







Efecto antioxidante y antibacteriano de diferentes extractos de *Tithonia tubaeformis*.

Antioxidant and antibacterial effect of different extracts from *Tithonia tubaeformis*.

García-Vázquez, L. M.¹ , Ocampo-López, J.¹ , Ayala-Martínez, M.¹ ,
Hernández-Aco, R. S.¹ , Zaragoza-Bastida A.¹ , Zepeda-Bastida, A.^{1*} 

¹ Área Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Instituto de Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Av. Universidad Km. 1 Rancho Universitario, CP. 43600. Tulancingo, Hidalgo. México



Please cite this article as/Como citar este artículo: García-Vázquez, L. M., Ocampo-López, J., Ayala-Martínez, M., Hernández-Aco, R. S., Zaragoza-Bastida A., Zepeda-Bastida, A. (2023). Antioxidant and antibacterial effect of different extracts from *Tithonia tubaeformis*. *Revista Bio Ciencias*, 10 e1348 <https://doi.org/10.15741/revbio.10.e1348>

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: May 12th 2022.

Accepted/Aceptado: March 28th 2023.

Available on line/Publicado: April 21th 2023.

RESUMEN

El género *Tithonia*, ha sido ampliamente estudiado para determinar sus efectos bioactivos de interés farmacéutico y nutricional, por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue determinar el efecto antioxidante y antibacteriano de cinco extractos de *Tithonia tubaeformis*, obtenidos con solventes de polaridad ascendente, hexano, diclorometano, acetato de etilo, metanol y etanol. Se identificó la presencia de taninos, alcaloides y fenoles totales. Se midió el efecto antioxidante a los radicales ABTS, DPPH y poder reductor al ion férrico, se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria de cada extracto sobre *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* y *Listeria monocytogenes*. Los resultados obtenidos mostraron que los cinco extractos tienen efecto antioxidante sobre los radicales ABTS, DPPH y potencial reductor al ion férrico; sin embargo, los extractos que presentaron un efecto estadísticamente significativo ($p < 0.05$) fueron metanol y etanol. Los extractos de metanol, etanol y acetato de etilo mostraron actividad antimicrobiana, siendo el solvente de etanol el que mayor actividad antibacteriana tuvo, con una Concentración Mínima Inhibitoria de 1 mg/mL sobre *Escherichia coli* y 3 mg/mL sobre *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*. Estos resultados sugieren que *Tithonia tubaeformis* puede ser de interés farmacéutico y nutricional por los efectos bioactivos de los fitoquímicos presentes en sus extractos.

PALABRAS CLAVE: ABTS, DPPH, Ion férrico, bacterias patógenas.

*Corresponding Author:

Armando Zepeda Bastida. Área Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Instituto de Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Av. Universidad Km. 1 Rancho Universitario, CP. 43600. Tulancingo, Hidalgo. México.
Tel. 7717172000 Ext 2449. E-mail: azepeda@uaeh.edu.mx

ABSTRACT

The genus *Tithonia* has been extensively studied to determine its bioactive effects of pharmaceutical and nutritional interest; therefore, the objective of this study was to determine the antioxidant and antibacterial effect of five extracts of *Tithonia tubaeformis*, obtained with ascending polarity solvents, hexane, dichloromethane, ethyl acetate, methanol, and ethanol. In addition, tannins, alkaloids, and total phenols were identified. The antioxidant effect of ABTS radicals, DPPH, and ferric ion reducing power was measured, and the Minimum Inhibitory Concentration of each extract was determined on *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, and *Listeria monocytogenes*. The results showed that the five extracts have antioxidant effects on ABTS, DPPH radicals, and ferric ion-reducing potential; however, methanol and ethanol had a statistically significant effect ($p < 0.05$). In addition, methanol, ethanol, and ethyl acetate extracts showed antimicrobial activity; ethanol solvent was the best, with a Minimum Inhibitory Concentration of 1 mg/mL on *Escherichia coli* and 3 mg/mL on *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, and *Listeria monocytogenes* respectively. These results suggest that *Tithonia tubaeformis* may be of pharmaceutical and nutritional interest due to the bioactive effects of phytochemicals in its extracts.

KEY WORDS: Comparative Advantage, export, international market.

Introducción

El género *Tithonia* es una fuente de varios compuestos naturales, como lactonas, sesquiterpenos, diterpenos y flavonoides; la especie más investigada ha sido *Tithonia diversifolia*, la cual ha mostrado actividad antiinflamatoria, analgésica, antipalúdica, antiviral, antidiabética, antidiarreica, antimicrobiana, antiespasmódica, vasorrelajante, antioxidante y citotóxica (Chagas-Paula *et al.*, 2012). *Tithonia tubaeformis* es una especie nativa de México, ubicada en todo su territorio; crece como maleza en terrenos cultivados, principalmente de maíz, por lo que se considera desecho (Mendoza-Ramírez *et al.*, 2021). En la medicina tradicional se utiliza para controlar problemas gastrointestinales y favorecer la digestión; además, algunos agricultores la utilizan como alimento para el ganado (Gheno-Heredia *et al.*, 2011); se han utilizado diferentes partes de la planta en la alimentación de conejos para evaluar los parámetros productivos en la etapa de engorda (Pérez-Martínez *et al.*, 2018); asimismo, se evaluó la calidad de la carne y canal de conejos alimentados con la planta (Zepeda-Bastida *et al.*, 2019); por otro lado, los extractos de *Tithonia tubaeformis* han mostrado efecto antinociceptivo, en un modelo de ratón (Nawaz *et al.*, 2018; 2019); asimismo, se han identificado algunos compuestos fitoquímicos tales como saponinas, taninos, fenoles y flavonoides en extractos metanólicos, a los que se les atribuye actividad antiinflamatoria (Hinojosa-Dávalos *et al.*, 2013). Estos hallazgos sugieren que los metabolitos secundarios presentes en la planta pueden prevenir o retrasar el desarrollo

de enfermedades cardiovasculares, diabetes y cáncer, debido a procesos que involucran especies reactivas de oxígeno y también pueden tener un efecto modulador sobre las reacciones bioquímicas en las cascadas de señalización necesarias para las funciones celulares (Pretti *et al.*, 2018). Existen varias técnicas para la extracción de compuestos bioactivos, la mayoría de las cuales se basan en el poder de extracción de diferentes solventes y la aplicación de calor a los compuestos de interés (Azmir *et al.*, 2013). Este estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto antioxidante y antimicrobiano de cinco extractos de *Tithonia tubaeformis*.

Material y Métodos

Reactivos y soluciones

Hexano (Hx), diclorometano (DCM), acetate de etilo (AcOEt), etanol (EtOH) y metanol (MeOH) fueron adquiridos de Meyer®. Agua destilada y desionizada fue obtenida del Sistema de Purificación de Agua Elix (Merck-Millipore, Alemania) ácido 2,2'-Azino-bis 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS), 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina, Folin ciocalteu, ácido 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox), ácido galico, carbonato de sodio (Na_2CO_3), verde de bromocresol ($\text{C}_{21}\text{H}_{14}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$), fosfato de sodio (Na_3PO_4) cloroformo y penicilina fueron adquiridos de Merck® y Agar Mueller Hinton se obtuvo de DIBICO® (México).

Equipos

Licadora Oster® (USA), espectrofotometro Jenway modelo 6300, baño María StableTemp, Cole Parmer, (USA).

Extracción con disolventes orgánicos

Tithonia tubaeformis fue obtenida de campos de maíz en Teotihuacan, Estado de México, México (19°41'00'' N 98°52'00'' O) entre los meses de septiembre y octubre de 2018. Se utilizaron tallos, hojas y flores deshidratadas a temperatura ambiente en la oscuridad, se molieron en una licadora y se almacenaron en una bolsa de papel marrón de calidad alimentaria en la oscuridad y libre de humedad hasta su uso posterior.

Los extractos se obtuvieron por maceración (Brusotti *et al.*, 2014). Se pesaron 40 g de material vegetal, permaneciendo en contacto con los diferentes solventes: Hx, DCM, AcOEt, EtOH y MeOH, durante 24 h a temperatura ambiente y en agitación constante; posteriormente se filtraron a través de cuatro capas de gasa seguidas de papel filtro (Whatman No. 40), los extractos obtenidos se almacenaron en un matraz ámbar y se enfriaron a 4 °C hasta su posterior uso.

Análisis fitoquímico

La actividad antioxidante se determinó mediante la técnica ABTS (Siddhuraju & Becker, 2007) basada en la decoloración del radical ABTS debido a la reducción del catión electrónico presente en la muestra vegetal. Se realizó una curva de calibración con Trolox y para los extractos se tomaron 50 mL de cada uno y se incubaron por 30 min a temperatura ambiente

en oscuridad con 1.45 mL del radical ABTS y se midió la absorbancia a 732 nm. Por otro lado, el efecto antioxidante también se determinó mediante la técnica DPPH (Brand-Williams *et al.*, 1995), basada en la capacidad de un antioxidante para neutralizar un radical. Se determinó la concentración inicial del compuesto DPPH, así como la concentración resultante después de agregar los extractos, 1.95 mL de solución de DPPH a 50 mL de cada extracto; la absorbancia se midió a 517 nm cada 10 min durante 1 h, el tiempo en que la concentración de DPPH se reduce a la mitad y el porcentaje de inhibición se determinó a los 30 min. Además, para DPPH y ABTS se realizó la medición de IC_{50} .

Se midió el potencial reductor del ion Fe^{+3} a Fe^{+2} (Müller *et al.*, 2011). Se realizó una curva de calibración control con Trolox. Se tomaron 100 mL de cada extracto, se depositaron en un tubo de ensayo con 300 mL de agua destilada y 300 mL de solución FRAP (2,5 mL de 2,4,6-Tris (2-piridil)-s-triazina con 2,5 mL de $FeCl_3$ en solución buffer de acetato 0.3 M, pH 3.6), se incubaron en baño María (StableTemp, Cole Parmer, USA) a 37 °C por 30 min, transcurrido el tiempo, en el espectrofotómetro se midió la absorbancia a 593 nm.

Los resultados obtenidos de los tres ensayos, se analizaron mediante un diseño completamente al azar y un análisis de varianza de una vía. Se realizó una prueba de comparación de medias de Tukey con una $p < 0.05$ con el programa estadístico IBM SPSS Statistics versión 20.

Se midieron los fenoles totales (Singleton *et al.*, 1999) a través de un método colorimétrico que permite el análisis de compuestos orgánicos con anillos aromáticos (fenoles, ácido tánico, lignina y proteínas). Se preparó un extracto acuoso con 40 g de la planta en 100 mL de agua destilada, después se colocaron 1,58 mL del extracto en tubos de ensayo y se adicionaron 100 μ L de reactivo de Folin ciocalteu, se agitó y se incubó por 8 min a temperatura ambiente y en la oscuridad, transcurrido el tiempo, se adicionó 300 μ L de Na_2CO_3 al 20 % (p/v), se agitó e incubó a 50 °C en baño maría por 15 min, se evaluó la absorbancia a 765 nm en el espectrofotómetro.

La presencia de alcaloides se midió (Shamsa *et al.*, 2010) basado en la reacción del nitrógeno de los alcaloides con el verde de bromocresol, dando como resultado la formación de un complejo de transferencia de carga verde de bromocresol/alcaloide. Se elaboró el extracto con 20 g de planta seca en 50 mL de agua destilada hirviendo, se cubrió con aluminio y se dejó durante una hora, después se filtró con tres capas de gasa y papel filtro; al material vegetal remanente se le agregaron 50 mL de agua hirviendo, se esperó 30 minutos y se filtró con gasa; se transfirieron 5 mL del extracto a un tubo de ensayo, se agregaron 5 mL de verde de bromocresol y 5 mL de Na_3PO_4 , se agitó y se agregaron 2 mL de cloroformo, se vació con un embudo de separación en un matraz volumétrico de 10 mL para recuperar la fase clorofórmica, el resto de la solución se devolvió al tubo y se repitió hasta alcanzar un volumen final de 10 mL, a la fase clorofórmica se le midió la absorbancia a 470 nm.

Para determinar la presencia de taninos (Bajaj & Devsharma, 1977), se preparó un extracto acuoso con 0.8 g de la planta en 100 mL de agua destilada, se filtró con papel filtro de poro medio; para el ensayo, se transfirieron 250 mL de extracto al tubo, se adicionó 100 μ L del reactivo de

Folin-Denis, 250 μL de Na_2CO_3 (al 35 %) y 4.40 mL de agua destilada, se incubó por 30 min a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo se midió la absorbancia a 760 nm.

Ensayo antibacteriano

Para evaluar la capacidad antibacteriana, los extractos obtenidos con los diferentes solventes fueron usados contra *Escherichia coli*, *Salmonella tiphymurium*, *Salmonella enteritidis* y *Listeria monocytogenes* (CLSI, 2015); se realizaron 5 concentraciones de cada extracto (10, 7, 5, 3, 1 y 0.5 mg/mL) para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC), los extractos se filtraron con filtros de pirinola de 0.45 mm (Thermo Scientific®). La actividad antibacteriana de los extractos se determinó mediante la prueba de discos en agar, para lo cual, se sembraron las bacterias en monocapa, ajustando la concentración de estas al estándar de 0.5 de la escala de McFarland (1.5×10^8 UFC/mL) en cajas de petri con medio sólido Muller Hinton. Se colocaron discos de papel filtro impregnados con cada extracto, para ser evaluados con las diferentes concentraciones; se usaron 20 mg/mL de penicilina como control positivo; los cultivos se incubaron a 37 °C durante 48 h. La MIC se definió como la concentración más baja del extracto que no mostró un crecimiento bacteriano visible después del período de incubación.

Resultados y Discusión

Para evaluar el efecto antioxidante es necesario utilizar diferentes métodos como DPPH, ABTS y FRAP; los resultados obtenidos de los diferentes extractos de *Tithonia tubaeformis* se muestran en la Tabla 1; mediante la técnica DPPH, el metanol tuvo mayor capacidad antioxidante (76.49 %) estadísticamente significativo ($p < 0,05$), seguido de etanol y hexano (67.6 % y 56.14 %, respectivamente), con respecto al diclorometano y al acetato de etilo. En cuanto a la técnica ABTS, los resultados obtenidos mostraron que al igual que la técnica DPPH, el metanol presentó el mayor porcentaje de inhibición (79.38 %), seguido del etanol y el hexano (76.10 % y 62.57 %, respectivamente) con respecto al diclorometano y al acetato de etilo; este mismo comportamiento lo podemos observar en la medición del IC_{50} , donde encontramos que el metanol (2.10 mg/mL DPPH y 0.80 mg/mL ABTS) y el etanol (6.05 mg/mL DPPH y 2.27 mg/mL ABTS) requirieron una menor concentración para tener un efecto antioxidante sobre la mitad de un radical libre; la capacidad antioxidante por el método ABTS fue menor que por el método DPPH, quizás debido a los diferentes mecanismos de reacción de los radicales evaluados. La diferencia entre la capacidad antioxidante de los extractos puede deberse a la concentración o tipo de compuesto disuelto en cada solvente, debido a que el porcentaje de extracción aumenta progresivamente con la polaridad del solvente; esto significa que la tasa de rendimiento de extracción es directamente proporcional al índice de polaridad de los solventes (Zhang *et al.*, 2015). Dentro del género *Tithonia*, el efecto antioxidante ha sido ampliamente evaluado; el extracto acuoso de *Tithonia diversifolia* puede contrarrestar las reacciones en cadena de radicales, previniendo el daño oxidativo de los lípidos plasmáticos más allá de la acción de los antioxidantes naturalmente presentes en el plasma (di Giacomo *et al.*, 2015).

Por otro lado, en la Tabla 1 también se puede observar el potencial reductor del ion férrico (FRAP) de los diferentes extractos obtenidos de *Tithonia tubaeformis*; los resultados

encontrados mostraron que el extracto metanólico tuvo el mayor poder reductor sobre el ion férrico (137.27 mM/mL) estadísticamente significativo ($p < 0.05$); esto se relaciona con el estrés oxidativo inducido por iones metálicos, a los cuales se les han atribuido diversas enfermedades. En contraste, el efecto antioxidante/reductor medido por la técnica de FRAP, se refiere a la quelación del ion Fe^{3+} a Fe^{2+} , el cual, podría prevenir el daño potencial a las biomoléculas por la acumulación de hierro, que conduce a un aumento de los radicales libres y al desarrollo del estrés oxidativo (Ojo *et al.*, 2018); se ha sugerido que la presencia de monoterpenos y monoterpenos oxigenados en el aceite esencial de *Tithonia diversifolia* son los principales responsables del potencial antioxidante-reductor (Orsomando *et al.*, 2016); además, los extractos obtenidos con acetona, acetato de etilo, diclorometano y butano de las hojas de *Tithonia diversifolia* han mostrado poder reductor al ion Fe^{3+} (Pantoja-Pulido *et al.*, 2017).

Tabla 1. Efecto antioxidante de extractos obtenidos de *Tithonia tubaeformis*.

Extractos	DPPH		ABTS		FRAP (mM/mL)
	(%)	IC50 (mg/mL)	(%)	IC50 (mg/mL)	
Hexano	56.14 ^{ab} ± 3.50	11.15	62.57 ^{ab} ± 1.38	8.29	49.04 ^c ± 2.37
Diclorometano	35.58 ^c ± 11.12	12.54	56.95 ^{bc} ± 5.13	10.79	1.87 ^e ± 1.50
Acetato de etilo	24.16 ^{bc} ± 12.96	25.40	51.14 ^c ± 4.29	13.38	25.05 ^d ± 1.26
Metanol	76.49 ^a ± 2.37	2.10	79.38 ^a ± 0.21	0.80	137.27 ^a ± 1.11
Etanol	67.60 ^a ± 5.64	6.05	76.10 ^a ± 1.37	2.27	89.72 ^b ± 4.87

^{abc} Letras diferentes dentro de las filas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

La cuantificación de taninos, alcaloides y fenoles totales presentes en la planta completa de *Tithonia tubaeformis* se muestra en la Tabla 2. Los resultados encontrados mostraron que el extracto acuoso de *Tithonia tubaeformis* contiene 2 % de taninos, 3 % de alcaloides y 230 mg EAG/L de fenoles totales, lo que sugiere que esta planta podría ser de interés farmacéutico, ya que estos compuestos están vinculados a actividades farmacológicas por tener efectos antiinflamatorios, antimicrobianos y antioxidantes (da Gama *et al.*, 2014). En otras investigaciones se han mencionado fenoles, alcaloides, esteroides, taninos y cumarinas en extractos metanólicos y etanólicos de *Tithonia tubaeformis*, los cuales demostraron inhibición sobre el radical DPPH (Hinojosa-Dávalos *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2015); además, se han evaluado extractos de *Tithonia diversifolia*, mostrando un efecto antioxidante sobre el radical DPPH (da Gama *et al.*, 2014) y la presencia de fenoles (Ang *et al.*, 2019). Por tanto, nuestros resultados obtenidos a partir de la cuantificación de taninos, alcaloides y fenoles son consistentes con los obtenidos por otros autores ya que su presencia se correlaciona con un efecto antioxidante (Nithya *et al.*, 2016; Santhosh *et al.*, 2022).

Tabla 2. Cuantificación de taninos, alcaloides y fenoles totales presentes en la planta completa de *Tithonia tubaeformis*.

Fitoquímicos	Concentración
Taninos %	2
Alcaloides %	3
Fenoles mg EAG/L	230

Los resultados de la actividad antimicrobiana de los diferentes extractos obtenidos de *Tithonia tubaeformis* se muestran en la Tabla 3. El extracto que presentó mejor actividad antimicrobiana fue el etanol, con una MIC de 1 mg/mL sobre *Escherichia coli*, 3 mg/mL sobre *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*, seguidas de acetato de etilo y metanol. Los datos obtenidos son consistentes con extractos etanólicos y metanólicos de *Arnica montana*, que mostraron un efecto antibacteriano sobre *Staphylococcus aureus* con un halo de inhibición de 20 mm y 19 mm respectivamente (Kryvtsova & Koščová, 2020); además, los extractos de *Olea africana* y *Tithonia diversifolia* han mostrado un efecto antimicrobiano sobre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* (Douglas & Jeruto, 2016). El efecto antimicrobiano se ha atribuido a los compuestos fitoquímicos presentes en los extractos de fuentes vegetales, lo que sugiere que algunos de estos compuestos pueden penetrar la membrana celular de las bacterias a través de su acción hidrofílica e hidrofóbica al interactuar con las moléculas de la membrana y provocar la muerte celular (Ju et al., 2019).

Tabla 3. Actividad antibacteriana de extractos obtenidos de *Tithonia tubaeformis*.

Extractos	MIC mg/mL			
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Hexano	N/I	N/I	N/I	N/I
Diclorometano	N/I	N/I	N/I	N/I
Acetato de etilo	3	3	3	5
Metanol	5	5	7	1
Etanol	1	3	3	3

MIC = Concentración mínima inhibitoria

N/I= Sin inhibición

Conclusión

Nuestros resultados sugieren que los extractos obtenidos con metanol, etanol y acetato de etilo de *Tithonia tubaeformis* son efectivos como portadores de fitoquímicos, ya que mostraron efecto antioxidante y antibacteriano, contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus typhimurium*, *Salmonella enteritidis* y *Listeria monocytogenes*, esto sugiere, que en estos extractos, la presencia de metabolitos secundarios podría ser más significativa y diversa. Sin embargo, se necesita más investigación para determinar el tipo de metabolito presente en la planta y al que se le atribuyen estos efectos bioactivos.

Contribuciones de los autores

Conceptualización del trabajo García-Vázquez, L. M. y Zepeda-Bastida, A. Desarrollo de la metodología García-Vázquez, L. M., Ocampo-López, J., Ayala-Martínez, M. Validación experimental Hernández-Aco, R. S. Análisis de resultados García-Vázquez, L. M. y Zaragoza-Bastida A. Redacción y preparación del manuscrito García-Vázquez, L. M., Ocampo-López, J., y Zepeda-Bastida, A. Redacción, revisión y edición Zaragoza-Bastida A., Hernández-Aco, R. S. y Zepeda -Bastida, A. Todos los autores leyeron y aprobaron el manuscrito final.

Fondos

Esta investigación no recibió financiación externa.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para estudios de doctorado.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Referencias

- Ang, A. M. G., Enot, M. M., Baltazar, G. J. D., Alinapon, C. V., Buncales, E. O., & Barbosa, G. B. (2019). Antioxidant and cytotoxic activity of the leaf ethanolic extracts of *Tithonia diversifolia* and *Gliricidia sepium* from Bukidnon, Philippines. *Asian Journal of Biological and Life Sciences*, 8(1), 8-15. DOI:10.5530/ajbls.2019.8.2
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4),

- 426-436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Bajaj, K. L., & Devsharma, A. K. (1977). A colorimetric method for the determination of tannins in tea. *Microchimica Acta*, 68, 249-253. <https://doi.org/10.1007/BF01196209>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Brusotti, G., Cesari, I., Dentamaro, A., Caccialanza, G., & Massolini, G. J. (2014). Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: The role of analysis in the ethnopharmacological approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 87, 218-228. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.03.007>
- 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. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201100019>
- Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI. (2015). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *Twenty-Second Informational Supplement Clinical and Laboratory Standards Institute*, 32.
- da Gama, R. M., Guimarães, M., de Abreu, L. C., & Armando-Junior, J. (2014). Phytochemical screening and antioxidant activity of ethanol extract of *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray dry flowers. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(9), 740-742. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014APJTB-2014-0055>
- di Giacomo, C., Vanella, L., Sorrenti, V., Santangelo, R., Barbagallo, I., Calabrese, G., Genovese, C., Mastrojeni, S., Ragusa, S., & Acquaviva, R. (2015). Effects of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. gray extract on adipocyte differentiation of human mesenchymal stem cells. *PLoS One*, 10(4), e0122320. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122320>
- Douglas, K., & Jeruto, J. (2016). Phytochemistry and antimicrobial activity of extracts from medicinal plants *Tithonia diversifolia* and *Olea africana*. *British Journal of Pharmaceutical Research*, 12(3), 1-7. <https://doi.org/10.9734/bjpr/2016/26566>
- Gheno-Heredia, Y., Nava-Bernal, G., Martínez-Campos, A., & Sánchez-Vera, E. (2011). Las plantas medicinales de la organización de parteras y médicos indígenas tradicionales de Ixhuatlancillo, Veracruz, México y su significancia cultural. *Polibotánica*, (31), 199-251. <http://www.scielo.org.mx/pdf/polib/n31/n31a12.pdf>
- Hinojosa-Dávalos, J., Gutiérrez Lomelí, M., Siller López, F., Rodríguez Sahagún, A., Morales del Río, J. A., Guerrero-Medina, P. J., & Del-Toro-Sánchez, C. L. (2013). Phytochemical screening and antiinflammatory capacity of leaves from *Tithonia tubaeformis*. *Biotecnia*, 15(2), 53-60. <https://biotecnia.unison.mx/index.php/biotecnia/article/view/150/142>
- Ju, J., Xie, Y., Guo, Y., Cheng, Y., Qian, H., & Yao, W. (2019). The inhibitory effect of plant essential oils on foodborne pathogenic bacteria in food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(20), 3281-3292. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1488159>
- Kryvtsova, M., & Koščová, J. (2020). Antibiofilm-forming and antimicrobial activity of extracts of *Arnica montana* L., *Achillea millefolium* L. on *Staphylococcus* genus bacteria. *Biotechnologia Acta*, 13(1), 30-37. DOI:10.15407/biotech13.01.030
- Mendoza-Ramírez, N., Ayala-Martínez, M., Soto-Simental, S., Zepeda-Bastida, A., Ocampo-López, J., & García-Vázquez, L. M. (2021). *Tithonia tubaeformis* forage with medicinal properties, an alternative for animal feed. *Boletín de Ciencias Agropecuarias del ICAP*. 7(13), 1-3. <https://doi.org/10.29057/icap.v7i13.5999>
- Müller, L., Fröhlich, K., & Böhm, V. (2011). Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (α TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. *Food Chemistry*, 129(1), 139-148.

- <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.045>
- Nawaz, N. U. A., Saeed, M., Rauf, K., Usman, M., Arif, M., Ullah, Z., & Raziq, N. (2018). Antinociceptive effectiveness of *Tithonia tubaeformis* in a vincristine model of chemotherapy-induced painful neuropathy in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 103, 1043-1051. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.115>
- Nawaz, N. U. A., Saeed, M., Khan, K. M., Ali, I.; Bhatti, H. A., Sabi-Ur-Rehman, Shahid, M., & Faizi, S. (2019). Isolation of tyrosine derived phenolics and their possible beneficial role in anti-inflammatory and antioxidant potential of *Tithonia tubaeformis*. *Natural Product Research*, 35(22), 4286-4294. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1705813>
- Nithya, T. G., Jayanthi, J., & Ragunathan, M.G. (2016). Antioxidant activity, total phenol, flavonoid, alkaloid, tannin, and saponin contents of leaf extracts of *Salvinia molesta* D. S. Mitchell (1972). *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9(1), 200-203.
- Ojo, O. A., Ojo, A. B., Ajiboye, B. O., Olaiya, O., Okesola, M. A., Boligon, A. A., de Campos, M. M. A., Oyinloye, B. E., & Kappo, A. P. (2018). HPLC-DAD fingerprinting analysis, antioxidant activities of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray leaves and its inhibition of key enzymes linked to Alzheimer's disease. *Toxicology Reports*, 5, 585-592. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.05.003>
- Orsomando, G., Agostinelli, S., Bramucci, M., Cappellacci, L., Damiano, S., Lupidi, G., Maggi, F., Ngahang Kamte, S. L., Biapa Nya, P. C., Papa, F., Petrelli, D., Quassinti, L., Sorci, L., Vitali, L. A., & Petrelli, R. (2016). Mexican sunflower (*Tithonia diversifolia*, Asteraceae) volatile oil as a selective inhibitor of *Staphylococcus aureus* nicotinate mononucleotide adenyltransferase (NadD). *Industrial Crops and Products*, 85, 181-189. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.03.003>
- Pantoja-Pulido, K. D., Colmenares-Dulcey, A. J., & Isaza-Martínez, J. H. (2017). New caffeic acid derivative from *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray butanolic extract and its antioxidant activity. *Food and Chemical Toxicology*, 109, 1079-1085. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.03.059>
- Pérez-Martínez, K., García-Valencia, S., Soto-Simental, S., Zepeda-Bastida, A., & Ayala-Martínez, M. (2018). Productive parameters rabbits fed with different parts of the *Tithonia tubaeformis* plant. *Abanico Veterinario*, 8(2), 108-114. <https://doi.org/10.21929/abavet2018.82.10>
- Pretti, I. R., da Luz, A. C., Jamal, C. M., & Batitucci, M. C. P. (2018). Variation of biochemical and antioxidant activity with respect to the phenological stage of *Tithonia diversifolia* Hemsl. (Asteraceae) populations. *Industrial Crops and Products*, 121, 241-249. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.080>
- Santhosh, P., Nithya, T. G., Gokila Lakshmi, S., Lincy Shiny Marino, G., Balavaishnavi, B., & Kamaraj, M. (2022). Assessment of phytochemicals, antioxidant, antibacterial activity, and profiling of functional molecules in novel freshwater fern *Salvinia cucullata* Roxb. *South African Journal of Botany*, 151, 275-283. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.02.030>
- Siddhuraju, P., & Becker, K. (2007). The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. *Food Chemistry*, 101(1) 10-19 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.004>
- Shamsa, F., Monsef, H., Ghamooshi, R., & Verdian-Rizi, M. (2010). Spectrophotometric determination of total alkaloids in some iranian medicinal plants. *Journal of Applied Horticulture*, 12(1): 69-70. http://www.horticultureresearch.net/jah/2010_12_1_69_70.PDF
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymology*, 299, 152-178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Zepeda-Bastida, A., Ayala Martínez, M., & Soto Simental, S. (2019). Carcass and meat quality

of rabbits fed *Tithonia tubaeformis* weed. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 48, e20190074.
<https://doi.org/10.1590/rbz4820190074>

Zhang, H., Xi, W., Yang, Y., Zhou, X., Liu, X., Yin, S., Zhang, J., & Zhou, Z. (2015). An on-line HPLC-FRSD system for rapid evaluation of the total antioxidant capacity of *Citrus* fruits. *Food Chemistry*, 172, 622-629. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.121>