

## 1. RESUMEN

Las infecciones vaginales se encuentran entre las enfermedades que más se presentan en ginecología. La vaginitis es la inflamación de la mucosa de la vagina y obedece a diversas etiologías. Los principales microorganismos causales de vaginitis son *Trichomonas vaginalis* y *Candida* spp.

La vaginosis bacteriana es la infección de tejidos vaginales, generalmente por transmisión sexual. La vaginosis es más frecuente durante el periodo fértil y aunque su etiología es polimicrobiana se ha visto que uno de los agentes infecciosos más importante es *Gardnerella vaginalis*, identificada en la década de 1950 por Leopod, Gardner y Dukes.

En Guatemala, el uso de plantas medicinales para el tratamiento de infecciones vaginales es una práctica popular, que ha sido heredada de generación en generación. Con este estudio se desea comprobar y validar la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos y diclorometánicos de ocho especies de plantas medicinales utilizadas para el tratamiento de infecciones vaginales contra *G. vaginalis* y cinco especies de *Candida* para poder ser utilizados como una alternativa al tratamiento farmacológico.

A los extractos que presentaron actividad ( $p < 0.10$ ) contra alguna de las especies de *Candida* se les determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM). El crecimiento de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilopsis* y *C. krusei* fue inhibido por el extracto metanólico de *Punica granatum* a una concentración de 0.5 mg/mL. *C. tropicalis* mostró inhibición a una concentración de 1 mg/mL.

*G. vaginalis* no fue inhibida por los extractos metanólicos y diclorometánicos ensayados lo que indica que las partes de las plantas utilizadas no poseen los metabolitos necesarios para inhibir el crecimiento de dicho microorganismo.

## 2. INTRODUCCION

El hombre primitivo debió adquirir conocimientos que le eran útiles al determinar cuales plantas podrían tener un valor alimenticio y cuales podrían provocarles la muerte; los poderes curativos de ciertas hierbas, raíces, jugos, hongos, etc., se debieron haber conocido por necesidad o por accidente. Una vez estos atributos fueron conocidos, se utilizaron como tratamiento antimicrobiano, para enfermedades gastrointestinales, para enfermedades de la piel, u otras aún más graves; toda esta información indudablemente se ha transmitido de generación en generación.

La búsqueda de compuestos con actividad antimicrobiana es de gran trascendencia debido a la dificultad que se presenta al combatir enfermedades causadas por microorganismos patógenos. Se ha incrementado súbitamente el interés del hombre en plantas medicinales en estos últimos años, debido a muchos factores, entre ellos podemos mencionar el interés por un tratamiento más natural y la disminución de costos.

Guatemala es un país ecológica y culturalmente privilegiado, tanto por su ubicación geográfica y gran diversidad genética, como por la riqueza cultural. Sin embargo, es muy poco lo que se ha investigado sobre estas importantes fuentes de saber y el uso de los productos naturales.

En nuestro país la vaginitis es uno de los problemas más comunes en ginecología. La vaginosis bacteriana es la infección de tejidos vaginales, generalmente por transmisión sexual, en cambio la vaginitis es la inflamación de la mucosa de la vagina y obedece a diversas etiologías entre las que podemos mencionar a las especies de *Candida*. La vaginosis es más frecuente durante el periodo fértil y aunque su etiología es polimicrobiana se ha visto que uno de los agentes infecciosos más importantes es *G. vaginalis* (1,2).

Existen prácticas de medicina tradicional, que generalmente se acompañan de plantas medicinales, con este estudio se desea comprobar y validar la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos y diclorometánicos de las siguientes plantas de uso medicinal: *Smilax dominicensis* (zarzaparrilla), *Phlebodium pseudoaureum* (calahuala), *Dioscorea alata* (ñame), *Citrus aurantium* (naranja agria), *Ananas comosus* (piña), *Punica*

*granatum* (granada), *Hamelia patens* (chichipín) y *Brosimum alicastrum* (ramón), contra microorganismos de importancia médica, como *G. vaginalis*, *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilopsis* y *C. tropicalis*, que causan vaginosis y vaginitis.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1. Microbiota vaginal normal

La microbiota vaginal ha sido estudiada desde 1892 por Döderlein cuando describió el patrón normal que se observa en la mujer en edad reproductiva la cual está constituida por microorganismos aerobios, anaerobios y bacilos de Döderlein estos en conjunto le confieren un pH a la vagina que oscila entre 4-5 (2,3).

El estímulo hormonal determina la proliferación de las células epiteliales que aumentan su contenido de glucógeno. Este es utilizado por *Lactobacillus* spp. Siendo el ácido láctico el producto final del metabolismo que ocasiona un descenso importante del pH. La acidez resultante inhibe muchas bacterias. En la mujer en edad reproductiva predominan distintas especies de lactobacilos, otros bacilos Gram positivo y menor número de cocos Gram positivo (*Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., etc.). También pueden encontrarse en bajo número Actinomyces, bacilos Gram negativo anaerobios como Bacteroides y distintas especies de enterobacterias. *S. agalactiae* (grupo B) se aísla en un porcentaje variable a esta edad. Si bien no suele producir enfermedad en la mujer, su presencia implica riesgo para el recién nacido, en el cual puede causar enfermedad severa (3).

La composición de la microbiota depende del contenido de estrógenos. Durante la gestación, a medida que el embarazo progresa, aumenta la densidad de lactobacilos y disminuyen los bacilos Gram negativo anaerobios y facultativos, el resultado es un mecanismo que reduce el riesgo de bacteriemia grave durante el parto y el puerperio. También puede aumentar la cantidad de levaduras y, eventualmente, pueden causar síntomas (3,4).

En la etapa prepuberal predominan microorganismos de origen cutáneo y perineal: *Staphylococcus epidermidis*, *Propionibacterium* spp., pueden aislarse levaduras en escaso número, al igual que enterobacterias y algunos bacilos Gram negativo anaerobios (3).

En la mujer postmenopáusica, al cesar el estímulo hormonal, la microbiota retorna al patrón de la infancia. La microbiota vaginal juega un papel muy importante en la protección frente a infecciones vaginales (4).

### **3.2. Microbiota vaginal alterada**

Como ya se mencionó la microbiota vaginal está compuesta por un delicado ecosistema en el que los lactobacilos tienen un papel fundamental en la defensa frente a los patógenos que causan infecciones ya que crean condiciones desfavorables para que estos microorganismos patógenos puedan proliferar y colonizar la vagina (3,4).

La utilización de antibióticos, alteraciones en la inmunidad, incluso situaciones de estrés pueden causar un descenso de los lactobacilos lo cual es aprovechado por los patógenos para proliferar en la vagina y se produce un proceso infeccioso de la vagina. Es por ello que ante una infección vaginal, debe no solo tratarse el microorganismo causal con el tratamiento específico para él, sino que también hay que procurar que se recupere el equilibrio del ecosistema vaginal mediante la administración de lactobacilos (3,4).

### **3.3. Vaginosis**

Es definida como la infección de los tejidos vaginales y se caracteriza microbiológicamente por una alteración compleja de la microbiota vaginal, en la cual los lactobacilos decrecen en número ocasionando el crecimiento de diversas bacterias patógenas anaeróbicas, siendo el agente infeccioso más importante *G. vaginalis*; estas infecciones pueden ocurrir en mujeres sexualmente activas como en mujeres con ausencia de relaciones sexuales (4,19).

La vaginosis aumenta el riesgo de padecer Enfermedad Inflamatoria Pélvica, endometritis postparto, corioamnionitis, rotura prematura de membranas (2,4).

#### **3.3.1. Etiología y factores predisponentes de vaginosis**

*Gardnerella vaginalis* es el principal agente etiológico causante de la vaginosis, la cual está presente en la vagina del 40% de las mujeres asintomáticas pero se halla en gran cantidad en más del 95% de las pacientes con vaginitis. En la vaginosis causada por *G.*

*vaginalis* pueden hallarse gran cantidad de bacterias en la superficie de las células en el flujo vaginal denominadas células clave que son características de la infección. Otros agentes causales de vaginosis son: *Mobiluncus* spp., *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Fusobacterium*, *Veillonella*, *Mycoplasma hominis*, *Peptococcus* spp., *Ureaplasma urealyticum* y *Streptococcus viridans* (5-13,19).

Entre los factores predisponentes para el desarrollo de la vaginosis se encuentra el empleo de hormonas orales, uso frecuente de duchas vaginales, antibióticos; los cuales trastornan la microbiota vaginal al disminuir la concentración de lactobacilos y otros miembros de la microbiota normal, por lo que permite la proliferación de microorganismos patógenos. El embarazo y la diabetes se acompañan de una disminución cualitativa de la inmunidad por células, lo que ocasiona una incidencia más elevada de vaginosis bacteriana. Las múltiples parejas sexuales aumentan el riesgo de contagio y más si se tiene antecedentes de infecciones urinarias (13,14).

La transmisión sexual como factor predisponente ha sido muy discutida. Por un lado algunos investigadores no han encontrado diferencia significativa en la prevalencia de vaginosis bacteriana o en el aislamiento de *G. vaginalis* entre grupos de jóvenes sexualmente activas y vírgenes, por lo que sugieren que ésta no debe ser considerada una enfermedad exclusivamente de transmisión sexual (3,18).

### 3.3.2. Epidemiología de vaginosis

La vaginosis bacteriana representa el 40 a 50% de los casos de vaginitis reportados. Estudios realizados en Guatemala revelan que el 20% de mujeres estudiadas presentaban *G. vaginalis*, y de estas solamente el 55% presentó flujo vaginal mal oliente. Otro estudio reveló que el 5% de mujeres con leucorrea presentó cultivo positivo para *G. vaginalis* utilizando agar chocolate. En mujeres embarazadas se detectó *G. vaginalis* en 9.09% usando agar Columbia (3,15).

Otros estudios retrospectivos, en las estadísticas realizadas sobre las enfermedades infecciosas han ido en aumento, pues a partir de 1998 hubo un crecimiento de un 19.8%, del cual el 15.9% pertenece a la vaginosis por *G. vaginalis* de una población de estudio de

405 mujeres, los casos de leucorrea en niñas fueron en un 42.1%. Los casos presentados en las clínicas de enfermedades de transmisión sexual abarcan de un 32 a 64%, en el contexto médico familiar de un 12 a 25% y en la práctica obstétrica de un 10 a 26%, los cuales tienen prevalencia en mujeres jóvenes de 15 a 43 años, otros autores han reportado casos en niñas de 5 a 10 años con *G. vaginalis* en los resultados 82% de mujeres en edad fértil *Candida*, *Trichomonas* y *Gardnerella* se encuentran en aproximadamente 90% de las pacientes con vulvovaginitis. Si se excluyen las infecciones víricas, estas serían causa del 97% de vulvovaginitis (15,16).

*Gardnerella* raramente es aislada de niñas premenstruales. Se ha aislado de casi el 50% de las mujeres postmenopáusicas, aunque a bajas concentraciones. Tiene mayor prevalencia entre mujeres de raza negra, y se ha asociado a promiscuidad sexual, embarazo previo, dispositivos intrauterinos y enfermedades de transmisión sexual (3,16,17).

El método anticonceptivo utilizado también es importante, ya que se han aislado en mayor proporción *Candida*, *Trichomonas*, *Gardnerella* y bacterias anaeróbicas de mujeres que usan anticonceptivos orales o dispositivos intrauterinos, mientras que en mujeres que usan métodos de barrera el microorganismo predominante es el lactobacilo (17,18).

### 3.3.3. Características de *G. vaginalis*

Desde el punto de vista morfológico, el microorganismo tiene el aspecto de un bacilo pleomórfico de aproximadamente 0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro y 1.5 a 2.5  $\mu\text{m}$  de longitud, anaerobio facultativo, catalasa y oxidasa negativa con una toxina citotóxica que rompe las células epiteliales, lo cual explica las alteraciones ultraestructurales en las células (17-19).

Se ha encontrado que es capaz de inducir la presencia de anticuerpos IgA lo que indica una respuesta inflamatoria local con una hemolisina que actúa sobre las células amino que se tiñen con Gram variable cuyas características son confirmadas por el sistema API-20, aunque existen bacterias que por su similitud se denominan agentes similares a *G. vaginalis* (19).

La pared celular contiene los aminoácidos: alanina, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, histidina, lisina, metionina, prolina, serina, treonina y triptófano, pero no

se han detectado ácido diaminopimélico ni ácidos teicoicos. El análisis de ácidos grasos muestra: laurato, estereato y oleato. El análisis de carbohidratos indica 6-deoxitalosa pero no arabinosa (19).

Sadhu y cols. Concluyeron que aunque el nivel ultraestructural de la pared celular de *G. vaginalis* muestra organización de Gram positiva, su pared celular es inusualmente delgada en la mayoría de las células contribuyendo al misterio del porqué se tiñen como Gram variables (19).

A menudo se observan formas en palo de golf y gránulos metacromáticos. El microorganismo es inmóvil y no encapsulado. La mayor parte de las cepas del género *Gardnerella* son anaerobias facultativas y exigentes en cuanto a sus requerimientos nutricionales. En el agar sangre se produce una  $\beta$ -hemólisis difusa (20).

#### 3.3.4. Patología de vaginosis bacteriana causada por *G. vaginalis*

En la vaginosis este microorganismo produce el succinato necesario para la proliferación de anaerobios, los cuales producen aminopeptidasas que liberan aminoácidos que a su vez son descarboxilados para producir diaminas. Las diaminas más comunes son la putresina, la cadaverina, la trimetilamina y las poliamidas. Se ha sugerido que la trimetilamina es la principal responsable del olor a pescado (19).

##### 3.3.4.1. Sintomatología de vaginosis bacteriana causada por *G. vaginalis*

Los signos característicos encontrados son una secreción blanca o blanca-grisácea que se percibe generalmente después de la relación sexual, descarga vaginal excesiva, el olor fétido aminado (pescado) a causa de la producción de aminas por las múltiples bacterias de la vagina que puede ser más marcado después de la relación sexual sin protección debido a que el flujo seminal alcalino favorece más el olor. Las pacientes no siempre se quejan de prurito vulvar (58%), molestias vaginales o una dispareunia (19).

##### 3.3.4.2. Diagnóstico de vaginosis bacteriana causada por *G. vaginalis*

El diagnóstico clínico generalmente se lleva a cabo mediante los antecedentes clínicos y el olor. El examen pélvico debe llevarse a cabo para determinar la producción de



secreción anómala además de verificar o destacar la presencia de alguna otra enfermedad. El diagnóstico de vaginosis se basa en la presencia de cuando menos tres de los cuatro siguientes criterios clínicos las cuales han sido aceptadas como parámetro para indicar la presencia de la enfermedad: (6-8,19).

- Descarga fina, blanca adherente y homogénea.
- pH superior a 4.5.
- Prueba de amina positiva.
- Células indicadoras (células clave) en preparación salina (6-8,19).

La presencia de 2 de los 4 criterios clínicos aunados a la presencia de una prueba de “olor” a amina positiva y el hallazgo microscópico de células clave, permite hacer un diagnóstico exacto y rápido de la vaginosis (19).

#### 3.3.4.2.1. Diagnóstico de laboratorio

Se puede iniciar desde el examen de la secreción durante la toma de una muestra. Esta prueba se lleva a cabo colocando una gota de KOH al 10% en el espejo vaginal mezclando el fluido vaginal con una gota de KOH, el cual, debido a que tiene propiedades alcalinas, causa la producción de aminas dependientes del metabolismo de las bacterias anaeróbicas. Ya en el microscopio, primero se localiza el campo en potencia baja (fijación del objetivo 10x) para detectar tricomonas o yemas de levaduras y pseudohifas. Luego se ubica el campo en potencia alta (fijación del objetivo 40x) para detectar elementos relacionados con vaginosis: células clave, leucocitos, lactobacilos, además de otras bacterias en el medio. Los hallazgos microscópicos típicos permiten diferenciar las secreciones normales de las de origen infeccioso (19, 20-23).

La microbiota bacteriana puede ser examinada microscópicamente para evaluar la presencia de bacterias predominantes. Normalmente en la vagina de la mujer sana, en edad reproductiva, predominan los lactobacilos (bacilos Gram positivo). En pacientes con vaginosis, la microbiota de las pacientes cambia, reflejando un incremento en el crecimiento de *G. vaginalis* y otros anaerobios (bacilos Gram negativo o Gram variable) (23-24).

En la secreción vaginal de las pacientes con vaginosis bacteriana es notable la falta de leucocitos polimorfonucleares (PMNs), típicamente 1 ó menos de 1 PMN por célula epitelial vaginal; en coinfecciones se presenta un incremento en el número de los PMNs por lo cual es más difícil su diagnóstico. Si predominan los leucocitos, se debe considerar la posibilidad de que la paciente tenga otra enfermedad de transmisión sexual, debido a que la vaginosis bacteriana rara vez provoca un exudado con presencia de leucocitos, los cuales se han reportado en el 86% de las mujeres diagnosticadas con tricomoniasis (24).

#### 3.3.4.2.1.1. Características diagnósticas del cultivo de *G. vaginalis*:

- Beta hemolítico en agar sangre
- Oxidasa: Negativa
- Catalasa: Negativo
- Indol: Negativo
- Glucosa: Positivo
- Maltosa: Positivo
- Manitol : Negativo
- Reducción de Nitrato y nitritos: Negativo

#### 3.3.4.2.2. Diagnostico diferencial

La secreción vaginal causada por *Candida* y *Chlamydia* son características y se diferencia de la secreción causada por *Gardnerella*. En las infecciones gonocócicas se observa al microscopio su peculiar característica de agrupación en racimos, cadena o paquetes cuboidales (24,25).

El diagnóstico de Herpes simple se caracteriza por lesiones vesiculosas, pequeñas o grandes y contienen líquido claro; cuando se rompen dan lugar a ulceraciones, de localización vulvar, vaginal o cervical con presencia o no de ardor o sensación de quemadura, úlceras múltiples y linfadenopatía inguinal (25).

El diagnóstico de tricomoniasis se caracteriza por presentar leucorrea abundante, maloliente y espumosa, con prurito y ardor vulvovaginal así como dispareunia, disuria y flujo, la mucosa está hiperémica, moteada por petequias (cérvix en “fresa”) o zonas hemorrágicas, leucorrea olorosa, blanca o amarilla (25,26).

Es importante considerar que hasta un tercio de las mujeres son totalmente asintomáticas. Para diagnosticar *M. curtissi*, después de una incubación de 10 días en jarras de GasPak en platos de agar sangre se examinan las placas en busca de colonias de menos de 1 mm de diámetro, translúcidas e incoloras, compuestas por bacilos curvos Gram negativo, sustituyendo la tinción de safranina por fucsina básica (26).

#### 3.3.4.3. Tratamiento

El tratamiento más efectivo para vaginosis causada por *G. vaginalis* es el metronidazol, aunque también es eficaz la clindamicina, ambos destinados a erradicar el microorganismo causal sin alterar la microbiota vaginal, se utilizan a criterio del médico de la siguiente manera:

3.3.4.3.1. Una dosis de 400 mg dos veces al día durante 7 días.

3.3.4.3.2. Metronidazol en gel, un aplicador una vez al día durante 5 o 7 días.

3.3.4.3.3. Clindamicina al 2%, un aplicador una vez al día durante 7 días.

3.3.4.3.4. Clindamicina oral 300 mg dos veces al día durante 5 días. (3,23-25).

### 3.4. Vaginitis

Se define a vaginitis como aquel proceso inflamatorio de la mucosa vaginal que por lo general suele acompañarse de un aumento en la secreción vaginal. Dicha inflamación es causada principalmente por la alteración del equilibrio de la microbiota vaginal habitual que está presente en la vagina y cuya función es la de regular el pH vaginal y con ello la presencia de bacterias y otros microorganismos en el epitelio vaginal (26).

Las causas pueden ser diversas; pero los tipos más comunes de vaginitis infecciosa se presentan en el 90% de todos los casos en las mujeres en edad reproductiva y están causados por: tricomonas y *Candida* sp. (26).

#### 3.4.1. Etiología y factores predisponentes de vaginitis

Los principales agentes causales son; la vaginitis por *Trichomonas* causada por el parásito *T. vaginalis* (un protozoario), que, a diferencia de los otros tipos de vulvovaginitis, se transmite a través de infección vaginal. Los síntomas más característicos son una secreción vaginal de aspecto verdoso o amarillento con un olor desagradable, comezón intensa, ardor y enrojecimiento de los genitales y dolor durante el coito. Si no se trata puede afectar al cuello uterino (27,28).

La vaginitis por hongos, es llamada también candidiasis o moniliasis. La ocasiona el crecimiento excesivo de un hongo que normalmente está presente en la microbiota vaginal. La mayor parte de vaginitis por hongos son ocasionadas por la levadura *C. albicans*, aunque también otras levaduras, como *C. glabrata*, pueden ser el origen de la infección (28).

Otras infecciones menos comunes son causadas por *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Campylobacter*, Herpes y algunos parásitos (28).

Los factores que predisponen al desarrollo de vaginitis son el uso de hormonas orales, antibióticos. 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. La inmunosupresión también es un factor predisponente para presentar infecciones por levaduras (28).

#### 3.4.2. Epidemiología de vaginitis

Acevedo y Arroyo en el 2009 realizaron un estudio prospectivo en 594 pacientes que asistieron a la Clínica de Papanicolaou de la Asociación Pro-Bienestar de la Familia (APROFAM) en la ciudad de Guatemala, se determinó que 305 pacientes (51.3%) padecían de vaginitis, de los cuales 25 pacientes (4.2%) presentaban vaginitis por *Candida* sp. (28).

La vaginitis generalmente es causada por *C. albicans* en un 90% de las infecciones. Otros casos están producidos por otras especies como *C. tropicalis* y *C. stellatoidea*. Los datos disponibles acerca de la epidemiología de la colonización del cuerpo humano por levaduras y de la micosis vaginal son todavía hoy inadecuados e incluso contradictorios. La mayoría de los datos publicados tienen su origen en pacientes seleccionadas que no pueden considerarse representativas. La mayoría de datos disponibles en la literatura existente sobre incidencia se basan, por tanto, en estimaciones (29-32).

La especie *Candida* es parte de la microbiota transitoria normal del cuerpo humano, y puede detectarse en el tracto orointestinal del 50% de los adultos. Se estima que la incidencia de colonización vaginal por levaduras en las mujeres sanas, asintomáticas, no embarazadas oscila entre el 10 y el 25%. Esta proporción asciende a aproximadamente un 30% durante el embarazo (33,34).

Determinar la especificidad de una cepa ha demostrado que, en determinados casos, los hongos se transfieren de la región perianal hasta la vagina. Las cifras de incidencia de candidiasis vulvovaginal también varían en comparación con otros agentes causantes implicados en la vaginitis. Según Sobel, *Candida* es el segundo agente infeccioso más común en la vaginitis aguda después de las bacterias, aunque en las regiones tropicales, las levaduras son la primera causa. En contraste, un estudio prospectivo realizado con 495 mujeres mostró que la candidiasis, la tricomoniasis y la vaginosis bacteriana se diagnosticaban con la misma frecuencia. Estadísticas del Reino Unido reflejaron que, entre los años 1975 y 1984, la incidencia de infecciones vaginales por *Candida* se incrementó desde 118 a 200 casos anuales por cada 100.000 mujeres (32).

Se estima que, hasta el 75% de las mujeres sufren candidiasis vaginal al menos una vez en su vida durante su edad reproductiva. De estas mujeres, aproximadamente un 40-50% padecerán una segunda infección, y hasta un 5% del total de la población femenina sufre de infecciones recurrentes crónicas por *Candida* (34).

La candidiasis vulvovaginal constituye la segunda causa de vaginitis en mujeres en edad fértil así como en adolescentes; en estas se encontró a *Candida* spp. en 22,7 a 28% y *C. albicans* en 80% (34).

En niñas pre púberes la etiología generalmente es inespecífica. La prevalencia de candidiasis vulvovaginal en mujeres adultas es del 6 al 13.8% de las mujeres en actividad sexual, de las cuales el 74 al 94% es producida por *C. albicans* y el resto se debe a: *Candida* spp. (17.4%); *C. glabrata* (15,9%); *C. parapsilopsis* (2.9%); *C. tropicalis* y *C. subtropicales* (1.5 a 5.1%); *C. famata* (5.9%) y *C. kruseii* (0.7%) (33).

En mujeres asintomáticas puede aislarse *Candida* spp. hasta en un 20%. En mujeres embarazadas la prevalencia es mayor (28% a 38%) pero menor que la hallada en el tercer trimestre, también se encuentra a *C. albicans* como la principal etiología (88%) seguido de, *C. glabrata* (6,2 a 16,3%) ésta se relaciona a vaginitis crónica, *C. krusei* (4%) y *Candida* spp. (17,7%) (22,33).

*C. albicans* puede producir en más del 80% de los casos una infección congénita por *Candida* sp., seguida por *C. tropicalis* en el 10%, *C. parapsitosis* y *C. stellatoidea* con menor frecuencia generalmente por vía ascendente asociado al uso de DIU o cerclaje, produciendo corioamnionitis, aborto, muerte perinatal, infección cutánea neonatal y neumonitis fúngica (56).

En mujeres menopáusicas se encontró una prevalencia de 7.2 % de *Candida* spp. Buscemi y col. hallaron mayor frecuencia de candidiasis en mujeres VIH positivas ( $p=0,0086$ ) y Villalobos encontró *C. albicans* en 20.75% tanto en mujeres seropositivas y seronegativas, *Candida* spp. en 5.66% en seropositivas y 11% en seronegativas. La prevalencia de *C. albicans* en muestras de exudado vaginal en mujeres internadas por sepsis ginecológica es de 59.8% seguida de la vaginosis bacteriana con 22.1% (57).

### 3.4.3. Características de *Candida* sp.

Suelen presentarse como una célula oval levaduriforme o redondas; de 2 a 5 micras, con paredes finas; sin embargo, en tejidos infectados también se han identificado formas filamentosas de longitud variable, con extremos redondos de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de diámetro y pseudohifas, que son células alargadas de levadura que permanecen unidas entre sí (32).

Las levaduras o blastosporas son microorganismos eucarióticos, las cuales se reproducen asexualmente por un proceso específico de división celular conocido como gemación (32).

La forma filamentosa del hongo (hifa), es una estructura microscópica tubular, la cual contiene múltiples unidades celulares divididas por septos y puede surgir a partir de blastosporas o de hifas existentes. Esta crece continuamente por extensión apical (32,35).

La pared celular está formada por múltiples capas; compuesta por: quitina, glicanos, mananos, glicomananos; péptidos; algunos producen cápsula de polisacáridos extracelular, respiración oxidativa; capacidad limitada de anaerobiosis (fermentación); metabolismo heterotrófico; producen metabolitos primarios (citrato y etanol) y secundarios (amanitina, aflatoxina); tiempo de duplicación largo (36).

La apariencia microscópica de todas las especies de *Candida* es similar; todas las levaduras son Gram positiva, en algunas ocasiones la forma de las blastosporas puede variar de ovoide a elongada o esférica (36).

Se presentan bajo condiciones de cultivo semianaeróbico o facultativo y está formado por células elongadas que se mantienen unidas entre sí como una cadena y blastoconidias o blastosporas que están agrupadas en montones a lo largo del pseudomicelio, en los sitios en que los extremos finales de las células pseudomiceliales se empalman con otras (36).

En contraste con otras especies de *Candida*, *C. albicans* tiene una marcada tendencia a formar esporas grandes de pared gruesa, denominadas clamidosporas, sobre todo cuando se cultivan en un medio especial como Agar Harina de Maíz; la clamidospora tiene un diámetro de 7 a 8  $\mu\text{m}$  y casi siempre se origina en el extremo del pseudomicelio. Es una importante característica morfológica en la identificación de *C. albicans*. Asimismo, tiene la capacidad para producir tubos germinales (filamentación en suero) cuando las colonias son inoculadas en 0.5 ml de suero a temperatura de 37°C, observándose los resultados después de 2 o 3 h (21,37).

#### 3.4.4. Patología de vaginitis causada por candidiasis

La ausencia de algunos factores de virulencia, como la producción de pseudohifas, consideradas como estructuras que incrementan la adherencia y penetración del hongo en los tejidos, conduce a considerar que *C. glabrata* es menos virulenta que otras especies, como *C. albicans* o *C. tropicalis* (37).

Este hecho es cierto cuando se utilizan modelos experimentales en animales de laboratorio; sin embargo, existen evidencias que demuestran una rápida diseminación de las infecciones por *Candida* en los enfermos inmunodeprimidos, en quienes también se produce una elevada tasa de mortalidad (38).

Aunque el conocimiento de los marcadores de virulencia en esta especie es escaso, algunas investigaciones han demostrado que *C. glabrata* produce proteinasas y que la hidrofobicidad de su superficie celular es similar a la de *C. albicans*, lo que asegura su capacidad de adherencia a las células del huésped. Otros factores relacionados con una mayor virulencia, como el cambio en el fenotipo de las colonias, muy estudiado en *C. albicans*, también puede producirse en *C. glabrata* (38,39).

##### 3.4.4.1. Sintomatología de vaginitis causada por candidiasis

La candidiasis comúnmente causa un flujo espeso, blanco, como cuajado (queso tipo “cottage”). Puede que tenga o no un olor desagradable, especialmente durante la menstruación. Puede causar mucha picazón e irritación dentro y fuera de la vagina. La vulva (labios vaginales) puede enrojecer e inflamarse y puede arder o picar. Este tejido irritado e inflamado es frágil. El rascarse o la actividad sexual pueden causar pequeñas cortaduras. En casos muy graves, se pueden formar úlceras u otros tipos de infecciones bacterianas en los tejidos lesionados. Puede haber casos asintomáticos en 10 a 20% de mujeres en edad fértil, casos agudos y severos (32).

##### 3.4.4.2. Diagnóstico de vaginitis causada por candidiasis

Muchas mujeres pueden darse cuenta por sus síntomas que tienen una infección. Sin embargo, un diagnóstico correcto es esencial. En el interrogatorio se tendrá en cuenta



antecedentes de flujo genital, detalle de medidas higiénicas, síntomas y antecedentes patológicos de importancia. Al examen físico se determinará la presencia de signos, características del flujo, lesiones vulvovaginales agregadas (úlceras, etc.). El diagnóstico clínico suele sobre diagnosticar más que subdiagnosticar. En la gran mayoría, la observación de leucorrea y de la mucosa vaginal mediante la especuloscopia, es suficiente sin tener que requerir de exámenes complementarios. En general el pH es inferior a 4.5 y la prueba de aminas es negativa. En las niñas la vaginoscopia, método de excepción, se efectuará por el especialista en caso de vulvovaginitis crónica (32,34).

#### 3.4.4.2.1. Exámenes complementarios.

3.4.4.2.1.1. Examen directo (Examen en fresco) La muestra debe ser tomada de la pared vaginal lateral, puede ser sometida a observación microscópica con KOH al 10 a 20% o preparaciones teñidas (Gram) que permiten reconocer blastoconidias, filamentos, pseudohifas de *Candida* spp. El examen microscópico directo es específico pero menos sensible (4,17,20).

3.4.4.2.1.2. Cultivo: No es usado rutinariamente, pero puede ser útil en mujeres con síntomas recurrentes y con síntomas típicos que presenten una preparación de KOH negativo. Se logra aislar diferentes especies de *Candida* además de sensibilidad a diferentes antifúngicos (antifungigrama con lecturas a las 24 a 48 h de incubación, no requiere medios exigentes, entre estos se tiene al Agar dextrosa de Sabouraud (Bioxón)), durante 7 días a 37°C, o, agar Base Columbia por 48 h en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, también se realiza cultivos con CHROMagar *Candida* (CHROMagar Company, Paris, France) para identificación de especies según el color de las colonias (30,32).

*C. albicans* produce colonias verdes y tiene la capacidad de producir tubos germinativos (prueba fisiológica) y clamidoconidias en agar leche con Tween 80. El cultivo en medio Inray Colorex Yeast: *C. albicans* da colonias de color verde o verde azulado; *C. glabrata* rosado oscuro y *C. krusei* rosado oscuro con bordes blancos; *C. tropicalis* azul oscuro con halo púrpura (27,31).

#### 3.4.4.2.2. Diagnostico diferencial:

3.4.4.2.2.1. Vaginosis bacteriana: Se caracteriza por flujo homogéneo, prueba de nitritos positiva, presencia de células clave, pH vaginal mayor a 4.5, de las cuales debe presentarse por lo menos tres (27).

3.4.4.2.2.2. Tricomoniasis vaginal: Se caracteriza por presentar flujo genital fétido, espumoso y cambios inflamatorios vaginales y es generalmente de transmisión sexual (28).

#### 3.4.4.3. Tratamiento de vaginitis causada por candidiasis

El tratamiento estándar para este tipo de infección es la aplicación de una medicina antifúngica en forma de crema o supositorio dentro de la vagina. Por lo general, los tratamientos se usan por algunos días. Los principales medicamentos antifúngicos son: clotrimazole, miconazole, nistatina, terconazole y tioconazole (30,32).

Las cremas y supositorios pueden usarse sin problemas, aún si las infecciones recurren con frecuencia. Sin embargo, algunas infecciones no responderán muy bien o no lo harán en absoluto a estos tratamientos. Por lo general, este tipo de problema se controla mejor con medicamentos antifúngicos orales como ketoconazole o fluconazole. No se recomienda usar una sola dosis de tratamiento (30,34).

Hay también algunos remedios caseros para tratar estas infecciones (ácido bórico, ajo o betadine) que si se usan correctamente pueden funcionar para algunas mujeres (35).

### **3.5. Medicina natural**

En Guatemala existe una gran diversidad de flora y fauna, gracias a las condiciones climatológicas imperantes que hacen del territorio nacional un hábitat perfecto para el desarrollo de plantas medicinales. Sobre su actividad medicinal y sobre su capacidad biocida es escasa la información documentada (36).

A la fecha, se han realizado varias tesis con el apoyo del Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos, Lic. Armando Cáceres, Dirección General de Investigación y otras instituciones

internacionales como la Agencia Japonesa de Cooperación Internacional (JICA) y la Organización de Estados Americanos (OEA) en las cuales se ha evaluado la actividad biocida de productos vegetales con ensayos antibacteriano, antilevadura, antimicótico, antiprotozoario, insecticida y antiartemia (33).

### **3.6. Descripción de las plantas en estudio**

Desde hace algunos años se han hecho estudios sobre plantas que contienen principios antibacterianos, en este caso, se utilizarán estas plantas por su composición química, farmacología, usos medicinales, historia y porque se le atribuye propiedades antiinflamatorias, antifúngicas, antipruríticas, antirreumática, antiséptica, cicatrizante, desinflamante, estimulante, diurética, entre otras. Por otro lado a pesar de algunas tesis realizadas sobre este tópico, no han sido estudiadas la actividad contra estos microorganismos causantes de vaginosis y vaginitis. Dichas plantas son:

3.6.1. Nombre científico: *Smilax domingensis* Willd

3.6.1.1. Familia: Smilacaceae

3.6.1.2. Nombre común: Zarzaparrilla

Otros nombres populares: Bejuco de la vida, cocolmea, cuculmea, diente de chucho, palo de la vida.

3.6.1.3. Descripción botánica: El género *Smilax* son bejuco leñosos o herbáceos, dioicos, trepando por zarcillos pareados; es un género complejo y poco estudiado. En Mesoamérica existen unas 26 especies y en Guatemala al menos 12 especies, de las cuales *S. lundellii*, *S. regelii* y *S. spinosa* son nativas de México y Centro América y se usan indistintamente con fines medicinales (37).

3.6.1.4. Hábitat y distribución geográfica: Es nativa de bosques húmedos o secos hasta 2,800 msnm. En Guatemala se ha descrito en Alta Verapaz, Guatemala, Huehuetenango, Izabal, Jutiapa, Petén, Quetzaltenango, Retalhuleu, Santa Rosa, Suchitepéquez y Zacapa (37).

3.6.1.5. Historia: Las *Smilax* del viejo Mundo eran utilizadas por Dioscorides y Plinio. Un grupo de plantas de *Smilax*, colectivamente llamadas zarzaparrilla, fueron introducidas del nuevo mundo de medicina europea por los comerciantes españoles del siglo XVI, de acuerdo con Monardes fue introducida por primera vez en Sevilla en 1536. Gerard (1633) las menciona como un “remedio contra los dolores crónicos de las articulaciones y la cabeza y contra los resfríos” Ximenez, en su Historia Natural del Reino de Guatemala se refiere a una planta como “una de las cosas en que la Divina Omnipotencia parece que más se esmero en comunicarle virtudes” (37).

La zarzaparrilla tuvo buen mercado desde el principio para el tratamiento de sífilis y una variedad de enfermedades que requería “purificación de la sangre”. En el siglo XVII era recomendada por famosos clínicos como Dordyce y Cullen para el tratamiento de sífilis, pero hacia principios del siglo XVIII dejó de usarse, posiblemente por adulteraciones. En 1850 vuelve a tener importancia. Por una combinación de factores la zarzaparrilla ha tenido una drástica pérdida de popularidad, aunque pareciera seguir siendo una droga útil en el tratamiento de ciertas enfermedades crónicas (37).

3.6.1.6. Usos medicinales: El cocimiento del rizoma es de uso medicinal en Centro América. Por vía oral se usa para tratar anemia, afecciones gastrointestinales (diarrea, dolor de estómago, inapetencia), hinchazón, malaria, dolor de riñones, enfermedades de la sangre y venéreas, hepatitis, reumatismo y tumores (38).

La decocción se aplica tópicamente para tratar diversas afecciones dermatomucosas (alergia, eccema, liquen plano, tinea, psoriasis) (38-41).

Se les atribuye propiedad antiinflamatoria, antifúngica, antiprurítica, antirreumática, antiséptica, cicatrizante, desinflamante, estimulante, diurética, diaforética, depurativa, sudorífica y tónica. Las raíces de varias especies del género se han utilizado como colorantes de refrescos o como componentes de arreglos florales (39-41).

3.6.1.7. Composición química: Indica la presencia de alcaloides, aceite esencial, esteroides insaturados, glucósidos esteroidales (saponinas, cardenolidos, bufadienolicos), flavonoides,

leucoantocianinas, taninos, polifenoles, resinas azucres y grasas. Se han aislado agliconas esteroidales (parrillina, sarsapogenina, smilagenicon) (39-42).

3.6.1.8. Farmacognosia: La materia médica son raíces y rizomas secos. Macroscópicamente son manojos de 60-70 cm de largo, arrugas longitudinales, color rojo-café, fractura de corteza corta con un centro fibroso, corteza blanco-café, xilema amarillo lignificado, zona parenquimatosas central cálida, sin olor, sabor amargo. Microscópicamente es un polvo rojo-café, consiste en células parenquimatosas rectangulares con gránulos esferoidales de almidón, hasta 30 µm de diámetro, gránulos esferoidales poliédricos, exodermis de dos capas engrosadas, paredes amarillentas, células de hipodermis lignificadas, xilema de vasos y fibras lignificados con engrosamientos espirales (42,43).

3.6.2. Nombre científico: *Phlebodium pseudoaureum* L.

3.6.2.1. Familia: Polypodiaceae

3.6.2.2. Nombre común: Calahuala

Otro nombre popular: Polipodio

3.6.2.3. Descripción botánica: Helecho epífito con un rizoma rastrero y sinuosos, 8-15 mm de grueso, densamente cubierto con una pelusa dorado-café. Frondas separadas, arqueadas o esparcidas; sobre tallos brillantes, cafés, 15-30 cm de largo. Hojas ovado-oblongas, verde brillantes, amarillentas o azul-verdosas 30-120 cm de largo, 20-40 cm de ancho, divididas en segmentos puntiagudos oblongos, 10-30 cm de largo, 2-5 cm de ancho, algunas veces traslapadas (44).

3.6.2.4. Hábitat y distribución geográfica: Nativas de Centro América. Crecen silvestres en troncos de palmas, árboles de encino y roca caliza desintegrada, en lugares de gran humedad a la sombra. Se encuentran desde México y Centro hasta sud América en alturas de 1,200-2,200 msnm. En Guatemala se ha descrito en Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chimaltenango, Escuintla, Guatemala, Huehuetenango, Jalapa, Quetzaltenango, Suchitepéquez y Zacapa (43).

3.6.2.5. Historia: Con el mismo nombre se designan varias especies de helechos de la familia Polypodiaceae que abundan en sitios sombreados y húmedos de los bosques de la región, la especie más común es *P. pseudoaureum* en Mesoamérica se usan ampliamente por sus múltiples virtudes medicinales atribuidas, en Guatemala se usan indistintamente otras especies medicinales (*P. attenuatum* y *P. dissimile*). En Honduras se produce comercialmente tanto *P. decumanum* como *P. leucotomos* (44).

3.6.2.6. Usos medicinales atribuidos: La infusión y decocción del rizoma se usa oralmente para tratar afecciones gastrointestinales (diarreas, dolor de estómago, estreñimiento, gastritis, respiratorias (asma, tos, tos ferina) y cardíacas, dolor de huesos, reumatismo, diabetes, gota, hipertensión, purificar la sangre, parásitos, enfermedades venéreas, sífilis y afecciones renales (cálculos, hidropesía) (44).

Tópicamente se usa la infusión en emplasto y cataplasma para el tratamiento de contusiones, reumatismo, úlceras, quemaduras, cáncer cierto tipo de tumores, psoriasis y eccema la decocción de las hojas se usa para detener las hemorragias (45).

Se le atribuye propiedad analgésica, antihemorrágica, depurativa, diurética, desinflamante, emenagoga, espasmolítico, expectorante, febrífuga, laxante, pectoral, purgante, sudorífica y tranquilizante (44).

3.6.2.7. Composición química: El rizoma de *P. pseudoaureum* contiene azúcar, aceite esencial, mucilago, almidón, nitrato de potasio y colorante rojo, además contiene calagualina, polipodina, aceites grasos y taninos, así como esteroides (ecdisterona y dos ecdisomas como la polipodaureina) las especies usadas medicinalmente en el Salvador contienen alcaloides, sesquiterpenlactonas y taninos (43,44).

3.6.2.8. Farmacognosia: La materia médica son los rizomas verdosos en su estado fresco y café dorado cuando secos, son cilíndricos, tortuosos escamas moreno ferruginosas, sin un olor especial; deben reunir las mismas características fisicoquímicas y sanitarias de las otras materias primas usadas para la elaboración de productos fitofarmacéuticos (44).

3.6.3. Nombre científico: *Dioscorea alata* L.

3.6.3.1. Familia: Dioscoreaceae

3.6.3.2. Nombres comunes: Ñame, macal, maxcal, akilmacal (Yucatán Maya), cabeza de negro, ñame, ñame blanco, ñame común, papa china (45).

3.6.3.3. Descripción botánica: Plantas erectas, glabras, tallos con cuatro ramificaciones; hojas alargadas pecioladas, ovadas, cordadas o cordadas, con seno basal ancho o estrecho, de 10-20 cm de largo, acuminado o caudado acuminado, espigas ramificadas, alongadas, las flores sésiles; perianto de 1.5 mm de diámetro, verde pálido, segmentos desiguales; estambres fértiles muy cortos; cápsula lustrosa, de 3 cm de ancho. Planta trepadora con 4 tallos en ángulo o en forma de alas y llegan a la copa de los árboles, por lo general no tiene tubérculos aéreos, tiene diversos tubérculos subterráneo lobulados o ramificados, de hasta 2 m de largo, de color blanco, amarillo, naranja, rojo o púrpura por dentro (45).

3.6.3.4. Hábitat y distribución geográfica: Nativa o tropical de Asia o África, cultivada en la mayoría de las regiones por sus raíces; cultivada comúnmente en Guatemala, especialmente en regiones bajas, y en ocasiones en elevaciones mayores, como el Departamento de Guatemala. Es originario de México, habita en clima cálido desde el nivel del mar hasta los 1500 m. Asociada a bosques tropicales caducifolio, subperennifolio y perennifolio (45).

3.6.3.5. Historia: El género *Dioscorea* posee una amplia variedad de especies de importancia económica, comestible y medicinal, estas especies se encuentran distribuidas a lo largo de las regiones lluviosas de los trópicos y regiones subtropicales (Montaldo, 1991). Según Coursey (1976) este género tuvo una amplia dispersión a fines del cretáceo pero luego ocurrió una evolución con cursos posteriores diferentes en el viejo y en el nuevo mundo y se originaron distintos desarrollos en los dos hemisferios. La separación de las formas ancestrales asiáticas y africanas. En los años 50 del pasado siglo se estudió en Veracruz, México, una variedad de *Dioscorea* que se usaba como saponina o jabón para matar peces por la compañía Sintex. Gracias a este descubrimiento, se detectó su contenido

en esteroides análogos a la progesterona, lo que sirvió de base al descubrimiento, en México, de la píldora anticonceptiva por parte de Djerassi, Miramontes y Romo (45).

3.6.3.6. Usos medicinales atribuidos: En Colombia las hojas son utilizadas como cataplasma en tumores y barros, en baños para aliviar varias irritaciones de la piel y picaduras de ciempiés. El almidón de los tubérculos se aplica como una pasta sobre hemorroides, en Costa Rica la infusión de hoja es tomada como sudorífico, febrífugo y estimulante digestivo (45).

3.6.3.7. Composición química: Tallos y tubérculos contienen diosgenina y una saponina, contiene inulina (45).

3.6.3.8. Farmacognosia: El tubérculo en bruto es agrio e irritante para la lengua y garganta. Grandes dosis causa pérdida del conocimiento. Antiinflamatorio y antiespasmódico (45).

3.6.4. Nombre científico: *Citrus aurantium* L.

3.6.4.1. Familia: Rutaceae

3.6.4.2. Nombre común: Naranja agria, naranja amarga

3.6.4.3. Descripción botánica: Árbol perenne de la familia de las rutáceas 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 elípticolanceoladas, 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 (46).

3.6.4.4. Hábitat y distribución geográfica: originario del sudeste de Asia; ampliamente cultivado en forma comercial en los trópicos y subtropical de ambos hemisferios. En Guatemala se cultiva en forma semicomercial en Baja Verapaz, Escuintla, Santa Rosa, Suchitepéquez y Zacapa (46).



3.6.4.5. Historia: En su lugar de origen, polinesia, consideran que las semillas llegaron a sus costas desde tiempos prehistóricos, domesticado por sus propiedades ornamentales, culinarias y medicinales en India o sureste de Asia, los Árabes lo llevaron a Arabia en el siglo IX y a España en el siglo XLL, fue la primera naranja que se cultivo en América, se naturalizó en México hacia 1568 y en Brasil en 1587. Las flores blancas y perfumadas son consideradas el símbolo de pureza, por lo que se destina a las novias un ramito de flores cuando se acercan al altar (46).

3.6.4.6. 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. El epicarpio del fruto, se obtiene mondando el mismo y desecándolo en lugar ventilado (46).

La naranja agria 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, espasmolítico, estomáquica, sedante y sudorífica (46).

3.6.4.7. 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 antidiarréicas y reductoras del colesterol (46).

3.6.4.8. Farmacognosia: La materia prima son las hojas, flores y pericarpio del fruto seco que deben reunir las mismas características fisicoquímicas y sanitarias de la materia prima usada para la elaboración de productos fitofarmacéuticos. Microscópicamente las flores

muestran en el mesófilo de los sépalos grandes grumos de cristales de oxalato de calcio, tricomas unicelulares en la epidermis y granos de polen esféricos, el epicarpio muestra paredes con glándulas de aceite (46).

3.6.5. Nombre científico: *Ananas comosus* (L.) Merrill

3.6.5.1. Familia: Bromeliaceae

3.6.5.2. Nombre común: Piña

3.6.5.3. Descripción botánica: Planta bianual, de hojas radicales, largas, duras, envalinadas de punta espinosa, flores trilobadas, de ovario infero, fruto grueso, carnoso, escamoso, coronado de hojitas, comestible (47).

3.6.5.4. Hábitat y distribución geográfica: Hierba robusta que puede crecer hasta una altura de 90 cm y extenderse lateralmente de 1 a 1.5 cm. Tallo cubierto con las hojas, al desprenderse estas dejan en manifiesto las cicatrices (47).

3.6.5.5. Historia: En tiempo de la colonia, los españoles la descubren por primera vez en Perú, y sorprendidos por su excelencia fomentaron su cultivo no solo en América e islas Canarias, sino que la dieron a conocer por Europa donde principian a cultivarlos en invernaderos (47).

3.6.5.6. Usos medicinales: Antiinflamatorio, béquico, tónico cerebral, refrescante, diurético, hipotensor, vermífugo. Entre las propiedades medicinales del mismo la más notable es la de la enzima proteolítica llamada bromelina, que ayuda a metabolizar los alimentos (47).

3.6.5.7. Composición química: Contiene agua, carbohidratos, grasas, proteínas, fibra, potasio, vitamina C, fósforo, vitamina A, tiamina, riboflavina, y niacina, ácido fólico total, serotonina (47).

3.6.5.8. Farmacognosia: La alta concentración de bromelina en la cáscara y otras partes ha llevado a su uso en decocción para aliviar infecciones laríngeas y faríngeas, así como en

uso tópico para la cistitis y otras infecciones. La materia prima es el fruto, el corazón y la cáscara (47).

3.6.6. Nombre científico: *Punica granatum* L.

3.6.6.1. Familia: Punicacea

3.6.6.2. Nombre Común: Granada, granada enana, granado, granado agrio, mata de granada (48).

3.6.6.3. Descripción botánica: 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 carnososo, 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 (48).

3.6.6.4. Hábitat y 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 (48).

3.6.6.5. Historia: Es una especie nativa de Paquistán, la investigación de esta planta medicinal se llevo a cabo en los municipios de Estelí, Somoto, Yalaguina, San Fernando, Totogalpa, Pueblo Nuevo, Jalapa. Es una planta originaria de la India y Medio oriente que aparece como elemento del escudo de arma de algunos países bolivarianos simbolizando la nueva granada (48).

3.6.6.6. Usos medicinales: Las partes utilizables son, raíz y corteza del fruto, popularmente se utiliza como, antidiarréico, 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, emenagogo 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 (48).

3.6.6.7. 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<sup>7</sup>piperideina) (48).

3.6.6.8. Farmacognosia:

La materia médica son la corteza, tronco, raíz y frutos secos. La corteza se presenta en pedazos pequeños, superficies con fisuras planas; la corteza de la raíz es rugosa y con cicatrices en la parte donde ha caído el corcho la corteza de raíz al microscopio presenta abundantes fragmentos de corcho de dos clases; parénquima del floema abundante, consiste en filas verticales de células pequeñas con grumos de cristales de oxalato de calcio, eventualmente priemas; esclereidos poco frecuentes; muy ocasionalmente gránulos esféricos de almidón (48).

Del pericarpio se han aislado siete compuestos fuertemente activos como inhibidores de la anhidrasa carbónica (punicalina, punicalagina, granatina B, galagildilactona, casuarinina, pedunculagina, telimagrandina I) y cuatro moderadamente activos (acido gálico, granatina A, corilagina, acido elágico) (48).

Se comercializan productos fitofarmacéuticos alopáticos y homeopáticos, se presenta como decocción, jarabe, tintura, extracto y cápsula. En el mercado chino se encuentran tabletas de 0.5 g del extracto, que se toman 4 tabletas 4 veces al día (48).

3.6.7. Nombre científico: *Hamelia patens* Jacq.

3.6.7.1. Familia: Chichipince

3.6.7.2. Nombre Común: Chipitin

3.6.7.3. Descripción botánica: Arbusto o arbolito, de 1.4 m hojas ternadas, lanceo-oblongas a redonda ovaes, de 5-21 cm, corto acuminadas a obtusas, inflor, con muchas flores, cáliz de 2.5-3 mm, corola tubular de 1.5-2 cm, anaranjado-rojiza, puberula, fruto subglososo u oblongo-elipsoideo, de 6-10 mm, rojizo (49).

3.6.7.4. Hábitat y distribución geográfica: Peten, Alta Verapaz, Izabal, Zacapa, Chiquimula, Santa Rosa, Escuintla, Suchitepéquez, Retalhuleu, Quetzaltenango, San Marcos, Huehuetenango, Quiche, México, Brasil, Panamá (49).

3.6.7.5. Historia: Arbusto elegante cuando está en plena floración, por lo que en oportunidades es sembrado como ornamento en parques y jardines de toda América tropical. Es uno de los primeros arbustos que aparece después de talar los bosques, pero rara vez se vuelve abundante en dichos lugares (49).

3.6.7.6. Usos medicinales: A dosis de 570 mg/kg, por vía intraperitoneal, provoca un efecto analgésico significativo ( $p \leq 0.05$ ) en tiempos de 90 y 120 minutos después de la administración. A dosis de 5700 mg/kg, la analgesia se obtiene en los tiempos de 60, 90, 120 y 240 minutos. El tamizaje hipocrático preliminar muestra que el extracto etanólico, a dosis de 770 mg/kg en vía intraperitoneal en la rata, provoca una franca depresión del sistema nerviosos central, disminución drástica de la actividad motora, analgesia, anestesia, pasividad, parálisis de las patas anteriores, midriasis y descenso de temperatura rectal (49).

La planta tiene actividad citostática, estudios clínicos en el Salvador reportan la mejoría y cicatrización de heridas con uso de jabón a base de la planta (49).

3.6.7.7. Composición química: Una selección fotoquímica preliminar realizada sobre la hoja demostró la presencia de alcaloides, saponinas, esteroides y taninos. La planta contiene alcaloides indólicos: maruquina, isomaruquina, palmirina, pteropodina, isopteropodina, rumberina y especiofilina. La flor contiene flavonoides (49).

3.6.7.8. Farmacognosia:

La materia médica que se usa popularmente es la hoja fresca y en ocasiones la raíz; que debe reunir las características fisicoquímicas y sanitarias de la materia prima usada en la elaboración de productos fitofarmacéuticos. En la revisión de literatura realizada no se encontraron referencias sobre la relación entre la actividad farmacológica atribuida y la composición química, ni estudios tendientes a la formulación de productos fitofarmacéuticos. No es una planta oficial, por lo que no se encuentra en ninguna farmacopea. Se comercializan productos fitofarmacéuticos como infusión polvo, jabón y tintura.

3.6.8. Nombre científico: *Brosimum alicastrum* Swartz.

3.6.8.1. Familia: Moraceae

3.6.8.2. Nombre común: Ramón, ajushte, capomo, ajah, confitura, iximche, leche maría, masico, masiquilla, mojo

3.6.8.3. Descripción botánica: Su fruto es redondo, de color anaranjado y su semilla es muy rica en almidón. No presenta ni olor ni sabor característico, su copa es densa, formada de hojas alargadas, gruesas y brillantes (50).

3.6.8.4. Hábitat y distribución geográfica: Es una especie que se desarrolla en el bosque muy húmedo subtropical cálido. Necesita de una precipitación pluvial de 2,100 a 4,300 mm anuales y temperaturas entre 21-25°C a una altitud de 80 a 1600 msnm (50).

Se adapta a climas desde semi-húmedos hasta semiáridos. Crece bien en suelos poco profundo o mal drenado, con fertilidad baja moderada y textura desde arcillosa hasta arenosa, aunque prefiere los cerros calizos y rocosos (50).

3.6.8.5. Historia: Juan de Esteyneffer, en su obra del siglo XVIII refiere que se usa para fracturas y atrofia de los miembros. Más información aparece hasta el siglo XX. Maximino Martínez la indica para el asma, bronquitis, como galactógeno y pectoral. Posteriormente, Narciso Souza comenta que el látex diluido en agua se emplea en el asma y la bronquitis y sus frutos aumentan la leche (50).

3.6.8.6. Usos medicinales: La inclusión del forraje del Ramón en la dieta del ganado vacuno aumenta la producción de leche. Las semillas de alto valor nutritivo son ricas en proteínas, aminoácidos, hierro y vitamina C. Pueden ser cocidas, transformadas en harina o tostadas para proporcionar una bebida similar al chocolate. Su madera es utilizada en la construcción, aunque por sus cualidades es más apreciada para la fabricación de muebles de lujo (50).

3.6.8.7. Composición química: Contiene compuesto glinoideo 1-4, 2-6-dimetoxi benzoquinona. La semilla contiene un aceite esencial, grasa, resina, cera, un alcaloide y una sustancia mucilaginosa (50).

3.6.8.8. Farmacognosia: Se describe que algunos médicos comprobaron la acción galactogénica ejercida por las semillas en mujeres recién paridas (50).

#### 4. JUSTIFICACION

La interacción del hombre con su variada naturaleza ha generado enormes conocimientos científicos y empíricos sobre el aprovechamiento óptimo de los recursos que nos ofrece la flora. De esta manera la medicina tradicional encuentra en Guatemala un lugar privilegiado, ya que la cosmovisión indígena valora grandemente las formas naturales de explicar y atender las enfermedades. Sin embargo, estas creencias de las comunidades de nuestro país no siempre coinciden con los sistemas médicos prevalecientes, se han tenido que comprobar, revalorizar y normalizar la distribución de las plantas medicinales y productos derivados que requieren atención para un ordenamiento adecuado en beneficio de la población, por medio del cual se podrá tomar en cuenta como un medicamento y no como un remedio casero.

Con esta idea en mente se evaluarán la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos y diclorometánicos de rizomas, árboles y arbustos de uso medicinal *A. comosus*, *B. alicastrum*, *C. aurantium*, *D. alata*, *H. patens*, *P. pseudoaureum*, *P. granatum*, *S. domingensis*, y, contra microorganismos de importancia médica, como *G. vaginalis*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilopsis*, y *C. tropicalis*, que causan vaginosis bacteriana, ya que las infecciones ginecológicas bajas (vulva, vagina), en los últimos años han sido tema de estudio motivado por un aumento en su prevalencia y gravedad de sus complicaciones. Esta entidad afecta a todas las edades, principalmente a mujeres en edad reproductiva.

Se utilizarán las plantas antes mencionadas porque se utilizan en salud femenina por sus propiedades antiinflamatorias, antifúngicas, antiséptica, cicatrizante, desinflamante y diurética, entre otras. Por otro lado a pesar de algunas tesis realizadas sobre este tópico, no han sido estudiadas la actividad de estos microorganismos contra los frutos y raíces antes mencionados.



## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo general**

5.1.1. Determinar la actividad antimicrobiana de las especies a las que se les atribuya propiedades medicinales contra microorganismos causantes de vaginosis.

### **5.2. Objetivos específicos**

5.2.1. Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos vegetales contra cepas *G. vaginalis* y 5 especies de *Candida*.

5.2.2. Determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los extractos contra *G. vaginalis* y 5 especies de *Candida*.

## **6. HIPOTESIS**

Al menos uno de los extractos presenta actividad biocida *in vitro* contra *G. vaginalis*, o especies del género *Candida*.

## **7. MATERIALES Y METODOS**

### **7.1. Universo de trabajo:**

Especies vegetales utilizadas en el tratamiento de vaginitis y vaginosis.

### **7.2. Muestra:**

Ocho extractos metanólicos y diclorometánicos de plantas medicinales de Guatemala que no han sido estudiadas y son utilizadas con frecuencia para el tratamiento de infecciones vaginales por su fácil obtención, siendo estos: pericarpio de *A. comosus*, *C. aurantium* y *P.granatum*, rizoma de *D. alata*, *P. pseudoaureum* y *S. domingensis*, hojas de *H. patens* y *B. alicastrum*.

### **7.3. Recursos**

#### 7.3.1. Humanos

##### 7.3.1.2. Seminaristas

Mónica Elizabeth Guerra Vega

Ana Lucía Godoy Anzueto

##### 7.3.1.3. Asesor

Lic. Armando Cáceres

#### 7.3.2. Institucionales

7.3.2.1. Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

7.3.2.2. Laboratorio de Productos Naturales Farmaya

7.3.2.3. Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT)

#### 7.3.3. Equipo

- 7.3.3.1. Balanza analítica Mettler AE 200 y Mettler PM 600
- 7.3.3.2. Autoclave OMRON Miny Manual Timer STMW Y222
- 7.3.3.3. Campana de flujo laminar bacteriológica Labconco Purifies Class II Biosafety Cabinet
- 7.3.3.4. Incubadora Fisher Scientific Isotemp Incubador 37 °C
- 7.3.3.5. Refrigeradora de 4-8°C ADMIRAL dualtemp y Fisher Scientific isotemp, de -80°C
- 7.3.3.6. Vortex Thermolyne Maxi Mix II 27600
- 7.3.3.7. Asas bacteriológicas en argolla
- 7.3.3.8. Equipo de Rotavapor Büchi Flawil 461 Brinkmann Precisión
- 7.3.4. Materiales
  - 7.3.4.1. Algodón
  - 7.3.4.2. Bata blanca de manga larga
  - 7.3.4.3. Beakers de 250 y 1000 mL
  - 7.3.4.4. Caja de Petri descartables
  - 7.3.4.5. Cinta adhesiva
  - 7.3.4.6. Cinta testigo
  - 7.3.4.7. Erlenmeyer de 1000 mL
  - 7.3.4.8. Espátula pequeña
  - 7.3.4.9. Fósforos
  - 7.3.4.10. Guantes de látex

- 7.3.4.11. Jabón desinfectante
- 7.3.4.12. Marcador permanente
- 7.3.4.13. Papel mayordomo
- 7.3.4.14. Papel filtro
- 7.3.4.15. Pipetas automáticas de 2-1000  $\mu$ L
- 7.3.4.16. Probetas de 25 mL y 100 mL
- 7.3.4.17. Tips amarillos de 10 a 200  $\mu$ l
- 7.3.4.18. Tijeras
- 7.3.4.19. Tubos de vidrio de fondo plano y con tapadera de rosca de 15 mL
- 7.3.4.20. Vaso de precipitar
- 7.3.4.21. Viales o frascos pequeños para almacenar el extracto
- 7.3.5. Reactivos
  - 7.3.5.1. Agar Base Columbia Marca Oxoid (CNA)
  - 7.3.5.2. Agar Muller Hilton
  - 7.3.5.3. Agar tripticasa soya
  - 7.3.5.4. Agua desmineralizada estéril
  - 7.3.5.5. Caldo Tripticasa soya
  - 7.3.5.6. Diclorometano
  - 7.3.5.7. Dimetil sulfóxido (DMSO)
  - 7.3.5.8. Etanol al 50%

7.3.5.9. Etanol al 95%

7.3.5.10. Metronidazol (disco de 50 µg)

7.3.5.11. Sangre de carnero

7.3.5.12. Solución salina 0.85%

## **7.4. Procedimiento**

### 7.4.1. Selección de las plantas en estudio

Se seleccionaron las plantas en estudio con base en su utilización para el tratamiento de infecciones vaginales por medio de información recopilada por CEMAT-FARMAYA.

### 7.4.2. Elaboración de extractos vegetales

Las plantas a estudiar fueron identificadas, se secaron, molieron y se pesó la cantidad necesaria para el desarrollo de los extractos.

### 7.4.3. Extracción por percolación

7.4.3.1. Se colocó un pedazo de algodón no muy grande en un percolador previamente limpio y seco, para usar como filtro en la parte inferior y se colocó papel filtro cortado en forma de embudo de acuerdo al diámetro del percolador.

7.4.3.2. Se pesó la cantidad de material vegetal a utilizar.

7.4.3.3. Se rotuló el percolador con el nombre científico de la planta, nombre común, fecha, peso, parte a utilizar de la planta y disolvente a utilizar.

7.4.3.4. Se humedeció el material vegetal con diclorometano y metanol adecuado para la extracción, utilizando un vaso de precipitar.

7.4.3.5. Se transfirió todo el material al percolador y se agregó etanol al 95% hasta cubrir el material vegetal.

7.4.3.6. Se dejó reposar el tiempo necesario para llevar a cabo la extracción, esto dependió del material vegetal (18 a 48 horas).

7.4.3.7. Se abrió la llave de la parte inferior luego de pasado el tiempo, y se dejó gotear el líquido a una velocidad adecuada.

7.4.3.8. Se recogió el líquido en un erlenmeyer, se añadió suficiente disolvente extra, según se requirió, hasta obtener el volumen de disolvente agregado al inicio.

7.4.3.9. Se presionó fuertemente el material sólido que ha quedado, y se añadió el líquido obtenido al percolador.

7.4.4. Concentración utilizando el rotavapor:

7.4.4.1. Se engrasaron todas las bocas esmeriladas y se armó el rotavapor. Se colocó el balón colector y se fijó con la llave respectiva.

7.4.4.2. Se revisó el nivel del agua del baño de calentamiento.

7.4.4.3. Se encendió el baño de María y se mantuvo la temperatura entre  $40\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

7.4.4.4. Se colocó el balón con la muestra y se sujetó el vástago con la llave correspondiente.

7.4.4.5. Se encendió la bomba de vacío durante el tiempo necesario para iniciar la destilación.

7.4.4.6. Se inició la destilación del extracto con recuperación del disolvente hasta obtener una consistencia semisólida.

7.4.4.7. Se vertió el extracto concentrado en una caja de Petri de vidrio debidamente tarada y rotulada.

7.4.4.8. Se colocó en una desecadora durante 7 a 15 días.

7.4.4.9. Se pesaron los viales tarados y rotulados, cuando el extracto tuvo consistencia sólida.

#### 7.4.5. Obtención de la cepa de *G. vaginalis*

La cepa fue proporcionada por la Asociación Pro-Bienestar de la Familia (APROFAM).

#### 7.4.6. Bioensayo para *G. vaginalis*

Para demostrar la actividad *in vitro* de los extractos metanólicos y diclorometánicos de las plantas contra *G. vaginalis* se procedió de la siguiente manera:

##### 7.4.6.1. Preparación del extracto de las plantas

7.4.6.1.1. Se pesaron 0.200 g del extracto y se disolvió en 4 mL de DMSO para obtener una concentración de 50 mg/mL.

7.4.6.1.2. Se tomaron 2.4 ml de extracto con DMSO + 9.6 ml de etanol al 50% para obtener una concentración final de 10 mg/mL

##### 7.4.6.2. Impregnación de taxos

7.4.6.2.1. Se impregnaron taxos con 50 µL de este. Se colocan 10 µL por día. Son 5 días

7.4.6.2.2. Se impregnaron cinco discos por cada extracto, cinco discos con la solución de metronidazol y cinco con etanol al 50% como control negativo.

##### 7.4.6.3. Preparación de agar CNA en bicapa

7.4.6.3.1. Se añadió 39 g de agar Columbia a 1000 mL de agua destilada

7.4.6.3.2. Se llevó a ebullición hasta lograr una disolución completa.

7.4.6.3.3. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 min.

7.4.6.3.4. Se enfrió a 50°C y se agregó un 5% de sangre humana.

7.4.6.3.5. Se agregó el contenido rehidratado (con etanol al 95%) de suplemento Selectivo

Gardnerella SR0070E, Marca Oxoid. (5 mL de suplemento en 500 mL de agar)



7.4.6.3.6. 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.

#### 7.4.6.4. Preparación del inóculo

7.4.6.4.1. Se transfirieron colonias frescas a un tubo de ensayo con solución salina estéril, comparándolo con el estándar de MacFarland 0.5. Para la obtención de colonias frescas, se tomó una azada de la muestra almacenada que fue proporcionada por APROFAM, se siembra en agar sangre y se incuba a 37°C por 24 horas.

#### 7.4.6.5. Inoculación de las placas

7.4.6.5.1. 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 dejó secar la caja cerrada de 5 a 10 minutos antes de colocar los discos.

#### 7.4.6.6. Colocación de los discos

7.4.6.6.1. Una vez la placa se encontraba seca, se colocaron los discos con pinzas estériles a una distancia de 30 mm uno del otro, se colocaron totalmente al azar seis discos en cada caja y se incubaron a 36°C en presencia de CO<sub>2</sub> por 48 horas.

#### 7.4.6.7. Medición de las zonas de inhibición

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

#### 7.4.6.8. Interpretación de resultados

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

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

#### 7.4.7. Bioensayo para *Candida* spp.

7.4.7.1. Obtención de las cepas de *Candida*: Fueron obtenidas del cepario de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

7.4.7.2. Preparación de cajas con agar extracto.

7.4.7.2.1. Se preparó una solución de cada extracto con una concentración de 10 mg/mL, disolviendo 0.0500 g de extracto en 1 mL de DMSO

7.4.7.2.2. Se tomaron 2.4 ml. de extracto con DMSO + 9.6 ml. de etanol al 50%.

7.4.7.2.3. Se prepararon 13.5 mL de agar Sabouraud en tubo.

7.4.7.2.4. Se utilizó como control negativo 13.5 mL de agar Sabourad con 1.5 mL de etanol al 50%

7.4.7.2.5. Se agregó 1.5 mL del extracto preparado (1:10) en una caja de petri, y adicionar 13.5 ml de agar Sabouraud, homogenizar y dejar solidificar el medio.

7.4.7.2.6. Se incubó una caja como control de esterilidad a 36°C por 24 horas.

7.4.7.2.7. Se refrigeró el resto hasta su uso.

7.4.7.3. Preparación del inóculo

7.4.7.3.1. Se sembró la cepa en una caja de agar Sabouraud y se incubó a 36°C por 48 horas.

7.4.7.3.2. Se tomó un inóculo del cultivo fresco, se sembró en 5 mL de caldo Sabouraud y se incubó por 48 horas.

7.4.7.3.3. Con pipeta estéril se tomó 50  $\mu$ L (0.05 mL) y se suspendió en 4.95 mL de solución salina estéril (dilución 1:100).

7.4.7.4. Inoculación de la levadura en placa

7.4.7.4.1. Se inoculó con asa bacteriológica la suspensión de levaduras en cada sección según plantilla y se hicieron cuatro repeticiones por microorganismo.

7.4.7.4.2. Las cajas se incubaron a 36°C por 48 horas.

7.4.8. Lectura e interpretación de resultados

7.4.8.1 Depende del crecimiento a lo largo del inóculo.

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

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

7.4.8.4. Contaminación: Presencia de microorganismos fuera del inóculo.

7.4.9. Concentración inhibitoria mínima (CIM)

A los extractos que presentaron efecto inhibitorio (actividad positiva) 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 cuadrilate con las siguientes diluciones del extracto:

- 1.0 mg/mL = 3.6 mL de agar Sabouraud + 0.4 mL de solución del extracto
- 0.5 mg/mL = 3.8 mL de agar Sabouraud + 0.2 mL de solución del extracto
- 0.25 mg/mL = 3.9 mL de agar Sabouraud + 0.1 mL de solución del extracto
- Control negativo = 4.0 mL de agar Sabouraud.

Se inocularon tres estrías de cada microorganismo con un asa bacteriológica en cada uno de los cuadrantes. Se incubaron a 36°C durante 24 a 48 horas. Se realizó una lectura y se interpretaron los resultados de acuerdo a su actividad.

## 7.5. Diseño Estadístico

### 7.5.1. 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 basará en la inhibición del crecimiento a partir una concentración de 1mg/ml.

## 7.6. Validez del método

### 7.6.1. Actividad bactericida de los extractos:

Se realizó un ensayo de dosis-efecto de la siguiente manera:

7.6.1.1. Se realizaron diluciones de Metronidazol a concentraciones de 5 mg/mL, 50 mg/mL, 500 mg/mL y 1000 mg/mL.

7.6.1.2. Se impregnaron taxos con dichas diluciones (50  $\mu$ l) en total.

7.6.1.3. Se colocaron los taxos en cajas de petri con agar sangre al 5% previamente estriadas en tres direcciones (tapete) con una suspensión de *G. vaginalis* estandarizada con un estándar de MacFarland 0.5

7.6.1.4. Se obtuvo inhibición de *G. vaginalis* a la dosis terapéutica de (500 mg/mL) y a una concentración de 1000 mg/mL (Tabla 5).

7.6.1.5. Para *Candida* spp. se hicieron diluciones de fluconazol a concentraciones de 37.5 mg/mL, 75 mg/mL, 150 mg/mL y 275 mg/mL.

7.6.1.6. Se impregnaron taxos con dichas diluciones (50  $\mu$ l) en total.

7.6.1.7. Se colocaron los taxos en cajas de petri con agar Sabouraud previamente estriadas en tres direcciones (tapete) con una suspensión de las cepas de *Candida* estandarizadas con un Standard de McFarland 0.5

7.6.1.8. Se obtuvo inhibición de las cepas de *Candida* a la dosis terapéutica de fluconazol (150 mg/mL) y a una concentración de 275 mg/mL (Tabla 5).

## 7.7. Análisis de datos

Se tabularon y analizaron los datos de acuerdo a los parámetros anteriormente descritos. Se realizó una prueba de hipótesis binomial donde:

$H_0$   $P \leq 0.5$  (el extracto no tiene efecto)

$H_a$   $P > 0.5$  (el extracto si tiene efecto)

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Selección de plantas

En la Tabla 1 se describe la familia, nombre científico, nombre común, número de herbario y parte utilizada de las plantas en estudio ( *A. comosus*, *B. alicastrum*, *C. aurantium*, *D. alata*, *H. patens*, *P. granatum*, *P. pseudoaureum* y *S. domingensis*).


**Tabla 1. Características de las plantas en estudio**

Familia	Nombre científico	Nombre común	*No. Herbario	Parte utilizada
Bromeliaceae	<i>Ananas comosus</i> L.	Piña	1021	Pericarpio
Moraceae	<i>Brosimum alicastrum</i> Swartz	Ramón	1019	Hojas
Rutaceae	<i>Citrus aurantium</i> L.	Naranja agria	1057	Pericarpio
Dioscoreaceae	<i>Dioscorea alata</i> L.	Ñame	1117	Rizoma
Chichipince	<i>Hamelia patens</i> Jacq.	Chipitín	980	Hojas
Polypodiaceae	<i>Phlebodium</i>	Calahuala	1039	Rizoma

	<i>pseudoaureum</i>			
Punicaceae	<i>Punica granatum</i> L.	Granada	990	Pericarpio
Smilacaceae	<i>Smilax dominigensis</i> Willd	Zarzaparrilla	1034	Rizoma

---

Fuente: Experimental. Banco de datos. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. USAC

\*Número de herbario proporcionado por FARMAYA

## 8.2. Actividad contra especies de *Candida*

En la Tabla 2 se presentan los resultados obtenidos experimentalmente en el tamizaje contra las cinco especies de *Candida*.

El único extracto que presentó actividad contra *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilopsis*, *C. tropicalis* fue el extracto metanólico de *P. granatum*.

**Tabla 2. Tamizaje de la actividad de los extractos contra seis especies de *Candida* a una concentración de 1 mg/mL**

Planta	Disolvente	Parte utilizada	A	B	C	D	E
<i>Ananas comosus</i>	Diclorometano	P	-	-	-	-	-
	Metanol		-	-	-	-	-
<i>Brosimum alicastrum</i>	Diclorometano	P	-	-	-	-	-
	Metanol		-	-	-	-	-
<i>Citrus aurantium</i>	Diclorometano	P	-	-	-	-	-
	Metanol		-	-	-	-	-
<i>Dioscorea alata</i>	Diclorometano	R	-	-	-	-	-
	Metanol		-	-	-	-	-
<i>Hamelia patens</i>	Diclorometano	R	-	-	-	-	-
	Metanol	R	-	-	-	-	-
<i>Phlebodium pseudoaureum</i>	Diclorometano	H	-	-	-	-	-
	Metanol		-	-	-	-	-
<i>Punica granatum</i>	Diclorometano	H	-	-	-	-	-
	Metanol		+	+	+	+	+
<i>Smilax domingensis</i>	Diclorometano	R	-	-	-	-	-
	Metanol		-	-	-	-	-

**Fuente: Datos obtenidos experimentalmente en el estudio**

Microorganismos: A: *C. albicans*, B: *C. krusei*, C: *C. glabrata*, D: *C. parapsilopsis*, E: *C. tropicalis*

Parte de la planta: P: Pericarpio, R: Rizoma, H: Hojas

(+) Actividad positiva: ausencia de crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo

(-) Actividad negativa: crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo

A los extractos que presentaron una actividad inhibitoria ( $p < 0.10$ ) contra alguna de las especies de *Candida* se les determinó la concentración inhibitoria mínima. *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilopsis* y *C. glabrata* fueron inhibidos a una concentración de 0.5 mg/mL por el extracto metanólico de *P. granatum*.

*Candida tropicalis* fue inhibida a una concentración de 1 mg/mL por el extracto metanólico de *P. granatum*.

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



Planta	Disolvente	Parte Utilizada de la planta	A	B	C	D	E
<i>Ananas comosus</i>	Diclorometano	P	-	-	-	-	-
	Metanol		-	-	-	-	-
<i>Brosimum alicastrum</i>	Diclorometano	P	-	-	-	-	-
	Metanol		-	-	-	-	-
<i>Citrus aurantium</i>	Diclorometano	P	-	-	-	-	-
	Metanol		-	-	-	-	-
<i>Dioscorea alata</i>	Diclorometano	R	-	-	-	-	-
	Metanol		-	-	-	-	-
<i>Hamelia patens</i>	Diclorometano	R	-	-	-	-	-
	Metanol	R	-	-	-	-	-
<i>Phlebodium pseudoaureum</i>	Diclorometano	H	-	-	-	-	-
	Metanol		-	-	-	-	-
<i>Punica granatum</i>	Diclorometano	H	-	-	-	-	-
	Metanol		0.5	0.5	0.5	0.5	1
<i>Smilax domingensis</i>	Diclorometano	R	-	-	-	-	-
	Metanol		-	-	-	-	-

**Fuente:** Datos obtenidos experimentalmente en el estudio

Microorganismos: A: *C. albicans*, B: *C. krusei*, C: *C. glabrata*, D: *C. parapsilopsis*, E: *C. tropicalis*

Parte de la planta: P: Pericarpio, R: Rizoma, H: Hojas

(-) Actividad negativa

### 8.3. Actividad de extractos contra *G. vaginalis*

Los resultados obtenidos experimentalmente en el tamizaje contra *G. vaginalis* se muestra en la Tabla 4, los extractos metanólicos y diclorometánicos de las plantas seleccionadas no presentaron actividad positiva ( $p > 0.10$ ).

**Tabla 4.** Tamizaje de la actividad de los extractos contra *G. vaginalis*

Planta	Disolvente	Parte utilizada	Actividad
<i>Ananas comosus</i>	Diclorometano	P	-
	Metanol		-
<i>Brosimum alicastrum</i>	Diclorometano	P	-
	Metanol		-
<i>Citrus aurantium</i>	Diclorometano	P	-
	Metanol		-
<i>Dioscorea Alata</i>	Diclorometano	R	-
	Metanol		-
<i>Hamelia Patens</i>	Diclorometano	R	-
	Metanol	R	-
<i>Phlebodium pseudoaureum</i>	Diclorometano	H	-
	Metanol		-
<i>Punica granatum</i>	Diclorometano	H	-
	Metanol		-
<i>Smilax domingensis</i>	Diclorometano	R	-
	Metanol		-

**Fuente:** Datos obtenidos experimentalmente en el estudio

Parte de la planta: P: Pericarpio, R: Rizoma, H: Hojas

(-) Actividad negativa

**Tabla 5. Ensayo dosis-efecto de metronidazol contra *G. vaginalis***

Concentración	5 mg/mL	50 mg/mL	500 mg/mL	1000 mg/ml
Microorganismo				
<i>G. vaginalis</i> y halo de inhibición	< 6 mm *	< 6 mm	10 mm	12 mm

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente en el estudio

\* Halo de inhibición: Se midió el diámetro con una regla calibrada en milímetros

< 6 mm: No inhibe, > 6 mm: Inhibe

**Tabla 6. Ensayo dosis-efecto de fluconazol contra especies de *Candida***

Concentración	37.5 mg/mL	75 mg/mL	150 mg/mL	275 mg/ml
Microorganismo y halo de inhibición				
<i>C. albicans</i>	< 6 mm	< 6 mm	12 mm	15 mm
<i>C. glabrata</i>	< 6 mm	< 6 mm	10 mm	12 mm
<i>C. krusei</i>	< 6 mm	< 6 mm	16 mm	18 mm
<i>C. parapsilopsis</i>	< 6 mm	< 6 mm	12 mm	23 mm
<i>C. tropicalis</i>	< 6 mm	< 6 mm	9 mm	11 mm

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente en el laboratorio

\* Halo de inhibición: Se midió el diámetro con una regla calibrada en milímetros

< 6 mm: No inhibe, > 6 mm: Inhibe

## 9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Para validar el presente estudio se realizó un ensayo donde se evaluó la dosis del fármaco versus el efecto sobre los microorganismos en estudio, se realizaron diluciones de metronidazol a concentraciones de 5, 50, 500 y 1000 mg/mL, se impregnaron taxos con dichas diluciones (50 µl) en total (Tabla 4).

Se colocaron los taxos en cajas de petri con agar sangre al 5% previamente estriadas en tres direcciones (tapete) con una suspensión de *G. vaginalis* estandarizada con un estandar de MacFarland 0.5. Se obtuvo inhibición de *G. vaginalis* a la dosis terapéutica de (500 mg/mL) y a una concentración de 1000 mg/mL (Tabla 5).

Para *Candida* spp. se hicieron diluciones de fluconazol a concentraciones de 37.5 , 75, 150 y 275 mg/mL. Se impregnaron taxos con dichas diluciones (50 µl) en total. Se colocaron los taxos en cajas de petri con agar Sabouraud previamente estriadas en tres direcciones (tapete) con una suspensión de las cepas de *Candida* estandarizadas con un estandar de MacFarland 0.5.

Se obtuvo inhibición de las cepas de *Candida* a la dosis terapéutica de fluconazol (150 mg/mL) y a una concentración de 275 mg/mL (Tabla 5).

Se evaluó la actividad antimicrobiana de ocho plantas nativas guatemaltecas, *A. comosus*, *B. alicastrum*, *C. aurantium*, *D. alata*, *H. patens*, *P. pseudoaureum*, *P. granatum*, *S. domingensis* las cuales son usadas comúnmente por la población para el tratamiento de diversas infecciones vaginales incluyendo vaginitis y vaginosis.

Existen estudios previos que demuestran resultados de inhibición frente a especies de *Candida* (52) por extractos de plantas de uso medicinal en Guatemala, los cuales inhiben a *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. stellatoidea* y *C. tropicalis*, sin embargo, ningún extracto presentó efecto inhibitorio contra *C. parapsilopsis*.

Otro estudio indica que las hojas de *L. graveolens* presentaron actividad antifúngica contra la fase micelial y la levadura de *Sporothrix schenckii* (31).

Debido a estos antecedentes se esperaba que los extractos metanólicos y diclometánicos de frutas y raíces de uso etnomédico en Guatemala presentaran actividad inhibitoria para las especies de *Candida* y *G. vaginalis*, ya que las plantas seleccionadas en el presente estudio (Tabla 1) son utilizadas comúnmente para tratar la inflamación e infecciones vaginales.

El extracto metanólico de *P. granatum* mostró efecto inhibitorio ( $p < 0.10$ ) contra *C. albicans*, *C. kruseii*, *C. glabrata*, *C. parapsilopsis* y *C. tropicalis*. A dicho extracto se le determinó la CIM a concentraciones de 0.25, 0.5 y 1 mg/mL. *C. albicans*, *C. kruseii*, *C. glabrata*, *C. parapsilopsis* fueron inhibidas ( $p < 0.10$ ) a la dosis de 0.5 mg/mL y *C. tropicalis* a 1 mg/mL. Estas inhibiciones demuestran que en las partes utilizadas de las plantas, existe algún metabolito responsable de la inhibición, es probable que en alguna otra parte de la planta (hojas, flores, rizoma, etc.) estén presentes a mayor o menor concentración.

Basados en la composición y datos en la literatura (32), es posible que alguno de los mecanismos de acción sean, la inhibición del ergosterol o de otros esteroides, lesionando la pared celular fúngica y alterando su permeabilidad, como consecuencia se produce la pérdida de elementos intracelulares esenciales provocando la muerte de las células fúngicas. Otro posible mecanismo es la inhibición de la síntesis de los glucanos a través de la inactivación de la enzima 1,3-beta-glucano sintetasa. La falta de glucanos en la pared celular la vuelve débil e incapaz de soportar el estrés osmótico, por lo que muere.

La punicina y los taninos ejercen dos efectos sobre las especies de *Candida*, la punicina posee acción tóxica y los taninos acción astringente, esta acción sinérgica inhibe el crecimiento de dichos microorganismos.

Según estudios hechos por Vasconcelos (51), el extracto acuoso de *P. granatum* posee efectos antifúngicos similares al miconazol, aunque no se conoce el mecanismo de acción, ni cuál es el metabolito responsable de la inhibición, sin embargo, puede deberse a la presencia de la peletierina o punicina que es un alcaloide que se le atribuyen propiedades ténicas y desinflamatorias.

Otro estudio (54) indica que el extracto etanólico de *P. granatum* posee propiedades similares a nistatina, clotrimazol y anfotericina B, en dicho estudio se inhibió el crecimiento de especies de *Candida* en pacientes VIH positivo.

Un estudio realizado para investigar el efecto antimicrobiano de un gel hecho a base de *P. granatum* comparándolo con Daktarin® gel oral mostró tener efectos fitoterapéuticos similares contra tres especies de estreptococos (*S. mitis*, *S. mutans* y *S. sanguis*) y *C. albicans* ya que logró inhibir el crecimiento de los mismos (55).

Los ensayos se realizaron con cuatro repeticiones de cada uno para obtener 95% de confianza ( $p=0.05$ ).

Los extractos de *A. comosus*, *B. alicastrum*, *C. aurantium*, *D. alata*, *H. patens*, *P. pseudoaureum* y *S. domingensis* no presentaron efecto inhibitorio sobre las especies de *Candida*, es probable que los compuestos fitoquímicos presentes en las partes de los frutos y rizomas como taninos y flavonoides no sean activos contra estos microorganismos.

La cepa de *G. vaginalis* fue proporcionada por la Clínica de Asociación Pro-Bienestar de la Familia (APROFAM), donde fue aislada e identificada. El ensayo se realizó en agar CNA y se cultivó a temperatura y atmósfera de CO<sub>2</sub> adecuada.

La metodología utilizada fue difusión de disco, el extracto metanólico y diclorometánico se utilizó a una concentración de 1 mg/mL, con los que se impregnaron los taxos, los cuales fueron colocados en cajas de petri según plantilla.

También se utilizó como control positivo una solución de metronidazol a una concentración de 500 mg/mL, la cual es la dosis terapéutica usual el cual inhibió el crecimiento de *G. vaginalis*. Como control negativo se utilizó etanol al 50%, el cual no inhibió el crecimiento de *G. vaginalis*. El metronidazol actúa sobre las proteínas que transportan electrones en la cadena respiratoria de las bacterias anaerobias, mientras que en otros microorganismos se introduce entre las cadenas de ADN inhibiendo la síntesis de ácidos nucleicos. Debido a su mecanismo de acción, bajo peso molecular, y unión a las proteínas muy baja, el metronidazol es muy eficaz como antimicrobiano, y prácticamente no induce resistencias (53).

*G. vaginalis* no se inhibió con ninguno de los extractos metanólicos y diclorometánicos ensayados ( $p>0.10$ ). Esto puede deberse a que la parte del fruto y rizoma utilizado no posee los metabolitos inhibitorios o estén presentes en concentraciones bajas que no inhiban el crecimiento de *G. vaginalis*. Sin embargo, se esperaba que alguno de los frutos y raíces utilizados inhibieran a dicha bacteria, por los fitocomplejos que poseen ya que los mismos poseen actividad bactericida y se ha demostrado que pueden inhibir el crecimiento de algunas bacterias (*B. subtilis*, *S. aureus*).

## 10. CONCLUSIONES

10.1. La prueba de validación para las especies de *Candida* por el método de inhibición mostró tener resultado dosis-efecto con fluconazol a concentraciones de 125 y 275 mg/mL.

10.2. La prueba de inhibición para *G. vaginalis* por el método de inhibición mostró tener resultado dosis-efecto con metronidazol a concentraciones de 500 y 1000 mg/mL.

10.3. El extracto metanólico de pericarpio de *P. granatum* mostró un efecto inhibitorio ( $p < 0.10$ ) a una concentración de 0.5 mg/mL contra *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata* y *C. parapsilopsis*, para *C. tropicalis* la dosis fue de 1 mg/mL

10.4. Los extractos de *A. comosus*, *B. alicastrum*, *C. aurantium*, *D. alata*, *H. patens*, *P. pseudoaureum* y *S. domingensis*, no mostraron efecto inhibitorio contra las especies de *Candida* ( $p > 0.10$ ).

10.5. *G. vaginalis* no fue inhibida ( $p > 0.10$ ) por los extractos metanólicos y diclorometánicos ensayados.



## **11. RECOMENDACIONES**

11.1. Realizar extractos bioguiados para determinar la fracción bioactiva y aislar la sustancia activa responsable de la actividad anticáncida.

11.2. Continuar con la investigación de productos naturales para buscar nuevas especies vegetales que puedan contribuir a la salud preventiva.

## 12. REFERENCIAS

1. Nester E. Anderson D. y Cols. Microbiología Humana. México. Editorial Manual Moderno. 2007. 966p. (p.731-732)
2. Hernández F. *Gardnerella vaginalis* en la etiología de la vaginosis bacteriana. Revista Costarricense Ciencias Médicas 1998; (3)19: 57-61.
3. Forbes B. Sahn D. Weissfeld A. Diagnóstico Microbiológico. 11ªed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana. 2004. 1063p. (p.354-357)
4. Winn W. Diagnóstico Microbiológico. 6ª ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana. 2008. 1382p. (p.795-796)
5. Velarde JE. Estrada RE. Sexually transmitted infections associated with vulvovaginal symptoms in adolescents denying sexual activity. Salud Pública Mexico. 2003; 19 (45): 641-646.
6. Fauci A. Kasper D. Longo D. Principios de Medicina Interna. 17ª ed. México. Editorial McGraw-Hill. 2009. 1358p. (p.792-793)
7. Jonathan SB. Ginecología de Novak. 13ª ed. México. Editorial McGraw-Hill, 2003. 830p. (p.372-375).
8. Forbes B. *et al.* Diagnostic Microbiology. 11ªed. Estados Unidos de América. Editorial Mosby, 2002. 1400p. (p.941-943).
9. Mendoza GA, Sánchez VJ, Sánchez PI. Frecuencia de vaginosis producida por *Gardnerella vaginalis* y su asociación con otros patógenos causantes de infección genital en la mujer. Ginecología. Revista Obstetricia Mexicana. 2001; 4(69): 272-276.
10. Gutiérrez M, López M. Microbiología y Parasitología Médica. Editorial Méndez. 2003. 843p. (p.820-822).
11. Murria P. *et al.* Clinical Microbiology. 8ª ed. Estados Unidos de América. Editorial ASM press. 780p. (p.315,495-496).
12. Madigan M., Martinko J., Parker J. Biología de los Microorganismos. 10ª ed. Editorial Prentice –Hall. México, S.A. de C.V. 2003. 986p. (p.856-857)
13. Torres M. Manual Práctico de Bacteriología Médica. Guatemala. Editorial Serviprensa C.A., 1996. 229p. (p.157-160).

14. Navarrete P. *et al.* Evaluación de los criterios de Nugent y Amsel para el diagnóstico de vaginosis bacteriana. *Revista Ginecología Médica de Chile* 2000; 128(7):767-771.
15. Cook. RL. *et al.* Clinical, Microbiological and Biochemical Factors in recurrent Bacterial Vaginosis. *Journal of Clinical Microbiology* 1992; 2(30):98-101.
16. Barbara AM. Bacterial vaginosis. *American Family Physician* 1998; 5(57): 129.
17. Murray P., Rosenthal K., Pfaller M. *Microbiología Médica*. 5ta. Ed. España. Elsevier España, S.A. 2006. 963p. (p.473-483)
18. Barberis IL. A biotype study of *Gardnerella vaginalis* isolated from patients with and without symptoms of Bacterial vaginosis. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica* 1999; 17(10): 506-508.
19. Diagnostico clínico, de laboratorio y tratamiento de la vaginosis por *G. vaginalis*. Fecha de consulta: 8 de Marzo de 2010. Disponible en: <http://med.javeriana.edu.co/publi/vniversitas/serial/v48n4/5-VAGINOSIS.pdf>
20. Prescott C., Harley J., Klein D. *Microbiología*. 5ta. Ed. España. Editorial McGraw-Hill Interamericana de España, S.A.U. 2002. 1195p. (p.751-753)
21. Koklik WK, Willey HP y Amos DN. *Zinsser Microbiología*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana, Documento Técnico No. 17, 2002. 1300p. (p.685-717).
22. Cutié M. *et al.* Vaginosis bacteriana en edades tempranas. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología* 2000;2(3):304-310.
23. Wesley B. *Gardnerella vaginalis*: Characteristics, clinical considerations and controversies. *Clinical Microbiological Reviews* 1992;5(3):213-237.
24. Marrazzo J. Persistent Enigmatic Ecological Mystery: Bacterial Vaginosis *Journal of Infectious Diseases* 2006;2(21)1,475-1,477.
25. Gini G. *Manual de procedimientos para la identificación de las bacterias con importancia clínica*. 2 ed. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, 1995. 130p. (p. 85-86).
26. Sánchez J. *et al.* Diagnóstico clínico, de laboratorio y tratamiento de la vaginosis por *Gardnerella vaginalis*, *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*, 2007;5(48):382-395.

27. Schmitdt H, Hansen JG. Diagnosis of bacterial vaginosis by wet mount identification of bacterial morphotypes in vaginal fluid. *International Journal STD AIDS* 2000; 7(11): 150-155.
28. Acevedo L. Arroyo G. Incidencia y etiología de vaginitis infecciosa en mujeres guatemaltecas. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia* 2009:1-4.
29. Hernández E. *et al.* Bacterial and Mycotic infections of the lower genital tract in HIV positive female patients. *Revista Científica de Medicina Tropical y Microbiología* 2003;31(2):104-111.
30. Bennett, JE. Searching for the yeast connection. *New England Journal of Medicine*. 1990;25(323):1766-1767.
31. Gaitán IC. Actividad de doce plantas nativas guatemaltecas contra *Sporothrix schenckii*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia), 2005. 58p.
32. Logemann HE. *Manual Práctico de Micología Médica*. Guatemala: Editorial Universitaria. 2000. 227p. (p.40-45).
33. Lorenzana L., Cardona A., Cáceres A. Actividad biocida de seis plantas de uso medicinal en el municipio de Tacaná, San Marcos, Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2005. 65p.
34. Ióvine E. *et al.* *El Laboratorio en la Clínica, Metodología Analítica, Fisiopatología e Interpretación Semiológica*. 3 ed. Bogotá: Editorial Médica Panamericana, 1998. 831 p. (p. 341-344).
35. Cáceres A. *et al.* Screening of antimicrobial activity of plants popularly used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. *Journal of Ethnopharmacology* 1991;6(31):263-276).
36. Braunwald E. *et al.* *Principios de Medicina Interna*. 15 ed. México: Editorial McGraw-Hill, 2002. 2,500p. (p.998-999).
37. Cáceres A. *Plantas de uso medicinal en Guatemala*. Primera edición. Editorial universitaria. Universidad de San Carlos de Guatemala. 1999. (p. 373-376).

38. Cáceres A. Samayoa B. Tamizaje de la actividad de plantas usadas en Guatemala para el tratamiento de afecciones gastrointestinales. Cuadernos de investigación. 1989. No. 6-89 Guatemala, DIGI, Universidad de San Carlos de Guatemala, 138p.
39. Logan M. Desórdenes digestivos y plantas y fuentes marinas. Basel, Birckhanser Verlag. 1973. 373p.
40. Pöll E. Plantas comestibles y tóxicas. Guatemala. CECON. 1984. Pp. 53.
41. Arriaza D.A. Acción diurética y antimicrobiana de algunos vegetales del género *Smilax*, Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 1983. 55p.
42. Cáceres A. Vademecum Nacional de Plantas Medicinales. Universidad de San Carlos de Guatemala. 2006. 262p.
43. Cáceres A. Plantas de uso medicinal en Guatemala. Primera edición. Editorial universitaria. Universidad de San Carlos de Guatemala. 1999. (p. 105-107).
44. Cáceres A., Bernal Y., Martínez J.V. 1era. Ed. Fundamentos de Agrotecnología de Cultivo de Plantas Medicinales Iberoamericanas. Santaré de Bogotá. D.C: Convenio Andrés Bello (AB) y Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). 2000. 536p.
45. Standley P. & Williams L. Flora de Guatemala. Feldiana: Botany. 1970. (Pp. 147-149).
46. Cáceres A. Plantas de uso medicinal en Guatemala. Primera edición. Editorial universitaria. Colección monografías Volumen 1. Universidad de San Carlos de Guatemala. 1999. (p. 283-286).
47. Albornoz, A. Medicina tradicional herbaria: Guía de fitoterapia. Instituto Farmacoterápico Latino S.A. División de Fitoterapia y Productos Naturales. Caracas Venezuela. 1992. Pp. 478.
48. Cáceres A. Plantas de uso medicinal en Guatemala. Primera edición. Editorial universitaria. Universidad de San Carlos de Guatemala. 1999. (p. 186-187).
49. Robineau L. Farmacopea Caribeña. Martinique, Francia. Editorial Emile Dèsormeauz, 1996. 380p. (p.179-182).
50. Asociación Becaria Guatemalteca. Centro Impresor Piedra Santa. Vol. I 1991. (Pp. 24,25,65).

51. Vasconcelos L. Sampaio M. Sampaio FC. Higino JS. Use of *Punica granatum Linn* as an antifungal agent against candidosis associated with denture stomatitis. *Mycoses* 2003. (p. 192-196).
52. Barrascout W. Inhibición de *G. vaginalis* y seis especies de *Candida* por extractos de plantas utilizadas para el tratamiento de infecciones vaginales. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2009. 47p.
53. Metronidazol mecanismo de acción. Vademécum. Fecha de consulta: 31 de Marzo de 2010. Disponible en: <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/m038.htm>.
54. Actividad anticándida de *P. granatum* en diferentes solventes. Fecha de consulta: 25 de Abril de 2010. Disponible en: <http://www.informaworld.com/smpp/content~db=all~content=a725242726>.
55. Laurylene César de Souza Vasconcelos. Fábio Correia Sampaio. Maria Carmélia Correia. Minimum Inhibitory Concentration of Adherence of *Punica granatum Linn* (pomegranate) Gel Against *S. mutans*, *S. mitis* and *C. albicans*. *Brazilian Dental Journal*. 2006;17(3)121-130.
56. Balu RB, Savitz DA, Ananth CV. Bacterial vaginosis and vaginal fluid defensins during pregnancy. *American Journal Obstetric Gynecology* 2002; 14(187): 1267-71.
57. Taylor F. Vaginal flora morphotypic profiles and assessment of bacterial vaginosis in women at risk for HIV infection. *Infection Disorders Obstetric Gynecology*. 2004; 8(12): 121-126.