



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE *Turnera diffusa*
WILLD. EX SCHULT (TURNERACEAE)

TESIS

PARA OBTENER EL TITULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA:

CHRISTIAN URIEL AGUILERA RAMÍREZ

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ROCIO SERRANO PARRALES



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial agradezco infinitamente a mi preciada y querida Facultad de Estudios Superiores Iztacala por darme la oportunidad de pertenecer a esta hermosa familia, por permitirme conocer a todo tipo de personas y por ayudarme a realizar uno de mis más grandes objetivos, mientras a su vez me impulsa a obtener y trabajar por querer cumplir muchos más.

A mis profesores en general, gracias a todos y cada uno de ellos, por su paciencia, dedicación, excelente trabajo y esfuerzo que le ponían a cada una de sus clases y por contagiarnos el amor a tan maravillosa carrera con todas sus historias, cuentos, platicas, trabajos y datos curiosos que dependían siempre de las especies.

A la Doctora Rocio, por aceptarme para trabajar en conjunto con ella en el laboratorio, por orientarme en todo momento, y tenerme paciencia para la realización de este trabajo, por compartir sus espacios y siempre iluminarme con sus conocimientos y experiencias, por la confianza puesta en mí y compartir sus anécdotas y por su invaluable tiempo.

A la Doctora Tzasna por siempre estar al pendiente del trabajo, aconsejarme y estarme guiando, así mismo, por su apoyo en todo momento para realizar un trabajo óptimo.

Al Doctor Memo por orientarme, siempre inspirarme a estudiar más y más, por ser parte fundamental y de gran inspiración por esta preciada carrera desde que era mi profesor de química hasta mi sinodal.

Al próximo Doctor Erick por siempre estarme ayudando con el manejo de los equipos del laboratorio, por sus momentos para estarnos molestando, por su tiempo y sus preguntas que siempre ayudaron mi retroalimentación.

A la maestra Julieta por apoyarme en la revisión de mi trabajo de tesis como parte de mi jurado.

A mis compañeros del laboratorio de Farmacognosia, a Gelitos por siempre tener una energía tan bonita que contagia, a Karlita por compartir siempre platicas inspiradoras y hacer una convivencia agradable en el laboratorio y durante toda la carrera desde el primer, hasta el último semestre.

A Adriana porque juntos formamos un buen equipo de trabajo, para todos los experimentos, por siempre apoyarme en todo momento, ser comprensiva y organizada para poder realizar los trabajos en calidad de excelencia, por todas las pláticas emotivas y experiencias que vivimos en el transcurso y desarrollo de nuestras tesis.

Agradecimientos personales

A mis padres (Virginia y Mario) por brindarme la libertad de ejercer lo que fuera de mi agrado, sin cuestionarme nada, ayudándome a ser una persona autosuficiente y capaz de decidir que quiere para esta vida. Por los tantos sacrificios realizados para ayudarme a terminar mis estudios de Licenciatura, por hacer que nunca me faltara nada ni en la carrera ni en mi vida, por darme la humildad y enseñarme el valor del trabajo duro, ayudándome a comprender que cuando el camino es duro, caminar es apasionante. Un hijo nunca terminara de agradecer el cariño, amor y apoyo a sus padres. “Gracias mis súper héroes. ¡Ningún hijo tuvo mejores Padres!”

A mis hermanos Erika y Felipe y a mis padrinos David y Jorge por siempre motivarme a nunca claudicar y siempre ponerme de ejemplo para los que vienen. Por siempre presumir mi esfuerzo y ayudarme a siempre trabajar más y más duro.

A mi abuela Martha y a mi abuelo Efrén por su apoyo para realizar mis estudios desde que era pequeño hasta la fecha. Por guiarme para no cometer errores con base en, sus pláticas, experiencias y anécdotas compartidas para llevar un buen camino y una buena vida.

A mis mejores amigos y personas importantes que conocí durante mi vida universitaria: Mariana, Oscar, Frida, Karina, Karla, Lomeli, Adriana, Andrea y Ceci personitas que saben cuánto les quiero, son parte fundamental de mi desarrollo profesional y personal; en una relación, en un equipo, y en la vida, con ustedes siempre serán y estarán los mejores recuerdos, momentos y experiencias. Continuemos con nuestra tradición de seguir viajando y disfrutando de esta vida.

Mafer, Daniel y Jack por ser parte fundamental de mi desarrollo personal en mi etapa más cambiante y vulnerable de la vida, les agradezco las infinitas experiencias compartidas, desde el CCH-N, hasta la fecha. Manteniendo esas amistades que a pesar de tantos años transcurridos y a pesar de que estemos en Biología, Medicina, Odontología o Ciencias de la Tierra se mantienen con tanto amor, cariño y respeto. Tenemos un camino por delante y les agradezco el hoy y espero verlos en el mañana.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
JUSTIFICACIÓN.....	8
HIPÓTESIS	8
OBJETIVOS	9
MATERIALES Y MÉTODOS	10
1. Colecta del material vegetal	10
2. Obtención de extractos	10
3. Pruebas de identificación de metabolitos secundarios	10
4. Actividad antibacteriana	10
4.1 Evaluación cualitativa.....	11
4.2 Evaluación cuantitativa	11
4.3 Evaluación sobre las curvas de sobrevivencia bacteriana.....	11
5. Actividad antifúngica.....	11
5.1 Evaluación cualitativa en hongos levaduriformes.....	12
5.2 Evaluación cualitativa en hongos filamentosos.....	12
5.3 Evaluación cuantitativa en hongos filamentosos	12
6. Análisis estadístico	12
RESULTADOS.....	13
1. Datos etnobotánicos de la especie	13
2. Rendimiento de los extractos.....	13
3. Pruebas de identificación de metabolitos secundarios	14
4. Actividad antibacteriana	14
4.1 Evaluación cualitativa.....	14
4.2 Evaluación cuantitativa	16
4.3 Curvas de sobrevivencia bacteriana.....	17
5. Actividad antifúngica.....	21
5.1 Evaluación cualitativa en hongos levaduriformes.....	21
5.2 Evaluación cualitativa en hongos filamentosos.....	21
5.3 Evaluación cuantitativa en hongos filamentosos	22

DISCUSIÓN.....	23
CONCLUSIONES.....	30
APÉNDICES.....	31
1. Clasificación y descripción botánica de <i>T. diffusa</i>	31
2. Distribución geográfica de <i>T. diffusa</i>	33
3. Método de maceración (Domínguez, 1979).....	34
4. Pruebas cualitativas de identificación de los principales grupos de MS (Domínguez, 1979; Robles-García <i>et al.</i> , 2016).....	35
6. Método de dilución en agar	38
7. Curvas de sobrevivencia bacteriana	39
8. Método cualitativo de inhibición del crecimiento radial	40
9. Método de dilución en agar en hongos miceliados.....	41
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Usos etnobotánicos de <i>T. diffusa</i> en regiones de México	4
Cuadro 2. Antecedentes de estudios químicos realizados a especies del Género <i>Turnera</i>	5
Cuadro 3. Ficha técnica de <i>T.diffusa</i>	10
Cuadro 4. Rendimiento de los extractos de <i>T. diffusa</i>	10
Cuadro 5. Grupos de MS presentes en los extractos de <i>T. diffusa</i>	11
Cuadro 6. Actividad antibacteriana de los extractos de <i>T. diffusa</i>	12
Cuadro 7. Valores de CMI y CBM de los extractos con actividad antibacteriana de <i>T. diffusa</i>	13
Cuadro 8. Porcentaje de inhibición del extracto acetónico de <i>T. diffusa</i> sobre las curvas de sobrevivencia bacteriana.....	16
Cuadro 9. Actividad antifúngica de los extractos de <i>T. diffusa</i>	17

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>T. diffusa</i> Willd. Ex. Schult.....	5
Figura 2. Efecto del extracto acetónico de <i>T. diffusa</i> sobre las curvas de sobrevivencia bacteriana en cepas Gram negativas.....	14
Figura 3. Efecto del extracto acetónico de <i>T. diffusa</i> sobre las curvas de sobrevivencia bacteriana en cepas Gram positivas.....	15
Figura 4. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial del extracto hexánico de <i>T. diffusa</i> sobre <i>F. moniliforme</i>	18

RESUMEN

Las plantas medicinales tienen un papel clave en el mantenimiento de la salud, siendo el recurso más abundante de la medicina tradicional mexicana destinado a la atención de millones de mexicanos. *T. diffusa* es una especie perteneciente a la familia Turneraceae y es utilizada por las comunidades del Valle de Tehuacan-Cuicatlan para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto antimicrobiano de *T. diffusa* (Damiana). Se colectó la planta en Santa María Ixcatlán zona perteneciente al Valle de Tehuacan-Cuicatlan. Los extractos se extrajeron por el método de maceración. La composición química de los extractos se evaluó por los métodos de reacciones coloridas para la identificación de los principales grupos de metabolitos secundarios. La actividad antimicrobiana se determinó en 20 cepas de importancia clínica por los métodos de difusión y dilución en agar e inhibición del crecimiento radial. En los organismos más susceptibles se realizaron curvas de sobrevivencia bacteriana. En cuanto a la composición química, los extractos presentaron fenoles, flavonoides, taninos, esteroides y terpenos. El extracto acetónico inhibió el crecimiento microbiano de un mayor número de cepas (cuatro cepas Gram positivas y cuatro Gram negativas), mientras que el extracto hexánico inhibió el de una cepa Gram positiva y el de una cepa de hongo miceliado. Las cepas bacterianas más susceptibles al extracto acetónico fueron *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *S. aureus* FES-C y *S. epidermidis* (CMI= 2.0 y CBM= 3.0 mg/mL para todos los casos). Las cepas susceptibles al extracto hexánico fueron *S. aureus* (CMI= 3.0 y CBM= 4.0 mg/mL) y *Fusarium moniliforme*. En las curvas de sobrevivencia bacteriana, el extracto acetónico mostró efecto bactericida sobre *E. coli* (CMI=2.0, CBM= 3.0 mg/mL), *P. aeruginosa* (CMI=2.0, CBM= 3.0 mg/mL) *K. pneumoniae* (CMI= 1.0, CBM= 2.0 mg/mL), *S. epidermidis* (CMI=2.0, CBM= 3.0 mg/mL), *S. aureus* (CMI=3.0, CBM= 4.0 mg/mL), *E. faecalis* (CMI= 3.0, CBM= 4.0 mg/mL), así como efecto bacteriostático contra *Serratia marcescens* (CMI= 3.0, CBM= 4.0 mg/mL). Los resultados permiten demostrar las propiedades antimicrobianas de *T. diffusa* en el tratamiento de enfermedades de etiología infecciosa.

INTRODUCCIÓN

Las plantas destinan una cantidad significativa de carbono asimilado y de energía en la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas denominadas metabolitos secundarios (MS). A diferencia de los productos del metabolismo primario (carbohidratos, lípidos, proteínas, etc.), comunes en todas las plantas, los MS se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, su producción se encuentra restringida a una determinada familia, género o especie (Avalos y Pérez-Urria, 2009).

Los MS son compuestos de bajo peso molecular sintetizados en respuesta de diversos factores de estrés. Pueden ser almacenados en formas inactivas y posteriormente ser activados mediante acción enzimática. Estos compuestos se concentran en estructuras como las vacuolas y las paredes celulares vegetales (Hammond *et al.*, 2000; Nolasco, 2018). La biosíntesis de los MS ocurre a partir de los productos que resultan de algunas rutas metabólicas del metabolismo primario, como la fotosíntesis, glucolisis, ciclo de Krebs, vía del ácido shikímico, vía del metileritritol fosfato y bases nitrogenadas (Wink, 1999), de las cuales derivan cuatro intermediarios químicos principales: acetil coenzima A, ácido shikímico, ácido mevalónico y metileritritol fosfato (Dewick, 2002). A partir de estos compuestos, se biosintetizan los terpenos, alcaloides, compuestos fenólicos, etcétera (Gutiérrez & Estévez, 2009).

Las propiedades de los MS de las plantas han sido aprovechadas por el ser humano, quien por medio de la observación aprendió a manipularlas, usándolas contra enfermedades que afectan su salud y la de los animales, dando lugar al establecimiento de lo que hoy se conoce como herbolaria (Mendoza *et al.*, 2006), que es un campo del conocimiento dirigido a investigar y verificar las propiedades de las plantas medicinales, que a través del tiempo han tenido un papel clave en el mantenimiento de la salud de la población mundial (Morales, 2009).

Las enfermedades infecciosas siguen siendo una de las causas más importantes de muerte en la humanidad (Lozano *et al.*, 2012). La introducción de los antibióticos en la práctica aumentó la esperanza de vida de la población, sin embargo, desde

hace años una amenaza creciente deteriora la eficacia de estos fármacos: la resistencia bacteriana, (Pagalilauan & Limaye, 2013) la cual continúa en aumento y representa serios retos para el tratamiento de infecciones, tanto en las comunidades como en los hospitales (Jones, 2001).

El uso de sustancias naturales en el tratamiento de diferentes enfermedades, incluidas las de etiología infecciosa, constituye un desafío en la medicina y se ofrece como una alternativa (Domingo & López, 2003). En respuesta a la necesidad de conseguir estrategias eficaces para el control de las infecciones bacterianas, se ha recurrido a la fitoquímica y fitofarmacología, logrando encontrar nuevas moléculas (Ávila *et al.*, 2006). Con esto se acepta que, a pesar del avance alcanzado por la síntesis química, las plantas son una valiosa fuente de sustancias activas con propiedades antibacterianas (Nascimento *et al.*, 2000).

Se estima que a nivel global se utilizan más de 10,000 especies vegetales con fines medicinales (Morales, 2009). México es un país muy rico en diversidad florística (esto soportado por aproximadamente 4,500 especies vegetales), por lo que ocupa el segundo lugar a nivel mundial en el número de plantas medicinales registradas (García de Alba *et al.*, 2012). Así mismo, en México las plantas representan el recurso más abundante de la medicina tradicional, destinado a la atención de la salud de millones de habitantes (Lozoya & Zolla, 2015).

El valle de Tehuacán-Cuicatlán es una zona de importancia florística en México, debido a que cuenta con entre 10 y 11.4% de la flora mexicana. Posee 365 especies vegetales endémicas, que representan el 13.9% de su flora, y son utilizadas con distintos fines, uno de ellos es el medicinal (Dávila *et al.*, 2002). Entre las especies utilizadas por los habitantes del valle se encuentran las de la familia Turneraceae, que comprenden 10 géneros y 226 especies. Los géneros *Piriqueta* y *Turnera* concentran el mayor número de especies: 45 y 128 respectivamente (Arbo, 2005).

Turnera diffusa Willd. Ex Schult., es una especie utilizada con fines medicinales en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán (Hernández, 2003), es conocida como “Damiana” (figura 1). Su distribución es amplia, se distribuye desde Texas hasta Sudamérica. En México se distribuye en los estados de Baja California Sur, Chihuahua, Coahuila,

Sonora, Nuevo León, Hidalgo, Estado de México, Guerrero, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán y Quintana Roo (Alvarado-Cárdenas, 2006)

T. diffusa es la especie más importante de su género en cuanto a su aplicación en la medicina tradicional (Argueta, 1994). Además, ha sido mencionada en publicaciones europeas que indican que proviene de los misioneros del siglo XVII (Nuevas cartas sobre California), quienes le otorgaron el nombre de “Damiana”, refiriéndose a San Damián, un mártir cristiano considerado el patrón de los farmacéuticos, dicho nombre común generalmente aceptado fue acuñado por el misionero Juan María de Salvatierra, a finales del siglo XVII (Rätsch, 1997).

En México la especie es utilizada contra el dolor de estómago, enfermedades pulmonares relacionadas con el abuso del tabaco, infecciones de vejiga y riñón, reumatismos, diabetes y picaduras de escorpión (Argueta, 1994). Algunos antecedentes de uso etnobotánico de *T. diffusa* se mencionan en el cuadro 1.

En investigaciones realizadas con la especie *T. diffusa*, únicamente se ha reportado que tiene efecto antimicrobiano en cepas relacionadas con enfermedades gastrointestinales (Hernández *et al.*, 2003; Bueno *et al.*, 2010). Además, se evaluó la toxicidad del extracto hidroalcohólico (Bezerra *et al.*, 2011). En otras especies del género se ha documentado efecto antimicrobiano (Sethi & Ramasamy, 2012) y ansiolítico (Kumar & Sharma, 2006), como se menciona con mayor detalle en el cuadro 2.



Figura 1. *T. diffusa* WILLD EX. SCHULT (Imagen tomada de: shorturl.at/imPX2)

Cuadro 1. Usos etnobotánicos de *T. diffusa* en regiones de México

Región	Uso	Referencia
Norte de México (varios grupos humanos)	Tónico y afrodisiaco.	Martínez, 1969
Los Guarijíos de Sonora.	Contra gripe, contra el dolor y como afrodisiaco.	Aguilar <i>et al.</i> , 1994
La Cora de Jesús María, Nayarit.	Dolores de cabeza causados por la tos y para la bronquitis.	Aguilar <i>et al.</i> , 1994
Los Otomíes del Valle del Mezquital, Hidalgo.	Contra la diarrea y molestias estomacales.	Aguilar <i>et al.</i> , 1994
Sureste de México (cultura Maya)	Tratar enfermedades respiratorias (tos y bronquitis).	Heinrich <i>et al.</i> , 1998; Ankli <i>et al.</i> , 1999
Sur de Puebla	Tratar la diarrea y cólicos.	Canales <i>et al.</i> , 2005
Zapotitlán Salinas, Puebla	Tratamiento de enfermedades gastrointestinales.	Hernández <i>et al.</i> , 2003; Hernández <i>et al.</i> , 2005; Paredes-Flores <i>et al.</i> , 2007
Monterrey, Nuevo León	Afrodisiaco y para promover la ovulación.	González-Stuart, 2010
Sur de Nuevo León	Afrodisiaco y trastornos gastrointestinales.	Estrada-Castillón <i>et al.</i> , 2012

Cuadro 2. Antecedentes de estudios químicos realizados a especies del género *Turnera*

Autor y año	Contribución
Nakanishi <i>et al.</i> , 1965	Determinaron que un extracto de metanol-agua (1:1) de <i>T. ulmifolia</i> presenta actividad contra <i>S. aureus</i> .
Hernández <i>et al.</i> , 2003	Evaluaron los extractos hexano, cloroformo y etanol de <i>T. diffusa</i> contra 12 cepas bacterianas que causan enfermedades gastrointestinales más comunes en México. El extracto de hexano presentó actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. El extracto obtenido con etanol mostró actividad contra <i>Shigella boydii</i> y <i>S. aureus</i> . El extracto cloroformo fue selectivo sobre bacterias Gram negativas.
Kumar & Sharma, 2006	Evaluaron actividad contra la ansiedad. La apigenina pura-2, aislada del extracto metanólico de <i>T. diffusa</i> . Reportaron actividad significativa con dosis de 2mg/Kg.
Bueno <i>et al.</i> , 2010	El aceite esencial de <i>T. diffusa</i> mostró actividad antibacteriana sobre 15 cepas de <i>Mycobacterium</i> .
Murugan & Rajendran, 2011	Investigaron la actividad antibacteriana de <i>T. subulata</i> en donde el extracto obtenido con acetona mostró actividad moderada contra <i>K. pneumoniae</i> . El extracto de cloroformo mostró actividad moderada contra <i>S. aureus</i> y una menor contra <i>K. pneumoniae</i> .
Bezerra <i>et al.</i> , 2011	En modelos <i>in vivo</i> evaluaron la toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico de <i>T. diffusa</i> . Los autores reportaron que los ratones toleraban dosis orales de entre 10/1000 mg/kg del extracto. Concluyeron que el extracto no muestra toxicidad aguda en dosis relativamente altas, además, el extracto no alteró la actividad locomotora, coordinación motora o tiempo de sueño en los grupos experimentales.
Sethi & Ramasamy, 2012	Evaluaron la actividad antibacteriana <i>in vitro</i> del extracto etanólico de las hojas de <i>T. ulmifolia</i> contra bacterias Gram negativas (<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. tify</i> y <i>P. fluorescens</i>). El extracto mostró actividad inhibitoria contra todas las cepas, principalmente sobre <i>P. fluorescens</i> y <i>P. aeruginosa</i> .
Santos <i>et al.</i> , 2012	Encontraron que el extracto etanólico de <i>T. ulmifolia</i> mostró actividad antifúngica sobre <i>Candida albicans</i> , <i>C. krusei</i> y <i>C. tropicalis</i> . Sin embargo, no hubo actividad antifúngica clínicamente relevante.

JUSTIFICACIÓN

Debido al gran número de enfermedades infecciosas causadas por microorganismos patógenos y su resistencia frente a los antibióticos, se ha apostado por el uso de productos naturales derivados de las plantas contra las enfermedades de etiología infecciosa, en este sentido *T. diffusa* resulta de gran importancia debido a las propiedades que por conocimiento etnobotánico y fitoquímico se le atribuyen. Además, aún no se conocen sus principios activos, lo que hace necesario investigar la especie para aprovechar su potencial medicinal. Por tanto, la pregunta de investigación del presente trabajo es la siguiente:

¿*T. diffusa* presentará actividad antimicrobiana?

HIPÓTESIS

La especie *T. diffusa* es utilizada en la medicina tradicional para aliviar problemas de salud asociados a infecciones gastrointestinales y para tratar enfermedades respiratorias, además, otras especies del género *Turnera* han presentado actividad antimicrobiana. Con base en esto, es probable que los extractos de *T. diffusa* presenten actividad contra diferentes microorganismos patógenos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto antimicrobiano de los extractos de *T. diffusa* (Damiana).

OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener la concentración de sólidos solubles en solventes de diferente polaridad (hexano, acetona y metanol) de *T. diffusa*.
- Identificar los principales grupos de metabolitos secundarios presentes en los extractos.
- Evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos.
- Determinar la Concentración Mínima inhibitoria (CMI), Concentración Bactericida Mínima (CBM), Concentración Fungicida Mínima (CFM) y la Concentración Fungicida 50 (CF₅₀) en las que los extractos presentan actividad antimicrobiana.
- Evaluar el efecto de los extractos activos mediante la curva de sobrevivencia bacteriana.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Colecta del material vegetal

T. diffusa se colectó en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Oaxaca, México, en el municipio de Santa María Ixcatlán el 28 de Agosto del 2018 (coordenadas: 17° 48' 90.7" N, 97° 00' 61.8" W a 772 msnm) y se depositó un ejemplar en el Herbario IZTA para su identificación.

2. Obtención de extractos

El material vegetal se secó a temperatura ambiente. Para la obtención de los extractos se utilizó la parte aérea de la planta, la cual se pesó y se cortó en trozos. Los extractos se obtuvieron por el método de maceración utilizando solventes de diferente polaridad (hexano, acetona y metanol) (Apéndice 3) (Domínguez, 1979). El extracto se filtró y destiló a presión reducida para quitar el exceso de solvente, posteriormente se dejaron secar a temperatura ambiente en frascos de vidrio para su total evaporación. El rendimiento de los extractos se determinó con relación al peso seco de la planta. Los resultados se reportaron en gramos y porcentaje.

3. Pruebas de identificación de metabolitos secundarios

Los extractos se analizaron mediante pruebas cualitativas de presencia y/o ausencia de alcaloides (reactivos de Mayer y Dragendorf), fenoles (cloruro férrico), flavonoides (NaOH), taninos (reactivo de gelatina), terpenos (vainilla y ácido sulfúrico), cumarinas (NaOH y HCl), saponinas (H₂O y agitación), esteroides y triterpenos (reactivo de Lieberman-Buchard) (Apéndice 4) (Domínguez, 1979; Robles-García *et al.*, 2016).

4. Actividad antibacteriana

Para los bioensayos se utilizaron 19 cepas bacterianas de importancia clínica: *Enterococcus aerogenes* ATCC 13048, *E. gergoviae* ATCC 33028, *E. faecalis* ATCC 14506, *Escherichia coli* 82 MR, *E. coli* CUSI, *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724, *K. pneumoniae* ATCC 13883, *Micrococcus luteus* ATCC 10240, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enterica* ATCC 7251, *S. typhi* ATCC 19430, *Serratia marcescens* ATCC 14756, *Staphylococcus aureus* 23MR, *S. aureus* ATCC

29213, *S. aureus* CC, *S. aureus* CUSI, *S. aureus* FES-C, *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. epidermidis* FES-C, *Vibrio cholerae* ATCC 39450. Las cepas se obtuvieron del laboratorio de Farmacognosia de la FES Iztacala.

4.1 Evaluación cualitativa

La evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana se llevó a cabo con el método de difusión en agar de Kirby-Bauer (Ferraro, 2001; Taroco *et al.*, 2006). Como control positivo se utilizaron sensidiscos con 25 µg de cloranfenicol, como tratamiento experimental sensidiscos con 2 mg del extracto y como control negativo sensidiscos con 10 µL del solvente empleado en la extracción. Las pruebas se realizaron por triplicado (Apéndice 5).

4.2 Evaluación cuantitativa

Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración bactericida mínima (CBM). Se utilizó la técnica de dilución en agar (Koneman, 1991). Como control positivo se utilizaron placas con 30 µg/mL de cloranfenicol, como tratamiento experimental se utilizaron placas de 96 pozos en donde las concentraciones de los extractos activos empleados fueron de 0.25 a 4.0 mg/mL y un testigo sin extracto. Como control negativo se usaron las placas con los diferentes solventes. Las pruebas se realizaron por triplicado (Apéndice 6).

4.3 Evaluación sobre las curvas de sobrevivencia bacteriana

El efecto microbicida de los extractos activos se determinó en curvas de sobrevivencia bacteriana se evaluó sobre las cepas que presentaron mayor sensibilidad en las pruebas cuantitativas. Se registró el crecimiento de las cepas durante siete tiempos, distribuidos en 24 horas, al ser expuestas a diferentes concentraciones del extracto activo (1/2 CMI, CMI y CBM) y un grupo testigo (sin extracto) (Kubo *et al.*, 1993) (Apéndice 7).

5. Actividad antifúngica

Se utilizaron tres cepas de hongos levaduriformes (*Candida albicans* 17 MR, *C. glabrata* y *C. tropicalis*) y cuatro de hongos filamentosos (*Trichophyton mentagrophytes* CDBB-1112, *Aspergillus niger*, *Fusarium moniliforme* CDBB-H-265

y *F. sporotrichum*) de importancia médica y agronómica, obtenidas del laboratorio de Farmacognosia de la FES Iztacala.

5.1 Evaluación cualitativa en hongos levaduriformes

La evaluación cualitativa de la actividad antifúngica de los extractos sobre hongos levaduriformes se llevó a cabo por el método de difusión en agar Kirby-Bauer. Como control positivo se utilizaron sensidiscos con 30 µg de nistatina, como tratamiento sensidiscos con 2 mg de extracto y como controles negativos sensidiscos con 10 µL de cada solvente empleado en la extracción. Las pruebas se realizaron por triplicado.

5.2 Evaluación cualitativa en hongos filamentosos

La evaluación para hongos filamentosos se realizó con el método de inhibición del crecimiento radial (Ugwuja et al., 2014; Montes de Oca *et al.*, 2017). Como control positivo se utilizaron sensidiscos con 7 µg de ketoconazol, como control negativo 10 µL del solvente utilizado y como tratamiento sensidiscos con 2 mg de extracto. Las pruebas se realizaron por triplicado (Apéndice 8).

5.3 Evaluación cuantitativa en hongos filamentosos

Para la determinación de la concentración fungicida media (CF₅₀) y la concentración fungicida mínima (CFM) se utilizó el método de dilución en agar. Las concentraciones utilizadas fueron de 0.25 a 4.0 mg/mL de los extractos que resultaron activos en el método cualitativo (Montes de Oca *et al.*, 2017). Las pruebas se realizaron por triplicado (Apéndice 9).

6. Análisis estadístico

Para determinar si existe diferencia entre la actividad antimicrobiana de los extractos con respecto al control se realizó un análisis estadístico ANOVA unifactorial. Para determinar la CF₅₀ de los extractos sobre los hongos filamentosos se graficaron las concentraciones de extracto evaluadas vs porcentaje de inhibición del crecimiento radial, con el gráfico obtenido se realizó un análisis de regresión logarítmica.

RESULTADOS

1. Datos etnobotánicos de la especie

Cuadro 3. Ficha técnica de *T. diffusa*

Nombre científico:	<i>Turnera diffusa</i>
Nombre común:	Damiana
Parte utilizada:	Aérea
Uso:	Enfermedades gastrointestinales y respiratorias
Forma de uso:	Infusión
Fecha de colecta:	28 de agosto del 2018
Zona de colecta:	Santa María Ixcatlán, Oaxaca
Colector:	Héctor Cervantes Maya
No. de registro en el Herbario:	3260 IZTA

2. Rendimiento de los extractos

El extracto metanólico de hojas y tallos de *T. diffusa* presentó el mayor rendimiento (4.71%), en comparación con el extracto hexánico y acetónico (0.62% y 2.24% respectivamente) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Rendimiento de los extractos de *T. diffusa*

Extractos	Gramos	Porcentaje
	(g)	(%)
Hexánico	1.95	0.62
Acetónico	7.09	2.24
Metanólico	14.91	4.71

El rendimiento en porcentaje se obtuvo con respecto a 316.7 g de planta seca y fragmentada.

3. Pruebas de identificación de metabolitos secundarios

En los extractos se identificaron fenoles, flavonoides, taninos, esteroides y terpenos (Cuadro 5). Los extractos acetónico y metanólico presentaron la mayor diversidad de grupos de MS, en comparación con el hexánico. Los extractos mencionados presentaron los mismos grupos, entre ellos los fenoles, dentro de este grupo se encuentran los flavonoides y los taninos, que resultaron positivos en las pruebas.

Cuadro 5. Grupos de MS presentes en los extractos de *T. diffusa*.

Extracto	Cum	Fen	Alc	Flav	Sap	Tan	Gluc	Est	Terp
Hexánico	-	-	-	-	-	-	-	√	√
Acetónico	-	√	-	√	-	√	-	√	-
Metanólico	-	√	-	√	-	√	-	√	-

Cum: cumarinas, Fen: fenoles, Alc: alcaloides, Flav: flavonoides, Sap: saponinas, Tan: taninos, Gluc: glucósidos, Est: esteroides, Terp: terpenos. √ prueba positiva. - prueba negativa.

4. Actividad antibacteriana

4.1 Evaluación cualitativa

Las pruebas de actividad antibacteriana mostraron que el extracto acetónico fue el más activo al inhibir el desarrollo de ocho cepas bacterianas: cuatro Gram positivas (*E. faecalis*, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* FES-C y *S. epidermidis*) y cuatro Gram negativas (*E. coli* CUSI, *K. pneumoniae* ATCC 13883, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *S. marcescens* ATCC 14756). Por otra parte, el extracto hexánico resultó ser menos activo al inhibir el crecimiento únicamente de *S. aureus* ATCC 29213, mientras que el extracto metanólico no presentó actividad antibacteriana (Cuadro 6).

Los mayores halos de inhibición se observaron en el extracto acetónico en las cepas *S. epidermidis* FES-C, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *K. pneumoniae* ATCC 13883 (13.66 ± 1.15 , 10.00 ± 1.00 y 10.00 ± 1.00 mm, respectivamente) (Cuadro 6). Con respecto al análisis estadístico (ANOVA unifactorial) los halos de inhibición del cloranfenicol (control positivo) y del extracto acetónico y hexánico (tratamientos)

mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$). En general, los halos de inhibición del cloranfenicol fueron mayores que los de los extractos.

Cuadro 6. Actividad antibacteriana de los extractos de *T. diffusa*

Microorganismos	Control positivo		Extractos	
	Cloranfenicol	Hexánico	Acetónico	Metanólico
Gram negativas				
<i>E. coli</i> CUSI	22.33 ± 0.57	na	6.66 ± 0.57*	na
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	12.33 ± 1.15	na	10.00 ± 1.00*	na
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	21.33 ± 1.15	na	10.00 ± 1.00*	na
<i>S. marcescens</i> ATCC 14756	20.00 ± 0.00	na	6.33 ± 0.57*	na
Gram positivas				
<i>E. faecalis</i> ATCC 14506	11.00 ± 0.00	na	7.66 ± 0.57*	na
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	20.66 ± 1.15	6.00 ± 0.00*	7.00 ± 0.00*	na
<i>S. aureus</i> FES-C	19.00 ± 1.00	na	6.00 ± 0.00*	na
<i>S. epidermidis</i> FES-C	26.00 ± 1.00	na	13.66 ± 1.15*	na

Halos de inhibición en (mm). Valores promedio obtenidos de tres repeticiones ± DE. Los sensidiscos se probaron con 2 mg de extracto por disco. na: no presentó actividad. *Indica diferencia significativa ($P < 0.05$) con el control positivo (cloranfenicol).

4.2 Evaluación cuantitativa

En la actividad antibacteriana se observó que las cepas más susceptibles al extracto acetónico dentro del grupo de las Gram negativas fueron; *E. coli* CUSI, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*. Mientras que del grupo de las Gram positivas fueron; *S. aureus* FES-C, *S. epidermidis* FES-C y *S. aureus* ATCC 29213, al haber sido inhibidas por las concentraciones menores (CMI = 2.0 y CBM = 3.0 mg/mL respectivamente) (Cuadro 7).

En cuanto al extracto hexánico, este mostró un valor de CMI de 3.0 mg/mL sobre *S. aureus* ATCC 29213, que fue la única cepa susceptible a este extracto.

Cuadro 7. Valores de CMI y CBM de los extractos con actividad antibacteriana de *T. diffusa*

Microorganismos	Control positivo		Extractos			
	Cloranfenicol		Hexánico		Acetónico	
	CMI	CBM	CMI	CBM	CMI	CBM
Gram negativas						
<i>E. coli</i> CUSI	4.0	8.0	-	-	2.0	3.0
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	1.0	5.0	-	-	2.0	3.0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	na	na	-	-	2.0	3.0
<i>S. marcescens</i> ATCC 14756	2.0	12.0	-	-	3.0	4.0
Gram positivas						
<i>E. faecalis</i> ATCC 14506	3.0	7.0	-	-	3.0	4.0
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	8.0	12.0	3.0	4.0	2.0	3.0
<i>S. aureus</i> FES-C	4.0	10.0	-	-	2.0	3.0
<i>S. epidermidis</i> FES-C	2.0	5.0	-	-	2.0	3.0

Los resultados de la CMI del cloranfenicol están dados en µg/mL, los extractos en mg/mL.

4.3 Curvas de sobrevivencia bacteriana

En la evaluación del efecto del extracto acetónico de *T. diffusa* sobre el crecimiento de las bacterias Gram negativas, la cepa *E. coli* resulto ser la más sensible al extracto, al inhibir el 99.9% de la población en comparación con el grupo testigo, a las primeras 2 horas del experimento con las concentraciones del extracto de 2.0 y 3.0 mg/mL (CMI y CBM respectivamente) (Figura 2).

Así mismo, en *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, también se observó una disminución del crecimiento de la población en un 99.9 %, a las 24 horas de la exposición con el extracto acetónico en la concentración de 3.0 mg/mL (CBM). Mientras que en la concentración de 2.0 mg/mL (CMI) se observó una disminución del crecimiento menor en ambas cepas (Cuadro 8).

Por otra parte, la cepa menos sensible al extracto acetónico fue *S. marcescens* al inhibirse únicamente el 66.25 % y 70.11% de su crecimiento de la población, con respecto al grupo testigo, a las 24 horas de la exposición con el extracto, a las concentraciones de 3.0 y 4.0 mg/mL (CMI y CBM respectivamente).

En la Figura 3 se muestra el efecto del extracto acetónico en las curvas de sobrevivencia bacteriana en las cepas Gram positivas. La cepa *S. aureus* fue la más sensible al extracto, al ser inhibido su crecimiento en un 99.9%, con respecto al grupo control, a las primeras 2 horas del experimento con la concentración de 4.0 mg/mL (CBM), así mismo, con la concentración de 3.0 mg/mL (CMI) se observó inhibición del 99.9% a las 24 horas de exposición con el extracto.

En *S. epidermidis* se observó efecto bactericida (99.9% de inhibición del crecimiento microbiano) a las 12 horas de la exposición con el extracto en la concentración de 3 mg/mL (CBM).

Así mismo, la cepa *E. faecalis* fue inhibida en un 99.9 % de su población, a las 24 horas de la exposición con el extracto, en la concentración de 3.0 mg/mL.

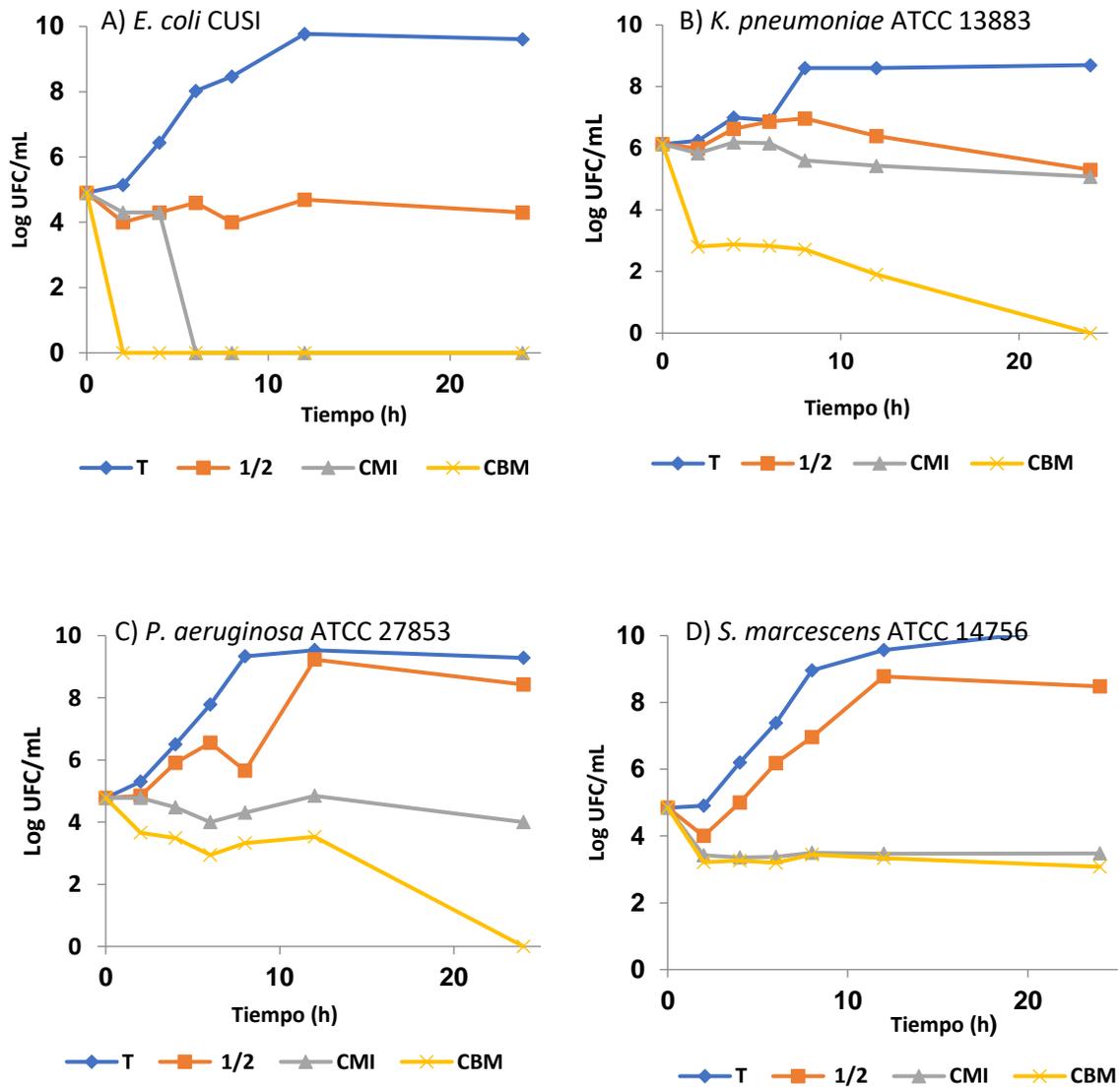


Figura 2. Efecto del extracto acetónico de *T. diffusa* sobre las curvas de sobrevivencia bacteriana en cepas Gram negativas: A) *E. coli* CUSI, B) *K. pneumoniae* ATCC13883, C) *P. aeruginosa* ATCC 27853 y D) *S. marcescens* ATCC 14756. Las concentraciones utilizadas para A), B) y C) fueron: 1/2 CMI = 1.0, CMI = 2.0, CBM = 3.0mg/mL. Mientras que para D) fueron: 1/2 CMI = 2.0, CMI = 3.0, CBM = 4.0 mg/mL.

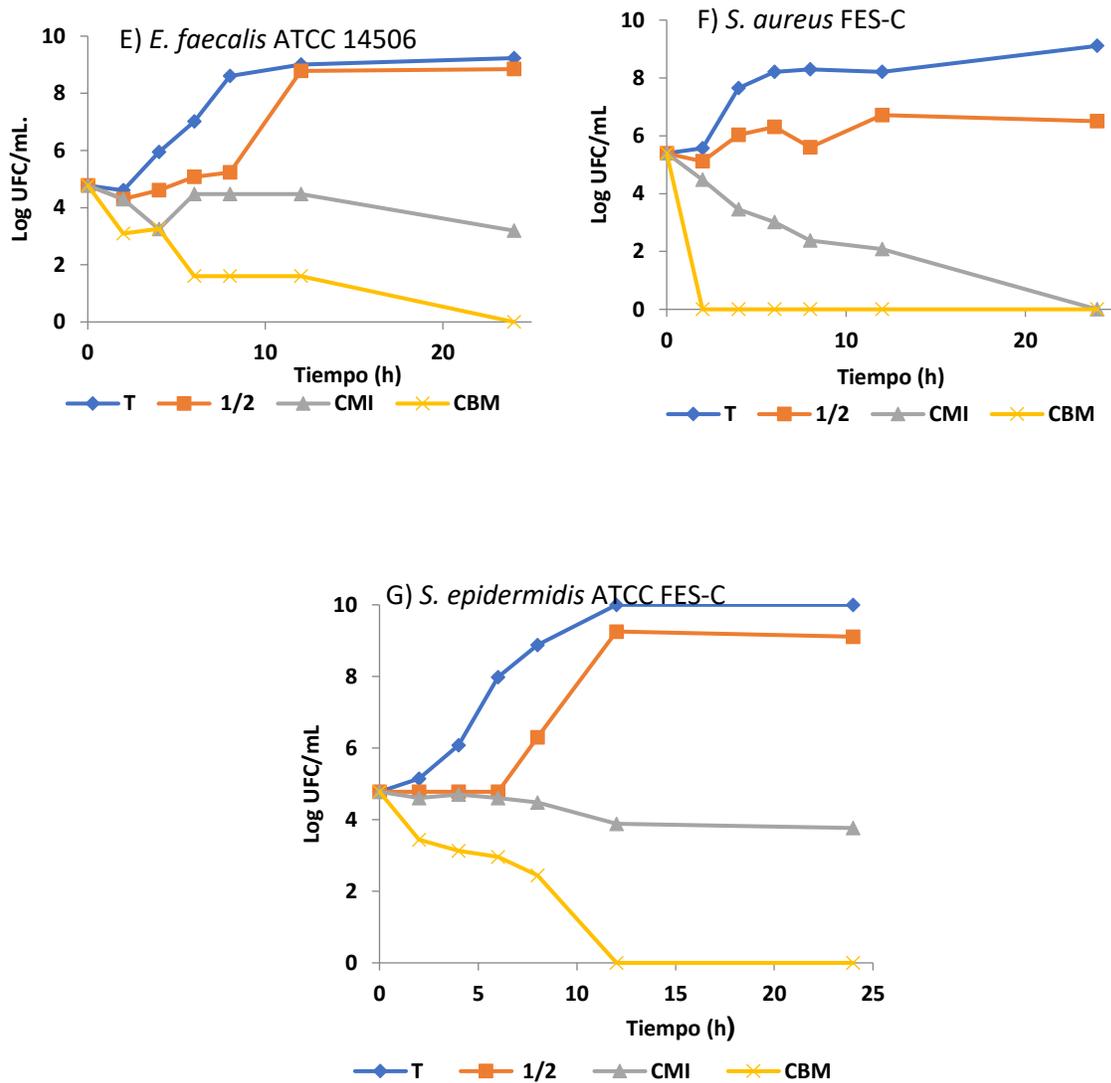


Figura 3. Efecto del extracto acetónico de *T. diffusa* sobre las curvas de sobrevivencia bacteriana en cepas Gram positivas: E) *E. faecalis*. F) *S. aureus* y G) *S. epidermidis*. Las concentraciones utilizadas para la cepa E) fueron: ½ CMI = 2.0, CMI = 3.0, CBM = 4.0 mg/mL, mientras que para las cepas F) y G) fueron: ½ CMI = 1.0, CMI = 2.0, CBM = 3.0 mg/mL.

En el cuadro 8, se concentran los datos de los porcentajes de inhibición de las curvas de sobrevivencia bacteriana para las cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas, al transcurrir las 24 horas de la exposición con el extracto, en donde se observa que el extracto acetónico de *T. diffusa* no muestra una tendencia de susceptibilidad hacia un grupo de microorganismo en particular, al conseguir una inhibición del 99.9 % de las poblaciones bacterianas para ambos grupos en las concentraciones iguales a CBM.

Cuadro 8. Porcentaje de inhibición del extracto acetónico de *T. diffusa* sobre las curvas de sobrevivencia bacteriana

Microorganismos	Inhibición del crecimiento bacteriano (%)		
	½ MIC	MIC	CBM
Gram negativas			
A) <i>E. coli</i>	55.27 %	99.9 %	99.9 %
B) <i>K. pneumoniae</i>	39.06 %	66.25 %	99.9 %
C) <i>P. aeruginosa</i>	9.13 %	56.89 %	99.9 %
D) <i>S. marcescens</i>	17.70%	66.25 %	70.11 %
Gram positivas			
E) <i>E. faecalis</i>	4.17 %	65.40 %	99.9 %
F) <i>S. aureus</i>	34.95 %	99.9 %	99.9 %
G) <i>S. epidermidis</i>	8.86 %	62.33 %	99.9 %

Valores de las concentraciones de ½ MIC, MIC y CBM están dados en mg/mL. En el tiempo 7 (24 horas) para cepas Gram negativas A), B) y C) fueron: 1.0, 2.0 y 3.0 mg/mL y para D) 1.5, 3.0 y 4.0 mg/mL respectivamente. Para cepas Gram positivas E) fueron: 1.5, 3.0 y 4.0 mg/mL, mientras que para F) y G) fueron: 1.0, 2.0 y 3.0 mg/mL respectivamente.

5. Actividad antifúngica

5.1 Evaluación cualitativa en hongos levaduriformes

Los extractos de *T. diffusa* no presentaron actividad contra hongos levaduriformes.

5.2 Evaluación cualitativa en hongos filamentosos

Las pruebas de actividad antifúngica mostraron que el extracto hexánico presentó actividad sobre *Fusarium moniliforme* CDBB-H-266, mientras que los extractos acetónicos y metanólicos no presentaron actividad (Cuadro 9).

Cuadro 9. Actividad antifúngica de los extractos de *T. diffusa*

Microorganismos	Control positivo		Extractos	
	Ketoconazol	Hexánico	Acetónico	Metanólico
Hongos filamentosos				
<i>A. niger</i>	+	na	na	na
<i>F. moniliforme</i> CDBB-H-266	+	+	na	na
<i>F. sporotrichum</i>	+	na	na	na
<i>T. mentagrophytes</i> CDBB-H-1112	+	na	na	na

na: no actividad, +: actividad

5.3 Evaluación cuantitativa en hongos filamentosos

El extracto hexánico logra inhibir el 28.6% del crecimiento radial de la cepa *F. moniliforme*, con la mayor concentración probada (4 mg/mL) (Figura 4). Al calcular la CF₂₅ a partir de la ecuación obtenida de la regresión lineal se obtuvo un valor de 3.3 mg/mL, lo cual corresponde con la cantidad de extracto necesaria para inhibir el 25% del crecimiento radial del hongo.

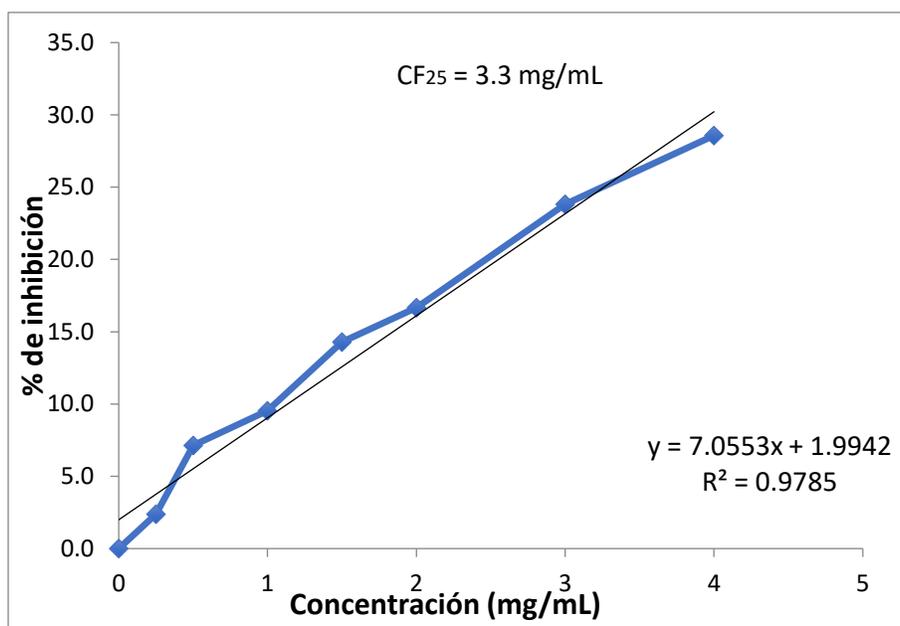


Figura 4. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial del extracto hexánico de *T. diffusa* sobre *F. moniliforme*

DISCUSIÓN

T. diffusa es una planta nativa de América, que ha tenido una gran importancia en diversos sectores, donde su uso tradicional ha prevalecido, por ejemplo, en la región de Tehuacan-Cuicatlan, para tratar enfermedades gastrointestinales, por esta razón la importancia del presente estudio radica en evaluar y validar científicamente el uso de la especie en la medicina tradicional.

Rendimiento de los extractos y grupos de MS en *T. diffusa*

El extracto metanólico presentó el mayor rendimiento (Cuadro 4) lo que indica que *T. diffusa* sintetiza una concentración alta de compuestos polares. La producción de metabolitos de diversa polaridad en las especies vegetales se encuentra controlados por los factores abióticos (estrés ambiental, temperatura, humedad, nutrientes, agua, altitud, latitud, contaminación, interacciones con otros organismos o por factores genéticos (Jones y Hartley, 1999) y bióticos (infecciones por bacterias, hongos, herbivoría, así como relaciones intra e interespecíficas). Teniendo en cuenta que la especie de estudio se colectó en una zona árida-semiárida, la producción de MS como mecanismo de adaptación a la radiación UV (Zavala & Ravetta, 2002) incrementa la producción de compuestos fenólicos, como flavonoides, ligninas, taninos y cumarinas, los cuales actúan como filtros UV, lo que disminuye el efecto nocivo de la radiación UV sobre las plantas (Rozema *et al.*, 2002; Zhang & Björn, 2009).

Así mismo, los extractos acetónico y metanólico presentaron la mayor diversidad de grupos de MS, en comparación con el hexánico. Los extractos mencionados, de hecho, presentaron los mismos grupos, entre ellos los fenoles, dentro de este grupo se encuentran los flavonoides y los taninos (Cuadro 5). Estos resultados concuerdan con lo descrito por Zhao *et al.* (2007) quienes reportaron que *T. diffusa* contiene flavonoides, además de aceites esenciales, terpenos, resinas y derivados cianogénicos; los autores aislaron y caracterizaron 35 compuestos, de los cuales 19 eran flavonoides. En otro trabajo Alcázar-Meléndez *et al.* (2004), analizaron los extractos de Damiana y reportaron la presencia de varios grupos de MS, entre ellos los taninos. El papel que desempeñan los flavonoides en los vegetales es diverso,

existen evidencias experimentales que sugieren su capacidad de absorber la radiación ultravioleta, lo que los convierte en filtros solares para proteger los tejidos vegetales de las radiaciones dañinas (Echeverri, 1987), lo cual se debe a los anillos bencénicos que presentan (Zhang y Björn, 2009). Por otra parte, el extracto hexánico fue el único que presentó terpenos, lo cual concuerda con lo señalado por Zhao *et. Al.* (2007), quienes encontraron sesquiterpenoides, triterpenoides y politerpenoides en las hojas de *T. diffusa*.

Actividad antibacteriana

Se considera como activo a un extracto cuando presenta algún efecto de inhibición del crecimiento bacteriano, se obtuvo que el extracto acetónico fue el más activo (Cuadro 6), al inhibir el crecimiento de cepas Gram positivas y Gram negativas. Con base en el promedio del diámetro de los halos de inhibición, se estableció que la actividad antibacteriana del extracto acetónico de *T. diffusa* fue sobresaliente en las cepas *S. epidermidis* FES-C, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* (13.66 ± 1.15 , 10.00 ± 1.00 y 10.00 ± 1.00 mm respectivamente); sin embargo, al ser una prueba cualitativa cuyo fundamento se basa en la difusión de los extractos en el medio (Ferraro, 2001; Taroco *et al.*, 2006), con esta prueba aun no era posible afirmar una mayor actividad del extracto sobre las cepas mencionadas, ya que los extractos polares, al contener grupos de MS de esa misma naturaleza, tienden a difundir con mayor eficiencia en el medio acuoso (agar), en comparación con los extractos no polares, como el hexánico, que al contener grupos de MS no polares, no tienen afinidad por el medio acuoso, lo que dificulta su difusión en las placas experimentales, por lo que estos extractos con frecuencia presentan halos de inhibición pequeños. Por otra parte, el extracto hexánico únicamente inhibió el crecimiento de una cepa Gram positiva *S. aureus* ATCC 29213. Mientras que el extracto metanólico no presentó actividad sobre ninguna cepa.

Al determinar la CMI y la CBM se obtuvieron valores de 2.0, 3.0 y 4.0 mg/mL sobre las cepas susceptibles, estas concentraciones son altas comparadas con el control positivo, que presenta valores de CMI y CBM de 1.0 a 12.0 $\mu\text{g/mL}$; sin embargo, es posible considerar los resultados del presente trabajo como buenos, en cuanto a

potencial antimicrobiano se refiere, ya que los extractos activos son mezclas complejas de compuestos en las que los MS bioactivos se encuentran en concentraciones variables, las cuales pueden ser muy bajas, lo que hace necesario el empleo de concentraciones altas de extracto para poder observar su efecto inhibitorio sobre los microorganismos.

Los resultados de la actividad antibacteriana obtenidos en el presente trabajo coinciden con el efecto antibacteriano que se ha reportado para otras especies del género *Turnera*, como lo obtenido por Hernández *et al.* (2003), quienes reportaron la actividad de los extractos de *T. diffusa* contra 12 cepas bacterianas relacionadas con enfermedades gastrointestinales, donde el extracto etanólico mostró actividad contra *S. epidermidis* y *S. aureus*. Así mismo Sethi & Ramasamy (2012) evaluaron la actividad de un extracto etanólico de las hojas de *T. ulmifolia* contra bacterias Gram negativas, mostrando una actividad inhibitoria contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* y *Salmonella typhi*. Sin embargo, en el presente trabajo, el extracto que presentó una mayor eficacia fue el acetónico. Lo cual es comparable con lo obtenido por Murugan & Rajendran (2011), quienes reportaron que el extracto acetónico de *T. subulata* mostró un alto grado de inhibición contra *Proteus vulgaris* e inhibición moderada contra *K. pneumoniae*. Los mismos autores mencionaron que el extracto clorofórmico mostró inhibición moderada contra *S. aureus* y una mayor actividad contra *K. pneumoniae*.

Los resultados de las pruebas de actividad antibacteriana del presente estudio muestran que el extracto acetónico de *T. diffusa* no muestra una tendencia de inhibición de un grupo de microorganismos en particular. Actuando como un antibiótico de amplio espectro, con actividad tanto para bacterias Gram positivas como frente a Gram negativas. De modo que los extractos pudieran tener uno o varios mecanismos de acción antibacteriana, por ejemplo, pueden actuar a nivel de la pared celular (en cualquiera de las tres etapas: en la síntesis de la pared, transporte y transpeptidación), actuando como bloqueadores de los mecanismos de resistencia, afectando las membranas celulares, bloqueando la síntesis de factores

metabólicos, inhibiendo la síntesis proteica, el metabolismo o estructura de los ácidos nucleicos (Calvo y Martínez-Martínez 2009).

El efecto antibacteriano que presentan los extractos de *T. diffusa* puede atribuirse a la acción de los MS que presenta como los terpenos y los fenoles, los cuales se tiene reportado que presentan actividad antibacteriana (Trombetta, *et al.*, 2005). El mecanismo de acción de cada molécula antimicrobiana está relacionado con los grupos funcionales que contiene, su disposición y en general con el arreglo espacial de la molécula, ya que estos factores en conjunto definen su reactividad (Hernández, 1999; Peza-Ortiz, 2016).

En el caso de los terpenos, los cuales al tener una naturaleza lipófila pueden interaccionar con las membranas de las bacterias, lo cual se traduce en una alteración de la fluidez, permeabilidad, expansión, además de una perturbación de las proteínas incorporadas a la membrana, inhibición de la respiración y la alteración de los procesos de transporte de iones (Trombetta, *et al.*, 2005).

Por su parte, los fenoles se caracterizan por la presencia de anillos aromáticos con uno o más grupos hidroxilo (OH), por regla general, estos poseen varios sustituyentes y, en ocasiones, el grupo OH se encuentra modificado (Pérez, 2003). Los fenoles, con frecuencia presentan fitotoxicidad, por lo que son almacenadas en las vacuolas celulares en su forma glucosilada (Sepúlveda *et al.*, 2003). Los MS con residuos hidroxilados pueden formar puentes de hidrogeno con biomoléculas, por ejemplo, con determinadas zonas en proteínas, en centros de reacción enzimáticos o con ácidos nucleicos, lo cual inhibe su función. Otro mecanismo de acción de los fenoles es su potencial de unión con otras especies químicas, por ejemplo, con iones metálicos. La toxicidad por quelación, descrita para taninos, se da porque los sistemas biológicos son altamente dependientes de los iones metálicos y su unión con metabolitos los vuelve inaccesibles para el consumo bacteriano (Scalbert, 1991). Al igual que los flavonoides, los cuales tienen la capacidad de inhibir la síntesis de DNA y RNA, ya que tienen grupos hidroxilo libres, con los que pueden formar puentes de hidrógeno con las bases nitrogenadas; una estructura plana, semejante a la estructura de las bases púricas y pirimídicas, lo cual propicia que se

puedan intercalar entre de las mismas en la doble hélice. Algunas flavonas han mostrado tener un mayor efecto inhibitorio en la síntesis de ácidos nucleicos, estas presentan la característica de que poseen tres grupos hidroxilo en el anillo B (Hernández, 1999).

Es un hecho que la utilización de antimicrobianos ha mejorado la calidad y expectativas de vida de las personas alrededor del mundo, reduciendo la mortalidad y morbilidad causadas por diferentes enfermedades infecciosas (García, 2007). Según el efecto de su acción sobre las bacterias, se pueden clasificar en bacteriostáticos (inhibiendo transitoriamente el crecimiento bacteriano) y bactericidas (ejerciendo una acción letal para la bacteria) (Cordínes, 1998).

El extracto acetónico sobre la curva de sobrevivencia bacteriana en el grupo de las Gram negativas mostró un efecto bactericida en las cepas *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*. Mientras que *S. marcescens* presentó un efecto bacteriostático manteniendo aun colonias bacterianas en todos los tratamientos después de 24 horas. Por otra parte, contra las bacterias Gram positivas: *E. faecalis*, *S. aureus* y *S. epidermidis* mostró un efecto bactericida.

El efecto bactericida y bacteriostático del extracto acetónico de *T. diffusa* sobre ambos grupos de bacterias es de gran interés dada su importancia al causar enfermedades al ser humano. Del grupo de las Gram negativas; *E. coli* comúnmente causa enfermedades del sistema gastrointestinal, o infecciones en las vías urinarias (Nataro & Kaper, 1998). *S. marcescens* es una bacteria común en insumos hospitalarios causantes de enfermedades nosocomiales e infecciones urinarias (Haddy *et al.*, 1996). *P. aeruginosa* es una cepa oportunista que favorece el inicio de infecciones nosocomiales en pacientes inmunocomprometidos y puede causar neumonías, infecciones del tracto urinario y bacteriemias (Ochoa *et al.*, 2013) y *K. pneumoniae* es una cepa oportunista, está implicada principalmente en infecciones nosocomiales, infecciones del tracto urinario, neumonías, sepsis e infecciones de herida quirúrgica (Echeverri-Toro *et al.*, 2012).

Mientras que del grupo de las Gram positivas; *S. epidermidis*, es causante de infecciones urinarias, nosocomiales, osteomielitis, bacteriemias en pacientes

inmunosuprimidos y en infecciones de dispositivos (Rogers *et al.*, 2009) *E. faecalis* cepa causantes de infecciones nosocomiales, puede causar endocarditis, infecciones de vejiga, próstata y epidídimo (Schleifer & Kilpper-Balz, 1984) y *S. aureus* considerada una bacteria oportunista, causa comúnmente piodermidis, intoxicaciones alimentarias y una gran variedad de afecciones en la población general; no obstante, se encuentra entre las cepas microbianas causantes de infecciones en los hospitales (Garza-Velasco *et al.*, 2013).

Con base en lo anterior, se puede establecer que el extracto de *T. diffusa* tiene un alto efecto contra cepas que causan enfermedades nosocomiales, gastrointestinales, respiratorias e infecciones urinarias.

Actividad antifúngica

En lo que respecta a la actividad antifúngica, el extracto hexánico fue el único extracto activo, al inhibir el crecimiento radial de *F. moniliforme* (Cuadro 9). La importancia ecológica y clínica de esta cepa se debe a que se encuentra entre los hongos patógenos y micotoxígenos de plantas más destructivos. Su relevancia en la industria agrícola es inmensa, lo que resulta en pérdidas multimillonarias debido a la reducción del rendimiento de los cultivos. Además, se informan con frecuencia infecciones en humanos y animales. En los humanos, causan infecciones denominadas fusariosas, que pueden ser superficiales, como la queratitis o la onicomicosis (Sharma & Marques, 2018).

La actividad puede atribuirse a los MS que presenta el extracto, como los terpenos a los cuales se les ha atribuido actividad antifúngica, por su interacción con los sitios enzimáticos y con la membrana celular del microorganismo alterando su capacidad selectiva, permitiendo el escape de componentes intracelulares (Nychas, 1995).

Sin embargo, un aspecto que ha complicado la situación es el desarrollo de mecanismos de resistencia primaria y secundaria a los antimicóticos por algunas especies de hongos. Entre los mecanismos de resistencia se encuentra la sobreproducción de blancos enzimáticos, la implementación de vías metabólicas

alternas y la producción de bombas de flujo externo que expulsan los medicamentos al espacio extracelular (Mesa *et al.*, 2004).

En lo que respecta a las pruebas cuantitativas, las concentraciones a las cuales se observaría la CF_{50} y CFM son altas con respecto a otros estudios; sin embargo, se debe tener en cuenta que se está trabajando con extractos crudos que contienen otros metabolitos o impurezas sin actividad antifúngica.

La similitud en la presencia de MS identificados en los extractos acetónico y metanólico, así como la diferencia en la actividad antibacteriana observada en este trabajo, en donde se obtuvo que el extracto acetónico fue el que presentó actividad, sugiere que los MS en ambos extractos presentan un alto nivel de variación en su composición química intraespecífica para esta especie, ya que el extracto metanólico no presentó actividad antibacteriana, por lo que es necesario realizar análisis químicos más específicos a los extractos, para determinar el tipo o tipos de MS con actividad antimicrobiana.

CONCLUSIONES

- En los extractos de *T. diffusa* se detectó la presencia de fenoles, flavonoides, taninos, esteroides y terpenos.
- Los extractos hexánico y acetónico de *T. diffusa* presentan actividad antimicrobiana.
- El extracto acetónico fue el más activo, al inhibir el crecimiento de cuatro cepas bacterianas Gram positivas y cuatro Gram negativas.
- El extracto hexánico presentó actividad antibacteriana sobre *S. aureus* ATCC 29213, así como actividad antifúngica sobre *F. moniliforme*.
- El extracto metanólico no presentó actividad antibacteriana.
- Los resultados permiten demostrar las propiedades antimicrobianas de *T. diffusa* en el tratamiento de enfermedades de etiología infecciosa.

APÉNDICES

1. Clasificación y descripción botánica de *T. diffusa*

Clasificación:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Dilleniidae

Orden: Malpighiales

Familia: Turneraceae

Género: *Turnera*

Especie: *T. diffusa* Willd. Ex Schult.



Figura 5. *T. diffusa*. (Imagen adaptada de Puga-Guzmán *et al.*, 2019)

Nombre sinonimia: *Buhadschia humifusa* C.Presl; *Turnera aphrodisiaca*

Ward; *Turnera diffusa* var. *Aphrodisiaca* (Ward)

Urb.; *Turnera humifusa* (C. Presl) Endl.

Ex Walp.; *Turnera pringlei* Rose.

Nombre común: Damiana, hierba de la pastorcita, hierba del ahorcado, hierba del venado, malva blanca, mejorana, orégano cimarrón, rompe camisas machos, Turnera.

Descripción botánica (Alvarado-Cárdenas, 2016)

Se encuentra a manera de arbusto con tallas desde los 25 cm hasta los 2 m de alto: presenta tallos teretes, seríceos a globrescentes. Hojas sésiles o pecioladas: estípulas, 1.0 mm de largo subuladas, seríceas: peciolos 1.8 a 2.0 mm de largo, láminas de 0.6 a 1.8 cm de largo, 3.0 a 7.0 mm de ancho, elípticas a obovadas, la base es cuneada sin nectáreas, ápice agudo a obtuso, margen serrado glandular, membranáceas, haz seríceo, envés seríceo a lanoso sin puntos resinosos. Flores solitarias, heterostilas, epifitas sésiles o pedicelos 1.0 mm de largo: brácteas 2 persistentes, 4.0 a 5.0 mm largo, 1.2 a 2.0 mm ancho, lanceoladas, vilosos: hipantio 3.0 a 5.0 mm de largo, 2.0 a 2.5 mm de diámetro viloso a seríceo: sépalos 2.5 a 3.0 mm largo, 1.0 a 1.8 mm ancho, lanceolados, vilosos: pétalos 6.0 a 6.5 mm de largo, 3.8 a 4.2 mm ancho, obovados, ápice obtuso amarillos, glabros filamentos 5.0 a 6.0 mm de largo, 1.0 mm ancho ovoide, seríceo, estilos 2.5 a 3.3 mm largo, globos. Cápsula 3.0 a 3.8 mm largo. 3.0 mm diámetro, ovoidales, verde-amarillentas a pardas, tuberculadas seríceas: semillas 1.6 a 1.9 mm de largo, 0.7 a 1.0 mm de ancho, reniformes, pardas o negras (Figura 6). Número cromosómico $2n = 14$.

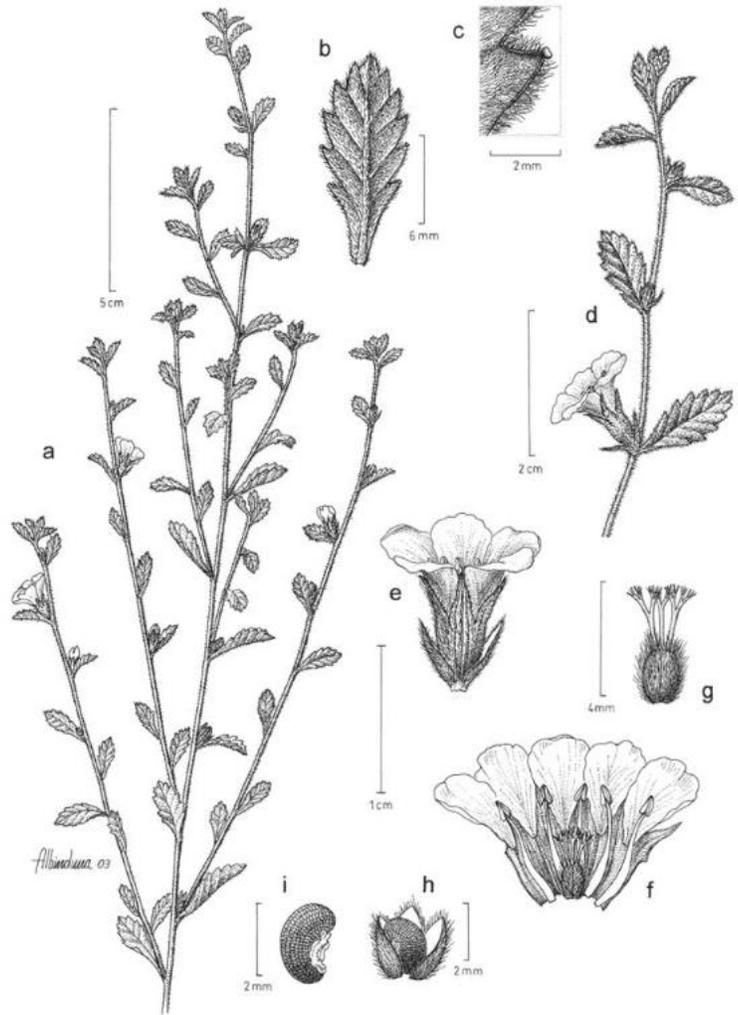


Figura 6. *T. diffusa*. -a. rama con flores. -b. hoja. -c. detalle de la hoja. -d. rama con flor. -e. flor y brácteas. -f. detalle de la flor abierta. -g. gineceo. -h. cápsula con semilla. -i. semilla reticulada con arilo. (Imagen adaptada de Alvarado-Cárdenas, 2006).

2. Distribución geográfica de *T. diffusa* (Puga-Guzmán, 2019)

Se encuentra distribuida desde el sur de los Estados Unidos (Texas), hasta el norte de Sudamérica, incluyendo las Antillas (Figura 7). En México se encuentra en los estados de Baja California, Baja California Sur, Chihuahua, Coahuila, Sinaloa, Jalisco, Sonora, San Luis Potosí, Tamaulipas, Monterrey, Michoacán, Guerrero, Hidalgo, Morelos, Guanajuato, Querétaro, Puebla, Veracruz, Yucatán, Quintana Roo, Chiapas y Oaxaca.

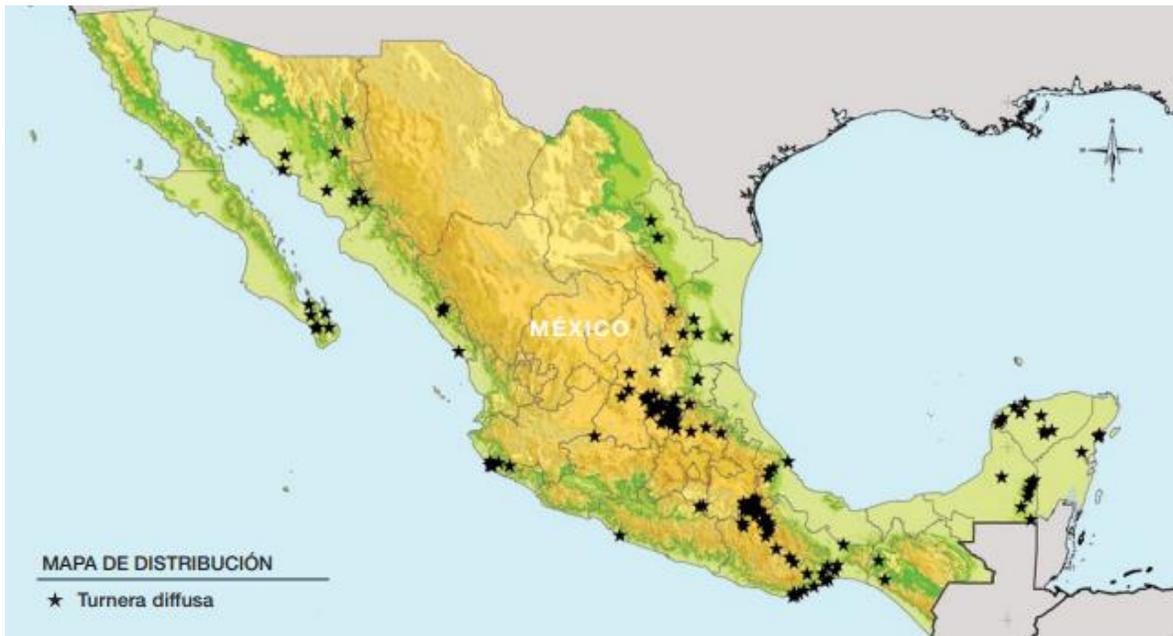


Figura 7. Distribución de *T. diffusa* (Imagen adaptada de Puga-Guzmán *et al.*, 2019).

3. Método de maceración (Domínguez, 1979)

La maceración consiste en la obtención del extracto vegetal con solventes orgánicos, en el cual se coloca el material vegetal seco y pulverizado en un matraz y se agrega el solvente apropiado de acuerdo con el extracto que se desea obtener (hexano, acetona y metanol).

El macerado se deja reposar durante 24 horas con el propósito de que se sature el solvente con el extracto. La muestra se filtra y el exceso de solvente se evapora a presión reducida. La extracción se realiza las veces necesarias para obtener el máximo rendimiento. El extracto se coloca en charolas de vidrio sin tapa para permitir la evaporación total del solvente. Finalmente, el extracto se pesa y se determina el rendimiento en gramos y en porcentaje, este último se calcula con respecto al peso seco inicial de la planta.

4. Pruebas cualitativas de identificación de los principales grupos de MS (Domínguez, 1979; Robles-García *et al.*, 2016)

Tubo N°	Grupo de MS	Reactivos	Agregar en el tubo correspondiente	Adicionar		Prueba positiva
1	Fenoles	FeCl ₃	1 mL solución patrón	3 gotas de FeCl ₃	Mezclar	Coloración azul o verde
2	Taninos	Reactivo de gelatina	Tubo con la solución de la prueba positiva de fenoles	3 gotas de reactivo de gelatina (1%)	Mezclar	Precipitado azul o verde oscuro
3	Alcaloides	Dragendorf	1 mL de solución patrón	3 gotas de reactivo Dragendorf	Mezclar	Precipitado color rojizo
4	Alcaloides	Mayer	2 mL de solución patrón	3 gotas de reactivo Mayer	Mezclar	Precipitado lechoso
5	Glucósidos	α-naftol y HCl	3 mL de solución patrón	3 gotas de α-naftol, 3 gotas de HCl concentrado	El HCl debe dejarse caer por las paredes del tubo	Anillo morado
6	Saponinas	Agua destilada	10 mg de extracto	2mL de agua destilada	Agitar por lo menos dos minutos	Espuma que permanece al menos un minuto
7	Cumarinas	NaOH y HCl	1 mL de NaOH al 10 %	5 gotas de solución patrón (extracto)	Mezclar	Si hay coloración amarilla agregar 3 gotas de HCl al 10 %. Si la mezcla se vuelve transparente la prueba es positiva
8	Triterpenos y esteroides	Lieberman-Buchard	2 mg de extracto disuelto en 1 mL de cloroformo	3 gotas de reactivo de Lieberman-Buchard	Mezclar	Color azul o verde: positivo para esteroides. Color rojo, violeta o morado: positivo para triterpenos
9	Monoterpenos	Vainillina-H ₂ SO ₄	Placa de silica gel (2 cm ²) 1 gota de solución patrón en el centro de la placa	1 gota de Vainillina (5%) 1 gota de H ₂ SO ₄ (5%)	Calentar en una parrilla a temperatura baja	Halo azul verdoso, morado o naranja rojizo

5. Método de difusión en agar Kirby-Bauer

(Ferraro, 2001; Taroco *et al.*, 2006)

Utilizando esta técnica se evalúa cualitativamente la actividad antibacteriana de los compuestos de un extracto o un compuesto puro, los cuales difunden a través del agar. Si hay compuestos activos, el crecimiento de los cultivos microbianos se detienen y se forman halos alrededor del disco que contiene las sustancias o extractos a evaluar. En el método se utiliza como medio de cultivo estándar el agar Muller-Hinton; es importante que el medio alcance en la placa un espesor uniforme de 4 mm, si es más fino los compuestos tienden a difundir más en dirección lateral, lo que aumenta el tamaño de las zonas de inhibición; un agar de más de 4mm de espesor produce una mayor dilución del extracto hacia abajo, con tendencia a estrechar artificialmente las zonas de inhibición.

Con un asa de siembra se tocan las superficies convexas de 4 o 5 colonias. Se sumerge el asa en 10 mL de caldo Muller-Hinton (Bioxon), se enjuaga bien en el líquido para descargar todo el material y luego se retira el asa, el tubo de cultivo se incuba a 37 °C durante aproximadamente 24 h. Una vez logrado esto, se sumerge un hisopo de poliéster, estéril y seco en la suspensión de bacterias, antes de retirarlos se elimina el exceso de líquido haciendo rotar el hisopo contra la pared interna del tubo. Con este hisopo se inocula la superficie de una placa con agar de Muller-Hinton. Previamente, se deja que la placa alcance temperatura ambiente. Finalmente, se siembra mediante estría en por lo menos tres direcciones, dando vueltas a la placa en ángulos de aproximadamente 60° luego de cada estría. Se utilizan sensidiscos de 5 mm de diámetro hechos de papel Whatman número 5. Se utilizan 2 mg de los extractos disueltos en 10 µL del disolvente correspondiente con cada extracto. Al llevar a cabo la prueba de susceptibilidad, los discos impregnados con las sustancias a evaluar se colocan en la superficie del agar separados por lo menos 22 mm uno de otro y a 14 mm del borde de la placa, para evitar que las zonas de inhibición se superpongan o se extiendan hasta el margen de la placa. Los sensidiscos se presionan suavemente sobre la superficie del agar, cuidando de no moverlos una vez colocados en su lugar. Sobre cada sensidisco se coloca la

concentración de cada extracto a evaluar. Para el control negativo se preparan sensidiscos a los que se les agregan 10 μL del disolvente empleado para disolver el extracto. Se evalúa la sensibilidad de las cepas experimentales con sensidiscos impregnados con 25 μg de cloranfenicol. Los sensidiscos se preparan 24 horas antes del bioensayo. Las placas incuban a 37 °C. En el caso de existir zonas de inhibición se reporta el extracto como activo. Las zonas de inhibición se miden con una regla de calibración en milímetros. En todos los casos esta prueba se hace por triplicado y se reportan los valores promedio \pm DE.

6. Método de dilución en agar

(Método modificado de Koneman *et al.*, 1991)

Con esta técnica se evalúan las diferentes concentraciones de los extractos que presenten actividad antibacteriana en las pruebas cualitativas. Las concentraciones a evaluar son: 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mg/mL, así como un grupo testigo, sin extracto. Para obtener las concentraciones se prepara una solución patrón y con base en ella se toman las alícuotas correspondientes, las cuales se agregan a 20mL de agar Mueller-Hinton a 45 °C, las mezclas se agitan rápidamente para obtener dispersiones homogéneas y se colocan en cajas Petri.

El inóculo se prepara a partir una suspensión bacteriana con una concentración de 1.5×10^8 UFC/mL, se toman 10 μ L de esta suspensión bacteriana y se agregan en 10 mL de solución salina (0.9%) para obtener el inóculo con una concentración de 1.5×10^5 UFC/mL.

El inóculo se coloca en la superficie del agar con las distintas concentraciones de extracto, para ello se utilizan hisopos estériles que se impregna con el inóculo y con ellos se colocan por triplicado puntos sobre la superficie del agar. Como control positivo se preparan placas con 30 μ g/mL de cloranfenicol y como control negativo se usan placas con los diferentes solventes, de acuerdo con el volumen de las alícuotas utilizadas en la preparación de las concentraciones de extracto.

Las placas se incuban a 37 °C, durante 24 horas. La CBM se toma como aquella concentración en la que ya no se observa crecimiento bacteriano y CMI aquella concentración que antecede a la CBM y que aún presenta crecimiento bacteriano, aunque en menor proporción comparado con el grupo control negativo.

7. Curvas de sobrevivencia bacteriana (Método modificado de Kubo *et al.*, 1993)

Este método se emplea para determinar el efecto que tiene el extracto sobre el crecimiento bacteriano, basándose en las CMI y CBM obtenidas. Y así determinar los impactos necesarios para que se produzca la muerte bacteriana. Se utiliza como medio de cultivo estándar el agar Muller-Hinton. El inóculo a emplear es de 1.0×10^5 UFC/mL.

Una vez determinada la CMI y la CBM se preparan cuatro tubos experimentales, como se muestra a continuación:

Tubo No.	Concentración de extracto
1	0.0 mg/mL (Testigo)
2	$\frac{1}{2}$ CMI
3	CMI
4	CBM

Las concentraciones del extracto se preparan en los tubos con 10 mL de caldo Muller-Hinton. A cada tubo se le agregan 100 μ L del inóculo y se incuban durante 24 horas a 37 °C. Durante el tiempo de incubación se muestrea el crecimiento o la muerte microbiana en distintos intervalos de tiempo, que resultan en un total de seis tiempos distribuidos en 0, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas.

En cada muestreo se realizan diluciones en tubos con solución salina, de estas se toman alícuotas de 50 μ L, las cuales se siembran en placas con agar Muller-Hinton y se incuban durante 24 horas, transcurrido el tiempo se cuentan las UFC y se calcula el número de UFC/mL en cada tiempo y en cada concentración.

Con los datos obtenidos se grafica el Log del número de sobrevivientes vs. el tiempo (en horas) para determinar el número de impactos necesarios para que se produzca la inactivación bacteriana, para ello se prolonga la zona lineal de la curva de supervivencia hasta su inserción con el eje de las ordenadas.

8. Método cualitativo de inhibición del crecimiento radial (Montes de Oca *et al.*, 2017)

Este ensayo evalúa cualitativamente la actividad antifúngica sobre hongos filamentosos de un extracto o un compuesto puro. Los compuestos difunden a través del agar y si estos son activos, el crecimiento del hongo es más lento o se detienen, resultando la deformación de la colonia. El método se lleva a cabo en cajas Petri que contienen 25 mL de agar papa-dextrosa (PDA), en el cual se inocula el micelio del hongo activamente en crecimiento. Se utilizan sensidiscos de 5 mm de diámetro de papel Whatman No. 5. Se impregnan con 2 mg del extracto o compuesto puro, disueltos en 10 μ L del disolvente. Los sensidiscos se preparan 24 horas antes del bioensayo, para dejar que el disolvente se evapore. Los discos se colocan a una distancia de 5 mm del límite micelial, utilizando una pinza estéril. Los sensidiscos se presionan suavemente con la punta de la pinza, cuidando de no moverlos una vez colocados en su lugar. Como control negativo se colocan sensidiscos a los que se les agrega 10 μ L de disolvente, y como control positivo se usan sensidiscos con 7 μ g de ketoconazol, en ambos casos se dejan evaporar durante 24 horas. Se realizan tres repeticiones. Las cajas se incuban a 28 °C durante 72 horas o hasta que el crecimiento micelial se haya desarrollado. En caso de existir alguna deformación en el crecimiento del hongo, se reporta el extracto como activo, ya que en condiciones normales el crecimiento del hongo es circular y este debe crecer encima de los sensidiscos, también cualquier signo de diferencia de color esporulación o morfología indican actividad antifúngica.

9. Método de dilución en agar en hongos miceliados (Montes de Oca *et al.*, 2017)

Este método se utiliza para determinar la concentración de sustancias o extractos, capaces de inhibir el crecimiento del micelio. Se realiza en placas con diferentes concentraciones de los extractos (0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mg/mL) utilizando una solución patrón y, con base en esta se toman alícuotas, las cuales se agregan a 3 mL de agar papa-dextrosa, a una temperatura de 45 °C, para obtener las concentraciones señaladas. Una vez agregadas las concentraciones del extracto, la mezcla se agita rápidamente para obtener una dispersión homogénea y se colocan por triplicado en placas de 24 pozos.

Después de que el agar solidifica se coloca el inóculo fúngico, que consiste en un botón de micelio de 1 mm de diámetro, en el centro de cada pozo con las concentraciones a evaluar. Como control positivo se utilizan pozos con ketoconazol (100 µg/mL) y como control negativo se preparan pozos con los diferentes solventes, de acuerdo con el volumen de las alícuotas utilizadas en la preparación de las concentraciones de extracto. Además, se emplean pozos testigo (sin extracto), los cuales son considerados como el 100% de crecimiento radial cuando el micelio se ha desarrollado.

Las placas se incuban a 28°C durante 24 a 72 horas o hasta que el crecimiento micelial se haya desarrollado. Se mide el crecimiento del hongo y se realiza una gráfica concentración-respuesta, en la que la respuesta es el porcentaje de inhibición, tomando en cuenta que el grupo testigo es el 0% de inhibición. La concentración que representa el 100% de inhibición es aquella en la que ya no se observa crecimiento, la cual corresponde a la Concentración Fungicida Mínima (CFM); mientras que la concentración que representa el 50% de inhibición corresponde a la Concentración Fungicida Media (CF₅₀)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ❖ Aguilar, A., Camacho, J. R., Chino, S., Jacquez., P. y López, M. E. (1994). Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Información Etnobotánica. IMSS. México. pp. 1-20.
- ❖ Alcázar-Meléndez, L., Delgado-Rodriguez, J., Real.Cosio, S. (2004). Analysis of essential oils of both wild and micropropagated plants of Damiana (*Turnera diffusa*). *Fitoterapia* 75, 696-701.
- ❖ Alvarado-Cárdenas, L. O. (2006). Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Fascículo 43. Turneraceae. Instituto de Biología, UNAM. México.
- ❖ Ankli, A., Sticher, O., Heinrich, M. (1999). Medical ethnobotany of the Yucatec Maya: Healers' consensus as a quantitative criterion. *Economic Botany*, 53, 144-160.
- ❖ Arbo, M. M. (2005). Estudios sistemáticos en *Turnera* (Turneraceae). III. Series Anomalae y *Turnera*. *Bonplandia*, 14: 115-318.
- ❖ Argueta, V. A., (1994). *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*. Vol. 1. Mexico: Instituto Nacional Indigenista.
- ❖ Avalos, G. A. y Pérez-Urria, C. E. (2009). Metabolismo secundario de plantas, *Reduca Bio.*, Serie Fisiología Vegetal. 2(3): 119-145.
- ❖ Ávila, L., Baquero, E., Viña, A., Murillo, E. (2006). Actividad antibacteriana de *Diplostephium tolimense* Cuatrec. (Asteraceae) frente a *Staphylococcus aureus*. *Vitae*, 3(1): 55-60.
- ❖ Bezerra, A. G., Mendes, F. R., Tabach, R., Carlini, E. A. (2011), Effects of a hydroalcoholic extract of *Turnera diffusa* Willd. Ex Schult., Turneraceae, in tests for adaptogenic activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21: 121-127.
- ❖ Bueno, S. J. G., Stashenko, E. E., Martínez, J. R., Ribón, W. (2010). Antimycobacterial activity of essential oils from colombian medical plants. *Revista Salud Publica*, 12(2): 53-65.
- ❖ Calvo, J. & Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica*.27(1): 44-52.

- ❖ Canales, M., Hernández, T., Caballero, J., Romo de Vivar, A., Avila, G., Duran, A., Lira, R. (2005). Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coaxcatlán, Puebla, México. *Journal of Ethnopharmacology*, 97: 429-439.
- ❖ Cordínes, J., R. Machado y C. Hamilton. (1998). Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *Acta Médica*. 8(1): 13-27.
- ❖ Dávila, P. Arizmendi, M. C., Valiente-Banuet, A., Villaseñor, J. L., Casas, A., Lira, R. (2002). Biological diversity in the Tehuacan – Cuicatlán Valley, Mexico. *Biodiversity and Conservation*, 11(3): 421-442.
- ❖ Dewick, P. M. (2002). Medicinal Natural Products, a biosynthetic approach, Segunda edición. England: John Wiley & Sons Ltd.
- ❖ Domingo, D., López, M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española Quimioterapia*, 16(4): 385-393.
- ❖ Domínguez, X.A. (1979). Métodos de Investigación Fitoquímica. México: Ed. Limusa.
- ❖ Echeverri, L. (1987). *Productos naturales biológicamente activos, departamento de química*. Universidad de Antioquia. Medellin. Pp. 124-126.
- ❖ Echeverri-Toro, L. M., Rueda, Z. V., Maya, W., Agudelo, Y., Ospina, S. (2012). *Klebsiella pneumoniae* multi-resistente, factores redisponebles y mortalidad asociada en un hospital universitario en Colombia. *Rev. Chil. Infectol.*; vol. 29(2): 175-182.
- ❖ Estrada-Castillon, E., Soto-Mata, B.E., Garza-López, M. Villareal-Quintanilla, J.A., Jimenez-Pérez, J., Pando-Moreno, M., Sánchez-Salas, J., Scott-Morales, L., Coteria-Correa, M., (2012). Medicinal plants in the southern region of the State of Nuevo León, México. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 8: 45-57.
- ❖ Ferraro, M.J. 2001. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Eleventh Informational Supplement, 21(1): M100-S11.
- ❖ García de Alba G. J. E., Ramírez, H. B. C., Robles A. G., Zañudo H. J., Salcedo R. A. L. y García de Alba V. J. E. (2012). Conocimiento y uso de las plantas medicinales en la zona metropolitana de Guadalajara. *Desacatos*, 39: 29-44.

- ❖ García, M. & García, O. (2007). Aspectos generales sobre nuevos antimicrobianos en el adulto mayor con insuficiencia renal crónica. *Geroinfo*. Publicación de gerontología y geriatría; 2(3).
- ❖ Garza-Velasco, R., Zuñiga-Rangel, O., Perea-Mejia, L. M. (2013). La importancia clínica actual de *Staphylococcus aureus* en el ambiente intrahospitalario. *Educ. quim* vol.24 no.1.
- ❖ González-Stuart, A.E., (2010). Use of medicinal plants in Monterrey, Mexico. *Notulae Scientia Biologicae*, 2: 7-11.
- ❖ Gutiérrez, R. A. & Estévez, B. A. (2009). Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el S. XXI. *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. (Esp), 103(2): 409-419.
- ❖ Haddy, R. I., Mann, B. L., Nadkarni, D. D., Cruz, R. F., Elshoff, D. J., Buendia, F. C., Domers, T. A., Oberheu, A. M. (1996). Nosocomial infections in the community hospital: severe infection due to *Serratia* species. *J. Fam Pract*; 42 (3): 273-7.
- ❖ Hammond. K. B., Jones. J. D. G., Buchanan, B. B., Grisse, W., Jones L. R. (2000). *Biochemistry & molecular biology of plants*. Maryland, USA: American Society of Plant Physiologists.
- ❖ Heinrich, M., Ankli, A. Frei, B., Weimann, C., Sticher, O. (1998). Medicinal plants in México: Healers' consensus and cultural importance. *Social Science and Medicine*, 47, 1859-1871.
- ❖ Hernández D. C. T. (1999). Actividad antimicrobiana de la planta *Tagetes lucida* Cav. (Pericon). Tesis de Maestría. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico, pp 6-27.
- ❖ Hernández, T., Canales, M., Avila, J. G., Duran, A., Caballero, J., Romo de Vivar, A., Lira, R. (2003). Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). *Journal of Ethnopharmacology*. 88, 181-188.
- ❖ Hernández, T., Canales, M., Caballero, J., Duran, A., Lira, R., (2005). Quantitative analysis of traditional knowledge about plants used in the treatment

- of gastrointestinal diseases among the inhabitants of Zapotitlan Salinas, Puebla. México. *Interciencia*, 30: 529-535.
- ❖ Jones, R. N. (2001). Global aspects of antimicrobial resistance among key bacterial pathogens. *Clinical Infections Diseases*, 32:S-1-S156.
 - ❖ Jones, C. G., Hartley, S. E. (1999). A protein competition model of phenolic allocation, *Oikos* 86: 27-44.
 - ❖ Koneman, E. W., Allens, S. D., Dowell, V. R., Summers, H. M. (1991). Diagnóstico microbiológico. México: Ed. Médica Panamericana.
 - ❖ Kubo, I. (1993). Antimicrobial activity of green tea (layer components). In: Bioactive volatile compounds from plants. Edited by Teranishi, R. and Buttery, R. G. American Chemical Society Washington. D. C. USA. 57-70.
 - ❖ Kumar, S. & Sharma, A., (2006) Apigenin: The Anxiolytic Constituent of *Turnera aphrodisiaca*. *Pharmaceutical Biology*, 44(2), 84-90.
 - ❖ Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K., Lim, S., Shibuya, K., Aboyans, V., Abraham, J., Adair, T., Aggarwal, R., Ahn, S., Almazroa, M., Alvarado, M., Anderson, H., Anderson, L., Andrews, K., Atkinson, C., Baddour, L., Barker, S., Murray, C. (2012). Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 380: 2095-128.
 - ❖ Lozoya, X. & Zolla, C. (2015). *Lo invisible es verde*. México: El vidrio en el espejo.
 - ❖ Martínez, M., (1969). *Las Plantas Medicinales de México*. Quinta ed. México: Ed Botas.
 - ❖ Mendoza, P. N., De León, R. J. & Figueroa-Hernández, J. L. (2006). Actualidades farmacológicas: Herbolaria. *Revista de la Facultad de Medicina. UNAM*. México, 48(6). URL: www.shorturl.at/fmLRW
 - ❖ Mesa, A. C., J. G. Bueno, L. A. Betancur. (2004). Productos naturales con actividad antimicótica. *Revista Española de Quimioterapia*. 17 (4): 326-327.
 - ❖ Montes de Oca-Márquez C., Hernández-Delgado C.T., Orozco-Martínez J., García-Bores A.M., Avila-Acevedo J.G., Ortiz-Melo M.T., Peñalosa-Castro I., López-Moreno G.†, Serrano-Parrales R. (2017) Actividad antibacteriana y

- antifúngica de *Dalea Carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 40(2): 161-168.
- ❖ Morales, S. V. (2009). Investigación farmacológica y química de *Datura lanosa* A.S. Barclay ex bye (Solanaceae): una contribución para la elaboración de su monografía tipo OMS. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
 - ❖ Murugan T. & Rajendran P. (2011). Screening for antibacterial activity of *Turnera subulate* extracts against human pathogens. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 2(5): 1456-1459.
 - ❖ Nakanishi, K., Sasaki, S. I., Kiang, A. K., Goh, J., Kakisawa, H., Ohashi, M., Goto, M., Watanabe, J. M., Yokotani, H., Matsumura, C., Togashi, M. M. (1965). Phytochemical survey of Malaysian plants. Preliminary chemical and pharmacological screen-ing. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 13: 882-890.
 - ❖ Nascimento, G., Locatelli, J., Freitas, P., Silva, G. (2000). Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacterial. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31: 247-256.
 - ❖ Nataro, J. P. & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *American Society for Microbiology*. Vol. 11, No. 1, 142-201.
 - ❖ Nolasco O. E. (2018). Estudio fitoquímico y evaluación de la actividad antimicrobiana, antioxidante y fotoprotectores de *Hyptis mociniana* (Benth) (Tesis de posgrado). México: Universidad Nacional Autónoma de México.
 - ❖ Nychas, G. J. (1995). Natural antimicrobials from plants. En *New Methods of food preservation*. Editorial Gould G. W., Champman & Hall. London. 58-59.
 - ❖ Ochoa, S., Lopez-Montiel, F., Escalona, G., Cruz-Córdova, A., Dávila, L., López-Martínez, B., Jjiménez-Tapia, Y., Giono, S., Eslava, C., Hernández-Castro, R., Xicohtencatl-Cortes, J. (2013). Características patogénicas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas. *Bol Med Hosp Infant Mex*; 70(2): 138-150.
 - ❖ Pagalilauan, G. L. & Limaye A. P. (2013). Infections in transplant patients. *Medical Clinics of North America*, 97: 581-600.

- ❖ Paredes-Flores, M., Lira Saade, R., Dávila Aranda, P.D. (2007). Estudio etnobotánico de Zapotitlán Salinas, Puebla. *Acta Botánica Mexicana*, 79: 13-61.
- ❖ Pérez, T. G. (2003). Los flavonoides: antioxidantes o preoxidantes. *Revista Cubana de Investigación Biomédica* 22 (1): 48-57.
- ❖ Peza-Ortiz E. (2016). Estudio fitoquímico del extracto floral de *Jacaranda mimosifolia* D. Don. (BIGNONIACEAE) y algunas actividades biológicas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. México. Pp. 6-7.}
- ❖ Puga-Guzmán, P. S., Magallan-Hernández, F., Ramírez-Segura, O., Queijeiro-Bolaños, M., Vergara-Pineda, S. (2019). La damiana: planta afrodisiaca en la medicina tradicional. Su conservación y aprovechamiento. *CONABIO. Biodiversitas*, 144:12-16.
- ❖ Ratsch, C., (1997). *Plants of Love: Aphrodisiacs in history and guide to their identification*. Berkeley, California: Ten Spees Press.
- ❖ Robles-García, M.A., Aguilar, A.J., Gutierrez-Lomelí, M., Rodríguez-Félix, F., Morales-Del-Río, J.A., Guerrero-Medina, P.J., Madrigal-Pulido, J.A. y Del-Toro-Sánchez, C.L. (2016). Identificación cualitativa de metabolitos secundarios y determinación de la citotoxicidad de extractos de Tempisque (*Sideroxylum capiri* Pittier). *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, XVIII(3): 3-8.
- ❖ Rogers, K. L., Fey, P. D., Rupp, M. E. (2009). Coagulas-Negative Staphylococcal infections. *Infectious Disease Clinics of North America* 23 (1): 73-98.
- ❖ Rozema, J; LO Bjorn; JF bornman; A. Gaberscik; Dp Harder; ET AL. (2002). The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrial ecosystems – an experimental and functional analysis of the evolution of UV-absorbing compounds. *J. Photochem. Photobiol. Biol.* 66:2-12.
- ❖ Santos, K. K. A., Matias, E. F. F., Souza, C. E. S., Tintino, S. R., Braga, M. F. B. M., Guedes, G. M. M., Nogueira, L. F. B., Morais, E. C., Costa, J. G. M., Menezes, I. R. A., Coutinho, H. D. M. (2012). Anti-candida activity of *Mentha arvensis* & *Turnera ulmiflora*. *Journal of Medicinal Food*, 15: 322-324.
- ❖ Scalbert A. (1991). *Antimicrobial properties of tannins*. *Phytochemistry*, 30: 3875-3882.

- ❖ Schleifer, K. H. & Kilpper-Balz, R. (1984). Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus*. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 34: 31-34.
- ❖ Sepúlveda, J. G.; Porta, D. H. y Rocha, S. M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología.* 21 (3): 355-363.
- ❖ Sethi, P. & Ramasamy D. (2012). Antibacterial activity of aqueous extract of the leaves of *Turnera ulmiflora* Linn. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research,* 3: 224-226.
- ❖ Sharma, L. & Marques, G. (2018). *Fusarium*, an entomopathogen-A Myth or Really. *Pathogens.* 7(4): 93.
- ❖ Taroco, R., Seija, V., Vignoli, R. 2006. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. En *Temas de Bacteriología y Virología Médica.* 2 ed. (pp. 663-671). Montevideo (Uruguay): Universidad de la República, Departamento de Bacteriología y Virología, Oficina del libro FEFMUR.
- ❖ Trombetta, D.; Castelli, F.; Grazia, S. M.; Venuti, V.; Cristani, M.; Daniele, C.; Saija, A.; Mazzanti, G. y Bisignano, G. (2005). Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 49 (6): 2474-2478.
- ❖ Ugwuja, F.N., Maduemesi, J.N.C., Ugwoke, K.I. y Mbadianya, J.I. 2014. *In vitro* inhibition of radial growth, sporulation and germination of *Alternaria solani* by some fungicides. *Agro-Science,* 13(1).
- ❖ Wink M. (1999). Introduction: Biochemistry, role and biotechnology of secondary metabolites. *Annual Plant Reviews.* Sheffield Academic Press Ltd. London, UK. pp 1-17.
- ❖ Zavala, J. A., & Ravetta D.A. (2002). The effect of solar UV-B radiation on terpenes and biomass production in *Grindelia chiloensis* (Asteraceae). A woody perennial. *Plant ecology* 161: 185-191.
- ❖ Zhang, W. J., Björn, L. O. (2009). The effect of ultraviolet radiation on the accumulation of medicinal compound in plants. *Fitoterapia,* 80: 207-218.

- ❖ Zhao, J., Pawar, R. S., Ali, Z., Khan, I. A. (2007). Phytochemical Investigation of *Turnera diffusa*. School of Pharmacy, University of Mississippi. Nat. Prod. 70(2): 289-292.