



## ***In Vitro* Antimicrobial Activity of Methanolic and Hexanic Extracts of *Turnera diffusa* Against Common Urinary Pathogens**

### **Actividad Antimicrobiana *in vitro* de extractos metánolicos y hexánicos de *Turnera diffusa* contra patógenos comunes de vías urinarias**

Báez-Parra, K. M.<sup>1</sup>, Soto-Beltrán, M.<sup>2</sup>, López-Cuevas, O.<sup>1</sup>, Basilio Heredia, J.<sup>1</sup>, Alcaraz-Meléndez, L.<sup>3</sup>, Angulo-Escalante, M. A.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Coordinación Culiacán. Km. 5.5 Carr. a Eldorado, Col. Campo El Diez, C.P. 80110, Culiacán, Sinaloa, México.

<sup>2</sup>Universidad Autónoma de Sinaloa, Av. de las Américas y Josefa Ortiz de Domínguez, Culiacán, Sinaloa, C.P. 80000, Culiacán, Sinaloa, México.

<sup>3</sup>Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. Av. Instituto Politécnico Nacional 195, Playa Palo de Santa Rita Sur, C.P. 23096, La Paz, Baja California Sur, México.

**Cite this paper/Como citar este artículo:** Báez-Parra, K. M., Soto-Beltrán, M., López-Cuevas, O., Basilio Heredia, J., Alcaraz-Meléndez, L., Angulo-Escalante, M. A. (2019). *In Vitro* Antimicrobial Activity of Methanolic and Hexanic Extracts of *Turnera diffusa* Against Common Urinary Pathogens. *Revista Bio Ciencias* 6(2), e670. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.06.nesp.e670>



#### **ABSTRACT**

*Turnera diffusa* Willd. ex Schult. is well known in traditional medicine as aphrodisiac, diuretic, hypoglycemic, tranquilizer and urinary tract antiseptic, here the main focus was the antiseptic effect. The goal of this study was to evaluate the antimicrobial activity of methanolic and hexanic extracts of two varieties of *Turnera diffusa* Willd. ex Schult against main tract urinary pathogens. Also, the chromatographic profile of the extracts was generated. For the methanolic extract the mobile phase was composed of ethyl acetate, acetic and formic acids and water (100:11:11:27). On the other hand, hexane and acetic acid (7.2:2.9) were used for the hexanic extract. The antimicrobial activity and minimum inhibition concentration were evaluated by the disc diffusion method and microdilution method, respectively, against *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus*

#### **Article Info/Información del artículo**

Received/Recibido: February 05<sup>th</sup> 2018.

Accepted/Aceptado: August 29<sup>th</sup> 2019.

Available on line/Publicado: September 3<sup>rd</sup> 2019.

#### **RESUMEN**

*Turnera diffusa* Willd. ex Schult, es conocida en la medicina tradicional como afrodisíaco, diurético, hipoglucémico, tranquilizante y antiséptico del tracto urinario, en este trabajo nos centramos en el efecto antiséptico; por lo que el objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos y hexánicos de dos variedades de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult contra los principales patógenos urinarios. Además se generaron perfiles cromatográficos de los extractos, donde, se utilizó para el extracto metanólico, la fase móvil compuesta de acetato de etilo, ácido acético, ácido fórmico y agua (100:11:11:27). Por otro lado, se utilizaron hexano y ácido acético (7.2:2.9) para el extracto hexánico. La actividad antimicrobiana y la concentración mínima inhibitoria se evaluaron mediante el método de difusión en disco y microdilución, respectivamente, contra *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*. El extracto metanólico reveló la presencia de bandas de amarillo a naranja, mientras que el extracto hexánico mostró bandas de azul a violeta. Los resultados mostraron actividades antibacterianas y antifúngicas de los extractos metanólicos y hexánicos de las variedades *Turnera diffusa*

#### **\*Corresponding Author:**

Angulo-Escalante, Miguel Ángel, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. A.C. Coordinación Culiacán. Km. 5.5 Carr. a El dorado, Col. Campo El Diez, C.P. 80110, Culiacán, Sinaloa, México. Phone and Fax 01 (667) 760-5536 Ext. 231. Email: [manguelo@ciad.mx](mailto:manguelo@ciad.mx)

*aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. The methanolic extract revealed the presence of bands from yellow to orange while the hexanic extract showed bands from blue to violet. The results showed antibacterial and antifungal activities of both methanolic and hexanic extracts of *Turnera diffusa* var. *diffusa* and *Turnera diffusa* var. *aphrodisiaca* against urinary tract pathogenic species, confirming one of their potential medicinal uses.

---

## KEY WORDS

---

Antimicrobial activity, HPTLC (High performance thin layer chromatography), minimum inhibitory concentration (MIC), *Turnera diffusa*, urinary tract infections.

---

## Introduction

Urinary tract infections (UTI) are severe public health problems, affecting around 150 million people each year worldwide (Sharma *et al.*, 2013; Tibyangye *et al.*, 2015). Among the most common causative agents are *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, group B *Streptococcus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus aureus* and *Candida* spp (Flores-Mireles *et al.*, 2015; Lagunas-Rangel, 2018). In Mexico, the most isolated pathogen from urinary infections is *Escherichia coli* (67.8 %), followed by *E. faecalis* (8 %), *K. pneumoniae* (3.4 %) and the yeast *Candida* spp. (2.7 %) (Lagunas-Rangel, 2018). Currently, these pathogens have acquired resistance to common antimicrobials used for their treatment (e.g. ampicillin, amoxicillin and ceftriaxone, among others). Thus, the need to search for new natural alternatives, such as plant-based extracts since they contain multiple chemical compounds, to which bacterial, fungal, protozoal and viral diseases cannot develop resistance simultaneously (Tibyangye *et al.*, 2015).

*Turnera diffusa* Willd. ex. Schult. (Passifloraceae) commonly known as damiana (Arbo, 2000; Szewczyk & Zidorn, 2014) is a small, wild shrub plant from arid and semi-arid regions of South America, Mexico and the United States (Alcaraz-Meléndez *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2007). Two varieties have been documented, *T. diffusa* var. *aphrodisiac* Ward Urb. (Tda) and *T. diffusa* Willd. ex Schult. var. *diffusa* Ward Urb. (Tdd) (Arbo, 2000). This small plant is traditionally used

var. *diffusa* y *Turnera diffusa* var. *aphrodisiaca* contra especies patógenas del tracto urinario, confirmando uno de sus usos medicinales.

---

## PALABRAS CLAVE

---

Actividad antimicrobiana, HPTLC (cromatografía en capa fina de alta resolución), concentración inhibitoria mínima (MIC), *Turnera diffusa*, infecciones del tracto urinario.

---

## Introducción

Las infecciones del tracto urinario (UTI) son un problema severo de salud pública, que afectan a más de 150 millones de personas al año a nivel mundial (Sharma *et al.*, 2013; Tibyangye *et al.*, 2015). Entre los agentes causales más comunes se encuentran *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, grupo B *Streptococcus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus aureus* y *Candida* spp (Flores-Mireles *et al.*, 2015; Lagunas-Rangel, 2018). En México, el patógeno más aislado de las infecciones urinarias es *Escherichia coli* (67.8 %), seguido de *E. faecalis* (8 %), *K. pneumoniae* (3.4 %) y la levadura *Candida* spp. (2.7 %) (Lagunas-Rangel, 2018). Actualmente, estos patógenos han adquirido resistencia a los antimicrobianos comúnmente utilizados para su tratamiento (ampicilina, amoxicilina, ceftriaxona, entre otros). Por ello, la necesidad de buscar nuevas alternativas naturales, como los extractos de plantas, ya que contienen múltiples compuestos químicos, a los cuales, las agentes bacterianos, fúngicos, protozoarios y virales no pueden desarrollar resistencia simultáneamente (Tibyangye *et al.*, 2015).

*Turnera diffusa* Willd. ex. Schult. (Passifloraceae) comúnmente conocida como damiana (Arbo, 2000; Szewczyk & Zidorn, 2014) es un arbustos silvestre de regiones áridas y semiáridas de América del Sur, México y los Estados Unidos (Alcaraz-Meléndez *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2007). Se han documentado dos variedades, *T. diffusa* var. *aphrodisiaca* Ward Urb. (Tda) y *T. diffusa* Willd. ex Schult. var. *diffusa* Urb. (Tdd) (Arbo, 2000). Esta pequeña planta se usa tradicionalmente para el tratamiento de diversas enfermedades, como infecciones del tracto urinario, diabetes mellitus, malaria, diarrea y úlceras pépticas (Chevallier, 1996);

for the treatment of various diseases, including urinary tract infections, diabetes mellitus, malaria, diarrhea and peptic ulcers (Chevallier, 1996; Benson, 2008; FEUM, 2013) although the best known effect is as tonic and stimulant that has become popular as an aphrodisiac (Estrada-Reyes et al., 2016). The main bioactive components of *T. diffusa* include flavonoids, such as gonzalitosin I, apigenin and derived glycosides, luteolin and derived glycosides, cyanoglucoside tetrafilin B, arbutin a phenolic glycoside and the alkaloids damianin and caffeine. Additionally, its essential oil is composed of  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, p-cymene, 1,8-cineol, which are obtained mainly from leaves and stems (Piacente et al., 2002; Kumar & Sharma, 2006; Zhao et al., 2007), the studies do not specify the variety analyzed.

It is known that both varieties have been used in traditional medicine, but to date and to our knowledge, no studies have demonstrated their pharmacognostic properties to correctly identify the two varieties or supported their biological activity as varieties. A few studies have shown the antimicrobial activity of different extracts of *T. diffusa*; however, they have not referred to the variety used since damiana varieties have been used interchangeably. For example, Hernández et al. (2003) demonstrated the antimicrobial activity of the hexanic and ethanolic extracts of damiana (*T. diffusa*) against gastrointestinal pathogens. Therefore, it is imperative to know the biological activities of the varieties of *T. diffusa* to ensure the benefit to consumers. Even though damiana of California (*T. diffusa* Willd. ex Schult. *aphrodisiac* Ward Urb.) is the one with higher demand as a herbal remedy compared to the other variety, no scientific studies are known that confirm its effectiveness yet. Due to the commercial importance of this plant and the lack of control for collecting practices, the government has established some programs to promote its cultivation and avoid deforestation since the wild plant is sold in local markets for medicinal purposes without any safety control (Gamez et al., 2010; Martínez de la Torre, 2013).

As a first step for the identification of the two varieties of damiana, our group has identified leaf morphology and anatomy of both varieties (Báez-Parra et al., 2018). Consequently, the aim of this study was to evaluate the antimicrobial effect of methanolic and hexanic crude extracts of *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. var. *aphrodisiac* Ward Urb. and *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. var. *diffusa* Ward Urb., against pathogens related to urinary tract infections.

Benson, 2008; FEUM, 2013), aunque el efecto más conocido es como tónico y estimulante, por lo que ha adquirido popularidad como afrodisíaco (Estrada-Reyes et al., 2016). Los principales componentes bioactivos de *T. diffusa* incluyen flavonoides, como gonzalitosina I, apigenina y glucósidos derivados, luteolina y glucósidos derivados, cianoglucósido tetrafilina B, arbutina, un glucósido fenólico y los alcaloides damianina y cafeína. Además, su aceite esencial está compuesto de  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, p-cimeno, 1,8-cineol, que se obtienen principalmente de hojas y tallos (Piacente et al., 2002; Kumar & Sharma, 2006; Zhao et al., 2007), no obstante, los estudios no especifican la variedad analizada.

Ambas variedades se han utilizado en la medicina tradicional, pero hasta la fecha y según nuestro conocimiento, ningún estudio ha demostrado sus propiedades farmacognósticas para identificar correctamente las dos variedades o respaldar su actividad biológica como variedades. Algunos estudios han demostrado la actividad antimicrobiana de diferentes extractos de *T. diffusa*; sin embargo, no han especificado cual es la variedad utilizada, ya que las variedades de damiana se han usado indistintamente. Por ejemplo, Hernández et al. (2003) demostraron la actividad antimicrobiana de los extractos hexánicos y etanólicos de damiana (*T. diffusa*) contra patógenos gastrointestinales. Por lo tanto, es imperativo conocer las actividades biológicas de las variedades de *T. diffusa* para asegurar el beneficio a los consumidores. Si bien, la damiana de California (*T. diffusa* Willd. ex Schult. *aphrodisiac* Ward Urb.) tiene mayor demanda como remedio herbal en comparación con la otra variedad, aún no se conocen estudios científicos que confirmen su efectividad. Debido a la importancia comercial de esta planta y la falta de control para las prácticas de recolección, el gobierno ha establecido algunos programas para promover su cultivo y evitar la deforestación, ya que la planta silvestre se vende en mercados locales con fines medicinales sin ningún control de calidad (Gamez et al., 2010; Martínez de la Torre, 2013).

Como primer paso para la identificación de las dos variedades de damiana, nuestro grupo identificó la morfología de la hoja y la anatomía de ambas variedades (Báez-Parra et al., 2018). En continuidad, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto antimicrobiano de los extractos crudos metanólicos y hexánicos de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. var. *aphrodisiac* Ward Urb. y *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. var. *diffusa* Ward Urb., contra patógenos relacionados con infecciones del tracto urinario.

## Material and Methods

### Preparation of the strains

Positive controls of *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Candida albicans* were used. The microorganisms were obtained from the Mexican National Laboratory for Food Safety Research and activated in culture medium of Trypticase Soy Broth (TSB) (BD Bioxon, Mexico) incubated at 37 °C for 24 h; subsequently, they were streaked on Trypticase Soy Agar (TSA) (BD Bioxon, Mexico) and incubated at 37 °C for 24 h (Microbank, Pro Lab Diagnostics, USA). Finally, the colonies obtained were used to prepare a suspension of  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL corresponding to McFarland scale standard 0.5 (CLSI, 2017).

### Drugs and reagents

Reagents naringin, apigenin, chlorogenic acid, diosgenin, methanol, hexane, 2-aminoethyl diphenyl borate, anisaldehyde and dimethyl superoxide were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); ethyl acetate, glacial acetic, formic, and sulfuric acids from J.T. Baker (Xalostoc, State of Mexico, Mexico); and polyethylene glycol 4000 from Alfa Aesar (Tewksbury, MA, USA).

### Plant collection

Leaves of *T. diffusa* Willd ex Schult. var. *aphrodisiaca* Ward Urb. and *T. diffusa* Willd. ex Schult. var. *diffusa* were collected in the stage of flowering and fruiting in Imala, Culiacán, Sinaloa, Mexico (24° 51' 35" N; 107° 13' 1" W; 92 masl) from 2016-2017. The varieties were identified at the Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS) in Culiacán, Sinaloa and Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) La Paz, B.C.S. Mexico. Samples with access numbers HCIB30319 for Tdd and HCIB300069 for Tda were deposited in CIBNOR herbarium.

### Extract preparation

The leaves, previously washed with tap water and dried in the shade for seven days, were pulverized and macerated with methanol or hexane, in proportion 1:10, under constant agitation of 175 rpm (Shaker DOS-10L, SKY LINE, ELMI, CA, USA) for 24 h. Then, the extracts were filtered and concentrated under vacuum in a rotary

## Material y Métodos

### Preparación de las cepas

Se utilizaron controles positivos de *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Candida albicans*. Los microorganismos se obtuvieron del Laboratorio Nacional para la Investigación en Inocuidad Alimentaria y se activaron en medio de cultivo de caldo de soya tripticaseína (TSB) (BD Bioxon, México) e incubados a 37 °C durante 24 h; posteriormente, se estiraron en agar soya tripticaseína (TSA) (BD Bioxon, México) y se incubaron a 37 °C durante 24 h (Microbank, Pro Lab Diagnostics, EE. UU.). Finalmente, las colonias obtenidas se utilizaron para preparar una suspensión de  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL correspondiente al estándar de escala de McFarland 0.5 (CLSI, 2017).

### Reactivos

Los reactivos naringina, apigenina, ácido clorogénico, diosgenina, metanol, hexano, 2-aminoetil difenil borato, anisaldehído y superóxido de dimetilo se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.); acetato de etilo, ácido acético glacial, ácido fórmico y sulfúrico de J.T. Baker (Xalostoc, Estado de México, México); y polietilenglicol 4000 de Alfa Aesar (Tewksbury, MA, EE. UU.).

### Colección de plantas

Se recolectaron hojas de *T. diffusa* Willd ex Schult. var. *aphrodisiaca* Ward Urb. y *T. diffusa* Willd. ex Schult. var. *diffusa*, en etapa de floración y fructificación en Imala, Culiacán, Sinaloa, México (24° 51' 35" N; 107° 13' 1" W; 92 masl) del 2016-2017. Las variedades se identificaron en la Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS) en Culiacán, Sinaloa y en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) La Paz, B.C.S. México. Las muestras con los números de accesión HCIB30319 para Tdd y HCIB300069 para Tda que se encuentran depositados en el herbario del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR).

### Preparación de extractos

Las hojas, previamente lavadas con agua del grifo y posteriormente deshidratadas a la sombra durante siete días, se pulverizaron y se maceraron con metanol o hexano, en proporción 1:10, bajo agitación constante de 175 rpm (Shaker DOS-10L, SKY LINE, ELMI, CA, USA) durante 24 h. Luego, los extractos se filtraron y se concentraron al

evaporator (BUCHI, CH) at 335 mbar, 45 °C and 35 rpm, and at 360 mbar, 40 °C and 35 rpm for the methanolic and hexanic extract, respectively. The concentrated extracts were stored at 4 °C until use.

#### High-performance thin-layer chromatography

The HPTLC analysis was performed based on the methodology proposed by Reich (2012). Damiana methanolic and hexanic extracts (5 µL of a 1:10 solution in methanol or hexane, respectively) and standard solutions naringin, chlorogenic acid, apigenin and diosgenin (4 µL of a 1:1 solution in methanol or hexane, respectively) were loaded as 10-mm band length and 15-mm distance between each band in a 10 x 10-cm glass plates HPTLC 60F<sub>254</sub> (CAMAG, Merck, DE) using a semi-automatic applicator Linomat V (Camag, Muttenz, CH) which was controlled with VisionCATS 2.4 software. The plate was developed in a double channel chamber (CAMAG, Merck, DE) with the respective mobile phase up to 80 mm. The FEUM (2013) methodology was followed by separating the phenolic compounds from the methanolic extract, which consisted of developing the plate with the mobile phase: ethyl acetate, acetic acid, formic acid and water (100:11:11:27) with a previous saturation of 20 min. The developed plate was let to dry at room temperature and heated at 100 °C for three min. The bands were derivatized spraying with 2-aminoethyl diphenyl borate 1 % in methanol (NP) and with polyethylene glycol 4000 5 % in ethanol (PEG). For the hexanic extract, the mobile phase used was hexane, acetic acid (7.2: 2.9) and the plate was developed under the same conditions as the methanolic extract, but derivatization was performed with anisaldehyde in concentrated sulfuric acid (170 mL of cold methanol, 20 mL of glacial acetic acid, 10 mL sulfuric acid, and 1 mL of anisaldehyde) (Sophia *et al.*, 2011). The bands obtained on the plate were observed on UV light at 254 and 366 nm (CAMAG, Merck, DE) and detected with a TLC scanner (CAMAG, Merck, DE) at 254 and 366 nm for the methanolic extract, and 500 nm for the hexanic extract (Sophia *et al.*, 2011; Seasotiya *et al.*, 2014).

#### Antimicrobial susceptibility assays

##### Extract preparation

The extracts were prepared following Akujobi *et al.* (2004) and Alaribe *et al.* (2011) methodologies. The extract concentrations used were 5, 10, 15, 20 and 30 mg/mL for both varieties. As for the methanolic extract,

vacío en un evaporador rotatorio (BUCHI, CH) a 335 mbar, 45 °C y 35 rpm, para el extracto metanólico, a 360 mbar, 40 °C y 35 rpm para el extracto hexánico. Los extractos concentrados se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

#### Cromatografía en capa fina de alta resolución

El análisis de HPTLC se realizó según la metodología propuesta por Reich (2012). Para lo cual, se cargaron los extractos metanólicos y hexánicos de damiana (5 µL de una solución 1:10 en metanol o hexano, respectivamente) y las soluciones estándar naringina, ácido clorogénico, apigenina y diosgenina (4 µL de una solución 1: 1 en metanol o hexano, respectivamente) con una longitud de banda de 10 mm y distancia de 15 mm entre cada banda, en placas de vidrio de 10 x 10 cm HPTLC 60F<sub>254</sub> (CAMAG, Merck, DE), utilizando el aplicador semiautomático Linomat V (Camag, Muttenz, CH), y analizando los resultados con el software VisionCATS 2.4. La placa se desarrolló en una cámara de doble canal (CAMAG, Merck, DE) con la respectiva fase móvil hasta 80 mm. Se siguió la metodología de la FEUM (2013) para la separación de los compuestos fenólicos del extracto metanólico, que consistió en desarrollar la placa con la fase móvil: acetato de etilo, ácido acético, ácido fórmico y agua (100:11:11:27) con saturación previa de 20 min. La placa revelada se dejó secar a temperatura ambiente y se calentó a 100 °C durante tres minutos. Las bandas se derivatizaron con 2-aminoetil difenil borato al 1 % en metanol (NP) y con polietilenglicol 4000 al 5 % en etanol (PEG). Para el extracto hexánico, la fase móvil utilizada fue hexano, ácido acético (7.2: 2.9) y la placa se desarrolló bajo las mismas condiciones que el extracto metanólico, la derivatización se realizó con anisaldehído en ácido sulfúrico concentrado (170 mL de metanol frío, 20 mL de ácido acético glacial, 10 mL de ácido sulfúrico y 1 mL de anisaldehído) (Sophia *et al.*, 2011). Las bandas obtenidas en la placa se observaron con luz UV a 254 y 366 nm (CAMAG, Merck, DE) y se detectaron con un escáner de TLC (CAMAG, Merck, DE) a 254 y 366 nm para el extracto metanólico y 500 nm para el extracto hexánico (Sophia *et al.*, 2011; Seasotiya *et al.*, 2014).

#### Análisis de susceptibilidad antimicrobiana

##### Preparación de extractos

Los extractos se prepararon siguiendo las metodologías de Akujobi *et al.* (2004) y Alaribe *et al.* (2011). Las concentraciones de extracto utilizadas fueron 5, 10, 15, 20 y 30 mg/mL para ambas variedades. En cuanto al extracto metanólico, se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) al 30 %,

it was dissolved in 30 % dimethylsulfoxide (DMSO) while the hexanic extract was dissolved in 30 % DMSO with 5 % Tween 80.

#### Disc diffusion method

The initial inoculum of each microorganism tested was uniformly inoculated with a sterile swab on the surface of Mueller-Hinton agar plates (BD Bioxon, MX). Once the plates were inoculated, a 1-cm diameter filter paper disc containing 0.5, 1, 1.5, 2 and 3 mg of extract, was placed independently on the agar. Ciprofloxacin at 5 µg was used as positive control for the bacterial test and nystatin for the yeast test. DMSO 30 % and DMSO 30 % with Tween 80 at 5 % were used as negative controls for the methanolic and hexanic extract, respectively. The plates were incubated at 37 °C for 24 h. The antimicrobial activity was determined by measuring the inhibition zone diameter (Ahmad & Beg, 2001; CLSI, 2017). For each evaluation, five repetitions were made.

#### Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC)

The MIC was determined by the microdilution assay, using 96-well microplates, inoculated with 10 µL of microbial suspension  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL, 140 µL of culture medium, and 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3 and 5 mg respectively. Absorbance was measured at 600 nm using a SINERGY HT microplate spectrophotometer (BioTek Winooski, VT, USA) at 37 °C at the beginning of the experiment and at 24 h post-incubation. The MIC was determined at the lowest concentration of the extract at which no growth was observed. Based on the MIC, MBC was determined, by streaking in selective media for each microorganism tested: Hektoen enteric agar (BD Difco) for *Klebsiella pneumoniae*, TSA for *Enterococcus faecalis*, Baird-Parker agar (BD Difco) for *Staphylococcus aureus*, ECC (CHROMagar) for *Escherichia coli* and TSA for *Candida albicans*. All plates were finally incubated at 37 °C for 24 h, and the presence of growth was observed. MBC was determined as the minimum concentration of the extract capable of killing the analyzed microorganism. The MIC and MBC assays were performed in triplicate with two repetitions for each assay (Cha *et al.*, 2016).

#### Statistical analysis

The analysis of variance (ANOVA) was used to compare antimicrobial activity of the extracts and Tukey's

mientras que el extracto hexánico se disolvió en DMSO al 30 % con Tween 80 al 5 %.

#### Método de difusión del disco

El inóculo inicial de cada microorganismo analizado, se inoculó uniformemente con un hisopo estéril en la superficie de las placas de agar Mueller-Hinton (BD Bioxon, MX). Una vez que se inocularon las placas, se colocaron de manera independiente discos de papel filtro de 1 cm de diámetro con 0.5, 1, 1.5, 2 y 3 mg de extracto, en el agar. Se utilizaron 5 µg ciprofloxacino como control positivo para el ensayo bacteriano y nistatina para el ensayo con la levadura. El DMSO al 30 % y el DMSO al 30 % con Tween 80 al 5 % se utilizaron como controles negativos para el extracto metanólico y hexánico, respectivamente. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h. La actividad antimicrobiana se determinó midiendo el diámetro de la zona de inhibición (Ahmad & Beg, 2001; CLSI, 2017). Para cada evaluación se realizaron cinco repeticiones.

#### Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y Concentración Mínima Bactericida (MBC)

La MIC se determinó mediante el ensayo de microdilución, utilizando microplacas de 96 pocillos, inoculadas con 10 µL de suspensión microbiana  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL, 140 µL de medio de cultivo y 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2 y 3 y 5 mg de extracto metanólico o hexánico, respectivamente. La absorbancia se midió a 600 nm utilizando un espectrofotómetro de microplacas SINERGY HT (BioTek Winooski, VT, EE. UU.) al inicio del experimento y 24 h después de la incubación a 37 °C. La MIC se determinó como la concentración más baja del extracto a la cual no se observó crecimiento microbiano. A partir de la MIC, se determinó la MBC, mediante estriado en medios selectivos para cada microorganismo analizado: Agar entérico de Hektoen (BD Difco) para *Klebsiella pneumoniae*, TSA para *Enterococcus faecalis*, agar Baird-Parker (BD Difco) para *Staphylococcus aureus*, ECC (CHROMagar) para *Escherichia coli* y TSA para *Candida albicans*. Todas las placas se incubaron finalmente a 37 °C durante 24 h, y se observó la presencia del crecimiento. La MBC se determinó como la concentración mínima del extracto capaz de eliminar al microorganismo analizado. Los ensayos MIC y MBC se realizaron por triplicado con dos repeticiones para cada ensayo (Cha *et al.*, 2016).

#### Análisis estadístico

Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) para comparar la actividad antimicrobiana de los extractos y la prueba de Tukey, para determinar diferencias

test to determine significant differences with a 95 % level of significance with Minitab software version 17.

significativas, con un nivel de significancia del 95 % con la versión 17 del software Minitab.

## Results and Discussion

### Chromatographic profile of methanolic extract

Crude extracts were used for the analyses. In Figure 1, profiles of the two varieties are shown, before (a) and after (b) derivatizing the metabolites with the NP-PEG developer. After derivatization, four yellow bands were observed in both varieties with greater intensity and definition in Tda variety; a yellow to brown band was also observed at daylight. At 254 nm, eight and seven yellow bands were observed in Tda and Tdd, respectively. At 366 nm, the methanolic extract chromatograms of *T. diffusa* leaves of both varieties revealed yellow to orange band colorations, these results confirmed the presence of flavonoids, which were in accordance to the FEUM (2013).

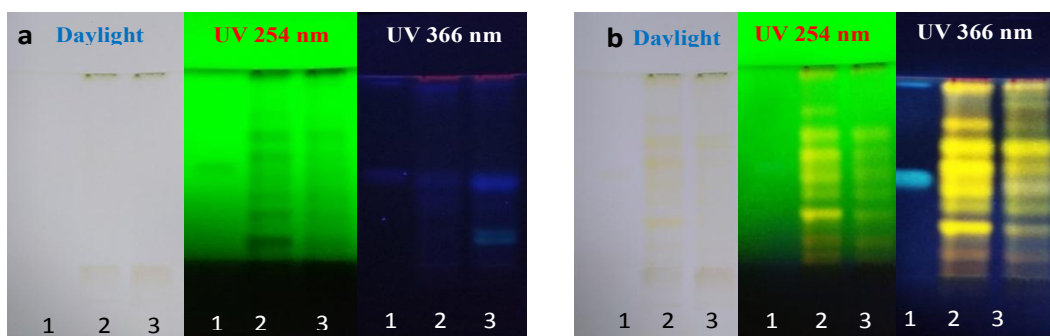
The HPTLC chromatograms generated for the standards and the methanolic extract of Tda and Tdd are shown in Figure 2. The 366 nm chromatogram in Tda showed ten peaks (2A) while that of Tdd showed eight (2B). These peaks may represent groups of metabolites, since crude extracts were used.

## Resultados y Discusión

### Perfil cromatográfico del extracto metanólico

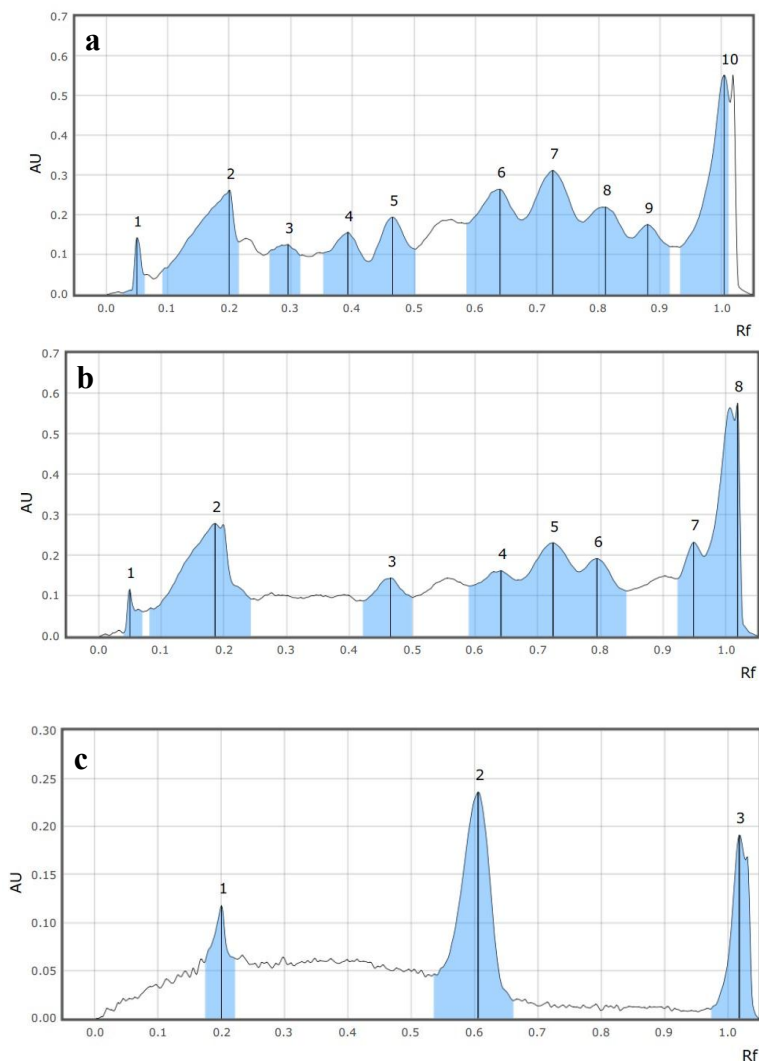
Se utilizaron extractos crudos para los análisis. En la Figura 1, se muestran los perfiles de las dos variedades, antes (a) y después (b) de la derivatización de los metabolitos con el revelador NP-PEG. Después de la derivatización, se observaron cuatro bandas amarillas en ambas variedades con mayor intensidad y definición en la variedad Tda; también se observó una banda amarilla a marrón a la luz del día. A 254 nm, se observaron ocho y siete bandas amarillas en Tda y Tdd, respectivamente. A 366 nm, los cromatogramas del extracto metanólico de las hojas de *T. diffusa* de ambas variedades revelaron coloraciones de bandas de amarillo a naranja; estos resultados confirmaron la presencia de flavonoides, de acuerdo con la FEUM (2013).

Los cromatogramas de HPTLC generados para los estándares y el extracto metanólico de Tda y Tdd se muestran en la Figura 2. El cromatograma de 366 nm en Tda mostró diez picos (2A) mientras que el de Tdd mostró ocho (2B). Estos picos pueden representar grupos de metabolitos, ya que se utilizaron extractos crudos.



**Figure 1. Chromatographic profile of Tda and Tdd methanol extract. Line 1: standards naringin, chlorogenic acid and apigenin (1 mg/mL), line 2: Tda and line 3: Tdd. a) Plates before derivatizing, b) Plates after derivatizing.**

**Figura 1. Perfil cromatográfico del extracto metanólico de Tda y Tdd. Línea 1: estándares de naringina, ácido clorogénico y apigenina (1 mg/mL), línea 2: Tda y línea 3: Tdd. a) Placas antes de la derivatización, b) Placas después de la derivatización.**



**Figure 2. a) Methanolic chromatogram of Tda by HPTLC b) Methanolic chromatogram of Tdd. c) Chromatogram of standards, peak 1: naringin, peak 2: chlorogenic acid and peak 3: apigenin.**

**Figura 2. a) Cromatograma del extracto metanólico de Tda por HPTLC b) Cromatograma del extracto metanólico de Tdd. c) Cromatograma de estándares, pico 1: naringina, pico 2: ácido clorogénico y pico 3: apigenina.**

#### Chromatographic profile of the hexanic extract

In Figure 3, profiles of the hexanic extract of the two varieties are shown, before (a) and after (b) deriving the metabolites with anisaldehyde in sulfuric acid, revealed bands from blue to violet colorations (Figure 3b), which corresponded to terpenoid natural

#### Perfil cromatográfico del extracto hexánico

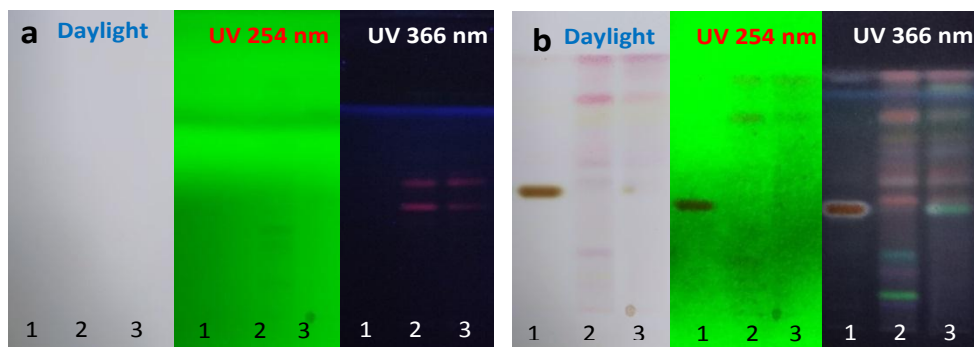
En la Figura 3 se muestran los perfiles del extracto hexánico de las dos variedades, antes (a) y después (b) de la derivación de los metabolitos con anisaldehído en ácido sulfúrico, se observaron bandas de coloraciones azules a violetas (Figura 3b), que corresponden a metabolitos de naturaleza terpenoide



**Table 1.**  
**Peaks height, areas and times retention (Rf), of the chromatograms**  
**of the methanolic extracts of Tda and Tdd and standards.**

**Tabla 1.**  
**Altura de picos, áreas y tiempos de retención (Rf) de los cromatogramas**  
**de los extractos metanólicos de Tda y Tdd y los estándares.**

<i>Turnera diffusa</i> var. <i>aphrodisiaca</i>				<i>Turnera diffusa</i> var. <i>diffusa</i>				Standards			
Peak	Rf	H	% area	Peak	Rf	H	% área	Peak	Rf	H	% area
1	0.050	0.1428	5.94	1	0.050	0.1158	6.00	1	0.200	0.1176	21.62
2	0.200	0.2626	10.92	2	0.186	0.2789	14.44	2	0.606	0.2357	43.31
3	0.296	0.1252	5.21	3	0.466	0.1435	7.43	3	1.019	0.1908	35.07
4	0.393	0.1563	6.50	4	0.641	0.1620	8.39				
5	0.466	0.1943	8.08	5	0.724	0.2309	11.96				
6	0.640	0.2647	11.00	6	0.794	0.1922	9.95				
7	0.726	0.3120	12.97	7	0.949	0.2321	12.02				
8	0.811	0.2193	9.12	8	1.019	0.5759	29.82				
9	0.880	0.1757	7.30								
10	1.004	0.5521	22.96								



**Figure 3.** Chromatographic profile of Tda and Tdd hexanic extract. Line 1: standard diosgenin (1 mg/mL), line 2: Tda and line 3: Tdd. a) Plates before derivatizing, b) Plates after derivatizing.

**Figura 3.** Perfil cromatográfico del extracto hexánico de Tda y Tdd. Línea 1: diosgenina estándar (1 mg/mL), línea 2: Tda y línea 3: Tdd. a) Placas antes de la derivatización, b) Placas después de la derivatización.

metabolites (Sophia *et al.*, 2011). The chromatograms obtained by HPTLC of the hexanic extracts revealed nine peaks for the two varieties (Figure 4) and differences in retention by the stationary phase, shown in Table 2.

(Sophia *et al.*, 2011). Los cromatogramas obtenidos por HPTLC de los extractos hexánicos revelaron nueve picos para las dos variedades (Figura 4) y las diferencias en la retención por la fase estacionaria se muestran en la Tabla 2.

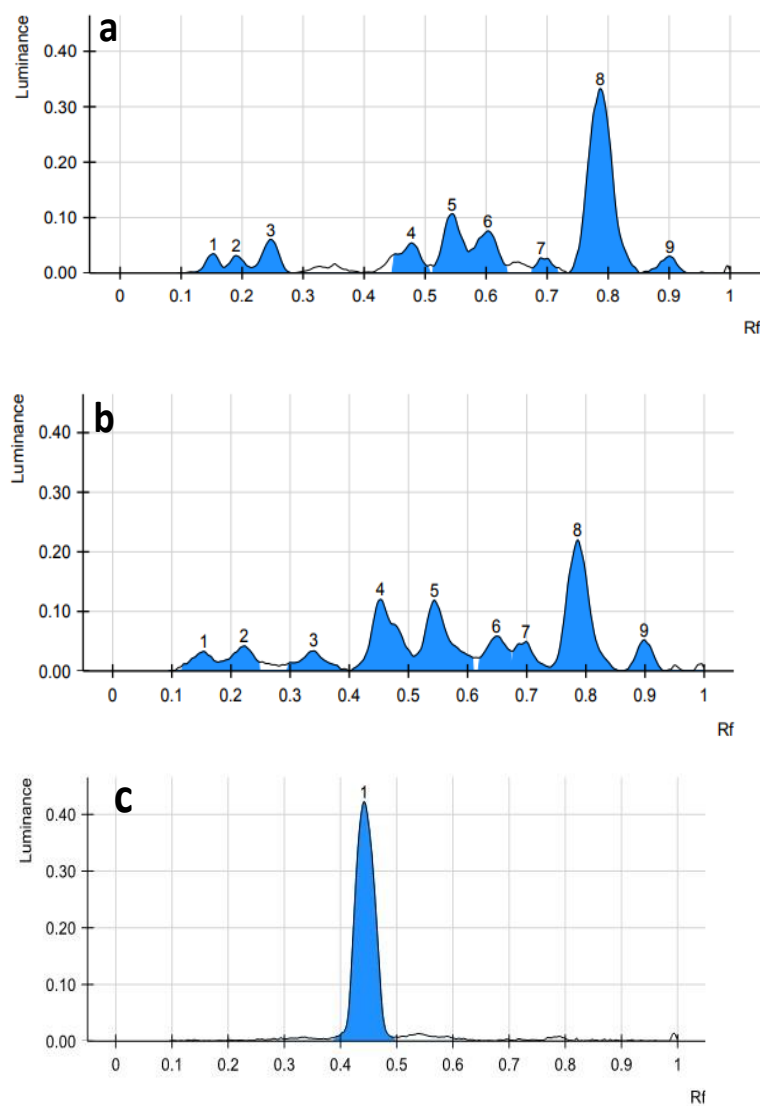


Figure 4. a) Hexanic chromatogram of Tda by HPTLC, b) Hexanic chromatogram of Tdd, c) Chromatogram of standard diosgenin.

Figura 4. a) Cromatograma hexánico de Tda por HPTLC, b) Cromatograma hexánico de Tdd, c) Cromatograma del estándar diosgenina.

It is well known that *damiana* has sesquiterpenes (caryophyllene), triterpenes (squalene and sisosterol), and polyterpenes (ficaprenol) (Zhao *et al.*, 2007), whose compounds correspond to the chemical groups seen in this study.

Se conoce que la *damiana* contiene sesquiterpenos (cariofileno), triterpenos (escualeno y sisosterol) y politerpenos (ficaprenol) (Zhao *et al.*, 2007), cuyos compuestos corresponden a los grupos de metabolitos observados en este estudio.

**Table 2.**  
**Peaks height, areas and times retention (Rf), of the chromatograms of the hexanic extracts of Tda and Tdd and the diosgenin standard.**

**Tabla 2.**  
**Altura de picos, áreas y tiempos de retención (Rf) de los cromatogramas de los extractos hexánicos de Tda y Tdd y el estándar de diosgenina.**

<i>Turnera diffusa</i> var. <i>diffusa</i>				<i>Turnera diffusa</i> var. <i>aphrodisiaca</i>				Standard			
Peak	Rf	H	% de area	Peak	Rf	H	% de area	Peak	Rf	H	% area
1	0.154	0.0328	4.51	1	0.153	0.0347	4.61	1	0.483	0.6093	100.00
2	0.222	0.0419	5.77	2	0.19	0.0314	4.17				
3	0.34	0.0338	4.65	3	0.247	0.0607	8.05				
4	0.453	0.12	16.52	4	0.478	0.0543	7.2				
5	0.544	0.1185	16.31	5	0.544	0.1071	14.2				
6	0.649	0.0585	8.05	6	0.603	0.0757	10.05				
7	0.699	0.049	6.74	7	0.69	0.0271	3.6				
8	0.786	0.2199	30.27	8	0.788	0.3326	44.11				
9	0.899	0.0521	7.17	9	0.901	0.0303	4.02				

#### Microbial susceptibility

Table 3 shows the results obtained from the antibacterial and antifungal activity evaluation by disc diffusion method of the crude methanolic and hexanic extracts of Tda and Tdd against *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* and *C. albicans*. When the results were compared with control (ciprofloxacin for bacteria and nystatin for yeast), the methanolic and hexanic extracts showed similar or inferior capacity to the positive control. The 3 mg of the methanolic extract of Tdd showed an inhibition halo of 14.49 mm in the test against *S. aureus*, showing the best activity but no significant differences within the concentrations of 2.5, 2.0 and 1.5 mg of the same extract. The hexanic extract of Tdd was the only one that showed activity against *E. coli*, without significant differences between 1-3 mg and no activity against *E. faecalis* while the Tda and Tdd methanolic extract at 2.5 and 3 mg had the best results on this bacterium. As for *K. pneumoniae*, all the extracts showed inhibitory activity, but they did not show statistically significant differences when compared with the control group. Only the hexanic extracts of the two varieties (Tda and Tdd) show antimicrobial activity at 3 mg against *C. albicans*.

All the statistical analyses had a square R of 98.00-99.80, with a 95 % level of significance.

#### Susceptibilidad microbiana

En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos de la evaluación de la actividad antibacteriana y antifúngica mediante el método de difusión en disco, de los extractos metanólicos y hexánicos crudos de Tda y Tdd contra *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* y *C. albicans*. Cuando los resultados se compararon con el control (ciprofloxacino para bacterias y nistatina para levaduras), los extractos metanólicos y hexánicos mostraron una capacidad estadísticamente inferior al control positivo. Los 3 mg del extracto metanólico de Tdd mostraron un halo de inhibición de 14.49 mm en la prueba contra *S. aureus*, mostrando la mejor actividad sin diferencias estadísticamente significativas con 2.5, 2.0 y 1.5 mg del mismo extracto. El extracto hexánico de Tdd fue el único que mostró actividad contra *E. coli*, sin diferencias significativas entre 1-3 mg y sin actividad contra *E. faecalis*, mientras que el extracto metanólico de Tda y Tdd a 2.5 y 3 mg tuvo los mejores resultados en esta bacteria. En cuanto a la *K. pneumoniae*, todos los extractos mostraron actividad inhibitoria, pero no mostraron diferencias estadísticamente significativas. Solo los extractos hexánicos de las dos variedades (Tda y Tdd) a 3 mg muestran actividad antimicrobiana contra *C. albicans*.

Todos los análisis estadísticos presentaron una R cuadrada de 98.00-99.80, con un nivel de significación del 95 %.

**Table 3.**  
**Antimicrobial effect of methanolic and hexanic extracts of Tda and Tdd.**

**Tabla 3.**  
**Efecto antimicrobiano de los extractos metanólicos y hexánicos de Tda y Tdd por el método de difusión en disco.**

Variety	Extract	mg	Inhibition zone (mm)				
			<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Turnera diffusa</i> var. <i>diffusa</i>	Methanolic	1	12.56 <sup>c,d,e</sup>	NA	10.53 <sup>d,e</sup>	10.28 <sup>c</sup>	NA
		1.5	14.07 <sup>b,c,d</sup>	NA	11.15 <sup>c,d</sup>	10.50 <sup>c</sup>	NA
		2	14.24 <sup>b,c</sup>	NA	11.34 <sup>c</sup>	10.86 <sup>c</sup>	NA
		2.5	14.49 <sup>b,c</sup>	NA	11.82 <sup>b,c</sup>	10.96 <sup>c</sup>	NA
		3	14.89 <sup>b</sup>	NA	12.15 <sup>b</sup>	11.01 <sup>c</sup>	NA
	Hexanic	1	10.38 <sup>f</sup>	10.64 <sup>b</sup>	NA	10.18 <sup>c</sup>	NA
		1.5	10.71 <sup>e,f</sup>	10.74 <sup>b</sup>	NA	10.19 <sup>c</sup>	NA
		2	10.82 <sup>e,f</sup>	10.66 <sup>b</sup>	NA	10.24 <sup>c</sup>	NA
		2.5	11.28 <sup>e,f</sup>	10.64 <sup>b</sup>	NA	10.22 <sup>c</sup>	NA
		3	11.74 <sup>e,f</sup>	10.76 <sup>b</sup>	NA	10.24 <sup>c</sup>	11.72 <sup>b</sup>
<i>Turnera diffusa</i> var. <i>aphrodisiaca</i>	Methanolic	1	10.34 <sup>f</sup>	NA	10.08 <sup>e</sup>	10.24 <sup>c</sup>	NA
		1.5	10.71 <sup>e,f</sup>	NA	10.10 <sup>e</sup>	10.29 <sup>c</sup>	NA
		2	11.45 <sup>e,f</sup>	NA	10.11 <sup>e</sup>	10.40 <sup>c</sup>	NA
		2.5	12.07 <sup>d,e,f</sup>	NA	10.31 <sup>e</sup>	10.42 <sup>c</sup>	NA
		3	12.49 <sup>c,d,e</sup>	NA	10.43 <sup>d,e</sup>	10.45 <sup>c</sup>	NA
	Hexanic	1	NA	NA	NA	10.11 <sup>c</sup>	NA
		1.5	NA	NA	NA	10.36 <sup>c</sup>	NA
		2	NA	NA	NA	10.20 <sup>c</sup>	NA
		2.5	NA	NA	NA	10.20 <sup>c</sup>	NA
		3	NA	NA	NA	10.30 <sup>c</sup>	12.09 <sup>b</sup>
Control	Antibiotic	5µg	29.77 <sup>a</sup>	31.42 <sup>a</sup>	22.24 <sup>a</sup>	40.17 <sup>a</sup>	19.38 <sup>a</sup>

\*Different letters mean significant differences between treatments. Level of significance with the Tuckey test 95 %, n=5, NA: no activity.

\*Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos. Nivel de confianza para la prueba de Tukey, 95 %, n = 5, NA: Sin actividad.

Although some extracts showed no inhibitory activity in the antimicrobial activity test by the disc diffusion method, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) assays were performed for all the extracts. For *C. albicans*, where only the highest concentrations of hexanic extracts showed activity, the MIC and MBC were found at 0.05 mg for the methanolic and hexanic extracts of the two varieties. As for *E. coli* and *K. pneumoniae*, they were recorded from 0.05 to 0.1 mg. The MIC was found from 2-3 mg for the methanolic extract with respect to *S. aureus* and *E. faecalis*. On the other hand, the hexanic

Si bien, algunos extractos no mostraron actividad inhibitoria en la prueba de actividad antimicrobiana por el método de difusión en disco, se continuó con los ensayos de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y Concentración Mínima Bactericida (MBC) para todos los extractos. Para *C. albicans*, donde solo las concentraciones más altas de extractos hexánicos mostraron actividad en el método de difusión en disco, la MIC y el MBC se encontraron a 0.05 mg tanto para los extractos metanólicos como hexánicos de las dos variedades. En cuanto a *E. coli* y *K. pneumoniae*, se registraron de 0.05 a 0.1 mg. La MIC se encontró a partir de 2-3 mg para el extracto metanólico con respecto a *S. aureus* y *E. faecalis*; por otro lado, el extracto

**Table 4.**  
Minimum inhibition concentration and minimum bactericidal concentration  
of methanolic and hexanic extracts of Tda and Tdd.

**Tabla 4.**  
Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida de los extractos  
metanólicos y hexánicos de Tda y Tdd.

Microorganism	MIC/MBC (mg/mL)			
	<i>Turnera diffusa</i> var. <i>diffusa</i>		<i>Turnera diffusa</i> var. <i>aphrodisiaca</i>	
	Methanolic	Hexanic	Methanolic	Hexanic
<i>Staphylococcus aureus</i>	3/3	0.5/3	2/2	0.5/3
<i>Escherichia coli</i>	0.1/0.1	0.05/0.1	0.05/0.1	0.05/0.1
<i>Enterococcus faecalis</i>	3/3	1.5/NA	3/3	1.5/NA
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.05/0.1	0.05/0.05	0.05/0.1	0.05/0.05
<i>Candida albicans</i>	0.05/0.05	0.05/0.05	0.05/0.05	0.05/0.05

\*NA: No activity.

\*NA: Sin actividad.

extract of the two varieties for *S. aureus* and *E. faecalis* was found at 0.5 mg and 1.5 mg, respectively. Also, the MBC for *Enterococcus faecalis* was not observed for the hexanic extracts even though the highest concentration of 5 mg was used (Data not shown) (Table 4).

The *in-vitro* antimicrobial evaluation of the Tda and Tdd methanolic extracts showed that both were effective against *E. faecalis*, *K. pneumoniae* and *S. aureus*, but the Tdd methanolic extract was statistically more effective (Tabla 3). Although, the Tda and Tdd methanolic extracts showed no visible activity against *C. albicans* using the disc diffusion method, the extracts of both varieties showed antimicrobial activity at 0.05 mg when the microdilution method was performed. It could have been related with the way the metabolites were diffused on the agar by using the diffusion method, which might not have been as homogenous as the microdilution method, since the metabolites are placed in a homogenous aqueous medium.

On the other hand, the hexanic extracts of both varieties showed inhibition against *K. pneumoniae* and *C. albicans* at a concentration of 3 mg, but no significant differences among them were observed (Table 4). *Escherichia coli* and *S. aureus* showed halos of inhibition from 10.64-12.09 mm only in the Tdd hexanic extract using the diffusion method; however, both hexanic extracts of Tda and Tdd showed more efficacy with the microdilution

hexánico de las dos variedades para *S. aureus* y *E. faecalis* se encontró a 0.5 mg y 1.5 mg, respectivamente. Además, no se detectó la MBC para *E. faecalis* de los extractos hexánicos, donde, la cantidad más alta analizada fue 5 mg de extracto (Datos no mostrados) (Tabla 4).

La evaluación antimicrobiana *in vitro* de los extractos metanólicos de Tda y Tdd mostró que ambos inhibieron el desarrollo de *E. faecalis*, *K. pneumoniae* y *S. aureus*, además, el extracto metanólico de Tdd fue mejor estadísticamente (Tabla 3). Aunque los extractos metanólicos de Tda y Tdd no mostraron actividad visible contra *C. albicans* utilizando el método de difusión en disco, los extractos de ambas variedades mostraron actividad antimicrobiana a 0.05 mg cuando se analizó por el método de microdilución. Lo anterior, puede deberse a la forma en la que se difundieron los metabolitos en el agar, utilizando el método de difusión, la cual podría no ser tan homogénea como por método de microdilución, ya que en este los metabolitos se colocan en un medio acuoso homogéneo.

Por otro lado, los extractos hexánicos de ambas variedades mostraron inhibición contra *K. pneumoniae* y *C. albicans* a una concentración de 3 mg, pero no se observaron diferencias significativas entre ellos (Tabla 3). *E. coli* y *S. aureus* mostraron halos de inhibición de 10.64-12.09 mm solo en el extracto hexánico de Tdd utilizando el método de difusión; sin embargo, ambos extractos hexánicos de Tda y Tdd mostraron más eficacia con el método de microdilución.

method. Moreover, lower concentrations of hexanic extracts than methanolic extract were needed to have a higher efficacy on all the microorganisms tested, except for *E. faecalis*. The antimicrobial activity of methanolic extracts has been demonstrated against Gram-positive and Gram-negative bacteria where flavonoids were responsible for the activity (Taleb-contini *et al.*, 2003). The metabolites present in the methanolic extract are mainly flavonoids (Figure 1), for which their antimicrobial activity has been demonstrated both in Gram-positive and Gram-negative bacteria; furthermore, a structure-activity relationship has been observed on flavonoids, of which the most active are those that have dihydroxy groups at C3' and C4' positions, the position C6' unsubstituted and C7' with a hydroxy (Taleb-contini *et al.*, 2003). In addition, apigenin, another flavonoid present in *damiana* (Cushnie & Lamb, 2005; Nayaka *et al.*, 2014; Cha *et al.*, 2016) has also been proven to have antimicrobial activity; thus, our study has demonstrated that the flavonoids found in both Tda and Tdd varieties were responsible for the antimicrobial activity against the urinary tract pathogens analyzed.

The methanolic extracts of our study also showed antimicrobial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria showing maximum activity against *E. coli* and *K. pneumonia* according to the MIC obtained. In relation to the statistical analysis, the methanolic extracts of Tdd had significant differences compared to those of Tda. These differences might have been related with the type of metabolites present in each extract, as it was observed in the chromatographic analysis; the extracts had differences in peaks 3 and 4 of Tda, which were not found in Tdd, and peak 7 of Tdd that was not shared with Tda (Figure 2, Table 1). In addition, at 366 nm without derivatization, the chromatogram showed two bands (blue to green color) that were unique for Tdd. Thus, beside the flavonoids present they may have other metabolites that are causing the maximum activity. However, more studies are needed to make this assumption.

Finally, the antimicrobial activity of the metabolite terpenes and terpenoids have also been evaluated, demonstrating that terpenes have better activity when they are in a crude extract than individually isolated (Nazzaro *et al.*, 2013). Thus, the crude oil of the hexanic extracts in this study might have shown this activity on all the microorganisms evaluated, except for *E. faecalis*.

Asimismo, se necesitaron concentraciones más bajas de extractos hexánicos que de extracto metanólico para tener una mayor eficacia en todos los microorganismos probados, excepto en *E. faecalis*. La actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos se ha demostrado en otros estudios, contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas donde los flavonoides eran responsables de esta actividad (Taleb-contini *et al.*, 2003) además, se ha observado una relación estructura-actividad en los flavonoides, de los cuales los más activos son aquellos que contienen grupos dihidroxilo en las posiciones C3' y C4', la posición C6' no sustituida y C7' con un grupo hidroxilo (Taleb-contini *et al.*, 2003). Los metabolitos presentes en el extracto metanólico de las variedades de *damiana* son principalmente flavonoides (Figura 1). Incluso, la apigenina, un flavonoide presente en la *damiana* (Cushnie & Lamb, 2005; Nayaka *et al.*, 2014; Cha *et al.*, 2016) también ha demostrado tener actividad antimicrobiana de manera individual; así que, en nuestro estudio puede atribuir a los flavonoides encontrados en las variedades Tda y Tdd como los responsables de la actividad antimicrobiana contra los patógenos del tracto urinario analizados.

Los extractos metanólicos de nuestro estudio también mostraron actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, mostrando una actividad máxima contra *E. coli* y *K. pneumoniae* de acuerdo con la MIC obtenida. En relación con el análisis estadístico, los extractos metanólicos de Tdd tuvieron diferencias significativas en comparación con los de Tda. Estas diferencias podrían estar relacionadas con el tipo de metabolitos presentes en cada extracto, como se observó en el análisis cromatográfico (Figura 2, Tabla 1); los extractos tenían diferencias en los picos 3 y 4 de Tda, que no se encontraron en Tdd, y el pico 7 de Tdd que no se encontró en Tda. Por otra parte, a 366 nm sin derivatización, el cromatograma mostró dos bandas (de color azul a verde) que eran únicas para Tdd. Por lo tanto, además de los flavonoides presentes, pueden tener otros metabolitos que causan la máxima actividad. Sin embargo, se necesitan más estudios para comprobar esta teoría.

Finalmente, también se ha evaluado la actividad antimicrobiana de los terpenos y terpenoides, donde, se demostró que los terpenos tienen una mayor actividad cuando están en un extracto crudo que cuando son aislados y analizados individualmente (Nazzaro *et al.*, 2013). Por lo tanto, los metabolitos presentes en los extractos hexánicos crudos en este estudio, podrían ser los responsables de esta actividad en todos los microorganismos evaluados, a excepción de *E. faecalis*. La MIC y la MBC obtenidas no mostraron diferencias

The MIC and MBC obtained did not show significant differences against the microorganisms tested; however the chromatographic analysis of the Tda and Tdd hexanic extracts showed statistical differences. Therefore, the metabolites responsible for the inhibition activity of both varieties may not be those that are different between the varieties but those that are shared between them. Nevertheless, more studies are needed to identify the metabolites responsible for the antimicrobial activity in each variety and establish the relationship of each metabolite structure with the bioactive metabolites.

## Conclusion

The proper identification of medicinal plant extracts is required for safety, quality, and efficacy of the human consumption products. This is the first *in-vitro* study that has shown the antimicrobial activity of methanolic and hexanic extracts of two varieties of *T. diffusa* (*T. diffusa* var. *aphrodisiaca* and *T. diffusa* var. *diffusa*) against bacteria and fungi causing urinary tract infections. With the HPTLC analysis the nature of the compounds that carry out the bioactivity was identified. This study served as a baseline to identify the metabolites present in each extract; as a follow-up, further analyses of the metabolites responsible for the antimicrobial activity should be performed, especially in *Klebsiella pneumoniae* because it is a pathogen related to disorders for which damiana has been used as an herbal remedy.

## Acknowledgments

The authors would like to thank the Food Safety Research National Laboratory from the Research Center in Food and Development (CIAD) Culiacan, Mexico, Station, for proving the facilities to perform the *in-vitro* antimicrobial analysis; Adrian Beltran (UAS) and Sergio del Real Cosio (CIBNOR) for identifying *Turnera diffusa* Willd ex Schult. varieties; Diana Fischer for editorial services.

## References

- Ahmad, I. & Beg, A. Z. (2001) Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *Journal of Ethnopharmacology*, 74: 113–123. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00335-4](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00335-4)

significativas contra los microorganismos probados; sin embargo, el análisis cromatográfico de los extractos hexánicos Tda y Tdd si mostraron diferencias. Por lo tanto, los metabolitos responsables de la actividad de la inhibición antimicrobiana de ambas variedades pueden no ser aquellos que son diferentes entre las variedades sino aquellos que se comparten entre ellas. Sin embargo, se necesitan más estudios para identificar los metabolitos responsables de la actividad antimicrobiana en cada variedad y establecer la relación de la estructura de cada metabolito con los metabolitos bioactivos.

## Conclusión

La identificación adecuada de los extractos de plantas medicinales es necesaria para la seguridad, calidad y eficacia de los productos para consumo humano. Este es el primer estudio *in vitro* que ha demostrado la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos y hexánicos de dos variedades de *T. diffusa* (*T. diffusa* var. *aphrodisiaca* y *T. diffusa* var. *diffusa*) contra bacterias y levaduras que causan infecciones del tracto urinario. Con el análisis de HPTLC se identificó la naturaleza de los compuestos que llevan a cabo dicha bioactividad. Este estudio sirve como base para identificar la naturaleza de los metabolitos presentes en cada extracto; para ampliar la información es conveniente realizar análisis más específicos de los metabolitos responsables de la actividad antimicrobiana, especialmente en *Klebsiella pneumoniae*, ya que es un patógeno relacionado con padecimientos para los que se ha utilizado damiana como un remedio herbolario.

## Agradecimientos

Los autores desean agradecer al Laboratorio Nacional para la Investigación en Inocuidad Alimentaria del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) de la Coordinación Culiacán, México, por facilitar sus instalaciones para realizar el análisis antimicrobiano *in vitro*; al profesor Adrián Beltrán (UAS), a Margarito Rodríguez Álvarez y Sergio Real Cosío (CIBNOR) por identificar las variedades de *Turnera diffusa* Willd ex Schult. A Diana Fischer por la edición en inglés.

- Akujobi, C., Anyanwu, B. N., Onyeze, C. and Ibekwe, V. I. (2004) Antibacterial activities and preliminary phytochemical screening of four medicinal plants. *Journal of Applied Sciences*, 7: 4328–4338.
- Alaribe, C. S., Shode, F., Coker, H. A. B., Ayoola, G., Sunday, A., Singh, N. and Iwuanyanwu, S. (2011) Antimicrobial activities of hexane extract and decussatin from stem bark extract of *Ficus congensis*. *International Journal of Molecular Science*, 12: 2750–2756. <https://doi.org/10.3390/ijms12042750>
- Alcaraz-Meléndez, L., Real-Cosío, S., Suchy, V. and Svajdlenka E. (2007). Differences in essential oil production and leaf structure in phenotypes of damiana (*Turnera diffusa* Willd. *Journal of Plant Biology*, 50: 378-382. <https://doi.org/10.1007/BF03030671>
- Arbo, M. M. (2000). Estudios sistemáticos en *Turnera* (*Turneraceae*) 11. Series *Annulares*, *Capitatae*, *Microphyllae* y *Papilliferae*. Bonplandia, 10: 1-82.
- Báez-Parra, K. M., Alcaraz-Melendez, L., Santamaria-Miranda, A., Heredia, J. B., Leon-Felix, J., Muy-Rangel, M. D. and Angulo-Escalante, M. A. (2018). Leaf morphology and anatomy of varieties of *Turnera diffusa* var. *diffusa* and *Turnera diffusa* var. *aphrodisiaca* (Ward) Urb. *African Journal of Traditional Complement and Alternative Medicine*, 15: 110-116. <https://www.ajol.info/index.php/ajtcam/article/view/166904>
- Benson, K. (2008). *Herbalism: A complete reference guide to frequently used magical herbs and spices*. United States.
- Cha, S., Kim, G. and Cha, J. (2016) Synergistic antimicrobial activity of apigenin against oral pathogens. *International Journal of Engineering Research and Science*, 2: 27–37 <https://pdfs.semanticscholar.org/af9a/cb7f5dbced36511e164198d5ce84a7cd4266.pdf>
- Chevallier, A. (1996). *The encyclopedia of medicinal plants*. London. Dorling Kindersley.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2017). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* CLSI supplement M100S. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, Pennsylvania.
- Cushnie, T. P. T. & Lamb, A. J. (2005) Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26: 343–356. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002>
- Estrada-Reyes, R., Ferreyra-Cruz, O. A., Jimenez-Rubio, G., Hernandez-Hernandez, O. T. and Martínez-Mota, L. (2016). Prosexual effect of *Chrysactinia mexicana* A. Gray (Asteraceae), False damiana, in a model of male sexual behavior. *BioMed Research International*, ID 2987917. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2987917>
- FEUM (Farmacopea Herbolaria Mexicana). (2013). 2a Edición. ISBN: 978-607-460-402-3, 91-92.
- Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M. and Hultgren, S. J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature Reviews Microbiology*, 13: 269–84. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3432>
- Gamez, A. E., Ivanova, A. and Martínez de la Torre, J. A. (2010). La comercialización mundial de damiana y los pequeños productores de Baja California Sur. *Comercio Exterior*, 60: 2009-220. [http://revistas.bancomext.gob.mx/rce/magazines/136/3/209\\_GAMEZ\\_damiana.pdf](http://revistas.bancomext.gob.mx/rce/magazines/136/3/209_GAMEZ_damiana.pdf)
- Hernández, T., Canales, M., Avila, J. G., Duran, A., Caballero, J., Romo de Vivar, A. and Lira, R. (2003). Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). *Journal of Ethnopharmacology*, 88:181–188. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00213-7](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00213-7)
- Kumar, S. & Sharma, A. (2006). Apigenin: the anxiolytic constituent of *Turnera aphrodisiaca*. *Pharmaceutical Biology*, 44: 84–90. <https://doi.org/10.1080/13880200600591758>
- Lagunas-Rangel, F. A. (2018). Susceptibility profiles of bacteria causing urinary tract infection in Mexico—Single center experience with 10 years results. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 14: 90-94. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.03.004>
- Martínez de la Torre, J. A. (2013). Economic-financial assessment of a business plan for dried damiana. *Revista Mexicana de Ciencia Forestal*, 4: 16.
- Nayaka, H. B., Londonkar, R. L., Umesh, M. K. and Tukappa, A. (2014) Antibacterial attributes of apigenin, isolated from *Portulaca oleracea* L. *International Journal of Bacteriology*, ID 175851. <https://doi.org/10.1155/2014/175851>
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R. and De Feo, V. (2013) Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6: 1451–1474. <https://doi.org/10.3390/ph6121451>
- Piacente, S., Camargo, E. E. S., Zampelli, A., Gracioso, J. S., Souza-Brito, A. R., Pizza, C. and Vilegas, W. (2002). Flavonoids and arbutin from *Turnera diffusa*. *Zeitschrift für Naturforschung*, 57 c:983–985.



- Reich, E. (2012). HPTLC methods for identification of medicinal plants. HPTLC association.
- Seasotiya, L., Siwach, P., Malik, A., Bai, S., Bharti, P. and Dalal, S. (2014) Phytochemical evaluation and HPTLC fingerprint profile of *Cassia fistula*. *International Journal of Advances in Pharmacy, Biology and Chemistry*, 3(3): 604–611. [https://www.researchgate.net/profile/Priyanka\\_Siwach/publication/265972335\\_Phytochemical\\_evaluation\\_and\\_HPTLC\\_fingerprint\\_profile\\_of\\_Cassia\\_fistula/links/542298540cf26120b7a1937b.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Priyanka_Siwach/publication/265972335_Phytochemical_evaluation_and_HPTLC_fingerprint_profile_of_Cassia_fistula/links/542298540cf26120b7a1937b.pdf)
- Sharma, A., Bhatta, D. R., Shrestha, J. and Banjara, M. R. (2013). Antimicrobial susceptibility pattern of *Escherichia coli* isolated from urinary tract infected patients attending Bir hospital. *Nepal Journal of Science and Technology*, 14: 177–184. <https://doi.org/10.3126/njst.v14i1.8938>
- Sophia, D., Ragavendran, P., Arulraj, C. O. and Gopalakrishnan V.K (2011). In vitro antioxidant activity and HPTLC determination of n-hexane extract of *Emilia sonchifolia* (L.) DC. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, 2: 179–183. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3979225/pdf/JBCP-2-179.pdf>
- Szewczyk, K. & Zidorn, C. (2014). Ethnobotany, phytochemistry, and bioactivity of the genus *Turnera* (Passifloraceae) with a focus on damiana *Turnera diffusa*. *Journal of Ethnopharmacology*, 152: 424–43. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.01.019>
- Taleb-contini, S. H., Salvador, M. J., Watanabe, E., Ito, I. Y. and Rodrigues, D. (2003) Antimicrobial activity of flavonoids and steroids isolated from two *Chromolaena* species. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Science*, 39: 403–408. <http://doi.org/10.1590/S1516-93322003000400007>
- Tibyangye, J., Okech, M. A., Nyabayo, J. M. and Nakavuma J. L. (2015). In vitro antibacterial activity of *Ocimum suave* essential oils against uropathogens isolated from patients in selected hospitals in Bushenyi District, Uganda. *British Microbiology Research Journal*, 8: 489–498. <http://doi.org/10.9734/BMRJ/2015/17526>
- Zhao, J., Pawar, R. S., Ali, Z. and Khan, A. I. (2007). Phytochemical investigation of *Turnera diffusa*. *Journal of Natural Products*, 70: 289–292. <https://doi.org/10.1021/np060253r>