



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE QUÍMICO
FARMACOBIOLOGÍA**

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE
EXTRACTOS DE DAMIANA (*Turnera diffusa*)**

T E S I S

que presenta:

NÉSTOR MANUEL CHÁVEZ FLORES

**COMO REQUISITO PARA OBTENER
EL TÍTULO PROFESIONAL DE**

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

DIRECTOR DE TESIS:

**Doctor en Ciencias en Biotecnología de Plantas
RAFAEL SALGADO GARCIGLIA**

CO-DIRECTOR DE TESIS:

**Doctor en Ciencias Biológicas
EDGAR R. ESQUIVEL GUTIÉRREZ**

**JULIO DE 2016
MORELIA, MICHOACÁN, MÉXICO**



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH, bajo la dirección del Dr. Rafael Salgado Garciglia y la co-dirección del Dr. Edgar R. Esquivel Gutiérrez (CIBNOR, La Paz, Baja California Sur), quien desarrolla su estancia Post-Doctoral con la investigación "Evaluación del extracto acuoso de Turnera diffusa en la histopatología de órganos blanco de la Diabetes mellitus en ratas-STZ".

Forma parte del Proyecto "Caracterización, conservación y domesticación de germoplasma de zonas áridas", que se realiza en el CIBNOR, bajo la responsabilidad de la D.C. Lilia Alcaraz Meléndez.

DEDICATORIA

Principalmente a Dios, por darme la oportunidad de llegar hasta estas instancias de mi vida y asignarme este destino tan fortuito. Por ponerme en mi camino obstáculos, donde me ha dado herramientas para superarlos, con el fin de obtener nuevas enseñanzas y experiencias, así como colocarme metas para poder romperlas, teniendo muchas recompensas para poder ser mejor persona y profesionista en esta vida.

Dedico con gran énfasis a mis padres este trabajo, a José Antonio Chávez y María de Jesús Flores, quienes son los principales motores en mi vida. Gracias por la mejor herencia que le pueden otorgar a un hijo, la posibilidad de estudiar para lograr el éxito y ser alguien en la vida, y por su apoyo incondicional, por su amor de padres y por ser mí mayor ejemplo, los amo.

A mis hermanos Antonio, Marisol y Jaqueline, que siempre han estado conmigo en las buenas y en las malas, por las que he pasado a lo largo de mi vida. Por su apoyo total y porque siempre han estado orgullosos de mis logros, así como yo de los suyos, gracias porque son parte vital en mi vida, los quiere “el pilón”.

A Karla Moreno por ser mi amiga, pareja y colega, al ser la persona que me alienta para continuar por el camino correcto hacia el éxito con mucha perseverancia, además del apoyo incondicional que me ha brindado a los largo de mi formación.

Humberto Chávez, mi primo hermano, gracias por siempre estar al pie del cañón cuando más ocupaba de alguien, por los consejos y regaños, así mismo la por motivación que siempre dedicaste a mi persona para salir adelante.

*“La llave del éxito es el conocimiento del valor de las cosas”
John Boyle O'Reilly*

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, un orgullo ser Nicolaíta y representar esta institución, el agradecimiento especial es para mí honorable facultad de Químico Farmacobiología, por forjarme en sus aulas y permitirme concluir esta Licenciatura.

Al D.C. Rafael Salgado Garciglia, por brindarme la oportunidad de ser mi asesor al realizar mi proyecto de tesis con el fin de obtener el título de Lic. Químico Farmacobiólogo, pero más aún agradezco por los conocimientos y aprendizajes que me compartió en su laboratorio, además por su paciencia prestada en mi estancia y por la calidad de ser humano que representa, con mucho afecto y respeto “Gracias Dr. Rafa”.

A mi Co-Aesor, D.C. Edgar R. Esquivel Gutiérrez, agradezco por su colaboración dentro de mi proyecto realizado y por sus enseñanzas para lograr objetivos trazados.

A la Dra. Lilia Alcaraz Meléndez por ser la responsable del Proyecto “Caracterización, conservación y domesticación de germoplasma de zonas áridas”, que se lleva a cabo entre CIBNOR y la UMSNH, gracias por permitir el material vegetal para esta investigación.

A mis profesores revisores y miembros del comité sinodal M.C. Raúl Cortés, M.C. Rafael Torres Martínez, Q.F.B. Felipe de Jesús Tenorio, D.C. Alfredo Saavedra Molina y Q.F.B. Tellitud Sosa, que han tenido la paciencia para revisar y dar el visto bueno a mi Tesis, que además de brindarme la oportunidad de lograr la obtención del Título de la Licenciatura, me otorgaron su amistad, excelentes profesionistas y sobre todo grandes personas.

A la M.C. Alejandra Hernández García, Técnica del laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, a quien doy un particular agradecimiento por su colaboración dentro de mi proyecto, muy importante por el mayúsculo aprendizaje académico obtenido en mi estancia dentro del laboratorio y por infundirme la disciplina para trabajar correcta y responsablemente.

A la Biól. Yolanda García Rodríguez por su gran apoyo durante el análisis de los extractos por cromatografía de gases y espectrometría de masas, realizado en el laboratorio de Ecología Química y Agroecología, del IIES UNAM Campus Morelia, un agradecimiento especial.

A mis compañeros y ahora amigos del laboratorio de Biotecnología Vegetal, les agradezco la aceptación con la que recibieron y por compartir nuevos conocimientos que me han servido para conocer otras áreas de trabajo. Gracias por su importante amistad y profesionalismo.

A mis amigos incondicionales dentro de esta etapa universitaria, que ha sido hasta el momento la mejor que he vivido, por todos los momentos que pasé a su lado doy las gracias. Han sido muy especiales para mí, porque me han acompañado dentro de mi formación profesional. En esta gran etapa se tiene la oportunidad de conocer a mucha gente con diferentes pensamientos, culturas y tradiciones, te llevas una porción de cada una de ellas hasta formar hermandades. Cada uno de los momentos vividos te deja diferentes experiencias como muchas alegrías, ambiciones, aprendizajes, satisfacciones y sobre todo te enseñan a valorar lo que se tiene y el esfuerzo que se hace para conseguirlo. Con miedo a que me falte mencionar a alguno, hago general este agradecimiento para esas hermandades que he obtenido estos años, los llevaré por siempre en el corazón. “Gracias amigos, ahora colegas”.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	<i>i</i>
ÍNDICE DE FIGURAS	<i>ii</i>
RESUMEN	<i>iii</i>
ABSTRACT	<i>iv</i>
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
II.1. USOS DE PLANTAS MEDICINALES.....	4
II.1.1. Plantas con propiedades medicinales en México.....	8
II.2. PRINCIPIOS ACTIVOS DE LAS PLANTAS.....	10
II.3. PLANTAS MEDICINALES CON PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS..	13
II.3.1. Antibacterianos de origen vegetal.....	14
II.3.2. Antifúngicos de origen vegetal.....	16
II.3.2.1. Metabolitos vegetales contra hongos que afectan la salud humana.....	16
II.4. MÉTODOS DE EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA.....	18
II.5. MICROORGANISMOS EN ESTUDIO.....	20
II.6. DAMIANA (<i>Turnera diffusa</i>).....	22
II.6.1. Descripción botánica.....	22
II.6.2. Origen y distribución geográfica.....	24
II.6.3. Descripción química.....	25
II.6.4. Usos y aplicaciones.....	25
II.6.5. Variedades de damiana en estudio.....	27
III. JUSTIFICACIÓN	29
IV. OBJETIVOS	30
IV.1. OBJETIVO GENERAL.....	30
IV.1.1. Objetivos específicos.....	30

	Página
V. MATERIALES Y MÉTODOS	31
V.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	31
V.2. MEDIOS DE CULTIVO.....	32
V.3. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.....	32
V.4. ENSAYOS BIOLÓGICOS.....	33
V.4.1. Ensayos antimicrobianos.....	33
V.4.2. Determinación de la CMI.....	35
V.5. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS DEL EXTRACTO CON MAYOR ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	35
V.5.1. Cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG/EM).....	35
V.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	36
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
VI.1. EFECTO ANTIBACTERIANO.....	37
VI.1.1. Determinación de CMI.....	42
VI.2. EFECTO ANTIFÚNGICO.....	43
VI.2.1. Determinación de CMI.....	47
VI.3. ANÁLISIS POR CG/EM DEL EXTRACTO CON MAYOR ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	47
VII. CONCLUSIONES	50
VIII. LITERATURA CITADA	51

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Extractos o compuestos derivados de plantas contra bacterias patógenas de humano.	15
Cuadro 2. Especie vegetal y principio activo contra hongos que afectan la salud humana (Tomado de Damián-Badillo, 2007).	17
Cuadro 3. Algunas plantas mexicanas con propiedades antifúngicas (Tomado de Damián-Badillo, 2007).	18
Cuadro 4. Ubicación taxonómica de damiana (<i>Turnera diffusa</i> Willd. Ex Schult.) (Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2013).	23
Cuadro 5. Medio de cultivo líquido Caldo Nutritivo.	32
Cuadro 6. Halos de inhibición (cm) de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella typhi</i> y <i>Escherichia coli</i> , ejercidos por extractos de damiana (<i>T. diffusa</i>), con el método de discos impregnados, a las 48 h del cultivo.	38
Cuadro 7. Halos de inhibición (cm) de <i>Candida albicans</i> , ejercidos por extractos de damiana (<i>T. diffusa</i>) [1 mg/mL], con el método de discos impregnados, a las 48 h del cultivo.	44
Cuadro 8. Compuestos mayoritarios del extracto metanólico del genotipo de damiana negra silvestre (<i>T. diffusa</i> var. <i>aphrodisiaca</i>), por tiempo de retención y área bajo la curva de cada pico en el cromatograma correspondiente (Figura 6).	48

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Características principales de planta (A) y flor de damiana (B).	23
Figura 2. Planta de damiana blanca silvestre (<i>Turnera diffusa</i> var. <i>diffusa</i>) (A), planta de damiana negra silvestre (B) y cultivada (C) (<i>Turnera diffusa</i> var. <i>aphrodisiaca</i>)	28
Figura 3. Porcentajes de inhibición de extractos de damiana (<i>Turnera diffusa</i>) [1mg/mL] sobre <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> , a las 48 h de cultivo: Damiana negra silvestre (DNS); Damiana blanca silvestre (DBS); Damiana negra cultivada (DNC); Metanólico (MeOH); Hidroalcohólico (Aq-EtOH).	40
Figura 4. Bioensayo <i>in vitro</i> del extracto metanólico de damiana negra silvestre (<i>T. diffusa</i> var. <i>aphrodisiaca</i>) por el método de discos impregnados en <i>S. aureus</i> , 48 h después del cultivo: Metanólico (MeOH); Hidroalcohólico (Aq-EtOH); Dimetil sulfóxido (DMSO 1%); Ampicilina (Amp).	41
Figura 5. Porcentajes de inhibición de extractos de damiana (<i>Turnera diffusa</i>) [1mg/mL] sobre <i>C. albicans</i> , a las 48 h de cultivo: Damiana negra silvestre (DNS); Damiana blanca silvestre (DBS); Damiana negra cultivada (DNC); Metanólico (MeOH); Hidroalcohólico (Aq-EtOH).	45
Figura 6. Bioensayo <i>in vitro</i> del extracto metanólico de damiana negra silvestre (<i>T. diffusa</i> var. <i>aphrodisiaca</i>) por el método de discos impregnados en <i>C. albicans</i> , 48 h después del cultivo: Metanólico (MeOH); Hidroalcohólico (Aq-EtOH); Dimetil sulfóxido (DMSO 1%).	46
Figura 7. Cromatograma del extracto metanólico de damiana negra silvestre (<i>T. diffusa</i> var. <i>aphrodisiaca</i>).	48

NÉSTOR MANUEL CHÁVEZ FLORES. 2016. Determinación del efecto antimicrobiano de extractos de damiana (*Turnera diffusa*). Tesis de Licenciatura, Facultad de Químico Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México (Director de Tesis. Dr. Rafael Salgado Garciglia), p. 59.

RESUMEN

A fin de investigar la actividad antimicrobiana sobre los microorganismos patógenos *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, se obtuvieron tres diferentes extractos de damiana negra silvestre y cultivada (*Turnera diffusa* var. *aphrodisiaca*) y de damiana blanca silvestre (*T. diffusa* var. *diffusa*). Las metodologías de extracción involucraron solventes de diferente polaridad tales como: etanol-agua (1:1), metanol y hexano. Mediante ensayos *in vitro* por el método de difusión en discos impregnados, se determinó que tanto las variedades silvestres y genotipo cultivado de *Turnera diffusa*, así como el tipo de extracto influyen significativamente sobre el porcentaje de actividad antimicrobiana frente a las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y al hongo *Candida albicans*. Los extractos no mostraron inhibición sobre *S. typhi*. El extracto metanólico de damiana negra silvestre (*T. diffusa* var. *aphrodisiaca*) fue el de mayor actividad, presentando inhibición de los microorganismos a una concentración de 1 mg/mL (55% en *S. aureus*, 44.5% en *E. coli* y 57.5% en *C. albicans*). La concentración mínima inhibitoria para *S. aureus* y *C. albicans* fue de 1 mg/mL, y para *E. coli* fue de 0.05 mg/mL. Este extracto fue analizado por cromatografía de gases y espectrometría de masas, identificando mayormente compuestos de tipo terpénico, los de mayor concentración fueron el eucaliptol, el α -cedreno y el fenólico-glucósido arbutina, a los que se les atribuye la actividad antimicrobiana.

Palabras clave: Antibacteriano, Antifúngico, Arbutina, Bioensayos *in vitro*, Terpenos.

NÉSTOR MANUEL CHÁVEZ FLORES. 2016. Antimicrobial effect determination of damiana (*Turnera diffusa*) extracts. Tesis de Licenciatura, Facultad de Químico Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México (Director de Tesis. Dr. Rafael Salgado Garciglia), p. 59.

ABSTRACT

In order to investigate the antimicrobial activity against the pathogenic microorganisms *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*, three different extracts were obtained of wild and cultivated black damiana (*Turnera diffusa* var. *aphrodisiaca*) and wild white damiana (*T. diffusa* var. *diffusa*). Extraction methodologies involved solvents of different polarity such as: ethanol-water (1:1), methanol and hexane. Using *in vitro* tests for the impregnated Disc diffusion method, it was determined that both wild varieties and cultivated genotype of *Turnera diffusa*, as well as the type of extract significantly influence the percentage of antimicrobial activity against the bacteria *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and fungus *Candida albicans*. The extracts showed no inhibition of *S. typhi*. Extract methanol of wild black damiana (*T. diffusa* var. *aphrodisiaca*) showed the best percentage inhibition of microorganisms at a concentration of 1 mg/mL (55% in *S. aureus*, 44.5% in *E. coli* and 57.5% in *C. albicans*). This extract was analyzed by gas chromatography and mass spectrometry and the mostly compounds were identify as terpenes, the highest concentration was eucalyptol, α -cedrene and the phenolic glycoside arbutin, which is attributed to the antimicrobial activity.

Keywords: Antibacterial, Antifungal, Arbutin, *in vitro* assays, Terpenes.

I. INTRODUCCIÓN

Un área de la farmacología que se ha estudiado con gran énfasis es la terapia antimicrobiana. Desde principios del siglo XX, con el descubrimiento de la penicilina se desencadenó una serie de eventos que mostraron como un solo antibiótico podía curar la mayoría de las enfermedades infecciosas (Risso, 2000). Sin embargo, pronto se presentaron fenómenos de resistencia antimicrobiana favorecidos por: 1) la presión selectiva ejercida al prescribir formal o libremente medicamentos para uso terapéutico en humanos o animales, 2) la utilización generalizada de antimicrobianos en pacientes inmunocomprometidos, 3) el uso de dosis o duración inadecuada de la terapia antimicrobiana, y 4) el desconocimiento de los perfiles de sensibilidad de los diferentes microorganismos teniendo en cuenta la flora local de cada institución o comunidad (Sussmann *et al.*, 2008).

A pesar de la gran variedad de antimicrobianos con los que se cuenta actualmente, las infecciones provocadas por bacterias multi-resistentes causan una amplia morbilidad y mortalidad. Asimismo, incrementan los costos por una mayor estancia hospitalaria y complicaciones derivadas de la misma. Se calcula que el costo anual en los Estados Unidos por la resistencia antibiótica es entre 100 millones y 30 billones de dólares (Sussmann *et al.*, 2008).

En los últimos años se han estudiado nuevas estrategias para combatir las enfermedades infecciosas utilizando mecanismos diferentes a los ya establecidos, un caso específico son las plantas o los extractos y principios activos derivados de

éstas. El estudio de las plantas medicinales es hasta la fecha, un factor importante para la investigación y el desarrollo de fármacos antimicrobianos, ya que durante el desarrollo de investigaciones etnobotánicas se han encontrado y determinado metabolitos con propiedades antimicrobianas, con los que se han desarrollado tratamientos contra enfermedades gastrointestinales y dérmicas provocadas por microorganismos como bacterias y virus (Lozoya y Rivera, 1999).

Las sustancias derivadas de plantas, cuya actividad farmacológica es trascendente, se producen en las plantas mediante rutas adicionales al metabolismo primario, conocido como metabolismo secundario (Barrera, 2000), por ello dichas sustancias son llamadas metabolitos secundarios. Muchos de estos componentes, ya sea de forma individual o en diferentes combinaciones, poseen efectos estimulantes, calmantes o terapéuticos en el hombre, incluso, algunas de estas sustancias se aprovechan también en la industria farmacéutica, alimentaría, textil, agroquímica, perfumería y cosmetología (Morales-López, 2003). Se infiere que la distribución de los metabolitos secundarios en el reino vegetal es amplia puesto que se estima cerca de 20, 000 especies vegetales que son utilizadas medicinalmente (Penso, 1982).

Se estima que en México hay alrededor de 4,000 a 5,000 especies de plantas con atributos medicinales, esto equivale al 15% del total de su flora conocida. El conocimiento de las propiedades medicinales de las plantas ha trascendido desde la época prehispánica hasta nuestros tiempos gracias a la tradición oral. Los actuales “dueños” de esta información son, algunos de los miembros de los

diferentes grupos étnicos de nuestro país. A pesar de esta riqueza de diversidad y del conocimiento tradicional acerca de las plantas medicinales, los trabajos de validación química y biomédica a cerca de estas plantas, ha sido muy lento, ya que sólo en 5% de éstas se han llevado a cabo estudios de validación farmacológica, biomédica y de quimiotaxonomía (Huerta, 2002).

Un ejemplo de este conocimiento sobre el uso en la medicina tradicional mexicana, lo presenta la planta aromática de damiana (*Turnera diffusa* Willd., Familia Passifloraceae) que es utilizada debido a que entre sus diversas propiedades se le atribuye actividad antimicrobiana, sin embargo este efecto ha sido poco estudiado. La damiana se emplea como estimulante nervioso, afrodisiaco, diurético y para el tratamiento de afecciones genitourinarias (Osuna-Leal y Meza-Sánchez, 2000; Alcaraz-Meléndez y Véliz-Murillo, 2006). Los estudios fitoquímicos y farmacológicos de la damiana, demuestran la presencia de compuestos terpénicos, fenólicos y flavonoides, a los que se les atribuyen las propiedades antioxidantes, antiulcerogénicas e hipolipemiantes (Piacente *et al.*, 2002; Alcaraz-Meléndez *et al.*, 2004; Pazos-Guarneros, 2009).

Por ello, en la presente investigación, con el fin de estudiar las propiedades antimicrobianas de damiana, se determinó el efecto de diferentes extractos de tres genotipos (dos silvestres y uno cultivado) de dos variedades damiana (damiana negra, *T. diffusa* var. *diffusa*; y damiana blanca, *T. diffusa* var. *aphrodisiaca*), mediante ensayos *in vitro*, contra las bacterias *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *Staphylococcus aureus*, y el hongo *Candida albicans*, que afectan la salud humana.

II. ANTECEDENTES

La incidencia de infecciones serias en los vertebrados, provocadas por diversos microorganismos como bacterias y hongos, se han incrementado en los últimos años, debido principalmente al surgimiento de resistencia a las drogas que se emplean normalmente contra estos patógenos (Jawetz *et al.*, 1992). Esto ha provocado que las terapias antimicrobianas cada vez sean más tóxicas.

Entre los casos de resistencia, un ejemplo, donde la terapia antifungal actual produce gran toxicidad y problemas de resistencia, es el relacionado al uso del fluconazol, un antifúngico ampliamente distribuido y utilizado en contra de *Candida albicans*, la cual ha desarrollado resistencia a este fármaco. Se ha demostrado que la resistencia que esta especie ha desarrollado se puede transmitir en forma horizontal a otras especies de *Candida*, como ocurrió en *Candida glabrata* (Hosking, 1999). Debido a circunstancias como éstas, muchos grupos de investigación a nivel mundial, han retornado su atención a las plantas, que en diferentes grupos étnicos en el mundo son consideradas como medicinales, en busca de nuevos agentes activos, que pueden emplearse para dar salida a estos problemas (Jawetz *et al.*, 1992).

II.1. USOS DE LAS PLANTAS MEDICINALES

De acuerdo a la OMS (2002) una planta medicinal es definida como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para

propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos. La OMS hace una referencia a la medicina tradicional cuando interactúan las plantas con propiedades medicinales, definiéndola como “el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias de utilizar dicha planta, de las diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de las enfermedades físicas y mentales”. En la mayoría de los casos donde se emplea medicina tradicional se hace referencia a aquellos aspectos de esta medicina tendientes a ser empíricos (no están basados en metodologías y estudios científicos), donde se busca obtener soluciones a los problemas de salud de las personas, utilizando a las plantas como productos naturales con potenciales para el alivio o cura de enfermedades de la salud humana (Cortes-Mancera, 2015).

La investigación científica de las plantas utilizadas en medicina tradicional con un enfoque multidisciplinario se ha incrementado en todo el mundo, una gran variedad de especies se han estudiado y se ha acumulado suficiente evidencia científica sobre sus propiedades farmacológicas (Dahanukar y Kulkarni, 2000). Con este conocimiento, la industria farmacéutica a partir de los ingredientes activos aislados de las plantas ha logrado sintetizar aproximadamente el 25 % de los medicamentos más exitosos del mercado, por ejemplo la aspirina y el tamoxifén (Tripathi 2003).

Existe una gran cantidad de plantas que se han empleado como solución a malestares que interfieren al bienestar de la salud. En muchos trabajos se ha

determinado la función que tienen diversas plantas que son utilizadas en la medicina tradicional y se describen los métodos de cómo se realizó la identificación científica de sus componentes. Sin embargo, aunque son numerosas las especies de plantas estudiadas farmacológicamente, solo de un 5% de ellas se ha validado su relación fitoquímica, farmacológica y biomédica de los principios activos (Ocegueda *et al.*, 2015).

A nivel mundial, cada día se presta más atención al uso de las plantas medicinales de forma que la Etnobotánica, la Fitoterapia y la Fitoquímica están tomando un auge inesperado, tanto en la práctica de la medicina complementaria como en el ámbito académico. El 80% de la población mundial, más de cuatro mil millones de personas, utiliza las plantas como principal remedio medicinal según lo señala la OMS (Beyra, 2004).

La OMS estructuró en 1985 un Programa de Medicina Tradicional Herbolaria, reconociendo la existencia de 119 sustancias de origen vegetal que pueden considerarse fármacos importantes, útiles en más de 60 categorías terapéuticas y obtenidas principalmente de 91 especies. El estudio de las plantas medicinales más utilizadas por la población y su evaluación con métodos científicos actuales sus efectos farmacológicos y tóxicos han permitido su incorporación a la llamada medicina moderna, estos medios tradicionales con verdadera efectividad, han ido ganando prestigio en la práctica médica actual (Beyra, 2004).

Se estima en 5 mil el número de especies vegetales estudiadas exhaustivamente para una posible aplicación médica, que es una pequeña fracción del total estimado en 3 millones de especies (Sánchez, 2000). La utilización de extractos totales de las plantas ejerce en muchos de los casos un efecto más beneficioso sobre el organismo humano que la acción del compuesto aislado y produce menos efectos secundarios indeseables. Este postulado constituye el fundamento de la Fitoterapia, que tantos adeptos gana actualmente en el mundo entero (Sánchez, 2000). La OMS ha insistido en que el uso de plantas medicinales puede ser de gran aplicación en la atención primaria de los sistemas de salud, pero sobre bases científicas que sustenten seguridad, efectividad y calidad requeridas para su administración en humanos (Sánchez, 2000; Kumar *et al.*, 2007).

Otra característica muy importante que apoya al uso de productos derivados de las plantas, es que producen efectos secundarios mínimos o no los producen y son de bajo costo comparados con los agentes sintéticos (Kumar *et al.*, 2007). Por lo tanto es prioritario investigar sobre medicina tradicional con los recursos disponibles en la región para conseguir un aprovechamiento y uso de la misma con un respaldo científico (Beyra, 2004).

Además, las plantas medicinales tienen importantes aplicaciones en la medicina moderna, ya que son fuente directa de compuestos que se emplean como materia prima para la fabricación de medicamentos semisintéticos más complejos, la estructura química de sus principios activos puede servir de modelo para la elaboración de drogas sintéticas y tales principios se pueden utilizar como

marcadores taxonómicos en la búsqueda de nuevos medicamentos (Oliveira-Miranda *et al.*, 2005).

Las plantas medicinales más utilizadas a nivel mundial son *Aloe vera* (sábila), *Matricaria* spp. (manzanilla), *Eucalyptus* spp. (eucalipto), *Allium sativum* (ajo), *Plantago major* (llantén), *Gingko biloba* (ginco), *Valeriana officinalis* (valeriana), *Hypericum perforatum* (hierba de San Juan), *Echinacea purpurea* (equinacea), *Panax ginseng* (ginseg), *Ocimum basilicum* (albahaca), *Zingiber officinale* (jengibre), entre otras (Ecured, 2016).

II.1.1. Plantas con propiedades medicinales en México

México ocupa el segundo lugar a nivel mundial en el número de plantas medicinales registradas con 4500 plantas, sin embargo, se estima que sólo el 5% han sido estudiadas para validar química, farmacológica y biomédicamente los principios activos que contienen. En México, la mayor parte del conocimiento tradicional que se tiene acerca de las plantas medicinales proviene desde la época prehispánica y actualmente diversos grupos étnicos lo conservan. Desde hace más de 30 años ha surgido la necesidad de integrar las medicinas tradicionales dentro de los sistemas oficiales para mejorar la calidad de vida de los pacientes esto por razones de orden cultural y económico (Huerta, 2002).

En nuestro país, la medicina moderna comenzó a practicarse recientemente en muchas de las zonas rurales, en donde sus habitantes rara vez disponen de

recursos económicos para pagar fármacos modernos caros. Por eso, la población continúa confiando en las plantas medicinales de la región y de otras fuentes de la medicina tradicional. El conocimiento de estos aspectos farmacológicos y clínicos de la cultura autóctona mexicana, constituye una fuente importante de información de posibles nuevos agentes activos medicinales. Se estima que el 85% de la población de México recurre a las plantas tanto con fines medicinales como ingredientes de alimentos (Robinson y López, 1999).

Las investigaciones realizadas en nuestro país con plantas medicinales, se han desarrollado de sobremanera en la última década, indicativo de la importancia de la medicina tradicional mexicana. Actualmente, los reportes indican la existencia de literatura científica que avala el uso de las plantas, sus extractos o sus compuestos activos contra diversas enfermedades como la diabetes, hipertensión y cáncer, o con propiedades antibacterianas, antimicóticas, antiprotozoarias, relajantes y sedativas (Huerta, 2002).

Aunque los reportes indican un sinnúmero de plantas medicinales utilizadas en nuestro país, las más nombradas por sus usos son: Gordolobo (*Gnaphalium sp.*), Eucalipto (*Eucalyptus globulus*), Hierbabuena (*Menta sp*), Manzanilla (*Matricaria chamomilla*), Nopal (*Opuntia ficus-indica*), Árnica (*Heterotheca spp.*), Guarumbo (*Cecropia obtusifolia*), Verbena (*Verbena carolina*), Saúco amarillo (*Tecoma stans*), Epazote (*Chenopodium ambrosioides*), Sábila (*Aloe vera*), Ruda (*Ruta graveolens*), Romero (*Rosmarinus officinalis*), entre otras (Linares y Bye, 1990; Taddei-Bringas *et al.*, 1999).

II.2. PRINCIPIOS ACTIVOS DE LAS PLANTAS

Actualmente, se tiene el conocimiento de que muchos compuestos derivados de plantas, cuya actividad farmacológica es importante, se producen mediante vías metabólicas adicionales al metabolismo primario, conocido como metabolismo secundario (Wink, 2003), por lo que dichos compuestos son llamados metabolitos secundarios.

Algunos metabolitos secundarios son atractivos de insectos polinizadores (pigmentos y aromas) representando adaptaciones químicas a cambios del medio ambiente, o sirven como agentes de defensa contra plagas (fitoalexinas, quitinasas, β -glucanasas, proteinasas, péptidos antimicrobianos, etc.). Los metabolitos secundarios vegetales generalmente se encuentran en pequeñas cantidades en comparación a los metabolitos primarios y constituyen un grupo químico diverso que incluye a los alcaloides, flavonoides, glicósidos, fenoles, saponinas, taninos, esteroides, carotenoides y terpenoides entre otros, los cuales son usados por diferentes tipos de industrias (Dixon, 2001).

Muchos de éstos, ya sea de forma individual o en diferentes combinaciones, poseen efectos estimulantes, calmantes o terapéuticos en el humano, además de que es su mayoría son utilizados como materias primas de la industria farmacéutica, alimentaria, textil, agroquímica, perfumería y cosmetología (Hartmann, 2007). Su distribución en el reino vegetal se infiere que es amplia, se estima que cerca de 50,000 especies vegetales que son utilizadas medicinalmente,

de las cuales solo una pequeña cantidad se ha investigado para la obtención de medicamentos. De todas, aproximadamente del 15 al 20% de las plantas terrestres han sido evaluadas sobre el resto de las especies vegetales, además de que se desconoce si sus metabolitos poseen algún efecto farmacológico, por lo que el conocimiento en este campo queda restringido a grupos taxonómicos particulares, por lo que queda mucho por estudiar (Soejarto *et al.*, 2005).

Estas sustancias pueden encontrarse en cualquier estructura de la planta. Existen varios factores que determinan la calidad y la concentración de sustancias pertenecientes a la planta, los cuales son la época del año, la humedad, tipo de suelo y la edad de la planta entre otras. Por ejemplo las plantas que son jóvenes o demasiado viejas tienden a tener menos concentración de principios activos, así mismo suelos ácidos son sumamente más favorables para plantas que producen alcaloides y que la humedad afecta directamente a la concentración de los compuestos químicos presentes en las plantas (Ocegueda *et al.*, 2015).

Los efectos terapéuticos se debe al contenido de diferentes metabolitos secundarios como los aceites esenciales, taninos, ácidos fenólicos, sesquiterpenlactonas, cetonas y flavonoides, entre otros (Huerta, 2002). Entre los metabolitos secundarios que se producen en las plantas, destacan por ejemplo el taxol, que proviene de *Taxus brevifolia* y *Taxus cuspidata*, un compuesto con actividad anticancerígena (Wani *et al.*, 1971); la reserpina, sintetizado por las especies de *Rauwolfia serpentina* y *Rauwolfia vomitoria*, presenta actividad antihipertensiva y tranquilizante (Vakil, 1955); y la morfina y noscapina, son algunos

de los principios activos de *Papaver somniferum*, cuya actividad analgésica y antitumoral respectivamente son recetados a pacientes cuyos padecimientos son muy dolorosos incluyendo cáncer (Duke, 1973; Bulduk y Taktak, 2012).

La clasificación de los mismos se basa en la consistencia y se denominan con el mismo nombre de la planta de la cuál provienen (planta donante), por ejemplo aceite esencial de romero. Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas, son mezclas complejas de hasta 100 componentes, entre ellos: terpenoides, fenoles aromáticos, éteres, ésteres, aldehídos y cetonas que determinan el aroma característico de la planta donante (Batish *et al.*, 2008).

Algunos de los componentes fenólicos de los aceites esenciales son clasificados como GRAS (por las siglas en inglés de Generally Recognized as Safe) lo que potencia su uso (Ponce *et al.*, 2003). Los aceites esenciales de han mostrado en varios trabajos propiedades antibacterianas, antimicóticas, antiparasitarias e insecticidas (Burt, 2004; Gutierrez *et al.*, 2008; Ponce *et al.*, 2008). Algunos de los aceites esenciales que han sido ensayados en alimentos son: eucalipto (*Melaleuca alternifolia*), romero (*Rosmarinus officinalis*), menta (*Mentha piperita*), rosa mosqueta (*Rosa moschata*), trébol (*Syzygium aromaticum*), limón (*Citrus limonum*), orégano (*Origanum vulgare*), etc.

Las oleorresinas son líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas, éstas constituyen las verdaderas esencias de las especias en su forma más concentrada

y contienen gran variedad de compuestos volátiles y no volátiles. Además son los sustitutos preferidos de las especias tradicionales en las industrias de alimentos (Ponce *et al.*, 2008). Algunas de las oleorresinas utilizadas en alimentos por sus propiedades antimicrobianas son: romero, orégano, ajo (*Allium sativum*), cebolla (*Allium cepa* L.), arándano (*Vaccinium oxycoccus*), oliva (*Olea europea*), entre otros.

II.3. PLANTAS MEDICINALES CON PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS

En la actualidad, las posibilidades terapéuticas se ven notablemente menguadas por la ausencia de nuevos medicamentos que actúen frente a diversos patógenos; y a pesar de la disponibilidad de fármacos para el tratamiento de estas infecciones, se presenta problemas de resistencia, espectro de acción, costo y efectos adversos en el paciente como hepatotoxicidad y nefrotoxicidad (Nazar *et al.*, 2010; Pemán *et al.*, 2011). Debido a estas razones se debe orientar los esfuerzos a la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos que superen dichas limitaciones.

Es por ello, que numerosas investigaciones se realizan encaminadas hacia la evaluación de actividades antimicrobianas en extractos y aceites esenciales de plantas medicinales y aromáticas. Para ello se han empleado las técnicas *in vitro* dada la sencillez y reproducibilidad de las mismas.

Los principales extractos vegetales con actividad antimicrobiana son los aceites esenciales y las oleorresinas. Los extractos naturales se obtienen directamente de

las plantas y no sufren transformaciones posteriores, por ello su rendimiento es bajo y continúan siendo costosos. Se extraen de las partes no leñosas de las plantas, en especial de las hojas, mediante diferentes métodos: extrusión, destilación por arrastre con vapor de agua (más usada a nivel comercial), extracción con solventes volátiles y con fluidos supercríticos. Se encuentran en estructuras histológicas especializadas, localizadas sobre o cerca de la superficie de la planta (Shiva-Ramayoni, 2007). Se conocen aproximadamente 3000 plantas con potencial antimicrobiano, de las cuales 300 tienen importancia comercial (Burt, 2004).

II.3.1. Antibacterianos de origen vegetal

En la medicina tradicional de las diferentes regiones del mundo, a la fecha se dispone de variados agentes antimicrobianos obtenidos de plantas que se han probado tanto *in vitro* como *in vivo* (Cowan, 1999). Un ejemplo de ello es *Piper tuberculatum* Jacq. (Piperaceae) utilizado en humanos y animales domésticos como antiinflamatorio y desinfectante de heridas, los compuestos responsables de esta actividad con amidas isobutílicas, pirrolidina, dihidropiridona y piperidina (Silva *et al.*, 2002). Además, diferentes extractos derivados de plantas son potencialmente bactericidas, de algunos de ellos se desconocen los principios activos o están bajo investigación y algunos son inhibitorios del crecimiento de bacterias que causan infecciones difíciles de controlar en humanos con el uso de antibióticos tradicionales. En el cuadro 1 se describen diferentes tipos de extractos (acuosos, etanólicos y metanólicos) de diversas plantas como “té limón”

(*Cymbopogon citratus*), “hibisco” (*Hibiscus rosa-sinensis*) o “romero” (*Rosmarinus officinalis*) que muestran actividad contra bacterias patógenas de humanos, entre ellas *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* y *Staphylococcus aureus*.

Cuadro 1. Extractos o compuestos derivados de plantas contra bacterias patógenas de humano.

ESPECIE VEGETAL	EXTRACTO/ COMPUESTO	BACTERIA	REFERENCIA
<i>Rhizophora apiculata</i>	Taninos hidrolizables	<i>Proteus mirabilis</i> , <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Micrococcus sp.</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Erwinia sp.</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Klebsiella sp</i>	Lim et al., 2006
<i>Woodfordia fruticosa</i>	Metanólico	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Micrococcus flavus</i> , <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	Parekh y Chanda, 2007
<i>Myrcianthes rhopaloides</i>	Eucaliptol	<i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Streptococcus pyogenes</i>	Maldonado, 2008
<i>Thymus capitatus</i>	Aceite esencial	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Qaralleh et al., 2009
<i>Elettaria cardamomum</i>	Acuoso	<i>Staphylococcus aureus</i>	Kaushik et al. 2010
<i>Cymbopogon citratus</i>	Etanólico/ alcaloides	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Proteus vulgaris</i>	Hindumathy, 2011
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	Etanólico	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i>	Ruban y Gajalakshmi, 2012
<i>Anisomeles indica</i>	Metanólico	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Salmonella typhi</i>	Naise y Bhadange, 2013
<i>Emilia sonchifolia</i>	Metanólico	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella typhi</i> .	Thenmozhi et al., 2013
<i>Caesalpinia spinosa</i>	Infusión	<i>Staphylococcus aureus</i>	Guevara et al., 2014
<i>Prunus africana</i>	Metanólico	<i>Salmonella typhi</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Serratia marscecens</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus cereus</i>	Ngule et al., 2014
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Acuoso	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus vulgaris</i>	Adam et al., 2014
<i>Pittosporum tetraspermum</i>	Isosteviol	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Al-Dhabi et al., 2015

II.3.2. Antifúngicos de origen vegetal

Desde los años 60's del siglo veinte se han reportado sustancias producidas por las plantas con alto potencial antifúngico: se ha reportado el poder antibiótico de extractos de cebolla, ajo y otras plantas, y otros grupos de investigación han demostrado que los dermatofitos y otros hongos patógenos son sensibles a compuestos producidos por las plantas. Son muchos los trabajos con plantas de la familia Asteraceae que indican su efecto contra hongos patógenos aunque las más importantes pertenecen a los géneros *Achillea*, *Ageratum*, *Artemisia*, *Aster*, *Blumea*, *Caesulia*, *Centaurea* y *Crepis*, *Inula*, *Solidago*, *Parthenium*, *Pentanema*, *Tagetes* y *Tanacetum*, aunque plantas de otras 50 familias tienen características antifúngicas destacando la familias Fabaceae y Brassicaceae (Damián-Badillo, 2007).

II.3.2.1. Metabolitos vegetales contra hongos que afectan la salud humana

Las enfermedades más importantes causadas por hongos en el ser humano son las dermatomicosis, micosis superficiales, micosis subcutáneas y profundas. Éstas son ocasionadas por hongos conocidos tales como *Trichophyton rubrum* (Ascomycetes), *Candida albicans* (Basidiomycetes), *Sporothrix schenckii* (Deuteromycetes), *Cryptococcus* sp y *Aspergillus* sp que afectan la piel, tejido subcutáneo y órganos internos como pulmón, huesos, articulaciones, músculos o tracto genitourinario. Los metabolitos vegetales como vernolepina, vernodalina, taraxasterol, parteniol, gayuolona, artemisinina y algunas flavonas, han mostrado

toxicidad contra *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride* y *Candida albicans*. Otros extractos de plantas se reportan también como fuente de metabolitos contra hongos que afectan la salud humana (Cuadro 2). Incluso se ha reportado que los extractos vegetales de algunas plantas potencian el efecto de los fungicidas químicamente sintetizados (Jawets *et al.* 2002).

Cuadro 2. Especie vegetal y principio activo contra hongos que afectan la salud humana (Tomado de Damián-Badillo, 2007).

ESPECIE VEGETAL	COMPUESTO	HONGO
<i>Artemisia absinthium</i>	Tujona	<i>Candida</i> spp. <i>Aspergillus niger</i> .
<i>Vernonia amygdalina</i>	Vernolepina Vernodalina Taraxasterol	<i>Candida albicans</i> <i>Aspergillus Níger</i> <i>Candida albicans</i>
<i>Ageratum conyzoides</i>	Aceites esenciales	<i>Epidermophyton floccosum</i> <i>Microsporium cani</i> <i>Trichophyton mentagrophytes</i>
	Protoanemonina	<i>Epidermophyton floccosum</i>
<i>Solidago virgaurea</i>	Triterpenoides	<i>Candida albicans</i>
<i>Achillea fragrantissima</i>	Terpinenol	<i>Candida albicans</i>
<i>Parthenium argentatum</i> x <i>P. tomentosa</i>	<i>P. Parteniol</i> Guayulona	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Artemisia girdalii</i>	Flavonas	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Trichoderma viride</i>
<i>Pelargonium graveolens</i>	Clorotalonilo	<i>Colletotrichum gloesporioides</i>
<i>Tagetes erecta</i>	Aceite esencial	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
<i>Richardia brasiliensis</i>	Taninos	<i>Candida albicans</i> <i>Epidermophyton floccosium</i> <i>Trichophyton verrucosum.</i>
<i>Tribulus terrestris</i>	Espirostanol	<i>Candida albicans</i> <i>Cryptococcus neoformans</i>
<i>Oxalis erythrorhiza</i>	3-Heptadecil-5-metoxi-fenol	<i>Microsporium canis</i> <i>Microsporium gypseum</i> <i>Trichophyton mentagrophytes</i> <i>Trichophyton rubrum</i>
<i>Azadirachta indica</i>	Triterpenos Azadiractina	<i>Trichophyton rubrum</i> <i>Trichophyton mentagrophytes</i> <i>Microsporium nanum</i>
<i>Citrus bergamia</i>	Bergapteno Limoneno	<i>Candida</i> spp
<i>Drimys brasiliensis</i>	sesquiterpen drimanos	<i>Epidermophyton floccosum</i> <i>Trichophyton rubrum</i>
<i>Piper regnellii</i>	Conocarpano	<i>Candida albicans</i>
<i>Camellia sinensis</i>	epicatequin-3-O-galato (ECG)	<i>Candida glabrata</i> <i>Clavispora lusitaniae</i> <i>Cryptococcus laurentii</i>

Se han encontrado numerosas especies de plantas mexicanas que contienen metabolitos antifúngicos, destacando las que pertenecen a la familia Asteraceae, Lamiaceae, Fabaceae y Brassicaceae, han sido analizadas y se ha determinado sus principios activos antifúngicos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Algunas plantas mexicanas con propiedades antifúngicas (Tomado de Damián-Badillo, 2007).

ESPECIE VEGETAL	COMPUESTO	HONGO
<i>Asclepias curassavica</i>	Terpenos Cardenólidos	<i>Candida albicans</i>
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	Terpenos	<i>Rhizoctonia solani</i>
<i>Heliopsis longipes</i>	Afinina	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i> <i>C. gloeosporioides</i> <i>Phytophthora cinnamomi</i>
<i>Persea americana</i> Mill.	(E,Z,Z)-1-Acetoxi-2-hidroxi-4-oxo-heneicososa-5,12,15-trieno	<i>C. gloeosporioides</i>
<i>Flourensia cernua</i> <i>Origanum majorana</i> <i>Bouvardia ternifolia</i>	Aceites esenciales	<i>Rhizoctonia solani</i> <i>Phytophthora infestans</i>
<i>Eupatorium aschenbornianum</i>	Benzofuranos	<i>Tricophyton mentagrophytes</i> <i>T. rubrum</i>
<i>Larrea tridentata</i>	Resina	<i>Pythium</i> sp
<i>Tagetes lucida</i>	6,7-dimetoxi-4-metilcumarina Escoparona	<i>Fusarium moniliforme</i> <i>F. sporotrichum</i> <i>R. solani</i>

II.4. MÉTODOS DE EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA

Actualmente existen varios métodos para la evaluación de la actividad antimicrobiana y antimicótica de las plantas medicinales, pero los más utilizados son los métodos de difusión y dilución.

Técnica de difusión en agar.- El método consiste en aplicar una cantidad determinada del extracto en estudio en un disco de papel sobre la superficie de la placa donde se ha distribuido el inóculo con el microorganismo sobre el que se determinará la actividad antimicrobiana. Por el gradiente de concentración, el extracto difunde alrededor del disco. La sensibilidad del microorganismo al extracto se relaciona con el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento bacteriano. Según el diámetro del halo de inhibición, los microorganismos se clasifican en: no sensibles ($d < 8\text{mm}$), sensibles ($9\text{mm} < d < 14\text{mm}$), muy sensibles ($14\text{mm} < d < 19\text{mm}$) y extremadamente sensibles ($d > 20\text{mm}$) (Ponce *et al.*, 2008).

Método de dilución en medio de cultivo y en agar.- Ambos permiten obtener datos cuantitativos. En ellos, el extracto se incorpora al medio con agar cuando aún está líquido. Para lograr el rango de dilución deseado se preparan una serie de placas con diferentes concentraciones del extracto. Los resultados se expresan como Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) o como Bactericidas (CMB). CIM se define como la menor concentración del extracto que produce el 90% de reducción en el crecimiento de las colonias. La CMB se define como la mínima concentración del extracto que produce al menos un 99.9% de reducción en el crecimiento de las colonias (Ponce *et al.*, 2003). Si se usan medios líquidos, el procedimiento es el mismo, sólo que se usan tubos de ensayo para las diferentes diluciones.

Estos dos métodos pueden variar dependiendo de varios factores tales como: composición del medio de cultivo, microorganismos de prueba, método de extracción, pH, y otros, que afectan los resultados obtenidos. Se han minimizado

estas variaciones, realizando ambos métodos en condiciones estándar. Se han propuesto modificaciones de los métodos, con el fin de mejorar los resultados, tomando en cuenta que los principios básicos son los mismos (Mitscher *et al.*, 1972; Ríos y Recio, 1988).

II.5. MICROORGANISMOS EN ESTUDIO

Escherichia coli.- Es un bacilo Gram-negativo, aerobio o anaerobio, produce endotoxinas, fermenta la lactosa y la glucosa, positivos al indol en rojo de metileno, no tienen cápsula, cepas son móviles por flagelos. Las cepas lisas (L) forman colonias incoloras, convexas y brillantes, pero al ser sub-cultivadas se convierten en cepas rugosas (R) que forman colonias granuladas y opacas. Patología: se encuentra en el intestino grueso, causan enfermedad intestinal primaria, infección extra-intestinal. Es un microorganismo que puede desplazarse del conducto intestinal al tracto urinario y a los riñones por vía hematógica o linfática presentando con mayor frecuencia procesos patológicos en el tracto urinario (Winfield y Groisman, 2003; Kaper y Mobley, 2004).

Salmonella typhi.- Es un bacilo Gram-negativo, móvil anaerobio facultativo no esporulado, utiliza la glucosa y la manosa para producción de ácido sulfhídrico. En medio de Mac Conkey, las colonias miden de 2-3 mm de diámetro, son circulares, convexas, lisas e incoloras. Patología: la infección por *S. typhi* es causante de la fiebre tifoidea; produce malestar general, fiebre, cefalea, letargo, anorexia, molestias abdominales, erupción transitoria, esplenomegalia y leucopenia; a veces

diarrea de consistencia líquida con gran número de leucocitos polimorfonucleares (Ekinzi *et al.*, 2002; Durango *et al.*, 2004).

Staphylococcus aureus.- Son cocos Gram-positivo en racimos irregulares, inmóviles no formadores de esporas, sin cápsula, catalasa positiva y aerobios facultativos, poseen alta tolerancia a la sal, fermenta el manitol. Los antígenos constituyen la proteína A específico. *S. aureus* produce enzimas extracelulares como la coagulasa, estafilocinasa, nucleasa, lipasa y hialuronidasa. Crece con facilidad en tripticasa soya y agar sangre de carnero. Las colonias de *S. aureus* son redondas de 1-4 mm, de diámetro lisas, elevadas y resplandecientes de color gris o amarillo dorado intenso. Patología: *S. aureus* causa infecciones piógenas en lactantes y niños, en la piel, celulitis, furúnculos, pústulas, impétigo e infecciones postoperatorios. Si la lesión es severa las bacterias pasan las barreras locales de la lesión llegando a los ganglios linfáticos y al torrente sanguíneo en donde se multiplica causando necrosis. Produce intoxicación alimenticia: náuseas, vómitos, diarrea y a menudo shock. Se asocia con enteritis, osteomielitis, pioartrosis, bacteremia y endocarditis (Murray, 1995; Paganini, 2007).

Candida albicans.- Son levaduras que pueden producir pseudohifas e hifas verdaderas, colonias elevadas de coloración cremosa y opaca, de 1-2 mm de diámetro aproximadamente. Las levaduras macroscópicas son elipsoides o esféricas con brotes de 3-6 μm de tamaño; en medios sin carbohidrato fermentable *C. albicans* crece como levadura por gemación mientras que en medios sin carbohidrato fermentable y en condiciones semi-anaerobias la levadura se alarga

formando un pseudo-micelio. Patología: causa infecciones en la piel, mucosas y uñas. La candidiasis de la mucosa presenta lesiones únicas y una pseudo-membrana blanquecina que puede cubrir la lengua, paladar blando y mucosa oral. La candidiasis cutánea ataca los pliegues inter-triginosos de la piel, la región vulvo-vaginal y los genitales (Ripon, 1990).

II.6. DAMIANA (*Turnera diffusa*)

II.6.1. Descripción botánica

La damiana (*Turnera diffusa* Willd. Ex Schult.) pertenece a la familia Passifloraceae (Turneraceae) (Cuadro 4), es un hierba o arbusto, anual o perenne, de 0.3 – 1(2) m de alto; tallo muy ramificado y pubescente, con glándulas amarillas especialmente en las partes medulas. Contiene hojas alternas y/o verticiladas, simples, pecioladas, color verde, más claro en el haz, ovadas, espatuladas, elípticas o rómbicas – ovadas, de 0,2 – 2.2cm de largo, 0.1 a 1.1cm de ancho, aromáticas en estado fresco, el haz glabro o tomentoso, con glándulas amarillas especialmente en las maduras. Presente hojas alternas y/o verticales, simples, de color verde, más claro que en el haz, ovadas, elípticas o rómbico – ovadas, de 0.2 – 2.2cm de largo y 0.1 a 1.1 cm de ancho, aromáticas en estado fresco. Además tiene presencia de inflorescencias axilares, de flores solitarias o 3 – 4 en grupos cimosos; bractéolas lanceoladas. De 2 – 5 mm de largo. Flores subsésiles sobre el peciolo, de 4 – 7 mm de largo. Corola pequeña, amarilla de 5 pétalos, de 6 – 8 mm de longitud, escasamente acunados, a veces retorcidos insertos en la entrada del tubo del cáliz. 5 estambres, insertos en los pétalos; filamentos libres y distintos, un poco

aplanados, anteras con dos celdas, los sacos se abren longitudinalmente (Ramírez 1904; Gama *et al.*, 1985) (Figura 1).



Figura 1. Características principales de planta (A) y flor de damiana (B) (*Turnera diffusa*, Passifloraceae) (Fotografías de Margarito Rodríguez, CIBNOR).

Cuadro 4. Ubicación taxonómica de damiana (*Turnera diffusa* Willd. Ex Schult.) (Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2013).

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Rosidae
Orden:	Malpighiales
Familia:	Passifloraceae
Género:	<i>Turnera</i>
Especie:	<i>T. diffusa</i> Willd. Ex. Schult.

La damiana también es conocida como hierba de la pastora, hierba del venado, oreganillo, pastorcilla o rompe camisa macho. Presenta sinonimias botánicas con *Bohadschia humifusa* C. Presl, *Turnera aphrodisiaca* Ward, *Turnera diffusa* var. *aphrodisiaca* (Ward) Urb., *Turnera humifusa* (C. Presl) Endl. ex Walp. Y *Turnera pringlei* Rose (The Plant List, 2016).

El nombre de damiana que se le da a *Turnera diffusa*, hace referencia a San Damián, un mártir cristiano que es considerado como el patrono de los farmacéuticos, que fue apreciado por el misionero de la península de Baja California, Juan María de Salvatierra en el siglo XVII (Rätsch, 1997).

II.6.2. Origen y distribución geográfica

La damiana es una especie nativa de México y Centro América, con una distribución amplia hasta Sudamérica (Brasil y Bolivia). En nuestro país se distribuye en los Estados de Chihuahua, Querétaro, Guerrero, Oaxaca, Baja California Sur, San Luis Potosí, Coahuila, Sinaloa, Nayarit, Zacatecas, Tamaulipas y Puebla. Crece en matorral xerófilo, Bosque tropical caducifolio, vegetación de dunas costeras, vegetación secundaria derivada, sabanas, selva baja, bosque caducifolio y selva baja caducifolia, en altitudes de 700 a 1200 y de 0 a 800 m (Gama *et al.*, 1981; Alcaraz, 1999).

II.6.3. Descripción química

Existen muchas moléculas bioactivas que conforman la composición de damiana, Alcaraz-Meléndez *et al.* (2007) mostraron la presencia de terpenoides como cineol, alfa y beta – pinenos, p-cimeno, timol, sesquiterpenos (alfa – copaeno, delta – cadineno, calameneno); taninos; heterósidos hidroquinónicos; arbutósido; heterósidos cianogénicos; alcaloides; beta – sitosteroles; damianina (principio amargo); resina; y, goma.

Anteriormente se ha descrito que también contiene tetrafilina B, un cianoglicósido (Spencer y Seigler, 1981); gonzalitosina I, un flavonoide (Domínguez e Hinojosa, 1976); arbutina, un glucósido fenólico (Auterhoff y Hacle, 1968) y damianina (Steinmentz, 1960).

II.6.4. Usos y aplicaciones

Se aprovecha la hoja con fines medicinales y se elaboran licores a partir de ella. En Zapotitlán de las Salinas, Puebla, las infusiones se usan como expectorante para problemas de vías respiratorias, bronquitis y tosferina. También se usa para la disentería, dispepsia, malaria, dolores de estómago e intestino, así como para tratamiento de algunos tipos de parálisis. Se le atribuyen propiedades afrodisiacas, diuréticas y laxantes. En Europa se usa para problemas renales y de vesícula. Se utiliza para problemas de debilidad nerviosa, inflamación de la vejiga, estados alterados de los órganos sexuales (impotencia), espermatorrea, nefritis y diabetes.

También se usa para dispepsia, disentería, albuminaria, como catártico, para jaquecas debidas a bebidas alcohólicas, mejorador de la vista (Gama *et al.*, 1981; Sandoval, 1982; Ramírez, 1999; Alcaraz, 1999; Arias, 2000).

Son frecuentes los usos de la damiana en la medicina tradicional de varios países, para atender variados problemas de tipo ginecológico y sexual, tales como la debilidad e impotencia sexual, en dolores de postparto, espermatorrea, para promover la fertilidad, en la fortificación del útero y en caso de orquitis; así como afrodisíaca y conceptiva. Cuando se presentan irregularidades en el sangrado de la mujer popularmente se recomienda tomar la infusión hecha con las ramas con hojas o toda la planta pero sin raíz en ocasiones se administra dos veces al día por 15 días, después del último periodo menstrual. Sin embargo, es la tos el padecimiento en el que más se emplea en Guanajuato por ejemplo, se bebe el vino vegetal hecho con la planta o en Baja California Sur de las ramas con hojas se elabora una infusión que se ingiere caliente varias veces al día. Otros usos medicinales que se le confieren son contra el dolor de estómago, para el catarro y el pulmón contaminado por tabaquismo, en la debilidad muscular y general. También se aprovecha en picadura de escorpión, reumas, diabetes, inflamación de la vejiga y en nefritis; así como para estimular el apetito y reforzar la sangre (BDMTM, 2009).

La damiana cuenta con una fiable actividad diurética, su contenido en arbutina (0.7%) es una buena cobertura antiséptica en casos de infecciones urinarias, sobre todo en las cistitis. Se utiliza también como coadyuvante en litiasis renales y

pielonefritis, proporcionando excelentes resultados en las prostatitis (Alvarado *et al.*, 2011).

En épocas prehispánicas en México, en zonas de América del Norte los indios la utilizaban como tónico para la debilidad muscular y para reponer fuerza por el consumo de alcohol y como potenciador sexual (Girón y Cáceres, 1996). En la cultura Maya, usaban *T. diffusa* para enfermedades respiratorias desde tos hasta bronquitis (Heinrich *et al.*, 1998; Ankli *et al.*, 1999). Además los Zapotecas, en Oaxaca, utilizaban esta planta en decocciones, como remedio para la fiebre y mucho antes se usaba para casos de malaria (Frei *et al.*, 1998). Estudios posteriores determinan la capacidad de ser un eficiente antiasmático y nueva mente se confirma su propiedad afrodisiaca (Rätsch, 1997).

II.6.5. Variedades de damiana en estudio

En el grupo de investigación de la Dra. Lilia Alcaraz Meléndez, en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR, La Paz, Baja California Sur) se han descrito y estudiado para su propagación diversos genotipos de damiana (*T. diffusa*), resaltando principalmente genotipos de damiana blanca y genotipos de damiana negra, actualmente descritos como variedades, de los que se tienen individuos tanto cultivados como silvestres.

La damiana blanca, de acuerdo a los ejemplares comparados con los del Herbario del CIBNOR, ha sido clasificada como *Turnera diffusa* variedad *diffusa*, la cual presenta distintivamente pubescencia en hojas y tallos (Figura 2A); sin embargo la

damiana negra, fue clasificada como *Turnera diffusa* variedad *aphrodisiaca*, que presenta hojas y tallos glabros (sin pubescencia) (Figura 2B).

Las plantas silvestres tanto de damiana blanca como negra, son obtenidas de diferentes zonas en Baja California Sur y las plantas cultivadas de damiana negra se mantienen bajo condiciones no controladas en una zona de cultivo a campo abierto en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (La Paz, Baja California Sur) (Figura 2C).



Figura 2. Planta de damiana blanca silvestre (*Turnera diffusa* var. *diffusa*) (A), planta de damiana negra silvestre (B) y cultivada (C) (*Turnera diffusa* var. *aphrodisiaca*) (Fotografías de Margarito Rodríguez y Lilia Alcaraz Meléndez, CIBNOR).

III. JUSTIFICACIÓN

En la medicina tradicional mexicana, a la planta damiana (*Turnera diffusa*) se le atribuyen propiedades antimicrobianas, sin embargo este efecto no ha sido completamente estudiado, sobre todo con genotipos de dos variedades de esta especie que habitan o se cultivan en Baja California Sur. Con la obtención de diferentes tipos de extractos, puede mostrarse esta actividad, así como los posibles principios activos de la planta.

IV. OBJETIVOS

IV.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto antimicrobiano de extractos de damiana (*Turnera diffusa*).

IV.1.1. Objetivos específicos

1. Obtener diversos extractos de la parte aérea de tres genotipos (dos silvestres y un cultivado) de dos variedades de damiana (*T. diffusa*), colectados Baja California Sur.
2. Evaluar la acción inhibitoria *in vitro* de los diferentes extractos de *T. diffusa* contra las bacterias *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *Staphylococcus aureus*, y contra el hongo *Candida albicans*.
3. Determinar la CMI *in vitro* del extracto que presente actividad inhibitoria positiva frente a las bacterias y hongo en estudio.
4. Identificar los compuestos mayoritarios del extracto más activo mediante un perfil cromatográfico.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Material Vegetal.- Se colectó la parte aérea (hojas y tallos) de plantas de las dos variedades de damiana (*T. diffusa*): 1) Damiana negra silvestre (*T. diffusa* var. *aphrodisiaca*); 2) Damiana blanca silvestre (*T. diffusa* var. *diffusa*); 3) y Damiana negra cultivada (*T. diffusa* var. *aphrodisiaca*). Todas colectadas en la etapa de floración, en el municipio de La Paz, Edo. de Baja California Sur. Las muestras fueron sometidas a secado a temperatura ambiente en sombra, previo al transporte a la Ciudad de Morelia, donde fueron pulverizadas y almacenadas sin exposición a luz, a una temperatura de 25°C hasta su extracción.

Hongo.- La cepa de levadura (*Candida albicans*) pertenece al cepario del Módulo 3, Centro Multidisciplinario De Estudios En Biotecnología (CMEB) de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia (UMSNH), a cargo del D.C. Joel Edmundo López Meza.

Bacterias.- Las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* y *Escherichia coli*, pertenecen al cepario del Lab. de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas (UMSNH).

V.2. MEDIOS DE CULTIVO

El mantenimiento y re-cultivo de *C. albicans* se realizó por el método de siembra sucesiva con estriado completo en cajas Petri con medio Caldo Nutritivo sólido (Cuadro 5), en condiciones de incubación de 28°C. Las bacterias fueron cultivadas en matraces Erlenmeyer con medio nutritivo líquido (Cuadro 5) y en cajas Petri con caldo nutritivo sólido con agar bacteriológico (10 g/L) mediante estría cruzada, en condiciones de incubación de 28°C. Para medios líquidos se utilizó agitador orbital a 100 rpm.

Cuadro 5. Medio de cultivo líquido Caldo Nutritivo*.

Peptona	5g
Extracto de carne	3g

El pH final: 6.9 +/- 0.2. Suspender 8 gr de medio en polvo en 1000 ml. Ajustar el pH de crecimiento ideal a 6.8. Esterilizar en autoclave a 121°C por 25 min.

*10g/L de agar bacteriológico para medio sólido.

V.3. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

Los extractos para cada genotipo de damiana fueron obtenidos por maceración en solvente, utilizando metanol, hexano y una mezcla de agua/etanol (1:1), dando un total de 9 extractos. La maceración se realizó de la siguiente manera:

- a) Por cada 10g de muestra se adicionó un volumen de 100 mL de solvente, la maceración con metanol y hexano fue directa; pero para obtener el extracto hidro-alcohólico, a 10g de muestra se le adicionó un volumen de 50 mL de agua en ebullición, para posteriormente cuando enfrió la mezcla, se adicionaron 50 mL de etanol absoluto.

- b) Cada sistema se dejó en reposo durante 5 días sin exposición a luz y a temperatura ambiente (25°C).

- c) Cada uno de los extractos obtenidos se sometió a un proceso de filtrado para remoción de impurezas sólidas y se llevó a sequedad por evaporación, utilizando nitrógeno gaseoso.

- d) Todos los extractos fueron disueltos en Dimetil Sulfóxido al 1 % (DMSO), el cual se utilizó como vehículo en los bioensayos, los extractos se llevaron a refrigeración hasta su aplicación.

V.4. ENSAYOS BIOLÓGICOS

V.4.1. Ensayos antimicrobianos

Previo a la realización de los ensayos, cada bacteria fue cultivada por 24h en 10 mL de Caldo Nutritivo líquido en agitación, tomando como inóculo, una colonia con aza bacteriológica.

Se utilizó el método Kirby-Bauer, que consiste en realizar un frotis sobre la superficie del agar nutritivo con 100 μ L de cada suspensión bacteriana (Rojas *et al.*, 2005), y se aplican discos impregnados con los extractos en estudio.

Para el ensayo con *C. albicans*, la siembra del hongo se llevó a cabo por dispersión con estría sobre el medio de cultivo con aza bacteriológica, de un cultivo reciente (8 días).

Posteriormente, para todos los microorganismos, se depositaron discos de papel filtro (Whatman No. 1) impregnados con cada uno de los extractos y las cajas Petri fueron incubadas a 28°C durante 48 h. Éstas se invirtieron para evitar deshidratación del medio de cultivo. Cada experimento se realizó con una n=3, por duplicado.

En caja Petri estéril, los discos fueron impregnados con 20 μ L de cada uno de los extractos en una concentración inicial de 1 mg/mL. Como tratamiento Control Negativo, se aplicaron 20 μ L del vehículo (DMSO 1%); como Control Positivo para bacterias, 10 μ L de ampicilina (50 mg/L); y como Control Positivo para *C. albicans*, 10 μ L de nistatina (10 mg/L).

A las 48 h de cultivo, se determinaron los halos de inhibición, incluyendo el diámetro de los discos (mm), de cada uno de los tratamientos. Éstos se expresan en porcentajes de inhibición, considerando un 100% de inhibición a los halos de 2

cm producidos por la ampicilina y por la nistatina, y sin inhibición al presentando por el Control Negativo (DMSO 1%).

V.4.2. Determinación de la CMI

La determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI) fue determinada con el extracto con mayor actividad antifúngica o antibacteriana, ésta se obtuvo probando el efecto con la aplicación de diferentes concentraciones del extracto obtenidas por el método de dilución sucesiva (1:1, 1:5, 1:10 y 1:100) que corresponden a 0.5, 0.1 y 0.01 mg/mL), con el mismo método de bioensayo.

V.5. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS DEL EXTRACTO CON MAYOR ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

La identificación fue realizada por cromatografía de gases y espectrometría de masas.

V.5.1. Cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG/EM)

La identificación de los compuestos presentes en la fracción más activa del extracto de damiana, se realizó en un cromatógrafo de gases 7890A (Agilent Technologies) acoplado a un espectrómetro 5975C (Agilent Technologies), el volumen de inyección de la muestra fue mediante inyección tipo Split (50:1), se utilizó la columna capilar HP 5MS (30 m x 0.25 mm I.D. x 0.25 µm de Film) con un gradiente de temperatura, iniciando con 50°C/1min, con un aumento de 5°C/min hasta alcanzar 180°C/3min (tiempo de corrida 50 min), usando helio ultra puro constante

como gas acarreador (1mL/min). La identificación de los compuestos se llevó a cabo por comparación de su espectro de masas y el tiempo de retención, de acuerdo a la base de datos espectrales NIST/EPA/NIH2011 (Torres Martínez *et al.*, 2014).

V.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA), utilizando la prueba de diferenciación de medias de TUKEY (0.05), analizando una n=6. Para realizar la prueba de ANOVA, los datos de los experimentos se transformaron con la fórmula siguiente (Steel y Torrie, 1980):

$$\sqrt{X + 0.5}$$

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La investigación de plantas medicinales ya no es solo para conocer su papel como fuente de fitoquímicos, sino que es importante para determinar la interacción entre los expertos etnobotánicos e indígenas que conocen y usan a las plantas como medicinales. Asimismo, las investigaciones fitoquímicas se han hecho necesarias para la validación de extractos utilizados en estudios clínicos por medio de análisis cromatográficos, espectroscópicos, infrarrojo y por resonancia magnética nuclear (Heinrich, 2005).

En la presente investigación se evaluaron diferentes tipos de extractos de plantas de damiana con fines de analizar su efecto antimicrobiano, si éste está relacionado con cada una de las variedades estudiadas y determinar los principales compuestos bioactivos.

VI.1. EFECTO ANTIBACTERIANO

Con el diseño experimental para determinar el efecto antibacteriano, se comparó la capacidad de los diferentes extractos de los tres genotipos de damiana, de inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* y *Escherichia coli*, a través del método Kirby-Bauer o de discos impregnados. Como control positivo se aplicó el antibiótico ampicilina a una concentración de 50 mg/L, a la cual mostraron una alta susceptibilidad los tres tipos de microorganismos, produciendo un efecto bactericida.

La capacidad antibacteriana fue determinada por la medición del diámetro (cm) del halo de inhibición y también reportada como porcentaje de inhibición, considerando un 100% de inhibición del diámetro de inhibición ocasionado por el antibiótico (2 cm).

En el cuadro 6 se presentan los resultados obtenidos a las 48 h del cultivo, como valores del diámetro de los halos de inhibición (cm) producidos por los extractos en *S. aureus*, *S. typhi* y *E. coli*, en una concentración de 1 mg/mL.

Cuadro 6. Halos de inhibición (cm) de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* y *Escherichia coli*, ejercidos por extractos de damiana (*T. diffusa*) [1 mg/mL], con el método de discos impregnados, a las 48 h del cultivo.

GENOTIPOS DE DAMIANA	TIPO DE EXTRACTO	Halo de Inhibición (cm ± D.E.)		
		<i>S. aureus</i>	<i>S. typhi</i>	<i>E. coli</i>
DAMIANA NEGRA SILVESTRE	METANÓLICO	1.1±0.15*	0.12±0.015	0.89±0.09*
	HEXÁNICO	0	0	0
	HIDROALCOHÓLICO	0.88±0.08	0.13±0.011	0.39±0.022
DAMIANA BLANCA SILVESTRE	METANÓLICO	0.78±0.09	0.09±0.012	0.61±0.014
	HEXÁNICO	0	0	0
	HIDROALCOHÓLICO	0.71±0.14	0.11±0.016	0.36±0.012
DAMIANA NEGRA CULTIVADA	METANÓLICO	0.57±0.11	0.12±0.011	0.44±0.06
	HEXÁNICO	0	0	0
	HIDROALCOHÓLICO	0.33±0.04	0.15±0.017	0.12±0.017

(*) Indica diferencia significativa, (n=6, Tukey $\alpha=0.05$).

El efecto de los extractos de los diferentes genotipos de damiana fue diverso, dependiendo claramente de la sensibilidad de la bacteria, siendo *S. aureus* la bacteria más sensible y *S. typhi* la más resistente. Los extractos metanólicos de los tres genotipos de damiana mostraron ser los más efectivos ya que produjeron los mayores halos de inhibición en *S. aureus* y los más altos en *E. coli*, en *S. typhi* no se consideró un efecto inhibitorio. De éstos, el correspondiente a damiana negra silvestre (*T. diffusa* var. *aphrodisiaca*) fue el de mayor capacidad inhibitoria (Cuadro 6). Nakanishi *et al.* (1965) reportaron un resultado similar sobre *S. aureus* con un extracto metanol-agua (1:1) de *Turnera ulmifolia*.

Así mismo, los extractos hidroalcohólicos de los tres genotipos de damiana mostraron su efecto antibacteriano contra *S. aureus* y *E. coli*. En *S. aureus* se presentaron halos de inhibición entre 0.33 y 1.11 cm, siendo el más alto el ejercido por el de damiana negra silvestre, el cual también fue mayor en *E. coli* produciendo un halo de inhibición de 0.39 cm. En *S. typhi* no hubo tal efecto inhibitorio (Cuadro 6). Respecto a los extractos hexánicos de los tres genotipos de damiana, éstos no presentaron capacidad antibacteriana para ninguna de las tres bacterias, observando nulos halos de inhibición (Cuadro 6).

Debido a estos resultados, en la Figura 2 se presentan los datos de la inhibición de los extractos con el mayor efecto inhibitorio de los tres genotipos de damiana, ejercidos sobre *S. aureus* y *E. coli*, expresados en porcentajes de inhibición (%). En

ésta se muestra que el control positivo (ampicilina, 50 mg/L) produce un 100% de inhibición y el control negativo (DMSO 1%) utilizado como vehículo, no causa inhibición en ambas bacterias. En esta figura puede observarse que la mayor inhibición sobre *S. aureus* fue obtenida con los extractos metanólico (MeOH) e hidroalcohólico (Aq-EtOH) de damiana negra silvestre (DNS), con porcentajes de inhibición de 55% y 44%, respectivamente; y de 44.5% y 19.5% sobre *E. coli*, respectivamente. Los extractos de damiana blanca silvestre (DBS) aunque ejercieron inhibición sobre estas dos bacterias, fueron menores tanto con el extracto MeOH como con el Aq-EtOH, con 39% y 35.5% en *S. aureus* y con 30.5% y 18% en *E. coli*, respectivamente.

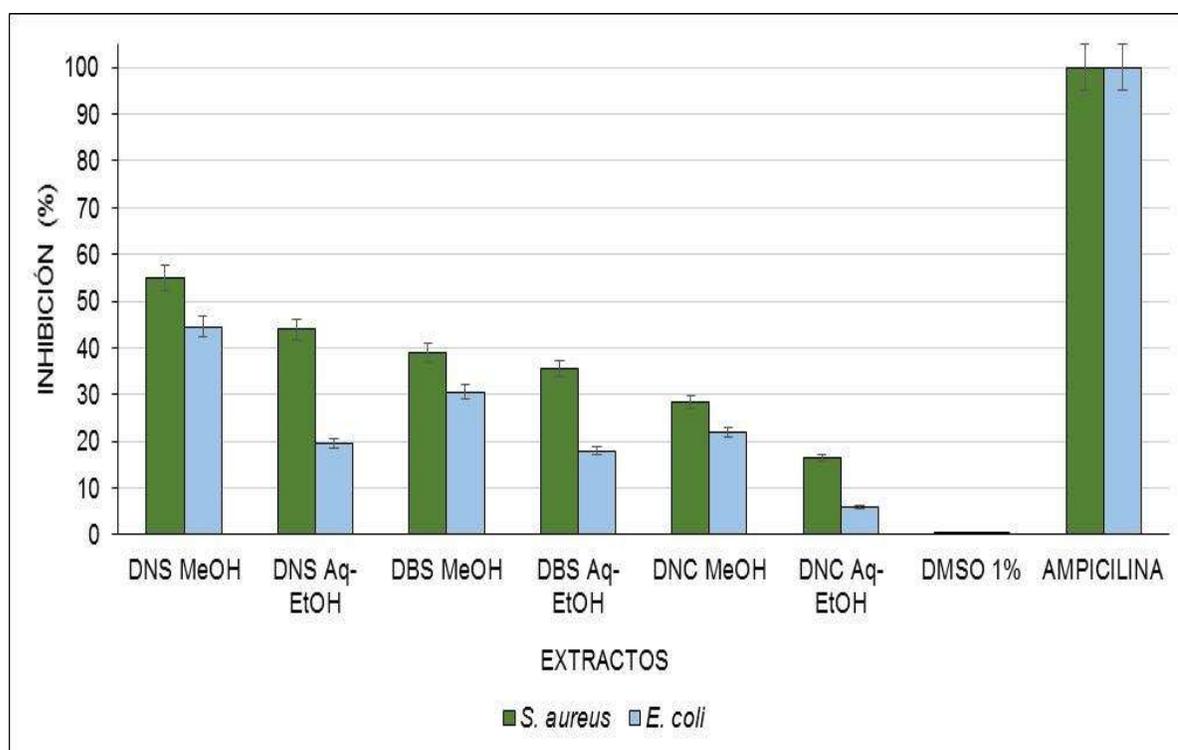


Figura 3. Porcentajes de inhibición de extractos de (*Turnera diffusa*) [1mg/mL] sobre *S. aureus* y *E. coli*, a las 48 h de cultivo: Damiana negra silvestre (DNS); Damiana blanca silvestre (DBS); Damiana negra cultivada (DNC); Metanólico (MeOH); Hidroalcohólico (Aq-EtOH). (*)Indica diferencia significativa, (n=6, Tukey $\alpha=0.05$).

En la Figura 4 se presenta una imagen representativa de los bioensayos con *S. aureus*, en la que se destaca el efecto inhibitorio de los extractos de damiana negra silvestre.

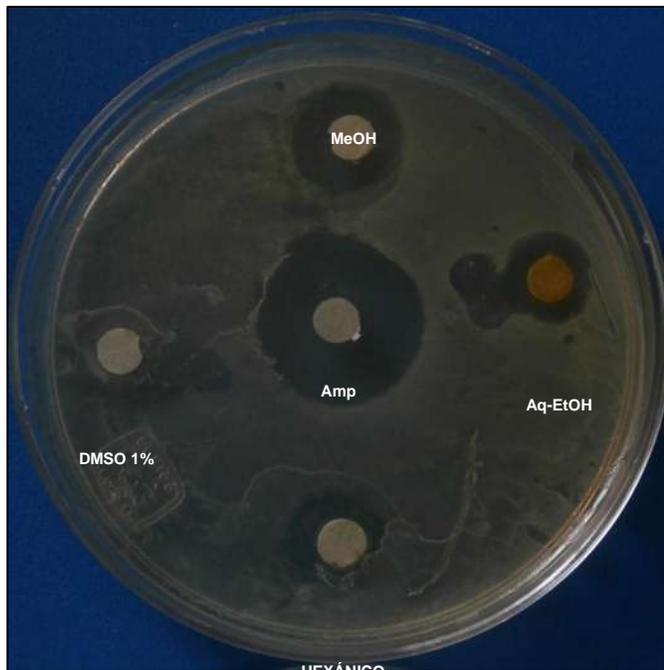


Figura 4. Bioensayo *in vitro* con el extracto metanólico de damiana negra silvestre (*T. diffusa* var. *aphrodisiaca*), por el método de discos impregnados en *S. aureus*, 48 h después del cultivo: Metanólico (MeOH); Hidroalcohólico (Aq-EtOH); Dimetil sulfóxido (DMSO 1%); Ampicilina (Amp).

Los extractos de damiana negra cultivada (DNC) mostraron los más bajos porcentajes bajo este mismo análisis de datos. Los valores del extracto de DNS presentaron diferencias significativas con todos los demás extractos ($P > 0.05$). Estos resultados determinan que los extractos de damiana negra silvestre son más efectivos que el genotipo cultivado y la variedad blanca silvestre (*T. diffusa* var. *diffusa*) por su efecto sobre el crecimiento de *S. aureus* y *E. coli*.

Los extractos hexánicos no presentaron actividad antibacteriana frente a las cepas estudiadas, esto se puede deber al método de extracción utilizado, ya que con este solvente se obtienen los compuestos menos polares, principalmente lípidos, y puede inferirse que éstos no tienen propiedades antibacterianas. Esto al compararse con los extractos metanólicos o hidroalcohólicos, en los que se obtienen los compuestos más polares o hidrosolubles, se comprueba que este tipo de metabolitos en damiana son más activos. Esto ha sido descrito para un gran número de especies de plantas, ya que en este tipo de extractos, se logra extraer la mayor parte de los compuestos activos (Cobián, 2007).

La diferencia de la actividad antibacteriana entre las variedades y el genotipo cultivado fue clara, lo que demuestra una variación en la producción de metabolitos secundarios activos que se reporta entre genotipos y según las condiciones donde crece la planta (Kumar *et al.*, 2007; Ocegueda *et al.*, 2015). Los genotipos silvestres de damiana mostraron una mayor actividad antibacteriana que el genotipo cultivado, indicativo que el efecto de localidad, temperatura, suelo, pH y disponibilidad de agua, son determinantes en damiana para que sintetice compuestos bioactivos.

VI.1.1. Determinación de CMI

La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue determinada con el extracto metanólico de damiana negra silvestre, observando el efecto con diferentes concentraciones sobre *S. aureus* y *E. coli* (0.5, 0.1, 0.05 y 0.01 mg/mL),

encontrando los siguientes resultados: para *S. aureus* el extracto no ejerció inhibición desde la primera dilución 1:1, que corresponde a la concentración de 0.5 mg/mL, por lo que la CMI es 1 mg/mL; sin embargo, en *E. coli* pudo observarse inhibición aun en la dilución mayor (1:5) por lo que ésta fue considerada como la CMI (0.05 mg/mL).

VI.2. EFECTO ANTIFÚNGICO

Mediante los bioensayos *in vitro* se determinó el efecto antifúngico de los extractos MeOH, Aq-EtOh y Hexánico, a una concentración inicial de 1 mg/mL, de los tres genotipos de damiana (DNS, DBS y DNC), probándolos contra el crecimiento del hongo levaduriforme *Candida albicans*, a las 48 h de su cultivo.

El efecto con mayor capacidad inhibitoria fue observado con los extractos metanólicos de los tres genotipos de damiana, aunque el halo de inhibición más grande se obtuvo con el de damiana negra silvestre (0.85 cm), valor con diferencia significativa al compararse con los demás tratamientos. Con el extracto hexánico de damiana negra silvestre solo se detectó una inhibición con un halo de 0.41 cm sobre *C. albicans* (Cuadro 7).

El extracto hidroalcohólico también tuvo un efecto antifúngico aunque en una proporción menor que el metanólico, siendo similares los valores tanto para damiana negra como damiana blanca silvestres. Los extractos de damiana negra

cultivada mostraron ser los menos efectivos sobre la inhibición del crecimiento de *C. albicans* (Cuadro 7).

Cuadro 7. Halos de inhibición (cm) de *Candida albicans*, ejercidos por extractos de damiana (*T. diffusa*) [1 mg/mL], con el método de discos impregnados, a las 48 h del cultivo.

GENOTIPOS DE DAMIANA	TIPO DE EXTRACTO	Halo de Inhibición (cm ± D.E.)
		<i>C. albicans</i>
DAMIANA NEGRA SILVESTRE	METANÓLICO	0.85±0.092*
	HEXÁNICO	0.41±0.033
	HIDROALCOHÓLICO	0.68±0.092
DAMIANA BLANCA SILVESTRE	METANÓLICO	0.71±0.088
	HEXÁNICO	0
	HIDROALCOHÓLICO	0.68±0.091
DAMIANA NEGRA CULTIVADA	METANÓLICO	0.22±0.011
	HEXÁNICO	0
	HIDROALCOHÓLICO	0.12±0.009

(*)Indica diferencia significativa, (n=6, Tukey $\alpha=0.05$).

Esta actividad antifúngica puede explicarse de la misma forma que para el efecto antibacteriano, donde se infiere que los compuestos polares de los extractos de damiana son los responsables de esta respuesta. Un ensayo antifúngico contra diferentes especies de *Candida* (*Candida albicans*, *Candida krusei* y *Candida tropicalis*), aplicando un extracto etanólico de *Turnera ulmifolia*, demostró una nula efectividad, lo que no coincide a lo encontrado para el extracto metanólico de *T.*

diffusa var. *aphrodisiaca* (silvestre) (Santos *et al.*, 2012), ya que con éste se logró un halo de inhibición de 0.85 cm.

Estos valores de halos de inhibición determinados por el efecto de los diferentes extractos de damiana, se presentan en la figura 5 como porcentajes de inhibición, tomando como 100% de inhibición un halo de 2 cm ejercido por nistatina a una concentración de 10 mg/mL.

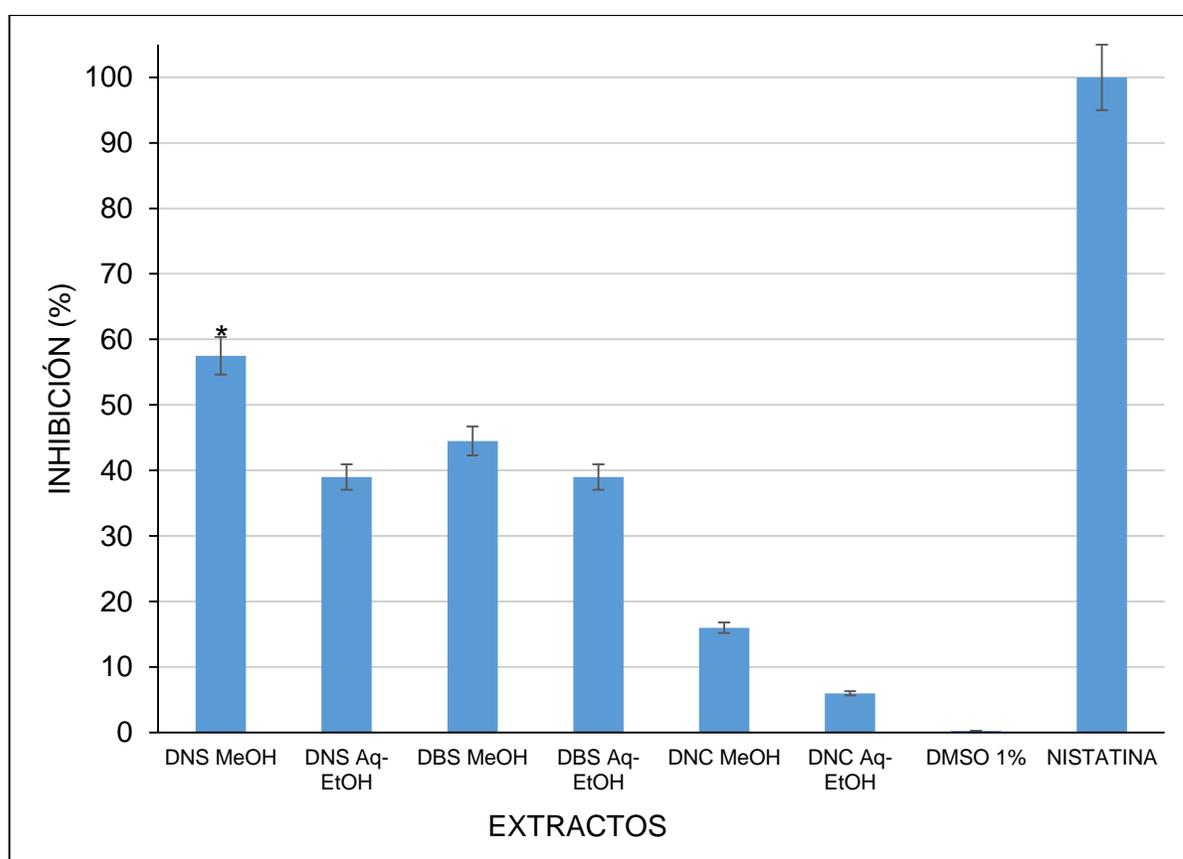


Figura 5. Porcentajes de inhibición de extractos de damiana (*Turnera diffusa*) [1mg/mL] sobre *C. albicans*, a las 48 h de cultivo: Damiana negra silvestre (DNS); Damiana blanca silvestre (DBS); Damiana negra cultivada (DNC); Metanólico (MeOH); Hidroalcohólico (Aq-EtOH). (*)Indica diferencia significativa, (n=6, Tukey $\alpha=0.05$).

En esta figura se resalta el mayor porcentaje de inhibición producido por el extracto de damiana negra silvestre (DNS) con un 57.5%, con diferencia significativa con todos los demás tratamientos. El extracto metanólico de damiana blanca silvestre produjo un 44.5% de inhibición, un valor mayor a los obtenidos por los extractos hidroalcohólicos de los genotipos silvestres de damiana, que correspondieron a un 34%, en ambas. Los porcentajes de inhibición por los extractos de damiana negra cultivada fueron de 11% o menores (Figura 4).

En la figura 6 se observa el efecto inhibitorio del extracto de damiana negra silvestre (*T. diffusa* var. *aphrodisiaca*) en un bioensayo *in vitro*, con la cepa de *C. albicans*.

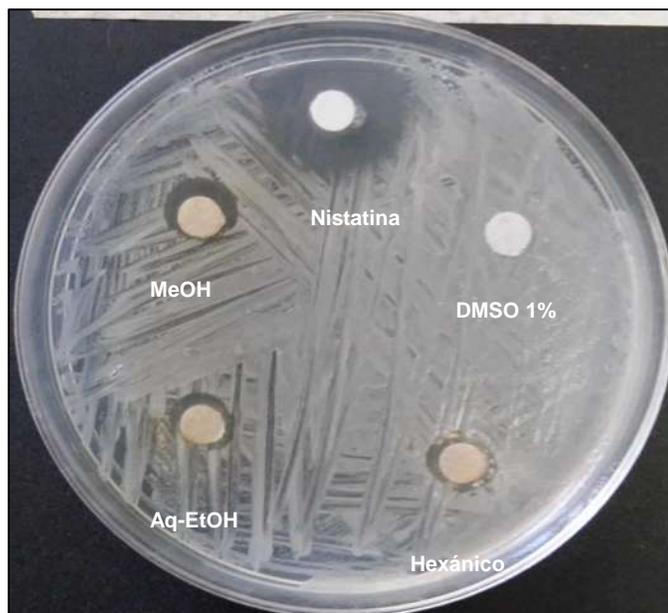


Figura 6. Bioensayo *in vitro* del extracto metanólico de damiana negra silvestre (*T. diffusa* var. *aphrodisiaca*) por el método de discos impregnados en *C. albicans*, 48 h después del cultivo: Metanólico (MeOH); Hidroalcohólico (Aq-EtOH); Dimetil sulfóxido (DMSO 1%).

VI.2.1. Determinación de CMI

La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue determinada de manera similar a la de bacterias, empleando solo el extracto metanólico de damiana negra silvestre, observando el efecto con diferentes concentraciones (0.5, 0.1, 0.05 y 0.01 mg/mL). La CMI se determinó con la concentración inicial utilizada (1 mg/mL) ya que desde la primera dilución (1:1) se perdió el efecto inhibitorio.

VI.3. ANÁLISIS POR CG/EM DEL EXTRACTO CON MAYOR ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

El análisis de los componentes fue realizado por cromatografía de gases-espectrometría de masas, con el fin de determinar la presencia e identificar metabolitos de tipo fenólico o terpénico. Los resultados llevaron a seleccionar al extracto metanólico (MeOH) de damiana negra silvestre (DNS) (*T. diffusa* var. *aphrodisiaca*) para realizar este tipo de análisis y relacionar la capacidad antimicrobiana con los metabolitos identificados, ya que éste fue el que mostró el mayor efecto inhibitorio sobre las bacterias *S. aureus* y *E. coli*, y sobre el hongo *C. albicans*.

En el extracto se identificaron como compuestos mayoritarios, principalmente de tipo terpénico como el α -Pineno, β -Pineno, Eucaliptol, Copaeno, Óxido de Cariofileno, α -Cedreno, α -Cadinol, 10-epi- γ -eudesmol, Espatulenol y Cadineno; sin embargo el

compuesto arbutina, un fenil-glucósido, fue el compuesto de mayor concentración, con un Tr de 32.22 y un área de 18,710,988, correspondiente a un 20.4% del total de compuestos en el extracto, en una abundancia de 400,000 (Figura 7, Cuadro 8).

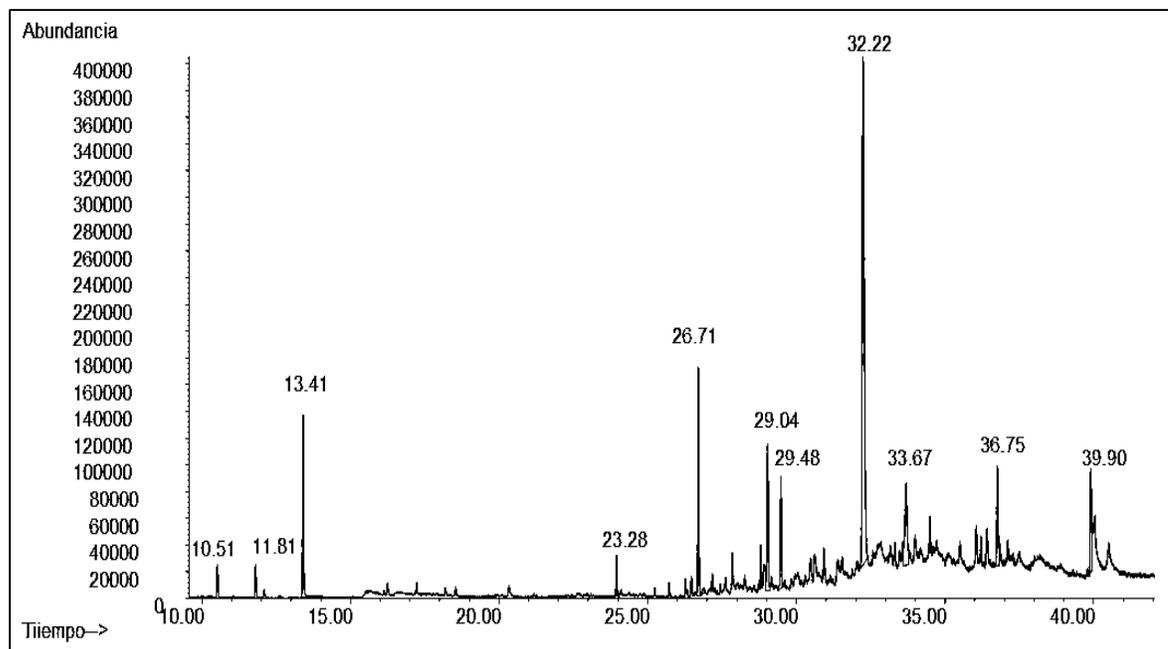


Figura 7. Cromatograma del extracto metanólico de damiana negra silvestre (*T. diffusa* var. *aphrodisiaca*).

Cuadro 8. Compuestos mayoritarios del extracto metanólico del genotipo de damiana negra silvestre (*T. diffusa* var. *aphrodisiaca*), por tiempo de retención y área bajo la curva de cada pico en el cromatograma correspondiente (Figura 6).

No. Pico	Tiempo de retención (Tr)	Área	Compuesto
1	10.51	1147898	α -Pineno
2	11.81	1119322	β -Pineno
3	13.41	3234842	Eucaliptol
4	23.28	1572996	α -Copaeno
5	26.71	4011292	α -Cedreno
6	29.04	3126157	Óxido de cariofileno
7	29.48	1964560	α -Cadinol
8	32.22	18710988	Arbutina
9	33.67	3306540	10-epi- γ -eudesmol
10	36.75	2345142	Espatulenol
11	39.90	2398017	Cadineno

Los otros dos componentes de mayor concentración son el eucaliptol (cineol) y el α -Cedreno. Al poseer este extracto este tipo de metabolitos secundarios es indicativo de que son los responsables de la acción bactericida y fungicida. Estos compuestos deben su actividad fungicida y/o bactericida a la sobrecarga a la que es sometida la membrana celular de los microorganismos de forma tal que la hace perder el control y la integridad. Los compuestos de tipo terpénico al igual que la membrana celular son hidrofóbicos por lo cual se introducen a través de la membrana celular alterando su estructura y haciéndola más permeable. Consecuentemente se altera la permeabilidad selectiva y se pierden contenidos celulares (Sánchez *et al.*, 2000).

Los terpenos, principalmente los monoterpenos y sesquiterpenos poseen un amplio espectro de actividad biológica, en particular antimicrobiana (Adris, 2007). Hay una gran cantidad de terpenos a los que se les atribuye capacidad antimicrobiana, como ejemplo están el mentol que se obtiene de la menta (*Mentha piperita*) y el eucaliptol presente en el eucalipto (*Eucalyptus globulus*) que inhiben el crecimiento de bacterias y hongos (Domingo y López-Brea, 2003).

Por otro lado, la presencia del fenil-glucósido arbutina, el compuesto de mayor concentración en *T. diffusa* var. *aphrodisiaca* (silvestre), ha sido relacionada con las propiedades antimicrobianas de diversos extractos, principalmente de plantas como *Pyrus spinosa*, cuyo extracto metanólico inhibió el crecimiento de las bacterias *Bacillus cereus*, *Micrococcus flavus*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhimuirum*; y

los hongos *C. albicans*, *C. kruzei*, *Aspergillus niger* y *A. fumigatus* (Kundaković *et al.*, 2014).

VII. CONCLUSIONES

Se determinó que tanto las variedades silvestres y genotipo cultivado de *Turnera diffusa*, así como el tipo de extracto influyen significativamente sobre el porcentaje de actividad antimicrobiana frente a las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y al hongo *Candida albicans*, siendo el extracto metanólico de damiana negra silvestre (*T. diffusa* var. *aphrodisiaca*) el de mayor actividad.

Este extracto a una concentración de 1 mg/mL inhibió en un 55% a *S. aureus*, un 44.5% a *E. coli* y en un 57.5% a *C. albicans*. La CMI para *S. aureus* y *C. albicans* fue de 1 mg/mL, para *E. coli* fue de 0.05 mg/mL.

El subsecuente análisis fitoquímico determinó que la actividad antimicrobiana del extracto de damiana negra silvestre (*T. diffusa* var. *aphrodisiaca*) es debido a la presencia de compuestos terpénicos y del flavonoide arbutina.

VIII. LITERATURA CITADA

- Adam S.H.Y., Ahmed A.A.Y., Omer A.K.M., Bashir A.M.A., Abdel-Rahman O.A.M. y Abdelgadir W.S. 2014.** In vitro antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* leave extracts. Journal, 2(1):15-21.
- Al-Dhabi N.A., Arasu M.V. y Rejiniemon T.S. 2015.** *In vitro* antibacterial, antifungal, antibiofilm, antioxidant, and anticancer properties of isosteviol isolated from endangered medicinal plant *Pittosporum tetraspermum*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (2015) p. 11.
- Alcaraz L. 1999.** Estudio de las Condiciones para la Micropropagación de Damiana *Turnera diffusa*. Tesis de Doctorado (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F.
- Alcaraz-Meléndez L., Delgado-Ramírez J. y Real-Cosío S. 2004.** Analysis of essential oils from wild and micropropagated plants of damiana (*Turnera diffusa*). Fitoterapia, 75 (7–8): 696-701.
- Alcaraz-Meléndez L. y Véliz-Murillo M.G. 2006.** Comercialización de una planta del desierto: damiana (*Turnera diffusa*). Revista Mexicana de Agronegocios. Cuarta Época, Año X, 19: 83-94.
- Alcaraz M., Real C., Václav S. y Švajdlenka E. 2007.** Differences in essential oil production and leaf structure in pheno-types of damiana (*Turnera diffusa* willd). Journal of Plant Biology, 50(3):378-382.
- Alvarado M., Salcedo S. y Vargas V. 2011.** Planta. Universidad Autónoma de Nuevo León. 11: 10-11.
- Ankli A., Sticher O. y Heinrich M., 1999.** Medical ethnobotany of the Yucatec Maya: healers' consensus as a quantitative criterion. Econ. Bot. 53, 144 – 160pp.
- Arias A. 2000.** Las Plantas de Zapotitlán Salinas, Puebla: Un folleto de divulgación sobre botánica y conservación. Tesis Profesional (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F.
- Auterhoff H. y Hackle H.P. 1968.** Components of Damiana drug. Arch. Pharm., 301:537-544.

- Barrera F.B. 2000.** Efecto antimicrobiano de extracto de flores de *Helenium mexicanum* H.B.K. sobre bacterias de importancia clínica. Tesis de licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. UMSNH. 53 p.
- Batish D., Singh H., Kohli R. y Kaur S. 2008.** *Eucalyptus* essential oil as a natural pesticide. Forest Ecol. Manage.
- BDMTM, 2009.** Atlas de las plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. México D.F. UNAM.
<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=d&amiana&id=7387>
- Beyra A. 2004.** Estudios etnobotánicos sobre plantas medicinales en la provincia de Camaguey (Cuba). Anales del jardín botánico de Madrid, 61(12):182-204.
- Bulduk B. y Taktak F. 2013.** Isolation and characterization of antitumor alkaloids from poppy capsules (*Papaver somniferum*). J. Chem., 2013:1-4.
- Burt S. 2004.** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. International Journal of Food Microbiology, 94:223-253.
- Cobian, G. 2007.** Evaluación de extractos de las hojas de *Gliricidia sepium* (jacq.) en la inhibición de *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. Tesis Maestría en tecnología avanzada. México. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada. 52p.
- Cortes-Mancera F., Ospina-Medina L., Eduardo-Forero J. y Cardona-Maya W. 2015.** Plantas afrodisíacas como potenciales capacitantes de espermatozoides humanos. Grupo Reproducción, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquía, Medellín, Colombia. 17 p.
- Cowan M.M. 1999.** Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbial. Rev., 12(4):564-582.
- Dahanukar S.A., Kulkarni R.A. y Rege N.N. 2000.** Pharmacology of Medicinal Plants and Natural Products. Indian Journal of Pharmacology, 32:81-118.
- Damián-Badillo L.M. 2007.** Efecto antifúngico de extractos de *Artemisia ludoviciana* Nutt., *Heliopsis longipes* 'A Gray' Blake, *Satureja macrostema* 'Benth.'

Briq. y *Tagetes lucida* Cav. Tesis Doctoral, Inst. de Investigaciones Químico-Biológicas, UMSNH, Morelia, Mich. México.

Dixon R. 2001. Natural Products and Plant Disease Resistance. Macmillan Magazines Ltd. Nature, 411:843-847.

Domingo D. y López-Brea M. 2003. Plantas con acción antimicrobiana. Rev. Esp. Quimioterap., 16(4):385-393.

Domínguez X.A. e Hinojosa M. 1976. Isolation of 5-hydroxy-7,3',4'-trimethoxy flavone from *Turnera diffusa*. Planta Med., 30:68-71.

Duke J.A. 1973. Utilization of papaver. Econ. Bot., 27(4):390-391.

Durango J., Arrieta G. y Mattar S. 2004. Epidemiología de *Salmonella* spp aislada de alimentos en la costa Atlántica. Biomédica, 24:89-96.

Ecured, 2016. Uso de plantas medicinales.
<http://www.ecured.cu/Usodeplantasmedicinales>

Edris A.E. 2007. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. Phytother. Res., 21:308-323.

Ekinci B., Coban Y., Birinci A., Durupinar A. y Erturc M. 2002. *In vitro* effects of cephalexin and ceftriaxone on *Salmonella typhi* within human monocyte derived macrophages. Clinical Microbiology and Infection, 8:810-813.

Frei B., Baltisberger M., Sticher O. y Heinrich M. 1998. Medical ethnobotany of the Zapotecs of the Isthmus-Sierra (Oaxaca, Mexico): documentation and assessment of indigenous uses. J. Ethnopharmacol., 62:149-165.

Gama L., Navare H. y Moreno N. 1981. Flora de Veracruz Turneraceae. Instituto Nacional de Investigaciones Biológicas. Veracruz.

Gama L., Navare H. y Moreno N. 1985. Turneraceae. Flora de Veracruz Investigaciones sobre Recursos Biológicos, Xalapa, Veracruz, México.

Girón L.M. y Cáceres A. 1996. Plantas de uso Medicinal en Guatemala. Editorial Universitaria, Guatemala.

Guevara J.M., Guevara G.J.C., Guevara D.J.S., Béjar V., Huamán A., Valencia E. y Abanto P. 2014. Evaluation of different biovarieties of *Caesalpinia*

- spinosa* (tara) poaching against oxacillin sensitive and resistant *Staphylococcus aureus* strains Ann. Fac. med., 75(2):177-80.
- Gutierrez J., Barry-Ryan C. y Bourke P. 2008.** The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. International Journal of Food Microbiology, 124:91-97.
- Hartmann T. 2007.** From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. Phytochemistry, 68:2831-2846.
- Heinrich M., Ankli A., Frei B., Weimann C. y Sticher O. 1998.** Medicinal plants in Mexico: healers' consensus and cultural importance. Soc. Sci. Med., 4:7:1859-1871.
- Hindumathy C.K. 2011** .In vitro Study of antibacterial activity of *Cymbopogon Citratus*. Internat. J. Biol. Biomol. Agric. Food and Biotech. Engineering, 5(2):48-52.
- Hosking S. 1999.** Fungi as animal pathogens. In: Molecular Fungal Biology (Oliver R.P. y Schweizer M. Eds.). Cambridge University Press, pp. 322-340, Cambridge, UK.
- Huerta C. 2002.**La herbolaria: mito o realidad. En: www.conabio.gob.mx
- Jawetz E., Melnick J y Adelberg E. 1992.** Microbiología médica. Editorial El Manual Moderno, S. A. de C. V. México. 700 p.
- Jawetz E., Melnick J. y Adelberg E. 2002.** Microbiología Médica. 17º Ed. cap 16. Editorial manual moderno. México.
- Kaper J.B., Nataro J.P.y Mobley H.L. 2004.** Pathogenic Escherichia coli. Nature Reviews Microbiology, 2:123-140.
- Kaushik P., Goyal P., Chauhan A. y Chauhan G. 2010.** In vitro evaluation of antibacterial potential of dry fruit extracts of *Elettaria cardamomum* Maton (Chhoti Elaichi). Iran J. Pharm. Res., 9(3):287–292.
- Kumar S.S., Kumar P.R., Jaiswal D. y Watal G. 2007.** Evidence-based critical evaluation of glycemic potential of *Cynodon dactylon*." eCAM, 5(4):415-420.
- Kundaković T., Ćirić A., Stanojković T., Soković M. y Kovačević N. 2014.** Cytotoxicity and antimicrobial activity of *Pyrus pyraeaster* Burgsd. and *Pyrus*

spinosa Forssk. (Rosaceae). African Journal of Microbiology Research, 8(6):511-518.

Lim H., Darah I. y Jain K. 2006. Antimicrobial activities of tannins extracted from *Rhizophora apiculata* barks. Journal of Tropical Forest Science, 18(1):59-65.

Linares E. y Bye R. 1990. Selección de plantas medicinales de México. Ed. Limusa, México.

Lozoya X. y Rivera E. 1999. Numeralia. Arqueología Mexicana. 7:39 p.

Maldonado E. 2008. Análisis de la composición del aceite esencial de *Myrcianthes rhopaloides* (Kunth in H.B.K.) *McVaugh*, Myrtaceae, y evaluación de su actividad biológica. Revista La granja (Ecuador), 1:17-24.

Mitscher L.A., Leu R., Bathala M.S., Wu W. y Beal J.L. 1972. Antimicrobial agents from higher plants. In Introduction, rational and methodology. Lloydia, 35(2):157-166.

Morales-López M.E. 2003. Efecto de la afinina y el decatrién bornilo sobre hongos patógenos humanos. Tesis de Maestría: Fac. de Medicina. Div. de Estudios de Posgrado, UMSNH.

Murray P. 1995. Manual of clinical microbiology, 6a ed., pp. 97-100.

Naise M.J. y Bhadange D.G. 2013. *In vitro* antibacterial activity of *Anisomeles indica* (L) O. Ktze Lamiaceae plant from Melghat, (M.S.) India. Science Research Reporter, 3(2):243-245.

Nakanishi K., Sasaki S.I., Kiang A.K., Goh J., Kakisawa H., Ohashi M., Goto M., Watanabe J.M., Yokotani H., Matsumura C. y Togashi M. 1965. Phytochemical survey of Malaysian plants. Preliminary chemical and pharmacological screening. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 13:882-890.

Nazar J.R., Lavados A., Daher O. y Bischoff M.C. 2010. Análisis microbiológico, epidemiológico y evolución clínica de los pacientes con bacteriemia en el Hospital Zonal de Esquel en el período 2007-2009. Rev. Argent. Microbiol., 42(3):151-164.

- Ngule M.C., Ndiku M.H. y Ramesh F. 2014.** Chemical constituents screening and *in vitro* antibacterial assessment of *Prunus africana* bark hydromethanolic extract. Journal of Natural Sciences Research, 4(16):2014.
- OMS. 2002.** Estrategia de la OMS sobre Medicina Tradicional 2002-2005.
- Ocegueda S., Moreno E. y Koleff P. 2005.** Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica, CONABIO. Biodiversitas, 62:12-15.
- Oliveira-Miranda M.A., Velázquez D. y Bermúdez A. 2005.** La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales una revisión de sus objetivos y enfoques. Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América, 30(8):453-459.
- Osuna-Leal E. y Meza-Sánchez R. 2000.** Producción de plantas y establecimiento y manejo de plantaciones de damiana: *Turnera diffusa* Willd. Folleto Técnico No 4: SAGAR : INIFAP, Centro de Investigación Regional del Noroeste. 28 p.
- Paganini H. 2007.** Infecciones por *Staphylococcus aureus* metilicilino resistente proveniente de la comunidad: un nuevo desafío para los pediatras. Medicina Infantil. Revista Hospital Pediatrico Garrahan, 14(4):292-296.
- Parekh J. y Chanda S. 2007.** *In vitro* antibacterial activity of the crude methanol extract of *Woodfordia fruticosa* Kurz. flower (Lythraceae). Braz. J. Microbiol., 38(2):June 2007.
- Pazos-Guarneros D. 2009.** Evaluación del efecto hipolipemiente e hipoglucemiente de extractos de *Turnera diffusa*, *Ibervillea sonora* y *Morinda citrifolia*, Tesis, CIBA-IPN, 119 p.
- Pemán J., Cantón E., Linares Sicilia M.J., Roselló E.M., Borrell N., Ruiz-Pérez-de Pipoon M.T., Guinea J., García J., Porrás A., García Tapia A.M., Pérez-Del-Molino L., Suárez A., Alcoba J., García-García A. 2011.** Epidemiology and antifungal susceptibility of bloodstream fungal isolates in pediatric patients: a Spanish multicenter prospective survey. J. Clin. Microbiol., 49(12):4158-4163.
- Penso G. 1982.** Inventory of medicinal plants and compilation of a list of the most widely used plants. Ginebra OMS (DPM/WP/78.2).

- Piacente S., Camargo E.E.S., Zampelli A., Gracioso J.S., Souza Brito A.R., Pizza C. y Vilegas W. 2002.** Flavonoids and arbutin from *Turnera diffusa*. Z. Naturforsch, 57(11-12):983-985.
- Ponce A., Fritz R., Del Valle C. y Roura S. 2003.** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, 36:679-684.
- Ponce A., Roura S., Del Valle C. y Moreira M. 2008.** Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: *in vitro* and *in vivo* Studies. Postharvest Biology and Technology, 49:294-300.
- Qaralleh H.M., Abboud M.M., Khleifat K.M., Tarawneh K.A. y Althunibat O. 2009.** Antibacterial activity in vitro of *Thymus capitatus* from Jordan. Pak. J. Pharm. Sci., 22(3):247-251.
- Ramírez J. 1904.** La Damiana *Turnera diffusa* – afrodisiaca. In: Estudios de la historia natural (Ramírez J. Ed.). Imprenta Secretaría de Fomento. México.
- Ramírez R. 1999.** Los Recursos Forestales no Maderables de México: Una revisión. Tesis Profesional (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F.
- Rätsch C. 1997.** Pflanzen der Liebe, 3. Aufl age. Aarau, AT Verlag.
- Rios J.L. y Recio M.C. 1988.** Screening methods for natural products with antimicrobial activity; a review of the literature. Journal of Ethnopharmacology, 3(2-3):127-148.
- Rippon J. 1990.** Micología médica: hongos y actinomicetos patógenos. México: Interamericana. p. 33-56.
- Risso A. 2000.** Leukocyte antimicrobial peptides: multifunctional effector molecules of innate immunity. Journal Leukocyte Biology, 68:785-792.
- Robinson G.G. y López C.B. 1999.** Patrones del uso de plantas medicinales entre los amuzgos del estado de Guerrero, México. <http://www.sil.org/mexico/amuzga/querrero/A006e-PlantasMedicinales-AMU.pdf>. Instituto Lingüístico de Verano, A.C.
- Rojas J.J., García A.M. y López A.J. 2005.** Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. Boletín

Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 4(2):28-32.

Ruban P. y Gajalakshmi K. 2012. *In vitro* antibacterial activity of *Hibiscus rosa-sinensis* flower extract against human pathogens. Asian Pac. J. Trop. Biomed., 2(5):399–403.

Sanchez L.A. 2000. Propuesta de ruta crítica para la evaluación genotóxica de plantas medicinales en Cuba. Revista Cubana Farm., 34(1):34-43.

Sandoval G. 1982. La Damiana (*Turnera diffusa* Willd.). Una Revisión Bibliográfica y Experiencias en su Aprovechamiento e Inducción al Cultivo. Tesis Profesional (Ing. Agrónomo Especialista en Fitotecnia). Universidad Nacional autónoma de Chapingo. México.

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. y Coutinho H.D.M. 2012. Anti-Candida activity of *Mentha arvensis* and *Turnera ulmifolia*. Journal of Medicinal Food, 15:322-324.

Shiva-Ramayoni C. 2007. Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento. Tesis Doctoral. Departamento de Sanidad y Anatomía de Animales. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. 173p.

Silva R.H., Deboni H., Kato M., Bolzani V., Méda C., Young M. y Furlan M. 2002. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry*, 59(5):521-527.

Soejarto D.D., Fonga H.H.S., Tana G.T., Zhang H.J., Ma C.Y. y Franzblau S.G. 2005. Ethnobotany/ethnopharmacology and mass bioprospecting: Issues on intellectual property and benefitsharing. J. Ethnopharmacol., 100(1-2):5-22.

Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2013. *Turnera diffusa*. Damiana. <http://eol.org/pages/584511/names>.

Spencer K.C. y Seigler D.S. 1981. Tetraphyllin B from *Turnera diffusa*. Planta Med., 43(2):175-8.

- Steinmetz E.F. 1960.** *Damianae folia*. *Acta Phytotherapeut.*, 7:1-2.
- Sussman, M., Willis B., Victor S. y Bourne D. 2008.** Coral pathogens identified for white syndrome (WS) epizootics in the Indo-Pacific. *PLoS One*, 3:e2393.
- Taddei-Bringas G.A., Santillana-Macedo M.A., Romero-Cancio J.A. y Romero-Télles M.B. 1999.** Aceptación y uso de herbolario en medicina familiar. *Salud Pública de México*, 41:216-220.
- The Plant List. 2016.** *Turnera diffusa* Willd. ex Schult.
<http://www.theplantlist.org/tpl/search?q=Turnera+diffusa>
- Thenmozhi K., Sarada M., Manian S. y Paulsamy S. 2013.** *In vitro* antimicrobial potential of root extracts of the medicinal plant species, *Emilia sonchifolia* (Linn.) DC. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical*, 6(3):July-Sept.
- Torres-Martínez. R., Bello-González. M.A, Molina-Torres, J., Ramírez-Chávez E., García-Rodríguez Y., Fulgencio-Negrete R., García-Hernández A., López-Gómez R., Martínez-Pacheco M.M. y Salgado-Garciglia R. 2014.** Efecto de la fertilización sobre el crecimiento y contenido de compuestos volátiles en *Satureja macrostema* "Benth" Briq. *Rev. Mex. Cienc. For.*, 5(21): 122-134.
- Tripathi K.D. 2003.** *Essentials of Medical Pharmacology*, 5a. ed. Jaypee, Brothers Medical Publishers, India. 179 p.
- Vakil R.J. 1955.** *Rauwolfia serpentina* in the treatment of high blood pressure: A review of the literature. *Circulation*, 12:220-229.
- Wani M.C., Taylor H.L., Wall M.E., Coggon P. y McPhail A.T. 1971.** Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Amer. Chem. Soc.*, 93:2325-2327.
- Winfield M.D. y Groisman E.A. 2003.** Role of non host environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7):3687-3694.
- Wink M. 2003.** Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64:3-19.