

EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS OBTENIDOS A PARTIR DE *TITHONIA DIVERSIFOLIA* (HEMSL.) A. GRAY CON USO POTENCIAL EN LA INDUSTRIA LECHERA

Recibido:

Aceptado:

Juan D. Londoño C.^{*}, Wilson Barragán H.^{**}, Mariana Muñoz^{***},
Liliana Mahecha L^{****}, Joaquín Angulo A.^{*****}

Resumen

El uso de antibióticos en el tratamiento de la mastitis en la industria lechera ha acarreado una problemática con potencial impacto en la salud pública, como la resistencia antimicrobiana. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la acción antimicrobiana del extracto alcohólico de hojas, tallos y flores de *Tithonia diversifolia* sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en cultivo *in vitro*. Se evaluó el efecto inhibitorio en el crecimiento bacteriano a través de un ensayo de sensibilidad. En ambas bacterias el control positivo presentó un halo de inhibición superior a 30 mm, con diferencia significativa de los extractos de *T. diversifolia*. Los cuales presentaron para *S. aureus* un halo de 9,7 y 10,4 mm y para *E. coli* de 6,5 y 9,4 mm para tallo-hoja y flores respectivamente. El extracto alcohólico de flores de *T. diversifolia* se perfila como una herramienta potencial para inhibir el crecimiento bacteriano.

Palabras clave: bioensayo, *Escherichia coli*, extracto alcohólico, mastitis, *Staphylococcus aureus*, halo de inhibición.

^{*} SENA-CRNR La Salada. Caldas, Antioquia. Grupo de Investigación La Salada.

^{**} Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Agrosavia), Centro de Investigación Turipaná. Cereté, Colombia.

^{***} SENA-CRNR La Salada. Caldas, Antioquia. Grupo de Investigación La Salada.

^{****} Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias. Medellín, Colombia. Grupo de Investigación en Ciencias Agrarias (Grica).

^{*****} Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias. Medellín, Colombia. Grupo de Investigación en Ciencias Agrarias (Grica).

ANTIMICROBIAL EVALUATION OF EXTRACTS OBTAINED FROM *TITHONIA DIVERSIFOLIA* (HEMSL.) A. GRAY WITH POTENTIAL USE IN THE DAIRY INDUSTRY

Juan D. Londoño C.*, Wilson Barragán H.** , Mariana Muñoz***,
Liliana Mahecha L****, Joaquín Angulo A.*****

Abstract

Antibiotics used as a treatment for mastitis in the dairy industry have brought a problem with a potential impact on public health, such as antimicrobial resistance. The objective of this study is to evaluate the antimicrobial action of alcoholic extract from *Tithonia diversifolia*'s leaves, stems, and flowers on the growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in *in vitro* cultures. The inhibitory effect on bacterial growth was evaluated through a sensitivity test. In both bacteria, the positive control presented an inhibition halo greater than 30 mm, with a significant difference from the extracts of *T. diversifolia*, which presented, for *S. aureus*, a halo of 9.7 and 10.4 mm and for *E. coli* of 6.5 and 9.4 mm for stem-leaf and flowers respectively. The alcoholic extract of *T. diversifolia* flowers is emerging as a potential tool to inhibit bacterial growth.

Keywords: Alcoholic extract, bioassay, *Escherichia coli*, inhibition halo, mastitis, *Staphylococcus aureus*.

Introducción

La leche se describe como la secreción mamaria normal de animales bovinos, bufalinos y caprinos sanos, que se obtiene mediante ordeños completos, con destino a consumo en fresco o posterior procesamiento industrial y que no ha sido objeto de adulteración mediante la adición de sustancias no autorizadas para la modificación de sus constituyentes (1).

En términos dietéticos, la leche se caracteriza por ser un alimento que aporta proteínas (caseína, albuminas y globulinas), carbohidratos (lactosa), vitaminas (A, E, D, K, B1, B2, B6, B12 y C), minerales (Ca, P, Na, Mg, Fe, Zn, entre otros) y lípidos (ácidos grasos saturados, mono y poliinsaturados) (2). Así como también péptidos bioactivos y ácidos grasos de configuración *trans* generados en el rumen, lo cual lo confiere la categoría de alimento funcional por sus beneficios en la salud humana (3, 4).

La producción anual de leche fresca en Colombia para el 2016 se estimó en 5,4 millones de toneladas (5), con un crecimiento anual en los últimos años de aproximadamente 1,5 % (6). Esta industria genera aproximadamente 580 000 empleos directos y ha registrado un crecimiento para el PIB de leche sin elaborar de 11 % para el 2017 (7), por lo cual Quintero Duque et al. (8) afirman que esta industria es parte fundamental de la seguridad económica familiar en la mayor parte de pequeños ganaderos adscritos a este sistema productivo.

Pese a la importancia de la industria lechera en la economía nacional y mun-

dial, en la actualidad existen varios problemas que amenazan el entorno lechero, entre los cuales se resalta la inocuidad de los alimentos y el impacto de la residualidad de medicamentos y contaminantes químicos en la leche para consumo humano. El reporte global de la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés) (9) para vigilancia de la resistencia antimicrobiana ha indicado que esta situación es una problemática de salud pública de orden mundial, citando entre las causas posibles el mal uso de antibióticos en la industria pecuaria y su permanencia en la cadena alimenticia. Tang et al. (10), en una revisión sistemática que aborda la necesidad de restringir el uso de antibióticos en la producción pecuaria, hallaron 179 documentos asociados a resistencia de antibióticos, de los cuales 23 hacían referencia a ganado bovino y 21 de ellos evidenciaban la presencia de bacterias resistentes en humanos.

Arenas y Melo (11) han documentado la presencia de 22 casos con patógenos resistentes a antibióticos aislados de fuentes ambientales y enfermedades transmitidas por alimentos en Colombia. En esta revisión se citan 6 referencias directamente relacionadas con la leche o glándula mamaria, en las cuales se indica que se ha evidenciado resistencia a antibióticos como Penicilina, Espiramicina, Tetraciclina, Betalactámicos, Ciprofloxacina, Oxitetraciclina, Ampicilina, Tetraciclina, entre otros. Por su parte, Máttar et al. (12), al evaluar la presencia de antibióticos en leches pasteurizadas y crudas, han indicado la ausencia de residuos antibióticos en la leche pasteurizada, aunque evidenciaron la presencia de antibióticos en 28 % de las leches crudas evaluadas.

El uso indiscriminado de antibióticos se ha relacionado con mecanismos de resistencia asociados a la selección genética de microorganismos resistentes a determinados antibióticos y la posibilidad que tiene estos de transferir la resistencia, incluso a cepas sensibles, a través de procesos biológicos como transferencia de material genético vía plásmidos, transposones o integrones. Entre los mecanismos específicos de resistencia, se citan la expulsión de antibióticos a través de bombas de flujo, la modificación de blancos terapéuticos o la inactivación de antibióticos (11, 13).

Una de las enfermedades que más demanda tratamiento antibiótico en la industria lechera es la mastitis. Esta afección se define como la inflamación de la glándula mamaria, principalmente por causas bacterianas, aunque también se evidencian inflamaciones por causas traumáticas (14). El *Staphylococcus aureus* se cita como uno de los agentes más importantes en presencia de mastitis infecciosa. La importancia radica en que esta bacteria no es un patógeno exclusivo de la ubre, dado que puede existir en el entorno de la ubre como sala de ordeño, piel, heridas, las manos de los ordeñadores (14) e incluso en el agua usada en la bebida y rutina de ordeño (15), lo que favorece su transmisión. Adicionalmente, cuenta con diferentes mecanismos de virulencia y de resistencia a antibióticos (16). También se citan como agentes causantes de mastitis los microorganismos como *Streptococcus agalactiae* y *Actinomyces pyogenes*, y las enterobacterias *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. y *Enterobacter* spp. (17).

La creciente problemática de resistencia de microorganismos a antibióticos y su potencial impacto en la salud humana ha demandado la búsqueda de alternativas derivadas de principios activos o aceites esenciales en especies vegetales con capacidades bactericidas, para que sean propuestas como potenciales terapias alternativas al control de la mastitis (18). En este sentido, algunos investigadores han identificado que *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray (*Asteraceae*) posee compuestos fitoquímicos con capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias (19-21).

T. diversifolia, también conocida como botón de oro, margaritón, falso girasol o girasol mexicano, se ha descrito como una planta perenne de la familia *Asteraceae* originaria de América Central. La planta puede alcanzar una altura de 2 a 3 m y presenta hojas alternadas y dentadas con tres lóbulos con 6 a 8 cm de diámetro, con presencia de flores a través de todo el año (22, 23). En esta especie se han descrito una serie de compuestos fitoquímicos y aceites esenciales, entre los que resaltan diterpenos, flavonoides, derivados de ácidos clorogénicos y lactonas sesquiterpénicas, entre otros, con efectos antiinflamatorio, citotóxicos, antimicrobiales, gastroprotectores, quimiopreventivos y antialérgicos (20, 24).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la acción antimicrobiana de extractos alcohólico de hojas, tallos y flores provenientes de *Tithonia diversifolia* sobre el crecimiento de *S. aureus* y *E. coli* bajo condiciones de cultivo *in vitro*.

Materiales y métodos

El experimento se desarrolló en el Centro de los Recursos Naturales Renovables (CRNR)-La Salada-SENA (Caldas-Antioquia), ubicado en las coordenadas 6°3'38"N y 75°37'54" W a una altura de 1800 msnm, temperatura promedio anual de 20 °C, precipitación media anual de 2000 mm, descrita como una zona agroecológica de bosque muy húmedo premontano (bmh-PM), según Holdridge (25).

Colecta de material vegetal

La colecta de material vegetal se realizó en un banco forrajero establecido con *T. diversifolia*, con aproximadamente 5 años de antigüedad. El banco forrajero se estableció con semilla sexual, previa mecanización y adecuación edáfica del terreno. Con un manejo agronómico basado en corte manual cada 90 días. El material cosechado fue sometido a lavado con agua destilada, para retirar impurezas asociadas con el área de cosecha.

Extractos de *T. diversifolia*

La extracción se realizó por vía alcohólica. Se tomaron por separado 200 g de material correspondiente a hojas, tallos apicales y flores. Cada parte de la planta fue sometido a inmersión en alcohol etílico al 96 % de pureza, por espacio de 24 h. Posteriormente el alcohol fue removido por medio de rotoevaporador a 60°C.

Ensayo de susceptibilidad

Los análisis asociados a la evaluación microbiológica se realizaron en el Labora-

torio de Servicios Tecnológicos, adscrito a la estrategia SENNOVA del CRNR La Salada (Caldas, Antioquia). La prueba de susceptibilidad en la inhibición de crecimiento en *S. aureus* y *E. coli* como efecto de los extractos obtenidos de hojas más tallos apicales y flores de *T. diversifolia* se realizó siguiendo los lineamientos de CLSI (26). Para tal fin se procedió al cultivo de *S. aureus* cepa ATCC 25923 y *E. coli* cepa ATCC 25922 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) en cajas de Petri utilizando el medio de cultivo Baird-Parker. El cultivo se mantuvo a 37°C por espacio de 24 a 48 h para garantizar el crecimiento adecuado del microorganismo. La selección de los microorganismos por evaluar se realizó teniendo en cuenta la prevalencia de estos en la zona y la disponibilidad de la cepa en el laboratorio.

Se utilizaron discos de papel filtro estériles de 6 mm, sumergidos en cada uno de los extractos por espacio de 2 minutos. Los discos se aplicaron en las cajas de Petri inoculadas previamente con el cultivo de *S. aureus* y *E. coli* tomando como base el patrón McFarland de 0,5, lo que equivale a una concentración aproximada de 108 UFC/ml, los cuales se incubaron a 35±1°C por 48 h. La viabilidad de cada extracto fue evaluada midiendo el halo de inhibición en el crecimiento del microorganismo alrededor del disco de papel. Esta medición se realizó a las 24 y 48 h posinoculación de los discos de papel, mediante un calibrador digital. Se consideró una inhibición efectiva en el crecimiento con un halo (HI) mayor a 6 mm.

Dentro del experimento se utilizó como control positivo el antibiótico Cloxacillin (5 µg) para *S. aureus* y Ceftiofur

(30µg) para *E. coli* descrito como eficiente en el control de cepas ATCC.

Diseño experimental y análisis de la información

Los datos se colectaron bajo un diseño de bloques completos al azar. Se consideró como bloqueo la repetición completa del experimento para cada una de las bacterias llevadas a cabo en tres días no consecutivos. La prueba de sensibilidad para cada bacteria se desarrolló bajo un experimento factorial en diseño de bloques completos al azar en un modelo mixto, que consideró los efectos fijos de extractos (tallos-hojas, flores y control positivo), la hora de evaluación (24 y 48 h) y la interacción de estos dos factores y como efectos aleatorios el bloque y el error experimental asociado al modelo. Los datos se analizaron empleando la función *lmer* del paquete *lme4* (27) en el software estadístico R-Project (Team R, 2018). El rechazo de la hipótesis nula se fijó con un p valor de 0,05. En caso de diferencias, en los factores se empleó el test de Tukey.

Resultados y discusión

El análisis de varianza indicó efecto significativo ($p < 0,05$) del extracto en la inhibición del crecimiento de *S. aureus* y *E. coli*. En los dos experimentos, el antibiótico evidenció un HI superior a 30 mm, con diferencia significativa comparado con los extractos obtenidos de hojas-tallos y flores en de *T. diversifolia*. En el caso de *S. aureus*, los extractos de *T. diversifolia* no presentaron diferencias significativas, con una media de HI que osciló entre 9,7 y 10,49 mm. Contrario

a esto, en *E. coli* el HI observado en el extracto obtenido a partir de flores presentó 3,25 mm por encima ($p < 0,05$) del observado en el extracto obtenido de tallo-hojas (tabla 1).

Tabla 1. Halos de inhibición (mm) para *S. aureus* y *E. coli* sometidas a extractos alcohólicos de hojas-tallos y flores de *T. diversifolia* y de un antibiótico comercial

	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Hojas y Tallos	9,72 b	6,52 c
Flores	10,49 b	9,48 b
Antibiótico*	31,22 a	32,69 a
Hora		
24	16,7	16,14
48	17,58	16,33
RCME	2,7063	1,3136
p valor		
Extractos	<,0001	<,0001
Hora	0,2995	0,3149
Extr:Hora	0,9136	0,782

* Para *S. aureus* el halo en el antibiótico corresponde a *Cloxacillin* y para *E. coli* a *Ceftiofur*. RCME expresa la raíz del cuadrado medio del error. Las letras en la columna indica diferencias significativas según test de Tukey.

Fuente: elaboración propia.

Los resultados obtenidos en los HI de extractos a partir de hojas-tallos y flores de *T. diversifolia*, distaron significativamente del control positivo. Sin embargo, en ambos experimentos se observaron HI superiores a 6 mm y en el caso específico del extracto de flores en *S. aureus*, superior a 10 mm, el cual ha sido especificado como límite para indicar una actividad parcial (entre 10 y 13 mm) contra el crecimiento de bacterias (28). La reducción en el crecimiento bacteriano asociada a

T. diversifolia puede estar relacionada con metabolitos secundarios, entre los cuales se han citado hasta 160 compuestos, con mayor representación de monoterpenos (46 %), sesquiterpenos (24,4 %), aldehídos (5,3 %), alcanos (3,4 %), ácidos grasos (3,1 %) entre otros (20), así como también a la presencia de taninos, saponinas y flavonoides (29, 30).

Los mecanismos bactericidas citados para los compuestos que pueden encontrarse en *T. diversifolia* se relacionan con alteración y daño del ADN para compuestos como alcaloides cuaternarios, daño en membranas celulares y pérdida de contenido celular para esteroides, inhibición en la síntesis de ADN y alteración en los mecanismos de transporte en membranas celulares para flavonoides, interacción y daño con compuestos esteroides de membranas celulares para saponinas, inhibición de enzimas extracelulares y secuestro de sustratos para taninos (31) y reducción inducida de lipopolisacáridos para compuestos como tagitina C, F y A (30).

Para la inhibición en el crecimiento de *S. aureus* se ha reportado el uso de *T. diversifolia* con extractos acuosos HI de 6 mm (19), aceites esenciales con HI de 14 mm (20), extractos metanólicos y clorofórmicos con HI de 12 y 20 mm, respectivamente (21), metanólicos con un HI de 16 mm (32) y etanólico y acuoso para flores y tallos con HI de 20, 22, 18 y 19 mm, respectivamente (33). En relación con *E. coli*, los mismos autores han reportado 0 mm en HI para extracto acuoso, 9 mm de HI para aceite esencial, 0 mm de HI para extractos metanólicos y clorofórmicos, 9 mm para extracto me-

tanólico y 11, 12, 16 y 14 mm para extractos etanólicos y acuosos en flores y tallos, respectivamente.

Las causas asociadas al bajo HI reportadas en el presente estudio pueden estar relacionadas con la concentración mínima inhibitoria (MIC) en los extractos, la cual ha sido reportada desde concentraciones bajas entre 1,56 a 2 mg/ml con respuestas en HI de 6 a 14 mm (19, 20), hasta concentraciones entre 3,13 y 10 mg/ml con HI que oscilan entre 11 y 22 mm (21, 33). En el presente trabajo no se determinó la MIC, pero se supone baja con base en las respuestas en HI y los resultados antes descritos. Otro factor que pudo influir en baja respuesta obtenida en la presente investigación, se asocia a la naturaleza química de los extractos y su relación con las características físico-químicas de los medios de cultivo, en los cuales se han descrito aspectos como la temperatura, el grosor y porosidad que facilitan o limitan el efecto de difusión de los principios activos (34).

Conclusiones

Los extractos obtenidos de *T. diversifolia*, principalmente el extraído a partir de flores, se pueden perfilar como potenciales controladores del crecimiento en bacterias como *S. aureus* y *E. coli*. Los resultados demuestran que se hace necesario explorar otros solventes para extracción como etanol y agua, con la consideración de evaluar la concentración mínima inhibitoria, a fin de obtener un valor objetivo de la efectividad de los extractos.

Referencias

1. Minprotección. Decreto 616 de 2006. Por el cual se expide el Reglamento Técnico sobre los requisitos que debe cumplir la leche para el consumo humano que se obtenga, procese, envase, transporte, comercializa, expendi, importe o exporte en el país [Internet]. Bogotá, D. C.; 2006 [citado 31 jul 2018]. Disponible en: <https://www.ica.gov.co/getattachment/15425e0f-81fb-4111-b215-63e61e9e9130/2006D616.aspx>
2. Agudelo Gómez DA, Bedoya Mejía O. Revista Lasallista de Investigación. Rev Lasallista Investig [Internet]. 2005 [citado 19 agosto 2018];2(1):38-42. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69520107>
3. Calvo M, Castro-Gómez A, García-Serrano L., Rodríguez-Alcalá L, Juárez Iglesias M, Fontecha Alonso J. Grasa láctea: una fuente natural de compuestos bioactivos. Aliment Nutr y Salud [Internet]. 2014 [citado 19 agosto 2018];21(3):57-63. Disponible en: [http://digital.csic.es/bitstream/10261/113565/1/Grasa láctea.pdf](http://digital.csic.es/bitstream/10261/113565/1/Grasa%20láctea.pdf)
4. Juarez Iglesia M, De La Fuente Layos M, Fontecha Alonso J. Los nutrientes de la leche en la salud cardiovascular. Nutr Hosp [Internet]. 2015 [citado 19 agosto 2018];31(2):26-32. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=309238518004>
5. FAO. Faostat. Livestock Primary [Internet]. 2018. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL>
6. Carulla JE, Ortega E. Sistemas de producción lechera en Colombia: retos y oportunidades. Dairy Prod Syst Colomb challenges Oppor [Internet]. 2016 [citado 19 agosto 2018];24(2):83-7. Disponible en: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=118712329&lang=es&site=ehost-live>
7. Fedegan. Cifras de Referencia Sector ganadero colombiano. Bogotá, D. C.; 2018.
8. Quintero Duque S, Quintero Duque M, Quintero Duque D. La cadena láctea popular: un análisis desde el derecho a la alimentación y la subsistencia de las comunidades campesinas en Colombia. Livest Res Rural Dev [Internet]. 2018 [citado 19 agosto 2018];30(7). Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/326606709>
9. WHO. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. [Internet]. Geneva; 2014 [citado 25 junio 2019]. Disponible en: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748_eng.pdf?sequence=1
10. Tang KL, Caffrey NP, Nóbrega DB, Cork SC, Ronksley PE, Barkema HW, et al. Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: a systematic review and meta-analysis. Lancet Planet Heal [Internet]. 2017 [citado 19 agosto 2018];1(8):e316-27. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(17\)30141-9](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(17)30141-9)
11. Arenas NE, Melo VM. Producción pecuaria y emergencia de antibiótico resistencia en Colombia: Revisión sistemática Livestock production and emergency antibiotic resistance in Colombia: Systematic review. Infectio [Internet]. 2018 [citado 19 agosto 2018];22(2):110-9. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v22n2/0123-9392-inf-22-02-00110.pdf>
12. Máttar S, Calderón A, Sotelo D, Sierra M, Tordecilla G. Detección de Antibióticos en Leches: Un Problema de Salud Pública. Rev Salud Pública [Internet]. 2009 [citado 19 agosto 2018];11(4):579-90. Disponible en: http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0124-00642009000400009&lng=es&nrm=iso&tlng=es
13. Casellas JM. Resistencia a los antibacterianos en América Latina: conse-

- cuencias para la infectología. Rev Panam Salud Publica [Internet]. 2011 [citado 19 agosto 2018];30(6):519-28. Disponible en: <http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/9428/a04v30n6.pdf?sequence=1>
14. Ramírez N, Palacio LG, Ceron JM, Jaramillo M. Mastitis. Fondo editorial Biogenesis. Medellín; 2011. 28 p.
15. Arismendi J, Valencia D, Cerón-Muñoz MF. Caracterización de la calidad microbiológica del agua en hatos lecheros del Norte de Antioquia, Colombia. Livest Res Rural Dev. 2018;30(8).
16. Calderón A, Rodríguez VC. Prevalencia de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano cundiboyacense (Colombia). Rev Colomb Ciencias Pecu [Internet]. 2008 [citado 19 agosto 2018];21:582-9. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/2950/295023543006.pdf>
17. Colorado-Jaramillo J, Zuluaga J, Olivera M, López-Herrera A. Microorganisms isolated in bacteriological culture from milk samples from clinically healthy holstein cows Microorganismos aislados en cultivo bacteriológico de muestras de leche de vacas holstein clínicamente sanas Microorganismos aislados em cultivo bact. Med Vet y zootenia CES. 2018;193.
18. Acosta Moreno A, Mira Hernández J, Posada Arias S. Tópicos en mastitis bovina: desde la etiología hasta algunas terapias alternativas. J Agric Anim Sci [Internet]. 2017; [citado 19 agosto 2018];6(1):42-58. Disponible en: <http://repository.lasallista.edu.co:8080/ojs/index.php/jals/article/view/1461>
19. John-Dewole, Oni OOA. Phytochemical and Antimicrobial Studies of Extracts from the Leaves of *Tithonia Diversifolia* for Pharmaceutical Importance. IOSR J Pharm Biol Sci [Internet]. 2013; [citado 19 agosto 2018]6(4):2319-7676. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/4dbc/ec8c807aef71b5165fbd-26f506e17e719431.pdf>
20. Orsomando G, Agostinelli S, Bramucci M, Cappellacci L, Damiano S, Lupidi G, et al. Mexican sunflower (*Tithonia diversifolia*, Asteraceae) volatile oil as a selective inhibitor of *Staphylococcus aureus* nicotinate mononucleotide adenylyltransferase (NadD). Ind Crops Prod [Internet]. 2016; [citado 19 agosto 2018]85:181-9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.03.003>
21. Ogundare AO. Antimicrobial activity of *Tithonia diversifolia*. Vol. 2, Trends in Applied Sciences Research. 2007. p. 145-50.
22. Londoño J, Mahecha L, Angulo J. Desempeño agronómico y valor nutritivo de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A Gray para la alimentación de bovinos. Rev Colomb Cienc Anim. 2019;11(1).
23. Gallego L, Mahecha L, Angulo J. Crecimiento y desarrollo de Gray en condiciones de trópico alto. In: 3° Congreso Nacional de Sistemas Silvopastoriles. VIII Congreso Internacional de Sistemas Agroforestales Introducción. 2015. p. 1-39.
24. Sampaio BL, Edrada-Ebel R, Da Costa FB. Effect of the environment on the secondary metabolic profile of *Tithonia diversifolia*: A model for environmental metabolomics of plants. Sci Rep [Internet]. 2016 [citado 19 agosto 2018];6. Disponible en: www.nature.com/scientificreports
25. Holdridge LR (Leslie R. Forest environments in tropical life zones; a pilot study [Internet]. 1st ed.]. Oxford,: Pergamon Press; 1971 [citado 3 mayo 2018]. 747 p. Disponible en: <https://searchworks.stanford.edu/view/609670>
26. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. Twelfth Edition. M02-A12 [Internet]. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015. [citado 19 agosto 2018];1-73 p. Disponible en: <http://www.clinical-labstandards.org/standards/antimicrobial-disk-susceptibility-tests>

www.facm.ucl.ac.be/intranet/CLSI/CLSI-2015-M02-A12-original.pdf

27. Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S. Fitting Linear Mixed-Effects Models using lme4. *J Stat Softw* [Internet]. 2015; [citado 19 agosto 2018]67(1):1-48. Disponible en: <http://arxiv.org/abs/1406.5823>

28. Quinto E, Santo M. The Microbiological Assay Methods. In: Guevara B, editor. *A guidebook to plant screening: phytochemical and biological*. Research C. Manila; 2005. p. 196.

29. Rivera J, Chará J, Gómez J, Ruíz T, Barahona R. Variabilidad fenotípica y composición fitoquímica de *Tithonia diversifolia* A. Gray para la producción animal sostenible. *Livest Res Rural Dev*. 2018;30(12).

30. Ajao AA, Moteetee AN. *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray. (Asteraceae: Heliantheae), an invasive plant of significant ethnopharmacological importance: A review. *South African J Bot* [Internet]. 2017; [citado 19 agosto 2018]113:396-403. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.09.017>

31. Gutierrez RM, Baculi R, Pastor N, Puma-At T, Balangcod T. Antibacterial potential of some medicinal plants of

the Cordillera Region, Philippines. *Indian J Tradit Knowl* [Internet]. 2013 [citado 25 enero 2019];12(4):630-7. Disponible en: <http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/22191/1/IJTK%2012%284%29%20630-637.pdf>

32. Balangcod TD, Vallejo VL, Patacsil M, Apostol O, Marie L, Laruan VA, et al. Phytochemical screening and Antibacterial activity of selected medicinal plants of Bayabas, Sablan, Benguet Province, Cordillera Administrative Region, Luzon, Philippines. *Indian J Tradit Knowl* [Internet]. 2012 [citado 25 enero 2019];11(4):580-5. Disponible en: <http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/14947/1/IJTK%2011%284%29%20580-585.pdf>

33. Liasu MO, Ayandele AA. Antimicrobial activity of aqueous and ethanolic extracts from *Tithonia diversifolia* and *Bryum coronatum* collected from Ogbomoso. *Adv Nat Appl Sci* [Internet]. 2008 [citado 25 enero 2019];2(1):31-43. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/285076676>

34. Bonev B, Hooper J, Parisot J. Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. *J Antimicrob Chemother*. 2008;61(6):1295-301.