

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA Y
FUNGICIDA *IN VITRO* DE *Tithonia diversifolia* (Helmsl) A. Gray**

**DIANA MARÍA LONDOÑO PÉREZ
DANIEL FERNANDO LÓPEZ NARANJO**

**UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA
FACULTAD DE INGENIERÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS-
BIOLOGÍA
MEDELLÍN
2016**

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA Y
FUNGICIDA *IN VITRO* DE *Tithonia diversifolia* (Helmsl) A. Gray**

**DIANA MARÍA LONDOÑO PÉREZ
DANIEL FERNANDO LÓPEZ NARANJO**

**Trabajo de grado para optar al título De Maestría En Ciencias Naturales y
Matemáticas-Biología**

**Director
CARLOS AUGUSTO HINCAPIÉ LLANOS
Doctor en Biología**

**UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA
FACULTAD DE INGENIERÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS-BIOLOGÍA
MEDELLÍN
2016**

Medellín, 30 de Julio 2016

Nosotros, Daniel Fernando Naranjo López y Diana María Londoño Pérez

“Declaramos que esta tesis (o trabajo de grado) no ha sido presentada para optar a un título, ya sea en igual forma o con variaciones, en esta o cualquier otra universidad” Art 82 Régimen Discente de Formación Avanzada.

Firma:



Daniel Fernando López Naranjo

C.C. 71742167 de Medellín



Diana María Londoño Pérez

C.C. 43362960 de San Pedro

“La ciencia es el alma de la prosperidad de las
naciones y la fuente de todo progreso”

Louis Pasteur

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dios su infinita bondad al permitirnos vida, salud, y la capacidad de participar en un proceso de cualificación hacia la construcción del entorno escolar, familiar y social.

A la Gobernación de Antioquia por posibilitar el acceso a la educación superior de los maestros y confiar en ellos la tarea de formar al ciudadano del presente y del mañana.

Al señor Sergio Fajardo Valderrama Gobernador de Antioquia quien en su periodo de gobierno confió en los maestros como gestores y multiplicadores del conocimiento para coayudar en la tarea de convertir a Antioquia en la más educada.

Al gobernador actual el señor Luis Pérez Gutiérrez quien continuo con el apoyo a los maestros y maestras de Antioquia en el mejoramiento de la educación.

A la Universidad Pontificia Bolivariana por abrirnos las puertas y permitirnos el acceso al conocimiento y a la investigación, preparándonos así

para un futuro competitivo y formándonos como personas de bien para el mejoramiento del entorno escolar y social.

Al director y asesor del proyecto de investigación Carlos Augusto Hincapié Llanos agradecemos su disposición y acompañamiento continuo en este proceso de formación e investigación científica.

A la microbióloga Mónica Liliana Cardona Aristizabal por su entrega, disposición y acompañamiento incondicional.

Al señor Javier Roldán Palacio, Botánico de la Universidad de Antioquia quien con su apoyo y orientación permitió la identificación taxonómica de la planta a estudiar.

A la Institución Educativa Entreríos y a la I. E. Luis Eduardo Arias Reinel, de Barbosa en cabeza de sus rectores por brindar el espacio para el desarrollo del ejercicio investigativo.

A nuestras familias, inmensa gratitud por apoyar la labor pedagógica y científica en aras del fortalecimiento de nuestra profesión y vocación docente.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	19
1. JUSTIFICACIÓN	22
2. PROBLEMA	25
3. OBJETIVOS	26
3.1. Objetivo general	26
3.2. Objetivos específicos	26
4. MARCO TEÓRICO	27
4.1. Contexto regional	27
4.2. Características de <i>T. diversifolia</i>	29
4.3. Actividades biológicas encontradas en <i>T. diversifolia</i>	31
4.3.1. Actividad antimicrobiana	31
4.3.2. Actividad de toxicidad	34
4.3.3. Actividad antiinflamatoria	35
4.3.4. Actividad antioxidante	36
4.3.5. Actividad fagodisuasiva	37
5. DISEÑO METODOLÓGICO	38

	pág.
5.1. Obtención de la planta	39
5.2. La recolección del material vegetal para proceso de laboratorio	40
5.3. Tratamiento previo de material vegetal	41
5.4. Secado de material vegetal	43
5.5. Molienda	44
5.6. Extracción por maceración a temperatura ambiente	45
5.7. Diseño de experimento	47
5.8. Preparación de soluciones	48
5.9. Prueba de sensibilidad	49
5.9.1. Preparación de inóculo	49
5.9.2. Preparación del medio	49
5.9.3 Siembra en profundidad	50
5.10. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB)	50
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
6.1. Identificación botánica de la planta	54
6.2. Material colectado y rendimientos de la extracción	55
6.3. Prueba de sensibilidad	57
6.4. Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida	
6.5. Discusión	63
CONCLUSIONES	70
RECOMENDACIONES	71
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Diagrama de flujo, metodología	38
Figura 2. Material vegetal de <i>T. diversifolia</i>	39
Figura 3. Colecta de <i>T. diversifolia</i>	40
Figura 4. Selección de material vegetal de <i>T. diversifolia</i>	41
Figura 5. Lavado de material colectado <i>T. diversifolia</i>	41
Figura 6. Secado de material vegetal de <i>T. diversifolia</i> a temperatura ambiente	42
Figura 7. Cuarto día de Secado de <i>T. diversifolia</i> a temperatura ambiente	43
Figura 8. Molienda en molino manual de <i>T. diversifolia</i>	44
Figura 9. Extracción por maceración de <i>T. diversifolia</i>	45
Figura 10. Filtrado <i>T. diversifolia</i>	45
Figura 11. Rotoevaporación de <i>T. diversifolia</i>	46
Figura 12. Inoculación de microorganismos	52
Figura 13. Identificación de <i>T. diversifolia</i>	53
Figura 14. Registro del número de Voucher de <i>T. diversifolia</i>	54
Figura 15. Pesaje <i>T. diversifolia</i>	55

	pág.
Figura 16. Prueba de sensibilidad del extracto de <i>T. diversifolia</i> obtenido con Etanol sobre <i>S. aureus</i>	56
Figura 17. Prueba de sensibilidad del extracto de <i>T. diversifolia</i> obtenido con Acetato de Etilo sobre <i>S. aureus</i>	57
Figura 18. Prueba de control con antibiótico (Ampicilina) sobre <i>S. aureus</i>	57
Figura 19. Prueba de sensibilidad del extracto de <i>T. diversifolia</i> obtenido con Hexano sobre <i>S. aureus</i>	58
Figura 20. Gráfica de residuos para diámetro para verificar el supuesto de independencia	60
Figura 21. Medias del diámetro de inhibición con intervalos de confianza <i>aureus</i> del 95,0% para los tratamientos según la prueba de Tukey ($P < 0,05$)	62
Figura 22. Tubos de macrodilución, proceso de concentración mínima inhibitoria	63
Figura 23. Unidades Formadoras de Colonias correspondiente a los tubos de ensayo de macrodilución 1, 2, 3, 4	65

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Usos de plantas aromáticas en el municipio de Barbosa	27
Tabla 2. Procedimiento prueba de concentración mínima inhibitoria	51
Tabla 3. Rendimiento de la extracción, con respecto al material vegetal deshidratado	55
Tabla 4. Diámetro medio del halo de inhibición para los extractos a partir de <i>T. diversifolia</i> sobre <i>S. aureus</i> con intervalos de confianza del 95,0%	61
Tabla 5. Resultados de la concentración mínima bactericida	64

ANEXOS

Anexo 1: Potencial del material vegetal como agente antimicrobiano

RESUMEN

El presente estudio evalúa la actividad bactericida de extractos obtenidos de la planta *Tithonia diversifolia* (Helmsl) A. Gray sobre las bacterias *Escherichia Coli* y *Staphylococcus aureus*, y su actividad fungicida sobre el hongo *Candida guilliermondii*. La planta se recolecta en la zona rural del municipio de Barbosa, Antioquia, Colombia. La identificación taxonómica fue realizada en el herbario de la Universidad de Antioquia. Se colectó la parte aérea de la planta y se le deshidrató por secado por convección a temperatura ambiente. 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 bacteria *S. aureus* presentó sensibilidad frente a los extracto etanol y acetato de etilo. Los demás organismos presentaron nula sensibilidad a los extractos. A partir de estos resultados se puede profundizar en técnicas y métodos que lleven a una aplicación agroindustrial de alto valor agregado de esta planta fomentando su siembra y creando una posible fuente de ingresos para sus productores.

Palabras clave: Aromáticas, Bactericida, Fungicida, Extractos.

ABSTRACT

This study assesses the bactericidal activity of extracts from the plant *Tithonia diversifolia* (Helmsl) A. Gray on *Escherichia Coli* bacteria and *Staphylococcus aureus*, and fungicidal activity on the fungus *Candida guilliermondii*. The plant is harvested in the rural area of the municipality of Barbosa, Antioquia, Colombia. Taxonomic identification was made in the Universidad de Antioquia herbarium. The aerial part of the plant was collected and dehydrated by convection drying at room temperature. The extractions were performed using the solvents ethanol, ethyl acetate and hexane. Susceptibility testing and In vitro minimum inhibitory concentration were made, determining that *S. aureus* bacteria showed sensitivity to ethanol extract and ethyl acetate. The rest organisms had no sensitivity to the extracts. From these results some techniques and methods can be gone in depth which can lead to agroindustrial high value-added application of this plant, promoting its planting and creating a possible source of income for its producers.

Keywords: Aromatic, Bactericide, Fungicide, Extracts.

GLOSARIO

En la realización de este proceso investigativo es necesario tener claro los conceptos más relevantes dentro de la etapa de revisión bibliográfica, de experimentación y valoración de los resultados para mayor comprensión del lenguaje científico. Se presentan en forma de glosario los conceptos clave.

Anticancerígenas: Sustancia o medicamento que evita o controla la aparición de células cancerígenas (Caisique, 2006).

Antiinflamatorias: Es el medicamento o procedimiento que desinflama los tejidos, está presente en productos naturales los cuales son procesados por análisis químicos en modelos *In vivo* o *In vitro* (Gómez Estrada, González Ruiz & Medina, 2011).

Antioxidantes: Son moléculas que retrasan la oxidación de otras moléculas y se encuentran en muchos alimentos (Messias, 2009)

Antitumorales: Son compuestos químicos que impiden el crecimiento de tumores, y la formación inadecuada de las células (Regueiro, 2015).

Antiviral: Son sustancias que provienen de la naturaleza o que han sido procesadas químicamente y propenden por interrumpir el ciclo o la etapa de un virus (Jassim & Naji, 2003).

Bactericidas: Sustancia de origen natural o sintetizada químicamente que es capaz de inhibir el crecimiento de las bacterias o eliminar más del 99.9% de ellas (Fontecha Umaña & Rodríguez Jerez, 2014).

Cultivo: Es el proceso por medio del cual las plantas dan fruto en beneficio de la tierra, el hombre y otros seres vivos (Donelan, 2009).

Cultivo microbiano: Es un proceso que permite el aislamiento de los gérmenes causantes o asociados a una infección, en este, no solamente se registra el agente etiológico, sino que también se tiene disponible para efectuar pruebas de tipificación, determinación de sensibilidad a antibióticos y capacidad bactericida de líquidos corporales (Ramírez, Ramírez & Pérez, 2006).

Hierbas: Plantas utilizadas con fines medicinales, culinarios e industriales; con componentes activos benéficos y/o perjudiciales para un organismo vivo. Son caracterizadas por sus tallos finos y flexibles, además de poseer poca altura (Ministerio de Agricultura, 2009).

Fungicida: Sustancia que sirve para inhibir el crecimiento de los hongos o parásitos que causan enfermedades o daños en un organismo vivo (Cámara, Escribano, Navarro, Toledano & García, 1991).

Ruderal: Hace referencia a la vegetación que se encuentra en los caminos, carreteras o espacios de cultivo abandonado por donde comúnmente pastorea el ganado o transitan las personas (Martínez, 2010).

INTRODUCCIÓN

El uso frecuente de las plantas a lo largo de la historia ha sido importante en la vida del ser humano, convirtiéndose en fuente de materias primas indispensables a nivel medicinal, alimenticio, aromático, farmacológico, cosmetológico y químico (Fernández, 2006). De ellas se han obtenido componentes que favorecen su existencia permitiendo utilizar y transformar la biodiversidad en aras del mejoramiento de la calidad de vida. (Datos que se pueden corroborar en el Anexo 1: Potencial del material vegetal como agente antimicrobiano, Capítulo I elaborado por los estudiantes Beatriz Eugenia López Pino, Claudia Patricia Arroyave Sosa, Daniel Fernando López Naranjo y Diana María Londoño Pérez como resultado de la revisión del estado del arte sobre la importancia de las plantas aromáticas y de los microorganismos como agentes patógenos).

Su incidencia en el sector de la salud ha llevado al colectivo científico a ahondar en diversos estudios a fin de optimizar el aprovechamiento de las mismas generando alternativas de prevención y control en las actividades de la cotidianidad. Es el caso de las enfermedades que causan algunos microorganismos cuando se adquieren por contacto directo; la *E. Coli* por ejemplo, tiene incidencia en patologías que se asocian con problemas gastrointestinales (Rodríguez, 2002), generalmente por ingesta de alimentos

contaminados y/o almacenados insalubrementemente (Hannaoui, Villalobos, & Nazaret, 2009). *S. aureus*, refiere estudios derivados de infecciones del torrente sanguíneo (Álvarez Lam. & Ponce Bittar, 2012) y *C. guillermondii* está presente en afecciones de las vías urinarias (Pinoni, Castán, Maegli, Lorenzo, Frizzera, Jewtuchowicz & Mujica, 2007) especialmente en mujeres en edad fértil (Suárez, 2010). (Ver Anexo 1, Capítulo II)

La *T. diversifolia* por condiciones agroambientales, se adapta fácilmente a las variedades climáticas del país y en especial en el área de estudio comprendida dentro del municipio de Barbosa, ubicado en el Valle de Aburrá, con una altura sobre el nivel del mar de 1300 m.s.n.m y unas condiciones agroecológicas propias de un clima subtropical, con temperatura promedio de 25 °C (Barbosa, 2015). A las plantas del género *Tithonia* se le han atribuido varias propiedades, entre las que se cuenta la actividad antiviral, vasodilatador, cáncer quimiopreventivos, bioinsecticida y repelentes (Chagas-Paula, Oliveira, Rocha & Da Costa, 2012).

Es conocida comúnmente en la región del Valle de Aburrá del departamento de Antioquia como falso Girasol o Botón de oro, es un arbusto valorado por sus atributos ornamentales y terapéuticos. En la cultura popular tiene valor en el tratamiento de enfermedades infecciosas (Duarte & Empinotti, 2012). En Centro y Sur América, en Asia y África es comúnmente usada como abono verde por su alto nivel de Fósforo incluso en suelos estériles (Sharrock,

Sinclair, Gliddon, Rao, Barrios, Mustonen, & Godbold, 2004). Es una planta originaria de Sudamérica con presencia activa en países como Colombia, Ecuador y Venezuela, por sus características reproductivas, se extiende formando poblaciones grandes (Villaseñor & Espinosa, 1998).

En este documento se evalúa la actividad bactericida de extractos obtenidos de la planta *T. diversifolia* sobre las bacterias *E. coli* y *S. aureus*, y la actividad fungicida sobre el hongo *C. guilliermondii*. Esta planta requiere mayor investigación para potenciar sus aplicaciones a nivel comercial y mejorar la producción y/o manejo en cultivos extensivos para crear una posible nueva fuente de ingreso para los pobladores del municipio de Barbosa.

1. JUSTIFICACIÓN

La vida del planeta depende de las plantas, que a través del proceso de fotosíntesis concentran la energía, convierten la materia orgánica en materia viva beneficiando a los seres que las consumen. Sin ellas no existirían los animales ni el hombre. Actúan como pulmones en la naturaleza debido a la transformación del Dióxido de Carbono en Oxígeno, son también fuente reguladora de agua, hábitat de animales y elemento primordial para el desarrollo y crecimiento de los seres vivos (Lahlou, 2004).

Desde los inicios de la humanidad, las plantas han ofrecido alimento y alivio para distintas enfermedades de los seres vivos, específicamente en los animales y humanos, lo que ha incurrido en el escenario popular, al reconocimiento de las bondades del reino vegetal. Al abordar los antecedentes teóricos del uso y aprovechamiento de este reino, es preciso reconocer el aporte de las culturas ancestrales, quienes desarrollaron conocimientos importantes acerca de las propiedades de las plantas. (Ver Anexo 1, Capítulo I)

La utilidad de las plantas a nivel alimenticio, medicinal, industrial y ornamental ha evolucionado con el hombre, y desde los sistemas económicos, ha cobrado mayor importancia. Es el caso de las plantas aromáticas que referencian un alto grado de consumo debido a su bajo costo. Por costumbre

popular, predomina el uso de aquellas que actúan sobre el sistema gastrointestinal, seguido por las plantas con propiedades antiinflamatorias, diuréticas y sedantes; de ellas se utilizan las partes aéreas tratadas para preparar infusiones y aliviar las dolencias e inflamaciones. Por lo anterior se han convertido en una forma de terapia medicinal, toda vez que es utilizada con fines preventivos, asumiendo que son de uso seguro, sin embargo su consumo indiscriminado presenta en algunos casos efectos adversos a la salud (Carballo, Cortada, & Gadano, 2005).

En el contexto nacional, Colombia es un país reconocido por su diversidad en fauna y flora. Las tribus indígenas con su tradición cultural, los grupos afro con el conocimiento de ellas, los campesinos con el cuidado y mantenimiento de las huertas, y las abuelas con su botica, se han constituido en la motivación para que comunidades científicas trabajen en el reconocimiento y la riqueza de las plantas (Ver Anexo 1, Capítulo I).

A nivel regional *T. diversifolia* es una planta que en el municipio de Barbosa se considera como una maleza pues se desarrolla a lo largo de la rivera del río Nechí (Río Medellín) o en zonas al borde de caminos veredales, convirtiéndose de manera natural en un cerco vivo. De igual manera se usa como base alimentaria de aves de corral o de especies menores como los conejos.

Con el presente trabajo, se pretende determinar la actividad fungicida y bactericida de *T. diversifolia* sobre microorganismos patógenos, ya que dentro de la tradición de los habitantes del municipio de Barbosa se encuentran usos en el tratamiento de afecciones de tipo infeccioso con esta planta, así como el manejo de dolores corporales; conocimiento este que se encuentra dentro de la sabiduría popular de los campesinos de manera empírica. De esta manera es como se incorporaron al tratamiento de afecciones causadas por *E. coli*, *S. aureus* y *C. guillermondii* por lo que se busca ampliar el conocimiento tradicional y sustentarlo desde el conocimiento científico determinando las propiedades antimicrobiales de la *T diversifolia*.

Se han realizado diversos estudios de los componentes de la planta encontrando metabolitos secundarios que han dado respuesta positiva en el control de los diferentes agentes patógenos; lo que permite tener un conocimiento sobre el potencial que tiene el material vegetal como agente antimicrobiano y sobre el control de las afecciones ocasionadas por estos patógenos, (Ver Anexo 1, Capítulo II) para desarrollar a partir de allí otro tipo de investigaciones que profundicen en la obtención de tratamientos relevantes a partir del material vegetal *T. diversifolia*.

2. PROBLEMA

El proyecto pretende determinar si existe actividad bactericida y fungicida en *T. diversifolia* en la inhibición del crecimiento de bacterias como *E. coli* y *S. aureus* y del hongo *C. guilliermondii* perjudiciales para la salud de los animales y el hombre.

Pregunta de investigación

¿El extracto de *T. diversifolia* presenta potencial bactericida *In vitro* contra las especies *E. coli* y *S. aureus* y fungicida *in vitro* contra el hongo *C. guilliermondii*?

Hipótesis

T. diversifolia presenta actividad bactericida y fungicida *in vitro* contra bacterias como *E. coli* y *S. aureus* y el hongo *C. guilliermondii*.

T. diversifolia no presenta actividad bactericida y fungicida *In vitro* contra bacterias como *E. coli* y *S. aureus* y el hongo *C. guilliermondii*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Determinar la actividad bactericida y fungicida *In vitro* de *Tithonia diversifolia* (Helmsl) A. Gray obtenida en el municipio de Barbosa en el departamento de Antioquia.

3.2. Objetivos específicos

- Obtener extractos a partir del material biológico recolectado usando solventes con diferentes polaridades.
- Evaluar la actividad bactericida de extractos obtenidos a partir del material vegetal recolectado de la planta *T. diversifolia* sobre las bacterias *E. coli* y *S. aureus*.
- Evaluar la actividad fungicida de extractos obtenidos a partir del material vegetal recolectado de la planta *T. diversifolia* sobre el hongo *C. guillermondii*.

4. MARCO TEÓRICO

Para el desarrollo de esta investigación se retomaron elementos del contexto regional del municipio de Barbosa específicamente del corregimiento Hatillo, de igual manera se avanzó en la búsqueda de artículos científicos que describen las diferentes actividades de la planta en estudio y a partir de los hallazgos en la literatura se establecen puntos de discusión en torno a sus propiedades biológicas y beneficios.

4.1. Contexto Del Municipio de Barbosa

El municipio de Barbosa se encuentra ubicado dentro de la región conocida como Valle de Aburrá, a una distancia de 36 km de la ciudad de Medellín. Fue fundado el 25 de agosto de 1795 y se encuentra a una Latitud Norte 6° 26' 21", Longitud Oeste 75° 20' 04" de Greenwich, con una altura de 1300 msnm. El territorio del municipio es montañoso y su relieve corresponde a la Cordillera Central Colombiana, sistema montañoso de los Andes y es clasificado como bosque húmedo subtropical con una humedad relativa del 70%, con 2000 a 2500 mm anuales de precipitación. Su economía está basada en actividades que implican la industria del cartón, papel, textiles, químicos, alimentos y confecciones. En el sector agropecuario se destacan la producción

de caña, café, cítricos y productos de pan coger como el maíz, el frijol y la piña (Barbosa, 2015).

En el municipio de Barbosa del departamento de Antioquia es común el uso de las plantas aromáticas para sanar múltiples dolencias o afecciones de salud (Bernal, Galeano, Rodríguez, Sarmiento & Gutiérrez, 2011). Ver tabla 1.

Tabla 1. Usos de plantas aromáticas en el municipio de Barbosa

Nombre Común	Nombre Científico	Uso
Stevia	(<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni)	Es comercializada por los pobladores de la zona a raíz de sus múltiples propiedades como edulcorantes de infusiones y demás alimentos (Lemus-Mondaca, R., Vega-Gálvez, A., Zura-Bravo, L., & Ah-Hen, K. 2012).
Salvia	(<i>Salvia officinalis</i> L.)	Crece como maleza en las laderas de la carretera y es consumida según la necesidad para aliviar problemas digestivos, hidratar la piel y el cuero cabelludo (Muñoz, F. 1996).
Mortiño	(<i>Vaccinium meridionale</i> Sw.)	Se cultiva en los huertos con fines comerciales y le son atribuidos beneficios para sanar enfermedades cardiovasculares, la diabetes y la artritis (Montoya, C. G., Ospina, C. O., Mesa, N. S., Cano, C. M., Lobo, M., Arias, P. G. G., & Pérez, B. R. 2009).
Apio	(<i>Apium Graveolens</i> L.)	Son utilizados las hojas y los tallos para la limpieza digestiva, dolores de estómago y diarreas, reducir el colesterol y tratar los hongos en la piel, actúa como repelente para los insectos. (Fonnegra, F. G., & Jiménez, J. R. 2007).
Caléndula	(<i>Caléndula Officinalis</i> L.)	Apetecida por sus flores actúa como depurador de la sangre, purgante y de uso dermatológico y cicatrizante (Muñoz, F. 1996).
Diente León	(<i>Taraxacum Officinale</i> L.)	Son usadas sus hojas, flores y raíz, para sanar enfermedades del hígado y del riñón, disminuir el colesterol en la sangre y como diurético (Fonnegra, F. G., & Jiménez, J. R. 2007).
Hinojo	(<i>Foeniculum Vulgare</i> Mill.)	Del cual se emplean el tallo y las semillas para problemas estomacales y digestivos, para mejorar la circulación y la producción de leche en mujeres lactantes (Muñoz, F. 1996).
Limoncillo	(<i>Cymbopogon Citratus</i> D.C.)	Se emplean sus hojas con el fin de curar la gripas y resaca (Fonnegra, F. G., & Jiménez, J. R. 2007).
Manzanilla	(<i>Chamaemelum Nobile</i> L.)	Sus flores son usadas como relajantes, para las venas varices, en problemas digestivos y cólicos menstruales (Muñoz, F. 1996).
Falso Girasol	<i>T. diversifolia</i> (Helmsl) A. Gray	Es utilizada como cercos vivos y cortinas rompe vientos en el sector agrícola, también como suplemento proteico en el ganado de leche. Las flores para decoración y elaboración de artesanías. Sus hojas para realizar masajes, emplastos e infusiones que alivian los dolores musculares y las infecciones (Kato, 1998).

Fuente: Elaboración Propia

4.2. Características de *T. diversifolia*

T. diversifolia es una planta que pertenece “al Reino Plantae, subreino Traqueobionta (plantas vasculares), división Magnoliophyta (plantas con flor), clase Magnoliopsida (dicotiledóneas), subclase Asteridae, orden Asterales, familia Asteráceas y género *Tithonia*” (Kato, 1998). Es una planta herbácea que de acuerdo a sus características botánicas oscila entre 1,5 a 4,0 m de altura, presenta una amplia red radicular con ramas fuertes, raíz principal fusiforme con numerosas derivaciones secundarias muy finas, con florecencias de tonalidades amarillas a naranja de 3 a 6 cm aproximadamente y corolas de 8 mm. Posee tallos erectos, ramificados, con hojas alternas, de formas y medidas irregulares (González, 2014). Dentro de los componentes activos encontrados en las hojas de *T. diversifolia*, están los alcaloides, fenoles, flavonoides, sesquiterpeno, monoterpenos y diterpenos (Oyewole, 2008).

En Colombia la *T. diversifolia* crece en condiciones agroclimáticas variadas, a una altura máxima de 2700 msnm, con precipitaciones anuales entre 800 a 5000 mm y en diferentes tipos de suelo; tolera condiciones de acidez y baja fertilidad (Kato, 1998).

A nivel departamental y especialmente en el municipio de Barbosa, la planta ha sido utilizada como cerco vivo y material forrajero para el consumo

del ganado; se intensificó su uso en el año 2010 y 2011 con un programa planteado desde la Gobernación para fomentar los bancos forrajeros para el ganado de leche, se implementó como sistemas para ramoneos en surcos, colocando unos alambrados con distancias aproximadas de tres metros (3 m), sembrando el botón de oro o falso girasol rodeado de otras especies de árboles para fomentar el sombrío en los potreros. Actualmente se usa como suplemento protéico para el ganado de leche y con programas de silvopastoreo orientados desde la UMATA para la alimentación del ganado (García F., Entrevista, 2015). Los habitantes de la región referencian su uso en la cotidianidad y asumen los beneficios medicinales de esta en tanto “la toman en infusión para evitar infecciones, hacen enjuagues para tratar heridas y llagas, así como los problemas de encías. Para mejorar los esguinces, golpes, luxaciones o moretones, se hacen masajes o se ponen emplastos en la zona afectada y manifiestan que se emplea en la elaboración de cremas y tónicos para estimular la circulación” (Agudelo, Entrevista, 2016).

Otras aplicaciones que le dan los habitantes de Barbosa a la planta son “el control de insectos como las hormigas, para el tratamiento de los golpes, la calentura, los calambres y las hinchazones”. Además, hacen uso de las flores para efectos decorativos y ornamentales (Agudelo, Entrevista, 2016).

4.3. Actividades biológicas encontradas en *T. diversifolia*

Los procesos biológicos desarrollados con *T. diversifolia* que marcan relevancia se relacionan con los diferentes métodos de extracción, solventes, concentraciones, tipo de ensayo o pruebas usadas y compuestos identificados en la actividad biológica los cuales se describen a continuación:

4.3.1. Actividad antimicrobiana

La proliferación de los microorganismos (bacterias, hongos, parásitos) es común en diferentes ambientes acuáticos, terrestres, hospitalarios. Su presencia afecta tanto a los animales como al hombre ya que son un reservorio en potencia con las condiciones apropiadas para su desarrollo. Estos se adaptan con facilidad al medio, generan infecciones y se vuelven resistentes a un antibiótico lo que les permite la supervivencia. Por tanto, las reacciones químicas entre los microorganismos, el medicamento y el tratamiento para eliminarlos o reducirlos se hacen cada día más importante, en el sentido de encontrar alternativas antimicrobianas que puedan ser utilizadas para combatir las infecciones de los seres humanos y de los animales, ya sea en los alimentos o como desinfectantes en el ambiente superando los problemas de resistencia bacteriana (Manrique, E & Mosquera O. 1997).

En este sentido, existe un marcado interés en el estudio de las plantas con propiedades farmacológicas ya que de ellas se deriva un potencial importante de compuestos químicos con efecto antimicrobiano que puede ser

analizado en procesos *In vitro* o *In vivo* donde sus componentes activos son la base para la síntesis de nuevos productos en el tratamiento de las infecciones. No obstante, la utilización de las plantas medicinales ha sido un legado de los ancestros quienes las emplearon para atender diversas afecciones y defenderse frente a los ataques de los microorganismos, insectos y otros animales (Domingo, D., & López-Brea, M. 2003).

Para determinar la actividad microbiológica de la *T. diversifolia*, sobre células tumorales humanas Orsomando *et al*, 2016 en el estudio Mexican sunflower (*Tithonia diversifolia*, Asteraceae) volatile oil as a selective inhibitor of *Staphylococcus aureus* nicotinate mononucleotide adenyltransferase (NadD) analizaron la actividad y efectos antimicrobianos del aceite esencial de inflorescencias de *T. diversifolia* por el método de difusión en agar en cepas de *S. aureus* y *E. coli*, observándose de manera *In vitro* la inhibición de la enzima NAD biosintética puro NadD de *S. aureus* marcada con un halo de 14 mm (Orsomando, Agostinelli, Bramucci, Cappellacci, Damiano, Lupidi & Petrelli, 2016).

Así mismo, en los organismos *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*, *Corynebacterium pyogenes*, *S. aureus*, *Streptococcus faecalis*; *E.coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Shigellady senteriae*, se realizaron pruebas antibacterianas a partir

de los extractos de hexano, acetato de etilo y metanol de la hoja seca de *T. diversifolia* encontrando que el extracto de acetato de etilo fue el que mostró mayor actividad inhibidora en las cepas estudiadas. Posteriormente se realizan pruebas con un sesquiterpenlactonas 1 aislado del extracto de acetato de etilo reportando actividad antimicrobial contra todos los microorganismos ensayados, excepto para *S. aureus* y *B. cereus*. El extracto de hexano también mostró actividad inhibitoria contra tres cepas Gram positivo (*B. stearothermophilus*, *B. subtilis* y *C. sporogenes*), en *E. coli* Gram negativo y en el hongo *C. albicans*. Mientras que el extracto de metanol se activó sólo contra dos cepas Gram positivo (*B. subtilis* y *B. anthracis*) y dos cepas Gram negativo (*E. coli* y *K. pneumonia*) y en el hongo *C. albicans* (Obafemi, C. A., Sulaimon, T. O., Akinpelu, D. A., & Olugbade, T. A. 2006).

Los resultados obtenidos a partir de los reportes anteriores muestran como respuesta una actividad antimicrobiana apreciable contra algunos agentes patógenos, considerándose especial el extracto de las hojas de *T. diversifolia*; el de mayor incidencia es el obtenido a partir del solvente etanólico cuya acción inhibitoria es mejor que la obtenida de los extractos de metanol.

A través del estudio realizado por Linthoingambi, *et al.* 2013, se muestra la eficiencia de los extractos de hojas de *T. diversifolia* con éter de petróleo, cloroformo y metanol (disolventes orgánicos) frente a nueve especies de hongos patógenos de plantas: *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*,

Aspergillus flavus, *Aspergillus niger*, *Cuvularia lunata*, *Drechslera oryzae*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium expansum* y *Penicillium italicum* y cuatro bacterias patógenas en humanos: *Faecalis enterococcus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*. El informe registra que los tres extractos mostraron efecto inhibitorio contra todas las bacterias probadas siendo más alto el inducido por éter de petróleo y el de cloroformo contra el *S. aureus* que mostró un halo de inhibición de 11.6 y 11.4 mm, respectivamente (Linthoingambi, W., & Singh, M. S. 2013).

4.3.2. Actividad de toxicidad

Elufioye *et al*, 2009, en el estudio Toxicity studies of *Tithonia diversifolia* A. Gray (Asteraceae) in rats, evaluó la toxicidad del extracto etanólico de la parte aérea de *T. diversifolia* sobre ratas Wistar adultas administrado de manera oral dosis de 400-1600 mg/kg y posteriormente, se sacrificaron los animales para examinar diversos órganos en un rango de tiempos de 30 min hasta 24 h después de la administración. Los estudios mostraron un efecto tóxico reversible en el riñón y el hígado, mientras que no se presentó ningún efecto adverso notable en la morfología del corazón, el bazo y el cerebro (Elufioye, Alatis, Fakoya, Agbedahunsi & Houghton, 2009).

Goffin *et al*, 2002 evaluó las propiedades antimaláricas *In vitro* contra tres cepas de *Plasmodium falciparum* a partir del extracto de *T. diversifolia*

obtenido con el solvente éter; para la evaluación de dichas propiedades se realizó un bioensayo que condujo al aislamiento de la sesquiterpeno lactona C tagitinina conocido como un componente activo contra el *P. falciparum* (IC 50 en la cepa FCA: 0,33 microg / ml). Se encontró que el extracto presentó actividad antiplasmodial (IC 50 en la cepa FCA: 0,75 microg / ml), además el estudio revela propiedades citotóxicas contra el microorganismo evaluado (IC₅₀ en células HTC-116: 0,706 microg / ml). (Goffin, Ziemons, De Mol, De Madureira, Martins, da Cunha & Frederich, 2002).

4.3.3. Actividad antiinflamatoria

Owoyele *et al*, 2004 referencia el uso de *T. diversifolia* en actividades antiinflamatorias y analgésicas para el tratamiento de condiciones inflamatorias dolorosas (Owoyele, Wuraola, Soladoye, & Olaleye, 2004) referenciando que los órganos que tienen mayor riesgo de inflamación son el riñón y el corazón, por lo que pueden comprometer la salud de animales y personas. Frente a esto, Elufioye *et al*, 2004 a través del estudio de toxicidad de la planta encontró componentes anti-inflamatorios y analgésicos como fenoles, flavonoides, saponinas, alcaloides, esteroides, taninos y cumarinas que pueden ser utilizados como bases para investigaciones futuras y posibles aplicaciones de *T. diversifolia* en las industrias farmacéutica o alimentaria (Elufioye, T. O. & Agbedahunsi, J. M. 2004).

4.3.4. Actividad antioxidante

A través de un tamizaje fitoquímico realizado para identificar compuestos de las partes aéreas de *T. diversifolia* se detectó la presencia de taninos, flavonoides y fenoles reconocidos por retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas (Thielecke & Boschnabb, 2009).

Otros estudios permiten justificar el uso de la planta para reducir el desarrollo de enfermedades que afectan a la población mundial. En el trabajo realizado por Kriss Dayana Pantoja Pulido *et al*, 2014 a partir de un fraccionamiento biodirigido a extractos polares de *T. diversifolia*, con el fin de encontrar compuestos fenólicos, se hallaron compuestos fenólicos de tipo derivados de ácido cinámicos en extractos butanólico (Pulido, K. D. P., Martínez, J. H. I., & De Vélez, A. J. C. 2014)

4.3.5. Actividad fagodisuasiva

Con el extracto etanólico de *T. diversifolia*, se encontró actividad fagodisuasiva sobre el insecto plaga *Bemisia tabaci* Gennadius. Se usó como método de extracción la maceración en etanol al 70% y luego se realizó un fraccionamiento en solventes de alta polaridad (hexano, acetato de etilo, metanol y diclometano). Se encontraron como posibles compuestos responsables triterpenos, esteroides etéreos y alcohólicos, saponinas y taninos (Bagnarello, Hilje, Bagnarello, Cartín & Calvo, 2009).

5. DISEÑO METODOLÓGICO

El protocolo a seguir en el desarrollo de la metodología atiende al trabajo de Maestría en Ciencias Naturales y Matemáticas – Biología realizado por Beatriz Eugenia López Pino y Claudia Patricia Arroyave Sosa con la Determinación de la actividad bactericida y fungicida *in vitro* del *Ageratum conyzoides* L. y los estudiantes Daniel Fernando López Naranjo y Diana María Londoño Pérez en la Determinación de la actividad bactericida y fungicida *in vitro* de *Tithonia diversifolia* (Helmsl) A. Gray en coordinación con el director del trabajo Carlos Augusto Hincapié Llanos. La diferencia radica en la planta usada por cada grupo, en las características de las regiones donde se realizó la colecta del material vegetal y los resultados obtenidos frente a la prueba de sensibilidad ya que se realizó un procedimiento adicional con el extracto de *T. diversifolia*.

Para determinar la actividad bactericida y fungicida *In vitro* de *T. diversifolia* (Helmsl) A. Gray se desarrollarán una serie de actividades que se resumen en el siguiente diagrama de flujo (Figura 1).

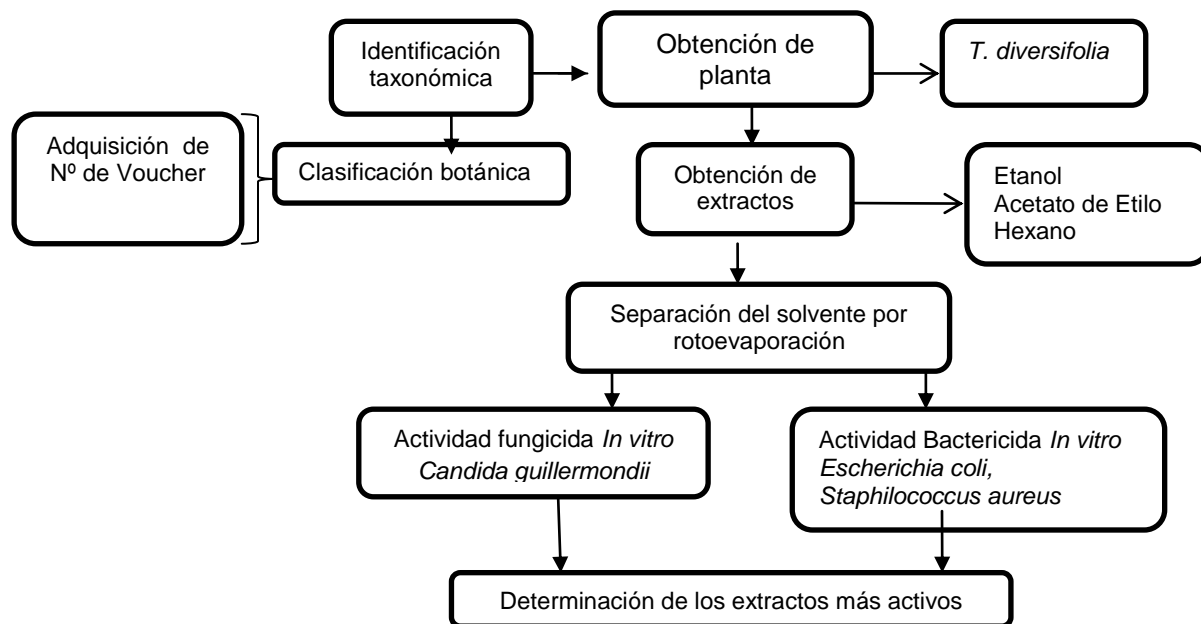


Figura 1. Diagrama de flujo, metodología

Fuente: Elaboración propia.

5.1. Obtención de la planta

Se realizó el día 10 de julio de 2015 la colecta de la parte aérea del espécimen (Figura 2), en el kilómetro 9 del corregimiento el Hatillo con la ayuda de productores agrícolas que conocían la existencia de la planta y se registraron coordenadas y altura sobre el nivel del mar para su posterior identificación en el herbario de la Universidad de Antioquia.



Figura 2. Material vegetal de *T. diversifolia*

Fuente: Elaboración propia.

5.2. La recolección del material vegetal para proceso de laboratorio

Se realizan colectas de la parte aérea del espécimen de *T. diversifolia* en el lugar donde se recolectó la planta para su identificación el día 5 de septiembre de 2015, tomando el registro fotográfico. La colecta se realizó como se ve en la Figura 3.



Figura 3. Colecta de *T. diversifolia*

Fuente: Elaboración propia.

5.3. Tratamiento previo de material vegetal

Se preparó una solución de 10 l de agua por 40 cm^3 de hipoclorito de sodio al 5.25%, a fin de lavar el material vegetal para eliminar suciedades y polvo retirando manualmente material dañado o enfermo. Como se observa en las Figuras 4 y 5.



Figura 4. Selección de material vegetal de *T. diversifolia*

Fuente: Elaboración propia.



Figura 5. Lavado de material colectado *T. diversifolia*

Fuente: Elaboración propia.

5.4. Secado de material vegetal

Se realizó a temperatura ambiente esparciendo el material en la forma en que aparece en la Figura 6. Se determinó manualmente el nivel de deshidratación del material recolectado, el cual fue alcanzado el día 4 (Figura 7) dado por los cambios de su color y estructura.



Figura 6. Secado de material vegetal de *T. diversifolia* a temperatura ambiente

Fuente: Elaboración propia.



Figura 7. Cuarto día de Secado de *T. diversifolia* a temperatura ambiente

Fuente: Elaboración propia.

5.5. Molienda

Se hizo una reducción de tamaño en molino manual (Figura 8), para aumentar la superficie de contacto con los solventes hasta obtener un polvo uniforme, tamizando con malla 18.



Figura 8. Molienda en molino manual de *T. diversifolia*

Fuente: Elaboración propia.

5.6. Extracción por maceración a temperatura ambiente

Se prepararon 3 diferentes tipos de extractos basados en la polaridad del solvente usado. Los solventes utilizados fueron hexano (apolar), acetato de etilo (medianamente polar) y etanol (polar), para cada extracto se pesaron en balanza analítica 10 g de material vegetal de *T. diversifolia* y se le agregaron 100 ml del solvente correspondiente depositado en un recipiente de vidrio. El solvente se mantuvo en contacto con el material vegetal durante 48 h (Figura 9). Pasado ese tiempo se filtró la mezcla (Figura 10), se centrifugó (6000 rpm, 5 min) y se recuperó por destilación a presión reducida en rotoevaporador (Laborata 2010, Heidolph) a 40 °C, eliminando el solvente hasta la sequedad (Figura 11). Posteriormente, el solvente recuperado se depositó en un

recipiente con el material vegetal. Este proceso se realizó 3 veces (Vidaurre Martínez, Querevalú García, De los Ríos Martínez & Ruiz Reyes, 2007) en las instalaciones del laboratorio de Ingeniería Agroindustrial en el Campus UPB Laureles, Medellín, Colombia.



Figura 9. Extracción por maceración de *T. diversifolia*

Fuente: Elaboración propia.



Figura 10. Filtrado *T. diversifolia*

Fuente: Elaboración propia.



Figura 11. Rotoevaporación de *T. diversifolia*

Fuente: Elaboración propia.

EL rendimiento de la extracción se calculó usando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Peso extracto}}{\text{Peso material Vegetal seco}} \times 100$$

Ecuación 1: Porcentaje rendimiento

5.7. Diseño de experimento

Para cada microorganismo (*E. coli*, *C. guillermondii* y *S. aureus*) se realizó un diseño completamente al azar con cinco tratamientos (3 extractos, control absoluto (ausencia de tratamiento) y control relativo (ampicilina)) con

tres repeticiones cada uno. Se usó una concentración de dos por ciento (2%) de la solución del extracto evaluado. En los casos donde se obtienen resultados positivos con los extractos se realiza el análisis de varianza con un nivel de confianza del 95% y la prueba de Tukey, en caso de encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

5.8. Preparación de soluciones

Los extractos obtenidos se llevaron a una concentración del 2% en agua destilada y esterilizada. Se usó dicha concentración dado que, de acuerdo a ensayos previos, no se lograron concentraciones mayores debido a la baja solubilidad de cada extracto. Se prepararon 6 ml de cada solución. Para los extractos obtenidos con acetato de etilo y hexano se usó tween 80 al 0,2%, como agente emulsionante para lograr formar una emulsión. La ecuación usada para calcular la cantidad de agua que se debió agregar para lograr la concentración deseada es la siguiente:

$$2\% = \frac{2 \text{ g extracto}}{100 \text{ ml soln}} \times 6 \text{ ml}$$

Ecuación 2: Fórmula para cada extracto

Se realizó un experimento adicional utilizando hexano como solvente en la preparación de las soluciones para evaluar su actividad antimicrobiana pero

éste causó que se secase el medio de cultivo y se dañara el experimento, por lo que se decidió solubilizarlo sólo en agua.

5.9. Prueba de sensibilidad

La determinación de la actividad antimicrobiana del extracto de *T. diversifolia*; se realizó mediante la técnica de difusión en pozo como prueba semicuantitativa. Posteriormente se realizaron las pruebas de: Concentración mínima inhibitoria (CMI) y Concentración mínima bactericida (CMB) como ensayos confirmatorios de tipo cuantitativo. Los microorganismos testeados fueron: bacterias *S. aureus*, *E. coli* y el hongo levaduriforme *C. guilliermondii*.

5.9.1 Preparación del inóculo

Se activaron las cepas de *S. aureus*, *E. coli* y *C. guilliermondii* dispuestas en el banco de cepas del laboratorio GRAIN de la Universidad Pontificia Bolivariana, conservadas bajo el método comercial Criobank. Para ello, se removió la perla del criobank y se inoculó en 10 ml de caldo nutritivo y saboraud incubando a 37 °C durante 24 h.

5.9.2 Preparación del medio

Se preparó el Agar Mueller - Hinton (MH) de acuerdo a las indicaciones de la etiqueta, conservándolo en estado líquido a una temperatura de 45 °C. En cada caja se vertieron 50 µl por microorganismo (*S. aureus*, *E. coli* y *C.*

guillermondii) y 20 ml del medio Muller – Hinton. Se realizó un homogenizado de la mezcla.

5.9.3 Siembra en profundidad

Después de 15 min y utilizando un sacabocados estéril se realizaron tres (3) pozos por caja; perforando el medio de cultivo hasta el fondo de la caja para obtener un pozo de 3 mm de diámetro con bordes uniformes. Luego se adicionaron 50 µl de los extractos a evaluar en cada pozo.

El control absoluto se realizó usando tween 80 al 0,2% y agua destilada y esterilizada, para el control relativo se usaron los anteriores ingredientes más ampicilina comercial (antibiótico) a 1 g / ml y se llevaron a incubadora a 37 °C por 24 h.

Finalmente, se realizó la lectura de la susceptibilidad antimicrobiana, por observación y medición del halo de inhibición alrededor de cada pozo. Los ensayos se realizaron por triplicado para cada aislamiento.

5.10. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y Concentración mínima bactericida (CMB)

De acuerdo a los resultados de la prueba inicial de difusión de pozo. Se seleccionó la concentración a la cual se evidenció actividad antimicrobiana y a partir de ésta se realizó la prueba de CMI para determinar la menor concentración del extracto que inhibe el crecimiento de las bacterias. Y se determinó la Concentración Mínima Bactericida (CMB), que corresponde a la mínima concentración de antimicrobiano que elimina a más del 99,9% de los microorganismos viables después de 24 h de incubación

La concentración mínima inhibitoria se evaluó mediante el método de macrodilución a partir de una concentración al 2% del extracto con los solventes que presentaron sensibilidad (acetato de etilo y etanol).

Se tomaron diez (10) tubos de ensayo con 1 ml de caldo nutritivo en cada uno y se adicionó 1 ml del extracto con diluciones seriadas como lo muestra la tabla 2. Finalmente se inoculó 1 ml de solución bacteriana en cada uno de los diez tubos valorando según la escala de Mc Farland N° 0.5 la turbidez por observación visual (Chiang, 1985). En este procedimiento se realizaron los respectivos controles; el control positivo con caldo nutritivo y suspensión

bacteriana y el control negativo sin caldo nutritivo ni suspensión bacteriana. Se incubaron por 24 h a 37 °C.

Tabla 2. Procedimiento prueba de concentración mínima inhibitoria

Tubos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Control
Caldo nutritivo	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml
Extracto	1ml	Del anterior 1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml Descartar 1 ml	1ml
Inóculo	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	X
Concentración mg/mL	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	

Fuente: Elaboración propia.

La concentración mínima bactericida se evaluó a partir de aquellos tubos que no presentaron crecimiento los cuales fueron subcultivados en cajas con agar para verificar crecimiento.

Para determinar la CMB se extrajeron 100 µL de los tubos en los cuales no se observó crecimiento visible de la bacteria (inhibición de crecimiento); ésta suspensión fue inoculada en placas Petri debidamente rotuladas con la concentración correspondiente, añadiéndose luego agar MH a 45 °C aproximadamente. Se utilizó como control positivo agar MH con 100 µL de inóculo sin antimicrobiano, y como control negativo, agar MH sin inóculo y sin antimicrobiano. Las placas se dejaron incubar durante 24 h a 35 °C. Los

aislados fueron considerados sensibles al extracto cuando no hubo crecimiento en las placas después de 24 h de incubación, cada ensayo fue sometido a 3 repeticiones.

La concentración mínima bactericida (CMB) se consideró como la dilución más alta en la cual no se presentó crecimiento bacteriano. Ver Figura 12.



Figura 12. Inoculación de microorganismos

Fuente: Elaboración propia.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Identificación botánica de la planta

Se realizó con la ayuda del Botánico Javier Roldán Palacio de la Universidad de Antioquia, quien recibe el espécimen de 32 cm por 42 cm aproximadamente el mismo día de colectada, informando lugar de procedencia y el respectivo registro fotográfico para la identificación taxonómica de la planta (Figura 13). En las instalaciones de la Universidad de Antioquia Bloque 2, herbario 411 se procede a secar y prensar la muestra a una temperatura de 40 °C.

<p>Nombre Común: Margaritón Nombre Científico: <i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl) A. Gray Lugar: Antioquia: Municipio de Barbosa, Corregimiento de Hatillo, elevación media 1350 msnm Coordenadas: N 06° 43' 65.5'' O 075° 33' 21.13'' Colectores: Diana María Londoño Pérez Daniel Fernando López Naranjo Universidad Pontificia Bolivariana Maestría en Ciencias Naturales y Matemáticas- Biología. Planta Arbustiva de 4m, inflorescencias amarillas. Fecha: 11 de Julio de 2015</p>	<p>Registro Fotográfico:</p> 
---	---

Figura 13. Identificación de *T. diversifolia*

Fuente: Elaboración propia.

El día 9 de septiembre de 2015 se recibe el registro del número de voucher (Figura 14): HUA 198377 *Tithonia Diversifolia* (Helms.) A. Gray.



Figura 14. Registro del número de Voucher de *T. diversifolia*

Fuente: Herbario Universidad de Antioquia, 2015, s.p.

6.2. Material Colectado y rendimiento de la extracción

El material vegetal colectado para las pruebas de laboratorio fue en total 7.2 kg como se ve en la Figura 15.



Figura 15. Pesaje *T. diversifolia*

Fuente: Elaboración propia.

Los resultados de los rendimientos de la extracción, con respecto al material deshidratado, se encuentran en la tabla 3.

Tabla 3. Rendimiento de la extracción, con respecto al material vegetal deshidratado

Solvente	Etanol	Acetato de Etilo	Hexano
Rendimiento de extracción (%)	6,136	4,11	1,629

Fuente: Elaboración propia.

6.3. Prueba de sensibilidad

Primero se realizó la prueba de sensibilidad en pozo con los tres microorganismos, y sólo se obtuvieron resultados (halos de inhibición) sobre *S. aureus* con los extractos obtenidos a partir de etanol marcando un halo de inhibición de 3.2 mm (Figura 16) y acetato de etilo registrando un halo de inhibición de 3.66 mm (Figura 17). El control mostró un halo de inhibición de 17,66 mm (Figura 18). Con el extracto hexánico no se obtuvieron resultados (Figura 19). Como sobre *E. coli* y *C. guillermondii* no se tuvieron resultados, es decir, no se presentaron halos de inhibición con ninguno de los extractos, no se realizó el Análisis de varianza (ANOVA).

Radio para extracto de etanol: 3.2 mm



Figura 16. Prueba de sensibilidad del extracto de *T. diversifolia* obtenido con Etanol sobre *S. aureus*

Fuente: Elaboración propia.

Radio para extracto de Acetato de Etilo: 3.66 mm

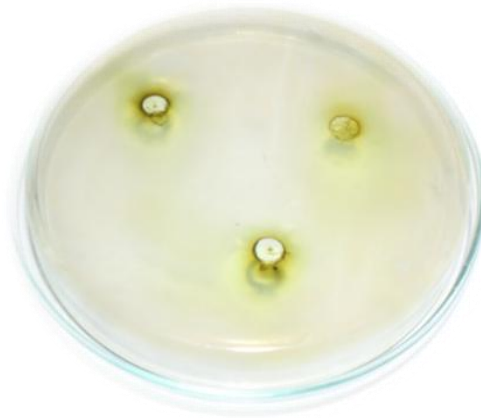


Figura 17. Prueba de sensibilidad del extracto de *T. diversifolia* obtenido con Acetato de Etilo sobre *S. aureus*

Fuente: Elaboración propia.

Radio para control: 17.66 mm

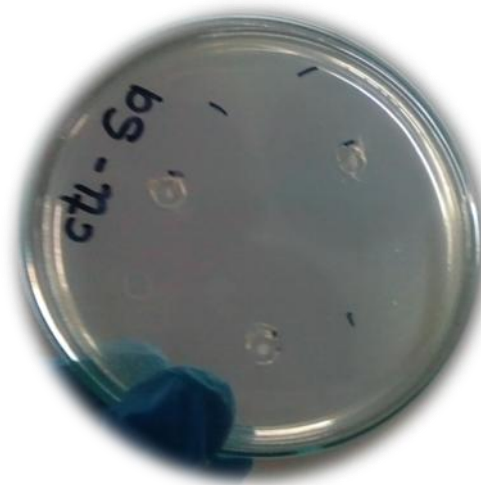


Figura 18. Prueba de control con antibiótico (Ampicilina) sobre *S. aureus*

Fuente: Elaboración propia.

Con Hexano, se verificó el resultado en dos oportunidades y los diferentes microorganismos mostraron resistencia (Figura 19).



Figura 19. Prueba de sensibilidad del extracto de *T. diversifolia* obtenido con Hexano sobre *S. aureus*

Fuente: Elaboración propia.

Dado que se obtuvieron resultados positivos para *S. aureus* se procedió a realizar el Análisis de varianza, comenzando por la verificación de sus supuestos de la ANOVA usando el programa Statgraphics Centurion XVII obteniendo resultados a partir de los siguientes datos:

Homogeneidad de varianza: Para este supuesto las hipótesis son:

- H_0 : No hay homogeneidad de varianza
- H_a : Si hay homogeneidad de varianza

Se realizó el test de Levene obteniendo un valor P de 0,0597342 en el test. Como valor $P > 0,05$ entonces se acepta la hipótesis alterna, lo que quiere decir que si cumple el supuesto de homogeneidad de varianza.

Normalidad: Para este supuesto las hipótesis son:

- H_0 : No hay un comportamiento normal en los datos.
- H_a : Si hay un comportamiento normal en los datos.

Se realizó el test de Shapiro-Wilk para cada uno de los tratamientos donde se obtuvieron datos diferentes a cero registrando un valor P de 0,964972 para el tratamiento realizado con el extracto obtenido con etanol, un valor P de 0,999999 para el tratamiento con el extracto obtenido con acetato de etilo y un valor P de 0,6369 para el control relativo (antibiótico). Como el valor P en todos los casos fue $> 0,05$ entonces se acepta la hipótesis alterna, lo que quiere decir que si cumple el supuesto de normalidad.

Independencia: Para verificar este supuesto se debe obtener la gráfica de secuencia u orden de toma de los datos (Número de fila) Vs residuos y verificar que no haya patrones, lo cual se puede ver en la figura 20. Como no

hay patrones detectables se puede afirmar que se cumple con el supuesto de independencia.

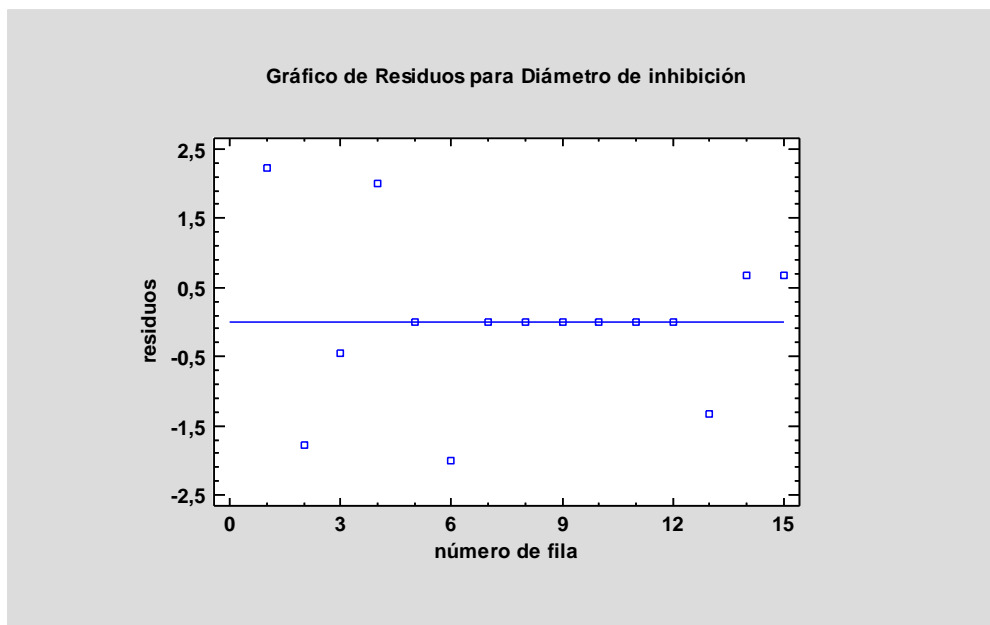


Figura 20. Gráfica de residuos para diámetro para verificar el supuesto de independencia

Fuente: Elaboración propia.

Verificado el cumplimiento de los supuestos se procedió a realizar el ANOVA usando el software Statgraphics Centurion XVII obteniendo los siguientes resultados

ANOVA para diámetro de inhibición por tratamiento

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	2584,12	4	646,031	340,63	0,0000
Intra grupos	18,9659	10	1,89659		

Las hipótesis para el ANOVA son:

- Ho: No hay diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos
- Ha: Hay diferencia estadísticamente significativa entre al menos dos de los tratamientos.

Como se puede observar valor P es $0,0000 < 0,05$ por tanto se acepta la hipótesis alterna, lo que quiere decir que hay diferencia estadísticamente significativa entre al menos dos de los tratamientos, para determinar entre cuales se realizó la prueba de Tukey. Los resultados pueden verse en la tabla 4 y en la Figura 21.

Tabla 4. Diámetro medio del halo de inhibición para los extractos a partir de *T. diversifolia* sobre *S. aureus* con intervalos de confianza del 95,0%

Tratamiento		Media	Intervalo de confianza
Nombre	Código		
Extracto usando acetato de etilo	TAESa	7,33b	(5,48 - 9,18)
Extracto usando etanol	TESa	6,45b	(4,60 - 8,30)
Extracto usando hexano	THSa	0,00a	(-1,85 - 1,85)
Control absoluto	CNSa	0,00a	(-1,85 - 1,85)
Control relativo (antibiótico)	CPSa	35,33c	(33,48–37,18)

Las medias con la misma letra no tiene diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Tukey ($P < 0,05$)

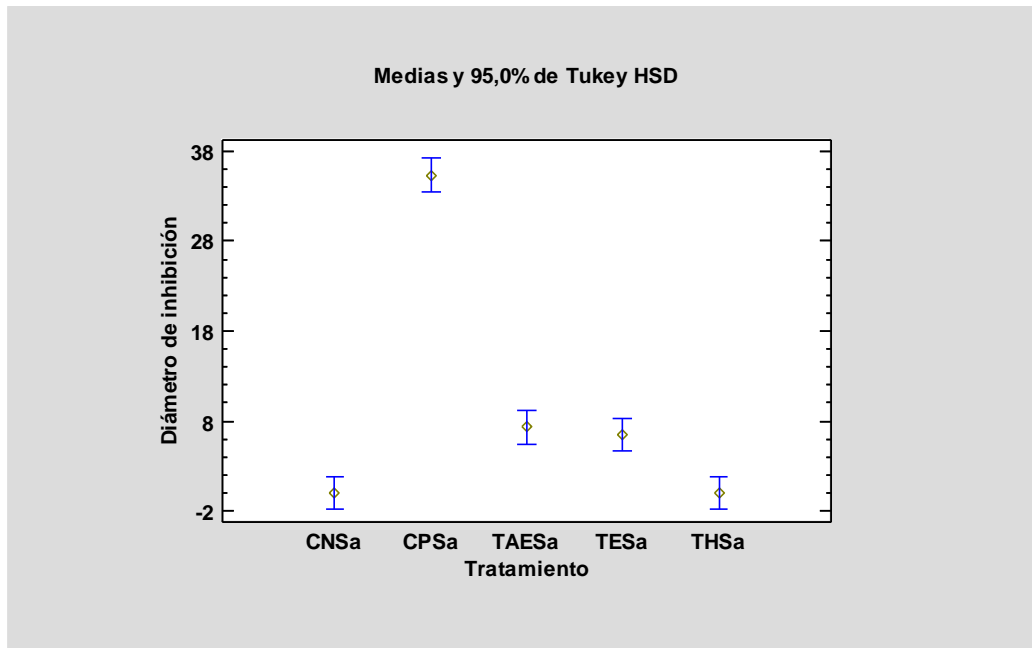


Figura 21. Medias del diámetro de inhibición con intervalos de confianza *S. aureus* del 95,0% para los tratamientos según la prueba de Tukey ($P < 0,05$)

Fuente: Elaboración propia.

De acuerdo a estos resultados, se puede observar que sobre *S. aureus* hay diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos con los solventes etanol y acetato de etilo con respecto al control absoluto y el extracto obtenido con hexano, pero sin diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Esto quiere decir que si hay actividad inhibitoria del crecimiento de *S. aureus* de estos dos extractos. Sin embargo, el control relativo (antibiótico) tiene una actividad superior estadísticamente comparado con los demás tratamientos.

6.4. Concentración mínima inhibitoria y Concentración mínima bactericida

Con los extractos que mostraron efectividad sobre el microorganismo se encontró dicha actividad, se continuó con la prueba de concentración mínima inhibitoria para hallar la concentración antimicrobiana que inhibe el crecimiento visible después de su incubación. De esta manera, se confirma la sensibilidad del microorganismo a un agente antimicrobiano.

En cuanto a la CMI (Figura 22), se referencia por macrodilución que el extracto de *T. diversifolia* obtenido con acetato de etilo y el obtenido con etanol causan inhibición en un mililitro del extracto con una concentración al 0,01 g/ml, ya que en el ensayo número tres se observan 6 unidades formadoras de colonia (UFC), lo que corresponde 25% de inhibición. Para los siguientes ensayos se evidenció turbidez en el medio lo que indica crecimiento microbiano.

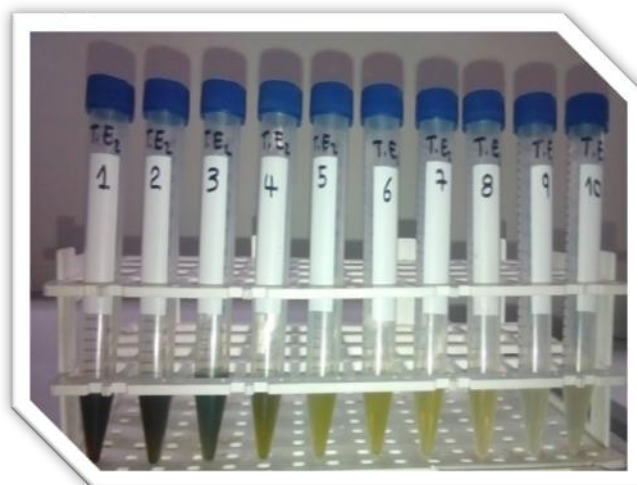


Figura 22. Tubos de macrodilución, proceso de concentración mínima inhibitoria.

Fuente: Elaboración propia.

La concentración mínima bactericida (CMB) se consideró como la dilución más alta en la cual no se presentó crecimiento bacteriano. En la Tabla 5 se exponen los resultados de la determinación CMB

Tabla 5: Resultados de la concentración mínima bactericida

Tubos	Promedio de unidades formadoras de colonia (UFC)	% de reducción
Ensayo 1.	0	100
Ensayo 2.	2	50
Ensayo 3.	6	25
Ensayo 4.	Incontables	0

Control (-)	0	0
Control (+)	20×10^2	0

La CMB del extracto *T. diversifolia* frente a la cepa *S. aureus*; corresponde a una concentración del 0.01 g/ml, para las concentraciones siguientes se observa crecimiento leve el cual va aumentando a medida que disminuye la concentración del extracto. Ver Figura 23.



Figura 23. Unidades formadoras de colonias correspondientes a los tubos de ensayo de macrodilución 1, 2, 3, 4

Fuente: Elaboración propia.

6.5. Discusión

El extracto de *T. diversifolia* presenta potencial bactericida *In vitro* sobre la bacteria *S. aureus* con etanol y acetato de etilo, solventes polares y medianamente polares respectivamente. El extracto hexánico no mostró actividad sobre dicha bacteria. Ningún tipo de extracto mostró actividad con la bacteria *E. coli* y el hongo *C. guillermondii*.

Los resultados obtenidos en el presente estudio coinciden parcialmente con los obtenidos por Obafemi, Sulaimon, Akinpelu & Olugbade, (2006), quienes encontraron actividad del extracto obtenido con acetato de etilo (al 0,2%) sobre *S. aureus* con un halo de inhibición de 16 mm. Probaron también con extracto hexánico sin encontrar actividad. Sin embargo, a diferencia del presente estudio, obtuvieron halos de inhibición sobre *E. coli* con el extracto hexánico (30 mm) y el obtenido con acetato de etilo (22 mm). Las diferencias pueden deberse a las diferencias que se presentan en las composiciones de metabolitos secundarios en plantas de diferentes orígenes. Igualmente puede ser causada por diferencias en cuanto a resistencia a sustancias antibióticas que pueden presentarse entre diferentes poblaciones de la misma especie de microorganismo, en este caso *E. coli*. Como dato adicional se puede mencionar que en ese estudio, tras ensayos biodirigidos, se logró aislar la sesquiterpen-lactona 1 del extracto obtenido con acetato de etilo, pero cuando se probó en *S. aureus* no presentó actividad por lo que se supone que es otro u otros los compuestos responsables de la acción. En dicho estudio también se encontró

actividad del extracto obtenido con acetato de etilo contra *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. polymyxa*, *K. pneumoniae* y *C. albicans*.

La actividad encontrada en el presente estudio sugiere que esta planta tiene un potencial interesante en cuanto a la actividad bactericida sobre *S. aureus*. Otra investigación que corrobora este hecho fue la realizada por Orsomando y colaboradores (2016) quienes, usando el aceite esencial obtenido por hidrodestilación a partir de inflorescencias, obtuvieron halos de inhibición sobre este microorganismo de 14 mm (10 µl de aceite al 100%) y determinaron que dicho aceite inhibe la enzima NadD, biosintetizadora de NAD en *S. aureus*.

Vale la pena aclarar que las naturalezas tanto de la parte de la planta usada como las de los compuestos que hay en el aceite esencial y los extractos que presentaron actividad en este trabajo son diferentes y que ameritaría en trabajos futuros identificar los compuestos responsables de la actividad encontrada en esta investigación para poder realizar una mejor comparación.

Es sobresaliente que en el estudio de Orsomando y colaboradores, la actividad fue obtenida con aceite al 100% mientras que este trabajo se encontraron actividades al 2%, lo cual muestra que el potencial de los extractos obtenidos en este estudio puede llegar a ser mayor al obtenido por ellos a pesar de haber obtenido menores halos de inhibición (ver tabla 4). Las flores han demostrado también tener efecto bactericida contra otras bacterias tales como

Megaterium bacillus y contra el hongo *Violaceum microbotryum* (Bouberte, 2006).

De acuerdo a los resultados obtenidos, se pudo determinar que *T. diversifolia* tiene actividad bactericida, la cual debe ser estudiada con mayor profundidad para poder determinar el o los compuestos responsables y los mecanismos de acción. También es importante poder determinar si hay efectos de los extractos sobre otros organismos o sobre mamíferos y humanos para establecer la viabilidad de su uso en la prevención o tratamiento de enfermedades causadas por *S. aureus*.

Si la planta tiene potencial desde el punto de vista medicinal esto puede representar una fuente adicional de ingresos para los campesinos del sector que decidan implementar cultivos de la misma.

CONCLUSIONES

Los métodos seleccionados para evaluar la actividad de sensibilidad en los diferentes extractos de la especie *T. diversifolia* muestran que los extractos etanólico y el obtenido con acetato de etilo, al 2%, presentan actividad bactericida sobre *S. aureus*. Dicho microorganismo mostró ser no sensible al extracto hexánico en el método utilizado.

Los resultados obtenidos muestran que los extractos etanólico y el obtenido usando acetato de etilo partir de la planta *T. diversifolia* tienen una concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida sobre *S. aureus* del 0,01 g/ml.

La actividad inhibidora del crecimiento bacteriano mostrada por los extractos obtenidos con etanol y acetato de etilo sobre *S. aureus*, a pesar de ser significativamente superior a la no aplicación de ningún producto, fue significativamente inferior a la mostrada por el antibiótico comercial (ampicilina)

Los extractos obtenidos a partir de *T. diversifolia* no mostraron actividad bactericida sobre *E. coli*, ni actividad fungicida sobre *C. guillermondii*

RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos ameritan realizar más investigaciones, como por ejemplo la búsqueda e identificación del compuesto o compuestos responsables de la actividad sobre *S. aureus*. Así mismo, se pueden realizar ensayos sobre otros microorganismos diferentes a los evaluados o pensar en evaluar el uso de otros solventes para el proceso de extracción.

De igual forma, en una futura posible investigación se puede determinar el mecanismo de acción del extracto o de los compuestos responsables.

Se pueden realizar futuras investigaciones que permita una inocua aplicación de los extractos efectivos, pero para esto se deben realizar otras pruebas tales como citotoxicidad sobre células humanas, para determinar si existe algún efecto nocivo sobre humanos y otros organismos.

Si se encuentra que el uso de *T. diversifolia* es inocuo para seres humanos y otros animales y se pueden encontrar aplicaciones útiles de los extractos, se puede plantear la posibilidad de promover el cultivo comercial de esta planta, y de esta forma se pueden ver beneficiados los campesinos y otros involucrados en la siembra y transformación agroindustrial de la especie.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez Lam, I. & Ponce Bittar, J. (2012). *Staphylococcus aureus*, evolución de un viejo patógeno. *Revista Cubana de Pediatría*, 84(4), 383-391.
- Bagnarello, G., Hilje, L., Bagnarello, V., Cartín, V., & Calvo, M. (2009). Actividad fagodisuasiva de las plantas *Tithonia diversifolia* y *Montanoa hibiscifolia* (Asteraceae) sobre adultos del insecto plaga *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Revista de Biología Tropical*, 57(4), 1201-1215.
- Barbosa, P. d. (2015). *Plan de desarrollo de Barbosa*. Recuperado de http://cdim.esap.edu.co/BancoMedios/Documentos%20PDF/barbosa_parte_1.pdf
- Bernal, R., Galeano, G., Rodríguez, A., Sarmiento, H., & Gutiérrez, M. (2011). Nombres comunes de las plantas de Colombia. Recuperado de <http://www.biovirtual.unal.edu.co/nombrescomunes/>
- Bouberte, M. K. (2006). *Tithoniaquinone A* and *Tithoniamide B*: A new anthraquinone and a new ceramide from leaves of *Tithonia diversifolia*. *Zeitschrift für Naturforschung B*, 1(61), 78-82.

- Caisique, J. A. (2006). Paclitaxel (Taxol), una sustancia anticancerígena. *Cienciorama*. s.p.i.
- Cámara, M. A., Escribano, J., Navarro, A. B., Toledano, R. & García, S. N. (1991). Control de residuos de insecticidas organofosforados y fungicidas orgánicos en frutas y hortalizas. Resultados de encuestas, 1990. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas*, 17(3), 373-380.
- Carballo, M. A., Cortada, C. M. & Gadano, A. B. (2005). Riesgos y beneficios en el consumo de plantas medicinales. *Theoria*, 14(2), 95-108.
- Chagas-Paula, D. A., Oliveira, R. B., Rocha, B. A., & Da Costa, F. B. (2012). Ethnobotany, chemistry, and biological activities of the genus *Tithonia* (Asteraceae). *Chemistry & biodiversity*, 9(2), 210-235.
- Chiang, C. H. (1985). Clinical evaluation of a sustained-release preparation. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 36, 704-8.
- Domingo, D., & López-Brea, M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia*, 16(4), 385-393.
- Donelan, P. (2009). Cultivo de semillas. *Ecology Action*, (3), 61.

- Duarte, M. D. R. & Empinotti, C. B. (2012). Leaf and stem microscopic identification of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray (*Asteraceae*). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48(1), 109-116.
- Elufioye, T. O. & Agbedahunsi, J. M. (2004). Antimalarial activities of *Tithonia diversifolia* (*Asteraceae*) and *Crossopteryx febrifuga* (*Rubiaceae*) on mice in vivo. *Journal of ethnopharmacology*, 93(2), 167-171.
- Elufioye, T. O., Alatisé, O. I., Fakoya, F. A., Agbedahunsi, J. M. & Houghton, P. J. (2009). Toxicity studies of *Tithonia diversifolia* A. Gray (*Asteraceae*) in rats. *Journal of ethnopharmacology*, 122(2), 410-415.
- Fernández, Á. (2006). Las plantas aromáticas y medicinales PAM, un potencial con gran necesidad de reorientación. *Revista Española de Estudios Agrosociales y Pesqueros*, (209), 181.
- Fonnegra, F. G., & Jiménez, J. R. (2007). Plantas medicinales aprobadas en Colombia. Universidad de Antioquia. Medellín – Colombia. 44 – 269.
- Fontecha Umaña, F., & Rodríguez Jerez, J. J. (2015). *Estudio de la eficacia bactericida y bacteriostática de productos químicos embebidos en materiales*. Tesis (doctoral). Barcelona Universitat Autònoma de Barcelona.

Goffin, E., Ziemons, E., De Mol, P., De Madureira, M. C., Martins, A. P., da Cunha, A. P. & Frederich, M. (2002). In vitro antiplasmodial activity of *Tithonia diversifolia* and identification of its main active constituent: tagitinin C. *Planta Medica*, 68(6), 543-545.

Gómez Estrada, H. A., González Ruiz, K. N. & Medina, J. D. (2011). Actividad antiinflamatoria de productos naturales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 10(3), 2182-217.

González, J. (2014). Características botánicas de la *Tithonia Diversifolia* (asterales: Asreracea) y su uso en la alimentación animal. *Boletín Científico* 18(2), 45-58.

Hannaoui, R. E., Villalobos, L. B. & Nazaret, R. E. (2009). *Escherichia coli* shigatoxigénica: Patogénesis, diagnóstico y tratamiento. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, (29), 3-20.

Jassim S., A. A. & Naji, M. A. (2003). Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *Journal of Applied Microbiology*, 95(3), 412-427.

Kato, C. I. R. (1998). *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray, una planta con potencial para la producción sostenible en el trópico. Cali: *Fundación*

Centro para la Investigación en Sistemas Sostenibles de Producción Agropecuaria.

Lahlou, M. (2004). Methods to Study the Phytochemistry and Bioactivity of essential oils,. *Phytother* (18), 435-436.

Lemus-Mondaca, R., Vega-Gálvez, A., Zura-Bravo, L., & Ah-Hen, K. (2012). *Stevia rebaudiana Bertoni*, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chemistry*, 132(3), 1121-1132.

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

M. V. Pinoni, Castán, V., Maegli, M. I., Lorenzo, J., Frizzera, F., Jewtuchowicz, V., & Mujica, M. T. (2007) Características fenotípicas útiles para la identificación presuntiva de *Candida guilliermondii*. *Revista Argentina de Microbiología*, 39(2), 81-83.

Manrique, E. & Mosquera O. (1997). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos y fracciones obtenidas a partir de la *Espelia Murilloii* cuatro

y *Espeleptosis guacharaca*. Facultad de Ciencias Básicas. Pontificia Universidad Javeriana. Trabajo de pregrado. Bogotá.

Martínez, I. d. (2010). La flora y vegetación ruderal de Malinalco, Estado de México. México: Instituto de las Enseñanzas de Investigaciones en Ciencias Agrícolas.

Messias, K. L. (2009). Dossiê antioxidantes. *Food Ingredients Brasil*, (6), 16-31.

Ministerio de Agricultura, F. P. (2009). Plantas medicinales y aromáticas. F. P. Ministerio de Agricultura. *Plantas Medicinales y Aromáticas*. s.p.

Montoya, C. G., Ospina, C. O., Mesa, N. S., Cano, C. M., Lobo, M., Arias, P. G. G, & Pérez, B. R. (2009). Actividad antioxidante e inhibición de la peroxidación lipídica de extractos de frutos de mortiño (*Vaccinium meridionale SW*). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(6), 519-528.

Muñoz, F. (1996). Plantas medicinales y aromáticas: estudio, cultivo y procesado. Madrid – España. Mundi-Prensa Libros.

- Obafemi, C. A., Sulaimon, T. O., Akinpelu, D. A., & Olugbade, T. A. (2006). Antimicrobial activity of extracts and a germacranolidetype sesquiterpene lactone from *Tithonia diversifolia* leaf extract. *African Journal of Biotechnology*, 5 (12), 1254-1258.
- Orsomando, G., Agostinelli, S., Bramucci, M., Cappellacci, L., Damiano, S., Lupidi, G. & Petrelli, D. (2016). Mexican sunflower (*Tithonia diversifolia*, *Asteraceae*) volatile oil as a selective inhibitor of *Staphylococcus aureus* nicotinate mononucleotide adenylyltransferase (NadD). *Industrial Crops and Products*, 85, 181-189.
- Owoyale, V. B., Wuraola, C. O., Soladoye, A. O. & Olaleye, S. B. (2004). Studies on the anti-inflammatory and analgesic properties of *Tithonia diversifolia* leaf extract. *Journal of ethnopharmacology*, 90(2), 317-321.
- Oyewole, I. O., Adeoye, G. O., Anyasor, G. N., & Obansa, J. A. (2008). Anti-malarial and repellent activities of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) leaf extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2(8), 171-175.
- Pulido, K. D. P., Martínez, J. H. I., & De Vélez, A. J. C. (2014). Identification and antioxidant activity of cinnamic acid derivatives in polar extracts from *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray. In *XII congreso colombiano de fitoquímica. Productos Naturales* 4(1), 170 -171.

- Ramírez, W., Ramírez, P. & Pérez, F. (2006). Aislamientos microbiológicos en el Hospital Patrocinio Peñuela Ruíz: Estado Táchira 2005. *Col. Med. Estado Táchira*, 15(2), 29-34.
- Regueiro, J. R. (2015). Cáncer e inmunidad. *Inmunología*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, 27.
- Rodríguez, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos del *Escherichia Coli*. *Salud Pública de México*, 44(5), 464-475.
- Sharrock, R. A., Sinclair, F. L., Gliddon, C., Rao, I. M., Barrios, E., Mustonen, P. J. & Godbold, D. L. (2004). A global assessment using PCR techniques of mycorrhizal fungal populations colonising *Tithonia diversifolia*. *Mycorrhiza*, 14(2), 103-109.
- Suárez V., J. L. (2010). Prevalencia y sensibilidad de *Candida* spp a fluconazol en la clínica de la Sociedad Anticancerosa de Maracay, Venezuela. *Vitae: Academia Biomédica Digital*, (44), 3-8.
- Thielecke, F. & Boschmann, M. (2009). The potential role of green tea catechins in the prevention of the metabolic syndrome-a review. *Phytochemistry*, 70(1), 11-24.

Vidaurre Martínez, M. F., Querevalú García, L. M., De los Ríos Martínez, E. & Ruiz Reyes, S. G. (2007). Características farmacognósticas de las hojas de *Capparis avicennifolia*. *Revista Médica Vallejana*, (4), 121-131.

Villaseñor, J. L. & Espinosa, F. J. (1998). *Catálogo de malezas de México*. México: Universidad Nacional Autónoma de México - Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario.

ANEXO 1

Potencial del material vegetal como agente antimicrobiano

Arroyave Sosa Claudia Patricia (claudiapatricia@normalsm.edu.co), López Pino Beatriz Eugenia (belopi28@hotmail.com), López Naranjo Daniel Fernando (daniellopezlear@gmail.com), Londoño Pérez Diana María (diana.sanpedro@hotmail.com)

RESUMEN

El uso de las plantas ha tenido trascendencia en el desarrollo de la humanidad. Su utilización en diferentes aspectos ha marcado el crecimiento y desarrollo de las poblaciones ofreciendo alternativas de estudio para su profundización. Las diversas aplicaciones que se derivan de los recursos naturales se soportan en el desarrollo mismo de las necesidades de una población bien sea como sustento alimenticio, explotación agrícola e industrial, o en el campo de la medicina, en especial a lo que respecta al mundo microscópico donde se evalúan las implicaciones que puede tener para el funcionamiento de los organismos las afecciones causadas por agentes patógenos como los virus, las bacterias y los hongos.

No obstante, muchas enfermedades causadas por microorganismos son tratadas con productos que presentan una síntesis química. Otras por el contrario, a partir del desarrollo investigativo han sido asistidas desde el uso del potencial derivado de los vegetales ya que de ellos se obtienen las

moléculas y metabolitos secundarios necesarios para la generación de nuevos productos a fin de contrarrestar diversas patologías.

De esta manera, el artículo retoma el devenir del hombre en la búsqueda constante del conocimiento de las plantas aromáticas y medicinales en relación con las bacterias *Echerichia Coli*, *Staphylococcus aureus*, y el hongo *Candida guilliermondii*, en un continuo interactuar con la naturaleza donde la apropiación del saber popular transmitido de generación en generación como legado cultural se conjuga con los conocimientos científicos a fin de establecer referentes teóricos sustentados y acreditados desde veracidad de la ciencia.

Palabras Clave

Aromática, bactericida, fungicida, patógeno, microbiológico, microorganismo.

ABSTRAC

The use of plants has had importance in the development of humanity. Their use in different aspects has marked the growth and development of populations offering alternatives for deepening studies. The several applications derived from natural resources are supported on the own population development needs, either as sustenance, agricultural and industrial exploitation or in the medicine field, specially as regards the microscopic world where the implications it may have for the functioning of organisms are

assessed, the illnesses caused by pathogens agents such as viruses, bacteria and fungi.

However, many diseases caused by microorganisms are treated with products having a chemical synthesis. On the other hand, from research development others have been assisted from the plants potential use, now that molecules and secondary metabolites are obtained from them and they are necessary for the generation of new products to counteract various pathologies.

Thus, the article takes up the evolution of man during the constant search of knowledge of medicinal and aromatic plants in relation to the bacteria *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and the fungus *Candida guilliermondii* in a continuous interaction with nature where popular knowledge appropriation transmitted from generation to generation as a cultural legacy is conjugated with scientific knowledge to establish theoretical framework supported and accredited from veracity of science.

Keywords: Aromatic, bactericide, fungicide, pathogens, microbiological organism

INTRODUCCIÓN

En los diferentes ecosistemas se puede observar variedad de vegetación que gracias a estudios e investigaciones han reportado actividad

microbiológica, lo que las convierte en fuente inagotable para el tratamiento de patologías a nivel medicinal y agropecuario. Lo anterior permite el desarrollo de varios sectores que va desde la constitución de cultivos con especies prometedoras hasta el proceso investigativo de sus componentes microbiológicos y su posterior aplicación en el tratamiento de enfermedades producidas por hongos, bacterias y virus.

Muchas de las afecciones causadas por agentes patógenos se vienen tratando con determinados productos de síntesis química dejando de lado el uso de las plantas como fuente natural para la obtención de materias primas que faciliten el procesamiento de recursos con un alto potencial antimicrobiano. En este sentido es preciso revisar que las plantas que por lo general se usan para esta producción de agentes antimicrobianos se consideran malezas. Es por este motivo que se requiere profundizar en estudios científicos que retomen la importancia de las plantas como especies promisorias para mejorar la calidad de vida de la población campesina y se pueda de esta manera aprovechar las bondades de las especies vegetales con las que se interactúa constantemente.

Capítulo I

Importancia del material vegetal y usos medicinales

Las plantas medicinales han sido ampliamente utilizadas desde la existencia de los primeros pobladores (Lahlou, 2004), los cuales se iniciaron con la recolección de frutos en calidad de nómadas, más adelante se establecieron en un mismo lugar. Allí, comenzaron con el cultivo del maíz, que en su época surgió como el principal producto de comercialización y trueque entre las comunidades primitivas, especialmente para suplir su alimentación. El hombre fue descubriendo las propiedades curativas y alimenticias de las plantas, propiedades que han generado una constante búsqueda entorno a su siembra, cultivo y procesamiento (Toledo & Kutschker, 2012).

Con el surgimiento de enfermedades y dolencias se fueron aproximando al manejo de medicinas alternativas donde las plantas cobraron mayor importancia. En el transcurso del tiempo, éstas han asumido un rol relevante en el sector social y cultural, a nivel culinario, medicinal, cosmetológico y veterinario, alcanzando trascendencia económica para el desarrollo de las regiones. En su comercialización se ha dado un valor agregado, pasando de técnicas rudimentarias a las tecnologías de la innovación, donde se aprovecha todo su potencial agrícola, biológico e industrial (Fernández, 2006).

Egipcios y babilonios emplearon dentro de su cultura milenaria un sinnúmero de plantas aromáticas para obtener de éstas diferentes usos y aplicaciones. Así entonces, surge de ellos la propuesta de los primeros jardines y la implementación de la siembra exclusiva de aromáticas, que posteriormente

serían empleadas en el arte, en la preparación de ungüentos y aceites cosméticos que más adelante se comercializarían en diferentes regiones y países (Segura, 2005).

Algunos pueblos del Asia Pacífico entre ellos la India, China, Malasia, Tailandia, Macao fueron cultivadores de diferentes especies (Ody, 2000) como el azafrán, la pimienta, la canela, los clavos de olor y la nuez moscada; los cuales tenían un fuerte comercio en Europa y eran productos muy necesarios en la dieta alimenticia de los habitantes del antiguo continente. Al caer Constantinopla en poder de los turcos, estos bloquearon el paso a la Europa cristiana para poder comercializar las especies, por lo que ellos se tuvieron que abrir a buscar nuevas rutas; en una de estas Cristóbal Colón llegó a nuevas tierras en 1492 y fue en este encuentro de dos culturas cuando América completó el mundo y le cambió no sólo la forma de pensar al europeo, sino que incluso le cambió su dieta alimenticia al aportar nuevos ingredientes como el maíz y la papa, los frutos tropicales como el mango y la naranja, aportando también el ají y el tabaco (López, 2000).

Es así como a América Latina llegaron las plantas aromáticas y medicinales a través de los conquistadores y con el transcurrir de las investigaciones y el desarrollo de cultivos se han presentado avances significativos en el mejoramiento de las especies aromáticas, su implementación en los campos, su uso y distribución, esto de la mano de los

avances de la bioingeniería y la agricultura transgénica (Serrano, 2015). De igual manera el uso de las plantas aromáticas dentro de los cultivos, el consumo humano y las preparaciones a partir de sus compuestos moleculares permiten desarrollar una agricultura sustentable y amigable con el ambiente (García-Hernández, Murillo-Amador, Nieto-Garibay, Fortis-Hernández, Márquez-Hernández, Castellanos-Pérez & Ávila-Serrano, 2010).

En ese devenir histórico del nuevo mundo (continente americano) las culturas ancestrales, nativas del continente, utilizaron y utilizan las plantas de manera ritualista asociándolas a sus diferentes divinidades (Patiño, 1963). Se asocia de esta manera el crecimiento y uso de las plantas al desarrollo de las culturas a nivel alimentario, religioso y social.

En la actualidad y en el contexto científico, las plantas son asumidas como recursos determinantes para la economía, la seguridad alimentaria y la aplicación al control de diferentes enfermedades o patologías. Se conocen también los huertos familiares como espacios agro-ecosistémicos entre las especies, donde la variedad permite la multiplicidad de sus características, las cuales pueden adaptarse a las condiciones ambientales vigentes (Pérez, 2006).

Las comunidades indígenas son protagonistas en el conocimiento de la biodiversidad. Las prácticas que tradicionalmente realizan los hombres y mujeres de estos grupos para curar las dolencias y enfermedades más

comunes en la época dejan entrever la relación armónica con la naturaleza, de ahí que asumen el rol de curanderos proporcionando alivio a sus habitantes sin fundamento científico (chamanismo) (Medina, Martínez-Corona, Fernández, & Contreras, 2011).

El conocimiento que poseen las mujeres en las diferentes culturas y ámbitos sociales ha permitido que se proyecten en el medio como portadoras del saber botánico mediado por la experiencia y transmitido de generación en generación sin desconocer el papel que desempeñan los hombres como multiplicadores de éste. Por esta razón se reconocen los aportes que ambos géneros poseen y que en suma han permitido la evolución de la medicina alternativa y convencional (Albertí, 2006).

La sociedad moderna ha incrementado el uso de los productos naturales con fines nutricionales, terapéuticos y cosmetológicos a través de investigaciones farmacológicas estableciendo una normatividad frente a su manejo y dando parámetros a instituciones científicas, universidades y empresas farmacéuticas (Houghton, 2003).

Al hablar de las plantas y sus usos, se hace necesario acercarse al devenir de las comunidades y de las necesidades que se plantean por el aprovechamiento de los recursos, es de esta manera como las plantas aromáticas y medicinales contribuyen a la seguridad alimentaria, entendiendo

que esta “existe cuando todas las personas tienen, en todo momento, acceso físico, social y económico a alimentos suficientes, inocuos y nutritivos que satisfacen sus necesidades energéticas diarias y preferencias alimentarias para llevar una vida activa y sana” (FAO, 2011, p. 1). De ahí que sean de gran utilidad en la dieta de los campesinos y en la botica de aquellos que confían su estado de salud a sus propiedades.

En este sentido y combinando los conocimientos y adelantos científicos a nivel de las plantas aromáticas y medicinales, en el sector educativo y en especial con los estudiantes y a través de la implementación y empoderamiento de proyectos que impliquen la investigación, se pretende desde la enseñanza de las Ciencias Naturales abordar el uso adecuado de las plantas como un saber específico que enriquecerá los hábitos y estilos de vida saludable. Este proceso no es nada fácil ya que la cultura que se está generando en la sociedad contemporánea remite a la población al consumo inadecuado de productos, sin una debida verificación o análisis de sus propiedades y contraindicaciones. Se requiere del conocimiento, dominio y aplicación de quien orienta estos procesos para que desde su actuar motive a los estudiantes al acercamiento de una sana y balanceada alimentación que mejore la calidad de vida de los consumidores y les permita asimilar los saberes relacionados con las propiedades de las plantas (Flores, 2012).

Capítulo II

Los microorganismos y su influencia en los seres vivos.

Las bacterias y los hongos, se encuentran en el ambiente, generalmente se comportan como vectores de infecciones y enfermedades respiratorias y gastrointestinales. Para su control se emplea el cultivo de microorganismos; proceso que permite el aislamiento de los gérmenes causantes o asociados a una infección donde permite registrar el agente etiológico y efectuar pruebas de tipificación, determinación de sensibilidad a antibióticos y capacidad bactericida de líquidos corporales (Ramírez, Ramírez & Pérez, 2006).

Los microorganismos afectan además el desarrollo sano de diversas plantas, las cuales son necesarias para la producción de recursos destinados a diferentes sectores de la economía (Dmitriev, 2003). En aras de ejercer un control sobre éstos, se han empleado sustancias químicas que causan daños a especies valiosas dentro de la dinámica biológica. Lo anterior ha generado interés por el desarrollo de estrategias de biorremediación ambientalmente amigables (Hossain, Sultana, Kubota & Hyakumachi, 2008) ya que actúan como escudos protectores frente a las enfermedades (Nakkeeran, 2005) poniendo de manifiesto el potencial del material vegetal dentro de la producción de agentes controladores.

El ser humano es un reservorio natural, que por consiguiente capta los microorganismos responsables de muchas enfermedades y su principal impacto es ocasionado por las cepas de *S. aureus*, habitualmente resistentes a la penicilina y otros antibióticos que antes eran eficaces contra el tratamiento de las infecciones (Zendejas-Manzo, Ávalos-Flores & Soto-Padilla, 2014). Su transmisión en hospitales es de carácter epidemiológico y son los trabajadores de la salud, los que presentan más riesgo (Paulsen, 2015).

La bacteria *E. coli*, es un patógeno de transmisión alimentaria. Su origen se da principalmente en los productos de carne picada cruda o poco cocinada, la leche cruda y en muchos casos las hortalizas contaminadas por materia fecal. Lo que pone en peligro la salud de los pacientes que la adquieren, puesto que puede dar lugar a síndrome hemolítico urémico, especialmente en niños pequeños y ancianos. Razón por cual desde la Organización Mundial de la Salud se promueve la higiene y los buenos hábitos de alimentación como medida de prevención de enfermedades (Franz, & van Bruggen, 2008).

Las bacterias y el hongo objeto de estudio tienen presencia en los municipios de Barbosa, Entreríos y San Pedro de los Milagros desde el campo pecuario y humano; denotando que los procesos investigativos en este sentido no son el habitual de las comunidades, por tanto se limitan a utilizar los conocimientos empíricos. A continuación se detallan algunos elementos consultados desde las Secretarías de Salud, la Unidad Municipal de Asistencia

Técnica Agropecuaria (UMATA) y los Centros de Salud San Vicente de Paúl (Barbosa) y Santa Isabel (San Pedro de los Milagros):

El *S. aureus* es una bacteria que se encuentra presente en el ambiente, y está asociada a la mastitis del ganado de leche generando inflamación de la ubre con presencia de grumos al tacto con consecuencias en el secado de los cuartos, es decir que se disminuye altamente la producción normal de leche, hasta tanto el animal sea tratado con antibióticos (Pérez J. M., Ingeniero Agroindustrial, Entrevista, 2015).

En el municipio de Barbosa se presentan casos aislados registrados en los informes de visitas veterinarias a las veredas donde se recomienda un tratamiento con antibióticos para el animal (García F., Entrevista, 2015).

En los municipios de Entreríos y San Pedro de los Milagros son muy pocos los productores que realizan los estudios pertinentes en pruebas de laboratorio por lo que no se encuentra un informe estadístico de la incidencia de la bacteria; los pequeños productores consultan al veterinario una vez, luego siguen aplicando el antibiótico que les funcionó en cada presencia de mastitis a fin de recuperar las glándulas mamarias (Pérez J. M., Ingeniero Agroindustrial, Entrevista, 2015).

De acuerdo a lo verificado en el archivo de la Secretaria de Salud del Municipio de San Pedro, a nivel humano también se reporta una alta incidencia en personas de 22 a 49 años de edad con afecciones naso-faríngeas y enfermedades transmitidas por el consumo de alimentos denotando crecimiento de *S. aureus* con pruebas de coagulasa donde no se aisló el agente etiológico (Carvajal, Entrevista 2015).

En la misma línea en el municipio de San Pedro, los registros de laboratorio indican la presencia de la *Candida Albicans* en procedimiento realizado por urocultivo en un paciente en el año 2014, con afectación de la mucosa oral, digestiva y genital; su comportamiento se evidencia a través de enrojecimiento, picazón y malestar. Los registros clínicos revelan que un 10% de los pacientes afectados son mujeres que al examen de flujo vaginal muestran candidiasis (Pareja, Entrevista, 2015).

A nivel de los municipios de Entreríos y San Pedro de los Milagros se registra incidencia en las bacterias *S. aureus* y *E. coli* y el hongo *C. guilliermondii* con afectaciones tanto en las personas como en el ganado de leche fuente de producción económica en la zona mientras que en el registro del Hospital san Vicente de Paul del municipio de Barbosa, se encuentran reportes de *c. guilliermondii* y *Candida Albicans* de 10 casos en pacientes tanto hombres como mujeres (Méndez J., Entrevista, 2015).

Dentro de la determinación de las causas se tienen que es una afección provocada por micosis; se manifiesta a través de una candidiasis presentada en las mucosas, en las zonas genitales y en la piel. También se puede presentar de forma sistémica a través de la sangre afectando órganos como el cerebro, los ojos, el aparato urinario o los pulmones. (Méndez J., Entrevista, 2015).

En su tratamiento se recomiendan medicamentos de uso tópico como Nistatina, clotrimazol o el ketoconazol y de uso sistémico como el fluconazol o la caspofungina (Cancidas de 70 mg). Los pacientes con este tipo de afección no reportaron gravedad y mostraron mejoría a partir del uso de los productos médicos recomendados. Se resalta también que este tipo de hongo está presente de manera natural en el cuerpo haciendo parte de la flora saprofita, evitando así que otros microorganismos causen daño, por lo que se aconseja controlar el uso de antibióticos en los tratamientos que se realizan en algún tipo de afección médica (Méndez J., Entrevista, 2015).

Las constantes enfermedades que se presentan tanto en el hombre como en los animales han conllevado a que se profundice más en la manera de inhibir el crecimiento de las bacterias y virus responsables de muchas afectaciones, analizando su estructura, funcionamiento y periodos de vida, contribuyendo así a mejorar las condiciones de salud.

Por ejemplo el *S. aureus* se ha convertido en una de las bacterias más estudiadas por su incidencia clínica (Zendejas-Manzo, Ávalos-Flores & Soto-Padilla, 2014). “Es el principal causante de infecciones nosocomiales, tiene características particulares de virulencia y resistencia contra antibióticos, lo cual puede ser un gran problema de salud, a nivel comunitario e intrahospitalario” (Pareja, Entrevista, 2015). Representa una de las causas más comunes y letales de la infección del torrente sanguíneo, así se demuestra en estudio observacional prospectivo de pacientes con bacteriemia por *S. aureus* empleando hemocultivos positivos (Paulsen, 2015). Por sus características genéticas es un patógeno oportunista y sigue siendo una causa común de infecciones de herida por quemadura. Diferentes estudios han demostrado que el atrapamiento de compuestos derivados de plantas en liposomas podría aumentar su actividad anti – *S. aureus* (Faezizadeh, Gharib & Godarzee, 2015).

En plantas de la familia asteraceas se revelan estudios donde el extracto metanólico de *Centaurea calcitrapa* presenta actividad antimicótica y antimicrobiana, frente a *P. aeruginosa*, *S. aureus*, mientras que *Centaurea solstitialis* inhibe el crecimiento de las cepas de *S. agalatae* y *S. aureus* (Toribio, Oriani & Skliar, 2004).

Del mismo modo la bacteria *E. coli* referencia múltiples estudios (Neidhardt., 1999). Es un organismo anaeróbico presente en la flora intestinal que a su vez puede ocasionar enfermedades como la diarrea a demás de otros

síntomas como vómitos, dolor agudo de estómago y/o fiebre. Está presente en el aparato excretor, vías urinarias, ocasionando neumonía, cistitis, mastitis, septicemia, peritonitis (Rodríguez, 2002).

Algunas levaduras del género *Cándida* se asocian directamente con el estado inmunológico del paciente. “Durante la edad reproductiva por ejemplo, el 75% de las mujeres experimenta un episodio de candidiasis vulvovaginal, aproximadamente de 6 a 55% de las mujeres sanas son portadoras asintomáticas” (Solís-Arias, Moreno-Morales, Dávalos-Tanaka, Fernández-Martánez, Díaz & Arenas-Guzmán, 2014). Un 11% de las infecciones de las vías urinarias tienen su origen en este microorganismo; se identifica como factor de alto riesgo con el uso de la sonda urinaria. Los síntomas más frecuentes son fiebre y debilitamiento general. Es frecuente en mujeres mayores de 65 años de edad y en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (Vega, 2015).

Los microorganismos no sólo representan un perjuicio para los seres vivos, también tienen un efecto positivo para el ser humano ya que se emplean en la industria agrícola, alimenticia, farmacéutica para la generación de productos; es el caso de la *C. guilliermondii* que tiene importancia en el campo agroindustrial, y ha sido utilizado en la elaboración del xilitol, en sustratos de bagazo de caña de azúcar, con la aplicación simultánea de los azúcares de hemicelulosa (glucosa y xilosa). Los resultados observados fueron

satisfactorios para la producción del xilitol, denotando mayores concentraciones en el bagazo de la caña de azúcar hidrolizado (Barbosa, De Medeiros, De Mancilha, Schneider & Lee, 1988).

BIBLIOGRAFÍA

Albertí, M. D. (2006). Los aportes de las mujeres rurales al conocimiento de plantas medicinales en México. Análisis de género. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*, 3(2), 139-153.

Barbosa, M. F., de Medeiros, M. B., de Mancilha, I. M., Schneider, H. & Lee, H. (1988). Screening of yeasts for production of xylitol from d-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. *Journal of Industrial Microbiology*, 3(4), 241-251.

Dmitriev, A. (2003). Signal Molecules for Plant Defense Responses to Biotic Stress. *Russian J. Plant Physiol*, 50(3), 417-425.

Faezizadeh, Z., Gharib, A. & Godarzee, M. (2015). In-vitro and In-vivo Evaluation of Silymarin Nanoliposomes against Isolated Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 14(2), 627.

- FAO. (2011). Una introducción a los conceptos básicos de seguridad alimentaria. *La Seguridad Alimentaria en Información para las Decisiones*. Recuperado de www.fao.org/docrep/014/al936s/al936s00.pdf
- Fernández, Á. (2006). Las plantas aromáticas y medicinales PAM, un potencial con gran necesidad de reorientación. *Revista Española de Estudios Agrosociales y Pesqueros*, (209), 181.
- Flores, G. (2012). Alimentación y nutrición. *Plan Capacitación*, 1-104.
- Franz, E., & van Bruggen, A. H. (2008). Ecology of *E. coli* O157: H7 and *Salmonella enterica* in the primary vegetable production chain. *Critical Reviews in Microbiology*, 34(3-4), 143-161.
- García-Hernández, J. L., Murillo-Amador, B., Nieto-Garibay, A., Fortis-Hernández, M., Márquez-Hernández, C., Castellanos-Pérez, E. & Ávila-Serrano, N. Y. (2010). Avances en investigación y perspectivas del aprovechamiento de los abonos verdes en la agricultura. *Terra Latinoamericana*, 28(4), 391-399.
- Hossain, M. M., Sultana, F., Kubota, M. & Hyakumachi, M. (2008). Differential inducible defense mechanisms against bacterial speck pathogen in

Arabidopsis thaliana by plant-growth-promoting-fungus *Penicillium* sp. GP16-2 and its cell free filtrate. *Plant and Soil*, 304(1-2), 227-239.

Houghton. (2003). *Buddlejaglobosa*: a medicinal plant of Chile, their chemistry, biological activity and traditional uses. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 4(6), 36-41.

Lahlou, M. (2004). Methods to Study the Phytochemistry and Bioactivity of essential oils,. *Phytother* (18), 435-436.

López, T. (2000). *Plantas medicinales curativas: Atlas ilustrado de plantas medicinales y curativas*. Madrid -España: Susaeta.

Medina, B. V., Martínez-Corona, B., Fernández, M. A. & Contreras, A. A. (2011). Uso y conocimiento de plantas medicinales por hombres y mujeres en dos localidades indígenas en Coyomeapan, Puebla, México. *Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América*, 36(7), 493-499.

Nakkeeran, S., Renukadevi, P. & Marimuthu, T. (2005). Antagonistic potentiality of *Trichoderma viride* and assessment of its efficacy for the management of cotton root rot. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 38(3), 209-225.

Neidhardt. (1999). *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular Biology*, 2a. ed. Washington: ASM Press.

Ody, P. (2000). *The Complete Guide Medicinal Herbal*, pub. *Dorling Kindersley*.

Patiño, V. (1963). *Plantas cultivadas y animales domésticos en América Equinoccial. IV: Plantas introducidas. Capítulo. IV. Verduras y hortalizas. Editorial: Cali, Imprenta Departamental. Biblioteca Virtual. Biblioteca Luis Arango.*

Paulsen, J. (2015). *la Difusión de Staphylococcus aureus en Hospitales. Issue, 1-10.*

Pérez, I. (2006). *Composición específica y biomasa en huertos familiares en Tabasco. Agricultura Sostenible, (5), 275-282.*

Ramírez, W., Ramírez, P. & Pérez, F. (2006). *Aislamientos microbiológicos en el Hospital Patrocinio Peñuela Ruíz: Estado Táchira 2005. Col. Med. Estado Táchira, 15(2), 29-34.*

Rodríguez, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos del Escherichia Coli. *Salud Pública de México*, 44(5), 464-475.

Segura, S. (2005). Los jardines en la antigüedad. J. Torres (ed)

Serrano, J. A. S. (2015). El problema de los cultivos transgénicos en América Latina: una "nueva" revolución verde. *Revista Entorno Geográfico*, 1(3), 95-120.

Solís-Arias, M. P., Moreno-Morales, M., Dávalos-Tanaka, M., Fernández-Martánez, R. F., Díaz, F. O. & Arenas-Guzmán, R. (2014). [Vaginal colonization by *Candida* spp. Frequency and description of the species isolated in asymptomatic women]. *Ginecología y Obstetricia de México*, 82(1), 1-8.

Toledo, C. & Kutschker, A. (2012). Plantas Medicinales en el Parque Nacional Los Alerces, Chubut, Patagonia Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 47(3-4), 461-470.

Toribio, M. S., Oriani, S. D. & Skliar, M. I. (2004). Actividad antimicrobiana de *Centaurea solstitialis* y *Centaurea calcitrapa*. *Ars Pharmaceutica*, 335-341.

Vega, S. (2015). Candida urinary tract infections. An open study in 29 cases in a general hospital. (English). *Medicina Interna de México*, (1), 19-24.

Zendejas-Manzo, G.S., Avalos-Flores H. & Soto-Padilla, M. Y. (2014). General microbiology *Staphylococcus aureus*: Characteristics and methods of identifying pathogenicity. *Revista Biomédica* 25 (3), s.p.