

I. RESUMEN

Las infecciones vaginales se encuentran entre los trastornos más frecuentes por los cuales las pacientes solicitan atención ginecológica; entre estas están las vulvovaginitis (como la candidiasis, vaginosis y la tricomoniasis), y las ocasionadas por virus, (como el papiloma humano y el herpes genital).

En Guatemala la medicina natural ha sido utilizada desde generaciones antiguas, principalmente en el área rural, en la cual la mayoría de pacientes recurren al uso de plantas a las que se les atribuyen propiedades curativas, sin existir una base científica que confirme su verdadera acción farmacológica. Con el presente estudio se pretendió demostrar la actividad inhibitoria *in vitro* de los extractos diclorometánico y metanólico de seis plantas de uso medicinal (*Citrus aurantium* L. “naranja agria”, *Cornutia pyramidata* L. “jorocé”, *Cecropia obtusifolia* Bertoloi. “guarumo”, *Wigandia urens* var. *caracasana* HBK. “chocon”, *Punica granatum* L. “granada” y *Euophorbia lancifolia* Schlecht. “ixbut”), contra *Gardnerella vaginalis* y seis especies de *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsiloides*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea* y *C. glabrata*). Con el fin de determinar si pueden ser usados como un tratamiento natural, o servir como modelos químicos para la elaboración de nuevos medicamentos.

Todos los extractos (con excepción de *P. granatum* con diclorometano) presentaron actividad significativa en la fase del tamizaje contra las seis especies de *Candida* ($p < 0.10$). A los extractos con actividad positiva de los determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM), encontrando que *C. parapsiloides* fue inhibida por los extractos de, *C. aurantium* en diclorometano a una concentración de 0.5 mg/mL, *C. pyramidata* en metanol a una concentración de 1mg/mL y por *P. granatum* en metanol a una concentración de 0.5 mg/mL. *C. tropicalis* fue inhibida por *C. pyramidata* en metanol a una concentración de 1 mg/mL, y *C. stellatoidea* fue inhibida por *W. urens* var. *caracasana* en diclorometano a una concentración de 1 mg/mL.

En el estudio *C. albicans*, *C. krusei* y *C. glabrata* no fueron inhibidas por ninguno de los extractos ($p > 0.10$). En la fase del tamizaje ningún extracto presentó efecto inhibitorio significativo ($p > 0.10$) contra *G. vaginalis*.

II. INTRODUCCIÓN

La microbiota vaginal normal es predominantemente aerobia, con alrededor de seis especies diferentes de bacterias, las más frecuentes de ellas son los lactobacilos productores de peróxido de hidrógeno. La microbiología de la vagina depende de factores que afectan la capacidad de las bacterias para sobrevivir. (pH y concentración de glucosa para el metabolismo bacteriano). El pH de la vagina normal es menor de 4.5 y se conserva así gracias a la producción de ácido láctico (1,3).

Las infecciones de las vías genitourinarias se encuentran entre los trastornos más frecuentes por los cuales las pacientes solicitan atención ginecológica, pueden ser ocasionadas por virus, bacterias, levaduras o parásitos (1,2).

Entre las inflamaciones más frecuentes están las vulvovaginitis (como la candidiasis, la vaginosis y la tricomoniasis) y las ocasionadas por virus, (como el papiloma humano y el herpes genital). Generalmente ocurren cuando la microbiota normal de la vagina o el tracto intestinal se reproducen de manera excesiva, tal es el caso de *Gardnerella vaginalis* o las levaduras del género *Candida*. (1,2,3).

El diagnóstico adecuado se realiza con la revisión médica ginecológica, análisis de la muestra de la secreción vaginal y algunas se corroboran con otro tipo de exámenes, como la prueba de olor y preparación en fresco para determinar la presencia de estructuras micóticas (1,2).

En Guatemala la medicina natural ha sido utilizada desde generaciones antiguas, principalmente en el área rural, en la cual la mayoría de pacientes recurren al uso de plantas a las que se les atribuyen propiedades curativas, sin existir una base científica que confirme su verdadera acción farmacológica (4).

La fitoterapia en el tratamiento de la vaginitis y vaginosis supone la utilización de una serie de plantas que tienen como finalidad, prevenir y eliminar las infecciones, prevenir la inflamación, entre las plantas más comúnmente utilizadas se pueden mencionar, caléndula, ajo, equinacea, menta, corteza de roble entre otras (4).

Con el presente estudio se pretendió demostrar la actividad inhibitoria que poseen *in vitro* los extractos diclorometánico y metanólico de seis plantas de uso medicinal, contra *G. vaginalis* y especies de *Candida*, causantes de afecciones vaginales, (*Citrus aurantium* L “naranja agria”, *Cornutia pyramidata* L “flor lila”, *Cecropia outusifolia* Bertoloi “guarumo”, *Wigandia urens* var. *caracasana* HBK “chichicaste”, *Punica granatum* L “granada” y *Euophorbia lancifolia* Schlecht “ixbut”), para poder determinar si pueden ser usados como un tratamiento natural, o servir como modelos químicos para la elaboración de nuevos medicamentos.

III. ANTECEDENTES

A. INFECCIONES VAGINALES

La vaginosis y vaginitis son infecciones vaginales muy frecuentes en la población, se presentan en cerca de una quinta parte de las mujeres quienes acuden a consulta ginecológica. La mayoría de las mujeres presentan al menos un episodio de vaginitis o de vaginosis durante el período fértil de su vida (3).

La vaginosis es causada comúnmente por *G. vaginalis* y la vaginitis por diferentes especies de *Candida*. El fármaco de elección para estas infecciones es el metronidazol que puede causar efectos secundarios, como náusea, regusto metálico, diarrea y dolor de cabeza (3).

B. VAGINOSIS

La vaginosis es una infección bacteriana causada comúnmente por *G. vaginalis*. Se produce cuando hay un trastorno de la flora normal de la vagina, que ocasiona pérdida de los lactobacilos productores de peróxido de hidrógeno y producción de bacterias predominantemente anaerobias (se pueden encontrar bacterias anaerobias en menos del 1% de la flora vaginal normal). *G. vaginalis* es responsable del 40 al 50% de los casos de vaginosis reportadas. En las mujeres que experimentan vaginosis la concentración de *G. vaginalis* es 100 a 1,000 veces más alta que en las mujeres normales (3).

No se conoce qué desencadena el trastorno de la flora vaginal normal. Se ha atribuido a la alcalinización repetida de la vagina que se produce con el coito frecuente o con el uso de duchas vaginales. Una vez que desaparecen los lactobacilos productores de peróxido de hidrógeno es difícil restaurar la flora vaginal normal y es frecuente la recurrencia de la vaginosis bacteriana (7,8).

1. Agente etiológico

G. vaginalis se ha considerado el principal agente causal de vaginosis, ya que presenta los siguientes factores de patogenicidad: una hemolisina que actúa sobre las células del amnio, en la superficie celular presenta una glicoproteína que posee una elevada afinidad por la lactoferrina humana presente en la mucosa vaginal (7).

Fue descrita por primera vez en 1,953, por Leopold Ritter von Sacher-Masoch, quien lo aisló de 58 mujeres con cervicitis y de dos hombres con uretritis inespecífica, denominándola *Haemophilus vaginalis* por la asociación con los requerimientos nutricionales de *Haemophilus*. Más tarde se descartó este nombre y la relacionaron con otros géneros de bacilos Gram positivos como: *Corynebacterium*, *Butyribacterium* e incluso *Lactobacillus*, para luego finalmente clasificarla en el nuevo género *Gardnerella*, con una sola especie *G. vaginalis*. Este nombre se dio en honor de H.L. Gardner que en 1,980 observó que era la única bacteria encontrada en mujeres con síntomas de la infección (15,18).

Existen diferentes biotipos de *G. vaginalis*, los cuales en algunos casos están asociados o no a vaginosis bacteriana (1,3).

Los estudios de proteínas fundamentalmente de membrana han contribuido a una mejor comprensión de la patogenicidad de muchas bacterias. En *G. vaginalis*, poco se conoce sobre la identidad de sus proteínas de superficie y su relación con los diferentes perfiles bioquímicos observados. Las proteínas de superficie son blanco para los anticuerpos y no han sido caracterizadas en aislamientos de esta bacteria (15).

a. Características de *G. vaginalis*

Es un microorganismo serológicamente distinto, aislado del aparato genitourinario femenino normal, que desde el punto de vista morfológico tiene el aspecto de un bacilo pleomórfico de aproximadamente 0.5 μm de diámetro y 1.5 a 2.5 μm de longitud. Es Gram negativo a Gram variable, y la retención de esta tinción es más fuerte en los cultivos

jóvenes de 8 a 12 horas de incubación. *G. vaginalis* es vinculado con vaginosis, denominada así debido a que no se encuentran células inflamatorias. En los frotis en fresco, se observan “células indicadoras”, que son células del epitelio vaginal cubiertas con muchos bacilos Gram-variables. A menudo se observan bacterias con formas en palo de golf y gránulos metacromáticos (3,9,10).

El microorganismo es inmóvil, no produce esporas ni es encapsulado y la mayor parte de las cepas del género *Gardnerella* son anaerobias facultativas y fermentativas con gran producción de ácido acético como uno de los productos finales, y es exigente en cuanto a sus requerimientos nutricionales (9,10,11).

Este microorganismo da resultados negativos para las pruebas de catalasa, oxidasa, reducción de nitratos, indol y ureasa. Produce dos hemólisis en agar sangre humana y da positiva la prueba de hidrólisis de hipurato (12).

2. Patología y sintomatología

G. vaginalis es considerada como un patógeno de transmisión sexual, sin embargo su hallazgo no siempre se relaciona al factor de actividad sexual pues se ha encontrado, en mujeres sanas sin manifestaciones clínicas, por lo que también se le considera como un habitante normal de la flora vaginal, que solo con la presencia de otras bacterias se manifiesta clínicamente como responsable de la vaginitis inespecífica (13,18).

Los factores predisponentes para el desarrollo de la vaginosis son el pH de la vagina menos ácido de lo normal (mayor a 4.5), ausencia o disminución de la microbiota normal, principalmente bacilo de Döderlein y deficiencia de estrógenos que disminuyen el glicógeno de las células vaginales (13,18).

Clínicamente se caracteriza por un aumento en la secreción vaginal, que es de color blanco-grisáceo, es homogénea, con tendencia a adherirse a la pared vaginal, y presenta un olor desagradable a pescado que aumenta cuando la secreción se vuelve alcalina. Es común que haya prurito o irritación vulvar, no se presenta enrojecimiento ni edema de la vulva. En numerosos estudios se ha demostrado una relación entre la vaginosis y las secuelas

adversas importantes. Las mujeres que experimentan vaginosis están bajo riesgo incrementado de sufrir enfermedad inflamatoria pélvica (PID). PID subsecuente al aborto, infecciones postoperatorias del manguito vaginal después de histerectomía y citología cervical anormal. Las mujeres embarazadas con vaginosis están en peligro de ruptura prematura de membranas, trabajo de parto y parto antes del término, corioamnionitis, y endometritis subsecuente a cesárea. No se sabe si la investigación de la vaginosis y el tratamiento de la misma disminuirá el riesgo de estas secuelas adversas (3,14).

3. Diagnóstico

La vaginosis bacteriana se diagnostica con base en los siguientes criterios:

- a. Olor vaginal a pescado, particularmente notable después del coito y secreción vaginal.
- b. Secreciones vaginales de color grisáceo y que cubren con una capa muy delgada las paredes vaginales
- c. Un pH de estas secreciones mayor de 4.5 por lo general de 4.7 a 5.7.
- d. Microscopía de las secreciones vaginales que revela aumento del número de células indicios y leucocitos notablemente ausentes. En los casos avanzados de vaginosis más de 20% de las células epiteliales son células indicios.
- e. La añadidura de hidróxido de potasio (KOH) a las secreciones vaginales (prueba del olor) despide un olor de tipo amónico a pescado.

No se recomienda el cultivo de *G. vaginalis* como recurso diagnóstico por su falta de especificidad (3).

4. Tratamiento

De manera ideal el tratamiento de la vaginosis debe inhibir el crecimiento de las bacterias anaerobias, pero no de los lactobacilos vaginales, son eficaces los siguientes tratamientos:

- a. El metronidazol, antibiótico con actividad excelente contra los microorganismos anaerobios pero con actividad deficiente contra los lactobacilos, es el fármaco mas adecuado para tratar la vaginosis bacteriana, debe administrarse una dosis de 500 mg por vía oral dos veces al día durante siete días. Administración intravaginal de metronidazol en

gel al 0.75%, un aplicador lleno (5 g), dos veces al día durante cinco días. Un régimen alternativo consiste en una sola dosis oral de 2 g de metronidazol.

b. La clindamicina en los siguientes esquemas también es eficaz: Un aplicador lleno (5 g) intravaginal de crema de clindamicina al 2% a la hora de acostarse durante siete días. Clindamicina vía oral 300 mg por dos veces al día durante siete días. Un óvulo de clindamicina de 100 mg por vía vaginal al acostarse durante tres días.

Muchos clínicos prefieren el tratamiento intravaginal por la ausencia de efectos adversos generales, como malestar gastrointestinal leve o moderado y sabor desagradable. No se ha demostrado que el tratamiento del compañero sexual masculino mejore la reacción terapéutica por lo tanto no se recomienda (3).

C. VAGINITIS

Inflamación de la vagina muy común, caracterizada por flujo por el tracto genital. La infección es común durante la niñez y después de la menopausia cuando la mucosa vaginal es delgada y carece de la resistencia normal. Los principales agentes causales son *Trichomonas vaginalis* y *C.albicans*, sin embargo recientemente se han descrito casos de vaginitis por otras especies de *Candida* (3,4).

1. Etiología

Se estima que al menos un 75% de las mujeres experimenta por lo menos una crisis de vaginitis causada por *Candida* durante su vida. *C. albicans* es causante del 85 al 90% de las infecciones vaginales por levaduras. Otras especies de *Candida*, como *Candida glabrata* y *Candida tropicalis*, pueden ser causantes de afecciones vulvovaginales y tienden a ser resistentes al tratamiento (2,7).

Las levaduras del género *Candida* son hongos dimórficos que existen como blastosporas, que son las encargadas de la transmisión y la colonización asintomática, y como micelios, que son resultado de la germinación de las blastosporas y que fomentan la colonización y facilitan la invasión tisular. Las áreas extensas de prurito e inflamación que se relacionan a

menudo con invasión mínima de las células epiteliales de la parte baja de las vías genitales sugieren la existencia de una toxina o una enzima extracelular que desempeña una función en la patogenia de esta enfermedad. Puede haber además un fenómeno de hipersensibilidad productor de los síntomas irritantes que acompañan a la vaginitis (2,3).

Los factores que predisponen a las mujeres al desarrollo de vaginitis sintomática son uso de antibióticos, embarazo y diabetes. Mediante un mecanismo que se conoce como resistencia a la colonización, los lactobacilos impiden la proliferación de los hongos oportunistas. La administración de antibióticos trastorna la flora vaginal normal, pues disminuye la concentración de lactobacilos y otros miembros de la flora normal, y permite por tanto la proliferación de hongos. El embarazo y la diabetes se acompañan de una disminución cualitativa de la inmunidad mediada por células, que ocasiona una incidencia más alta de vaginitis (2).

2. Patología y sintomatología

Los síntomas aparecen cuando el equilibrio entre los microorganismos que normalmente habitan en la vagina se pierde y la población de *C. albicans* aumenta en relación con la de los otros microorganismos. Estos consisten en prurito vulvar acompañado de secreción vaginal, que se parece por sus características a la leche cortada. Esto sucede cuando el ambiente en la vagina presenta ciertas condiciones favorables que permiten que la *C. albicans* crezca y se nutra. Un medio ambiente que dificulte la supervivencia de otros microorganismos puede igualmente ocasionar un desequilibrio que conlleva a la infección por levaduras (18).

Puede haber dolor vaginal, dispareunia, ardor vulvar e irritación. Puede ocurrir disuria externa cuando la micción produce exposición al epitelio vulvar y vestibular. El examen revela eritema y edema de los labios y la piel vulvares. Pueden encontrarse lesiones pustulopapulosas periféricas definidas. La vagina se encuentra eritematosa y con una secreción blanquecina adherente. El cuello uterino tiene aspecto normal (3,18).

La candidiasis vaginal no se considera una enfermedad de transmisión sexual, sin embargo, del 12 al 15% de los hombres que tienen contacto sexual con una persona infectada desarrollan síntomas como prurito y erupción en el pene. Se debe prestar bastante atención a los episodios de candidiasis vaginal. La aparición repetitiva de infecciones inmediatamente después de un tratamiento terapéutico o una infección por levadura persistente que no responde al tratamiento puede ser el primer signo, o al menos un signo temprano, de que la persona está infectada con el virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH) (3).

3. Diagnóstico

- a) Secreción acuosa a densa de manera homogénea.
- b) pH vaginal normal.
- c) Presencia de elementos micóticos, sin formas germinativas de levaduras o micelios. Hasta en 80% de los casos los resultados de la preparación en fresco (solución salina) de las secreciones vaginales suelen ser normales, aunque puede encontrarse un incremento ligero en el número de células inflamatorias en los casos graves.
- d) La prueba de olor es negativa.
- e) Se puede establecer el diagnóstico supuesto en ausencia de elementos micóticos comprobados al microscopio si el pH y los resultados de la preparación en fresco son normales.
- f) El cultivo se recomienda para confirmar el diagnóstico (3).

4. Tratamiento

- a) Los agentes terapéuticos disponibles más a menudo para tratar la vaginitis, y que son más eficaces que la nistatina, son los fármacos del grupo azólico (butoconazol, clotrimazol, miconazol, ticonazol) aplicados de manera tópica. El tratamiento con azoles proporciona alivio de los síntomas y cultivos negativos en una proporción de 80 a 90% de las pacientes que han terminado el tratamiento. Los síntomas suelen desaparecer en dos o tres días (3).

b) Ha sido aprobado para el tratamiento de la vaginitis un antimicótico oral, fluconazol, que se administra en una sola dosis de 150 mg. Parece tener la misma eficacia cuando se compara con los azoles tópicos para tratar la vaginitis leve a moderada. Debe advertirse a las pacientes que sus síntomas no desaparecerán durante dos o tres días de modo que no esperen que se administre tratamiento adicional (3).

c) El tratamiento con un coadyuvante con un esteroide tópico débil, como crema de hidrocortisona al 1%, puede ser de utilidad para aliviar algunos de los síntomas irritantes externos (3).

D. USO DE MEDICINA NATURAL

Desde los tiempos antiguos la flora nativa ha proporcionado al hombre medios reales para tratar enfermedades. En Guatemala es muy común el uso de plantas medicinales por las comunidades indígenas, que cuentan con una admirable tradición sobre conocimientos populares de medicina vegetal. Los conocimientos han sido transmitidos de generación en generación, sin tener una verdadera base científica que justifique su uso (16,17).

En Guatemala se han realizado estudios que demuestran la utilidad y efectividad farmacológica de diversas plantas medicinales relacionadas con vaginitis y vaginosis. Girón en 1,983, determinó la inhibición de *C. albicans in vitro* por preparaciones de plantas usadas como medicina popular, encontrando que *Allium sativum*, *Eugenia caryophyllata* y *Solanum nigrescens* inhiben el crecimiento de la levadura. En 1,993, Montes estudió la actividad antibacteriana *in vitro* contra *G. vaginalis* de seis plantas de la flora guatemalteca, de las cuales cinco presentaron propiedades antibacterianas a 1mg/ml. Samayoa y Palacios en el 2004 realizaron el estudio de inhibición de *G. vaginalis* por extractos etanólicos vegetales, encontrando que siete de trece extractos estudiados tienen actividad inhibitoria contra *G. vaginalis* (4-6).

E. DESCRIPCIÓN DE LAS PLANTAS EN ESTUDIO

1. *Citrus aurantium* L.

a) Nombre común: Naranja agrio, naranja amargo

b) Familia: Rutaceae

c) Descripción: Árbol perenne de la familia de las rutaceas de hasta 10 m de altura con la copa muy redondeada y ramas con espinas largas no muy puntiagudas y flexibles. Hojas coriáceas, elípticas o elipticolanceoladas, agudas y con el pecíolo de alas estrechas. Flores solitarias de color blanco, muy perfumadas que es el azahar y con 5 pétalos y numerosos estambres. El fruto es carnoso con la corteza bastante lisa de color anaranjado y de sabor amargo, se cultiva ampliamente como árbol ornamental. El nombre específico *aurantium* hace referencia al color dorado de sus frutos y deriva del latín *auratus* que significa de color de oro. (20,21,30).

d) Distribución geográfica: Originario del sudeste de Asia; ampliamente cultivado en forma comercial en los trópicos y subtropicos de ambos hemisferios. En Guatemala se cultiva en forma semicomercial en Baja Verapaz, Escuintla, Santa Rosa, Suchitepéquez y Zacapa (30).

e) Usos medicinales: Para fines medicinales se utilizan las hojas, las flores y el epicarpio de los frutos. Las hojas se recogen en primavera, directamente del árbol, y se secan lo más rápidamente posible, guardándolas lejos de la luz y la humedad; las flores se colectan cuando están recién abiertas o todavía sin abrir y se secan con cuidado. En cuanto al epicarpio del fruto, se obtiene pelando el mismo y desecándolo en lugar ventilado. La naranja amarga tiene una acción antiespasmódica, ligeramente sedante e hipnótica. Por todo ello está indicada en casos de anorexia, malestar de estómago, ansiedad, insomnio, tos nerviosa, varices, flebitis, fragilidad capilar y diarreas. Las máximas propiedades terapéuticas de la naranja se manifiestan cuando se utiliza en forma de zumo exprimido. A las flores se les atribuye propiedad calmante, espasmolítica, estomacica, sedante y sudorífica (21-23, 30).

f) Composición química: en las hojas encontramos la esencia llamada de "petitgrain", que abunda más en las naranjas jóvenes. En las flores encontramos otra esencia llamada "neroli", además de otros compuestos; y en el epicarpio aparecen flavonoides, otras esencias, "curaçao", alcoholes varios, sales minerales, pectina, ácido cítrico y ascórbico. Los flavonoides confieren una acción vitamínica C de protección de los capilares y

preventiva de hemorragias. Por su parte, la presencia de un principio amargo, la limonina, da a la naranja un efecto tónico, aperitivo y eupéptico; por último, la pectina posee propiedades antidiarreicas y reductoras del colesterol (23).

2. *Cornutia pyramidata* L.

a) Nombre común: Jorocfé (Alta Verapaz), Flor lila (Guatemala), hoja de zope (Izabal); lat-che (Petén); bwa kasav (República Dominicana); tzultesnuk y matasano en Honduras

b) Familia: *Verbenaceae*

c) Sinónimos: *C. grandifolia* var. *intermedia* Moldenke, *C. latifolia* Moldenke, *C. lilacina* Moldenke, *C. pyramidata* var. *isthmica* Moldenke, *Hosta latifolia* HBK, *H. pyramidata*.

d) Descripción: es considerada como arbusto o árbol de 12 m de alto, algunas veces de 15 cm de diámetro con ramas cuadrangulares, hojas pubescentes, ovaladas o elípticas, de color verde claro de 8 a 28 cm de largo, 4 a 14 cm de ancho, verde grisáceo en el haz, base y ápice agudas o acuminadas usualmente atenuadas en la base y decurrentes. Las flores se dan en grupos muy abundantes vistosas en toda la planta de 11 a 25 cm incluso de hasta 40 cm de largo. Las flores son de color morado, en forma de tubo de unos 2 cm cada una; florece de enero a agosto y fructifica de julio a noviembre (24-26).

La planta es común encontrarla en sitios alternados de vegetación, normalmente en los límites de los bosques. Por la belleza de su flor, esta planta se puede utilizar como ornamental y también para la producción de miel (27).

e) Distribución geográfica: Se encuentra naturalmente en la cuenca del Caribe México, Honduras, El Salvador, Nicaragua y Guatemala. Crece como maleza en bosques densos a 150 a 1,300 msnm. En Guatemala se encuentra en Alta Verapaz, Chimaltenango, Chiquimula, El Progreso, Escuintla, Guatemala; Izabal, Petén, Santa Rosa, Sololá, Suchitepéquez, Zacapa (24-26).

f) Usos medicinales: Se utiliza la decocción de la raíz en crisis nerviosas. La decocción de las hojas se utiliza para dolores de cuerpo, inflamación del bazo, diabetes y flujos vaginales (28, 29, 32).

g) Composición química: Las hojas y tallos contienen alcaloides (32).

3. *Euphorbia lancifolia* Schlecht

a) Nombre común: Ixbut (en lengua maya) isbut, sapillo, hierba lechera (en Guatemala)

b) Familia: Euphorbiaceae

c) Descripción: Ixbut, de la lengua Pokom quiere decir “que aumenta el volumen del líquido de la mujer”. Es una interesante planta silvestre que al trozarse los tallos dejan escapar un jugo lechoso, como sucede en casi todas las Euforbiaceas. Es una hierba subtrepadora o rastrera, de tallos rollizos, cilíndricos algo carnosos, lisos y articulados, de color verde pálido, hojas alternas, romboideo lanceoladas, anchas en la base y con las extremidades agudas, de 5 a 9 cm. De ancho en la base, con las nervaduras laterales invisibles; flores pequeñas y blanquizas, con el cáliz de cuatro segmentos y el ovario vellosos. Se dice que las semillas son venenosas para el ganado. En Guatemala se encuentra en el Petén, y se le ha dado el uso desde tiempos remotos como galactogogo y solo recientemente ha despertado interés en México esa propiedad. El doctor Pedro Molina Flores la introdujo a la ciudad de Guatemala, donde una vez aclimatada, el doctor Salvador Sarabia preparó un extracto fluido que experimentó en varios casos comprobando plenamente su propiedad de producir y aumentar la secreción láctea, usando hasta 8 g del extracto (33,41).

d) Distribución geográfica: nativa de bosquecillos secos, en Guatemala se ha descrito en Alta Verapaz, Guatemala, Huehuetenango, Izabal, Petén, Quetzaltenango, Quiché, Sacatepéquez, San Marcos, Santa Rosa y Suchitepéquez (32).

e) Usos medicinales atribuidos: Los tallos huecos con escasas hojas se venden en los mercados locales, combate la impotencia sexual, fiebre puerperal, dolor de cuerpo y cólico

estomacal, tópicamente se usa la decocción en baños de la planta completa para llagas y dolor de cuerpo, se le atribuye propiedad galactogoga antiséptica y tónico estimulante (32,35).

f) Composición química: Los componentes de esta planta fueron determinados por el laboratorio de la estación experimental agronómica de Santiago de las Vegas y dio los siguientes resultados:

MUESTRA	FRESCA (%)	SECA A 40 °C	SECA A 100°C
		(%)	(%)
Humedad	83.712	4.5	-
Proteínas	2.20	12.95	13.51
Extracto etéreo	1.00	7.80	8.13
Fibra cruda	3.93	23.10	24.10
Cenizas	1.69	9.95	10.17
Carbohidratos	7.47	42.25	44.09

(35).

4. *Cecropia obtusifolia* Bertol

a) Nombre común: Choop. Guarumo, Igarata, Ix-coch.

b) Familia: Moraceae

c) Sinónimos: *C. mexicana* Hemsl.

d) Descripción: Árbol de rápido crecimiento de hasta 22 m de altura que tiene sabia lechosa y presenta pocas ramificaciones en la parte superior, tronco hueco hasta 30 cm de diámetro, hojas con tallos peludos, cuando jóvenes cubiertas de pelusa gris-rojiza al madurar arregladas en espirales circulares, 25 a 50 cm de ancho profundamente divididas de 8 a 13 lóbulos espatulados. Flores pequeñas agrupadas pendientes espinosas, las masculinas de 8 a 10 cm de largo, 3 a 4 mm de ancho, las femeninas de 20 a 40 cm de largo, 6 a 7 mm de ancho, muy carnosas al madurar, las espigas femeninas forman un agregado de frutas consistente de numerosas y verdaderas frutas pequeñas con una semilla única (32,34,39).

e) Distribución geográfica: Comunes en la mayoría de tierras bajas, bosquecillos húmedos y pantanos, frecuentes a la orilla de prados, nativa y abundante en el Sur de México y Centro América, hasta 1,300 msnm. En Guatemala se ha descrito en: Escuintla, Suchitepéquez, Santa. Rosa, El Progreso, Zacapa, Chiquimula, Petén e Izabal (32,38).

f) Usos medicinales atribuidos: En Mesoamérica como hojas de guarumo se usan indistintamente las especies de *Cecropia mexicana*, *Cecropia obtusifolia* y *Cecropia peltata*. Su uso popular es para tratar el asma, bronquitis, diabetes, dolor de muelas y de garganta, para calmar los nervios, como enema para la gonorrea, leucorrea, edema y diversas molestias hepáticas, en Guatemala la decocción de los vástagos tiernos es tomada como diurético, febrífugo, sudorífico, emenagogo y tónico cardíaco, así como para tratar la hinchazón, tos, tos ferina, reumatismo y aliviar el parto, para las infecciones gastrointestinales se usa para el tratamiento de la diarrea y como tónico aperitivo. En México la infusión de las hojas es comúnmente administrada oralmente durante períodos de 5 a 8 días en el tratamiento de la diabetes mellitus. La sabia se aplica tópicamente contra hemorragias, verrugas, callosidades, cáncer y diversas infecciones veterinarias (32,36,42).

g) Composición química: Contiene una saponina, la ambaina que es soluble en agua y etanol e insoluble en éter y cloroformo; a pesar de ser una saponina, carece del efecto tóxico de estas sustancias, como es la actividad lítica de los eritrocitos. La raíz y corteza contienen el glucósido, cecropina. El tamizaje fotoquímico de las hojas y tallos demuestra cardenólicos, bufadienólicos, flavonoides, leucoantocianinas, triterpenos, taninos y polifenoles (34, 35, 40).

5. *Wigandia urens* var. *caracasana* HBK

a) Familia: Hydrophylaceae

b) Nombre común: Chocón, cichicaste de caballo, mata pulga, ortiga de montaña, chocón, tabaquillo.

c) Descripción: Planta muy desarrollada, de 2-5 m de alto, subleñosa tallos herbáceos, con pelusillas blancas, hojas alternas, tallo acanalado, 5-50 cm de largo, indentado en la base, agujas en el pecíolo. Flores sésiles, moradas acampanadas de 1 a 2 cm de ancho, 5 estambres, cáliz persistente, hispido, estigma en clava; ovarios ovoides sedosos, que se encuentra en los sitios áridos, en los barrancos asoleados de la tierra templada, aunque algunas veces llega cerca de la costa. Sus frutos son una cápsula de dos valvas con numerosas semillas. Esta planta no es urticante por lo cual no es realmente una ortiga (41).

d) Distribución geográfica: Se encuentra en los sitios áridos, en los barrancos asoleados de la tierra templada, aunque algunas veces llega hasta cerca de la costa. Nativo de México a Perú a 70-3,000 msnm. En Guatemala se encuentra en Alta Verapaz, Chimaltenango, Guatemala, Huehuetenango, Quetzaltenango, Quiché, Sacatepéquez, San Marcos y Santa Rosa (41).

e) Usos medicinales: La infusión de hojas y flores se usa para diarrea y pujos, inapetencia, indigestión, retención urinaria, reumatismo, nerviosismo y tos ferina. A la raíz se le atribuyen propiedades diuréticas, febrífugas y sudoríficas. El extracto de las hojas se a usado contra la sarna y otras infecciones de la piel. El tamizaje antibacteriano demuestra que la tintura de hojas tiene actividad contra *Salmonella typhi*. Se confirma la actividad contra *S. typhi*, *Streptococcus pneumoniae* y *S. pyogenes*, los mejores disolventes son etanol y acetona (41, 42).

f) Composición químicas: En la revisión realizada no se encontró información sobre la composición química de esta especie (42).

6. *Punica granatum* L.

a) Familia: *Punicaceae*

b) Nombres comunes: Granada, granada enana, granado, granado agrio, mata de granada.

c) Descripción: Arbusto ramificado, de hasta 6 m de altura. Tallo de corteza rugosa, de color gris. Hojas opuestas cortamente pecioladas, coriáceas, enteras, ovales, elípticas u oblongas, de 1-8 cm de largo, cortamente pecioladas, con tonos rojizos. Flores solitarias o agrupadas en los extremos de las ramas, Fruto de 5 a 10 cm de diámetro, pulpa blanca o rosada, coronado por el cáliz persistente, subgloboso, semillas angulares, envueltas en un arillo carnoso, rojizo con la testa coriácea. Cualquier época del año puede trasplantarse, siempre que se cuente con riego durante las primeras semanas de establecida la plantación (24,42).

d) Distribución geográfica: Se cultiva ampliamente en todas las regiones templadas y cálidas de ambos hemisferios, especialmente en los países mediterráneos, dada su poca resistencia a los fríos intensos. Nativo del sur de Asia (Irán y Afganistán), ampliamente cultivado en Asia y en la región Mediterránea, naturalizado en las partes áridas de Norte América y en regiones tropicales y subtropicales de América Latina hasta 1,800 msnm. En Guatemala se cultiva casi en todo el país excepto en regiones muy altas (24, 41, 42).

e) Usos medicinales: Las partes utilizables son, raíz y corteza del fruto, popularmente se utiliza como, antidiarreico, antihelmíntico y tenífugo. La decocción de la corteza del tronco o raíz se usan para expulsar *Tenia*. La decocción de cáscara del fruto, se usa para tratar afecciones gastrointestinales (diarrea, disentería, gastralgia, parasitosis), enfermedades respiratorias, metrorragia, y blenorragia, a esta se le atribuye propiedad astringente, emenagoga y vermífuga. El jugo del arilo circundante de las semillas es aplicado para limpieza de los ojos, en conjuntivitis. El jugo del fruto en jarabe se usa para expulsar parásitos, hipertensión, artritis, enfermedades urinarias, ictericia, diabetes. Tópicamente se usa en lavados vaginales para leucorrea, en gargarismos para amigdalitis, en enema para enteritis y en lavados para hemorroides y evitar abortos. La decocción de las semillas se usa

en el tratamiento de sífilis. A las flores se les atribuye propiedad astringente y tónica. En Cuba es usada para tratar úlceras, gripe y enfermedades pulmonares (32, 40-42).

f) Composición química: Peleterina y derivados de la piridina, presentes en la corteza del tronco. Acido pirogálico, ácido granatotánico, resinas, colorantes, oxalato de calcio, mucílagos. El fruto contiene, glucosa, fructosa, sucrosa y maltosa. Las hojas contienen 2-(2-propenil)Δ'piperideina) (42,32).

IV. JUSTIFICACIÓN

La vaginosis y vaginitis son infecciones vaginales muy frecuentes en la población, se presentan en cerca de una quinta parte de las mujeres que acuden a consulta ginecológica. La mayoría de las mujeres presentan al menos un episodio de vaginitis o de vaginosis durante el periodo fértil de su vida (1).

La vaginosis es causada por *G. vaginalis* y la vaginitis por especies de *Candida*. El fármaco de elección para estas infecciones es el metronidazol que puede causar efectos secundarios, como náusea y dolor de cabeza. Además en el interior del país el tratamiento farmacológico no es accesible para las pacientes por su alto costo. Por tal motivo es importante conocer otras alternativas de tratamiento.

Con el presente estudio se pretendió conocer experimentalmente la acción farmacológica sobre dichos microorganismos, de los extractos diclorometánico y metanólico de seis plantas nativas de Guatemala, utilizadas popularmente para el tratamiento de vaginitis y vaginosis (*Citrus aurantium*, *Cornutia pyramidata*, *Cecropia obtusifolia*, *Wigandia urens* var. *caracasana*, *Punica granatum* y *Euphorbia lancifolia*), para poder determinar si pueden ser usados como un tratamiento natural por parte de la población, o servir como modelos químicos para la elaboración de nuevos medicamentos.

V. OBJETIVOS

A. GENERAL

Demostrar la actividad inhibitoria *in vitro* que poseen los extractos diclorometánico y metanólico de seis plantas medicinales contra *G. vaginalis* y especies de *Candida*, causantes de afecciones vaginales.

B. ESPECÍFICOS

1. Evaluar la actividad *in vitro* de *C. aurantium*, *C. pyramidata*, *C. obtusifolia*, *W. urens* var. *caracasana*, *P. granatum* y *E. lancifolia* contra una cepa de *G. vaginalis* y seis especies de *Candida*.
2. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CIM) de los extractos con actividad positiva.

VI. HIPÓTESIS

Por lo menos uno de los extractos diclorometánicos o metanólicos de las seis plantas a evaluar posee actividad contra *G. vaginales* o especies de *Candida*.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. UNIVERSO DE TRABAJO

Plantas medicinales nativas de Guatemala utilizadas en el tratamiento de enfermedades vaginales:

B. MUESTRA

1. *Citrus aurantium* L. (naranja agria)
2. *Cecropia outusifolia* Bertoloi (guarumo)
3. *Cornutia pyramidata* L. (flor lila)
4. *Euophorbia lancifolia* Schlecht (ixbut)
5. *Punica granatum* L. (granada)
6. *Wigandia urens* var. *Caracasana* HBK (chichicaste)

C. CEPAS

1. *Candida albicans*
2. *Candida glabrata*
3. *Candida krusei*
4. *Candida parapsilosis*
5. *Candida stellatoidea*
6. *Candida tropicalis*
7. *Gardnerella vaginalis*

D. RECURSOS**1. Humanos**

a. Tesista

Andrea Azucena Salazar Cruz

b. Asesores

Licda. Isabel Cristina Gaitán Fernández

Lic. Armando Cáceres Estrada

2. Institucionales

- Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Laboratorio de Productos Naturales Farmaya, S.A.
- Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT)

3. Físicos

a. Equipo

- Balanza analítica Mettler AE 200 y Mettler PM 600
- Autoclave OMRON Miny Manual Timer STMW Y222
- Campana de flujo laminar bacteriológica Labconco Purifies Class II Biosafety Cabinet
- Incubadora Fisher Scientific Isotemp Incubador 37 °C
- Refrigeradora de 4-8°C ADMIRAL dualtemp y Fisher Scientific isotemp, de -80°C
- Vortex Thermolyne Maxi Mix II 27600
- Asas bacteriologicas en argolla
- Equipo de Rotavapor BÜCHI Flawil 461 Brinkmann Precisión

E. Reactivos

- Agar Base Columbia Marca Oxoid (CNA)
- Agar Muller Hinton
- Agar tripticasa soya
- Agua desmineralizada estéril
- Caldo Tripticasa soya
- Diclorometano
- Dimetil sulfóxido (DMSO)
- Etanol 50 %
- Etanol 95 %
- Metronidazol (disco de 50µg)
- Sangre de carnero

- Solución salina 0.85%

F. Materiales

- Algodón
- Bata blanca de manga larga
- Beakers de 250 y 1000 mL
- Cajas de Petri descartables, simples y cuadrilate
- Cinta adhesiva
- Cinta testigo
- Erlenmeyer de 1000 mL
- Espátula pequeña
- Fósforos
- Guantes de látex
- Jabón desinfectante
- Marcador permanentes
- Papel mayordomo
- Papel filtro
- Pipetas automáticas de 2-1000 μ L
- Probetas de 25 mL y 100 mL
- Tips amarillos de 10 a 200 μ L
- Tijeras
- Tubos de vidrio de fondo plano y con tapadera de rosca de 15 mL
- Vaso de precipitar de 100 mL
- Viales o frascos pequeños para almacenar el extracto

G. PROCEDIMIENTO

1. Elaboración de extractos

Se elaboraron extractos metanólicos y diclorometanólicos de seis plantas nativas de Guatemala, utilizadas popularmente para el tratamiento de vaginitis y vaginosis, tomando

en cuenta que fueran utilizadas con frecuencia y además que no hubieran sido ni estuvieran siendo estudiadas.

2. Extracción continua por percolación para obtener el extracto

- La materia seca vegetal se secó, trituró, molió y rotuló.
- En un percolador previamente limpio y seco se colocó un pedazo de algodón no muy grande, para usar como filtro en la parte inferior y se colocó papel filtro cortado en forma de embudo de acuerdo al diámetro del percolador.
- Se pesó la cantidad de material vegetal a utilizar.
- El percolador fue debidamente rotulado con el nombre científico de la planta, nombre común, fecha, peso, parte de la planta a utilizar y disolvente utilizado.
- El material vegetal se humedeció con diclorometano y metanol adecuado para la extracción, utilizando un vaso de precipitar.
- Se transfirió todo el material al percolador y se agregó etanol al 95% hasta cubrir el material vegetal. Se observó que no se formaran burbujas.
- Dependiendo del material vegetal, se dejó reposar el tiempo necesario para llevar a cabo la extracción.
- Pasado el tiempo de reposo, se abrió la llave de la parte inferior, y se dejó gotear el líquido a una velocidad adecuada.
- El líquido se recogió en un erlenmeyer, se añadió suficiente disolvente extra, según se requirió, hasta obtener el volumen de disolvente agregado al inicio.
- Luego se presionó el material sólido que quedó, y se añadió el líquido obtenido al percolador.

3. Concentración utilizando el rotavapor

- Fue necesario engrasar todas las bocas esmeriladas y armar el rotavapor. Colocar el balón colector y fijarlo con la llave respectiva.
- Se revisó el nivel del agua del baño de calentamiento.
- Se encendió el baño de María y se mantuvo a una temperatura de $40\pm 1^{\circ}\text{C}$.

- El baño con la muestra se colocó y se sujetó el vástago con la llave correspondiente.
- Luego se encendió la bomba de vacío durante el tiempo necesario para iniciar la destilación.
- Se inició la destilación del extracto con recuperación del disolvente hasta obtener una consistencia semisólida.
- El extracto concentrado se vertió en una caja de Petri de vidrio debidamente tarada y rotulada.
- Durante 7 a 15 días se colocó el extracto en una desecadora, dependiendo del estado en que se encontraba la planta.
- Cuando el extracto tuvo consistencia sólida se transfirió a viales tarados y rotulados.
- Se calculó el rendimiento del extracto y se guardó en viales a 4°C.

4. Bioensayo para *G. vaginalis*

El bioensayo se llevó a cabo por una evaluación de la actividad de los distintos extractos en presencia de *G. vaginalis*, obtenida del cepario del Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, y para ello fue necesario preparar agar CNA, en cajas de petri e impregnar taxos con 50 µL de cada uno de los extractos

a. Preparación de los extractos de las plantas:

- Se pesó 50 mg de cada extracto y se disolvieron en 1 mL de DMSO para obtener una concentración final de 10 mg/mL.
- Se mezclaron 800 µL de los extractos con DMSO y 3,200 µL de etanol al 50%. (1mg/mL).
- Se impregnaron cuatro discos por cada extracto con 50 µL de la solución, cuatro discos con la solución de metronidazol (50 µg) como control positivo y cuatro discos con etanol al 70%, como control negativo, lo que hizo un total de 32 discos.

b. Preparación de agar CNA en bicapa

- Se añadieron 39 g de agar Columbia a 1000 mL de agua destilada

- Se llevó a ebullición hasta lograr una disolución completa.
- Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
- Se enfrió a 50°C y se agregó un 5% de sangre de carnero.
- Se rehidrató un vial de suplemento selectivo Gardnerella SR0070E, Marca Oxoid con 5 ml de etanol al 95%.
- Se agregó 5 mL de suplemento rehidratado en 500 mL del agar Columbia previamente preparado.
- En cajas de petri estériles se agregó una fina capa del agar sin sangre y cuando se solidificó se le agregó encima una capa de agar con sangre y suplemento. Se dejó solidificar y se refrigeró hasta su uso.

c. Preparación del inóculo

Se preparó una suspensión de colonias frescas con solución salina estéril, (comparándolo con el estándar de Mac Farland 0.5).

d. Inoculación de las placas

- Se inoculó el agar con un hisopo de algodón estéril, previamente sumergido en el inóculo estandarizado y se retiró el exceso rotándolo contra las paredes internas.
- Se estriaron las placas en tres direcciones, rotando la caja en un ángulo de 60° después de cada aplicación, se dejaron secar por 5 a 10 minutos antes de colocar los discos.

e. Colocación de los discos

- Con pinzas estériles, se colocaron totalmente al azar seis discos en cada caja, en forma equidistante.
- Las cajas se incubaron a 36°C en presencia de CO₂ por 48 horas.

f. Medición de las zonas de inhibición

Se midieron los halos de inhibición alrededor de cada disco con una regla calibrada.

g. Interpretación de resultados

Actividad negativa: halos menores de 6 mm alrededor del disco.

Actividad positiva: halos mayores de 6 mm alrededor del disco.

5. Bioensayo para *Candida*

a. Preparación de cajas con agar extracto.

- Se preparó una solución de cada extracto con una concentración de 10 mg/mL, disolviendo 50 mg de extracto en 1 mL de DMSO
- Se tomaron 800 µl de extracto con DMSO y 3,200 µL de etanol al 50%.
- Luego se preparó 13.5 mL de agar sabouraud en tubo.
- En una caja de petri se agregó 1.5 mL del extracto preparado (1:10), y 13.5 mL de agar sabouraud, se homogenizó y dejó solidificar el medio. Se refrigeró hasta su uso.

b. Preparación del inóculo

- Las especies de *Candida* a ensayar fueron purificadas e inoculadas en cajas de agar sabouraud.
- Se incubaron por 24 horas. Luego se inoculó una asada del cultivo en 5 mL de caldo sabouraud, se incubó a 36°C por 48 horas.
- Se diluyeron 50µL de la suspensión anterior en 4.5 mL de solución salina estéril (1:100).

c. Demostración de la actividad antibacteriana

- En las cajas con agar planta, se inoculó una asada de cada uno de los microorganismos siguiendo el patrón de la plantilla, se hicieron cuatro repeticiones por microorganismo, y se incubaron a 37°C por 48 horas.
- Como control negativo, se utilizó, 13.5 mL de agar sabouraud, mezclándolo con 1mL de etanol al 50%.

d. Interpretación de resultados

Depende del crecimiento a lo largo del inóculo.

Actividad negativa: Si hubo crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo.

Actividad positiva: Si no hubo crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo.

Contaminación: Presencia de microorganismos fuera del inóculo.

A los extractos que presentaron efecto inhibitorio en el bioensayo, se les determinó su concentración inhibitoria mínima (CIM), a diferentes valores de concentración para evaluar el efecto inhibitorio que causa cada uno de los extractos sobre el crecimiento de especies de *Candida* y el valor de sus CIM, para ello:

Se prepararon las cajas cuadruplicate con las siguientes diluciones del extracto:

Concentración

1.0 mg/mL = 3.6 mL de agar + 0.4 mL de solución del extracto

0.5 mg/mL = 3.8 mL de agar + 0.2 mL de solución del extracto

0.25 mg/mL = 3.9 mL de agar + 0.1 mL de solución del extracto

Control (-) = 4.0 mL de agar.

Se inocularon tres estrías de cada microorganismo con un asa bacteriológica en cada uno de los cuadrantes. Se incubó a 36°C durante 48 horas. Se realizó la lectura y se interpretan los resultados de acuerdo a su actividad.

H. Diseño estadístico

1. Tipo de Estudio

Experimental. Diseño completamente al azar. Con un total de cuatro réplicas por cada microorganismo analizado, para un nivel $\alpha = 0.10$. La determinación de la actividad bactericida se basó en la inhibición del crecimiento a partir de una concentración de 1 mg/mL.

2. Variables

- a. Variable dependiente. Actividad bactericida de los extractos etanólicos y diclorometanólicos de las plantas seleccionadas, en el crecimiento de *G. vaginalis* y seis especies de *Candida*.
- b. Variable independiente. Plantas nativas de Guatemala utilizadas empíricamente para el tratamiento de vaginitis y vaginosis.

3. Validez del método

Actividad bactericida de los extractos. En el bioensayo para *G. vaginalis* se utilizaron como control positivo cuatro discos impregnados con solución de metronidazol (50 µg), los que presentaron un 100% de inhibición de la bacteria; y como control negativo se utilizaron cuatro discos impregnados con etanol al 50% los cuales no presentaron inhibición. En el bioensayo para las especies de *Candida* solo fue necesario un control negativo para lo que se utilizó 13.5 mL de agar sabouraud con 1 mL de etanol al 50% donde hubo crecimiento óptimo de las especies de *Candida* ensayadas.

4. Análisis de datos

Los datos fueron tabulados y posteriormente analizados de acuerdo a los parámetros anteriormente descritos. Se realizó una prueba de hipótesis binomial donde:

Ho. $P \leq 0.5$ (el extracto no tiene efecto)

Ha. $P > 0.5$ (el extracto si tiene efecto)

Se espera que para rechazar Ho se obtengan cuatro repeticiones exitosas de los extractos probados

VIII. RESULTADOS

A. SELECCIÓN DE PLANTAS

Las plantas utilizadas en el estudio se seleccionaron por ser plantas nativas de Guatemala, utilizadas popularmente para el tratamiento de vaginitis y vaginosis. Tomando en cuenta la frecuencia de su uso y que no hubieran sido estudiadas para estas afecciones. En la tabla 1 se describe cada una de ellas, mencionando la familia, nombre científico, nombre común, número de herbario y parte utilizada en el estudio para la elaboración de los extractos metanólico y diclorometánico.

Tabla 1. Descripción de las plantas en estudio

Familia	Nombre científico	Nombre común	*No. Herbario	Parte utilizada
Rutacea	<i>Citrus aurantium</i> L.	Naranja agria	977	Pericarpio
Verbenacea	<i>Cornutia pyramidata</i> L.	Flor lila	991	Hojas y flores
Euphorbiacea	<i>Euphorbia lancifolia</i> Schlecht.	Ixbut	995	Hojas y tallo
Moraceae	<i>Cecropia obtusifolia</i> Bertoloi	Guarumo	979	Hoja
Hidrophyllaceae	<i>Wigandia urens</i> var. <i>caracasana</i> HBK.	Chichicaste	1,066	Flores
Punicacea	<i>Punica granatum</i> L.	Granada	990	Pericarpio

Fuente: Experimental Banco de datos listado de extractos Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia Depto. de Citohistología USAC,

* Número de herbario proporcionado por FARMAYA

B. ACTIVIDAD CONTRA ESPECIES DE *Candida*

El tamizaje de actividad contra las distintas especies de *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea* y *C. glabrata*) presentó que *C. albicans* y *C. krusei* no son inhibidas por ningún extracto ensayado, *C. parapsilosis* es inhibida por los extractos en diclorometano de *C. aurantium*, *C. obtusifolia* y por los extractos en metanol de *C. pyramidata*, *P. granatum* y *E. lancifolia*.

En el caso de *C. tropicalis* el extracto diclorometánico de *P. granatum* es el único que no inhibe su crecimiento, *C. stellatoidea* es inhibida por la mayoría de los extractos ensayados, excepto por los extractos metanólico de *C. aurantium* y extracto diclorometánico de *P. granatum*, por último, *C. glabrata* es inhibida únicamente por el extracto metanólico de *P. granatum* (tabla 2).

Tabla 2 Tamizaje de los extractos contra seis especies de *Candida*

Plantas	Parte utilizada	Disolvente	A	B	C	D	E	F
<i>Citrus aurantium</i>	Pericarpio	Diclorometano	-	-	+	+	+	-
<i>Citrus aurantium</i>	Pericarpio	Metanol	-	-	-	+	-	-
<i>Cornutia pyramidata</i>	Hojas y flores	Diclorometano	-	-	-	+	+	-
<i>Cornutia pyramidata</i>	Hojas y flores	Metanol	-	-	+	+	+	-
<i>Cecropia outusifolia</i>	Hojas	Diclorometano	-	-	+	+	+	-
<i>Cecropia outusifolia</i>	Hojas	Metanol	-	-	-	+	+	-
<i>Wigandia urens</i> var. <i>caracasana</i>	Flores	Diclorometano	-	-	-	+	+	-
<i>Wigandia urens</i> var. <i>caracasana</i>	Flores	Metanol	-	-	-	+	+	-
<i>Punica granatum</i>	Pericarpio	Diclorometano	-	-	-	-	-	-
<i>Punica granatum</i>	Pericarpio	Metanol	-	-	+	+	+	+
<i>Euphorbia lancifolia</i>	Hojas y tallo	Diclorometano	-	-	-	+	+	-
<i>Euphorbia lancifolia</i>	Hojas y tallo	Metanol	-	-	+	+	+	-

Fuente: datos obtenidos en el estudio

A: *C. albicans*

B: *C. krusei*

(+): Actividad positiva a una concentración ≤ 1 mg/mL

C: *C. parapsilosis*

D: *C. tropicalis*

E: *C. stellatoidea*

F: *C. glabrata*

(-): Actividad negativa a una concentración ≥ 1 mg/mL

A los extractos que en el tamizaje demostraron tener actividad positiva contra las especies de *Candida* ($p < 0.10$) se les determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) siendo de 0.5 mg/mL para *C. aurantium* en diclorometano y *P. granatum* en metanol, y de 1 mg/mL para *C. pyramidata* en metanol, que inhiben el crecimiento de *C. parapsilosis*. De 0.5 mg/mL para *P. granatum* en metanol que inhibe a *C. tropicalis* y de 1mg/mL para *Wigandia urens* var. *caracasana* en diclorometano que inhibe a *C. stellatoidea* (tabla 3).

Tabla 3. Determinación de la concentración inhibitoria minima (CIM) de los extractos (mg/mL)

Planta	Parte utilizada	Disolvente	C	D	E
<i>Citrus aurantium</i>	Pericarpio	Diclorometano	0.5	-	-

<i>Citrus aurantium</i>	Pericarpio	Metanol	-	-	-
<i>Cornutia pyramidata</i>	Hojas y flores	Diclorometano	-	-	-
<i>Cornutia pyramidata</i>	Hojas y flores	Metanol	1	-	-
<i>Cecropia outusifolia</i>	Hojas	Diclorometano	-	-	-
<i>Cecropia outusifolia</i>	Hojas	Metanol	-	-	-
<i>Wigandia urens</i> var. <i>caracasana</i>	Flores	Diclorometano	-	-	1
<i>Wigandia urens</i> var. <i>caracasana</i>	Flores	Metanol	-	-	-
<i>Punica granatum</i>	Pericarpio	Diclorometano	-	-	-
<i>Punica granatum</i>	Pericarpio	Metanol	0.5	0.5	-
<i>Euphorbia lancifolia</i>	Hojas y tallo	Diclorometano	-	-	-
<i>Euphorbia lancifolia</i>	Hojas y tallo	Metanol	-	-	-

Fuente: datos obtenidos en el estudio

C: *C. parapsilosis*

D: *C. tropicalis*

E: *C. stellatoidea*

(-): Actividad negativa a una concentración >1 mg/mL

C. Actividad contra *G. vaginalis*

La tabla 4 presenta los resultados del tamizaje contra *G. vaginalis*; donde se observa que ninguno de los extractos ensayados presenta actividad positiva contra la bacteria ($p > 0.10$).

Tabla 4. Tamizaje de la actividad *in vitro* contra *Gardnerella vaginalis*

Planta	Parte utilizada	Disolvente	Actividad
<i>Citrus aurantium</i>	Pericarpio	Diclorometano	-
<i>Citrus aurantium</i>	Pericarpio	Metanol	-
<i>Cornutia pyramidata</i>	Hojas y flores	Diclorometano	-
<i>Cornutia pyramidata</i>	Hojas y flores	Metanol	-
<i>Cecropia outusifolia</i>	Hojas	Diclorometano	-
<i>Cecropia outusifolia</i>	Hojas	Metanol	-
<i>Wigandia urens</i> var. <i>caracasana</i>	Flores	Diclorometano	-
<i>Wigandia urens</i> var. <i>caracasana</i>	Flores	Metanol	-
<i>Punica granatum</i>	Pericarpio	Diclorometano	-
<i>Punica granatum</i>	Pericarpio	Metanol	-

<i>Euphorbia lancifolia</i>	Hojas y tallo	Diclorometano	-
<i>Euphorbia lancifolia</i>	Hojas y tallo	Metanol	-

Fuente: datos obtenidos en el estudio

(-): actividad negativa

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las plantas seleccionadas para el estudio (tabla 1) son usadas comúnmente con la finalidad de prevenir y eliminar la inflamación e infecciones vaginales. Por lo tanto se esperaba que presentaran actividad inhibitoria contra *Gardnerella vaginalis* y especies del género *Candida*, con el objetivo de obtener diversas fracciones se emplearon los solventes metanol y diclorometano.

En la tabla 2, se muestran los resultados del tamizaje de actividad contra las distintas especies de *Candida*, tomando como punto de corte una concentración de 1mg/mL. Se puede observar que *C. albicans* y *C. krusei* no son inhibidas por ningún extracto ensayado, entre tanto que *C. parapsilosis*, *C. stellatoidea*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* son

inhibidas aunque no por todos los extractos. Estas inhibiciones demuestran que en las partes de las plantas utilizadas, existe algún metabolito responsable de la inhibición, es probable que en alguna otra parte de la planta (corteza, hojas, raíces, etc.) estén presentes a mayor o menor concentración.

A los extractos que presentaron actividad biológica en el bioensayo se les determinó la CIM (tabla 3) haciendo varias diluciones del extracto (1.0, 0.5 y 0.25 mg/mL) para evaluar el efecto inhibitorio que causa cada uno sobre el crecimiento de las especies de *Candida*. El extracto metanólico de pericarpio de *P. granatum* presentó actividad biológica ($p < 0.10$) contra *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* a una concentración de 0.5 mg/mL, según estudios hechos por Vasconcelos (43), el extracto acuoso de *P. granatum* posee efectos antifúngicos similares al miconazol, esto se confirma con el resultado anterior, aunque no se conoce el mecanismo de acción, ni cual es el metabolito responsable de la inhibición, sin embargo puede deberse a la presencia de la peleterina que es un alcaloide que se le atribuyen propiedades ténicas y desinflamatorias (11). El extracto diclorometánico de pericarpio de *C. aurantium* presentó actividad biológica ($p < 0.10$) contra *C. parapsilosis* a una concentración de 0.5 mg/mL. Esta actividad puede atribuirse a que los principales metabolitos con actividad biológica que presenta *C. aurantium* son los flavonoides, que poseen propiedades muy apreciadas en medicina, como antimicrobianos (44).

El extracto metanólico de hojas y flores de *C. pyramidata* presentó actividad biológica ($p < 0.10$) contra *C. parapsilosis* a una concentración de 1 mg/mL. No se ha encontrado ningún estudio relacionado, pero es importante indicar que la decocción de las hojas se utiliza para flujos vaginales (26). El extracto diclorometánico de flores de *W. urens* var. *caracasana* presentó actividad biológica ($p < 0.10$) contra *C. stellatoidea* a una concentración de 1 mg/mL. Se han realizado otros estudios donde se encontró que la tintura de hojas tiene actividad contra *Salmonella typhi*, *Streptococcus pneumoniae* y *S. pyogenes*, esta actividad se atribuye a la fibetina (fibidenolon) un flavonol ácido y a la naringenina, una flavona ácida soluble en etanol que presenta actividad contra bacterias y virus (36). *C. albicans*, *C. krusei* y *C. glabrata* no fueron inhibidas ($p > 0.10$) por ninguno de los extractos ensayados, lo que indica que ninguno posee metabolitos inhibidores de estas especies de *Candida*.

En la tabla 4 se presentan los resultados obtenidos del tamizaje realizado con los extractos en diclorometano y metanol, de las plantas en estudio contra *G. vaginalis*, de los cuales ninguno presentó actividad ($p < 0.10$). Esto puede deberse a que la parte de la planta que se utilizó no posee los metabolitos inhibitorios o están presentes en concentraciones bajas, no efectivas contra la bacteria.

X. CONCLUSIONES

1. El extracto metanólico de pericarpio de *P. granatum* presentó actividad biológica significativa ($p < 0.10$) contra *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* a una concentración de 0.5 mg/mL.
2. El extracto diclorometánico de pericarpio de *C. aurantium* presentó actividad biológica significativa ($p < 0.10$) contra *C. parapsilodes* a una concentración de 0.5 mg/mL
3. El extracto metanólico de hojas y flores de *C. pyramidata* presentó actividad significativa ($p < 0.10$) contra *C. parapsilosis* a una concentración de 1 mg/mL

4. El extracto diclorometánico de flores de *W. urens* var. *caracasana* presentó actividad significativa ($p < 0.10$) contra *C. stellatoidea* a una concentración de 1mg/mL.
5. *C. albicans*, *C. krusei* y *C. glabrata* no fueron inhibidas por ninguno de los extractos del estudio ($p > 0.10$).
6. De las plantas estudiadas, la que presenta mayor efecto inhibitorio contra las especies de *Candida* en estudio es el extracto metanólico de pericarpio de *P. granatum* a una concentración de 0.5mg/mL.
7. *G. vaginalis* no fue inhibida ($p > 0.10$) por ninguno de los extractos con diclorometano y metanol evaluados.

XI. RECOMENDACIONES

1. Continuar las investigaciones con las plantas que demostraron actividad al tamizaje in vitro, pero usando otras partes de la planta para conocer donde esta la mayor actividad contra los microorganismos de interés.
2. Investigar la actividad de los extractos positivos (*C. aurantium*, *C.pyramidata*, *W. urens* var. *caracasana* y *P. granatum*) contra otros microorganismos causales de afecciones vaginales como *Tricomonas vaginalis*.

3. Realizar estudios que permitan, el uso de los extractos con actividad, para la preparación de productos fitoterapéuticos.

XII. ANEXOS

Citrus aurantium L.



Nombre común: Naranja agrio, Naranja amargo

Fotografía tomada por A.C. Estrada

***Cornutia pyramidata* L.**



Nombre común: Flor lila (Guatemala), hoja de zope (Izabal); lat-che (Peten); bwa kasav (República Dominicana); tzultesnuk y matasano en Honduras.

Fotografía tomada por A.C. Estrada

***Euphorbia lancifolia* Schlecht.**



Nombre común: Ixbut, sapillo, hierba lechera

Fotografía tomada por A.C. Estrada

Cecropia
Bertoloi



obtusifolia

Nombre común: Choop. Guarumo, Igarata, Ix-coch.

Fotografía tomada por J.F Yoder

Wigandia urens
HBK



var. caracasana

Nombres comunes: Chichicaste, chichicaste de caballo, mata pulga, ortiga de montaña, chocón, tabaquillo

Fotografía tomada por G.A Cooper

Punica granatum L

Nombres comunes: Granada, granada enana, granado, granado agrio, mata de granada.

Fotografía tomada por

J.A Yoder



XII.

1. Cauce S. *et al.* the interaction of *vaginalis* blood cells.

acta. 1993. (p.1153-1158).

2. Jonathan SB. Ginecología de NOVAK. 13. ed. México: Editorial McGraw–Hill, 2003. 830p. (p.372-375).
3. Forbes B. *et al.* Diagnostic Microbiology. 11. ed. Estados Unidos de América: Editorial Mosby, 2002. 1400p. (p.942-943).

REFERENCIAS

Factors regulating of *Gardnerella* hemolysin with red Biochim biophys

4. Montes AL. Estudio de la actividad antibacteriana *in vitro* contra *Gardnerella vaginalis* de seis plantas de la flora guatemalteca. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1993.45p.
5. Palacios M. Inhibición del crecimiento de *Gardnerella vaginalis* por seis plantas de uso medicinal de la flora sur occidental Guatemalteca. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2004. 46p.
6. Samayoa C. Inhibición de *Gardnerella vaginalis* por extractos vegetales utilizados en el nororiente de Guatemala para el tratamiento de vaginitis. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2004. 52p.
7. Murria P. *et al.* Clinical Microbiology. 8. ed. Estados Unidos de América: Editorial ASM press, 2003. 780p. (p.315, 495-496).
8. Braunwald E. *et al.* Principios de Medicina Interna. 15. ed. México: Editorial McGraw Hill, 2002. 2,500p. (p.998-999).
9. Brooks G. *et al.* Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 16. ed. México: Editorial Manual Moderno, 1998. 1,200p. (p.337-338, 734-853).
10. Black JG. Microbiology Principles and explorations. 4. ed. Estados Unidos de América: Editorial John Wiley & Sons, 1999. 715p. (p.288-302).
11. Cook RL. *et al.* Clinical, Microbiological, and Biochemical Factors in recurrent Bacterial Vaginosis. Journal of Clinical Microbiology 1992; 30:98-101.
12. Holmes KK. *et al.* Sexually Transmitted Diseases. United States of America: Editorial McGraw Hill, 1984. 318p. (p.183-185).
13. Bennett JC. Plum F. Tratado de medicina interna de Cecil. 20. ed. México: Editorial Interamericana McGrawHill, 1996. 870p. (p.212-216).
14. El Manual Merck. 9. ed. España: Harcourt Brace Sociedad Anónima, 1997. 3,800p (1,122-1,124).
15. Barberis IL. *et al.* A biotype study of *Gardnerella vaginalis* isolated from patients with and without symptoms of Bacterial vaginosis. Enfer Infecc Microbiol Clin 1999; 17(10):506-508.

16. Morales AS. Inhibición *In vitro* de *Trichomonas vaginalis* por extractos acuosos y vegetales de uso popular. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1990. 53p.
17. Ocampo RA. Domesticación de plantas medicinales en Guatemala. Guatemala: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 1994. 213p.
18. Martín G. Ethnobotany a Methods Manual. WWF International/UNESCO, Royal Botanic Gardens, Kew, UK. Chapman & Hall Great Britain. 2000; 268.
19. Universidad de San Carlos de Guatemala. Etnobotánica y Conservación de los Recursos Fitogenéticos de uso Medicinal presentes en Guatemala. Proyecto Piloto. DIGI, 1988. p 29.
20. Koklik WK, Willey Hp y Amos DN. Zinsser Microbiología. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana, Doc. Tec. No. 17, 1983. 1,300p. (p.685-717).
21. Okunade K. *et al.* Flora of the British West Indian Islands. Rev. Plant Med 2004; 526:165-167.
22. Faillace R. Tinidazol-tratamiento en la dosis única para la vaginitis debida a *Gardnerella vaginalis*. Ensayo clínico controlado doble ciego en 40 pacientes, realizado en la asociación Pro-bienestar de la Familia (APROFAM). Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Medicas) 1987. p. 53.
18. Fletes LM. confirmación de la acción antibacteriana *in vitro* de cuatro plantas de la flora silvestre guatemalteca. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1990. p.42.
19. Standley PC, Williams LO. Flora of Guatemala. Fieldiana: Botany, vols.24, vol.9, 1970. 418p. (p.196-198).
20. Harold N. A monograph pf the genus *Cornutia*, in Fedde, Rep.Sp. 1886;40:153-205.
21. Gibson DN. Verbenaceas. Flora of Guatemala. Fieldana: Botany 1989. (p.196-197).
22. Robineau L. Farmacopea Caribeña. Martinique, Francia: Editorial Emile Désormeauz, 1996. 380p. (p.113-114).
23. Comerford SC. Medicinal plants of two Mayan healers from San Andres, Peten, Guatemala: Econ Bot. 1996. 320p.

24. Guevara CI. Plantas Medicinales utilizadas por los Itzáes. San José, Petén. Guatemala: Asociación Bioitza. 2001. 118p. (p.111-118)
25. Pineda M. Fotoquímica de algunas plantas Tramil. Tramil IV. Honduras: UNAH, 1990. 410p.
26. Cáceres A. Plantas de uso medicinal en Guatemala. Guatemala: Editorial Universitaria, 1996. 402p. (p.302-304).
27. Martínez M. Plantas útiles de la flora mexicana. México: Editorial Botas, 1979. 544p. (p.313-315).
28. Roig JT. Diccionario botánico de nombres vulgares cubanos. La Habana, Cuba: Editorial Científico-Técnica, 1984. 530p. (p.233-241).
29. Cáceres A. *et al.* Screening of antimicrobial activity of plants popularly used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. *J Ethnopharmacology* 1991;31(3):263-276.
30. Ocampo RA. Domesticación de plantas medicinales en Guatemala. Guatemala: Centro Agronómico Tropical de investigación y Enseñanza, 1994.132p. (p.13-20).
31. Linares E. *et al.* Selección de plantas Medicinales de México. México: Editorial Limusa, 1988. 121p. (p.50-51).
32. Standley PC, Steyermark JA. Flora of Guatemala. Fieldiana: Botany, vols. 24, vol.2, 1970. 466p.
33. King XM, Haddock N. The phytochemical investigation of *Cecropia peltata*. *J. Am.Pharm. Asso.*1999;48:129-130.
34. Guarán DM. La actividad lactogénica del Ixbut (*Euphorbia lancifolia*) y su posible efecto a nivel de síntesis proteica medida por el cambio de ácidos nucleicos (ADN y ARNm).Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación, facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1994. 47p.
35. Gibson, DN. Verbenacea. Flora of Guatemala. Fieldiana: Botany 1970. 455p. (p.109-111).
36. Cáceres A, Samayoa B. Tamizaje de la actividad antibacteriana de plantas usadas en Guatemala para el tratamiento de afecciones gastrointestinales. Cuaderno de investigación No. 6-89 Dirección general de investigación USAC. Guatemala. 138p.

37. Morton JF. Atlas of medicinal Plants of Middle América. Sprigfield, Charles C Thomas Publisher, 1981. 1420p.
38. Girón LM. Investigación de la inhibición de *Candida albicans* por preparaciones de plantas usadas en la medicina popular. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1983. 78p.
39. Zin J. Weiss C La salud por medio de las plantas Medicinales. Santiago, Chile: Editorial Saleciana, 1980. 387p.
40. Díaz JL. Uso de las plantas medicinales en México. México: IMEPLAM. 1976. 379p.
41. Agarwal VS, Ghosh B. Drug Plants of India (Root drugs) New Delhi: Kalyani Publishers, 1989. 330p.
42. Glasby JS. Dictionary of plants Containing Secondary Metabolites. London, France: Taylor& Francis publishers, 1991. 323p.
43. Vasconcelos L, Sampaio M, Sampaio FC, Higinio JS. Use of *Punica granatum Linn* as an antifungal agent against candidosis associated with denture stomatitis. *Mycoses* 2003;46:192-196.
44. Gerozanno, H.; Blacno, S.; Robin, J.H. Contenido de glicósidos de flavonoides en frutos inmaduros en *Citrus aurantium* y *Citrus sinensis* del noroeste argentino en *Información Tecnológica*, ISSN 0716-8756, Vol 13, nº3, 2002. 53