



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“Efecto inhibitorio de extracto de *Hamamelis virginiana*
en bacterias aisladas de casos de vaginosis bacteriana.”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

ERIK MENDOZA OAXACA

ASESORES:
QFB VICTOR ABREGO REYES



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.

ASUNTO: VOTO APROBATORIO
SUPERIORES CUAUTITLÁN

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**



ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la **Tesis**:

Efecto inhibitorio de extracto de Hamamelis virginiana en bacterias aisladas de casos de vaginosis bacteriana

Que presenta el pasante: **Erik Mendoza Oaxaca**

Con número de cuenta: **301277563** para obtener el Título de: **Químico Farmacéutico Biólogo**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcallí, Méx. a 20 de octubre de 2011.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Francisco López Mejía	
VOCAL	QFB. Brígida del Carmen Camacho Enríquez	
SECRETARIO	QFB. Víctor Hugo Abrego Reyes	
1er SUPLENTE	QFB. Amparo Ramos Aguilar	
2do SUPLENTE	QFB. Leticia Cubillo Carrillo	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
HHA/pm

Agradezco a:

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Quien otorga el título de QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

A MIS ASESORES:
M.V.Z GERARDO CRUZ JÍMENEZ
M.V.Z. JOSE ANTONIO LICEA
Dr. VICTOR HUGO ABREGO REYES

Por el apoyo brindado ya que sin ustedes esto no sería posible.

Agradezco al jurado que reviso esta tesis, por sus valiosos comentarios.

*Dedicada a mis padres y hermana.
Gracias por su apoyo y amor.*

INDICE GENERAL.....	I
INDICE DE FIGURAS.....	V
INDICE DE TABLAS.....	VII
INDICE DE GRAFICAS.....	VIII
RESUMEN.....	IX
1. INTRODUCCION.....	1
1.1 APARATO REPRODUCTOR.....	3
1.2 APARATO GENITAL FEMENINO.....	3
1.3 ÓRGANOS INTERNOS.....	4
1.3.1 OVARIOS.....	4
1.3.2 TROMPAS DE FALOPIO.....	5
1.3.3 UTERO.....	6
1.3.4 VAGINA.....	6
1.4 ÓRGANOS EXTERNOS.....	7
1.4.1 VULVA.....	7
1.4.2 LABIOS MAYORES.....	8
1.4.3 LABIOS MENORES.....	8
1.4.4 CLÍTORIS.....	8

2. INFECCIONES VAGINALES.....	9
2.1.1. VAGINOSIS BACTERIANA.....	9
2.1.2. VULVOVAGINITIS.....	10
2.1.3. VAGINITIS POR TRICHOMONIASIS.....	10
2.2. BACTERIAS DE IMPORTANCIA MEDICA EN VAGINOSIS BACTERIANA	12
2.3. <i>Escherichia coli</i>	12
2.4. <i>Staphylococcus</i>	12
2.4.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	12
2.4.2. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	13
2.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
2.6. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	14
2.7. <i>Proteus vulgaris</i>	15
3. PLANTAS MEDICINALES.....	15
3.1 <i>Hamamelis virginiana</i>	16
3.1.1 NOMBRE COMUN.....	16
3.1.2 NOMBRE CIENTIFICO.....	17
3.1.3 FAMILIA.....	17
3.1.4 HABITAT.....	17
3.1.5 PARTE UTILIZADA.....	17

3.1.6	COMPOSICION QUIMICA.....	17
3.1.7	ACCION FARMACOLOGICA.....	18
3.1.8	OTRA ACCION.....	18
4	OBJETIVOS.....	19
4.1	OBJETIVOS GENERALES.....	19
4.2	OBJETIVOS PARTICULARES.....	19
5	HIPOTESIS.....	19
6	MATERIAL.....	20
7	PLAN DE TRABAJO.....	21
8	METODOLOGIA.....	22
8.1	OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE EXUDADO CERVICO-VAGINA.....	22
8.2	TRATAMIENTO DE MUESTRAS DE EXUDADO CERVICO-VAGINAL.....	22
8.3	PREPARACIÓN DE EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE <i>Hamamelis virginiana</i>	23
8.4	ESTERILIZACIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE <i>Hamamelis virginiana</i>	23
8.5	PRUEBA DE ESTERILIDAD DEL EXTRACTO.....	24

8.6 OBTENCION DEL EXTRACTO SECO.....	24
8.7 PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN DE TRABAJO.....	25
8.8 ENSAYO IN VITRO DE MTT.....	25
8.9 PRUEBA BACTERIOSTATICO - BACTERICIDA.....	26
9 RESULTADOS.....	28
9.1. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS.....	28
9.2. PRUEBA DE ESTERILIDAD DEL EXTRACTO.....	30
9.3. OBTENCIÓN DE EXTRACTO SECO.....	31
9.4 ENSAYO INVITRO DE MTT.....	32
9.5. PRUEBA BACTERIOSTATICO BACTERICIDA	43
9.6. DISCUSIÓN.....	45
9.7. CONCLUSIONES.....	47
9.8. BIBLIOGRAFIAS.....	48
9.9. DIRECCIONES ELECTRONICAS.....	52
9.10. ANEXO I.....	53
10. GLOSARIO.....	56

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Aparato Genital Femenino.....	3
Fig. 2 Órganos internos del aparato genital femenino.....	5
Fig. 3 Órganos externos del aparato genital femenino.....	7
Fig. 4 Hojas de la planta <i>Hamamelis virginiana</i>	16
Fig. 5. Estructura del Hamamelitanino.....	18
Fig. 6 Extracto de <i>Hamamelis virginiana</i>	23
Fig. 7 Orden de llenado de la Microplaca.....	26
Fig. 8 Prueba de esterilidad del extracto <i>Hamamelis virginiana</i> . Cultivo de extracto en medio de cultivo BHI. Prueba positiva.....	30
Fig. 9 Ensayo de microplaca para <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> y <i>Candida albicans</i>	32
Fig. 10 Ensayo en microplaca para <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Proteus spp.</i>	36
Fig. 11 Ensayo de microplaca para <i>Gardnerella vaginalis</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39

Fig. 12 Efecto bacteriostático del extracto de <i>Hamamelis v.</i> que presento ante <i>Escherichia coli</i>	43
Fig. 13 Efecto bacteriostático del extracto de <i>Hamamelis v.</i> que presento ante <i>Staphylococcus aureus</i>	43
Fig. 14 Efecto bacteriostático del extracto de <i>Hamamelis v.</i> que presento ante <i>Pseudomonas aeruginos</i>	44
Fig. 15 Cultivo de <i>Staphylococcus aureus</i> sembrado en un medio sales de manitol.....	53
Fig. 16 Cultivo de <i>Staphylococcus epidermidis</i> en un medio SM (sales manitol).....	53
Fig. 17 Cultivo de <i>Escherichia coli</i> en un medio EMB (eosina azul de metileno).....	54
Fig. 18 Tinción de Gram de <i>Candida albicans</i>	54
Fig. 19 de <i>Proteus ssp</i> en esta imagen se puede apreciar el efecto swarming,.....	55

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Órganos del aparato genital femenino.....	4
Tabla 2. Características, diagnóstico y tratamiento de las infecciones vaginales.....	11
Tabla 3. Hoja técnica del extracto <i>Hamamelis virginiana</i>	31
Tabla 4. Resultados del % de crecimiento para <i>Escherichia coli</i>	33
Tabla 5. Resultados del % de crecimiento bacteria <i>Staphylococcus epidermidis</i>	34
Tabla 6. Resultados del % de crecimiento bacteria <i>Candida albicans</i>	35
Tabla 7. Resultados del % de crecimiento bacteria <i>Staphylococcus aureus</i>	37
Tabla 8. Resultados del % de crecimiento bacteria <i>Proteus spp.</i>	38
Tabla 9. Resultados del % de crecimiento bacteria <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40
Tabla 10. Resultados del % de crecimiento bacteria <i>Gardnerella vaginalis</i>	41
Tabla 11. CMI para los diferentes microorganismos estudiados.....	42

INDICE DE GRAFICAS

Grafica 1. Porcentaje de muestras (+) y muestras (-).....	28
Grafica 2. Porcentaje de la tinción de Gram.....	28
Grafica 3. Porcentajes de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> en el ensayo con el extracto <i>Hamamelis virginiana</i> a diferentes concentraciones.....	33
Grafica 4. Porcentajes de crecimiento de <i>Staphylococcus epidermidis</i> en el ensayo con el extracto <i>Hamamelis virginiana</i> a diferentes concentraciones.....	34
Grafica 5. Porcentajes de crecimiento de <i>Candida albicans</i> en el ensayo con el extracto <i>Hamamelis virginiana</i> a diferentes concentraciones.....	35
Grafica 6. Porcentajes de crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> en el ensayo con el extracto <i>Hamamelis virginiana</i> a diferentes concentraciones.....	37
Grafica 7. Porcentajes de crecimiento <i>Proteus spp.</i> en el ensayo con el extracto <i>Hamamelis virginiana</i> a diferentes concentraciones.....	38
Grafica 8. Porcentajes de crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en el ensayo con el extracto <i>Hamamelis virginiana</i> a diferentes concentraciones.....	40
Grafica 9. Porcentajes de crecimiento de <i>Gardnerella vaginalis</i> en el ensayo con el extracto <i>Hamamelis virginiana</i> a diferentes concentraciones.....	41

Resumen

La vaginosis bacteriana es una enfermedad común de etiología poco conocida y de impacto para la salud pública. La prevalencia de la vaginosis bacteriana se estima entre el 25% al 35% entre mujeres que asisten a consulta por trastornos ginecológicos en general y enfermedades clínicas de transmisión sexual (**Weir E. 2004**). La vaginosis bacteriana es la causa más frecuente de flujo maloliente en mujeres de edad fértil, afecta predominantemente a jóvenes, sexualmente activas, pero puede ocurrir en ausencia de relaciones sexuales (**Sobel J.D.2000**). La vaginosis bacteriana representa un trastorno complejo exclusivo de la flora bacteriana vaginal con la desaparición de los *Lactobacillus*, sobrecrecimiento de *Gardnerella vaginalis* y bacterias vaginales anaeróbicas (**Hallberg D., Nilsson S., Mårdh P.-A. 2001**). Desde principios de la historia de la humanidad, el hombre ha recurrido al uso de plantas con un fin curativo, se conoce que *Hamamelis virginiana* es de uso medicinal y tradicional por personas nativas de Norteamérica para el tratamiento de diferentes padecimientos externos e internos. En este trabajo se analizó la actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico de *Hamamelis virginiana* en microorganismos aislados de muestras cervico-vaginales en mujeres que padecían vaginosis bacteriana. Para la obtención del extracto hidroalcohólico de *Hamamelis virginiana* se esterilizó por el método de filtración empleando una membrana 0.45µm, verificando la esterilidad con el sembrado en agar BHI incubando a 35°C/24hrs, una vez confirmada la esterilidad del extracto, se llevó a sequedad total, para obtener cristales colocándolos en un frasco color ámbar, se pesó y se obtuvo 6.5918g de cristales con los cuales se preparó una solución de trabajo de concentración 39.316µg/µl que posteriormente se usó para los ensayos con los microorganismos. Para cada bacteria analizada, primero se le realizó un ensayo en microplaca en donde se encontraban 9 diferentes concentraciones del extracto a las cuales se les colocó 100 µl de una suspensión bacteriana estandarizada al 1 de la escala de Mac Farland, también se tuvo un control positivo, negativo y un blanco, se incubó a 37°C/24hrs. Pasando el tiempo de incubación se realizó la prueba cualitativa bactericida-bacteriostático para un carril y en otro se añadió 5µl de MTT (técnica de Mosmann) enseguida se colocó en un espectrofotómetro para lectura de microplacas a una absorbancia de 490nm. Se demostró la eficacia del extracto en *Staphylococcus aureus*,

Staphylococcus epidermidis, *E. coli*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Gardnerella vaginalis*, *Proteus spp.* presentando un efecto bacteriostático en todos los microorganismos.

1. Introducción

La vaginosis bacteriana es la infección vaginal más frecuente en mujeres de edad reproductiva esta enfermedad representa una alteración en la flora vaginal que consiste en la desaparición o disminución de *Lactobacillus spp.* y un incremento de bacterias principalmente anaerobias.

Un aumento de secreción vaginal es uno de los síntomas más frecuentes del tracto genital femenino; investigaciones recientes han demostrado que el 96% de las descargas vaginales resultan en 5 tipos de infecciones : 1. la vaginosis bacteriana que se presenta en un 4% a 64%; 2. candidiasis vulvovaginal del 28% al 37%, 3. cervicitis por *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoea*, 4. *Herpes* simple virus del tipo 2, del 2 al 20%, 5. *Trichomonas colpitis* en alrededor del 10% de las mujeres (Numanovic F. et. al. 2008).

Los aspectos de más relevancia en los últimos tiempos ha sido el tratamiento de la vaginosis bacteriana y otras infecciones vaginales. Hay una gran variedad de infecciones vaginales (Vaginosis bacteriana, *Chlamidias*, *Ureaplasma*, Trichomoniasis, etc.) que se han asociado a parto prematuro; sin embargo, los ensayos clínicos de tratamiento de *Chlamidias*, *Ureaplasma* y *Estreptococo del grupo B* que los tratamientos de la misma no redujeron la tasa de prematuridad. Un metaanálisis de 19 estudios, concluyó que existía un riesgo incrementado de prematuridad en un 60% en los casos de vaginosis bacteriana (Caberon R.L. 2006).

Con el paso de los años se le ha dado más importancia al uso de las plantas medicinales, aunque ya se sabía que a principios de la historia de la humanidad ya se usaban con un fin curativo.

En registros de estos medicamentos, en el panorama español apareció la Revista de Fitoterapia y la fundación de la Sociedad Española de Fitoterapia Asociada para el desarrollo y el estudio de las plantas Medicinales y sus aplicaciones (SEFIT) en el año 2000. Por su parte la OMS ha publicado documentos sobre la evaluación de la calidad, la seguridad y la eficacia de los preparados a base de plantas medicinales (Castillo G. E. y Martínez S. I., 2007). En el año de 1997 se creó un grupo de trabajo sobre

medicamentos a base de plantas en el seno de la Agencia Europea del Medicamento, que abordó la armonización de importantes temas legales y regulatorios en la Unión Europea, y que en el año del 2004 fue transformado en el comité sobre medicamentos a base de plantas, con función a evaluadora.

En lo que respecta a nuestro país la Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (CPFEUM) fundada el 26 de septiembre de 1984 por acuerdo secretarial es la que se encarga de la regulación de la herbolaria por medio de su ejemplar titulado Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos.

1.1 Aparato Reproductor

La función normal del aparato reproductor es distinta de la de otros sistemas corporales. El funcionamiento correcto del aparato reproductor no asegura la supervivencia del individuo, si no de la especie, la raza humana. Además, la actividad normal del sistema reproductor produce hormonas que permiten el desarrollo de las características sexuales. (Gary A. Thibodeau, Kevin T. Patton 2008).

1.2 Aparato Genital Femenino.

El aparato genital de la mujer está compuesto por dos glándulas mixtas de secreción interna y externa (los ovarios); dos conductos por donde se dirigen los óvulos del ovario del útero (trompas uterinas); un órgano que recibe y contiene el huevo fecundado (el útero) y un conjunto de órganos que intervienen en la copula (la vagina y la vulva), a lo que se agrega por la íntima relación fisiológica que con estos posee, la glándula mamaria. (Quiroz F, 2004).

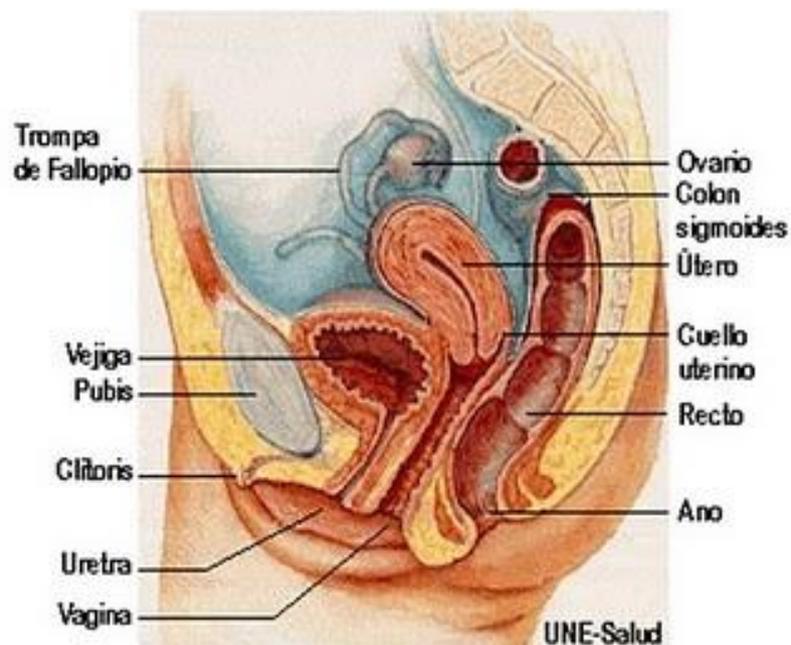


Fig. 1 Aparato Genital Femenino.

Tabla 1. Órganos del aparato genital femenino.

Órganos internos	Órganos externos.
Ovarios.	Vulva.
Trompa uterina.	Labios mayores.
Útero.	Labios menores.
Vagina.	Clítoris.

1.3 Órganos internos.

1.3.1 Ovarios.

Los ovarios son un par de glándulas semejantes a almendras en forma, tamaño, homologas (con el mismo origen embrionario) a los testículos del varón. Situados a uno y otro lado del útero, descienden hasta el borde de la porción superior de la pelvis durante el tercer mes de desarrollo prenatal. Un conjunto de ligamentos lo mantiene en su posición. Ligamento ancho, que es parte del peritoneo parietal se une a los ovarios mediante un repliegue peritoneal de doble capa, el mesovárico. El ligamento ovárico propio fija los ovarios al útero, mientras que el ligamento superior los une con la pared pélvica. Cada ovario posee un hilio, por el cual entran y salen vasos sanguíneos y nervios además de ser el sitio de inserción del mesovárico (Tortora G. J; Derrickson B; 2006).



Fig. 2 Órganos internos del aparato genital femenino

1.3.2 Trompas de Falopio.

También llamadas oviductos (conductos de los huevos). Conductos tubulares que comunican la cavidad uterina con la cavidad peritoneal, donde se encuentran los Ovarios

En su extremo distal, las trompas se abren en forma de embudo con múltiples prolongaciones vellosas llamadas fimbrias (pabellón tubárico). Las fimbrias tienen la función de recoger el óvulo liberado en la superficie de uno u otro ovario en el momento de la ovulación.

En el interior de las trompas ocurre la fertilización del óvulo por los espermatozoides y la nutrición del embrión durante la primera semana de embarazo.

Entre el sexto y octavo día después de la fecundación, las cilias en movimiento que tapizan la mucosa transportan el huevo fecundado hacia la cavidad uterina, a fin de que el embrión se anide en el endometrio y continúe su desarrollo.

1.3.3 Útero.

El útero es un órgano con forma de pera situado en la parte superior de la vagina, entre la vejiga urinaria por delante y el recto por detrás y está sujeto por seis ligamentos. El útero se divide en dos partes: el cuello uterino o cérvix y el cuerpo principal (el corpus) (Cabero R.L. 2006).

El útero o matriz es parte del trayecto que siguen los espermatozoides para llegar a las trompas de Falopio además de ser el sitio de la menstruación, implantación del ovulo fecundado, desarrollo embrionario y fetal durante la gestación y trabajo de parto. Situado entre la vagina y el recto, el útero no grávido tiene el tamaño y forma de una pera invertida. En mujeres que no han estado embarazadas, mide unos 7.5cm de longitud, 5cm de ancho y 2.5cm de espesor, siendo más grande en mujeres que se embarazaron recientemente y menor cuando son bajas las concentraciones de hormonas sexuales femeninas, como ocurre después de la menopausia (Tortora G. J; Derrickson B; 2006).

1.3.4 Vagina.

La vagina es un conducto para el flujo menstrual, parto y semen. Se trata de un órgano fibromuscular y tubular de 10cm de longitud con revestimiento de mucosa. Situada entre la vejiga y el recto, se dirige en sentido posterosuperior hasta su unión con el útero. Un espacio llamado fondo de saco vaginal rodea dicha unión (Tortora G. J; Derrickson B; 2006).

1.4 Órganos externos.

1.4.1 Vulva.

El término vulva se aplica de manera conjunta a los órganos genitales externos de la mujer (Tortora G. J; Derrickson B; 2006). La vulva es una estructura cutánea que se encuentra en el perineo anterior inmediatamente por debajo del monte de Venus. Esta constituida por los labios mayores, labios menores, el clítoris, con su prepucio, el vestíbulo de la vagina, el meato uretral y las glándulas vestibulares (Guerra T. A, 2007).

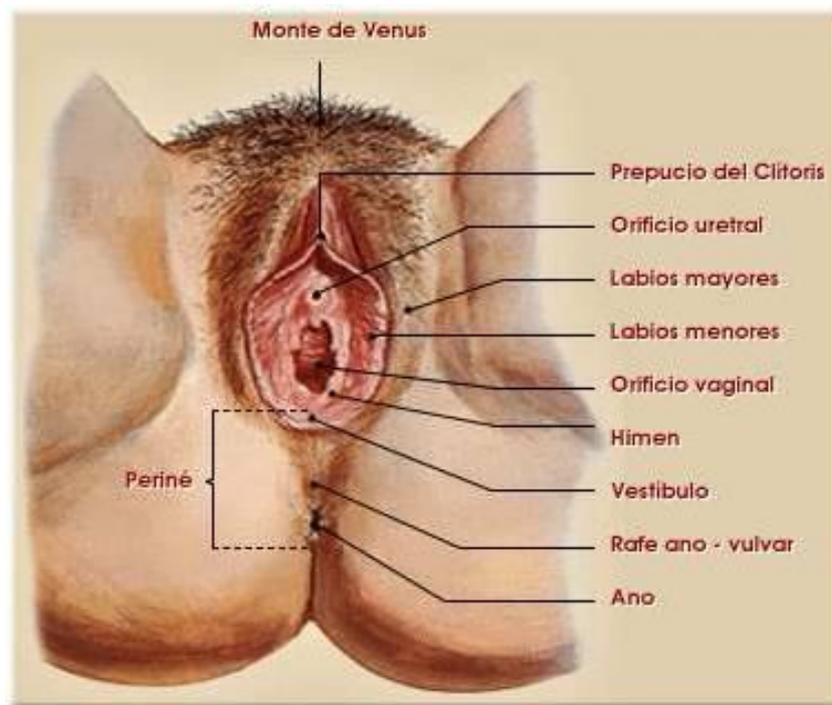


Fig. 3 Órganos externos del aparato genital femenino

1.4.2 Labios mayores.

Los labios mayores, formados por dos pliegues cutáneos que se extiende desde el monte de Venus a la región anal. Su cara externa tiene un color más oscuro y esta recubierta de vello y su cara interna es de color rosada, lisa y húmeda. Su extremidad posterior forma la comisura posterior situada a 2.5cm del ano. Los labios mayores están formados por tejidos adiposos y fibras musculares lisas que forman un órgano semieréctil. (Léon Perlemuter, Christophe Bilweis 1999)

1.4.3 Labios menores.

Los labios menores están situados por dentro de los labios mayores. Son dos pliegues mucosos que limitan el vestíbulo. Tiene un aspecto de color rosado liso, pero adoptan un color más oscuro durante el embarazo y tiene tendencia a atrofiarse durante la menopausia. Los tejidos de los labios menores convergen en una parte superior dividiéndose cada uno cerca de su extremo en dos laminillas desvaneciéndose las superiores en el prepucio del clítoris y uniéndose las inferiores para formar el frenillo del clítoris. (Léon Perlemuter, Christophe Bilweis 1999)

1.4.4 Clítoris.

Órgano homólogo al pene, de uno a dos centímetros de longitud, situado en la parte superior del introito, por encima del meato urinario; constituido por tejido eréctil que se fija al periostio del pubis. Provisto de una rica red venosa y sensitiva.

2. Infecciones vaginales

2.1.1 Vaginosis Bacteriana

La vaginosis bacteriana ha recibido diversas denominaciones vaginitis inespecífica, vaginitis asociada a *Gardnerella vaginalis* etc. Lo que hace difícil su comprensión, su definición y, en consecuencia, su diagnóstico, la gran importancia que actualmente se conoce a la vaginosis bacteriana, viene dada por su relación directa con la Enfermedad Pélvica Inflamatoria, de la que sería su precedente en muchas pacientes. (García R. J. A. y Picazo J. J. 1998)

La vaginosis bacteriana es un cuadro de vulvovaginitis caracterizado por la aparición de la secreción vaginal de olor desagradable con pH alcalino. Este olor característico y desagradable, olor a pescado, de flujo vaginal se debe a la presencia de aminas, y puede incrementarse poniendo en contacto una gota de secreción vaginal con una gota de un álcali (disolución de hidróxido de sodio o potasio): es la llamada prueba de aminas.

Gardnerella vaginalis es un bacilo que en la tinción de Gram tiene un comportamiento variable, aunque generalmente aparece como gram negativo, pleomórfico, anaerobio facultativo, exigente unos requerimientos nutricionales y que se encuentran en el tracto genital femenino como microbiota normal. Durante años era el agente causal de la vaginosis bacteriana, pero actualmente se sabe que esta es una infección sinérgica, producida por la acción conjunta de diferentes microorganismos anaerobios, entre los que se encuentra *G. vaginalis*.

El diagnóstico se efectúa por la prueba de aminas o por la presencia de tinción de gram del exudado vaginal de la llamadas células pista o células guía (clue cells), que son células epiteliales tapizadas con numerosos pequeños bacilos largos grampositivo. Además se observa una disminución o desaparición de los bacilos largos grampositivo (*Lactobacillus*), habitualmente presentes en la microbiota vaginal. Estos *Lactobacillus* son responsables en gran parte del pH ácido de la vagina que en condiciones fisiológicas protegen el epitelio vaginal de ser colonizado por microorganismos distintos a los de una microbiota normal.

Tratamiento se realiza fundamentalmente con Metronidazol por vía oral, no siendo en general necesario tratar al otro miembro de la pareja si no presenta síntomas. En la mujer embarazada se recomienda tratar siempre esta infección, ya que se ha relacionado con el desencadenamiento de un parto prematuro. (De la Rosa M; Prieto J, 2003).

2.1.2. Vulvovaginitis

La colonización vaginal por *Candida* es relativamente frecuente, en particular entre las mujeres atendidas en clínicas de ETS (Enfermedades de Transmisión Sexual). Muchas de estas mujeres también presentan colonización en la zona ano rectal. Sin embargo, solo la mitad de ellas tiene sintomatología de vulvovaginitis candidiasica, que incluye inflamación de vulva y vaginal, fisuras en la mucosa y existencia de un exudado adherente a la mucosa, blanquecino o amarillento, con grumos. La mayoría de las mujeres experimentan a lo largo de su vida algún episodio de candidiasis vaginal, no siempre tiene la candidiasis el carácter de ETS, pudiéndose ser una infección endógena.

2.1.3. Vaginitis por Trichomoniasis

La infección por *T. vaginalis* constituye una de las ETS mas frecuentes, produce leucorrea profusa, espumosa, amarillo-verdosa y maloliente, con abundantes polimorfo nucleares, pH alcalino, prurito vaginal y, en la exploración, vagina inflamada, cérvix enrojecido y edematoso con aspecto de frambuesa. (García R. J. A. y Picazo J. J. 1998)

Tabla 2. Características, diagnóstico y tratamiento de las infecciones vaginales.

	Vagina normal	Vulvovaginitis por candida	<i>Trichomonas vaginalis</i>	Vaginosis
Flora microbiana	<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Candida albicans</i> y otras levaduras	<i>Trichomonas vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i> , <i>micoplasma</i> y flora anaerobia asociada.
Síntomas o signos	Ninguno	Irritación y picor vulvar, leucorrea.	Leucorrea profusa y maloliente.	Leucorrea maloliente y abundante.
Exudado vaginal	Claro o blanco. Floccular no homogéneo	Blanco en agregados adherentes.	Amarillento homogéneo. Poco viscoso, a menudo espumoso.	Blanco o gris Homogeneo. Recubre la mucosa vaginal.
Inflamacion del introide vulvar o vaginal	No	Eritema del epitelio vaginal. Frecuente dermatitis.	Eritema del epitelio vaginal, petequias en cérvix.	No
pH de exudado	<4.5	<4.5	<4.5	<4.5
Olor a aminas (pescado) cuando se añade KOH (10%) al exudado vaginal.	No	No	Frecuentemente	Siempre
Examen microscópico	Células epiteliales predominio de lactobacillus	Leucocitos, células epiteliales, levaduras seudomicelios en el 80%.	Leucocitos <i>Trichomonas</i> en el 80-90% de las sintomáticas.	Células “clave” (clue). Escasos leucocitos y <i>Lactobacillus</i> , abundante flora mixta.
Tratamiento	No.	Clotrimazol o Miconazol intravaginal, una semana.	Metronidazol 2g p.o una sola dosis.	Metronidazol 500mg/12h 5-7 días.
Conducta frente a las parejas sexuales.	Ninguna.	Ninguna: si hay dermatitis del pene, tratamiento tópico.	Búsqueda de otras ETS Metronidazol.	Búsqueda de otras ETS. Tratamiento si lo requiere.
Modificada de K.K. Holmes, 1989)				

2.2. Bacterias de importancia medica en vaginosis bacteriana.

Microorganismos que con mayor frecuencia causan infecciones vaginales e infecciones del tracto uterino y prostatitis. En concreto los coliformes y *Escherichia coli* son mas frecuentes en el medio extrahospitalario. En el hospital son importantes las cepas más resistentes de coliformes como *Enterobacter* y *Citrobacter*, *Pseudomonas*, *Enterococos* y *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA). (J. Keith Struthers, Roger P. Westran 2005)

2.3. *Escherichia coli*

El genero *Escherichia* contiene una sola bacteria *E. coli*, es la especie bacteriana mas comúnmente recuperada en los laboratorios clínicos. Es uno de los organismos comunes involucrados en sepsis Gram negativa, las infecciones del tracto urinario y las heridas, la neumonía y meningitis en neonatos.

Se calcula que la *E. coli* causa unos 73,000 casos de infecciones entre ellos 61 muertes cada año en los E.U. según estadísticas de los CDC. El tratamiento de primera elección es trimetoprima-sulfametoxazol para reducir la diarrea del viajero (OMS., et al 2006).

2.4. *Staphylococcus*

Son microorganismos capaces de sobrevivir en condiciones adversas, colonizar fácilmente la mucosa y la piel de los humanos. La especie que se asocian con mas frecuencia a las enfermedades en humanos son *Staphylococcus aureus* (el miembro mas virulento), *S. epidermidis* y *S. saprophyticus*

2.4.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es un microorganismo ampliamente distribuido en todo el mundo y los portadores sintomaticos o las personas con lesiones estafilocócicas actúan como reservorios de la infección. En las poblaciones hospitalarias la incidencia de portadores nasales oscilan entre el 15 - 50%, y es incluso mayor en los toxicómanos por vía intravenosa y en los pacientes con diabetes mellitus insulín dependiente. La forma de contagio fundamental es la contaminación de las manos con secreción nasal. Las manifestaciones mas frecuentes por de la enfermedad por *Staphylococcus aureus* son

las infecciones superficiales (conjuntivitis, forúnculos, paroniquia) y de los tejidos blandos (celulitis, mastitis, incisiones quirúrgicas). Estos microorganismos son una de las causas principales de artritis séptica y de osteomielitis. La bacteremia por *Staphylococcus aureus* puede causar endocarditis y meningitis. Los *Staphylococcus* no producen faringitis y son los responsables de menos del 10% de las neumonías bacterianas. La invasión del aparato gastrointestinal por los estafilococos pueden adoptar dos formas. En una de ellas la ingestión de la enterotoxina estafilocócica provoca vómitos y diarrea 3-6 horas después del consumo de alimentos contaminados por *S. aureus*. Es característico que estos síntomas no vayan acompañados por fiebre. En la otra, la enterocolitis estafilocócica se debe a la proliferación de *S. aureus* en el intestino de un paciente que ha sido tratado con antibióticos de amplio espectro por vía oral. Las cepas habituales de *Staphylococcus aureus* son resistentes a la penicilina. Los antibióticos eficaces frente a ellas son aminoglicosidos, las cefalosporinas, la oxacilina y la nafcilina.

El *síndrome de shock toxico estafilocócico* es una enfermedad sistémica potencialmente mortal debida a la infección de *Staphylococcus aureus* y la producción de toxinas.

Se asocia al uso de tapones durante la menstruación y de esponjas vaginales anticonceptivas. Se han descrito otras causas no menstruales de síndrome de shock toxico tales como el taponamiento nasal, el parto y aborto, la infección de heridas quirúrgicas y las infecciones vaginales.

2.4.2. *Staphylococcus epidermidis*

Staphylococcus epidermidis es un microorganismo de bajo potencial patógeno que siempre forma parte integrante de la flora cutánea normal. Debido a su abicuidad se aisla a menudo en las muestras clínicas, incluido los hemocultivos. No obstante, estos microorganismos son, en la mayoría de las ocasiones, contaminantes cutáneos mas que verdaderos patógenos y solo producen infecciones en los pacientes con graves problemas médicos subyacentes. Una manifestación frecuente de la infección por *Staphylococcus epidermidis* es la bacteremia secundaria a un catéter intravenoso infectado. Mucho de estos pacientes desarrollan una febrícula persistente con elevaciones importantes periódicas de la temperatura corporal. Pueden encontrarse o no signos de tromboflebitis. La extracción de los catéteres contaminados es la parte mas

importante del tratamiento. A este respecto, el uso de cateteres venosos centrales impregnados de antiséptico reduce el riesgo de bacteremias relacionadas con este instrumental.

El problema terapéutico más complejo causado por *Staphylococcus epidermidis* es la infección de las prótesis valvulares cardíacas. Es típico que esta infección siga una evolución subaguda, pero la erradicación del microorganismo es difícil dada su resistencia a muchos de los antibióticos disponibles. (Stoelting K. R. y Dierdorf S. F. 2003)

2.5. *Pseudomonas aeruginosa*.

Pseudomonas aeruginosa. Se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza: en el agua, en el suelo e incluso en el jabón, además de ser parte de la flora saprofítica de pie e intestino en seres humanos y animales de diversas especies. No afecta a individuos sanos. Se comporta como oportunista en pacientes inmunodeprimidos que han recibido antibioticoterapia. La importancia clínica de la *P. aeruginosa*, es bien conocida ya que es el agente causal de otitis media, oftalmítis, infecciones de heridas, bacteriuria, neumonía y bacteremia. Causa una gran mortalidad en pacientes con compromiso inmunológico, quemados, oncológicos. En los hospitales, la transmisión de paciente a paciente por las manos del personal es más importante que la diseminación aérea. (Terrés M. A. et al. 1990)

2.6. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae es considerado un patógeno oportunista, causante de infecciones intrahospitalarias, infecta a pacientes con factores de riesgo de contraer una infección intrahospitalaria. Es clínicamente el más importante miembro del género de las enterobacterias y ocupa el primer lugar de un porcentaje del 31% en infecciones de tracto urinario seguido por *E. coli* con el 10% de las personas de edad adulta. También es un patógeno oportunista en pacientes con enfermedad pulmonar crónica, atrofia de la mucosa nasal y Rinoscleroma (Lisboa T. et al 2007)

2.7. *Proteus vulgaris*

Es un patógeno oportunista en humanos, causando infecciones urinarias, de heridas y en abscesos hepáticos. *P. vulgaris* tiene, por lo general, sensibilidad a la ciprofloxacina, ceftazidima, sulbactam, piperacil y al unasin, entre otros antibióticos. Es fácil aislar al *P. vulgaris* en individuos que habitan hogares de cuidados de larga duración, hospitales y en pacientes con enfermedades crónicas o con un sistema inmune comprometido.

3. Plantas medicinales.

El uso de las plantas con fines curativas se remonta al principio de la historia de la humanidad. El hombre recurría a la naturaleza en busca de su alimento y de su salud. Por medio de aciertos y errores aprendió a conocer las plantas que lo curaban; este conocimiento se transmitió de generación en generación y fue incrementándose con la experiencia. Sin los recursos que lo ofreció la naturaleza el hombre no hubiera sobrevivido. Tres mil años antes de Cristo se escribió el libro mas antiguo de plantas medicinales en china; los sumerios, 2500 años A.C. usaban las plantas con fines curativos; los asirios conocían mas de 250 hierbas medicinales; en la Grecia antigua se usaban, entre otras la canela, el ruibarbo, la genciana y la mostaza; de sus extensiones por Africa, Persia y la India, Alejandro Magno introdujo en Europa un sinnúmero de plantas con propiedades curativas. (Hernandez M. R., Gally J. M; 1981)

Planta medicinal, según formulo la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1978, es cualquier planta que en uno o mas órganos contienen sustancias que pueden ser utilizadas con finalidad terapéutica o que son precursores para la semisíntesis quimicofarmacéutico. (Castillo G.E, Martínez S. I; 2007)

3.1. *Hamamelis virginiana*

La planta medicinal popular *Hamamelis virginiana*, tiene una larga tradición de uso en el tratamiento de una serie de dolencias, tales como trastornos gastrointestinales y las condiciones inflamatorias de la piel. Los extractos de la corteza y de hojas de estas especies son muy apreciados en varios países por sus propiedades curativas. Se emplea como un agente hemostático local y como un astringente, ayuda por ejemplo, la curación de heridas, quemaduras y la inflamación. A partir de estudios clínicos y las prácticas medicas tradicionales, los componentes volátiles y de la fracción polar de la planta son de interés particular, que contenga las sustancias biológicamente activas supuestas.

3.1.1 Nombre común o vulgar:

Hamamelis, Avellana de bruja



Fig. 4 Hojas de la planta *Hamamelis virginiana*.

3.1.2 Nombre científico o latino:

Hamamelis virginiana

3.1.3 Familia:

Hamamelidaceae.

3.1.4 Hábitat

Su hábitat natural se extiende por América del norte, especialmente en Virginia, en donde toma el apelativo de virginiana. Se cultiva también en jardinería, encontrándose en la actualidad en proceso de expansión

3.1.5 Parte utilizada

La planta esta constituida por las hojas que es la parte mas usada, ocasionalmente se emplea la corteza y en algunas veces se usa conjuntamente.

3.1.6 Composicion Quimica.

La hoja contiene el 10%, constituidos por una mezcla de proantocianidoles, flavanos monómeros libres y esterificados, ácido gálico, poligaloilglucosa, hamamelitanino (2,5-di-O-galoil- α -D-hamamelofurafuranosa). Los constituyentes polifenólicos mayoritarios son proacianidoles y prodelphinidoles.

Contiene además aceite esencial, compuesto aproximadamente, por un 40% de alcoholes, 15% de ésteres y un 25% de derivados carbónilicos (2-hexanal, acetaldehído, iononas), glucósidos de flavonoles (miricitrósidos).

En la corteza, los taninos son los componentes mayoritarios, destacando el hamamelitanino, cuyo contenido es de 30 veces superior al de las hojas contiene también proantocianidoles. (Bravo L. 2006)

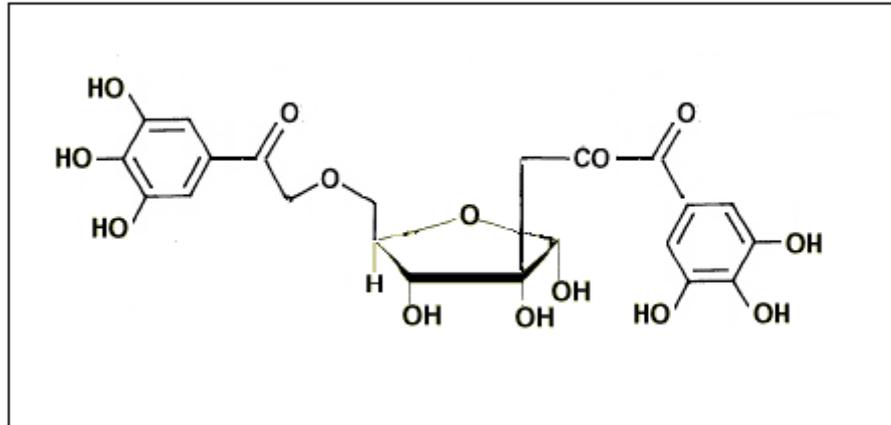


Fig. 5. Estructura del Hamamelitanino.

3.1.7. Acción farmacológica.

Acción venotónica, antiinflamatoria y antioxidante. La acción venotónica ha sido demostrada en conejos para diversos extractos acuosos e hidroalcohólicos por lo que se refiere a la actividad antiinflamatoria, esta fue demostrada en ratas para fase crónica de inflamación, pero no se ha observado actividad en la fase aguda.

En cuanto la corteza (hamamelitaninos) ha demostrado actividad antioxidante contra radicales superóxido inhibiendo, por otra parte, la despolimerización de ácido hialurónico y provocando además la concentración de la túnica muscular de las venas.

El hamamelitano es inhibidor de la 5-lipooxigenasa tiene actividad anti-TNF (anti factor de necrosis tumoral) y antioxidante. (Castillo G. E. y Martínez S. I. 2007)

3.1.8 Otra acción.

Otras aplicaciones que también han sido demostradas clínicamente son en el tratamiento de la dermatitis atópica, dermatitis seborreica, neurodermatitis y herpes labial.

Un extracto concentrado de hoja de Hamamelis ha demostrado actividad antiviral *in vitro* contra virus de herpes HSV-1. Por lo que se refiere a la corteza, el extracto acuoso y acetonico ha demostrado actividad antimicrobiana *in vitro* contra diferentes microorganismos. (Bernat Vanaclocha Vanaclocha, Cañigual; 2003)

4. Objetivos

4.1 Objetivo General.

Determinar el efecto inhibitorio del extracto de *Hamamelis virginiana* en bacterias aisladas de casos de vaginosis bacteriana.

4.2 Objetivos Particulares.

Aislar las bacterias que están involucradas en la enfermedad vaginosis bacteriana.

Obtener un extracto hidroalcohólico estéril.

Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto *Hamamelis virginiana* usando la técnica de Mosman.

Determinación de la actividad bacteriostática y/o bactericida del extracto *Hamamelis virginiana*.

5. Hipótesis.

Si el extracto de *Hamamelis virginiana* presenta un efecto inhibitorio sobre bacterias causantes de vaginosis bacteriana, entonces se podrá sugerir como una alternativa de tratamiento.

6. Material

Extracto Hidroalcohólico de *Hamamelis virginiana*

Agar BHI (marca MCDLAB)

Caldo BHI (marca MCDLAB)

Agar sales manitol (marca MCDLAB)

Agar sangre (marca MERCK)

Agar de eosina y azul de metileno (marca BIOXON)

Agar MacConkey (marca BIOXON)

CROMOagar (marca BD)

Agar Cetrimida (marca BIOXON)

Agar Casman (marca DIBICO)

MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (Sigma)

Dimetil Sulfóxido (Sigma)

SoluVet (Esteripharma)

Agua

Equipo

Campana de flujo laminar (VECO)

Bomba de vacío (Hoffmann-Pinther &

Bosworth)

Contenedor s.m.

Estufa (RIOSSA)

Vortex (Scientific Industries)

Autoclave s.m.

Filtro tipo bala (MILLIPORE)

Material de vidrio.

Pipeta volumétrica de 1 ml

Pipeta volumétrica de 2 ml

Matraz aforado de 25 ml

Matraz de Erlen Meyer 250 ml

Cristalizador

Otros

Placas PCR de 96 orificios (marca SARSTEDT)

Mechero

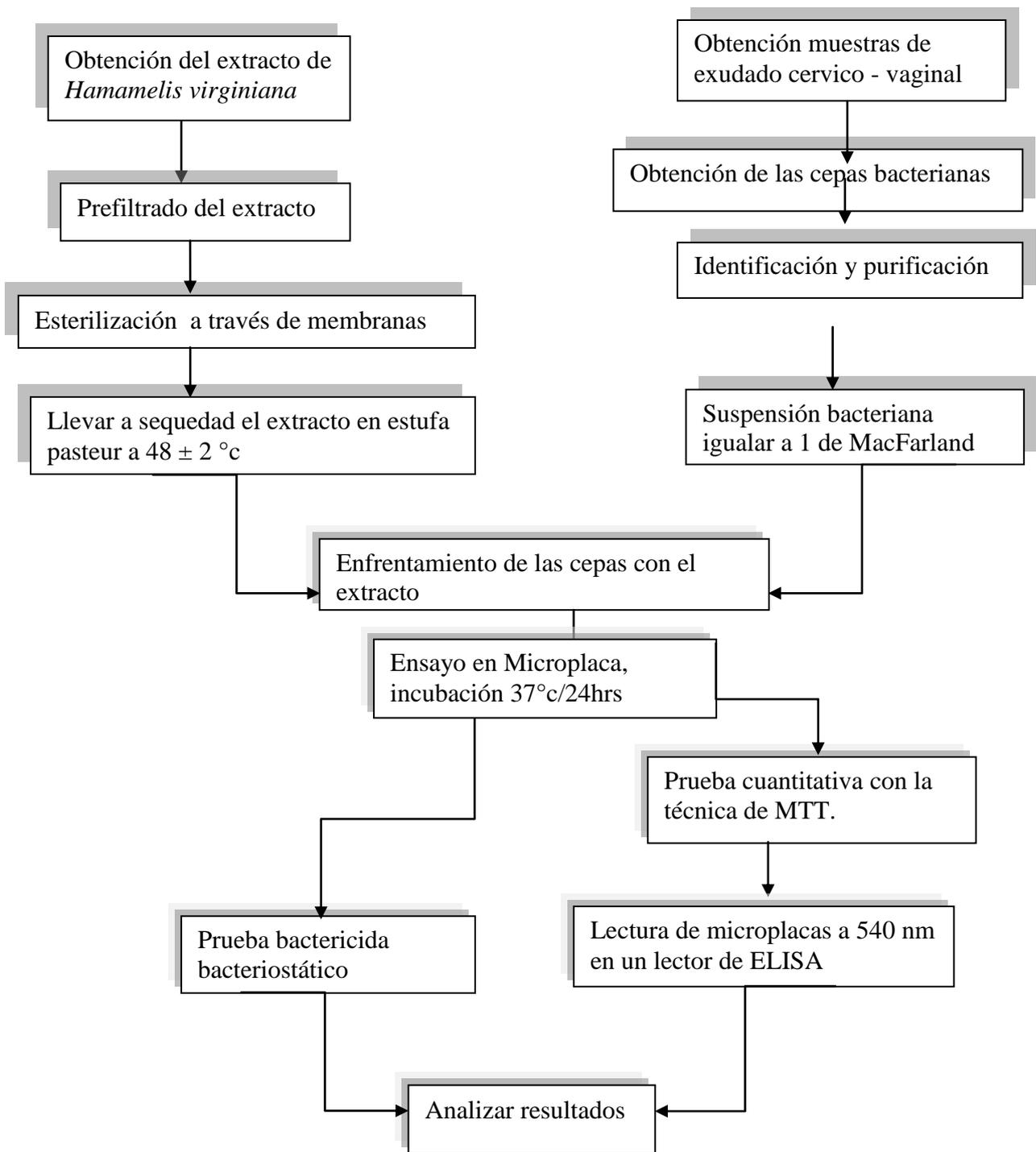
Papel filtro

Membranas de 0.45 μ m (marca MILLIPORE)

Maskin tape

Micropipetas de 100 μ l

7. Plan de Trabajo.



8. Metodología.

8.1 Obtención de muestras de exudado cervico – vaginal.

Las muestras fueron donadas, en tubos de transportación con agar Stuart por el laboratorio de análisis clínicos del Hospital General de zona No 57, “la Quebrada”.

8.2 Tratamiento de muestras de exudado cervico - vaginales.

El tratamiento de las muestras donadas de exudado cervico - vaginal fue de la siguiente manera.

- 1.- Se desinfecto el área de trabajo con una solución electrolisada de superoxidación de 60ppm así como el mechero utilizado dejando que actuara por 10 minutos.
- 2.- Enseguida se prendió el mechero para mantener el área de trabajo en condiciones de esterilidad al momento de trabajar.
- 3.-Se tomo el hisopo que contenía la muestra y con la técnica de sembrado en masivo se sembró en 7 diferentes medios de cultivo selectivo como se indica a continuación.

Agar sales manitol.

Agar Cetrimida.

Agar sangre.

Agar MacConkey.

Agar Eosina Azul de Metileno.

Agar Cassman.

CROMOagar.

4.- Posteriormente se lleva a incubación a 37°C/24hrs. Para el agar Cassman se incubaba en condiciones de anaerobiosis; colocándolo en una campana de desecación con atmosfera de CO₂.

5.-Al finalizar la incubación se realizan tinción de Gram y pruebas bioquímicas a las colonias que se encuentren en las cajas de agar.

6.- Identificadas y purificadas las bacterias, se sembraron en tubos de conservación se incubaron 37°C/24hrs y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

8.3 Preparación del extracto hidroalcohólico de *Hamamelis virginiana*.

El extracto fue facilitado por la empresa EXTRACTOS SIGMA S.A de C.V. el cual se entregó con ficha técnica *Hamamelis virginiana* código 3069HC.



Fig. 6 Extracto de *Hamamelis virginiana*

8.4 Esterilización del extracto hidroalcohólico de *Hamamelis virginiana*.

Para la esterilización del extracto se realizaron los siguientes pasos:

1.-Un prefiltrado.

2.-El extracto prefiltrado se vació en un contenedor, para que a su vez se filtrara por membrana de 0.45 μm , usando una bomba de vacío, esto se realizó fuera de la campana flujo laminar.

3.-Al finalizar la filtración por membrana de 0.45 μm , se esterilizó el filtro tipo bala y el cristalizador en autoclave a 15lb/15min. Todo el material que se introdujo en la campana de flujo laminar, se limpió con SES.

4.- La campana de flujo laminar previamente limpia y sanitizada se encendió por 30min antes de usarla, pasado el tiempo se armó el equipo de filtrado dentro de la campana de flujo laminar.

5.- En seguida el extracto se deposito en el contenedor y se hizo pasar a través de membrana 0.45 μm recibiendo el extracto en un cristalizador estéril.

8.5 Prueba de esterilidad del extracto.

Esta prueba se realizo al momento de finalizar la esterilización del extracto.

1.-Se tomaron directamente del cristalizador 3ml de extracto estéril.

2.-En 3 cajas de agar BHI se coloco 1ml de extracto y con un hisopo estéril se sembró en masivo.

3.-Se incubaron en estufa bacteriológica a 37 ° C por 24 hrs y 48 hrs.

4.-A las 24 y 48 hrs de incubación se revisaron las cajas y al no presentar contaminación se dio el extracto como estéril.

8.6 Obtención de extracto seco.

Para obtener el extracto seco el cristalizador que lo contenía se coloco en estufa a 45 °C hasta sequedad. Seco el extracto se procedió a la obtención de los cristales como se describe a continuación.

1.-Se limpio y esterilizo con solución SES el área de trabajo y se coloco un mechero para esterilidad.

2.- Se saco el cristalizador de la estufa bien tapado con papel metálico y se raspo el extracto con espátula estéril.

Para este paso de la obtención del extracto seco se uso guantes estériles, cofia y bata.

3.-El extracto seco se colocó en un vial estéril previamente pesado.

4.-Se pesó el vial con el extracto seco y se registró cuanto se obtuvo.

8.7 Preparación de Solución de trabajo.

Antes de trabajar en la preparación de solución de trabajo, se esterilizó todo el material que se utilizó (Vial, Matraz aforado, SSF, espátula) y se limpió el área de trabajo con SES.

1.-Se pesó 0.9829g de extracto seco en un vial usando una balanza analítica.

2.-Al extracto pesado se le agregó 1 ml DMSO (dimetil sulfóxido), para facilitar su dilución.

3.-Diluido el extracto se transfirió a un matraz aforado de 25 ml. Y se aforó con solución salina fisiológica (SSF) al 0.9% hasta la marca.

8.8 Ensayo in vitro de MTT

Para encontrar la concentración mínima inhibitoria (MIC) se usaron placas PCR de 96 orificios. Los orificios se llenaron con una micropipeta fija de capacidad de 100µl, con puntas estériles amarillas de la misma capacidad. Los Orificios se llenaron de la siguiente manera.

1.- Del orificio A1 al A9 se colocaron 100µl de solución salina fisiológica estéril.

2.- Después al orificio A1 se le adicionó 100 µl de la solución de trabajo, a partir de este orificio se hicieron diluciones hasta el orificio A9 desechándose los últimos 100 µl de la dilución que quedaban del orificio A9. Enseguida a los orificios se les adiciona 100 µl de suspensión bacteriana.

3.- El control +, control - y el blanco se prepararon como se describe a continuación.
Orificio A10 (control +) 100 µl de bacteria en BHI a doble concentración + 100 µl de solución bacteriana.

Orificio A11 (control -) 100 µl de SSF + 100 µl de BHI estéril doble concentración.

Orificio A12 (blanco) 100 µl de extracto + 100 µl de BHI estéril doble concentración.

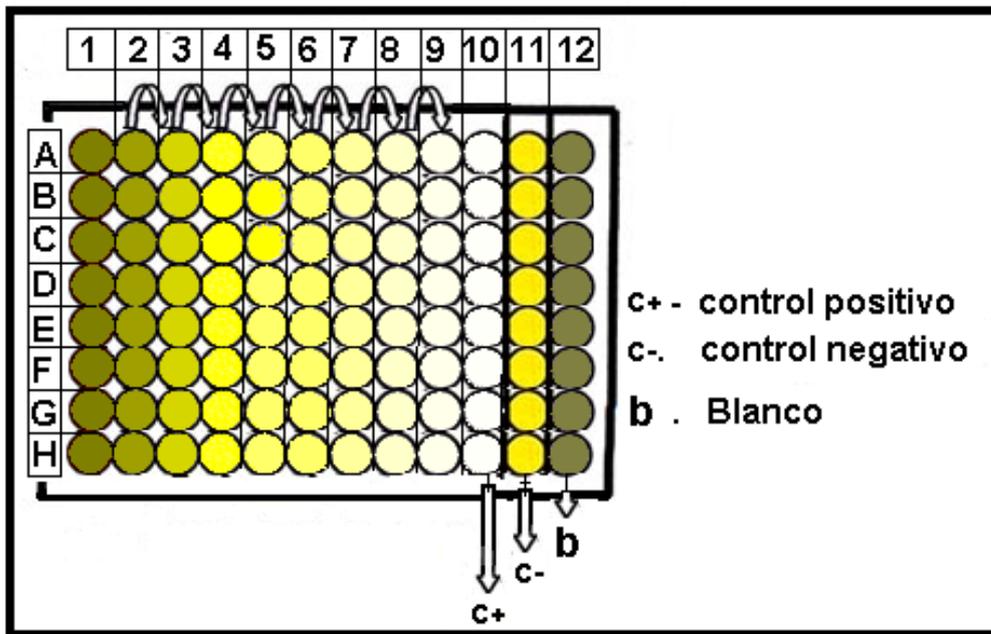


Fig. 7 Orden de llenado de la Microplaca

4.- Finalizando el llenado de los pozos se pone a incubar en estufa bacteriológica por a 37°C/24hrs.

9.8.1 Prueba bacteriostático bactericida.

Esta prueba se realizo al momento de sacar la microplaca de la estufa bacteriológica.

1.- A una caja con agar BHI se divide en 12 partes que indican el número de pozos de un carril de la microplaca.

2.- Con asa bacteriológica tomar una muestra de cada pozo y sembrarla en la caja con BHI en su número correspondiente.

3.- Incubar en estufa a 37°C/24hrs, después determinar su efecto Bacteriostático o Bactericida.

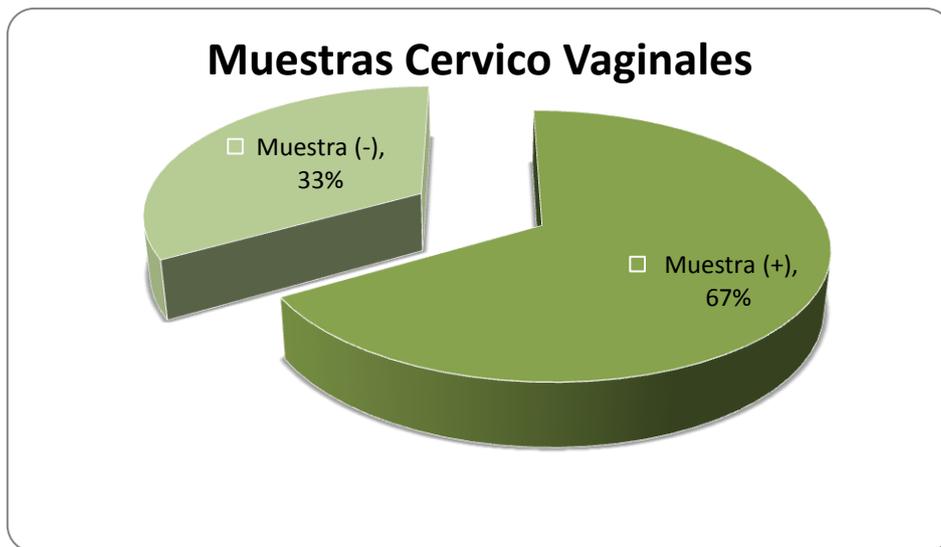
A cada pozo de un solo carril se colocaron 5 µl de MTT,

Se dejó reposar por 30 min y enseguida se colocó en un espectrofotómetro y se leyó λ de 460nm.

9. Resultados.

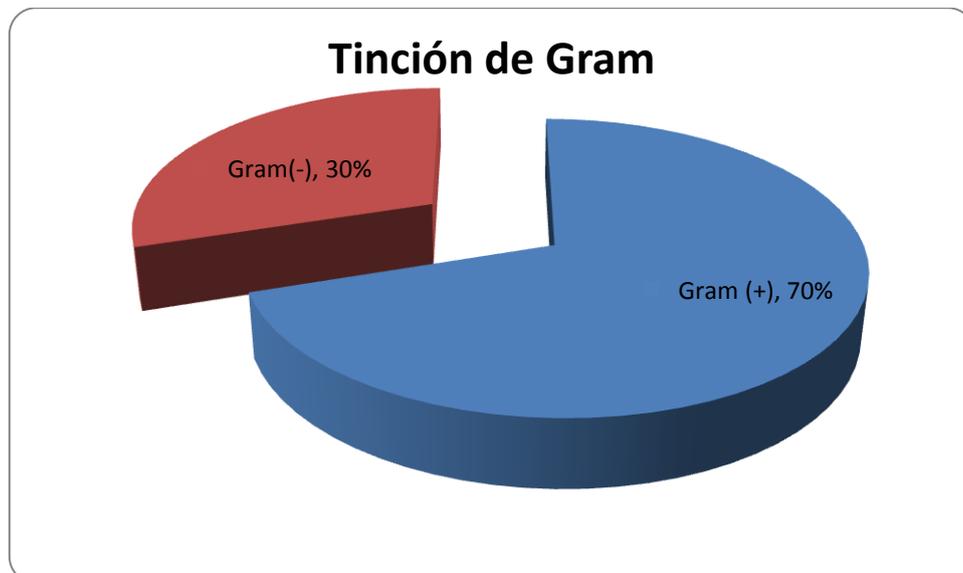
9.1 Aislamiento de Microorganismos.

De 30 muestras donadas por el Hospital General Zona 57 “quebrada” 21 de estas fueron positivas (66.66%) y 9 fueron negativas (33.33%).



Grafica 1. Porcentaje de muestras + (crecimiento bacteriano) y muestras – (sin crecimiento)

De las 20 muestras cervico vaginales positivas 14 (70%) son Gram positivo y 6 (30%) Gram negativo.



Grafica 2 Porcentaje de la tinción de Gram en muestras (+)

De las cepas empleadas para realizar el experimento se le realizaron pruebas para su aislamiento e identificación, obteniendo las siguientes cepas:

Staphylococcus aureus, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Pseudomonas spp.* *Proteus spp* y *Gardnerella vaginalis*.

9.2 Prueba de esterilidad del extracto.

La prueba que se realizo en medio BHI fue positiva, al no presentar crecimiento a las 24hrs y a las 48hr.



Fig. 8 Prueba de esterilidad del extracto *Hamamelis virginiana*. Cultivo de extracto en medio de cultivo BHI. Prueba positiva.

9.3. Obtención de extracto seco.

Rendimiento 6.5918g cristales de *Hamamelis virginiana*. El Frasco vacío registro un peso de 40.9956 y el frasco con el extracto 47.5874, se obtuvo 6.5918g por litro de extracto.

Tabla 3. Hoja técnica del extracto *Hamamelis virginiana*

Código 3069HC

Descripción	Extracto hidroalcohólico de Hamamelis
Apariencia	Líquido translucido
Color	Ámbar
Olor	Característico
Medio	Agua – alcohol
Solubilidad	Agua – alcohol – glicoles – tensoactivos.
Especificaciones	
Densidad	0.900-1.000
Índice de refracción	1.3478 – 1.3621
° Brix	10.0 – 19.0
Mesofilos Aerobios	<100ufc /ml
Mohos y Levaduras	<100ufc/ml
Coliformes	<100ufc/ml
Componentes primarios	Mucilagos, Ac. Orgánicos, taninos, (pirogalol), galotatinos, proantocianidinas, eterócidos, flavónicos (quercitrina, isoquercitina)
Propiedades	Tanificante, vasoconstrictor, astringente, regulador para circulación, refrescante, antiinflamatorio, antioxidante, antiviral.
Uso	Cosmético.
Almacenamiento	Temperatura ambiente. Protegerlo de la luz. En caso de precipitación agitar hasta incorporación.

9.4. Ensayo in vitro de MTT.

En estos resultados podemos observar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto, en algunos ensayos fue evidente la inhibición y en otros ligeramente se observo.

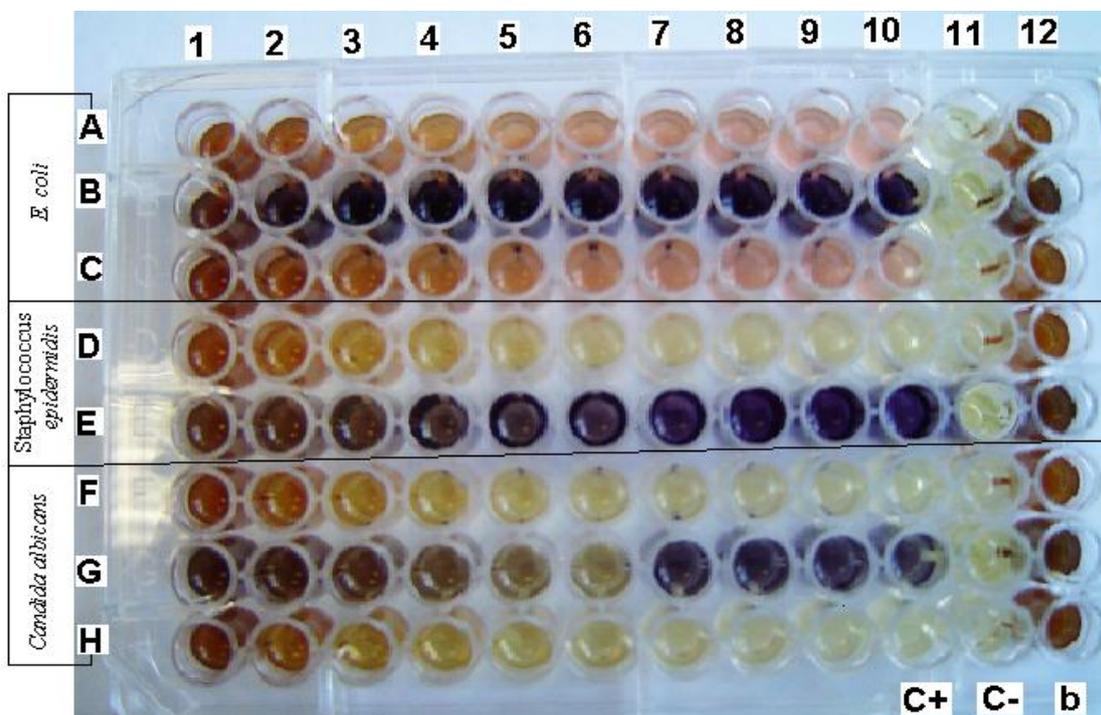
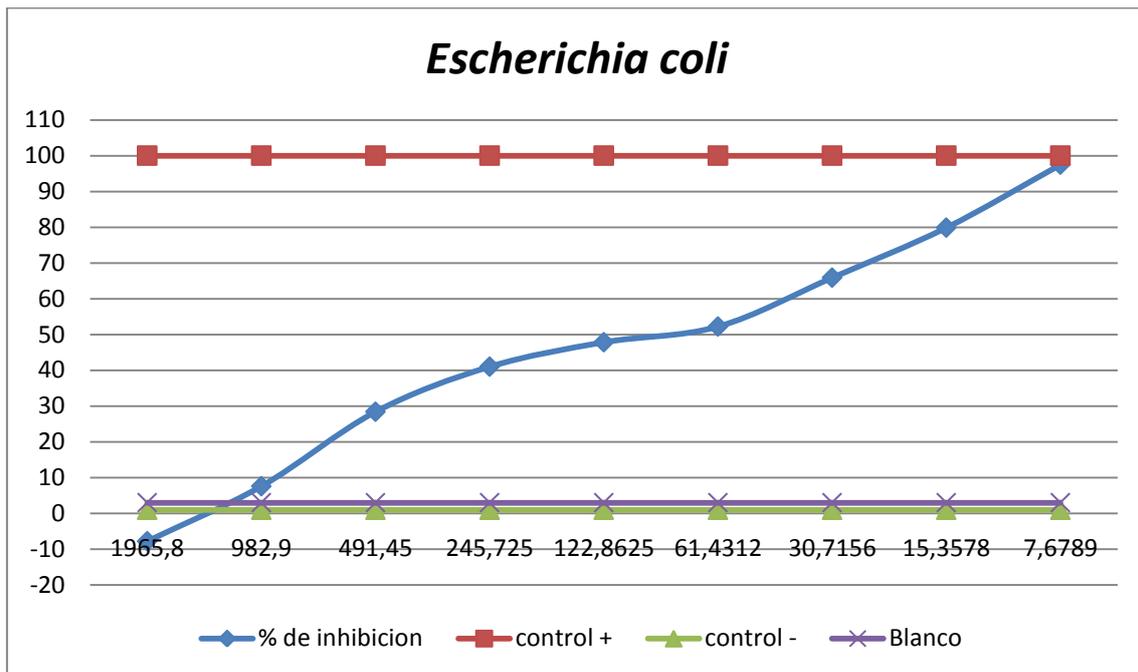


Fig. 9 Ensayo de microplaca para *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* y *Candida albicans*. En los carriles B, E y G se le agrego 5µl MTT.

En la fig. 9 se puede observar que para *E. coli* la formación de color azul purpura se presenta a partir de el pozo B2, para *Staphylococcus epidermidis* se presenta desde el pozo E3 y *Candida albicans* desde inhibe hasta G6.

Tabla 4. Resultados del % de crecimiento para *Escherichia coli*.

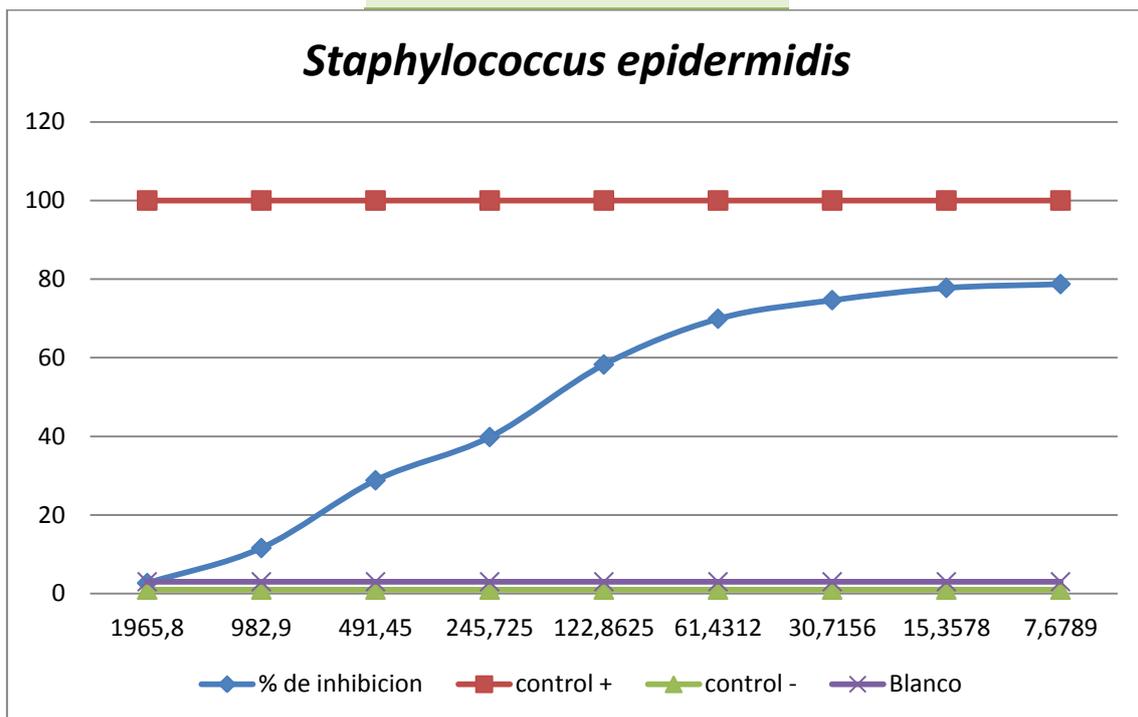
Concentración de <i>H. virginiana</i> $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$	% de crecimiento
1965,8	-7,7949
982,9	7,5814
491,45	28,4036
245,725	41,0037
122,8625	47,8376
61,4312	52,2156
30,7156	65,8836
15,3578	79,8718
7,6789	97,4906



Grafica 3. Porcentajes de crecimiento de *Escherichia coli* en el ensayo con el extracto de *Hamamelis virginiana* a diferentes concentraciones.

Tabla 5. Resultados del % de crecimiento para *Staphylococcus epidermidis*.

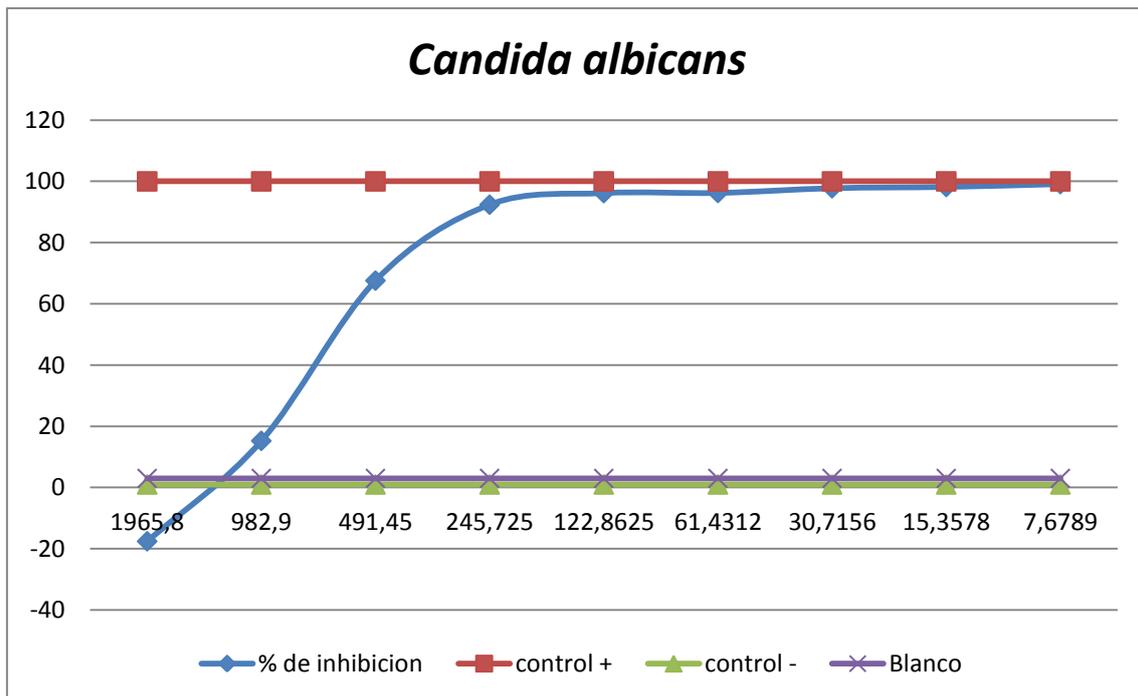
Concentración de H. virginiana $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$	% de inhibición
1965,8	2,6581
982,9	11,58958
491,45	28,81446
245,725	39,819245
122,8625	58,266879
61,4312	69,909623
30,7156	74,641148
15,3578	77,777778
7,6789	78,7347



Grafica 4. Porcentajes de crecimiento de *Staphylococcus epidermidis* en el ensayo con el extracto de *Hamamelis virginiana* a diferentes concentraciones.

Tabla 6. Resultados del % de crecimiento para *Candida albicans*.

Concentración de H. virginiana $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$	% de inhibición
1965,8	-17,5618
982,9	15,2525
491,45	67,585241
245,725	92,386735
122,8625	96,170014
61,4312	96,216721
30,7156	97,758057
15,3578	98,178421
7,6789	99,112564



Grafica 5. Porcentajes de crecimiento de *Candida albicans* en el ensayo con el extracto de *Hamamelis virginiana* a diferentes concentraciones.

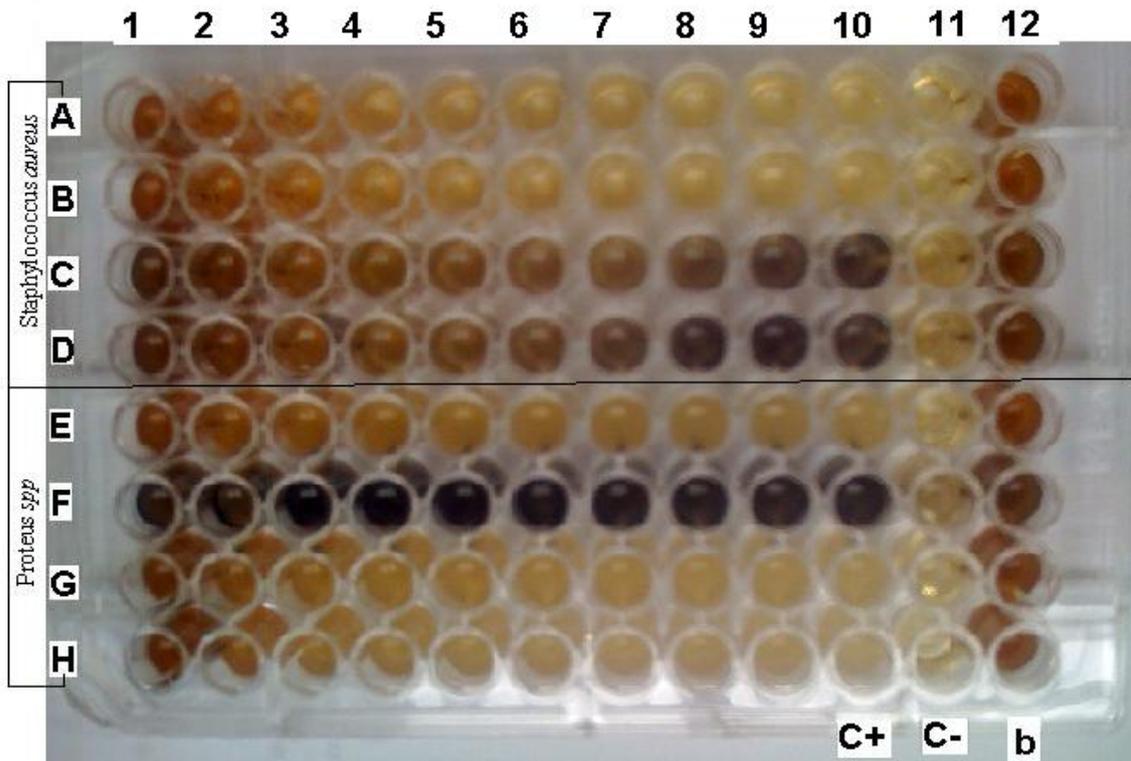
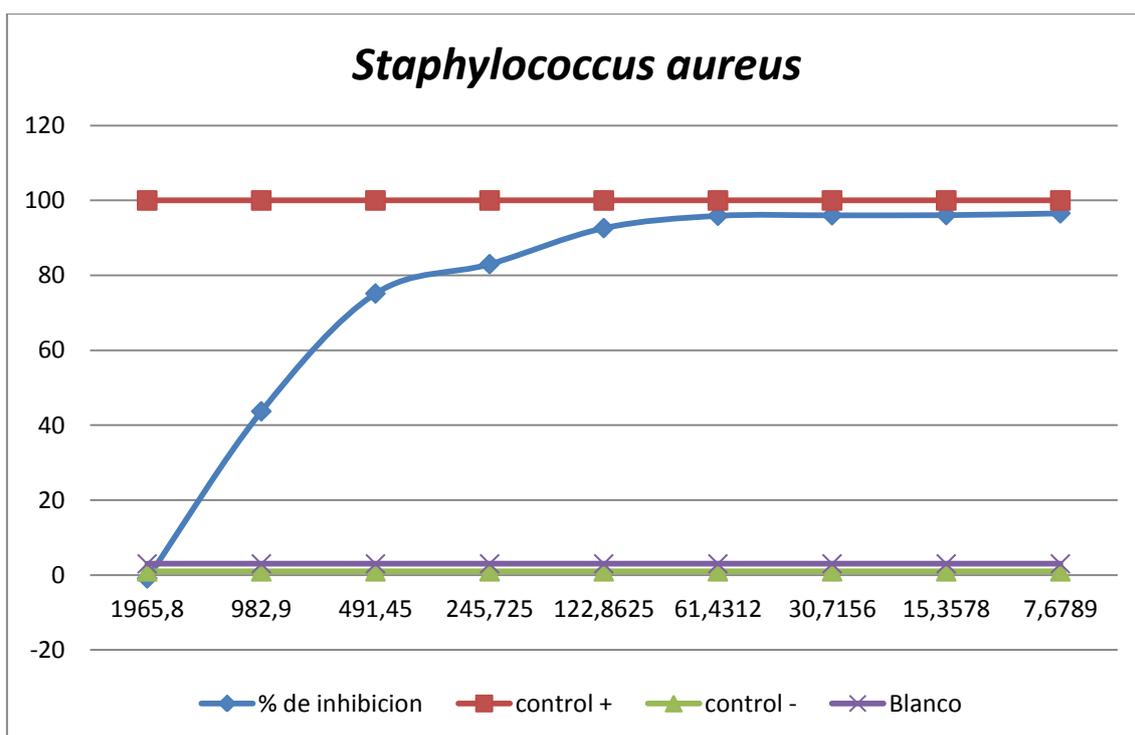


Fig. 10 Ensayo en microplaca para *Staphylococcus aureus* y *Proteus spp*. En los carriles C, D y F se le agrego 5µl MTT.

A simple vista se logra apreciar en la imagen que la formación de el color azul purpura empieza C4 y D4 en cuanto a *Proteus spp* la formación de color se aprecia en a partir del pozo F2.

Tabla 7. Resultados del % de crecimiento para la bacteria *Staphylococcus aureus*.

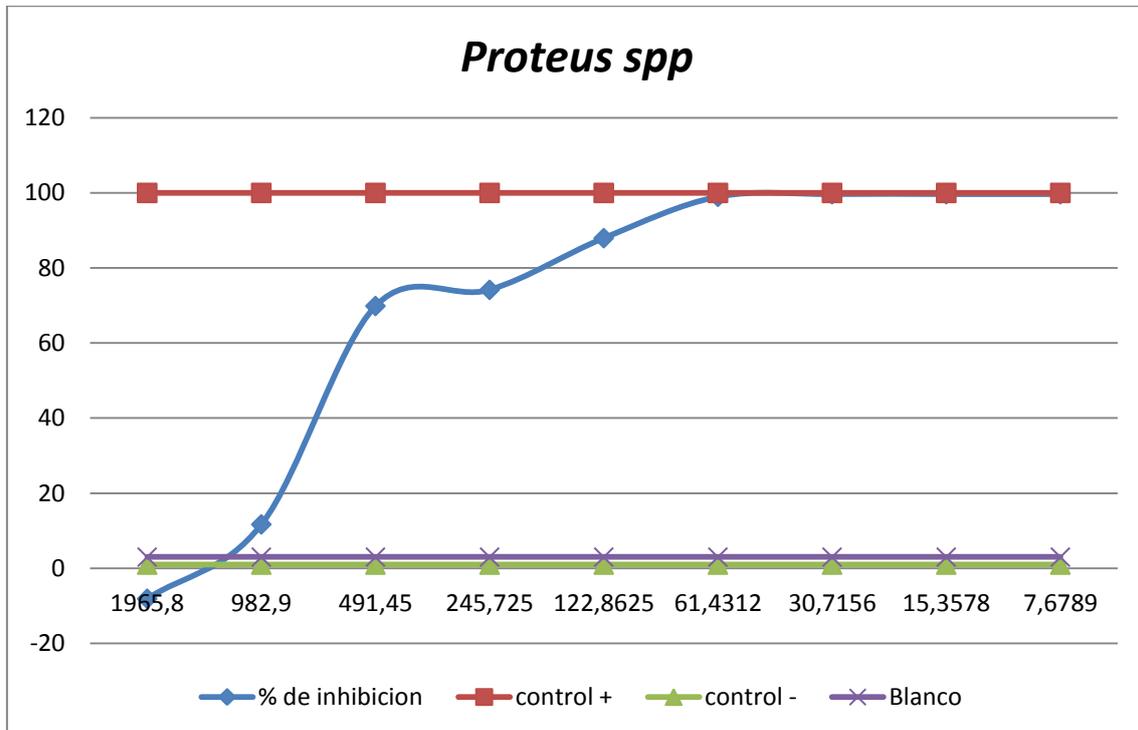
Concentración de <i>H. virginiana</i> µg/100µl	% de inhibición
1965,8	-0,892
982,9	43,70892
491,45	75,164319
245,725	83,004695
122,8625	92,629108
61,4312	95,915493
30,7156	96,056338
15,3578	96,103286
7,6789	96,57277



Grafica 6. Porcentajes de crecimiento de *Staphylococcus aureus* en el ensayo con el extracto de *Hamamelis virginiana* a diferentes concentraciones.

Tabla 8. Resultados del % de crecimiento para *Proteus spp.*

Concentración de H. virginiana $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$	% de inhibición
1965,8	-8,0895
982,9	11,703959
491,45	69,879518
245,725	74,182444
122,8625	87,951807
61,4312	98,967298
30,7156	99,655766
15,3578	99,655766
7,6789	99,655766



Grafica 7. Porcentajes de crecimiento de *Proteus spp.* en el ensayo con el extracto Hamamelis virginiana a diferentes concentraciones.

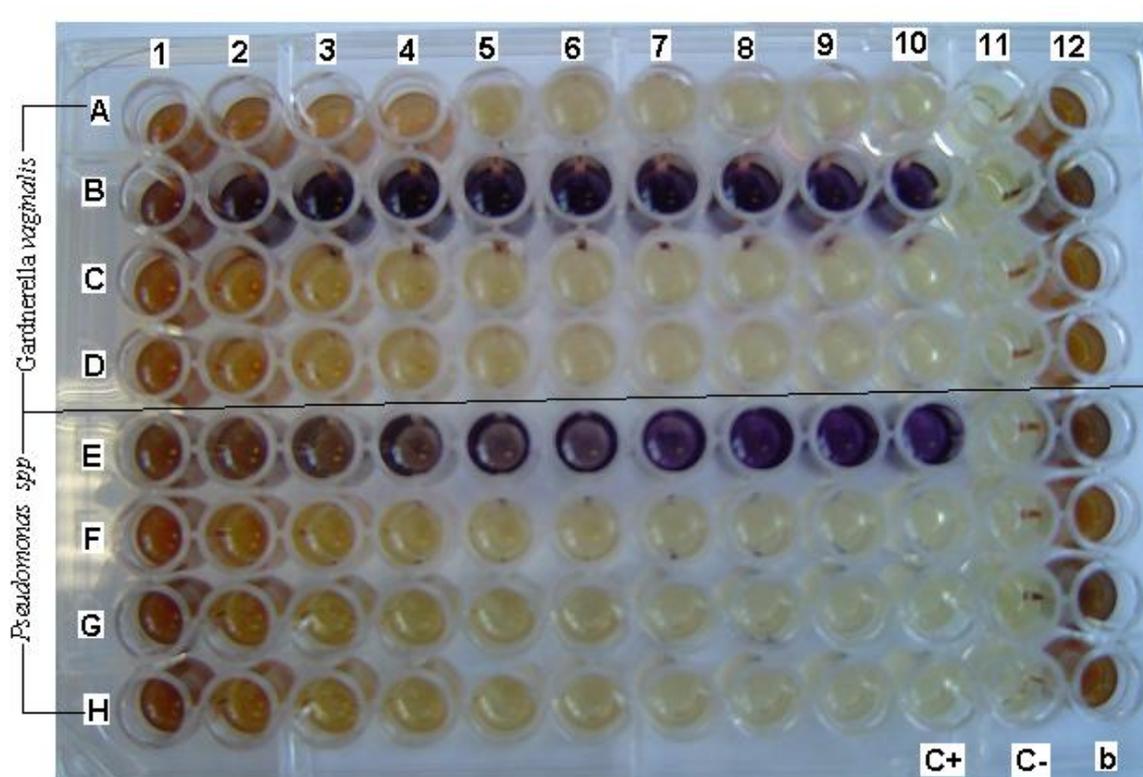
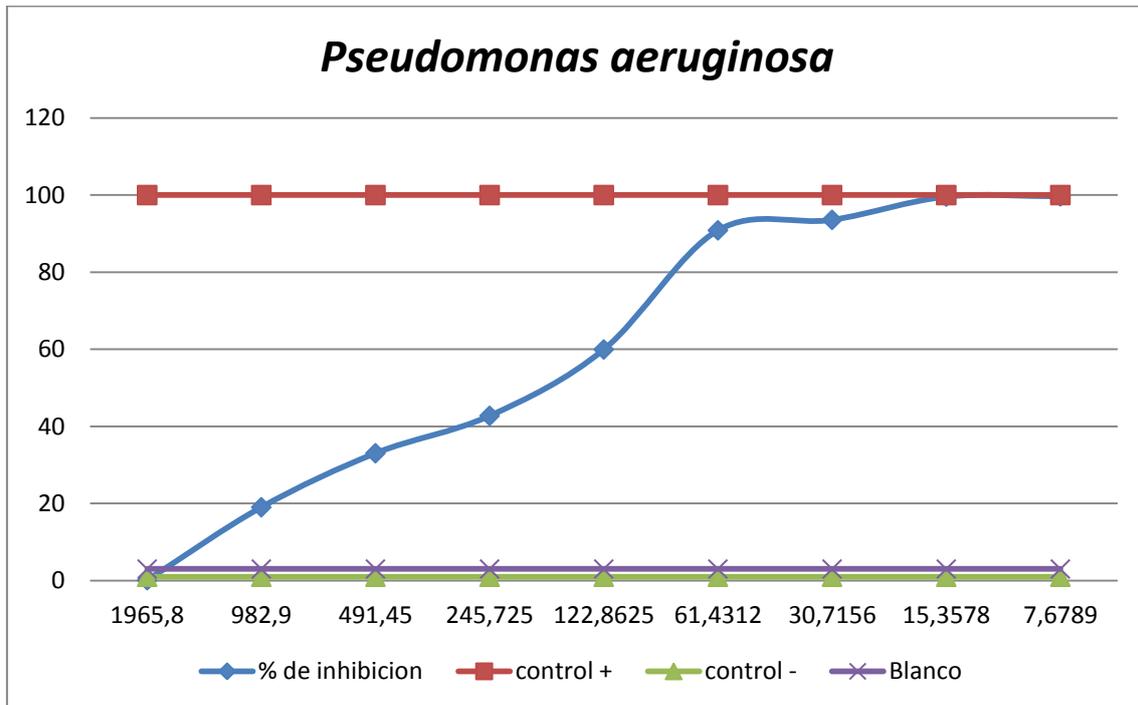


Fig. 11 Ensayo de microplaca para *Gardnerella vaginalis* y *Pseudomonas aeruginosa*. En los carriles C, D y F se le agregó 5µl MTT.

Tabla 9. Resultados del % de crecimiento para la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*.

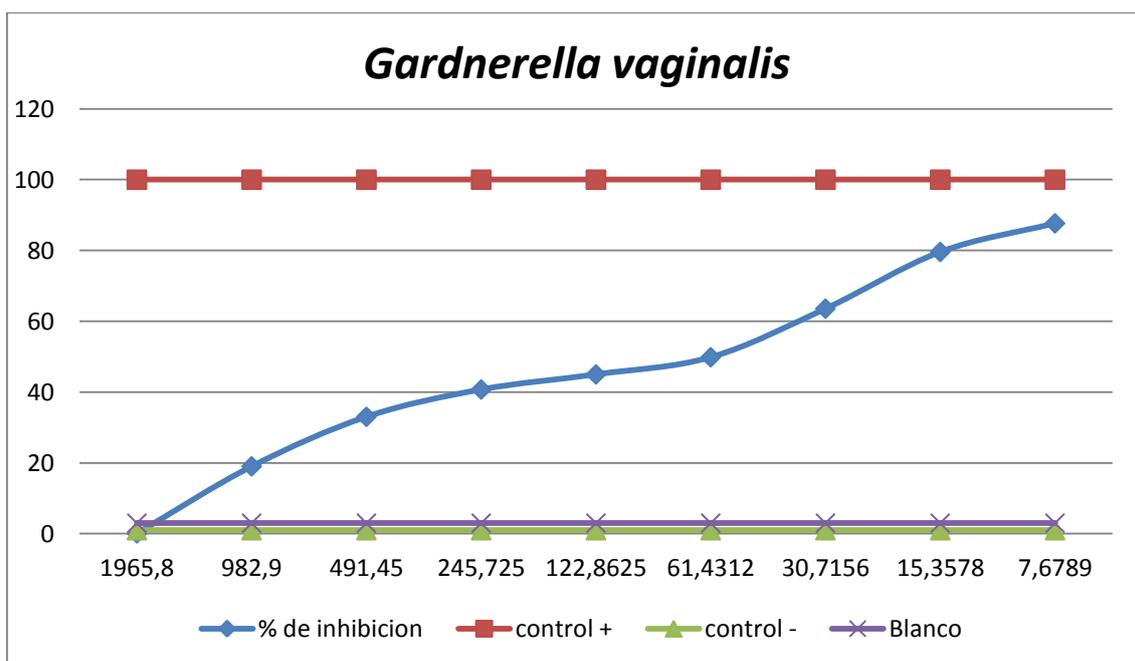
Concentración de <i>H. virginiana</i> µg/100µl	% de inhibición
1965,8	-9,91831972
982,9	2,91715286
491,45	14,4690782
245,725	31,9719953
122,8625	44,4574096
61,4312	50,8751459
30,7156	76,3127188
15,3578	81,0968495
7,6789	89,8483081



Grafica 8. Porcentajes de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en el ensayo con el extracto de *Hamamelis virginiana* a diferentes concentraciones.

Tabla 10. Resultados del % de crecimiento para *Gardnerella vaginalis*

Concentración de H. virginiana $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$	% de inhibición
1965,8	1,59955874
982,9	8,3838941
491,45	27,1924986
245,725	38,0584666
122,8625	60,3971318
61,4312	71,594043
30,7156	76,3375621
15,3578	77,2200772
7,6789	85,9900717



Grafica 9. Porcentajes de crecimiento de *Gardnerella vaginalis* en el ensayo con el extracto de *Hamamelis virginiana* a diferentes concentraciones.

Tabla 11. CMI para los diferentes microorganismos estudiados.

Concentración de H. virginiana $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$	% de crecimiento	Microorganismo
122,8625	47,8376	<i>Escherichia coli</i>
245,725	39,819245	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
61,4312	15,2525	<i>Candida albicans</i>
491,45	75,164319	<i>Staphylococcus aureus</i>
982,9	11,703959	<i>Proteus spp.</i>
122,8625	44,4574096	<i>Gardnerella vaginalis</i>
245,725	38,0584666	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

9.5. Prueba bacteriostático bactericida.

En la prueba bacteriostática - bactericida, se presento un efecto bactericida, en todas las bacterias analizada. A continuación se mostraran imágenes de pruebas realizadas a las diferentes bacterias.

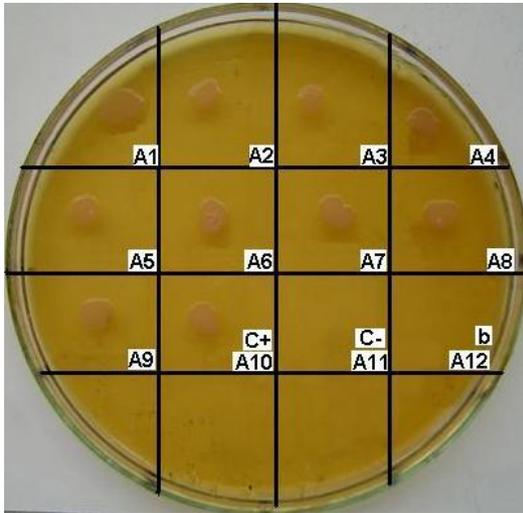


Fig. 12 Efecto bacteriostático del extracto de *Hamamelis v.* que presento ante *Escherichia coli* desde el pozo A1 – A9 y control positivo (+) y en Control negativo (C-) y blanco (b) sin crecimiento.

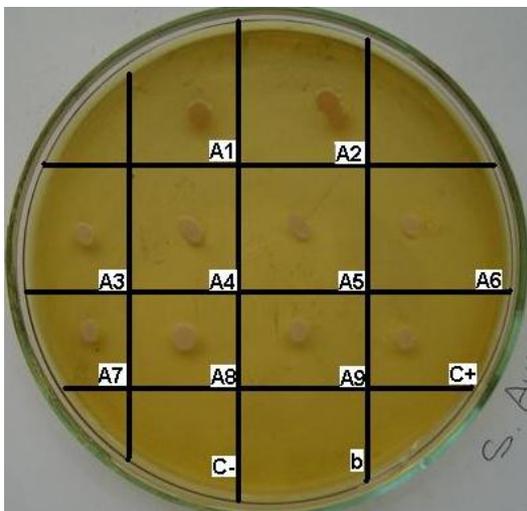


Fig. 13 Efecto bacteriostático del extracto de *Hamamelis v.* que presento ante *Staphylococcus aureus* desde el pozo A1 – A9 y control positivo (+) y en Control negativo (C-) y blanco (b) sin crecimiento.

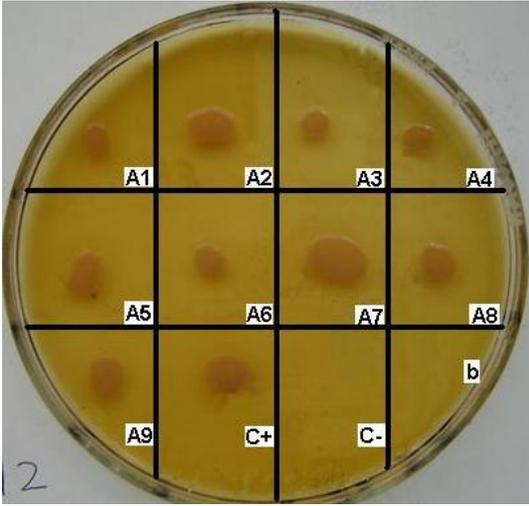


Fig. 14 Efecto bactericida del extracto de *Hamamelis v.* que presento ante *Pseudomonas aeruginos* desde el pozo A1 – A9 y control positivo (+) y en Control negativo (C-) y blanco (b) sin crecimiento.

9.6. Discusión.

En la Medicina Tradicional, la gente suele usar extracciones e infusiones para el tratamiento de sus padecimientos. Es por eso que en el presente estudio se trabajó con un extracto Hidroalcohólico de *Hamamelis virginiana* que fue donado por la empresa EXTRACTOS SIGMA S.A. de C.V. con una hoja técnica que presentaba información sobre sus propiedades y un análisis realizado por la empresa, esta información se presenta en tabla 3. Se decidió trabajar con la planta *Hamamelis virginiana* por tener múltiples funciones terapéuticas. Además que los extractos y destilados de la corteza y hojas son ampliamente utilizados como productos del cuidado de la piel, como en desodorantes, cicatrizantes, protectores solares, que hoy en día es común encontrarlos como componente de estos productos.

Prueba de esterilidad del extracto.

Es importante señalar a la prueba de esterilidad del extracto ya que desde esta punto inicia el trabajo por lo cual se tuvo un control de esto y así asegurar la esterilidad del extracto, por tal motivo la prueba de esterilidad del extracto se demostró colocando el extracto en cajas de agar BHI, se realizaron 3 pruebas de las cuales fueron positivas, lo que significa que en las pruebas no se encontró contaminación alguna, esto se puede apreciar bien en la Fig. 8 en donde se aprecia que no existe ningún tipo de crecimiento. Para la recolección de la materia seca se tuvo dificultad al momento de obtener el extracto que se encontraba seco en el cristalizador, el problema se generó por que el extracto tenía una consistencia chiclosa y esto hacía difícil su obtención, sin embargo se logró raspar obteniéndose un rendimiento de 6.5918g de extracto seco de *Hamamelis virginiana* de un litro de extracto hidroalcohólico.

Se seleccionó el ensayo in vitro de MTT por ser un método simple, rápido de bajo costo y conveniente para determinar el efecto inhibitorio del extracto de la planta *Hamamelis virginiana*, en comparación con muchos otros métodos. En las figuras 9, 10 y 11 se observa la formación de un color azul púrpura en los pozos del carril donde fue agregado MTT. El color formado se debe a que el MTT se basa en la capacidad de las enzimas mitocondriales, succinato-deshidrogenasa de células viables para transformar la sal de tetrazolio MTT en un producto de color azul púrpura y es proporcional al número

de células vivas (Saravanan 2003). Si observamos la figura 10 Ensayo de MTT para *Staphylococcus aureus* y *Proteus spp*. Se puede ver que a simple vista que en el ensayo para *Staphylococcus aureus* la inhibición del extracto empieza a dar efecto desde el pozo 1C, 1D hasta 4C, 4D. Por otro lado el ensayo realizado para *Proteus spp* difícilmente se puede apreciar cuales son los pozos en donde el extracto presento el efecto inhibitorio. Por este motivo para la determinación de la CMI se determino calculando el % de crecimiento de los microorganismos estudiados. Estos resultados del ensayo de MTT se corroboraron por medio de los gráficos los cuales nos demostraron los porcentajes de crecimiento de las bacterias estudiadas contra el extracto a diferentes concentraciones. Los resultados indicaron que el extracto de *Hamamelis virginiana* tiene un efecto inhibitorio frente al crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Gardnerella vaginalis*, *Proteus spp*. Entre los microorganismos estudiados encontramos que los más resistentes fueron *Pseudomonas aeruginosa* por tener una CMI en el pozo con concentración 245,725 µg/100µl con un crecimiento de 38,0584666 % al igual que *Staphylococcus epidermidis* que se inhibió con una concentración de 245,725 µg/100µl y un crecimiento de 11,703959. Y entre los más sensibles se tiene a *Candida albicans* que se inhibió hasta el pozo con concentración 61,4312µg/100µl y *Proteus spp* que tuvo una inhibición en el pozo con concentración 982.9µg/100µ. La CMI para diferentes microorganismos se muestra en tabla 11.

Determinada la CMI del extracto *Hamamelis virginiana* se procedió a establecer su actividad antimicrobiana con la prueba bacteriostático – bactericida. Se considero que el efecto es bacteriostático debido a que solo se impidió la multiplicación o inhibió el desarrollo de bacteria. Este efecto fue reversible, por que una vez que se sembró en la caja de agar BHI los microorganismos se volvieron a multiplicar, esto se puede observar en las figuras 12, 13 y 14 estas imágenes solo representan a los microorganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* en estas imágenes se aprecia el efecto bacteriostático ya que se puede observar un crecimiento de todos los orificios en donde se encontraba la bacteria excepto en el control negativo y blanco. Se encontró que el extracto tiene un efecto bacteriostático para todos microorganismos estudiados.

9.7. Conclusiones.

Se determinó el efecto inhibitorio del extracto de *Hamamelis virginiana* en bacterias aisladas de casos de vaginosis bacteriana.

Se aislaron las bacterias que están involucradas en la vaginosis bacteriana.

Se obtuvo un extracto de *Hamamelis virginiana* hidroalcohólico estéril.

Se logró determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto *Hamamelis virginiana* en los diferentes microorganismos estudiados.

Se determinó la actividad bacteriostática del extracto *Hamamelis virginiana* en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Gardnerella vaginalis*, *Proteus spp.*

9.8. Bibliografía

1. Weir E., Bacterial vaginosis: more questions than answers, 2004, Canadian Medical Association or its licensors JAMC • 31 AOÛT 2004; 171 (5)
2. Sobel J. D. Bacterial vaginosis by Annual Reviews Med. 2000. 51:349–356
3. Numanovic F., et. al. Bacterial vaginosis presence in sexually active women in Tuzla canton area, Bosnian Journal of Basic Med. Sciences 2008; 8 (4): 322-330
4. Numanovic F., et. al. Importance of isolation and biotypization of *Gardnerella vaginalis* in diagnosis of bacterial vaginosis, Bosnian Journal of Basic Med. Sciences 2008; 8 (3): 271-276
5. Cabero R. L. (2006) Parto prematuro, Editorial Medica Panamericana S.A. de C.V. España pags 109 – 111.
6. Castillo G. E. y Martínez S. I., (2007), Manual de Fitoterapia, Editorial MASSON, España Barcelona pags 5-7.
7. Gary A. Thibodeau, Kevin T. Patton (2008) Estructura y Funcion Cuerpo Humano, 13ª ed., Editorial Elsevier España pag. 90
8. Quiroz F. (2004) tratado de anatomía humana 39ª ed., 2 tomo editorial porrua México
9. Tortora G. J; Derrickson B; (2006) Principios de anatomía y fisiología 6ª ed., editorial panamericana.
10. Guerra T.A. (2007), Manual y atlas de enfermedades de la vulva 2ª ed. Editorial Glosa, pag. 13

11. León Perlemuter, Christophe Bilweis (1999) Anatomofisiología, editorial Masson España Madrid pag 187-189
12. García R. J. A. y Picazo J. J. (1998) Microbiología Médica Volumen 2, primera edición editorial Harcourt Brace de España S.A., España Madrid pags, 272 – 274.
13. De la Rosa M. y Prieto J., (2003) Microbiología para la Ciencia de la Salud segunda edición, edit. ELSEVIER, impreso en España por Graficas Muriel, S.A. pags 204-205.
14. Keith J. Struthers, Roger P. Westran (2005) Bacteriología clínica editorial Masson, México D.F. pag. 143
15. Hernández M. R., Gally J. M; (1981) Plantas medicinales 12ª ed. Editorial Arbol Colombia pags. 7 – 8.
16. Castillo G.E, Martínez S. I; (2007) Manual de fitoterapia Editorial ELSEVIER Barcelona España, pag. 5
17. Bernat Vanaclocha Vanaclocha, Cañigüeral (2003) Fitoterapia: vademécum de prescripción 4ª ed. Editorial ELSEVIER.
18. Manuel de la Rosa, José Prieto, (2003) Microbiología para la Ciencia de la Salud segunda edición, edit. ELSEVIER, impreso en España por Graficas Muriel, S.A. págs. 204-205.
19. Terrés M. A et. al. (1990). El grupo piocínico y las infecciones intrahospitalarias. Revista Mexicana de Patología Clínica Vol. 37 Nos. 1y2 Jun-Jul 1990 Pp 15 -19.
20. Stoelting K. R. y Dierdorf S. F. (2003) Anestesia y enfermedad coexistente 4ª Edición, Edit. ELSEVIER, España Pp. 554-555.
21. Mac Faddin J. F. (2003) Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica 3ª edición, Editorial Médica Panamericana, México, págs.

22. Allen, et. al. (2008) Koneman. Diagnostico Microbiológico, texto y atlas de color, 6ª edición Editorial Medica Panamericana, México.
23. Jukik W. K; Willet H.P;(1993). Microbiología, Editorial Medica Panamericana, España. 295-298
24. Helmut H. Wolff & Meinhard Kieser (2007) Hamamelis in children with skin disorders and skin injuries: results of an observational study, Eur J Pediatr (2007) 166:943–948.
25. Bravo L. (2006) Farmacognosia Especial 1ª Edicion, Edt. ELSEVIER España S. A. Pp. 191-193
26. Donati L, et. al. (2010). Vaginal microbial flora and outcome of pregnancy, Arch Gynecol Obstet (2010) 281:589–600
27. Castillo G. E. y Martinez S. I. (2007) Manual de Fitoterapia 1ª Edición, Edt. Masson, Barcelona España Pp. 134-135.
28. Iglesias N. J. (2009), Diseño de ingredients antioxidante de origen natural y su aplicacion en la estabilizacion de productos derivados de la pesca Edt. USC Pp. 73-75.
29. WANG Fang, CAO Li-ting, HU Song-hua (2007) A rapid and accurate 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide colorimetric assay for quantification of bacteriocins with nisin as an example Journal of Zhejiang University SCIENCE B 2007 8(8):549-554.
30. OMS. Glosario de términos especializados para la evaluación de medicamentos. Versión preliminar, 1990.
31. OMS. Guías para el tratamiento de las infecciones de transmisión sexual. Ed. Catalogación por la Biblioteca de la OMS, Ginebra, Suiza, 2005.
32. OMS. Las víctimas de E. coli alcanzan ahora un total de 109 y los CDC se unen a la investigación. Ed. Catalogación por la Biblioteca de la OMS, Washington, Estados Unidos 2006.

33. Elke D. Reissing, (2004) Vaginal Spasm, Pain, and Behavior: An Empirical Investigation of the Diagnosis of Vaginismus, Archives of Sexual Behavior, Vol. 33, No. 1, February 2004, pp. 5–17 (© 2004)
34. Eddie F.,(2008) Relation between vaginal and endocervical pH in patients undergoing cold-knife conization and hysterectomy, Arch Gynecol Obstet (2008) 277:43–46
35. M. Lakhtin, et. al. (2010) Probiotic Lactobacillus and Bifidobacterial Lectins Against Candida albicans and Staphylococcus aureus Clinical Strains: New Class of the Pathogen Biofilm Destructors, Probiotics & Antimicro. Prot. (2010) 2:186–196.

9.9. Direcciones electrónicas.

<http://fichas.infojardin.com/plantas-medicinales-COPIASEGURIDAD/hamamelis-virginiana.htm>

(http://www.biologiareproductiva.com/conociendo_nuestro_cuerpo.php)

<http://seresmodelicos.csic.es/galeria/bacteri.html>

<http://anatomia-genital.blogspot.com/2010/10/anatomia-genital.html>

http://www.biologiareproductiva.com/conociendo_nuestro_cuerpo.php

<http://picasaweb.google.com/110696708330680758752/Labdemos#5452150232123563362>

<http://anatomia-genital.blogspot.com/2010/10/anatomia-genital.html>

9.10. Anexo I

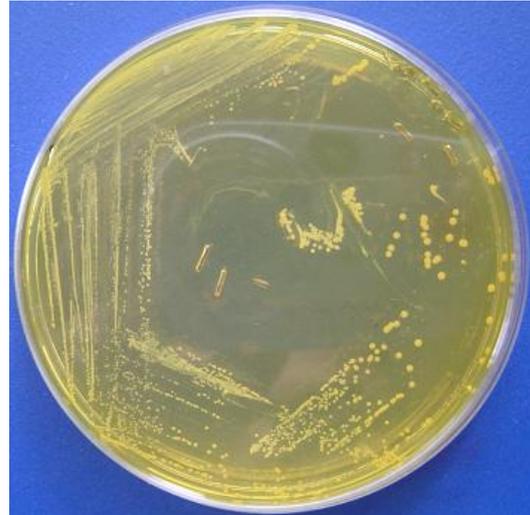


Fig. 15 Cultivo de *Staphylococcus aureus* sembrado en un medio sales de manitol



Fig. 16 Cultivo de *Staphylococcus epidermidis* en un medio SM (sales manitol)



Fig. 17 Cultivo de *Escherichia coli* en un medio EMB (eosina azul de metileno).

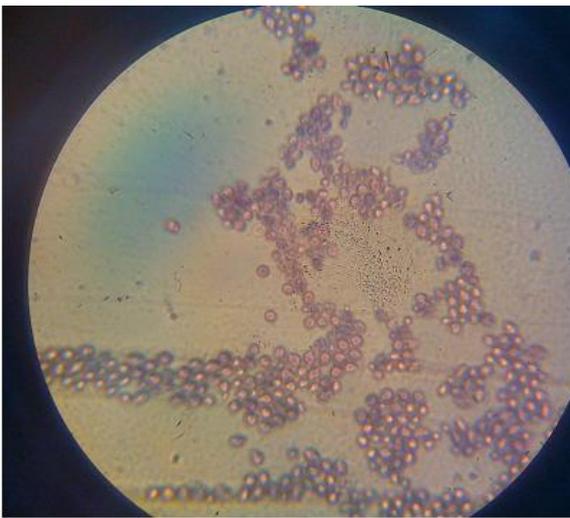


Fig. 18 Tinción de Gram de *Candida albicans*

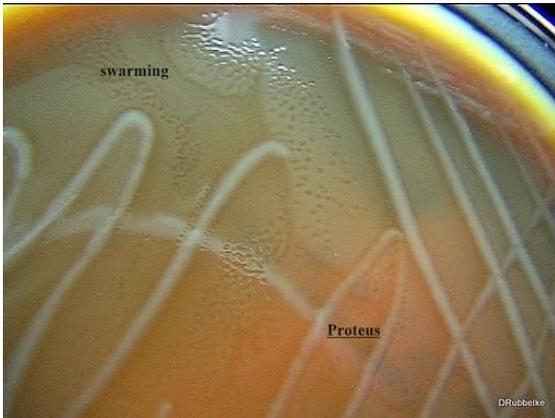


Fig. 19 de *Proteus vulgaris* en esta imagen se puede apreciar el efecto swarming,

10. Glosario.

- BHI- Brain Heart Infusion (Infusión Cerebro Corazón).
- MTT - Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol.
- SEFIT - Sociedad Española de Fitoterapia Asociada para el desarrollo y el estudio de las plantas Medicinales y sus aplicaciones.
- OMS - Organización Mundial de la Salud.
- CPFEUM – Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.
- pH- pondus Hydrogenium. (Potencial de Hidrogeno).
- ETS – Enfermedades de Transmisión Sexual.
- KOH- Hidróxido de Potasio.
- E.U.- Estados Unidos.
- CDC – Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos.
- MRSA - *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina).
- HSV-1- *virus herpes hominis, de tipo I*.
- CO₂ – Bióxido de Carbono.
- SES – Solución Electrolisada de Superoxidación de 60ppm.
- SSF – Solución Salina Fisiologica.
- DMSO - Dimetil Sulfóxido.
- CMI – Concentración Minina Inhibitorio.
- ELISA - *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.