



**COMPOSICIÓN QUÍMICA Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD  
ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Tithonia diversifolia* (HEMSL.)  
A. GRAY (ASTERACEAE) RECOLECTADA EN EL ESTADO MÉRIDA -  
VENEZUELA**

**Silvana Villarreal-Rivas<sup>1</sup>, María Villegas-Moreno<sup>1</sup>, Luis Rojas-Fermín<sup>1</sup>, Yndra  
Cordero de Rojas<sup>2</sup>, María Rodríguez-Arredondo<sup>3</sup>, David Castillo-Trujillo<sup>4</sup>**

- 1. Instituto de Investigaciones. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela.**
- 2. Departamento Bioanálisis Clínico. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela.**
- 3. Departamento de Farmacognosia y Medicamentos Orgánicos. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela.**
- 4. Departamento de Medicina Preventiva y Social. Facultad de Medicina. Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela.**

**Correspondencia:** Silvana Villarreal Rivas. Oficina de Educación Médica. Facultad de Medicina. Universidad de Los Andes. Av. Don Tulio, Mérida. Teléfono: (0274)2403106.

**Email:** silvanab@ula.ve

**RESUMEN**

El aceite esencial de las hojas y flores frescas de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray, obtenido por el método de Hidrodestilación utilizando la trampa de Clevenger. Se obtuvo



1,2 mL de aceite a partir de 1 kg de hojas y 0,6 mL de aceite en relación a 1,320 kg de flores, y se caracterizó por cromatografía de gases-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), *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853). El aceite esencial 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 CLAVE:** asteráceas, *Tithonia diversifolia*, aceites esenciales, actividad antibacteriana.

**CHEMICAL COMPOSITION AND EVALUATION OF ANTIBACTERIAL  
ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL OF *Tithonia diversifolia* (HEMSL.) A. GRAY  
(ASTERACEAE) COLLECTED IN MERIDA STATE - VENEZUELA**

**ABSTRACT**

The essential oil of fresh leaves and flowers of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray, obtained by hydrodistillation method using the Clevenger trap. It was obtained 1.2 mL of oil



from 1 kg of leaves and 0.6 mL of oil in relation to 1,320 kg of flowers, and it was characterized by chromatography gas-mass spectrometry (GC/MS), being able to identify as major components:  $\alpha$ -pinene (54.44%), limonene (19.26%), trans- $\beta$ -ocimene (10.90%),  $\alpha$ -farnesene (4.17%) and sabinene (4.03%) for the leaves; and  $\alpha$ -pinene (53.55%), limonene (11.57%), 2-4-hexadienal (8.99%), trans- $\beta$ -ocimene (4.42%), 1,8-cineole (3.68%),  $\alpha$ -farnesene (3.17%) and terpineol (3.05%) for the flowers. The antibacterial activity was determined by the agar disk diffusion method against international reference bacteria *Staphylococcus aureus* (ATCC 27923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). The essential oil from the flowers of *T. diversifolia* inhibited the bacterial growth of *Escherichia coli* with an MIC of 12.5 ppm and *Enterococcus faecalis* with an MIC of 50 ppm.

**KEYWORDS:** asteraceae, *Tithonia diversifolia*, essential oils, antibacterial activity.

## INTRODUCCIÓN

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 (1). 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 (2, 1).

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 (3). 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 (4). 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 (5).

Por lo antes expuesto, se planteó el estudio de la *T. 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, bioinsecticida, cáncer quimiopreventivos y repelente (6-9). 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 (10, 11). 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 (12).

Con respecto a las propiedades medicinales adjudicadas a la planta *T. diversifolia* (Hemsl.) A. Gray; están el tratamiento contra la diabetes, la malaria, enfermedades infecciosas, entre otras (13). Por otra parte, en México, que es el lugar de origen de la planta, se usa para esguinces, fracturas óseas, contusiones, para aliviar problemas dermatológicos, gastrointestinales y antiinflamatorios. Además, en el sur de China la utilizan para tratar enfermedades de la piel (como el pie de atleta), diurético, hepatitis, ictericia y cistitis (14). 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

planteó determinar la composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de hojas y flores de la *T. diversifolia* (Hemsl.) A. Gray (Asteraceae) contra cepas de referencia ATCC.

## METODOLOGÍA

### Material Vegetal

Las partes aéreas frescas de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray. (Asteraceae) fueron recolectadas 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 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. Un voucher



de cada muestra fue depositado bajo el número 01.

### **Extracción de los Aceites Esenciales**

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, hasta su utilización.

### **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 (15). 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 ( $C_7$ - $C_{22}$ ) (16). Los valores obtenidos se compararon con los valores publicados en la literatura (17, 18).

### Determinación de la Actividad

#### Antibacteriana

Para evaluar la actividad antibacteriana se empleó la técnica de difusión en agar con disco llamada también método de Kirby-Bauer. Se emplearon bacterias de referencia internacional: *S. aureus* (ATCC 27923), *E. faecalis* (ATCC 29212), *E. coli* (ATCC 25922), *K. pneumoniae* (ATCC 23357) y *P. aeruginosa* (ATCC 27853).

#### Método de Difusión en Agar con Discos

**Preparación de las Placas:** Se depositaron aproximadamente 20 mL de agar Müller-Hinton (HIMEDIA®) en placas de Petri (19), suplementado con 2 % p/v de glucosa y azul de metileno (0,05 µg/mL) (20). 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 Müller-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.

**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. 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.

**Concentración Inhibitoria Mínima (CIM):** Es la concentración más baja capaz de inhibir el crecimiento del microorganismo visible (19). Este método consiste en enfrentar a las cepas de referencia a diferentes concentraciones de las muestras (21). La cual se realizó preparando diluciones de los aceites esenciales con DMSO, y se impregnaron discos con 10 µL de cada dilución, para luego ser evaluados por el método de difusión en agar con discos.

## RESULTADOS

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

En la extracción de los aceites esenciales de *T. 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. 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. Con respecto al aceite extraído de las flores se identificaron 12 compuestos, que representan el 96,45 % del aceite obtenido.

Los elementos que componen el aceite esencial de las hojas y flores de la *T. diversifolia* (Hemsl). A. Gray., se pueden observar en las Tablas 1 y 2 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. 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, con compuestos testigos o con datos propios.

En relación a los 11 compuestos identificados del aceite esencial de las hojas de *T. diversifolia*, se reconocieron los siguientes como mayoritarios:  $\alpha$ -pineno (54,44 %), limoneno (19,26 %), trans- $\beta$ -ocimeno (10,90 %),  $\alpha$ -farneseno (4,17 %) y el sabineno (4,03 %).

Ahora bien, de los 12 compuestos volátiles identificados en el aceite de las flores de *T. diversifolia* se reconocieron los siguientes como 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 %).

**Tabla 1. 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 2. 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	terpineol	11,819	3,05	1180	1177
8	$\alpha$ -terpineol	12,232	1,08	1193	1189
9	hexadeceno	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.



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

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; por lo que el aceite de las flores se sometió al ensayo por el método de Kirby Bauer y CIM. De este modo, los resultados de la actividad antibacteriana del aceite esencial de las flores de *T. diversifolia* (Hemsl.) A. Gray, reportado en la Tabla 3, 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 4). Se considera que si las muestras ensayadas muestran una CIM menor a 100 µg/mL, la actividad antimicrobiana es buena (22).

Con respecto al resto de los microorganismos empleados en el ensayo antibacteriano, no fueron tomados en consideración para el estudio de la 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.



## DISCUSIÓN

Es importante señalar que debido a la ubicación geográfica, clima (cálido) y estación (mes de febrero) en la que fue recolectada la planta para la extracción de

los aceites esenciales, se puede comprender las diferencias en relación a la composición química de los mismos, al compararlos con los reportados en la literatura (23, 24).

**Tabla 3. 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.

**Tabla 4. 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>S. aureus</i> 27923	0	25 Eri	25	8	8	8	8	8
<i>Enterococcus faecalis</i>		9						



ATCC29212	0	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.

En relación a los compuestos mayoritarios identificados en el aceite esencial de las hojas de *T. diversifolia*, 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 presentes 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 (25).

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 (26);

asimismo, dichos compuestos se encuentran presente en la *Espeletia shultzei* Wedd (Asteraceae) (27). 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.

Por otro lado, en estudios previos de las hojas de *T. diversifolia* 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 (24, 28). 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 (25),  $\alpha$ -pineno (29) y  $\beta$ -pineno (27).

Además, los resultados obtenidos se correlaciona con los de Wanzala *et al.*, donde los aceites esenciales de las partes aéreas frescas de la *T. diversifolia* del oeste de Kenia, fueron analizados por CG/EM, donde el  $\alpha$ -pineno se produjo en la mayor cantidad (63,64%) (14). Se concluye que con la naturaleza de aplicaciones multipotenciales descritas de la especie botánica estudiada, sus metabolitos secundarios pueden ser útiles en el futuro en las industrias farmacéutica, agrícola, alimentaria y de perfumería.

Con respecto a la actividad antibacteriana ensayada, los resultados obtenidos pueden compararse con los repostados en la literatura, 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 (8). 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 (30).

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 (31).



Asimismo, se ha reportado 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 (32). 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 *E. 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 (30).

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* (33). De igual modo, 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 positivas. Estos resultados apoyan el reconocimiento fitoquímicos como compuestos antibacterianos alternativos para ser utilizado en formulaciones farmacéuticas (34).

## CONCLUSIONES

El estudio fitoquímico (componentes volátiles) del aceite esencial obtenido de las de las hojas de *T. diversifolia* (Hemsl.) A. Gray, mostró los siguientes mayoritarios:  $\alpha$ -pineno (54,44 %), limoneno (19,26 %), trans- $\beta$ -ocimeno (10,90 %),  $\alpha$ -farneseno (4,17 %) y el sabineno (4,03 %). Por su parte, el aceite de las flores 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 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.

## REFERENCIAS

1. Rocha C., Reynolds N.D., Simons M.P. Resistencia emergente a los antibióticos: Una amenaza global y un problema crítico en el cuidado de la salud. *Rev. Perú Med. Exp. Salud Publica*; 2015, 32 (1): 139-45.
2. Munita J.M., Arias C.A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Spectr.*; 2016,4 (2). doi: 10.1128/microbiolspec.
3. Da Silva G.J., Domingues S. Insights on the horizontal gene transfer of carbapenemase determinants in the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Microorganisms*; 2016, 4 (3):E29.



4. Troncoso C., Pavez M., Santos A., Salazar R., Barrientos L. Implicancias Estructurales y Fisiológicas de la Célula Bacteriana en los Mecanismos de Resistencia Antibiótica. *Int. J. Morphol.*; 2017, 35 (4):1214-1223.
5. Vivot E., Sánchez C., Cacik F., Sequin C. Actividad antibacteriana en plantas medicinales de la flora de Entre Ríos (Argentina). *Cienc. Docencia tecnol.*; 2012, 45: 177-189.
6. Chagas P.D., Oliveira R., Rocha B., Da Costa F. Ethnobotany, Chemistry, and Biological Activities of the Genus *Tithonia* (Asteraceae). *Chemistry & Biodiversity*; 2012, 9: 210-235.
7. Miranda M., Varela R., Torres A., Molinillo J., Gualtieri S., Macías F. Phytotoxins from *Tithonia diversifolia*. *Journal of natural products*; 2015, 78: DOI - 10.1021/acs.jnatprod.5b00040.
8. Miranda C., Cardoso M., Batista L., Rodríguez L., Rodrigues A., Figueiredo A. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogénicas. *Rev. Ciênc. Agron.*; 2016, 47 (1): 213-220.
9. Lezcano-Más Y., Soca-Pérez M., Roque-López E., Ojeda-García F., Machado-Castro R., Fontes-Marrero D. Forraje de *Tithonia diversifolia* para el control de estrongídeos gastrointestinales en bovinos jóvenes. *Pastos y Forrajes*; 2016, 39 (2): 133-138.
10. Terry S.A., Ribeiro R.S., Freitas D.S., Delarota G.D., Pereira L.G., Tomich T.R., Mauricio R.M., Chaves A. Effects of *Tithonia diversifolia* on *in vitro* methane production and ruminal fermentation characteristics. *Animal Production Science*; 2016, 56: 437-441.
11. Mauricio R.M., Calsavara L., Ribeiro R., Pereira L., Freitas D., Paciullo D., Barahona R., Rivera J.,



- Chará J., Murgueitio E. Feeding ruminants using *Tithonia diversifolia* as forage. *Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research*; 2017, 5 (4): 00146.
12. Mustonen P.S., Oelbermann M., Kass D.C. Biomass production and phosphorus use efficiency in two *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray genotypes. *Journal of Plant Nutrition*; 2015, 38:1083–1096.
13. Do Rocio M., Bonisconi C. Leaf and stem microscopic identification of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray (Asteraceae). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*; 2012, 48, (1): 109-116.
14. Wanzala W., Osundwa E.M., Alwala O., Gakuubi, M.M. Chemical composition of essential oil of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray from the Southern slopes of Mount Elgon in Western Kenya. *IJEPP*; 2016, 2 (2): 72-83.
15. Sandra P., Bicchi C. *Capillary Gas Chromatography in Essential Oil Analysis*. Heidelberg. 1987.
16. Kováts E. Retention indices aliphatischer, halogenide, aldehyde und ketone. *Helvetica Chimica Acta*; 1958, XLI, 1915.
17. Adams R.P. *Identificación de esencial oils components by gas chromatography / mass spectroscopy*. 1995.
18. Davies N.W. Gas chromatographic retention índices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silica and carbowax 20M. Phases. *Journal of chromatography A*; 1990, 502, 1-24.
19. *Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement*. Wayne, Pennsylvania: CLSI. 2014.



20. NCCLS. Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods; approved guideline. NCCLS document EP5-A2. 2 nd ed. Wayne, Pennsylvania. 2004.
21. Romero C.R. Microbiología y Parasitología Humana. Tercera edición. Editorial Médica Panamericana S. A. México D. F. 2007.
22. Holetz F.B., Pessini G.L., Sanches N.R., García C.D., Vataru N.C., Prado D.B. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro; 2002, 97 (7): 1027-1031.
23. Ruiz C., Díaz C., Rojas R. Composición química de aceites esenciales de 10 plantas aromáticas peruanas. Revista de la Sociedad Química del Perú; 2015, 81, (2): 81-94.
24. Essien E., Ascrizzi R., Flamini G. Characterization of volatile metabolites of *Tithonia diversifolia* (Hemsley) A. Gray leaves and flowers. American Journal of Essential Oils and Natural Products; 2018, 6 (2): 19-21.
25. Buitrago D., Morales A., Rojas-Fermín L., Lucena M., Araujo L., Moujir L. 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; 2016, 15 (1): 69-76.
26. Alza N., Murray A. Chemical Constituents and Acetyl-cholinesterase Inhibition of *Senecio ventanensis* Cabrera (Asteraceae). Rec. Nat. Prod.; 2016, 10 (4): 513-518.
27. Alarcón L., Peña A., Velasco J., Usubillaga A., Contreras-Moreno B., Rojas L., Ramírez D., Aparicio R. Composición química y evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Espeletia schultzei* Wedd (Asteraceae) recolectada en el estado



- Trujillo – Venezuela. Universidad de los Andes. Venezuela. *Revista ACADEMIA*; 2016, 15 (35): 69-79.
28. Dorcas O., Moronkola I.O., Walker T., Setzer W., Oyewole I. Identification of the main volatile compounds in the leaf and flower of *Tithonia diversifolia* (Hemsl) Gray. *Journal of Natural Medicines*; 2007, 61: 63-66.
29. Oliva A., Garzoli S., Sabatino M., Tadić V., Costantini S., Ragno R., Božović M. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don fil. (Asteraceae) from Montenegro. *Natural Product Research*; 2018, DOI:10.1080/14786419.2018.1538218
30. Bueno-Sánchez J.G., Martínez-Morales J.R., Stashenko E. Actividad antimicrobiana de terpenos. *Salud UIS*; 2009, 41: 231-23.
31. Nazzaro F., Fratianni F., De Martino L., Coppola R., De Feo V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals (Basel)*; 2013, 6, (12): 1451-74.
32. Ferreira A.L., Lobato A., Lopes R., De Menezes R., Ferreira C., Moreira S. Chemical characterization, antioxidant, cytotoxic and microbiological activities of the essential oil of leaf of *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray (Asteraceae). *Pharmaceuticals*; 2019, 12, 34: 1-14. Doi:10.3390.
33. De Sousa L., Costa F.T., Nunes G., Da Silva L.F., Benvindo F.S. Antibacterial potential of the alpha-pinene positive enantiomer against the strain *Proteus mirabilis*. *MOL2NET, International Conference Series on Multidisciplinary Sciences*; 2017, 3: 1-6.
34. Medeiros L.A., De Oliveira L.E., Leite E., Formiga M.M., Nogueira T.V., Almeida I. Inhibitory effect of  $\beta$ -



**ACTA BIOCLINICA**

**Original**

**S. Villarreal-Rivas**

**Volumen 12, N° 24, Julio/Diciembre 2022**

**Depósito Legal: PPI201102ME3815**

**ISSN: 2244-8136**

**DOI: <https://www.doi.org/10.53766/AcBio/2022.12.24.04>**

---

pinene,  $\alpha$ -pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences; 2007, 43 (1): 121-126.