



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**“ELABORACIÓN DE UNA FORMA FARMACÉUTICA  
(ÓVULO) A BASE DEL EXTRACTO DE *Calendula  
officinalis*, *Echinacea purpurea* e *Hippocratea excelsa* PARA EL  
TRATAMIENTO DE INFECCIONES CERVICO  
VAGINALES HUMANAS”.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

**JIMÉNEZ VENEGAS LOURDES JANETH**

ASESORES: M.V.Z. GERARDO CRUZ JIMÉNEZ  
Dr. DAVID QUINTANAR GUERRERO  
M.V.Z. JOSE ANTONIO LICEA VEGA

CUAUTITLÁN IZCALLÍ, EDO. DE MÉXICO

2009.



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.



"Elaboración de una forma farmacéutica (ovulo) a base del extracto de Caléndula officinalis, Echinacea purpúrea e Hippocratea excelsa para el tratamiento de infecciones cervico vaginales humanas". |



Laboratorio No 10 de Microbiología Experimental  
Unidad de Posgrado de la FES Cuautitlán Campo I y el  
laboratorio de Posgrado en Farmacia dirigido por el  
Dr. David Quintanar Guerrero.



## *PENSAMIENTOS*

### *Pescador de hombres*

*Jú has venido a la orilla.*

*No has buscado, ni a sabios ni a ricos*

*Tan solo quieres que yo te siga*

*Señor, me has mirado a los ojos*

*Sonriendo has dicho mi nombre*

*En la arena, he dejado mi barca*

*Junto a ti buscaré otro mar....*

*Jú, sabes bien lo que tengo,*

*En mi barca no hay oro ni espadas*

*Tan solo redes y mi trabajo*

*Jú necesitas mis manos,*

*Mi cansancio que a otros descanse*

*Amor que quiera seguir amando...*

*Jú pescador de otros lagos,*

*Ansia eterna de hombres que esperan*

*Amigo bueno que así me llaman...*

*Señor, me has mirado a los ojos*

*Sonriendo has dicho mi nombre*

*En la arena, he dejado mi barca*

*Junto a ti buscaré otro mar....*

## AGRADECIMIENTOS

Al Diosito por darme el mejor regalo, prestándome a cuatro de sus mejores y hermosos Ángeles, gracias por ponerme los obstáculos necesarios para valorar lo que ahora tengo y soy, y por no abandonarme nunca.

Al mis asesores de tesis:

- ☆ M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez, erzo que si agradeciera cada cosa que he aprendido de usted mi tesis llevaría por nombre: Gracias profesor Gerardo, porque en usted tengo un amigo, que es un obrero del saber.
  
- ☆ M.V.Z. José Antonio Licea, gracias por siempre regalarme una sonrisa y estar pendiente de mis avances.
  
- ☆ Dr. David Quintanar Guerrero, gracias por su apoyo, ya que sin usted esto no sería posible.



**Como no te voy a querer  
Como no te voy a querer  
si mi corazón azul es,  
y mi piel dorada,  
siempre te amare.**



## DEDICATORIAS

Siempre he creído que cuando ya no estás conmigo es porque te has convertido en la estrella más brillante del firmamento, en un eterno resplandor que ilumina mi vida y regresa la fe a mi corazón.

F.V.R.

Dad aun no tengo palabras para ti, pero mi eterna gratitud por permitir que llegara hasta aquí, porque me enseñaste a resolver problemas, por nunca dudar que alcanzara esta meta y sobre todo porque este triunfo es por ti.

Mom, con todo mi cariño y agradecimiento por enseñarme a dar cada paso de mi vida, por darme la fortaleza de terminar esta faceta haciendo de este triunfo más tuyo que mío, me has enseñado a escribir "amistad" correctamente, por eso te admiro, te respeto, e infinitamente gracias por todo lo que has dado de tu vida para formar la mía.

Alma y Dorz, a ustedes tendría que pasar escribiendo toda mi vida para poder dedicarles algo, les agradezco su presencia, porque aun estando lejos solo basta tocar mi corazón para saber que están apoyándome siempre e incondicionalmente, por seguir compartiendo conmigo travessuras, sueños y realidades, gracias por llenar de flores mi vida.

Mis cuatro Ángeles.

A ti:

Por haber llegado a mi vida para llenarla de sonrisas, hacer menos amargos los Tragos que la vida me ha dado, por escueharme, brindarme tu tiempo, palabras y consejos siempre de Aliento, estoy orgullosa de mi por tener una pareja como tú y sobre todo por enseñarme que si quiero hacer reír a Dios le cuento mis planes. Σε αγαπώ

J.E.R.H.



Tal vez lo único que duele más que decirte adiós es no haber tenido la ocasión de haberte despedido de ti. Si fuésemos capaces de saber cuándo y dónde volveremos a encontrarnos de nuevo, nuestra despedida sería más tierna... ya solo me resta decir:

## GRACIAS:

Yun, Julieta, Gladys, Yagy y Tannia, mis amigos con los que descubrí el significado de un viernes, la hora feliz y el famoso karaoke. Sharon la niña que siempre me regresaba a la tierra. Ulises... (Ídgm) mi gran amigo, gracias por ser la persona incondicional que estuvo en los momentos determinantes de mi vida, por haber sido parte de ella. Julio, Marcos, Bary, Javo, Beto, mis hermanitos me los llevo en el corazón.

A todos los integrantes del laboratorio 10 de microbiología de la unidad de posgrado, Ah eso vine: Ale, Berz, Ulises, Dianita, Alex, Bel y Rubén, por hacer de mi estancia en el labo un recuerdo que vale la pena. Ahora se que las amigas se convierten en hermanas y estas son escogidas x el corazón gracias por ello Ale y Berz. Ale gracias por hacerme sentir que en este camino no iba sola, por todo... tu casa, familia, amistad... todo!!!. Berz te voy a extrañar mucho, sobre todo tus locuras y tu interminable sonrisa. Lalo desde ahora ya te extraño, gracias por tu presencia, tu amistad, tú..., Dianita tu compañía. Alex gracias por tus consejos, que hubiera hecho sin ti. Bel, tu sonrisa de complicidad. A la señora Erika por hacer menos pesado el trabajo en el mismo, por sus incansables platicas, y por supuesto a Don Martin que sin el nos volveríamos locos.

Y... a todas las personas que omito por falta de espacio, porque se que dios nos manda personitas muy especiales pero que no se quedan para siempre con nosotros, con la finalidad de enseñarnos cosas importantes en la vida.

A todos los QFB si recuerden:

Cuando anhelas un sueño y lo pides con el corazón...

el mundo conspira para que este se vuelva realidad.



## ÍNDICE GENERAL

	PÁG.
ÍNDICE GENERAL.....	6
ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
ÍNDICE DE TABLAS.....	10
RESUMEN.....	11
1. INTRODUCCIÓN.....	13
1.1. APARATO GENITAL FEMENINO.....	15
1.1.1. ÓRGANOS INTERNOS.....	15
1.1.2. ÓRGANOS EXTERNOS.....	17
1.2. INFECCIONES VAGINALES.....	18
1.2.1. VAGINITIS.....	19
1.2.2. INFECCIONES OCASIONADAS POR CÁNDIDA.....	21
1.2.3. TRICHOMONIASIS VAGINAL.....	23
1.2.4. VAGINOSIS BACTERIANA (VB).....	24
1.3. OTRAS BACTERIAS DE IMPORTANCIA MÉDICA, IMPLÍCITAS EN INFECCIONES VAGINALES	
1.3.1. <i>Escherichia coli</i> .....	26
1.3.2. <i>Streptococcus</i> .....	26
1.3.2.1. <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	27
1.3.3. <i>Staphylococcus</i> .....	27
1.3.3.1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	27
1.3.3.2. <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	27
1.3.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	28
1.3.5. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	28
1.3.6. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	28
1.4. FORMAS DE ADMINISTRACIÓN VAGINAL (ÓVULOS).....	29
1.4.1. DEFINICIÓN.....	29
1.4.2. EXIGENCIAS A LA FORMA FARMACÉUTICA (ÓVULOS VAGINALES).....	29
1.4.3. EXCIPIENTES DE LOS ÓVULOS.....	30
1.4.4. PRESENTACIONES EN USO.....	31



"Elaboración de una forma farmacéutica (ovulo) a base del extracto de *Caléndula officinalis*, *Echinacea purpúrea* e *Hippocratea excelsa* para el tratamiento de infecciones cervico vaginales humanas".

1.5. HIERBAS MEDICINALES.....	32
1.5.1. CALÉNDULA.....	32
1.5.2. NOMBRE CIENTÍFICO: <i>Calendula officinalis</i> .....	32
1.5.3. NOMBRE COMÚN: CALÉNDULA, MARAVILLA.....	32
1.5.4. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.....	33
1.5.5. SINONIMIA.....	33
1.5.6. HISTORIA.....	34
1.5.7. ACCIONES FARMACÉUTICAS.....	34
1.5.8. PROPIEDADES TERAPÉUTICAS.....	35
1.5.9. USOS MÁS COMUNES.....	36
1.5.10. CONTRAINDICACIONES E INTERACCIONES.....	37
1.5.11. PRINCIPALES COMPONENTES.....	37
1.6. EQUINACEA.....	37
1.6.1. NOMBRE CIENTÍFICO: <i>Echinacea purpurea</i> .....	37
1.6.2. NOMBRE COMÚN: ECHINACEA.....	37
1.6.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.....	38
1.6.4. HISTORIA.....	38
1.6.5. ACCIÓN FARMACÉUTICA.....	39
1.6.6. PRINCIPALES COMPONENTES.....	39
1.6.7. USOS MÁS COMUNES.....	40
1.6.8. DOSIS.....	41
1.6.9. CONTRAINDICACIONES E INTERACCIONES.....	42
1.7. CANCERINA.....	42
1.7.1. NOMBRE CIENTÍFICO: <i>HEMIANGIUM EXCELSUM</i> (SIN. <i>HIPPOCRATEA EXCELSA</i> ).....	42
1.7.2. NOMBRE COMÚN: CANCERINA.....	42
1.7.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.....	43
1.7.4. ACCIÓN FARMACÉUTICA Y USO TERAPÉUTICO.....	43
1.7.5. PRINCIPALES COMPONENTES.....	43
1.7.6. DOSIS Y USOS.....	43
1.7.7. CONTRAINDICACIONES.....	44
1.8. JUSTIFICACIÓN.....	45
2. HIPÓTESIS.....	46
3. OBJETIVOS.....	46
3.1. GENERAL.....	46
3.2. PARTICULARES.....	47



4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	48
4.1. MATERIAL.....	48
4.2. REACTIVOS.....	48
4.3. EQUIPO.....	48
4.4. PLAN DE TRABAJO.....	49
4.5. METODOLOGÍA.....	50
4.5.1. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS.....	50
4.5.2. PRUEBA DE ESTERILIDAD DEL EXTRACTO ETANÓLICO.....	50
4.5.3. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO SECO TOTAL.....	50
4.5.4. ELABORACIÓN DEL LOTE DE ÓVULOS A BASE DE GLICERO-GELATINA.....	51
4.5.5. PRUEBA DE ESTERILIDAD DEL LOTE DE ÓVULOS.....	51
4.5.6. PRUEBA DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO (DIAGRAMA 1) .....	52
4.5.7. ENSAYO EN MICROPLACA (DIAGRAMA 2) .....	53
4.5.8. PRUEBA DEL EFECTO BACTERICIDA Y/O BACTERIOSTÁTICO (DIAGRAMA 3) .....	54
4.5.9. PRUEBA DE CONTROL AL PRODUCTO TERMINADO .....	55
5. RESULTADOS.....	56
5.1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS.....	56
5.2. OBTENCIÓN Y ESTERILIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS.....	56
5.3. RESULTADOS EN LAS PRUEBAS DE CONTROL AL PRODUCTO TERMINADO.....	57
5.4. RESULTADOS DEL ENSAYO DE CONTROL MICROBIOLÓGICO.....	59
5.5. RESULTADOS DE ESTABILIDAD A CORTO PLAZO (6 MESES).....	60
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	62
7. CONCLUSIONES.....	68
8. SUGERENCIAS.....	69
9. APÉNDICE.....	70
9.1. PREPARACIÓN DE REACTIVOS.....	70
9.2. PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS AISLADAS.....	74
10. REFERENCIAS.....	76



## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA (1): ANTONIO VAN LEEUWENHOEK.....	13
FIGURA (2): ÓRGANOS GENITALES FEMENINOS.....	15
FIGURA (3): ÓRGANOS EXTERNOS FEMENINO.....	17
FIGURA (4): <i>Escherichia coli</i> .....	26
FIGURA (5): <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	26
FIGURA (6): <i>Staphylococcus aureus</i> .....	27
FIGURA (7): <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	28
FIGURA (8): <i>Listeria monocytogenes</i> .....	28
FIGURA (9): <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	28
FIGURA (10): FORMAS FARMACÉUTICAS.....	29
FIGURA (11): MOLDE PARA ÓVULOS .....	31
FIGURA (12): CALENDULA.....	32
FIGURA (13): <i>Echinacea purpurea</i> .....	37
FIGURA (14): USOS DE <i>Echinacea purpurea</i> .....	40
FIGURA (15): ACCIONES DE <i>Echinacea purpurea</i> .....	41
FIGURA (16): CANCERINA.....	42
FIGURA (17): CORTEZA DE CANCERINA.....	44
FIGURA (18): OBTENCIÓN Y ESTERILIZACIÓN DEL EXTRACTO SECO TOTAL.....	57
FIGURA (19): EXTRACCIÓN DE LA MASA OVULAR.....	57
FIGURA (20): PRODUCTO TERMINADO.....	58
FIGURA (21): PRUEBA DE ESTERILIDAD.....	59
FIGURA (22): ENSAYO COLORIMÉTRICO DE MOSMANN.....	59
FIGURA (23): EFECTO BACTERICIDA Y/O BACTERIOSTÁTICO .....	60
FIGURA (24): APARIENCIA.....	60
FIGURA (25): ESTABILIDAD A CORTO PLAZO .....	61



"Elaboración de una forma farmacéutica (ovulo) a base del extracto de Caléndula officinalis, Echinacea purpúrea e Hippocratea excelsa para el tratamiento de infecciones cervico vaginales humanas". |

## ÍNDICE DE TABLAS

	PÁG.
TABLA (1): AGENTES BIOLÓGICOS RESPONSABLES DE LAS INFECCIONES CERVICO-VAGINALES.	20
TABLA (2): PROPIEDADES CARACTERÍSTICAS DE <i>Candida albicans</i> .....	21
TABLA (3): TRATAMIENTO PARA LA CANDIDIASIS VAGINAL.....	22
TABLA (4): TRATAMIENTO PARA TRICHOMONIASIS.....	23
TABLA (5): PROPIEDADES CARACTERÍSTICAS DE <i>Gardnerella vaginalis</i> .....	24
TABLA (6): TRATAMIENTO PARA VAGINOSIS BACTERIANA.....	25
TABLA (7): UNIFORMIDAD DE PESO.....	58



## RESUMEN

Las infecciones genitales en la mujer constituyen una de las principales causas de consulta ginecológica en nuestro país. La mayoría de las mujeres han tenido una infección vaginal por lo menos una vez en su vida, afectando en todas las edades, tanto a las que están activas sexualmente como a las que no lo están. El término médico para una infección vaginal es "vaginitis". Las 3 causas más comunes de las infecciones vaginales son bacterias, protozoarios y hongos. Un estudio de exudado cérvico-vaginal implica la investigación tanto de microorganismos de la flora normal y patógena. Los patógenos de transmisión sexual son por lo general: *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis*, *Haemophilus ducreyi*, *Candida albicans*, *Listeria monocytogenes* y *Streptococcus agalactiae*. También se pueden producir secreciones vaginales si se tiene una infección en el cérvix por gonorrea o Chlamydia, hay otras causas de infecciones vaginales que son menos comunes. Cada tipo de vaginitis es causado por un tipo diferente de germen u organismo y, por consiguiente, debe tratarse de manera diferente.

El interés en el estudio de plantas medicinales como fuente de compuestos farmacológicos ha aumentado por todo el mundo y hay una necesidad de estudiar las características de la flora medicinal para validar su uso en la Medicina Tradicional y que esto permita a la Industria Farmacéutica el desarrollo de nuevos productos más efectivos y menos peligrosos para el paciente y así minimizar los efectos secundarios del mismo.

El objetivo principal de este trabajo es la realización de una forma farmacéutica (óvulo) a base del extracto de *Calendula officinalis*, *Echinacea purpurea* e *Hippocratea excelsa* para el tratamiento de infecciones cérvico vaginales humanas, utilizando para su elaboración y fabricación una mezcla glicero-gelatina por el método de moldeado. Se realizó la esterilización de los extractos por el método de filtración empleando una membrana de celulosa de 0.22  $\mu\text{m}$ , verificando la prueba de esterilidad con un sembrado de cada extracto en agar BHI, obteniendo resultados negativos de crecimiento microbiano, posteriormente se evaporaron hasta sequedad en el horno Pasteur a una temperatura de 37 °C y no más de 50 °C, se recolectó la materia seca, se pesó y colocó en pequeños frascos ámbar estériles. Una vez obtenida la materia seca se preparan dos lotes de 50 óvulos cada uno, con una concentración de 150 mg, a estos óvulos se les practicó la prueba de esterilidad y la prueba de inhibición de crecimiento bacteriano con bacterias que previamente se aislaron e identificaron, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Gardnerella vaginalis*.



Para emplear el método de Mosmann se hizo un ensayo en microplaca con y sin tratamiento, tomando una muestra equivalente a 10  $\mu$ l de caldo de cada una de las bacterias anteriormente mencionadas, finalmente se determino el efecto bactericida y/o bacteriostático mediante una prueba cualitativa en agar BHI. Los extractos de *Calendula officinalis*, *Echinacea purpurea* e *Hippocratea excelsa*, presentan un efecto bacteriostático en tres de las bacterias utilizadas y un efecto bactericida en *Escherichia coli* y *Gardnerella vaginalis*.

Cabe mencionar que tras una búsqueda minuciosa en la literatura nos damos cuenta que somos los pioneros en la elaboración de un forma farmacéutica con tres extractos naturales en el país, ya que en el año 2008 Ángeles. R probó una formulación solo con el extracto de *Calendula officinalis* por ello creemos que este óvulo será más eficaz al contar con dos extractos más en su formulación. La forma farmacéutica obtenida ya se está probando de manera in-vivo en un lote de cuatro personas voluntarias obteniendo resultados satisfactorios en un 80 %.

## INTRODUCCIÓN

Las bacterias son a menudo malignas y es la causa de enfermedades en los humanos y en animales. Sin embargo, ciertas bacterias, producen antibióticos, otras viven simbióticamente en los intestinos de animales (inclusive en los humanos) o en otra parte de sus cuerpos, en las raíces de ciertas plantas, convierten el nitrógeno en una forma utilizable. Las bacterias juegan un papel fundamental en la naturaleza y en el hombre. Ellas ponen el sabor en el yogur y el gusto en el fermento del pan; ayudan en la descomposición de la materia orgánica.

La existencia de microorganismos ya fue hipotetizada a finales de la Edad Media. En el Canon de medicina (1020), Abu Alì ibn Sinà planteaba que las secreciones corporales estaban contaminadas por multitud de cuerpos extraños infecciosos antes de que una persona cayera enferma, pero no llegó a identificar a estos cuerpos como la primera causa de las enfermedades. Cuando la Peste Negra (peste bubónica) alcanzó al-Ándalus en el siglo XIV, Ibn Khatima e Ibn al-Khatib escribieron que las enfermedades infecciosas eran causadas por entidades contagiosas que penetraban en el cuerpo humano. Estas ideas sobre el contagio como causa de algunas enfermedades se volvieron muy populares durante el Renacimiento, sobre todo a través de los escritos de Girolamo Fracastoro (CREATIVE C., 2009).



Antonio van Leeuwenhoek, la primera persona que observó una bacteria a través de un microscopio.

Figura 1.- Antonio van Leeuwenhoek

Las primeras bacterias fueron observadas por Antonio van Leeuwenhoek en 1683 usando un microscopio de lente simple diseñado por él mismo. Inicialmente las denominó animalículos y publicó sus observaciones en una serie de cartas que envió a la Royal Society de Londres, un grupo de individuos dedicados a la experimentación (Bordon. 1978). El nombre de bacteria fue introducido más tarde, en 1828, por Ehrenberg. Deriva del griego βακτήριον *-α*, *bacterion -a*, que significa bastón pequeño.



Aunque a finales del siglo XIX ya se sabía que las bacterias eran causa de multitud de enfermedades, no existían tratamientos antibacterianos para combatirlos. Fue ya en 1910 cuando Paul Ehrlich desarrolló el primer antibiótico, por medio de unos colorantes capaces de teñir y matar selectivamente a la espiroqueta *Treponema pallidum*, la bacteria causante de la sífilis. Erlich recibió el premio Nobel en 1908 por sus trabajos en el campo de la inmunología y por ser pionero en el uso de tintes y colorantes para detectar e identificar bacterias, base fundamental de las posteriores tinción de Gram y tinción de Ziehl Neelsen.

Las infecciones cérvico-vaginales fueron descubiertas hace mucho tiempo, por ejemplo la infección causada por Trichomonas, mencionada primeramente en 1835 por Donné, quien la describió como un protozoo flagelado, caracterizado por su vida en medio ácido. Confirmado 19 años después en 1855 por Kolliker y Scanzononi. Desde entonces hasta 1900 aparecieron unos siete ensayos en la literatura europea y americana, en los que se describen varias características de rasgos de las trichomonas. En 1894 Döderlein publicó su trabajo, describiendo el bacilo que lleva su nombre. Él también consideraba la elevada acidez de la vagina normal, un mecanismo protector del cuerpo contra el desarrollo de los organismos patógenos.

En 1920 se anunciaron dos importantes principios generales.

- El primero de ellos se refiere a que enfermedades sistémicas pueden cambiar la flora vaginal a través de su efecto sobre el epitelio vaginal.
- El segundo se refiere a que la flora vaginal puede ser cambiada por organismos de enfermedades infecciosas, venciendo a la flora normal latente de la vagina con alteraciones bioquímicas asociadas.

Desde 1900 ha habido frecuentes reportes sobre el hallazgo de Trichomonas en el varón, igual que la hembra. Este descubrimiento fue hecho originalmente en 1894 cuando Marchand encontró Trichomonas en el tracto urinario de un paciente varón. En 1929 fue descrita como cosa fisiológica la descomposición del glicógeno que normalmente tiene la célula de la mucosa vaginal con la formación consecutiva de ácido láctico. Esta descomposición la hace el bacilo de Döderlein.

En general, los ensayos que han aparecido en los últimos 50 años sobre las infecciones cérvico-vaginales se han referido principalmente a su tratamiento.

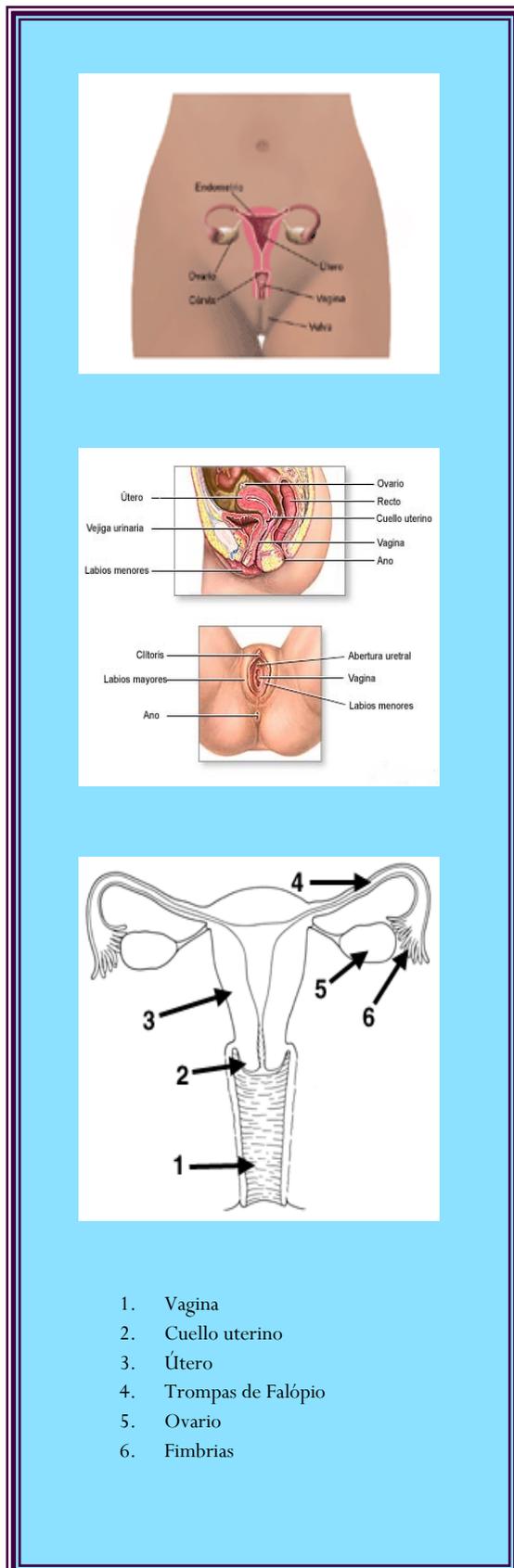


FIGURA 2.- ÓRGANOS GENITALES FEMENINOS

### 1.1.-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 al útero (trompas uterinas); un órgano que recibe y contiene el huevo fecundado (el útero) y un conjunto de órganos que intervienen en la cópula (la vagina y la vulva), a los que se agrega por la íntima relación fisiológica que con estos posee, la glándula mamaria (QUIROZ F., 2004).

#### 1.1.1.- ÓRGANOS INTERNOS

##### OVARIOS

Son dos órganos del tamaño y forma aproximados a una almendra. Situados en la aleta posterior del ligamento ancho, a los lados del útero. Son las glándulas genitales de la mujer; glándulas mixtas, cuya secreción externa origina los óvulos, y cuya secreción interna genera las hormonas ováricas, que intervienen en la producción de los caracteres sexuales secundarios de la mujer. Son de color rosa pálido en la niña y rosado en la mujer adulta, color que aumenta de intensidad durante el período menstrual. En la mujer adulta alcanza un peso de 8 gramos en estado de reposo, pero después del periodo menstrual disminuye su peso en uno y dos gramos. Su consistencia es firme, pero mucho menor que la del testículo (GUYTON A., 2005).



### **TROMPA UTERINA**

La trompa uterina o trompa de Falopio es un conducto que se extiende de la superficie exterior del ovario al ángulo lateral del útero, recorriendo el borde superior del ligamento ancho (QUIROZ F., 2004). Mide de 10 a 12 centímetros de longitud, y su diámetro, al salir del útero, es de dos a cuatro milímetros, aumentando progresivamente para medir en su extremidad ovárica ocho milímetros.

La trompa uterina está constituida por una capa externa serosa, una media muscular y una mucosa interna. Interiormente, la trompa es de un color rosado y presenta múltiples pliegues longitudinales de dimensiones muy variables. Los más grandes alcanzan hasta cuatro milímetros de altura, mientras los más pequeños apenas presentan un ligero levantamiento en la superficie de la trompa. (GUYTON A., 2005).

### **ÚTERO**

El útero o matriz, es un órgano hueco destinado a contener el huevo fecundado durante su evolución y a expulsarlo, cuando éste ha alcanzado su desarrollo completo. Está situado en la parte media de la excavación pélvica, entre la vejiga y el recto, por arriba de la vagina y por debajo de las asas intestinales. Tiene la forma de un cono truncado y aplanado de adelante hacia atrás, de base superior y de vértice inferior. Presenta en la unión de su tercio inferior con sus dos tercios superiores, un estrechamiento circular llamado istmo, que lo divide en una parte superior o cuerpo y una parte inferior o cuello (QUIROZ F., 2004).

Mide siete centímetros de longitud por cuatro de ancho en su cuerpo y dos en su cuello, con un espesor medio de dos y medio centímetros, tiene un peso de cuarenta a cincuenta gramos.

### **VAGINA**

La vagina es un conducto músculo membranoso que se extiende del cuello uterino a la vulva. Está situada por delante del recto, por atrás de la vejiga y por abajo del cuello uterino. Posee una porción pélvica y la otra comprendida en el espesor del perineo, al que atraviesa de arriba abajo y de atrás adelante para abrirse al exterior (QUIROZ F., 2004).

En estado de vacuidad la vagina se encuentra de forma aplanada de adelante hacia atrás, su longitud es de ocho centímetros como promedio, su cara anterior tiene una longitud de siete centímetros, mientras la posterior es más larga y mide nueve centímetros.

### 1.1.2.- ÓRGANOS EXTERNOS

#### VULVA

La parte externa de los órganos reproductores femeninos se denomina vulva, que significa cubierta. Se halla situada entre el peritoneo y la parte inferior de la pared anterior del abdomen, y transversalmente está comprendida entre los dos muslos. La vulva cubre la abertura de la vagina y otros órganos reproductores localizados en el interior del cuerpo. Está compuesta por las siguientes formaciones: el monte de Venus, los labios mayores, los labios menores, el clítoris, el orificio vaginal y el himen.

#### PUBIS

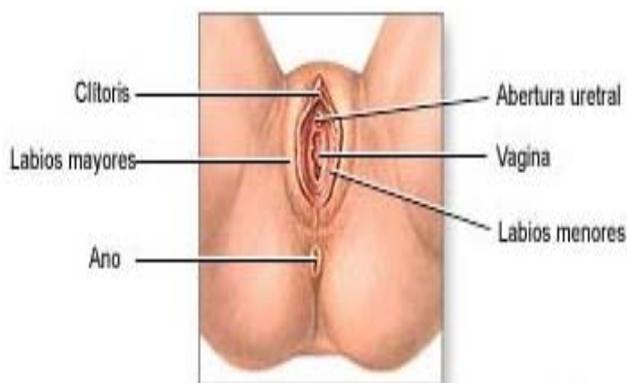


FIGURA 3.- ÓRGANOS EXTERNOS FEMENINOS

Es la zona más visible de la vulva, ubicada en la pelvis; también se la conoce como Monte de Venus. Tiene forma triangular, con la base en la parte superior. Está constituida en su interior por un abundante tejido graso y exteriormente por una piel que se cubre de vello a partir de la pubertad.

Los labios mayores se unen hacia delante y se pierden en un saliente mediano o monte de Venus. Los labios menores se unen también hacia delante para envolver al clítoris, que con otras formaciones constituyen el aparato eréctil de la vulva (GUYTON A., 2005).

#### LABIOS MAYORES

Labios mayores son dos repliegues cutáneos, alargados en sentido antero posterior y aplanados transversalmente. Poseen dos caras, dos bordes y dos extremidades, está constituido por diversas capas que de afuera adentro son: una capa cutánea de epidermis pigmentada cubierta de pelos y rica en glándulas sudoríparas y sebáceas. Contiene en su interior la capa de tejido celular con grasa más o menos abundante.



## LABIOS MENORES

Los labios menores o ninfas: están situados por dentro de los labios mayores y son dos repliegues cutáneos que poseen, como los mayores, dos caras, dos bordes y dos extremidades. La cara externa corresponde a la cara interna del labio mayor del que está separado por el surco labial.

## CLÍTORIS

Se encuentra situado en la parte superior de la vulva, por debajo de los labios mayores y entre los repliegues de los labios menores. Se trata de un órgano eréctil del tamaño de un guisante, con una estructura muy parecida a la del pene, pues está formado por un tejido esponjoso y abundantes terminaciones nerviosas. Asimismo, tiene un glande cubierto por un prepucio. La punta del clítoris es la zona más sensible de la mujer (QUIROZ F., 2004).

### 1.2.- INFECCIONES VAGINALES

Cuando el ecosistema de la vagina se ve alterado por diferentes causas, como el uso de antibióticos, hormonas, preparaciones orales o tópicas, duchas vaginales, medicamentos vaginales, enfermedades de transmisión sexual, cambios de pareja y situaciones de estrés, pueden aparecer infecciones vaginales (PARMET, 2004).

El medio ambiente de la vagina se protege de diferentes formas, como son la barrera física de sus tejidos, la flora endógena de bacterias, la respuesta inmune humoral y la protección que está mediada por células. También sufre descamaciones y regeneraciones, que permiten eliminar gran número de bacterias patógenas. Bajo la influencia de los estrógenos, el epitelio produce glucógeno que se degrada por la acción de *Lactobacillus spp* a glucosa y finalmente a ácido láctico, este último mantiene un pH vaginal menor de 4,5, que previene un crecimiento excesivo de bacterias patógenas.

La secreción normal de la vagina es clara, blanca, floculada, altamente viscosa, sin olor, con  $\text{pH} < 4,5$  y normalmente entre 5 y 10 diferentes microorganismos que incluyen *Lactobacillus spp* facultativos y anaerobios en concentraciones entre  $10^5$  y  $10^7$  células/ml, que se unen a los receptores de las células epiteliales de la vagina, de esta manera evitan la presencia y entrada de organismos no deseados, otros microorganismos presentan baja concentración. En la literatura se encuentran grandes variaciones en los términos para describir las características de las secreciones vaginales en cuanto a color, consistencia y olor, con mayor coincidencia en cuanto a síntomas como irritación, escozor, eritema e inflamación. El volumen de la secreción vaginal es variable, mientras que el mal olor puede presentarse en mujeres sanas, así como estados de irritación de la vagina.



Si bien el primer paso a seguir en el diagnóstico de las infecciones vaginales o también llamada vaginitis es el interrogatorio médico del paciente, éste se debe realizar, evitando una incorrecta interpretación de los síntomas que lleven a un falso diagnóstico de infección vaginal, cuando en realidad puede ser un funcionamiento normal del sistema reproductor femenino. De esta manera el especialista debe realizar un diagnóstico clínico donde se evalúen los cambios de los patrones usuales y la dificultad funcional que presente el paciente (SUROS A., 2001).

### 1.2.1.- VAGINITIS

La vaginitis es la enfermedad ginecológica más común encontrada en la atención médica primaria. Su diagnóstico en ocasiones resulta difícil, porque puede tener manifestaciones simples o combinaciones de síntomas de diferentes etiologías, siendo frecuente un comportamiento asintomático.

La vaginitis o vulvovaginitis es una inflamación de la vagina que provoca secreciones con olor característico, eritema, dolor, ardencia, escozor, irritación y escasa pérdida de sangre. La evaluación de la vaginitis requiere un interrogatorio, examen físico del paciente y análisis de la secreción vaginal.

Los seis tipos más comunes de vaginitis son los siguientes:

- Infección por *Candida*
- Vaginitis bacteriana.
- Vaginitis por Trichomoniasis.
- Vaginitis por Clamidia.
- Vaginitis gonocócica.
- Vaginitis viral.
- Vaginitis no infecciosa.

Cada uno de estos tipos de infección tiene una causa diferente y pueden presentar síntomas diferentes, por lo que el diagnóstico es con frecuencia complicado. Además, más de un tipo de vaginitis puede presentarse al mismo tiempo, con o sin síntomas presentes (RECTOR., et al 2007).

La vaginitis se puede categorizar como infecciosa y no infecciosa. Las causas no infecciosas son, por déficit de estrógenos, por irritación química, atrofia de la vagina, de origen alérgico y por descamación. La vaginitis de tipo infecciosa es la responsable del 90% de los restantes tipos de vaginitis, las principales causas de la vaginitis infecciosa son tres, la Vaginosis Bacteriana (VB), la Candidiasis y la Trichomoniasis.

TABLA 1.- AGENTES BIOLÓGICOS RESPONSABLES DE LAS INFECCIONES CERVICO-VAGINALES

<b>HONGOS</b>	<i>Candida albicans</i>
<b>PROTOZOARIOS</b>	<i>Trichomonas</i>
<b>BACTERIAS</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• <i>Neisseria gonorrhoeae</i></li><li>• <i>Gardnerella vaginalis</i></li><li>• Enterobacterias</li><li>• <i>Chlamydia</i></li></ul>
<b>VIRUS</b>	Virus del herpes simple (herpes virus)
<b>OTROS</b>	Flujo asociado a cuerpos extraños Vaginitis de contacto

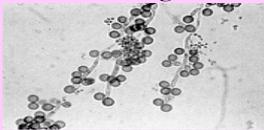
Cuando la flora vaginal se altera por la introducción de patógenos o por cambios en el medio ambiente vaginal ocurre la proliferación de patógenos. Los cambios en el pH y la disminución de los lactobacilos productores de peróxido de hidrógeno provocan la proliferación de microorganismos que normalmente están reprimidos como la *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis* y *Mobiluncus spp.* Estos microorganismos como productos de su metabolismo, liberan aminas que son responsables del mal olor en la descarga vaginal, incremento del pH y causan la exfoliación de células epiteliales.

Por otra parte, los cambios del medio ambiente como el incremento de la producción de glucógeno durante el embarazo y la alteración de los niveles de estrógenos y progesterona, por el uso de anticonceptivos orales, permiten la adherencia de *Candida albicans* a las células epiteliales de la vagina y facilitan la germinación de levadura. Esos cambios pueden transformar la colonización asintomática en una infección sintomática. En pacientes con *Trichomoniasis* los cambios en el nivel de estrógenos y progesterona, así como la elevación del pH y glucógeno, pueden provocar el crecimiento y virulencia de *Trichomonas vaginalis*.

### 1.2.2.- INFECCIONES POR CANDIDA

La candidiasis, también llamada micosis Candidiásica, es una infección por hongos vaginales, como se llama popularmente, tiene su causa en una de las muchas especies de hongos o levadura llamada *Candida albicans* o monilia. Hongo levaduriforme de la familia *cryptococacea* que incluye los géneros *Candida*, *Torulopsis*, *Trichosporum*, *Criptococcus*. Todas las personas tienen este hongo, por fuera y dentro del cuerpo. Se puede encontrar en la piel, en el estómago, en el colon, en el recto, en la vagina, en la boca y en la garganta. Los principales factores de riesgo para padecer la infección son el uso de anticonceptivos orales, diafragmas y espermicidas, estrógenos, frecuente actividad sexual, la administración de antibióticos, la diabetes mellitus y el embarazo (GROSSMAN H., 2008).

TABLA 2.- PROPIEDADES CARACTERÍSTICAS DE *Candida albicans*

CANDIDA	
Historia	En el año de 1839 Langenbeck descubrió el microorganismo del muguet ( <i>Candida albicans</i> ). Para el año 1923 Burkhout la denominó Cándida terminología utilizada actualmente
Pruebas diagnosticas de laboratorio 	<ul style="list-style-type: none"><li>A. Citología: consisten en raspados o hisopos tallados sobre las lesiones superficiales, exudado o materiales de catéteres intravenosos, colocados sobre un porta objeto.</li><li>B. Cultivo: Agar de Sabouraud, se cultivan a temperatura ambiente a 37° C. Se busca el crecimiento por gemación y pseudomicelios.</li><li>C. Examen microscópico: se procesan con tinción de gram en busca de pseudohifas.</li></ul>
Morfología 	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Las levaduras son células redondas u ovales. Los hongos filamentosos están formados por estructuras tubulares denominada hifas las cuales crecen en ramificación. <i>Candida albicans</i> es una levadura gram positiva.</li></ul>
Pruebas rápidas	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Prueba rápida para la ureasa</li><li>➤ prueba rápida para el nitrato reductasa</li><li>➤ prueba levodopa-citrato férrico.</li><li>➤ Y el más usado y económico es la prueba del tubo germinativo (<i>Candida</i>).</li></ul>



"Elaboración de una forma farmacéutica (ovulo) a base del extracto de Caléndula officinalis, Echinacea purpúrea e Hippocratea excelsa para el tratamiento de infecciones cervico vaginales humanas". |

Los principales síntomas que manifiesta la paciente son prurito, eritema, excoriaciones, edema y sensación de ardencia al orinar. La secreción vaginal que se observa en la Candidiasis es blanca, de aspecto de leche cortada o coagulo de queso y sin olor.

El tratamiento comprende, generalmente, la aplicación tópica de cualquiera de los imidazoles (por ejemplo, miconazol, clotrimazol, econazol, butoconazol, terconazol) o nistatina. Aunque los imidazoles suelen ser más costosos, el ciclo de tratamiento es más corto y parecen ser más efectivos que la nistatina. La presentación más común es en crema o en supositorio que se coloca dentro de la vagina (BEHRMAN E., 2001).

TABLA 3.- TRATAMIENTO PARA LA CANDIDIASIS VAGINAL (59)

TRATAMIENTO	FORMA DE USO Y DOSIS
Clotrimazol Gyne-Lotrimin crema	Se aplican cinco gramos de esta crema todos los días, usando un aplicador especial, durante 7 a 14 días.
Clotrimazol Mycelex supositorios vaginales	Está disponible bajo receta médica en supositorios potentes de 100 mg y 500 mg. Los supositorios de 100 mg se usan todos los días durante siete días. El supositorio de 500 mg es más potente que el de 100 mg y sólo se coloca una sola vez.
Miconazol Monistat crema vaginal	Se aplican 5 gramos de esta crema todos los días, usando un aplicador especial, durante siete días.
Miconazole Monistat supositorios vaginales	Está disponible en supositorios potentes de 100 mg, 200 mg y 500 mg. Los supositorios de 100 mg y 200 mg no requieren de receta médica. Los de 500 mg requieren receta médica. Los supositorios de 100 mg se usan una vez al día durante siete días y los de 200 mg se usan una vez al día durante tres días. El de 500 mg solamente se aplica una vez.
Terconazol	Estos supositorios contienen 80 mg de terconazol y se utiliza todos los días durante tres días.
Tioconazol (Vagistat pomada)	Esta pomada contiene 300 mg de tioconazol y se utiliza con un aplicador especial solamente una vez.
Butoconazol (crema)	Se aplican 5 gramos de esta crema con un aplicador especial, todos los días, durante tres días.



### 1.2.3.- TRICHOMONIASIS VAGINAL

*Trichomonas vaginalis* es un parásito flagelado de transmisión sexual con una alta tasa de transmisión en adultos, donde el 70 % de los hombres adquieren la infección después de una sola exposición. El tiempo de incubación de la enfermedad es de 2 a 8 días y el parásito puede permanecer viable por 6 horas en el medio ambiente.

La Trichomoniasis es una Enfermedad de Transmisión Sexual (ETS) se asocia a otras de su tipo como el virus herpes simple, gonorrea, virus papiloma humano y VIH. Esta infección es sintomática que se manifiesta por secreción vaginal fétida y prurito vulvar en mujeres y por uretritis en hombres.

La presencia y los síntomas dependen de la inmunidad local y la concentración inoculada, pudiendo transitar de forma asintomática en el 50 % de los casos. La secreción vaginal se muestra de color entre amarillo y verde, con abundante fluido espumoso y olor fétido, se acompaña de prurito vulvar y disuria. La mucosa vaginal se torna hiperemia y edematosa con petequias cervicales o cervix en fresa. El pH vaginal está entre 5.0-5.5.

Algunas mujeres no presentan síntomas con la Trichomoniasis. La identificación del parásito se hace por la observación al microscopio de su tamaño que es superior de 2 a 3 veces comparado con los leucocitos y la presencia de 4 flagelos que proporcionan su motilidad característica (VÁZQUEZ., 2008).

TABLA 5.- TRATAMIENTO PARA TRICHOMONIASIS <sup>(59)</sup>

RÉGIMEN	TRATAMIENTO	DOSIS	TASA DE CURACIÓN
RECOMENDADO	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Metronidazol</li> <li>• Tinidazol</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 g vía oral en dosis única</li> <li>• 2 g vía oral en dosis única</li> </ul>	<p>■ La tasa de curación que se registra para las mujeres varía entre el 82% y el 88 % pero puede aumentar al 95 % si las parejas sexuales reciben tratamiento simultáneo.</p>
ALTERNATIVO	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Metronidazol</li> <li>• Tinidazol</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 400 mg o 500 mg por vía oral, dos veces al día durante 7 días.</li> <li>• 500 mg por vía oral, dos veces al día durante 5 días.</li> </ul>	



#### 1.2.4.- VAGINOSIS BACTERIANA (VB)

La vaginosis bacteriana (VB) es un síndrome clínico que se origina por el reemplazo del *Lactobacillus sp.* productor del peróxido de hidrogeno normal, a causa de las altas concentraciones de bacterias anaerobias como *Gardnerella vaginalis* presentando un 90 % de los casos y *Mycoplasma hominis*. Aun no se comprende la causa de esta alteración microbiana en su totalidad.

TABLA 6.- PROPIEDADES CARACTERÍSTICAS DE *Gardnerella vaginalis*

<i>Gardnerella vaginalis</i>	
Historia	Se trata de una bacteria, antes llamada <i>Haemophilus vaginalis</i> que es capaz en la mujer producir un cuadro clínico irritativo con flujo vaginal (vaginitis), y en algunos casos en el hombre balanitis (inflamación en la cabeza del pene). La primeras descripciones datan de 1953, cuando Leopold lo aisló de 58 mujeres con cervicitis y de dos hombres con uretritis inespecífica y la denominaron <i>Haemophilus vaginalis</i> , por aislarse inicialmente son el Agar sangre, pero mas tarde se descarto y la relacionaron con otros géneros de bacilos gram positivos como; <i>Crynebacterium</i> , <i>Butgribacterium</i> e incluso <i>Lactobacillus</i> , para luego finalmente clasificarla en el nuevo género <i>Gardnerellas</i> , con una sola especie <i>Gardnerella vaginalis</i> . El nombre se dio en honor del H.L. Gardner.
Morfología	<i>Gardnerella vaginalis</i> es un bacilo inmóvil no encapsulado, puede presentar fimbrias y es corto con una longitud de 0.5. a 1.5 mm, lo que hace que parezca un cocobacilo pleomórfico, que usualmente se tiñe como gram negativo o gram variable.
Aislamiento e identificación	<p>A. Esta bacteria se ha podido aislar en agar sangre incubado en anaerobios en una atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> a 35 °C por 48 horas. Los medios más utilizados para su obtención son:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agar columbia</li> <li>• Agar vaginalis</li> <li>• Agar bicapa (HBT) es el más usado</li> <li>• Es importante mencionar que el microorganismo es exigente y no crece en agar-sangre o agar chocolate de sangre animal</li> </ul> <p>B. Se originan colonias translucida u opacas de 0.3 a 0.5 mm de diámetro, puntiforme, redondas, lisas, con hemolisis tipo beta.</p> <p>C. Otra prueba de sospecha es el agregado de KOH al 10% con un volumen igual al de la muestra provocando un olor a pescado.</p>
Pruebas bioquímicas	<ul style="list-style-type: none"> <li style="width: 33%;">• Oxidasa (-)</li> <li style="width: 33%;">• Catalasa (-)</li> <li style="width: 33%;">• Indol (-)</li> <li style="width: 33%;">• Glucosa (+)</li> <li style="width: 33%;">• Maltosa (+)</li> <li style="width: 33%;">• Lactosa (variable)</li> <li style="width: 33%;">• Sacarosa (variable)</li> <li style="width: 33%;">• Xilosa (variable)</li> <li style="width: 33%;">• Manitol (-)</li> <li style="width: 33%;">• Reducción de nitratos y nitritos (-)</li> </ul>



En los Estados Unidos de América, la VB es la causa más frecuente de vaginitis infecciosa en la mujer de edad reproductiva con estimado de tres millones de casos sintomáticos por año.

Mientras que la Trichomoniasis es una infección de transmisión sexual, la vaginosis bacteriana es una infección endógena del tracto reproductivo.

La prevalencia de la VB es difícil de precisar debido a su curso asintomático hasta en un 70 % de los pacientes. Esta prevalencia varía según la población estudiada, de manera que en gestantes está entre el 10-30 %, mientras que en pacientes con Enfermedades de Transmisión Sexual (ETS) resulta mayor con valores entre el 24-40 %. Aunque se observa alta frecuencia de la infección en mujeres con ETS y con múltiples parejas, no hay evidencias que aseguren su transmisión sexual.

Cuando la paciente es sintomática, el olor a pescado en la descarga vaginal es característico y propio de las aminas presentes, que se acentúan después del acto sexual por acción del pH alcalino del semen.

Las mujeres con vaginitis bacteriana se tratan generalmente con la aplicación oral o tópica de Metronidazol.

TABLA 7.- TRATAMIENTO PARA VAGINOSIS BACTERIANA (59)

RÉGIMEN	TRATAMIENTO	DOSIS
<b>RECOMENDADO</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Metronidazol</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 400 mg o 500 mg por vía oral dos durante 7 días.</li> </ul> <p>Nota: se debe advertir a los pacientes que reciben Metronidazol que eviten el consumo de alcohol mientras dure el tratamiento y hasta 24 hrs después de la última dosis.</p>
<b>ALTERNATIVO</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Metronidazol</li> <li>• Clindamicina vaginal al 2 %</li> <li>• Metronidazol al 0.75 %</li> <li>• Clindamicina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 g por vía oral como dosis única.</li> <li>• En crema, 5 g por vía intravaginal antes de acostarse, durante 7 días.</li> <li>• En gel, 5 g por vía intravaginal, dos veces al día durante 5 días.</li> <li>• 300 mg por vía oral, dos veces al día durante 7 días.</li> </ul>

### 1.3.- OTRAS BACTERIAS DE IMPORTANCIA MÉDICA, IMPLÍCITAS EN INFECCIONES VAGINALES

*Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* pueden ocasionalmente causar infecciones vaginales.

#### 1.3.1.- *Escherichia coli*

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

Se calcula que la *E. coli* causa unos 73,000 casos de infección, 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).



FIGURA 4.- *Escherichia coli*

#### 1.3.2.- *Streptococcus*

Los patógenos predominantes detectados en infecciones nosocomiales son grampositivos, como *Streptococcus* spp y en las últimas dos décadas se ha observado un incremento en las infecciones invasivas causadas por este patógeno, especialmente en adultos. *Streptococcus* es un diplococo grampositivo que coloniza el tracto respiratorio superior y, en general, llega al pulmón vía microaspiración del contenido de la faringe (LISBOA T. et al 2007).



FIGURA 5- *Streptococcus agalactiae*

### 1.3.2.1.-*Streptococcus agalactiae*

En medios líquidos tienden a proliferar como diplococos o en cadenas cortas en contraste con las cadenas largas de los otros grupos de estreptococos. El *Streptococcus agalactiae* o estreptococo  $\beta$ -hemolítico del grupo B (GBS) es un coco grampositivo, anaerobio facultativo, forma parte de la flora normal del tracto gastrointestinal, desde donde puede colonizar la vagina o el tracto urinario. Tradicionalmente, se ha considerado un importante factor etiológico, provocando sepsis, neumonía y meningitis en el neonato, adquirida cuando el canal del parto del gestante estuviese colonizado.

La penicilina G es el tratamiento de elección para las infecciones causadas por estreptococos de este grupo, la mayor parte de las cepas también son sensibles a la eritromicina, el cloranfenicol, cefalosporina, vancomicina y Clindamicina (VILLENAMA., et al 2009).

### 1.3.3.-*Staphylococcus*

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

#### 1.3.3.1.- *Staphylococcus aureus*

Es el patógeno más significativo para el hombre. Un 30 % de las personas sanas lo pueden albergar en las fosas nasales y un 20 % en la piel, hallándose el porcentaje más alto en los trabajadores de los hospitales y los pacientes condicionados a todo aquello que disminuye las defensas orgánicas de cualquier tipo. Desde un punto de vista clínico-terapéutico el mayor problema es la multiresistencia asociada, quedando restringido a mupirocina para uso tópico, glucopéptidos (vancomicina y teicoplanina), y trimetoprima más sulfametoxazol, eficaces en el tratamiento de las infecciones producidas por cepas de *S. aureus* resistentes a metilina.

#### 1.3.3.2.-*Staphylococcus epidermidis*

Es un microorganismo de baja virulencia, tiene una predilección peculiar por los cuerpos extraños como por ejemplo las válvulas cardíacas, catéteres y prótesis de cadera. La elección de tratamiento adecuado debe basarse en el antibiograma local contra *S. epidermidis*, un régimen inicial debe incluir un glucopeptido y gentamicina o vancomicina sola (BEHRMAN E. 2001, AZANZA R. et al 2004 y VILLENAMA et al 2009).



FIGURA 6.- *Staphylococcus aureus*

#### 1.3.4.-*Pseudomonas aeruginosa*

Es un patógeno oportunista en pacientes inmunodeprimidos y hospitalizados lesionando múltiples órganos y sistemas, siendo un gran problema de salud a nivel mundial. La mayor parte de las infecciones están localizadas en el tracto respiratorio, urinario, ótico, ocular y cutáneo. La importancia de *P. aeruginosa* radica también en su relativa resistencia a los antisépticos y antimicrobianos. El tratamiento requiere antibióticos como aminoglucósidos y ciprofloxacino (LEBEQUE Y. et al 2005).



FIGURA 7.- *Pseudomonas aeruginosa*

#### 1.3.5.-*Listeria monocytogenes*

La *Listeria monocytogenes* es un bacilo gram positivo que puede originar bajo ciertas condiciones la enfermedad denominada Listeriosis tanto en el hombre como en una gran variedad de especies animales por la resistencia que posee esta bacteria a factores ambientales. En E.U., la Listeriosis invasiva confirmada por hemocultivo o cultivo LCR constituye 7,4 casos por millón de habitantes por año. La Listeriosis perinatal complica 16 de cada 100.000 nacimientos y el 23 % causan feto muerto. Constituyen el 2 % de las muertes fetales en general. El tratamiento de elección es la ampicilina o penicilina intravenosa 150 a 200 mg/kg/día (CISTERNAS VA., et al 2002).



FIGURA 8.- *Listeria monocytogenes*

#### 1.3.6.-*Klebsiella pneumoniae*

Es clínicamente el más importante miembro del género de las Enterobacterias y ocupa el primer lugar con un porcentaje del 31 % en infecciones del tracto urinario seguido por *E. coli* con el 10 % en 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).



FIGURA 9.- *Klebsiella pneumoniae*

#### 1.4.- FORMAS DE ADMINISTRACIÓN VAGINAL (ÓVULOS)

Son formas farmacéuticas sólidas o semirrígidas terminadas por compresión o por colado sobre moldes para su aplicación en la vagina donde deben deslizarse para que ejerzan su acción tópica.

Contribuye una vieja forma que ya era aplicada por Hipócrates y se continuó usando en la Edad Media bajo la designación de pesarios, sustancias medicamentosas aglomeradas en pequeños cilindros o colocadas en bolsitas permeables, cuyo hilo de ligadura se continuaba fuera de la vagina para poderlas retirar luego del tratamiento. En el último siglo se emplearon estas formas con base de agar-agar o gelatina a las que se daba forma oval, de tamaño y peso variables pero no mayor de 14 a 16 g (HELMAN J., 1982).

##### 1.4.1.- DEFINICIÓN

Los óvulos vaginales son formas farmacéuticas, generalmente de forma esférica y oval para facilitar su administración por vía vaginal. Pueden contener el fármaco en forma de solución, emulsiones o suspensión.



FIGURA 10.- FORMAS FARMACÉUTICAS (ÓVULOS)

##### 1.4.2.- EXIGENCIAS DE LOS ÓVULOS VAGINALES

Cada unidad puede contener uno o varios fármacos y se administran en dosis unitarias. La masa de un óvulo es de 1 a 15 g. Los excipientes utilizados para la preparación son los mismos que se emplean para la fabricación de supositorios, tienen que ser adecuados para que la forma farmacéutica preparada se funda a 37 °C o se disuelva en el líquido acuoso que baña la zona de administración.



Además, deben reunir una serie de propiedades que, en líneas generales, son las siguientes:

- Deben ser inócuos y bien tolerados por la mucosa vaginal, que es, como se sabe, bastante sensible e irritable.
- Han de ser inertes frente a los principios activos que se le incorporan y, al mismo tiempo, estables frente a la acción de agentes extraños.
- Tienen que presentar una consistencia conveniente, ni muy blandos ni excesivamente rígidos o quebradizos.
- Deben permitir la liberación rápida y completa del principio activo en la vagina.

#### 1.4.3.- EXCIPIENTES DE LOS ÓVULOS

Los principales excipientes utilizados en la preparación de óvulos se dividen en dos grupos para su descripción, en bases grasas o lipófilicos y bases hidrófilicas.

##### 1. Bases grasas o lipófilicos

Las bases grasas solo se usan ocasionalmente cuando se utilizan fármacos de carácter lipófilicos. Ejemplo de estos excipientes es la manteca de cacao que ha sido sustituida por presentar inconvenientes en su manipulación por aceites hidrogenados y aceites hidrogenados dispersables en agua.

##### 2. Bases hidrófilas

Las bases hidrófilicas son las más utilizadas, ya que conservan la consistencia de la forma farmacéutica aun en altas temperaturas a diferencia de las bases grasas, por lo que son adecuados para su uso en países tropicales como México. Sin embargo, presentan el inconveniente de tener cierto poder de irritación para la mucosa vaginal. El excipiente más clásico es la mezcla gelatina-glicero-agua. La gelatina se obtiene por hidrólisis parcial del colágeno animal, cuando no se prepara por métodos especiales, es una sustancia anfótera, incomparable con numerosos fármacos de tipo iónico. La gelatina acostumbra a presentarse en forma de hojas o en polvo; esta última es la de mejor calidad y la más usada en farmacia. La proporción en que intervienen los tres componentes puede variar en un ámbito muy amplio para adecuar la consistencia en función de la naturaleza del principio activo que debe incorporarse (VILA JL., 2001).

#### 1.4.4.- PRESENTACIONES EN USO

a) Óvulos a base de Glicogelatina

Son las formas farmacéuticas prefentemente utilizadas, aunque a veces también las adopta la industria para la preparación de algunas especialidades. La preferencia radica fundamentalmente en que no se requiere instrumental costoso para su elaboración. Es suficiente contar con moldes muy simples como el que se muestra en la figura 11.

La farmacopea Argentina V prescribe una masa ovular de Glicogelatina constituida de:

- Glicerina .....60 g
- Gelatina .....10 g
- Agua destilada cbp .....100 ml

Según la misma farmacopea, se prepara por impregnación de la gelatina cortada en trozos pequeños en 30 ml de agua y se le añade la glicerina calentada a 50-60 °C. Una vez disuelta se reparte en moldes adecuados y lubricados con vaselina liquida (HELMAN J. 1982).



FIGURA 11.- MOLDE PARA ÓVULOS

### 1.5.-HIERBAS MEDICINALES

Hace mucho tiempo que el hombre descubrió la importancia de las hierbas; al principio sólo por su valor alimenticio, pero más tarde también con fines religiosos, culinarios y medicinales. Miles de años antes de Cristo los sabios de antiguas civilizaciones como la griega, la egipcia y la china ya ponían por escrito sus conocimientos sobre las hierbas (ALAN AD., 2005).

A lo largo de los siglos la lista de plantas utilizadas para aliviar todo tipo de males y enfermedades se ha alargado continuamente. Hoy en día las hierbas se utilizan principalmente en la cocina, pero conocer el origen y la historia de algunas hierbas culinarias sugiere toda una revelación.

Los términos "hierbas" y "especias" se confunden a menudo, sin embargo hay una diferencia clara. Entendemos por hierbas aquellas partes de plantas, como raíces, tallos y hojas, frutos y semillas, que crecen en un clima templado como Europa. Las especias son las mismas partes de las plantas, siempre y cuando crezcan en un clima tropical (MARTÍNEZ M., 2006).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO), se calcula que las 2/3 partes de la población de nuestro planeta recurre a las hierbas aromáticas y medicinales para su alimentación y para curar sus dolencias (OMS., 2005).

#### 1.5.1.- CALENDULA

1.5.2.- NOMBRE CIENTÍFICO: *Calendula officinalis*

1.5.3.-NOMBRE COMÚN: Calendula, Maravilla



FIGURA 12.- CALENDULA



Esta planta es conocida desde la antigüedad. Su nombre proviene del latín *calendae* (calendario) que se designa al primer día de cada mes del año, se atribuye a que crece todos los meses del año.

#### 1.5.4.-DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

La *Calendula* o Maravilla, crece espontáneamente en el campo y diferentes lugares del planeta. Está muy extendida en la zona mediterránea (Europa meridional y norte de Oriente próximo). Pertenece a la familia de las *Asteraceae* (compuestas) que incluye alrededor de 20,000 especies, entre las que se encuentran desde árboles, arbustos y plantas herbáceas.

Es una planta herbácea, anual, con flores amarillas. Su floración dura casi todo el año, cerrándose de noche y abriéndose al amanecer. Tiene una altura media que oscila entre los 30-50 cm., su tallo es semi-erecto, angular y ramificado y sus hojas son altas, oblongas o lanceoladas y sensibles, con una corona de 15-20 lígulas, y frutos encorvados, provistos casi todos de alas membranosas o púas dorsales. Se cultiva muy a menudo en los jardines de los que escapa con facilidad sus semillas (MARTÍNEZ M., 1997).

Se usa como planta ornamental y desde hace siglos se viene empleando como planta medicinal debido a sus cualidades terapéuticas. Desprende un olor desagradable y tiene un gusto amargo.

#### 1.5.5.-SINONIMIA

- Latín (científico): *Calendula officinalis*.
- Español: *Calendula*, Maravilla, Flor de todos los meses, Flor de difunto.
- Catalán: *Calendula*, Flor de tot l'any, Gojat, Clavellina de mort, Flor d'albat
- Gallego: Maravilhas, Boninas, Cuidados.
- Vasco: Ille, Ilherrilili.
- Inglés: Marigold, Marybud, Gold-bloom
- Francés: Souci des jardins
- Alemán: Ringelblume



### 1.5.6.- HISTORIA

Esta planta es conocida desde la antigüedad. El nombre *Calendula* proviene del latín *calendae* (Calendario) que designa el primer día de cada mes. Con este nombre algunos atribuyen a tiempo de los romanos, no se conoce todavía la patria de la maravilla, pero se sospecha que no se trata sino de una creación hortense a partir alguna raza silvestre de *Calendula*, aunque no puede ser muy distinta de la *Calendula arvensis*. Se hace referencia a la floración que prácticamente se produce todos los meses del año, incluso en los meses de invierno si este no es extremadamente frío. El hecho de que al igual que los girasoles, sus flores tienden a seguir el movimiento del sol, hizo que también se la conociese con el nombre de *solsequium* (que sigue al sol).

Algunos autores sitúan su origen en México, donde los antiguos aztecas atribuían a ella propiedades espirituales, mágicas y medicinales. Fueron los primeros exploradores españoles los que trasladaron sus semillas a España donde se procuró su cultivo, especialmente en los jardines de los monasterios, y de allí al resto de países de la cuenca mediterránea. El Códice de la Cruz-Badiano (*Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*) fechado en 1552 es el primer documento escrito conocido que hace referencia a esta planta. En 1578 el botánico Dodoens se refiere a ella "Tiene unas flores agradables, de color amarillo brillante, las cuales se cierran a la caída del sol..." "También Nicholas Culpeper (1660-1738) famoso herborista inglés la recomienda para "fortalecer el corazón" y escribe sobre ella "simplemente mire sus flores y su vista mejorara y usted verá cumplida su felicidad". A su vez el naturalista Linneo (1707-1778) hace referencia a la periodicidad en la abertura de sus flores.

Tanto en Latinoamérica como en algunos países europeos, las flores de la maravilla se utilizan para adornar los altares en la fiesta de todos los santos, sus flores se esparcen sobre los sepulcros y existe gran profusión de esta planta en los cementerios. También las Maravillas se utilizan en ceremonias religiosas hindúes. De ahí, tal vez, su nombre Flor de muerto Flor de difunto.

Histórica y tradicionalmente sus flores han sido consideradas muy beneficiosas para reducir la inflamación, como excelente antiséptico y poderoso cicatrizante (WAIZEL BJ., 2006).

### 1.5.7.- ACCIONES FARMACÉUTICAS

La *Calendula* viene siendo utilizada como un remedio natural para tratar pequeñas dolencias y problemas epidérmicos como pueden ser las quemaduras de sol, golpes, magulladuras, cardenales y arañazos, por nombrar algunos. En el pasado esta planta herbácea fue utilizada incluso para sanar vastas dolencias, tales como fiebres, úlceras e infecciones de la piel.

Las lociones y otras preparaciones tópicas de la Calendula (tinturas, ungüentos, cremas, gargarismos) de elaboración artesanal, se siguen utilizando todavía extensamente en Europa, especialmente en tratamientos lento-curativos de la piel. Muchas de estas formulaciones tópicas se pueden encontrar hoy en farmacias, para-farmacias y herboristerías de los Estados Unidos.

Actualmente los especialistas centran sus aplicaciones en su uso tópico, como puede ser edemas, erupciones, úlceras, quemaduras, pieles agrietadas, picaduras de insectos, inflamaciones y otras lesiones cutáneas (JIMÉNEZ M., 2006).

Los compuestos activos primarios de la hierba incluyen triterpenos (anti-inflamatorios) y flavonoides. Recientes estudios de investigación en el laboratorio indican que los pétalos de la Calendula tienen propiedades anti-bacterianas y antiviral, anti-inflamatorias, antisépticas, y pueden incluso ofrecer acciones inmuno-estimulantes. También se han demostrado los beneficios de caléndula en la curación de heridas por quemaduras.

La inflamación y dolor de garganta se puede tratar mediante gargarismos o aclarando con un té astringente hecho con flores secas de Calendula. Las autoridades sanitarias alemanas han aprobado el uso del té de Calendula para el tratamiento del dolor y la inflamación de la garganta. Ha quedado demostrado que la Calendula tiene propiedades anti-inflamatorias y cicatrizantes en su aplicación tópica. No se conoce claramente los componentes responsables de esos efectos, aunque algunos estudios sugieren que los flavonoides de la planta podrían contribuir a sus propiedades cicatrizantes.

Se sigue realizando estudios sobre los efectos anticancerígenos y antivirales de la Calendula. Por el momento, no existen pruebas suficientes para recomendar el uso clínico de la Calendula para el cáncer. Las pruebas sugieren que la Calendula podría ser útil para algunas infecciones virales. Sin embargo, no se sabe cuáles son los componentes responsables de esos efectos (ALAN AD., 2005).

#### 1.5.8.- PROPIEDADES TERAPÉUTICAS

- **Anti-inflamatorias** debido a la inhibición de la lipoxigenasa (flavonoides) y a sus antioxidantes y captadores de radicales libres (flavonoides y triterpenos).
- **Antiséptica y Cicatrizante** al potenciar la epitelización y regeneración de la piel dañada, estimulando la síntesis de glucoproteínas, nucleoproteínas y colágeno durante el periodo de regeneración tisular.
- **Acción antibacteriana y fungicida.**
- **Antiespasmódica.** Combate los espasmos, las contracciones o convulsiones.





- **Acción emenagoga**, como regulador del período menstrual y calmante de los dolores propios.
- **Emoliente**. Suaviza, tonifica e hidrata la piel.
- **Callicida**. Provoca la desaparición de verrugas víricas de la piel, debido a su contenido en ácido salicílico.
- **Colerética**. Estimulante de la actividad hepática, especialmente de la secreción biliar. Tomada en infusión resulta indicada en casos de congestión o insuficiencia hepática.
- **Antiulcerosa**. Cicatriza úlceras de estómago y duodeno. También resulta eficaz en gastritis, gastroenteritis y vómitos.

#### 1.5.9.- USOS MÁS COMUNES

- **Quemaduras**: sana y alivia las quemaduras ya que reduce la inflamación y tiene acciones astringentes, antisépticas y calmantes, a la vez que ayuda a una más rápida curación. Algunos botánicos afirman que la Calendula es la planta más eficaz para el tratamiento de quemaduras de primero grado. Dado que la mayoría de las quemaduras producidas por el sol son quemadura de primero grado, resulta lógico que muchos de los productos prescritos para quemaduras solares contengan Calendula.
- **Pie de Atleta**: Ideal para tratar el pie de atleta. Diversas investigaciones en el laboratorio han demostrado que la Calendula tiene efectos fungicidas. Puesto que el pie de atleta es causado por un hongo, Calendula resultará muy adecuada y conveniente para utilizarla como tratamiento.
- **Picaduras de insectos**: La Calendula puede reducir la inflamación y el picor producido por picaduras de insecto e incluso puede ayudar a prevenir la infección debido a sus acciones antimicrobianas. A su vez su acción astringente promueve una curación más rápida.
- **Heridas ulcerosas**. Muchos especialistas recomiendan gargarizar con una mezcla de Calendula para luchar contra los gérmenes y la inflamación asociada a estas heridas dolorosas.
- **Problemas dérmicos**. Muy conveniente para tratar problemas de la piel como el acné, irritaciones cutáneas, forúnculos, abscesos, dermatitis, grietas, piel seca y sensible, gingivitis y llagas.
- **Curación de heridas**. Acelera la curación de cortes y arañazos. La Calendula es uno de los remedios más comunes para tratar las heridas superficiales y menores de la piel, como cortes y arañazos, ayudando a que la herida cure más rápidamente.

### 1.5.10.- CONTRAINDICACIONES E INTERACCIONES

- 1.-Hipersensibilidad a la *Calendula* o a otras especies de la familia de las compuestas.
- 2.-No se debe tomar durante el embarazo ya que puede tener consecuencias el feto.
- 3.-No se recomienda la ingestión durante la lactancia debido a la ausencia de datos que lo avalen.
- 4.-También en aplicaciones tópicas (externas) se deberá actuar con la necesaria cautela.
- 5.-No se han descrito interacciones con otros medicamentos, aunque debido a la presencia de mucílagos pudiera existir riesgo potencial de retrasar o disminuir la absorción oral de otros principios activos.

### 1.5.11.- PRINCIPALES COMPONENTES

- Saponinas triterpénicas. Calendulósido.
- Triterpenos. Alfa y beta-amirina; monoalcoholes; dioles; trioles; ésteres.
- Flavonoides. Isoquercitrina, narcisina, neohesperidósido, rutina, isoramnetósido.
- Hidroxicumarinas. Escopoletina, umbeliferona, esculetina.
- Polisacáridos heterogéneos. Mucílagos.
- Esteroides.
- Carotenos. Luteína, zeaxantina.
- Aceite esencial. Monoterpenos.

## 1.6.- ECHINACEA

1.6.1.- NOMBRE CIENTÍFICO: *Echinacea purpurea*

1.6.2.- NOMBRE COMÚN: Equinacea



FIGURA 13.- *Echinacea purpurea*



### 1.6.3.- DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

El género es el nombre del griego *echino*, en el sentido de erizo, una alusión a la espinosa, de color marrón central del disco. Las flores de las especies de Echinacea se usan para hacer un té muy popular a base de plantas, que pretende fortalecer el sistema inmunológico; el extracto también está disponible en tabletas o líquidos en las farmacias y tiendas de alimentos saludables. A menudo es fácil su cultivo en los jardines.

Sus hojas son de color verde oscuro, ásperas, sus flores son como las margaritas con un cono central prominente, de color blanco, rosa, rojo o púrpura. El fruto se convierte en hojas pequeñas esparcidas hacia la parte superior del tallo. Las flores se producen solo encima de los tallos y se abomban, de color púrpura-marrón, de púas y centros caídos.

Florece a inicios del verano y continúan hasta las heladas otoñales. Llegan a medir hasta 0.7 m de altura (BISSER NG., 1994).

### 1.6.4.- HISTORIA

Utilizada por primera vez por los nativos americanos de las grandes planicies, la flor púrpura (es decir, la especie *E. angustifolia* y *E. purpurea*) se ha convertido en una de las hierbas medicinales más populares y suplementos botánicos en América del Norte y Europa.

Este nombre se refirió originalmente al rizoma y a las raíces desecadas de *Echinacea angustifolia* D.C., de hojas estrechas y flores cónicas purpúreas, que se han confundido a menudo con *E. pallida* (Nutt), cuya piña floral tiene un color purpúreo pálido y con *Echinacea purpurea* (L) Moench, cuya piña es color púrpura. Las tres especies son originarias de América y miembros de la familia Asteráceae. Es una especie reconocida desde hace tiempo en el Formulario Nacional de EE UU.

Históricamente, *Echinacea angustifolia* (EA), *E. pallida* (EPA) y *E. purpurea* (PE), han sido utilizados empíricamente en la fitoterapia para la cicatrización de heridas, alivio del dolor y el alivio de los síntomas de un resfriado.

Los preparados de Equinácea que se comercializan y son ampliamente utilizados en todo el mundo para proporcionar protección y tratamiento del resfriado común y otros trastornos infecciosos, pertenece a la mayor venta de drogas botánicas en los EE.UU. y Europa.



### 1.6.5.- ACCIÓN FARMACÉUTICA

La principal virtud de la Equinácea radica en sus propiedades antimicrobianas en contra de bacterias, hongos y virus que la configuran como una auténtica alternativa a los antibióticos químicos. Esta planta se considera uno de los mejores antibióticos naturales. La razón de esta propiedad se debe a su capacidad para estimular el sistema inmunitario, produciendo más glóbulos blancos. La Equinácea, el ácido caféico y el ácido chicórico son los componentes que producen esta estimulación. Igualmente se ha comprobado su poder para estimular la producción de interferón, una proteína que el propio organismo produce para neutralizar los virus.

La Equinácea estimula la inmunidad congénita del sistema inmune, dando como resultado un aumento de la fagocitosis y de la actividad de las células efectivas. Aumenta la salida, desde los macrófagos y desde los linfocitos T, del factor de necrosis tumoral (que es un polipéptido mediador de la inflamación con actividad antitumoral) y de los interferones (proteínas con actividad antiviral y antitumoral). Además, disminuye la diseminación de los agentes infecciosos por el organismo al inhibir la hialuronidasa tisular. Todas estas acciones contribuyen al aumento de la resistencia del organismo frente a las infecciones bacterianas y virales.

Cabe mencionar que la identidad exacta de los principios responsables de estos efectos de la Equinacea todavía se está estudiando.

### 1.6.6.- PRINCIPALES COMPONENTES

A partir de las partes aéreas de *E. purpurea* se han aislado dos polisacáridos de alto peso molecular con actividad inmunoestimulante.

- Uno es el 4-0-metilglucorono-parabinoxilano, de un peso molecular de 35 KD
- El otro es un ácido ramnoarabinogalactánico con un peso molecular de 50 KD.

El principal componente activo del jugo obtenido por presión de las flores *E. purpurea* es un arabinogalactano ácido de un peso molecular de 75 KD que también se puede producir a gran escala con cultivos celulares de la planta. Este polisacárido últimamente citado aumenta la fagocitosis y la liberación de interferón y de factor de necrosis tumoral.

Las actividades inmunoestimulantes de los polisacáridos solo se han demostrado in vitro o tras su administración parenteral.

Recientes estudios de laboratorio indican que los extractos etílicos de Equinácea son ricos en alcaloides que inhibe la producción de mediadores inflamatorios (VUKOVIC L., 2005).

### 1.6.7.-USOS MÁS COMUNES

- **Acción inmunoestimulante:** si nuestro sistema inmunológico funcionara siempre al 100 % de su capacidad, existiera la posibilidad de no enfermarse nunca, pero en realidad otros factores como el frío, el agotamiento, el estrés, la mala alimentación pueden debilitarlo y esta circunstancia hará posible que ciertas bacterias y virus se desarrollen y proliferen en nuestro organismo causando la enfermedad. La Equinácea posee la capacidad de reforzar todo el sistema inmunológico. La importancia de este fortalecimiento radica en una mayor resistencia a todos los agentes externos que nos agredan como: virus, bacterias, sustancias tóxicas y diferentes bacilos. Cuando las bacterias invaden nuestro organismo, las células encargadas de la defensa, los macrófagos, se activan para devorar y destruir dichas bacterias.
- **Acción antiséptica y antiinflamatoria:** aumenta la resistencia a la piel contra el ataque de bacterias, virus y hongos gracias a la inhibición de una enzima llamada hialuronidasa. La acción antiinflamatoria de la Equinácea viene referida desde 1950, donde se ponen de manifiesto sus excelentes resultados en la cura de pacientes afectados de artritis crónica. En 1957 se demuestra que el extracto de Equinácea reduce aproximadamente un 22 % la inflamación articular, comparable al efecto de la cortisona, como se sabe la cortisona tiene varios efectos colaterales entre ellos debilita el sistema inmunitario. No provoca, como otros antiinflamatorios, acidez estomacal.



Figura 14.- Usos de *Echinacea purpúrea*

- **Acción cicatrizante:** la Equinácea favorece la proliferación de fibroblastos (células de la piel que contribuyen a su rápida cicatrización). Ayudan a restaurar los márgenes de la herida abierta. Protección del colágeno a la acción de los radicales libres y del oxígeno, actuando

como un potente antioxidante. La combinación de las dos *Echinacea purpurea* y *angustifolia*, presentan además una acción sinérgica muy eficaz en el tratamiento por vía externa de úlceras, forúnculos, infecciones cutáneas y sabañones, reconstituyendo el tejido lesionado. Diferentes verificaciones a nivel experimental han confirmado que el consumo de la Equinácea impide la propagación de diversos tipos de infección, como por ejemplo, resfriados, gripes e infecciones a nivel cutáneo. Contribuye al control del *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

- **Acción antitumoral:** la Equinácea contiene principios activos (arabinolactano) que estimulan los macrófagos produciendo moléculas esenciales que estimulan otras células inmunitarias para la destrucción de células antitumorales.
- La comisión alemana autorizo el uso de los extractos alcohólicos de la raíz de la planta para colaborar al tratamiento de infecciones de tipo gripal y el jugo obtenido al dar presión de las partes aéreas de la planta para el tratamiento de infecciones recurrentes respiratorias del tracto superior y del urinario inferior.
- El valor de la Equinácea para tratar otras afecciones, por levaduras, radiaciones, artritis reumatoide, cáncer, etc., es muy notorio pero sigue sin verificarse.



FIGURA 15.- Acciones de *Echinacea purpurea*

#### 1.6.8.- DOSIS

Depende de la potencia de la muestra a su preparación.

El fabricante recomienda (hidroalcohólico) quince a treinta gotas (0.75 a 1.5 ml) dos a cinco veces por día, pero no más de 8 semanas (NARIMANIAN MB., 2005).

### 1.6.9.- CONTRAINDICACIONES E INTERACCIONES

Debido a su capacidad estimulante de los procesos autoinmunes, la Equinácea no debe emplearse en las personas que padezcan enfermedades sistémicas graves como tuberculosis, leucemia, enfermedades del colágeno, esclerosis en placas y otras similares. La Comisión E recomienda que ni interna ni externamente se use durante un periodo de tiempo que exceda de ocho semanas. En ocasiones poco frecuentes pueden presentarse reacciones alérgicas especialmente en las personas sensibles a los alérgenos del girasol (familia Asteraceae).

- La Equinácea suele dar una sensación de leve picor en la lengua, se trata de un efecto del todo normal, no perjudicial ni nocivo para el organismo, en toda la literatura científica no existe ninguna referencia de intoxicación por el consumo de Equinácea.
- A excepción de personas en estado de gravidez o lactancia, la Equinácea es extremadamente segura en dosis terapéuticamente recomendadas. Personas que presentan cuadros alérgicos provocados por la familia de las Asteracea (margaritas, girasoles, etc.) deben vigilar el uso de esta planta.

Existen personas que por decenios la han utilizado sin percibir ningún efecto adverso.

### 1.7.- CANCERINA

1.7.1.- NOMBRE CIENTÍFICO: *Hemiangium excelsum* (*sin. Hippocratea excelsa*)

1.7.2.- NOMBRE COMÚN: Cancerina



FIGURA 16.- Cancerina



### 1.7.3.- DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Arbusto o bejuco leñoso delgado más o menos erecto y hojas con consistencia de cuero, que crece sobre los arbustos o árboles pequeños de 10 cm de diámetro. Crece en lugares secos o húmedos, con frecuencia se le encuentra en sitios pedregosos, en donde forma parte del bosque tropical caducifolio. Puede alcanzar una altura de hasta 17 m y su tallo puede medir 10 cm de diámetro con ramas pecioladas. Su corteza es de color café rojizo, sus hojas pueden medir de 6 a 12 cm, son oblongoelípticas, pecioladas, redondeadas en el ápice. Sus inflorescencias miden de 1.5 a 6 cm de largo. Sus flores son blancas de sépalos abobado-dentados y se encuentran en racimos poco floreados. Sus frutos son elípticos capsulares de unos 6 cm.

Su fecha de floración es en el mes de noviembre.

### 1.7.4.- ACCIÓN FARMACÉUTICA Y USO TERAPÉUTICO

Se emplea para curar la diarrea y el vómito en los niños. En algunas comunidades se utiliza para matar piojos y otros ectoparásitos del hombre. También se utiliza la corteza machacada para problemas de la piel. En el estado de Morelos se utiliza para problema de úlceras gástricas, problemas del riñón y golpes.

Se ha comprobado que ayuda a desinflamar además evita la formación de moretones, lo que explica en parte su uso popular en caso de golpes y heridas. También se confirma que protege la pared del estómago. Con actividad anticancerígena en carcinoma epidermoide humano.

### 1.7.5.- PRINCIPALES COMPONENTES

- **Compuestos triterpenoides:** Canofilol, canofilal, ácido canofílico, friedelina, celastrol, excelsina, pristimerina, tingenona.
- **Alcaloides:** Hipocrateína I y II, emarginatina A, mayteína, hipocrateína III.
- **Esteroles:** Principalmente sitosterol.

### 1.7.6.- DOSIS Y USOS

Se hierve en un litro de agua, 5 gramos de raíz de *Cancerina* para curar por completo los flujos vaginales, la úlcera y los riñones inflamados. Además, si se tiene alguna herida o golpe, se puede hervir un trozo pequeño de raíz en medio litro de agua y se bebe por tres veces al día (NAVARRETE A., 2002).

Al tener alguna herida y facilitar la cicatrización, se hierven dos trozos pequeños en tres litros de agua, se bebe como agua de uso.

La gastritis o cualquier infección pueden atenderse hirviendo un puñito de corteza de Cancerina en litro y medio de agua y se bebe como agua de uso.

Las inflamaciones se alivian hirviendo un pedazo grande de raíz; el cocimiento obtenido se bebe como agua de uso y en lavados.

También se puede preparar la cocción usando un puñito de corteza de Cancerina y un litro de agua, se bebe como agua de uso para curar las llagas crónicas y el flujo blanco en la mujer. Además, se puede emplear en lavados contra los golpes y las apostemas.

Problemas en la vagina o flujos: Se utiliza la raíz de Cancerina y el Coscotomate (*Physalis coxtomatl*), la corteza del Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*), ramas de la hierba del cáncer (*Castilleja arvensis*), el tallo de la Tlatlancuaya (*Iresine calea*). Se hierven dos cucharadas del compuesto en un litro de agua. Para aseo vaginal es una toma.

**1.7.7.- CONTRAINDICACIONES:** No se conocen



FIGURA 17.- Corteza de Cancerina



## 1.8.- JUSTIFICACIÓN

El término médico para una infección vaginal es "vaginitis o vulvovaginitis" y ésta sucede cuando el ecosistema de la vagina se ve alterado por diferentes causas, como el uso de antibióticos, hormonas, preparaciones orales o tópicas, duchas vaginales, medicamentos vaginales, enfermedades de transmisión sexual, cambios de pareja y situaciones de estrés.

Las infecciones genitales en la mujer constituyen una de las principales causas de consulta ginecológica en nuestro país. La mayoría de las mujeres han tenido una infección vaginal por lo menos una vez en su vida interviniendo de manera económica, social y laboral, afectando a todas las edades, tanto a las que están activas sexualmente como a las que no lo están.

Por tal razón es importante implementar nuevos tratamientos valiéndonos de la extensa riqueza natural de nuestro país y que se han venido utilizando desde tiempo atrás, por ejemplo plantas como *Calendula officinalis*, *Hippocratea excelsa* y *Echinacea purpurea* que hoy representan una nueva alternativa para el desarrollo de fármacos más efectivos debido a sus múltiples acciones farmacológicas.

En el presente trabajo nos dedicamos a evaluar los extractos de estas tres plantas en nueve de las principales bacterias causantes de infecciones cervico-vaginales en humanos y así ofrecer un tratamiento alternativo para este padecimiento.



## 2.- HIPÓTESIS

“Si la forma farmacéutica (óvulo) elaborada a base de los extractos vegetales de *Calendula officinalis*, *Echinacea purpurea* e *Hippocratea excelsa* presentan una actividad antibacterial “in vitro” contra las bacterias a estudiar (*Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa*) entonces tendremos un tratamiento alternativo y eficaz en infecciones cervico-vaginales”

## 3.- OBJETIVOS

### 3.1.-GENERAL:

- Elaboración de una forma farmacéutica (óvulo) a base del extracto de *Calendula officinalis*, *Echinacea purpurea* e *Hippocratea excelsa* para el tratamiento de infecciones cérvico-vaginales humanas.



### 3.2.-PARTICULARES:

- Preparación de tres extractos etanolicos al 70 % de *Calendula officinalis*, *Echinacea purpurea* e *Hippocratea excelsa*.
- Elaboración de la forma farmacéutica en base a los extractos anteriormente mencionados con una concentración de 150 mg.
- Realizar prueba de esterilidad y solubilidad al lote de óvulos.
- Determinación de la actividad antibacterial de los óvulos por medio del método colorimétrico de Mosmann.
- Determinación de la actividad bactericida y/o bacteriostática de la forma farmacéutica en *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa*.



#### 4.-MATERIAL Y MÉTODOS

##### 4.1.- MATERIAL

- 3 Frascos vial de 5 L
- 6 Viales de 60 ml de capacidad
- 1 Barras magnética
- 3 Vial de 20 ml capacidad
- Embudo de filtración de plástico
- Papel filtro Wathman poro mediano
- 3 Matraz Erlenmeyer de 1 L marca (PYREX)
- 4 Matraz aforado de 25 ml (PYREX)
- 2 Matraz Erlenmeyer de 250 ml (PYREX)
- 17 Tubos de ensaye grandes
- Cristalizador (PYREX)
- 1 Vaso de precipitado de 100 ml
- 3 Vasos de precipitado de 250 ml (PYREX)
- 1 Vaso de precipitado 1L
- 4 Vasos de precipitado de 50 ml (PYREX)
- Probeta de 250 ml marca (PYREX)
- Molde para óvulos marca Erweka Modelo 139-07
- Vidrio de reloj (KIMAX)
- Papel aluminio
- 2 Membranas de filtración Millipore de 0.4  $\mu\text{m}$
- 60 Tubos de ensaye (KIMAX)
- 4 Tubos de ensaye
- Mechero Bunsen
- Asa bacteriológica
- 3 Gradillas
- Algodón
- Gasa
- Papel periódico
- Pipeta graduada de 10 ml (KIMAX)
- 2 Espátulas
- 3 Pipetas volumétricas de 2 ml (KIMAX)

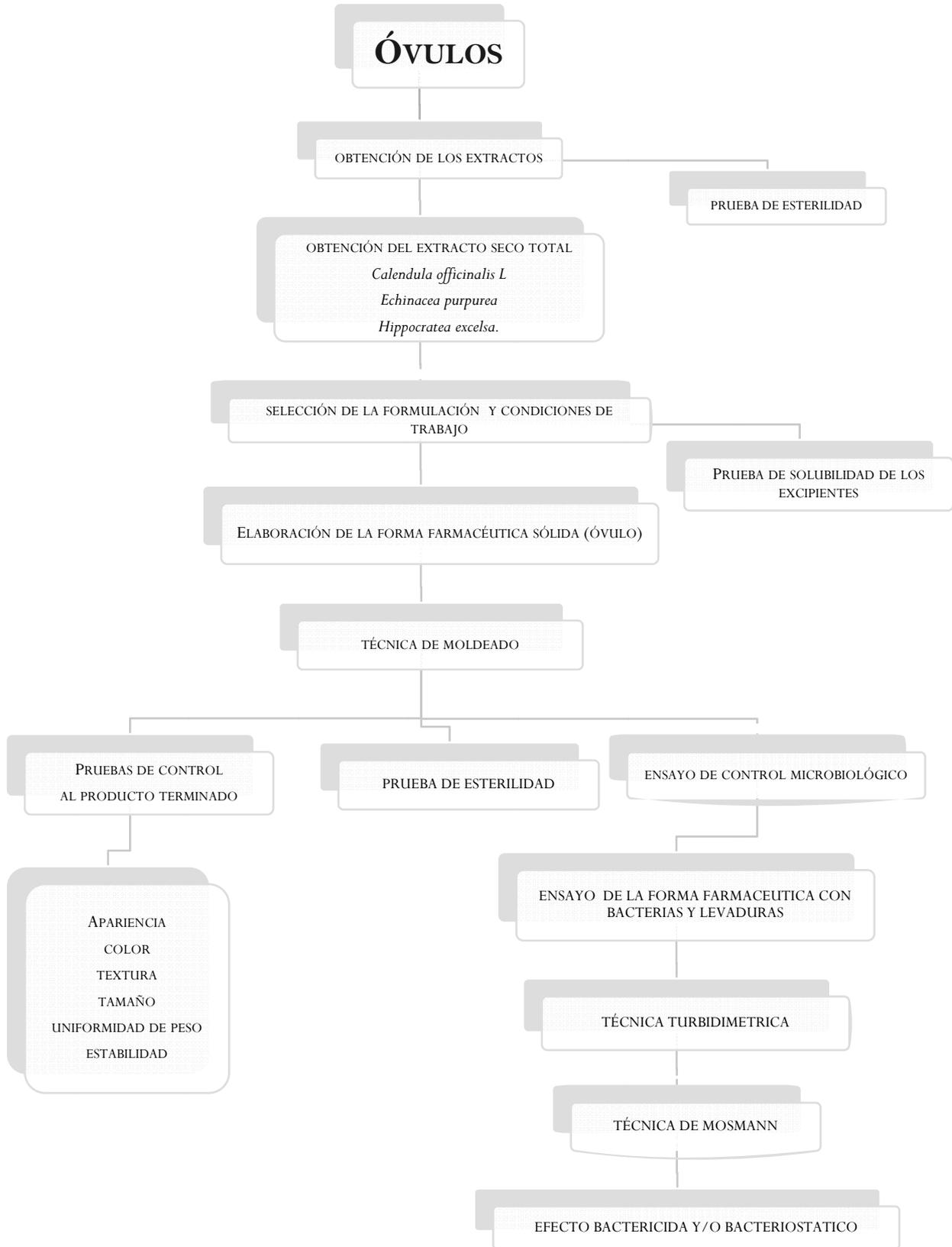
##### 4.2.-REACTIVOS

- Glicerina QP
- Gelatina grado USP
- Caldo de cultivo Mueller-Hilton BIOXON
- Aceite mineral

##### 4.3.-EQUIPO

- Campana de flujo laminar
- Autoclave (ALL AMERICAN Modelo 1925X)
- Horno Pasteur Ríos S.A. Modelo HS-41
- Estufa Bacteriológica Ríos Rocha S.A.
- Balanza analítica (ADVENTURE PRO)
- Microscopio óptico (OLYMPUS Modelo CHS)
- Parrilla con agitador (NUOVA II Stir Plate)

#### 4.4.-PLAN DE TRABAJO



"Elaboración de una forma farmacéutica (ovulo) a base del extracto de *Caléndula officinalis*, *Echinacea purpúrea* e *Hippocratea excelsa* para el tratamiento de infecciones cervico vaginales humanas".



#### 4.5.-METODOLOGÍA

##### 4.5.1.-PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS

1. Adquisición de las plantas *Calendula officinalis*, *Echinacea purpurea* e *Hippocratea excelsa* con el proveedor Leonel Flores Ríos en el mercado de Sonora.
2. Pesar 10 g de cada planta por cada litro de alcohol etílico, al 70 %.
3. Preparar un volumen de cada extracto igual a 5 L.
4. Colocar la mezcla en frasco vial color ámbar.
5. Agitar tres veces por día la mezcla, durante dos días.
6. Filtrar utilizando papel filtro Whatman.
7. El extracto etanólico obtenido se esteriliza por filtración empleando una membrana Millipore de 0.45 y 0.22  $\mu\text{m}$  con un filtro bala y una bomba de vacío en la campana de flujo laminar.
8. Guardar los extractos en frascos color ámbar estéril.

##### 4.5.2.-PRUEBA DE ESTERILIDAD DEL EXTRACTO ETANÓLICO.

1. Preparar medio BHI en forma de caldo para la prueba de esterilidad.
2. Utilizando un hisopo estéril, introducirlo en el extracto etanólico para que se humedezca.
3. Realizar un sembrado masivo en el agar BHI.
4. Incubar en la estufa bacteriológica a 37 °C por 24-48 hrs.
5. Revisar las cajas con el agar BHI a las 24 hrs y a las 48 hrs.
6. En caso de presentar un agente contaminante se procede a esterilizar por filtración.

##### 4.5.3.-OBTENCIÓN DEL EXTRACTO SECO

1. Esterilizar el cristalizador
2. Empleando la campana de flujo laminar realizar el vaciado del extracto en el cristalizador.
3. Colocar el cristalizador en el horno Pasteur a una temperatura no mayor de 45 °C. hasta la sequedad del extracto.
4. Esterilizar el área de trabajo y prender un mechero.
5. Seco el extracto, con una espátula estéril, realizar el raspado del cristalizador, en condiciones de esterilidad, usando guantes, cubrebocas y cofia.
6. Obtener el extracto seco y guardar en un frasco vial ámbar estéril.
7. Rotular los tres frascos.



#### 4.5.4.-ELABORACIÓN DEL LOTE DE ÓVULOS A BASE DE GLICERO-GELATINA

Los óvulos de glicero-gelatina se preparan de acuerdo con la formulación siguiente:

- Glicerina ..... 60 %
- Gelatina..... 10 %
- Agua destilada..... 30 %
- *Calendula officinalis* ..... 50 mg
- *Echinacea purpurea*..... 50 mg
- *Hippocratea excelsa*..... 50 mg
- cbp ..... ovulo

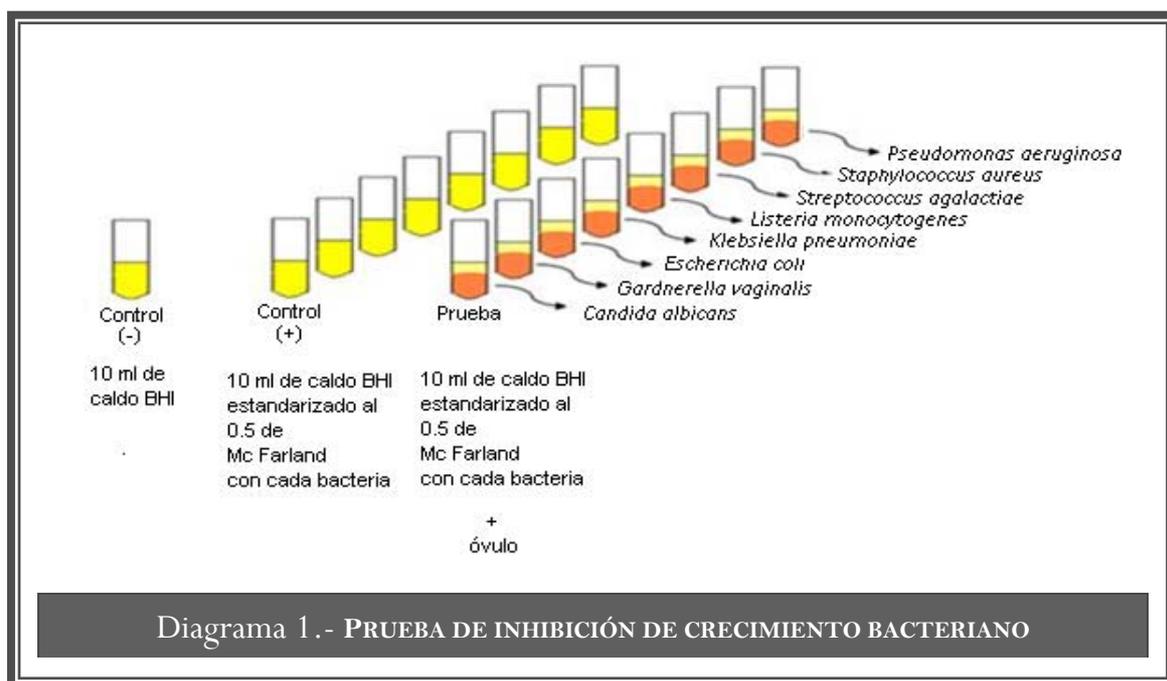
1. Se preparan dos lotes de 50 óvulos cada uno.
2. Mezclar glicero-gelatina-agua equivalente a 730 g de mezcla, en una proporción (60:10:30).
3. Mezclar en su totalidad la gelatina con la mitad de volumen de glicerina y el agua.
4. Agitar hasta disolución de la gelatina.
5. Esterilizar la mezcla anterior a 10 lb/ 10 min en la autoclave y la glicerina sobrante.
6. En la campana de flujo laminar, agregar a la mezcla del extracto seco de *Calendula officinalis*, *Echinacea purpurea*, *Hippocratea excelsa* y añadir el sobrante de glicerina.
7. Calentando y agitando suavemente para evitar la formación de burbujas, hasta la disolución.
8. Preparada la mezcla realizar el vaciado en el molde para óvulos previamente esterilizado, lubricado con aceite mineral y esperar la gelificación.
9. Extraer cuidadosamente la masa ovular empleando espátula y pinzas estériles.
10. Colocar cada óvulo en papel aluminio estéril y envolver.
11. Depositar 10 óvulos envueltos en un frasco estéril y guardar el frasco en refrigeración.

#### 4.5.5.-PRUEBAS DE ESTERILIDAD AL LOTE DE ÓVULOS.

1. Preparar Caldo BHI.
2. En 7 tubos grandes a cada uno añadirle 10 ml.
3. Esterilizarlos a 121 °C/ 15 lb.
4. Utilizar 3 tubos para el primer lote y 3 para el segundo lote
5. Emplear un tubo como control negativo.
6. Colocarles 1 óvulo a cada tubo
7. Incubar a 37 °C en la estufa bacteriológica por 24 hrs.
8. Revisar los tubos.

#### 4.5.6.-PRUEBA DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO BACTERIANO (DIAGRAMA 1).

1. Sembrar las siguientes bacterias en una placa de agar BHI e incubar en estufa bacteriológica a 37 °C durante 24 hrs.
  - *Candida albicans*
  - *Gardnerella vaginalis*
  - *Escherichia coli*
  - *Klebsiella pneumoniae*
  - *Listeria monocytogenes*
  - *Streptococcus agalactiae*
  - *Staphylococcus aureus*
  - *Staphylococcus epidermidis*
  - *Pseudomonas aeruginosa*
2. Preparar 200 ml de caldo BHI, distribuir en 20 tubos de ensaye aproximadamente 10 ml en cada tubo y esterilizar en autoclave a 15 lb de presión, 121 °C durante 15 minutos.
3. Usar un tubo como control negativo de crecimiento bacteriano.
4. Usar un segundo tubo como control positivo de crecimiento bacteriano para *Candida albicans*, tomar la placa de agar con *Candida albicans* con crecimiento de 24 hrs e inocular el tubo con caldo BHI estéril, estandarizar a 0.5 con el nefelómetro de Mc Farland y mezclar bien con un agitador vortex.
5. Repetir el paso anterior con cada una de las bacterias mencionadas en el paso uno.
6. A un tercer tubo, inocular repitiendo el paso 4 y 5, y añadir a cada uno un óvulo.
7. Incubar a 37 °C por 24 hrs.
8. Realizar una lectura visual, para analizar la turbidez o nitidez de cada tubo.





**4.5.7.- ENSAYO EN MICROPLACA (DIAGRAMA 2)**

1. Esterilizar en autoclave a 15 lb. de presión, 121 °C durante 15 minutos puntas para micropipeta de 100 µl.
2. Se requiere tener una microplaca con fondo plano de 96 pozos estéril, micropipeta de 100 µl, tubo 0.5 Mc Farland, y un agitador vortex.
3. Desinfectar la superficie de trabajo con benzal, mantener condiciones de esterilidad con 2 mecheros fischer, utilizar guantes estériles y cubrebocas.
4. Colocar en los pozos de la columna 1 y 10 de cada fila, con la micropipeta y puntas estériles, 100 µl del tubo control negativo.
5. Colocar en el pozo de la columna 2 y 11 de la fila A 100 µl del tubo control positivo de crecimiento de *Candida albicans*.
6. Repetir el paso anterior con los tubos de control positivo de cada bacteria.
7. Colocar en el pozo de la columna 3 y 12 de cada fila, 100 µl del tubo 3 (prueba) de cada bacteria.
8. Ya preparada la microplaca se adiciona a todos los pozos 0.5 µl del reactivo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol (MTT) para realizar la lectura colorimétrica.
9. Observar la coloración morada para registrar un resultado positivo.

	1 Control (-)	2 Control (+)	3 Prueba	4	5	6	7	8	9	10 Control (-)	11 Control (+)	12 Prueba						
A	100 µl de caldo BHI	100 µl de caldo BHI al 0.5 Mc Farland de cada bacteria	100 µl de caldo BHI al 0.5 Mc Farland de cada bacteria							100 µl de caldo BHI	100 µl de caldo BHI al 0.5 Mc Farland de cada bacteria	100 µl de caldo BHI al 0.5 Mc Farland de cada bacteria						
B																		
C																		
D																		
E																		
F				+													+	
G				Óvulo														Óvulo
H																		

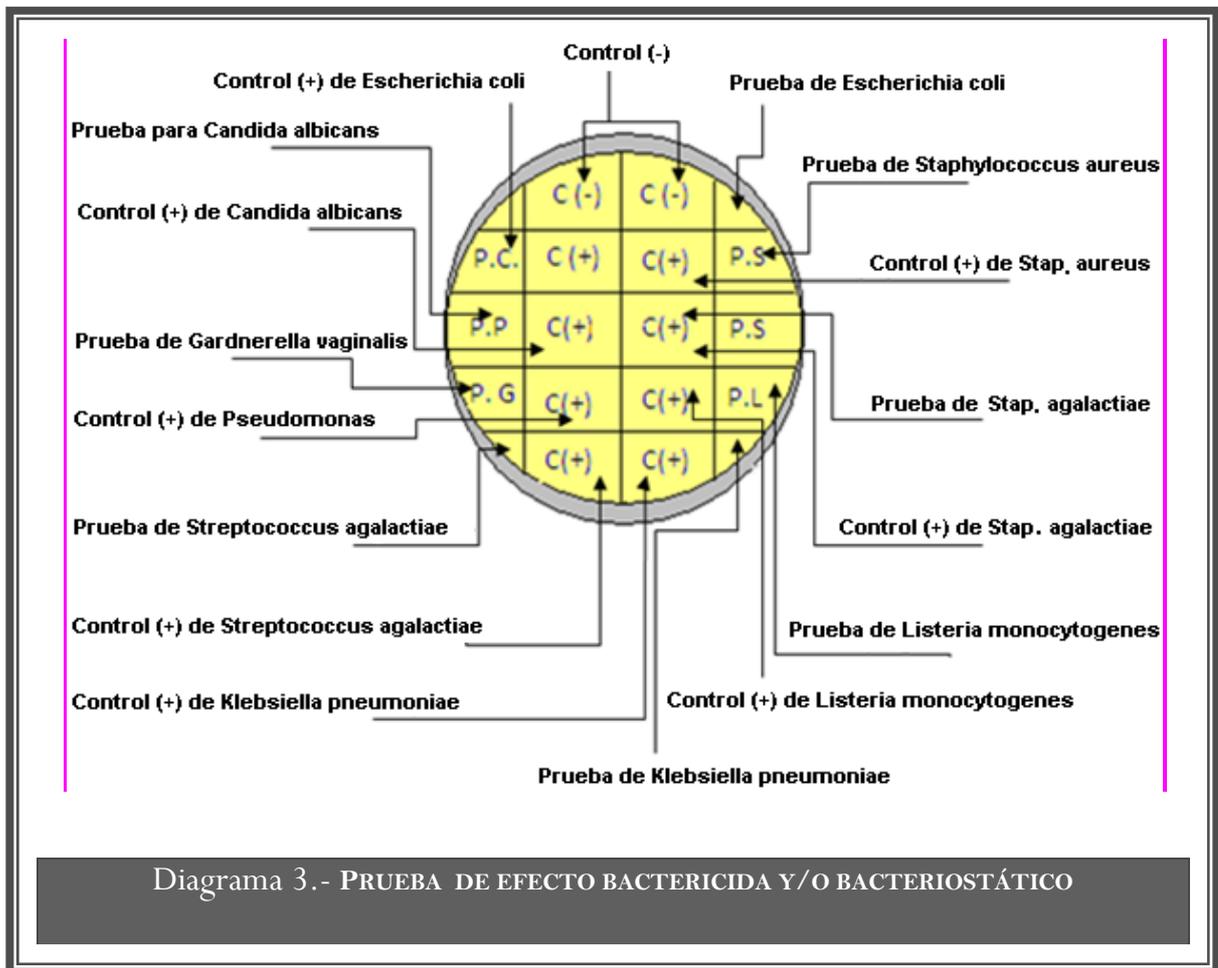
Diagrama 2.- ENSAYO EN MICROPLACA

"Elaboración de una forma farmacéutica (ovulo) a base del extracto de Caléndula officinalis, Echinacea purpúrea e Hippocratea excelsa para el tratamiento de infecciones cervico vaginales humanas".

"Elaboración de una forma farmacéutica (ovulo) a base del extracto de Caléndula officinalis, Echinacea purpúrea e Hippocratea excelsa para el tratamiento de infecciones cervico vaginales humanas". |

**4.5.8.-PRUEBA DE EFECTO BACTERICIDA Y/O BACTERIOSTÁTICO (DIAGRAMA 3)**

1. Tomar una asada de cada tubo que contiene óvulo y sembrarlo en agar BHI.
2. Tomar una asada del tubo control negativo y positivo y sembrarlo en agar BHI.
3. Incubar 24 hrs a 37 °C en estufa bacteriológica
4. Observar la placa verificando que el control negativo no presente crecimiento.
5. Verificar que el control positivo presente crecimiento.
6. Si existe crecimiento en donde se sembró la muestra problema se determina que el efecto es bacteriostático y si no existe crecimiento el efecto es bactericida.





#### 4.5.9.-PRUEBAS DE CONTROL AL PRODUCTO TERMINADO

- a) Apariencia (incluyendo consistencia)
- b) Color
- c) Textura
- d) Tamaño
- e) Uniformidad de peso
  1. Tomar una muestra aleatoria de 10 óvulos
  2. Pesar individualmente cada óvulo y registrarlo
  3. Registrar y promediar el peso de la muestra.
- f) Estabilidad a corto plazo (6 meses)
  - a) Estabilidad física
    - a)Aspecto
    - b)Color
    - c)Textura
    - d)Tamaño
  - b) Estabilidad microbiológica
    - 1.- Sembrar las siguientes bacterias en una placa de agar BHI e incubar en estufa bacteriológica a 37 °C durante 24 hrs.
      - a) *Escherichia coli*
      - b) *Gardnerella vaginalis*
    - 2.- Preparar 50 ml de caldo BHI y distribuir en 5 tubos de ensaye aproximadamente 10 ml en cada tubo y esterilizar en autoclave a 15 lb de presión, 121 °C durante 15 minutos.
    - 3.- Usar un tubo como control negativo de crecimiento bacteriano.
    - 4.- Usar un segundo tubo como control positivo de crecimiento bacteriano para *Escherichia coli*, tomar la placa de agar con *Escherichia coli* con crecimiento de 24 hrs e inocular el tubo con caldo BHI estéril, estandarizar a 0.5 con el nefelómetro de Mc Farland y mezclar bien con un agitador vortex.
    - 5.- Repetir el paso anterior con *Gardnerella vaginalis*.
    - 6.- A un tercer tubo, inocular repitiendo el paso 4 y 5, y añadir a cada uno un óvulo.
    - 7.- Incubar a 37 °C por 24 hrs.
    - 8.- Realizar una lectura visual, para analizar la turbidez o nitidez de cada tubo.

"Elaboración de una forma farmacéutica (ovulo) a base del extracto de *Caléndula officinalis*, *Echinacea purpúrea* e *Hippocratea excelsa* para el tratamiento de infecciones cervico vaginales humanas". |

## 5.-RESULTADOS

### 5.1.-AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS

Se obtuvieron 9 cepas, a estas se les realizaron diversas pruebas bioquímicas primarias y secundarias para su caracterización (ver apéndice 9.2), obteniendo una cepa de *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa*, con un porcentaje de levaduras del 11.11%, bacterias gram-positivas de 44.44% y de gram-negativas 44.44%. (Ver grafico 1).

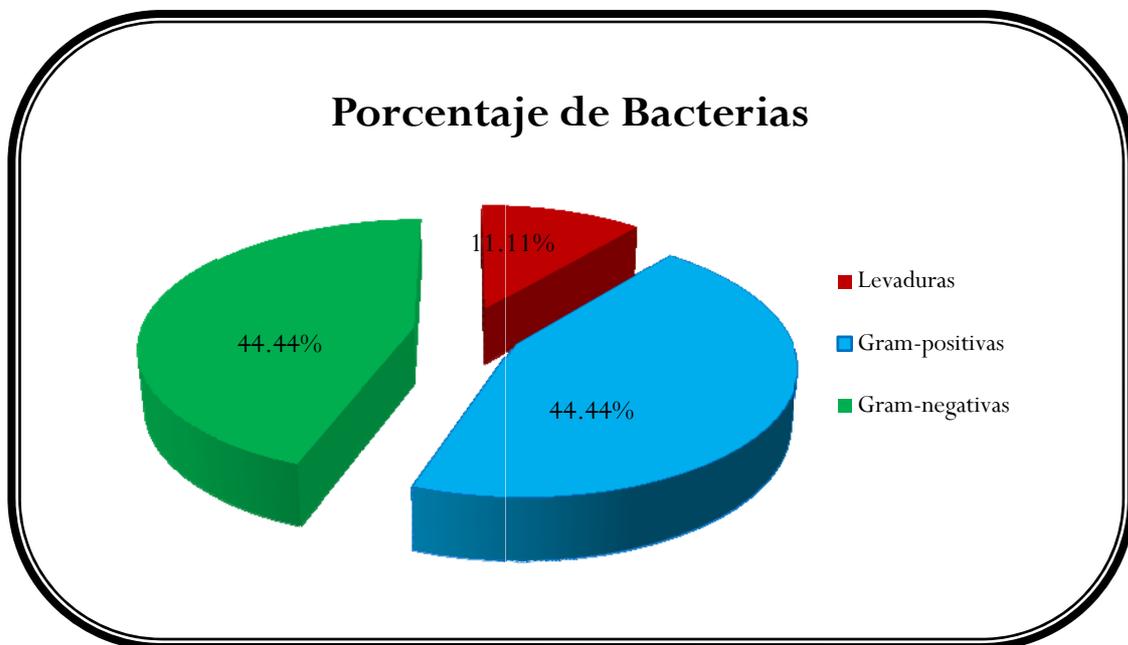


GRAFICO 1.- Porcentaje de bacterias

### 5.2.-OBTENCIÓN Y ESTERILIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS

Se trabajo con tres extractos etanólico esterilizándolos por el método de filtración con membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ , confirmando esta prueba en medio BHI, obteniendo resultados positivos ya que no hubo crecimiento bacteriano, con un rendimiento de 2.9 g/l de *Calendula officinalis* L, 0.8 g/l de *Echinacea purpurea* y 2.9 g/l de *Hippocratea excelsa*.

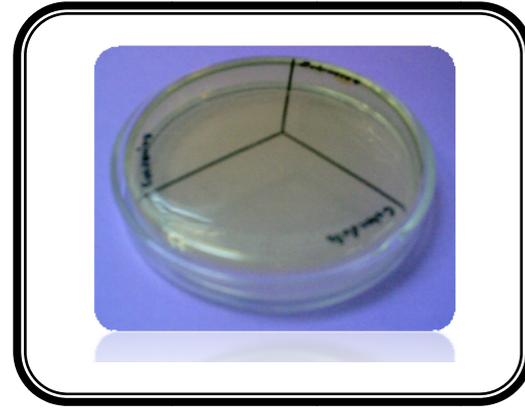


Figura 18.- Obtención y esterilización del extracto seco total

Los extractos secos obtenidos de las tres plantas se empleó para la elaboración de la forma farmacéutica (óvulo), los excipientes utilizados para el procedimiento explicado anteriormente fueron glicerina y gelatina, cabe mencionar que la disolución de los extractos en glicerina fue muy buena, logrando obtener dos lotes de óvulos de 50 formas farmacéuticas cada uno.

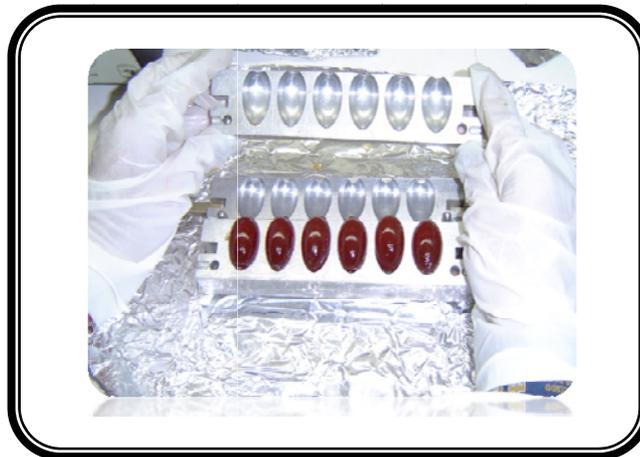


Figura 19.- Extracción de la masa ovular

### 5.3.- RESULTADOS EN LAS PRUEBAS DE CONTROL AL PRODUCTO TERMINADO

En las pruebas de control al producto terminado obtuvimos:

- a) Apariencia: en forma de gota y no se percibe la línea del molde.
- b) Color: vino
- c) Textura: semisólido cremoso y firme
- d) Tamaño: 3 cm



Figura 20.- Producto terminado

- e) Uniformidad de peso

MUESTRA	LOTE 1 (g)	LOTE 2 (g)
1	5.7533	5.7518
2	5.7504	5.7204
3	5.7452	5.7531
4	5.7369	5.6173
5	5.7912	5.8370
6	5.7316	5.7155
7	5.7895	5.7505
8	5.7787	5.7438
9	5.7856	5.6085
10	5.6604	5.7238
Promedio	5.7523	5.7222
D.V.	0.03724134	0.06345064

#### 5.4.- RESULTADOS DEL ENSAYO DE CONTROL MICROBIOLÓGICO

En el ensayo de control microbiológico a la forma farmacéutica una de las dos pruebas realizadas es la de esterilidad utilizando 3 muestras para cada uno de los dos lotes, obteniendo resultados negativos en el crecimiento de microorganismos provenientes del material empleado o de la mezcla de los excipientes para poder asegurar que los óvulos sean inocuos. (Ver figura 21)



Figura 21.- Prueba de esterilidad

El efecto de los tres extractos contenidos en la forma farmacéutica se determinó en la segunda prueba del control microbiológico donde se analizó la inhibición de crecimiento bacteriano sobre las nueve bacterias antes mencionadas con el ensayo colorimétrico de Mosmann (MTT). Este es un reactivo de óxido reducción, su fundamento es el uso del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazolio (MTT) como indicador colorimétrico, detectando la concentración de oxígeno proveniente del metabolismo bacteriano, cuando se encuentra en estado oxidado es de color amarillo y cambia a púrpura en estado reducido lo que nos permite obtener resultados cualitativos, siendo las bacterias sensibles *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Streptococcus agalactiae*, y las bacterias resistentes *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa*. (Ver figura 22)

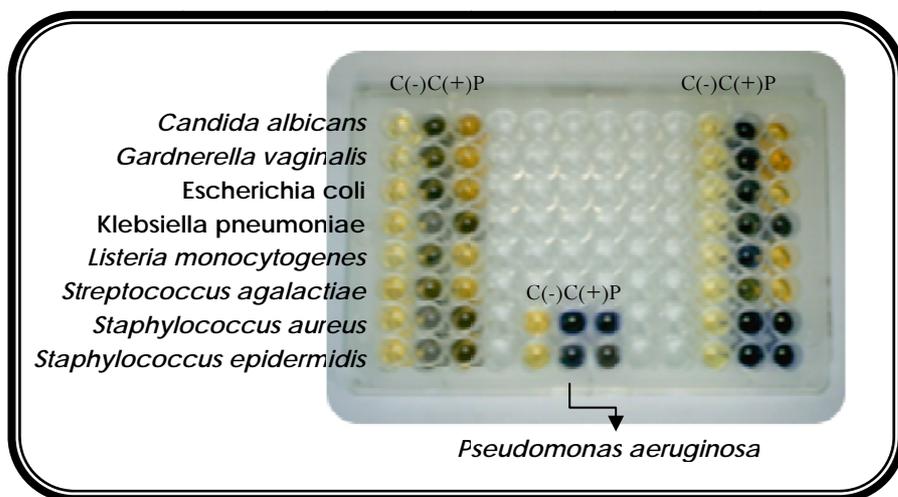


FIGURA 22.- Ensayo colorimétrico de Mosmann

"Elaboración de una forma farmacéutica (ovulo) a base del extracto de Caléndula officinalis, Echinacea purpúrea e Hippocratea excelsa para el tratamiento de infecciones cervico vaginales humanas".

Posteriormente se llevó a cabo la determinación cualitativa del efecto bactericida y/o bacteriostático de la forma farmacéutica para cada una de las nueve bacterias, encontrando que para, *Candida albicans*, *Listeria monocytogenes* y *Streptococcus agalactiae* el efecto es bacteriostático y para *Escherichia coli* y *Gardnerella vaginalis* el efecto es bactericida (Ver figura 23).

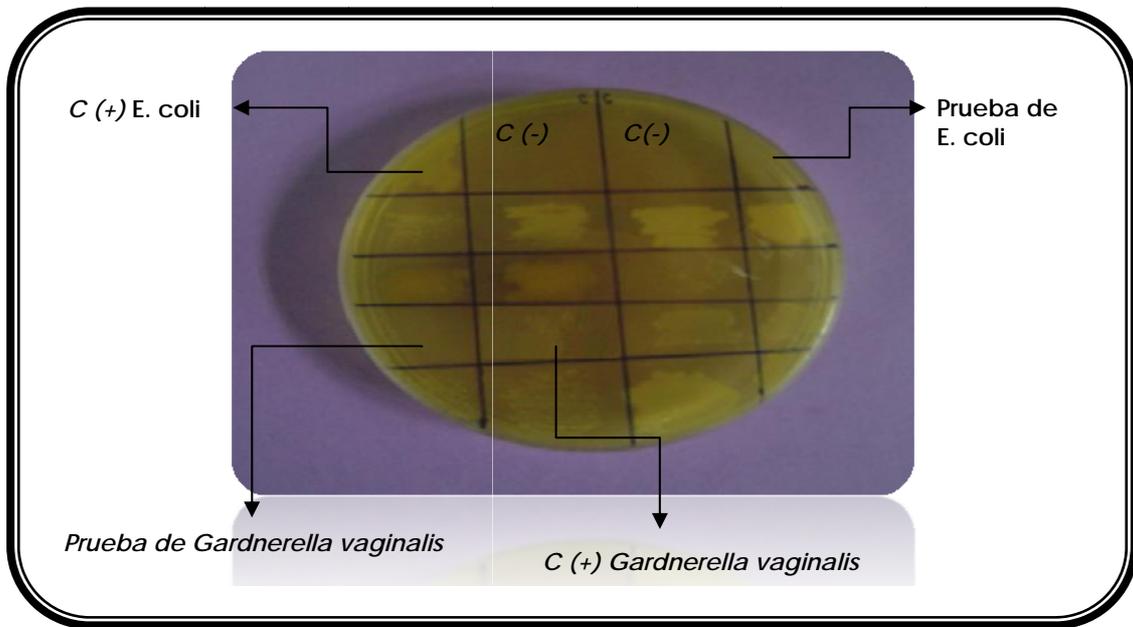


FIGURA 23.- Efecto bactericida y/o bacteriostático

### 5.5.- RESULTADOS DE ESTABILIDAD A CORTO PLAZO (6 MESES)

#### a) Estabilidad física

Su aspecto cambio debido a que adopto la forma del papel de aluminio, en el color no sufrió modificaciones así como en su textura, tamaño y peso.

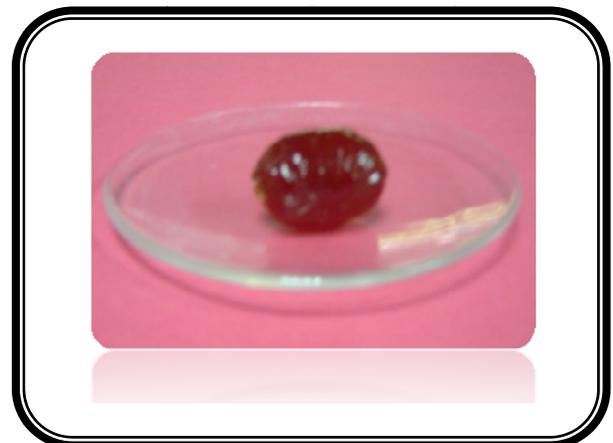


Figura 24.- Apariencia

b) Estabilidad microbiológica:

Para esta prueba utilizamos bacterias como *Escherichia coli* y *Gardnerella vaginalis* repitiendo el procedimiento de aislamiento e identificación de bacterias asegurándonos que fuesen las cepas correctas. Utilizamos la prueba de control microbiológico para analizar que la forma farmacéutica siguiera con el mismo poder de inhibición de crecimiento bacteriano después de un periodo de tiempo aproximado de seis meses, realizando una lectura visual de turbidez o nitidez. En cada uno de los seis tubos nos damos cuenta que inhibió el crecimiento de las dos bacterias al no presentar crecimiento en los tubos de prueba (Ver figura 25).

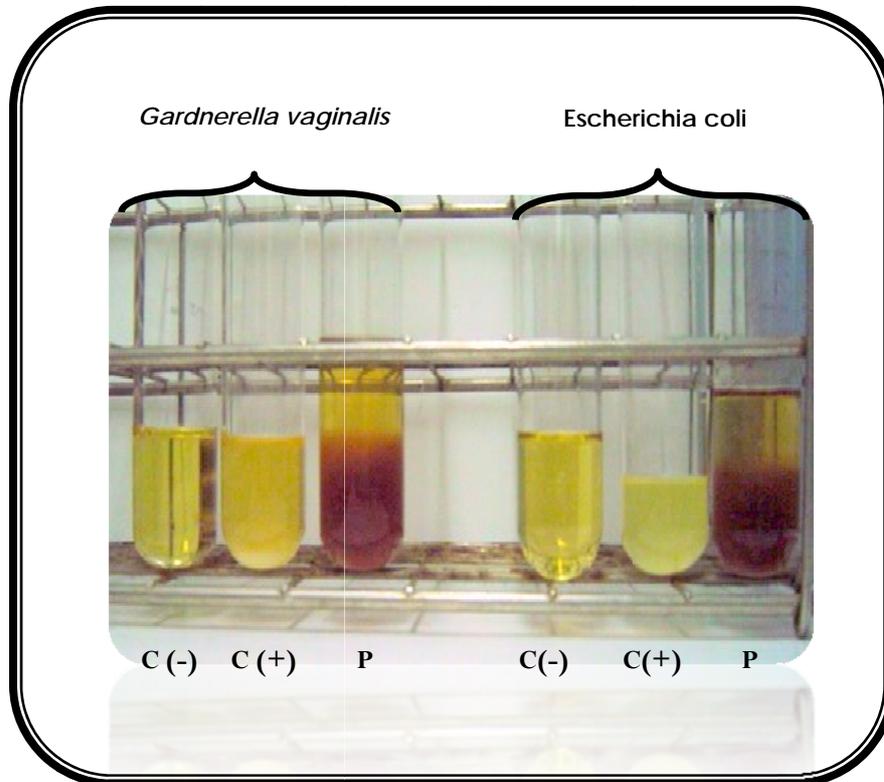


FIGURA 25.- Estabilidad microbiológica



## 6.-DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Después de muchos años de poca atención a la medicina tradicional y sus recursos naturales, el interés por esta posibilidad terapéutica de origen vegetal ha venido incrementándose, sobre todo porque ofrece una importante ventaja sobre los medicamentos alópatas, ya que estos últimos ahora se conocen como un factor primario en la evolución de gérmenes, es decir, incrementan la resistencia bacteriana volviendo así más peligrosos a estos patógenos. Sin embargo, la falta de difusión sobre la calidad, eficacia y seguridad de los fitofármacos hace difícil que los médicos especializados puedan decidir sobre los beneficios atribuidos a estos productos (VUKOVIC L., 2005).

Por las razones ya expuestas, el fitofármaco es un recurso terapéutico de gran valor especialmente para México. La Organización Mundial de la Salud señaló en el año 2006 que el 80 % de las personas que vive en los países en desarrollo utiliza la medicina tradicional herbolaria para resolver sus problemas de salud. Tomando en cuenta que el 80 % de la población mundial reside en países en desarrollo, se puede calcular que en 64 % de la población mundial hace uso de las plantas medicinales en forma no industrializada. Por ello se eligió trabajar con tres plantas medicinales que actúan sobre las principales bacterias involucradas en patologías vaginales.

La vaginitis es un síndrome clínico resultado de la sustitución de la flora vaginal normal de lactobacilos productores de peróxido de hidrógeno por altas concentraciones de bacterias anaeróbicas, que se traduce en cambios fisicoquímicos de las secreciones vaginales y en el que intervienen las características propias del hospedero, sin embargo, la mitad de las mujeres en las que se encuentran criterios clínicos de la entidad se mantienen asintomáticas (BLACWELL A., 1982. CDC., 1998). El grupo de infecciones del sistema reproductivo constituyen un problema de salud a nivel mundial, sin embargo los organismos de salud le dedican poca atención. Algunas de las explicaciones más comunes ofrecidas por estos organismos son: que no son fatales, son muy costosas y que están vinculadas al comportamiento sexual, aspecto difícil de estudiar y tratar (NASSEMBERT., 1993).

La OMS estimó que en el año 2005, una de cada dos mujeres que alcanzaron la edad reproductiva habrá tenido un episodio de enfermedad inflamatoria pélvica en su vida. Resultando un 30 % de las infecciones vaginales causadas por hongos y levaduras, la mayoría son debidas a *Candida albicans*. La vaginosis bacteriana representa el 60 % y el 10 % restante se debe a las mujeres infectadas con microorganismos comunes al sistema reproductivo (PASTORECK II J., 1994).



Existe ya en el mercado europeo un tratamiento para infecciones vaginales con *Calendula officinalis* en forma de óvulos. Ángeles Ricaño ME. (2008) expuso un trabajo en el cuarto congreso de investigación en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, en el cual realizó una forma farmacéutica como tratamiento de ectropión e infecciones vaginales con un solo extracto, *Calendula officinalis*. Nosotros trabajamos la combinación de tres extractos, *Calendula officinalis*, *Echinacea purpurea* e *Hippocratea excelsa*, lo cual resulta importante por diversas razones, entre ellas es que no todos los microorganismo son sensibles a la misma planta y/ o la más significativa para este ensayo, es la posibilidad de un efecto de sinergismo en la mezcla de los extractos contra las bacterias a estudiar.

En el presente trabajo se aislaron e identificaron 9 de las principales bacterias involucradas en infecciones vaginales: *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa* (grafico 1). Gonzales Vega E. (1997) mencionó que el microorganismo con mayor frecuencia encontrado en estas infecciones es *Candida albicans*, con una frecuencia del 75.5 % seguido por *Escherichia coli* con el 34.5 %, *Staphylococcus aureus* con el 22.4 % y *Gardnerella vaginalis* con el 17.3 %, ocasionando en la mayoría de los casos infertilidad, con menor incidencia se encuentra *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* con el 14.35 y 1.0 % respectivamente.

Los extractos empleados fueron hidroalcohólicos, preparados con etanol al 70 %. Pérez Carreón J. et al. (2002) probó que el extracto hidroalcohólico contiene saponinas, glucósidos, triterpenos, sesquiterpenos y flavonoides a diferencia de los extractos acuosos, acuoso-etanólicos, etanólicos y clorofórmicos, así también lo refiere Ángeles Ricaño M. et al. (2008) y Pérez Avendaño Y. et al. (2008). Con los estudios reportados anteriormente y al realizar esta extracción nos aseguramos de la obtención de las sustancias químicas que le confieren la actividad biológica a cada una las tres plantas utilizadas, por ejemplo, a *Calendula officinalis* se le conocen alrededor de 35 propiedades, entre ellas la actividad antiinflamatoria, analgésica, antitumoral, antiulcerosa, bactericida, diurética (BARAJAS L., et al. 2006), antiviral (WAIZEL B., 2006), citotóxica (CRUZ G. et al. 2006), reacción tuberculosa, estreptocócica y sifilítica (MARTÍNEZ M., 1997). *Hippocratea excelsa* mostró tener propiedades antiinflamatorias, bactericidas, antiulcerosas y antisépticas (WAIZEL B., 2006), y por último, *Echinacea purpurea* mejora la actividad inmunológica, bactericida y antiviral (VUKOVIC L., 2005).

Una vez obtenidos los extractos hidroalcohólicos se filtró con papel Whatman por decantación para retirar el material insoluble y eliminar sólidos de tamaño considerable, así mismo se esterilizó por filtración con membrana de celulosa de 0.22  $\mu\text{m}$ , después se realizó la prueba de esterilidad en medios



BHI obteniendo resultados negativos de crecimiento posteriores a la incubación de 24 y 48 horas, lo que indica que la esterilización fue adecuada ya que estos extractos son sensibles a altas temperaturas. Una vez esterilizados los extractos, se evaporan a sequedad en horno a una temperatura constante de 54-56 °C, siendo este un procedimiento sencillo con la finalidad de evaporar el alcohol con la finalidad de evitar falsos positivos. Para la recolección de la materia seca se presentó dificultad en el caso de *Echinacea purpurea* ya que su consistencia pegajosa hace difícil su manejo a diferencia de *Calendula officinalis* e *Hippocratea excelsa* que fue fácil su recolección, peso e incorporación a la formulación. Se obtuvo un rendimiento de 2.9 g/l de *Calendula officinalis*, 0.8 g/l de *Echinacea purpurea* y 2.9 g/l de *Hippocratea excelsa*.

Una vez pesada la materia seca de cada uno de los extractos, se disolvieron en la mezcla de glicerina y gelatina a baño maría a 45°C con agitación constante, obteniendo una concentración de 150 mg/ml de extracto, existiendo una fácil incorporación y excelente disolución en el caso de *Calendula officinalis* e *Hippocratea excelsa* pero un poco difícil con *Echinacea purpurea*. Preparada la mezcla tuvo un vaciado fácil lo que está influenciado por la temperatura a la cual se mantuvo la mezcla (45° C). No se emplearon blíster debido al costo. Las ventajas al utilizar blíster son las siguientes: se pueden hacer diferentes formas a un costo muy reducido, disminuye el tiempo de proceso y empaque y no es necesario mantenerlos en refrigeración, además brindan mayor estabilidad en los climas tropicales ya que si la masa se llegara a fundir debido al almacenaje en altas temperaturas, el molde aún retiene la misma forma, por lo que aun después de enfriarse, puede ser usado sin que haya ninguna distorsión (DÍAZ JJ. et al. 2003).

Una vez obtenida la masa ovular se le realizaron dos diferentes pruebas para su evaluación, la primera fue físicamente al producto terminado y la segunda es un ensayo de control microbiológico.

Con respecto a la prueba de control al producto terminado se evaluó apariencia, color, uniformidad de peso y estabilidad. Teniendo en cuenta estos aspectos se obtuvo una forma farmacéutica ovoide, donde no hubo formación de burbujas y tampoco se percibió la línea de moldeado, el color de los óvulos fue vino de manera uniforme, de textura suave sin problemas de recristalización, con un tamaño de 3 cm, con un peso de  $5.75 \text{ g} \pm 0.03 \text{ g}$  el cual se encuentra dentro de los límites señalados (VILA JL. 2001). Una de la pruebas en el ensayo microbiológico fue la de esterilidad de la forma farmacéutica, así nos asegurarnos que esta fuera inocua, obteniendo resultados negativos de crecimiento en caldo BHI. Nosotros creemos que el uso de diferentes medios de cultivo para bacterias (Mac Conkey, Eosina Azul de Metileno, Sales Manitol, Agar sangre, Agar chocolate, Caldo Tioglicolato así como diferentes atmósferas, aeróbica y anaeróbica) podría ampliar nuestro margen de seguridad en esta prueba, sin embargo debido a los recursos no fue posible.



Para evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos *Calendula officinalis*, *Echinacea purpurea* e *Hippocratea excelsa* contra las nueve bacterias antes mencionadas, se utilizaron pruebas cualitativas como turbidez y nitidez del crecimiento bacteriano, y para evidenciar los resultados de está nos basamos en la prueba colorimétrica de Mosmann en microplaca, siendo este un ensayo técnicamente sencillo y confiable, además de brindar la ventaja de utilizar poco volumen de inóculo bacteriano y del extracto a evaluar, sin embargo tiene la desventaja de ser costoso.

La técnica o ensayo de Mosmann ya se ha utilizado en una gran variedad de ensayos que incluyen la cuantificación de linfocitos, citotoxicidad, actividad celular (BAUTISTA C. et al. 2000), supervivencia y proliferación celular, siendo la cantidad de células vivas proporcional a la cantidad e intensidad del color del formazan producido. Este ensayo colorimétrico fue desarrollado por Mosmann en 1983 siendo modificado en 1986 por François Denzot y Rita Lang (CASTRO C. et al. 2006), el cual se basa en la reducción metabólica del colorante Bromuro de 3-(4.5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT, color amarillo) a formazan (compuesto coloreado púrpura) realizado por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa que es la encargada de generar energía en forma de ATP.

Basándonos en los resultados reportados por Ángeles Ricaño M. et al. (2008) sabemos que el extracto de *Calendula officinalis* tiene un efecto inhibitorio con las bacterias *Candida albicans* y *Escherichia coli*, comparado con el presente trabajo en donde se utilizaron tres extractos en lugar de uno por las razones ya mencionadas, esto nos da la pauta para pensar que el espectro aumentará sobre las bacterias utilizadas. Pérez Avendaño Y. et al. (2008) publicó un trabajo en el cual determinó el efecto de inhibición de la *Calendula officinalis*, *Echinacea purpurea* e *Hippocratea excelsa* solos y combinados. En el caso de *Calendula officinalis* encontró una CMI de 4000 µg/100 µl contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, para *Echinacea purpurea* sus resultados fueron muy satisfactorios ya que para *Staphylococcus aureus* reportó una CMI de 250 µg/µl y para *Escherichia coli* una actividad inhibitoria intermedia con una CMI de 1000 µg/1000 µl, y con respecto a *Hippocratea excelsa* reportó una CMI sobre *Escherichia coli* de 200 µg/100 µl y *Staphylococcus aureus* presentó mayor resistencia con una CMI de 400 µg/µl. Al realizar la combinación de los tres extractos se obtuvo una disminución en la CMI para *Escherichia coli* de 166.6 µg/100 µl, para *Staphylococcus aureus* con 83.3 µg/100 µl. Todo esto nos demuestra que el presente trabajo es una opción viable para el tratamiento de infecciones vaginales.

Logramos determinar el efecto de inhibición de la combinación de tres extractos naturales *Calendula officinalis*, *Hippocratea excelsa* y *Echinacea purpurea* con un porcentaje de 55.55 de inhibición, es decir, cinco de las nueve bacterias tratadas fueron sensibles a estos extractos: *Candida albicans*, *Gardnerella*



*vaginalis*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Streptococcus agalactiae*, y cuatro bacterias fueron resistentes: *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa*. Hay que tener en cuenta que Morales Sánchez M. et al. (2008) nos dice que *Pseudomonas aeruginosa* es especialmente sensible al extracto etanólico de *Calendula officinalis* y Pérez Avendaño Y. et al. (2008) reporta una baja sensibilidad de la combinación de estos extractos sobre *Staphylococcus aureus*, esto puede ser debido a las proteínas provenientes de la gelatina, ya que Ángeles Ricaño M. et al. (2008) coincide con nuestro trabajo en la resistencia de *Staphylococcus aureus* donde en su formulación también esta presente la gelatina. Chávez Maya D. et al. (2009) reporta que de acuerdo a la época del año, el manejo de las plantas, su desecación y el método de extracción pueden influir en la actividad antimicrobiana así como en otras propiedades de las mismas.

Una vez que se determinó el efecto de inhibición sobre las nueve bacterias y la interacción de sinergismo de los extractos etanolicos de *Calendula officinalis*, *Hippocratea excelsa* y *Echinacea purpurea* se procedió a establecer si la actividad de los extractos es bactericida o bacteriostática.

La actividad bactericida se entiende como la acción ejercida de un fármaco para producir la muerte de más del 99.9 % de las bacterias tratadas y la actividad bacteriostática se refiere a la acción de un fármaco de inhibir el desarrollo visible de las bacterias tratadas (HERNÁNDEZ S., et al. 2008). Se determinó cualitativamente que la actividad que presenta la combinación de los extractos etanólicos de *Calendula officinalis*, *Hippocratea excelsa* y *Echinacea purpurea* es bacteriostática sobre *Candida albicans*, *Listeria monocytogenes* y *Streptococcus agalactiae*, para *Escherichia coli* y *Gardnerella vaginalis* el efecto es bactericida. La técnica utilizada para este propósito fue rápida, práctica, confiable, ya que nos aclaro cualquier duda que se pudiera tener en la visualización de los tubos por medio de turbidez y/o nitidez, pero esta técnica tiene la desventaja de ser costosa.

Para finalizar con este trabajo se realizaron pruebas de estabilidad al cabo de seis meses, dividiéndolas en dos, tanto física como microbiológicamente, teniendo en cuenta que en el Laboratorio de Química Medicinal ubicado en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo uno, se analizó la estabilidad química de los tres extractos hidroalcohólicos para establecer la integridad y uniformidad del sus componentes químicos a base de electroforesis capilar y U.V-Visible. Se obtuvieron resultados preliminares de estabilidad de los extractos. Sobre las pruebas físicas no hubo modificaciones en el tamaño, color, forma y peso, sin embargo, la apariencia ha cambiado ya que adoptó la forma del papel de aluminio; con lo que respecta al ensayo microbiológico, se realizaron pruebas con dos de las bacterias utilizadas anteriormente, una muy resistente que es



*Escherichia coli* y una muy lábil *Gardnerella vaginalis*, mostrando que esta forma farmacéutica tiene el mismo poder inhibitorio que hace seis meses en la prueba de inhibición de crecimiento bacteriano.

En base a los resultados obtenidos de manera *in vitro* se pudo demostrar y confirmar que los extractos etanólicos de *Calendula officinalis*, *Hippocratea excelsa* y *Echinacea purpurea* presentan actividad antibacterial contra 5 de las principales bacterias responsables de provocar infecciones cervico-vaginales humanas *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Streptococcus agalactiae*, asimismo, presentan una actividad bacteriostática sobre *Candida albicans*, *Listeria monocytogenes* y *Streptococcus agalactiae* y un efecto bactericida para *Escherichia coli* y *Gardnerella vaginalis*, en otras palabras esto representa una opción viable y una alternativa para el tratamiento de estas infecciones.



## 7.-CONCLUSIONES.

- Se elaboró una forma farmacéutica (óvulo) a base del extracto de *Calendula officinalis*, *Echinacea purpurea* e *Hippocratea excelsa* para el tratamiento de infecciones cervico vaginales humanas.
- Se prepararon tres extractos etanólicos al 70 %, estériles y en forma solida de *Calendula officinalis*, *Echinacea purpurea* e *Hippocratea excelsa*.
- Se elaboró la forma farmacéutica en base a los extractos anteriormente mencionados con una concentración de 150 mg.
- Se determinó la actividad antibacterial de los óvulos por medio del método colorimétrico de Mosmann.
- Se determinó la actividad bacteriostática de la forma farmacéutica en *Candida albicans*, *Listeria monocytogenes* y *Streptococcus agalactiae*, en el caso de *Escherichia coli* y *Gardnerella vaginalis* el efecto fue bactericida.



## 8.-SUGERENCIAS.

Seguimiento a los estudios in vivo de este tratamiento con un mayor número de personas.



## 9.-APÉNDICE:

### 9.1.- PREPARACIÓN DE REACTIVOS

#### 9.1.1.- REACTIVOS PARA TINCIÓN DE GRAM

##### Alcohol-acetona

- Etanol (95%)..... 700 mL
- Acetona..... 300 mL

Mezclar ambos líquidos.

##### Cristal violeta

###### Solución A

- Cristal violeta..... 2,0 g
- Etanol (95%)..... 20 mL

Disolver el cristal violeta en el etanol.

###### Solución B

- Oxalato de amonio..... 0,8 g
- Agua..... 80 mL

Disolver el oxalato de amonio en el agua.

Después de preparar las soluciones A y B, verter una en la otra y agitar hasta que se mezclen perfectamente.

##### Solución de Yodo

- Yodo..... 1,0 g
- Yoduro de potasio..... 2,0 g
- Agua..... 300 mL

Triturar el yodo y el yoduro de potasio en un mortero en la campana de extracción.

Agregar agua y agitar, evitando el contacto de los reactivos con la piel.

##### Solución de Safranina

- Safranina 0,25 g
- Etanol (95%) 10,00 ml
- Agua 100,00 ml

Disolver la safranina en el etanol, mezclar, agregar el agua y volver a agitar. Filtrar la solución con papel filtro.



### 9.1.2.- REACTIVO PARA LA PRUEBA DE OXIDASA (REACTIVO DE KOVACS).

Esta prueba sirve para determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa que activa la oxidación del citocromo que es reducido por el oxígeno molecular que produce agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana. El oxígeno actúa por tanto como aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones. Por lo general, el sistema citocromooxidasa sólo se encuentra en los organismos aerobios, algunos anaerobios facultativos pero los anaerobios estrictos carecen de actividad oxidasa. Asimismo, la presencia de oxidasa va ligada a la producción de catalasa, ya que ésta degrada el peróxido de hidrógeno (ver prueba de la catalasa) que se produce como consecuencia de la reducción del oxígeno y cuya acumulación es tóxica. Este reactivo tiñe las colonias oxidasa positivas de color lavanda que vira gradualmente a púrpura-negruzco intenso.

#### Preparación:

- Clorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina..... 0.1 g
- Agua destilada..... cbp 1000 mL

Disolver el reactivo en el agua destilada.

#### Realización de la prueba:

1. Método en placa directa
  - Agregar directamente 2-3 gotas de reactivo a algunas colonias. No inundar toda la placa y no invertirla.
  - Observar los cambios de color, la reacción se produce de 10-15 segundos.
2. Método indirecto sobre papel
  - Colocar un trozo de papel de filtro de 3x3 cm en una placa de Petri.
  - Agregar 2-3 gotas del reactivo de Kovacs en el centro del papel.
  - Extender con el asa de siembra una colonia sobre el papel impregnado.
  - La reacción de color positiva se produce a los 5-10 segundos.

#### NOTA:

Este reactivo no es estable y por consiguiente debe prepararse para utilizarlo en pequeñas cantidades cada vez que se necesite.



### 9.1.3.- REACTIVO PARA LA PRUEBA DE CATALASA

Se utiliza para comprobar la presencia del enzima catalasa que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo. La principal excepción es *Streptococcus*.

Originariamente, esta prueba era utilizada para diferenciar entre los siguientes géneros:

- *Streptococcus* (-) de *Micrococcus* (+) y/o *Staphylococcus* (+).
- *Bacillus* (+) de *Clostridium* (-).
- *Lysteria monocytogenes* (+) y/o *Corynebacterium* (+), con las excepciones de *C.pyogenes* y *C.haemolyticum*, ambos -) de *Erysipelothrix* (-).

Preparación:

Solución acuosa de Peróxido de Hidrógeno de 10 volúmenes %.

Realización de la prueba:

1. Método del portaobjetos (recomendado):
  - Con el asa de siembra recoger el centro de una colonia pura de 18-24 horas y colocar sobre un portaobjetos limpio de vidrio.
  - Agregar con gotero o pipeta Pasteur una gota de  $H_2O_2$  al 30 % sobre el microorganismo sin mezclarlo con el cultivo.
  - Observar la formación inmediata de burbujas (resultado positivo).
  - Desechar el portaobjetos en un recipiente con desinfectante.
  - Si se invierte el orden del método (extender la colonia sobre el agua oxigenada) pueden producirse falsos positivos.
2. Método del tubo de ensayo:
  - Agregar 1 ml de  $H_2O_2$  al 3 % directamente a un cultivo puro de agar en slant densamente inoculado.
  - Observar la formación inmediata de burbujas (resultado positivo).

NOTA:

Si se utilizan para esta prueba cultivos procedentes de agar sangre, se debe tener la precaución de no retirar algo de agar con el asa al retirar la colonia ya que los eritrocitos del medio contienen catalasa y su presencia dará un falso resultado positivo.



#### 9.1.4.- MEDIOS DE CULTIVO

A continuación se presentan las fórmulas y los procedimientos para preparar los medios empleados en este análisis microbiológico.

#### 9.1.5.- INFUSIÓN CEREBRO-CORAZÓN (BHI)

- Infusión de cerebro de ternera.....	7,5 g
- Infusión de corazón de res.....	10,0 g
- Peptona de gelatina.....	10,0 g
- Cloruro de sodio.....	5,0 g
- Fosfato disódico dodecahidratado.....	2,5 g
- Glucosa.....	2,0 g

#### Preparación

Disolver 37 g en 1 L de agua destilada, calentar y agitar hasta ebullición y hervir durante 1 minuto. Distribuir y esterilizar durante 15 min a  $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ .

#### 9.1.6.- AGAR CEREBRO-CORAZÓN (BHI)

Tiene la misma composición de la infusión cerebro corazón más 15,0 g de Agar.

Suspender 52 g en 1 l de agua destilada, calentar y agitar hasta ebullición y hervir durante 1 minuto. Esterilizar a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos.

#### 9.1.7.- AGAR SANGRE DE CARNERO

#### Preparación:

- Base de agar sangre.....	95,0 mL
- Sangre de carnero desfibrinada.....	5,0 mL

Preparar el agar base de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Enfriar a  $45 - 28^{\circ}\text{C}$  y agregar asépticamente la sangre de carnero, la cual previamente se debe encontrar a temperatura ambiente ( $20 - 25^{\circ}\text{C}$ ). Homogeneizar el medio y verter en las cajas Petri estériles de 12 a 15 ml para la prueba de CAMP y de 15 a 20 ml para la prueba de hemólisis.

#### 9.1.8.- MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazolio)

1. Disolver MTT en RPMI-1640 rojo de fenol, hasta una concentración de 5 mg/ml.
2. Filtrar con membrana de  $0.22\ \mu\text{m}$ .
3. Guardar a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ , hasta su uso.

"Elaboración de una forma farmacéutica (ovulo) a base del extracto de Caléndula officinalis, Echinacea purpúrea e Hippocratea excelsa para el tratamiento de infecciones cervico vaginales humanas". |

**9.2.- PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS AISLADAS**

Bacterias	MORFOLOGÍA		PRUEBAS BIOQUÍMICAS					
	Colonial	Microscópica	GRAM	OF	Catalasa	Oxidasa	Motilidad	CAMP
<i>Escherichia coli</i>	En EMB colonias oscuras con brillo metálico verde	Bacilos	-	OF	+	-	-	
<i>Klebsiella spp</i>	Grandes mucosas, brillantes y pegajosas	Bastones encapsulados	-	OF	+	-	-	
<i>Pseudomonas spp</i>	Grandes y mucoides	Bastones rectos y delgados	-	O	+	+	+	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Colonias pequeñas y verdosas en agar Oxford	Bacilos	+		+	-	+	
<i>Candida albicans</i>	Colonias café en agar Cetrímida	redondas u ovales	+					
<i>Gardnerella vaginalis</i>	lactobacilos	Bacilos cortos pleomórficos	-		-	-		
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Blancas-gris	Cocos en pares o racimos	+	F	+	-	-	
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Pequeñas amarillentas	Cocos o cadenas	+	F	-	-	-	-



"Elaboración de una forma farmacéutica (ovulo) a base del extracto de Caléndula officinalis, Echinacea purpúrea e Hippocratea excelsa para el tratamiento de infecciones cervico vaginales humanas". |

BACTERIAS	PRUEBAS BIOQUÍMICAS									
	Indol	MR / VP	Citratos	Coagulasa	Glucosa	Urea	NO <sub>3</sub>	Manitol	TSI	Lactosa
<i>Escherichia coli</i>	+	+/-	-		+	-	+		Ác/Ác	+
<i>Klebsiella spp</i>	-	-/+	+		+	+	+		-	+
<i>Pseudomonas spp</i>	-	-/-			+	-	+		Alc/Alc	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	+/+					-		-	
<i>Candida albicans</i>			+		+	-	+			-
<i>Gardnerella vaginalis</i>	-						-			
<i>Staphylococcus aureus</i>		-/+		+	+		+	+		+
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		-/+		-		+	-	-		
<i>Streptococcus agalactiae</i>		v/-			+		-	-		
(+) : resultado positivo	(v) : variable									
(-) : resultado negativo										



## 10.- REFERENCIAS

1. ALAN, AD. *Las propiedades antibacterianas de algunas plantas usadas en medicina mexicana tradicional para el tratamiento de desordenes gastrointestinal*. Ciudad de México: Consejo Nacional y Tecnología, 2005.
2. ALPUCHE CM, DAZA CA. "Infecciones nosocomiales por bacterias Gram negativas resistentes a cefalosporinas de espectro extendido: asociación de dos peligrosos enemigos". *Enfermedades infecciosas y Microbiología* 22, no. 4 (2002): 192-199.
3. ÁLVAREZ, CI. *Manual Básico de Bacteriología*. 2da edición. Edo México: Hecho e impreso en Cuautitlán. U.N.A.M. 2005.
4. ÁNGELES RICAÑO ME et al. "Elaboración de una forma farmacéutica sólida (óvulo) a base de Glicero-gelatina con extracto de *Calendula officinalis*, para el tratamiento de Ectropión e infecciones vaginales humanas". Tesis profesional Q.F.B., UNAM FES-Cuautitlán, 2008.
5. ARIEL C, Lagos N, Galstuch J, González C, García C, Díaz J. "Infecciones por *listeria monocytogenes* y embarazo con buen resultado perinatal". *Rev. Chil. Obster. Ginecol* 67, no. 3(2002): 237-241.
6. AZANZA R, Barberan JA, García JA, Llinares P, Mensa J, Picazo J, Prieto J, Torre CJ. "Recomendaciones para el tratamiento de las infecciones nosocomiales producidas por microorganismos grampositivos". *Rev. Esp. Quimioterap* 17, (2004): 271-288.
7. BARAJAS LM et al. "A Daul and Opposite Effect of *Calendula officinalis* Flower Extract: chemoprotector and Promoter in a Rat Hepatocarcinogenesis Model". *Planta Médica* 72 (2006): 217-221.
8. BARNES J et al. "Herbal Medicines". Alemania: Pharmaceutical Press (PhP), 2007.
9. BAUTISTA CR et al. Evaluación del bioensayo de MTT para determinar la proliferación in vitro de linfocitos de bovino frescos y congelados. *Conacyt-SAGAR*, K0009-P9702, 2000.
10. BEHRMAN E. *Nelson tratado de pediatría*. 16ª edición. Ciudad de México: Ed. McGraw-Hill Interamericana, 2001.
11. BISSER NG. "Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals English". Boca Ratón: 1994.
12. BLACKWELL A. "Clinic diagnosis of anaerobic vaginosis (nonspecific vaginitis): a practical guide". *Br J Vener* 58 (1982): 387-93.
13. BORDÓN K. *Microbiología*. 4ª edición, Ciudad de México: Editorial publicaciones culturales S.A., 1978.
14. CASTRO C et al. "Determination of the cytotoxic effects of extractos, fractions, or substances, by means of the MTT test". *Revista de la Facultad de Medicina*, 2006.
15. CDC et al. "Guidelines for treatment of sexually transmitted diseases. Center for Disease Control and Prevention". *Rev Morb Mortal Wkly Rep* 23, no. 47 (1998): 4 - 71.



16. CHÁVEZ AM et al. Análisis de la encuesta nacional de salud reproductiva. Ed. McGraw-Hill Interamericana, México, 2007.
17. CHÁVEZ MAYA DIANA et al. "Evaluación del efecto antibacteriano del extracto de salvia *officinalis* L. en 7 bacterias de importancia medica". Tesis profesional Q.F.B. UNAM FES-Cuautitlán. 2009.
18. CHÁVEZ Ortiz Edith et al. "Estudio preliminar de extractos de *Calendula officinalis* por electroforesis capilar". Tesis profesional Q.F.B., UNAM FES-Cuautitlán, 2009.
19. CISTERNAS VA, Lagos NN, Galstuch LJ, González RC, Díaz TJ. "Infección por *Listeria monocytogenes* y embarazo con buen resultado perinatal". *Rev. Chil. Obstet. Ginecol* 67, no. 3 (2002): 237-241.
20. CLEMENCIA DC et al. "Determination of the cytotoxic effects of extracts, fractions, or subs, or substances, by means of the mtt test. Faculty of medicine". *Rev. Foundation Universitaria San Martin*, 2006.
21. CRUZ G, SAINZ JE, SEGURA P. *Manual de bacteriología clínica*. Ciudad de México: Hecho e impreso en Cuautitlán. UNAM, 1994.
22. CRUZ G, LICEA A, VERA G, GARDEA S, MENDOZA S. CIPRAN A. "Efecto del extracto de *Calendula officinales* (mercadela) y *Amphipterygium adstringens* (cuachalalate) en cultivos celulares evidenciándolo por el método colorimétrico de Mosmann". *Revista de Fitoterapia*, no. 6 (2006); 1- 109.
23. Creative Commons [en línea]. 10 oct 2009, <><http://es.wikipedia.org/wiki/Bacteria> [consulta: marzo 2009].
24. CUBEROS GL, CORDERO ME., GARCÍA CA, PACHÓN J. "Infecciones por *Pseudomonas* spp". *Revista de Medicina* 7, no. 78 (1998): 3629-3633.
25. DAZA PRM et al. "Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria". *Información Terapéutica del sistema nacional de salud* 22, (1998); 57-67.
26. DENIZOT F, LANG R. "Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability". *J Immunol. Methods* 89, (1986): 271-277.
27. DÍAZ JJ et al. *Manual de Tecnología Farmacéutica 1*. Ciudad de México: Hecho e impreso en Cuautitlán, UNAM FES-Cuautitlán. 2003.
28. DÍAZ RD, SOLÓRZANO SF, PADILLA BG, MIRANDA NM, GONZALES RR, TREJO JA. Infecciones nosocomiales. Experiencia en un hospital pediátrico de tercer nivel. *Rev. Salud pública de México* 41, (1999): 12-17.



29. ESCOIZA MENESES ANA PATRICIA et al. "Incidencia de *Streptococcus pyogenes*, mecanismos de patogenicidad en infecciones respiratorias en los últimos 4 años y tratamiento"; Tesis profesional Q.F.B., UNAM FES-Cuautitlán. 2007.
30. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 6ª. Ed. México. 1994.
31. FUGH BA. "Echinacea for the prevention and treatment of upper respiratory infections". *Rev Seminars in Integrative Medicine* 1, no. 1 (2003): 106-111.
32. GONZALES VEGA Elizabeth. "Alteraciones en la prueba postcoital (simshuhner) debidas a la presencia de microorganismos patógenos en el tracto genital de pacientes con problemas de esterilidad". Tesis profesional Q.F.B., UNAM FES-Cuautitlán. 1997.
33. GROSSMAN H., "Candidiasis (candidiasis oral; candidiasis vaginal; candidiasis esofágica)". National Institutes of Health, ADIDSmeds, 2008.
34. GUYTON A., Hall J. *Tratado de fisiología Medica*. Decima Edición. Ciudad de México: Editorial McGraw-Hill Interamericana, 2005.
35. HELMAN J. *Farmacotecnia teórica y práctica*. 3ª Ed. Tomo VII. Ciudad de México: CIA Editorial Continental, 1982.
36. HERNÁNDEZ ZAMORA SONIA et al. "Efecto sinérgico y/o antagónico de Quitosán y extracto de *Calendula officinalis* en bacterias comúnmente asociadas a infecciones de heridas en humanos". Tesis profesional Q.F.B. UNAM FES-Cuautitlán, 2008.
37. HERNÁNDEZ DIEGO JACOBO ISRAEL et al. "De la actividad profesional del Químico Farmacéutico Biólogo como analista del departamento de control de calidad de una industria farmacéutica veterinaria: elaboración de un protocolo para estudios de estabilidad de medicamentos". Tesis profesional Q.F.B. UNAM FES-Cuautitlán, 2008.
38. JIMÉNEZ ME, García LÁ, Algarra I, Paco L, Collado A, and Garrido F. "A new extract of the plant *Calendula officinalis* produces a dual in Vitro effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation". *Rev Biomed central* 6 (2006): 119-132.
39. KONEMAN E et al. *Diagnostico microbiológico: Texto y atlas a color*. 5ª edición, Madrid (España); Ed. Médica Panamericana, 2001.
40. LEBEQUE Y, Morris HJ, Calás VN. "Infecciones nosocomiales: incidencia de la *Pseudomonas aeruginosa*". Universidad de Oriente Centro de Estudios de Biotecnología Industrial Facultad de Ciencias Naturales. Santiago de Cuba 2005.
41. LEIPZING AD, Helmund B, Hensen K. *Tecnología Farmacéutica, texto para el ingeniero farmacéutico*. Traducido de la 4ª edición alemana. España (Zaragoza): Editorial Acribia, 1979.
42. LENNETTE EH. *Manual de Microbiología Clínica*. 4ª edición. Buenos Aires: Editorial. Médica Panamericana, 1991.
43. LISBOA T, Rello J. "Infecciones por grampositivos: perspectivas terapéuticas actuales". *Enferm Infecc Microbiol Clin*. (2007); 53-58.



44. MAC FADDIN J. F. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Buenos Aires (Argentina): Editorial Médica Panamericana, 1990.
45. MARTÍNEZ D, Alvarado R, Mendoza M, Basurto F. *Plantas medicinales de cuatro mercados del estado de Puebla*. Ciudad de México: Sociedad Botánica de México, 2006.
46. MARTÍNEZ M. *Las plantas medicinales de México*. 6ª edición. México, D.F.: Librería y Ediciones botas, 1997.
47. MORALES Sánchez María Ángeles et al. "Efecto de *Calendula officinalis* en *Pseudomonas aeruginosa* evidenciado por microscopia electrónica". Tesis profesional Q.F.B., UNAM FES-Cuautitlán, 2002.
48. MOSMANN T. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay". *J. Immunol Methods*, no. 65 (1983): 55–63.
49. NARIMANIAN MB et al. "Randomized trial of a fixed combination (KanJangs) of herbal extracts containing *Adhatoda vasica*, *Echinacea purpurea* and *Eleutherococcus senticosus* in patients with upper respiratory tract infections". *Rev. Phytomedicine*, no. 12 (2005): 539–547.
50. NASSEMBERT. "Implicaciones de las infecciones del sistema reproductivo en la mujer". En *La mujer y el VIH – SIDA*. London: Pondora Press, 1993.
51. NAVARRETE A, Trejo JL, Reyes L. "Principles of root bark of *Hippocratea excelsa* (*Hippocrataceae*) with gastro protective activity". *Journal of Ethno pharmacology*, 79 (2002): 383–388.
52. NORMA Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-1993, estabilidad de fármacos y medicamentos, publicada el 3 de agosto de 1996.
53. NORMA Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2005, estabilidad de fármacos y medicamentos, publicada el 3 de agosto de 1996.
54. OMS. Glosario de términos especializados para la evaluación de medicamentos. Versión preliminar, 1990.
55. OMS. Guías para el tratamiento de las infecciones de transmisión sexual. Ed. Catalogación por la Biblioteca de la OMS, Ginebra, Suiza, 2005.
56. 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.
57. PAGANINI H, LUPPINO V, HERNÁNDEZ C. "Infecciones invasivas por *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico del Grupo A". *Arch. argent. pediatr* (2001): 99.
58. PARMET S. "Síntomas vaginales". *The Journal of the American Medical Association*. 24 (2004): 1406.
59. PASTORECK II J. "Obstetric and gynecologic infections disease". *Raven Press* 3 (1994): 45-62.



60. PÉREZ AVENDAÑO YOLANDA et al. "Determinar el efecto inhibitorio del extracto de: *Calendula officinalis*, *Echinacea purpurea* e *Hippocratea excelsa*, (solos y combinados) en bacterias aisladas de casos de mastitis bovina utilizando el método de Mosmann y la microscopia electrónica". Tesis profesional Q.F.B., UNAM FES-Cuautitlán, 2008.
61. PÉREZ CARREÓN J. et al. "Genotoxic and anti-genotoxic properties of *Calendula officinalis* extracts in rat liver cell cultures treated with diethylnitrosamine". *Toxicology in Vitro*, no. 16 (2002): 253-258.
62. PÉREZ CARREÓN JULIO ISRAEL. "Protección por extractos de *Calendula officinalis* L. del daño genotípico inducido por carcinogénesis dietilnitrosamina en cultivos primarios de hepatocitos de rata". Tesis profesional Q.F.B., UNAM FES-Cuautitlán, 2000.
63. PRESCOTT L, KLEIN J et al. *Microbiología*. 5ª edición. España: Editorial Mc Graw Hill, 2004.
64. PRIESTLEY C J, King GR. "Bacterial vaginosis". *Br J Clin Pract* 50, no. 6 (1996): 331- 4.
65. QUIROZ F. *Tratado de Anatomía Humana*. 39ª edición. 2 tomos. Ciudad de México: Porrúa, 2004.
66. RAZIC S, ANTONIJE O, BRANISLAV P. "Trace elements analysis of *Echinacea purpurea*/herbal medicinal". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 33 (2003): 845-/850.
67. RECTOR et al. "La salud de las mujeres". En *La vaginosis*. University of virginia, Health Topics Contact, 2007.
68. RODRÍGUEZ OA, SANTISCO GR, VINICIO C. "Ginecología. Fertilidad". En *Salud reproductiva*. Editorial Libro de texto, 1996: 8.
69. RODRÍGUEZ RG, FERNÁNDEZ PC, DELGADO GA, CARRASCO AM, ANDRADAS AE, GARCÍA JS, ZIMMERMANN VM. "Relación de la infección nosocomial con la mortalidad hospitalaria. Estudio multicéntrico". *Medicina clínica* 100 (1992): 9-13.
70. SURÓS A. *Semiología médica y técnica exploratoria*. 8ª edición. Barcelona (España): MASSON, 2001.
71. TYLER V. *Pharmacognosy*. Seventh edition. EU: Editorial LEA & Febiger., 1976.
72. VÁZQUEZ. "Microbiological diagnosis of sexually-transmitted infection". Facultad de Medicina de Oviedo, Oviedo (España), 2008.
73. VILA JL. *Tecnología Farmacéutica*. Vol. II. España: Editorial Síntesis, 2001.
74. VILLENA MA, Olalla J, De la Torre J y García AJ. "Neumonía cavitada causada por *Streptococcus agalactiae*". *Rev. Clin. Esp* 5 (2009): 252-254.
75. VUKOVIC L. *La maravillosa Equinacea y otros remedios para la gripe y los resfriados*. Ciudad de México: Panamericana Editorial, 2005.
76. WAIZEL BJ. *Las plantas medicinales y las ciencias*. Ciudad de México: Instituto politécnico nacional, 2006.



77. WOLFGANG J et al. *ZINSSER Microbiología*. Buenos Aires (Argentina): Editorial Médica Panamericana, 1998.

### DIRECCIONES ELECTRÓNICAS

78. [http:// www.cdepardo@sanmartin.edu.com](http://www.cdepardo@sanmartin.edu.com)
79. [http:// www.iupac.org/publications/cd/medicinal\\_chemistry/](http://www.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/)
80. <http://www.4woman.gov>
81. <http://www.acog.org>
82. <http://www.AIDSmeds.com><http://www.anatomia.tripod.com>
83. <http://www.books.google.com.mx/intl/es/googleboks/about.html>
84. <http://www.botanical-online.com>
85. <http://www.crim.unam.mx>
86. [http:// www.healthfinder.gov/espanol/](http://www.healthfinder.gov/espanol/)
87. <http://www.healthsystem.virginia.edu/topleve/home.cfm>
88. <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2018.pdf>
89. <http://www.jama.com>
90. <http://www.listadodeenfermedadesportransmisionsexual.html>
91. <http://www.monografias.com/trabajos.14/deficitsoperavit/deficitsoperavit.shtml>
92. <http://www.pediatraldia.cl/>
93. <http://www.pediatraldia.cl/>
94. <http://www.youngwomwnshealth.org/index.html>