



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTITLÁN

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS (*Caléndula
officinalis*, *Hippocratea excelsa* y *Hammamelis
virginiana*) PARA EL TRATAMIENTO DE INFECCIONES
VAGINALES HUMANAS A TRAVES DE UNA
FORMA FARMACÉUTICA LOCAL (OVULO
A BASE DE GLICERINA-GELATINA).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A N:

CARRANZA CORONA JENNY ELIZABETH
VENEGAS MONTES EDNA YAHELL

ASESOR: M.V.Z. JOSE ANTONIO LICEA VEGA

CUAUTITLÁN IZCALLÍ, EDO. DE MÉXICO

2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

GRACIAS

Jenny

Gracias Señor porque a partir de que te conozco mi vida ha sido diferente, gracias por permitirme concluir con esta etapa, gracias por estar conmigo siempre aunque a veces no lo notaba.

Doy Gracias a mis padres Nery y Griselda, por todo su amor, apoyo, motivación, comprensión, el buen ejemplo que siempre me han dado para poder alcanzar uno de mis objetivos y por que nunca perdieron la fe en mi.

A mi esposo por ser el motor de mi vida, el padre de mis hijos y mi mas grande ilusión, por todo su amor, apoyo y comprensión en los momentos más difíciles.

GRACIAS AMOR.

A ti Dany porque sé que fue muy difícil para ti no tener toda la atención que requerías y porque a pesar de todo nunca recibí de ti reproches; te amo con todo mi ser y eres una bendición que Dios me adelanto. Siempre serás mi linda princesa.

A mis dos angelitos Daniel y Sofía

A mis hermanos Cesar y Nery; por ser mis grandes amigos, quienes con su consejo y cuidado he logrado ser la mujer que soy, los amo.

Gracias tío Isra, por su apoyo, gracias por el gran ser humano que es, por su gran corazón por impulsarme día a día con su ejemplo a lograr la superación personal.

Gracias a su hermosa familia por ser parte de mi vida.

A mis amigas Pam, Dali, Mary por su compañía y apoyo durante la curso de la carrera.
Las quiero mucho chiquis.

Gracias Yahell por tu tiempo, entrega, dedicación y decisión para poder realizar este sueño. Gracias por confiar en mí y por darme siempre palabras de aliento y esperanza. Gracias por impulsarme a terminar este proyecto. Gracias por darme la oportunidad de trabajar contigo, eres un ser humano excepcional. Te quiero.

Yahell

Yo solo quiero dar gracias a la sincronía del universo por ponerme a cada una de las personas que he conocido, a todas las esencias que han entrado y salido de mi vida; que me han enseñado todo lo que ahora reflejo. Gracias a todas las familias que he tenido para mejorar en todos los aspectos importantes de mi vida y me han hecho crecer en todos los sentidos. De todos y de cada uno de los compañeros, amigos y maestros me llevo muchas enseñanzas de esta etapa universitaria. Todos somos uno. Gracias totales.

A mis padres:

Victor Manuel Venegas Roa, María Julia Montes Vargas e Isabel Roa Alvarez.

Lo más importante que tengo en mi vida, este trabajo está dedicado principalmente a ti papa. Gracias por el siempre apoyarme. Te amo

A mis madres las amo con todo mi corazón y les doy las infinitas gracias por el apoyo y por confiar en mí. Las amo

Al amor que siempre me acompaña: Edgar Jonathan Aguirre Morales. Te amo

Agradecimiento especial:

Gracias a Extractos Sigma S.A. de C.V y sus colaboradores por el gran equipo como empresa que tienes, muchas gracias por permitirnos ir más allá con su apoyo en esta investigación y tener un alcance más objetivo. Gracias a Edgar Gómez, Claudia Nieto y Rubén Hernández.

“Y junto al rio, en la ribera, a uno y otro lado, crecerá toda clase de árboles frutales; sus hojas nunca caerán, ni faltará su fruto. A su tiempo madurará, porque sus aguas salen del santuario; y su fruto será para comer y su hoja para medicina.”

Ezequiel 47:12

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	8
JUSTIFICACION.....	9

INTRODUCCIÓN

1.0 Anatomía del Sistema Genital Femenino.....	10
1.1 Órganos Internos.....	10
1.2 Órganos Externos	11
2.0 Infecciones Ginecológicas.....	12
2.1 Síntomas Generales	13
2.2 Tipos de infecciones vaginales	
2.2.1 Vaginitis y vaginosis bacteriana.....	13
2.2.2 Vulvovaginitis	14
2.2.3 Cervicitis.....	15
2.3 Diagnóstico.....	16
3.0 Otras bacterias de importancia médica.....	17
3.1 <i>Escherichia coli</i>	18
3.2 <i>Proteus mirabilis</i>	18
3.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	19
3.4 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	19
4.0 Fitoterapia.....	20
4.1 Principios activos de las plantas medicinales	21
4.1.1 Polifenoles	21
5.0 Plantas medicinales utilizadas en la elaboración de óvulos vaginales.....	23
5.1 Calendula: <i>Calendula officinalis</i>	23
5.1.1 Generalidades.....	23
5.1.2 Descripción global.....	24
5.1.3 Fotoquímica y Principios activos.....	26
5.1.4 Propiedades farmacológicas y Principios activos.....	27
5.1.5 Usos y aplicaciones terapéuticas.....	27

5.1.6 Preparaciones de aplicación general.....	28
5.2 Cancerina: <i>Hippocratea excelsa</i>	29
5.2.1 Generalidades.....	29
5.2.2 Descripción global.....	29
5.2.3 Fotoquímica y Principios activos.....	31
5.2.4 Propiedades farmacológicas y Principios activos.....	31
5.2.5 Usos y aplicaciones terapéuticas.....	31
5.2.6 Preparaciones de aplicación general.....	32
5.3 Hamamelis: <i>Hamamelis virginiana</i>	33
5.3.1 Generalidades.....	33
5.3.2 Descripción global.....	33
5.3.3 Fotoquímica y Principios activos.....	35
5.3.4 Propiedades farmacológicas y Principios activos.....	35
5.3.5 Usos y aplicaciones terapéuticas.....	36
5.3.6 Preparaciones de aplicación general.....	36
6.0 Formas de administración vaginal.....	37
6.1 Ovulo vaginal.....	37
6.2 Características generales.....	38
6.2.1 Excipientes.....	38
6.2.1 Clasificación de excipientes.....	36
6.2.2 Elaboración de óvulos.....	39
6.3 Ensayos a la forma farmacéutica	39
7.0 Métodos utilizados	40
7.1 Método de Mossman.....	40
7.2 Curva de calibración para flavonoides y polifenoles	40
8.0 Objetivo general.....	43
8.1 Objetivos particulares.....	43
9.0 Parte experimental.....	44
9.1 Material de trabajo.....	44
9.2 Reactivos.....	45
9.3 Medios de cultivo y Bioquímica.....	45
9.4 Equipos e Instrumentos.....	46

9.5 Cepas Bacterianas.....	46
10.0 Diagrama de trabajo	47
11.0 Metodología de trabajo.....	48
11.1 Preparación de extractos etanólicos.....	48
11.2 Prueba de esterilidad de los extractos secos	48
11.3 Obtención de los extractos secos.....	49
11.4 Prueba de esterilidad de los extractos secos.....	49
11.5 Cuantificación de polifenoles, flavonoides y taninos de los extractos.....	49
11.6 Aislamiento e identificación de Cepas Bacterianas.....	51
11.7 Prueba de inhibición de crecimiento bacteriano en los extractos secos y CMI.....	51
11.8 Elaboración del lote de óvulos a base de glicerina-gelatina.....	51
11.9 Pruebas de esterilidad de el lote de óvulos.....	53
11.10 Pruebas de inhibición de crecimiento bacteriano.....	53
11.11 Pruebas de efecto bactericida – bacteriostático.....	54
12.0 Ensayos para la forma farmacéutica.....	54
12.1 Uniformidad de peso.....	54
12.2 Perfil de disolución.....	54
13.0 Resultados experimentales.....	55
13.1 Plantas medicinales.....	55
13.2 Extractos etanólicos de plantas medicinales.....	55
13.3 Cuantificación de polifenoles, flavonoides, y taninos de los extractos secos.....	57
13.4 Aislamiento e Identificación de bacterias.....	63
13.5 Prueba bactericida-bacteriostático de extractos secos.....	63
13.6 CMI para la forma farmacéutica.....	67
13.7 Elaboración de un lote de óvulos a base glicerina-gelatina.....	69
13.8 Prueba de inhibición de crecimiento bacteriano en el ovulo.....	70
13.9 Prueba bactericida-bacteriostático en el ovulo.....	71
14.0 Ensayos para la forma farmacéutica.....	73
14.1 Uniformidad de peso de la forma farmacéutica.....	73
14.2 Perfil de disolución de la forma farmacéutica.....	74
15.0 Discusión y Análisis de resultados.....	76
16.0 Conclusiones.....	83
17.0 Referencias bibliográficas.....	89

Figuras y Tablas de Referencia

Figura No 1 Órganos genitales femeninos internos.....	10
Figura No 2 Órganos genitales femeninos externos.....	11
Figura No 3 Evolución de la flora bacteriana.....	14
Figura No 4 Ejemplos de de polifenoles y derivados.....	22
Figura No 5 Generalidades de <i>Caléndula officinalis</i>	23
Figura No 6 Planta de <i>Caléndula officinalis</i>	24
Figura No 7 <i>Caléndula officinalis</i> y sus componentes.....	25
Figura No 8 Generalidades de <i>Hippocratea excelsa</i>	29
Figura No 9 <i>Hippocratea excelsa</i> y sus componentes.....	30
Figura No 10 Generalidades de <i>Hamamelis virginiana</i>	33
Figura No 11 <i>Hamamelis virginiana</i> y sus componentes.....	34
Figura No 12 Diagrama de diluciones por método de Mossman.....	40
Figura No 13 Generalidades de la Curva de Calibración para flavonoides	41
Figura No 14 Generalidades de la Curva de Calibración para polifenoles.....	42
Figura No 15 Generalidades para la cuantificación de Taninos.....	43
Figura No 16 Plantas medicinales.....	55
Figura No 17 Concentración de extractos en microplaca.....	67
Figura No 18 Prueba de uniformidad de peso.....	73
Figura No 19 Tiempo de disolución.....	74
Tabla No 1 Propiedades de la <i>Caléndula officinalis</i>	27
Tabla No 2 Aplicaciones de <i>Caléndula officinalis</i>	28
Tabla No 3 Propiedades de <i>Hippocratea excelsa</i>	32
Tabla No 4 Aplicaciones de <i>Hamamelis virginiana</i>	36
Tabla No 5 Clasificación de excipientes para la elaboración de óvulos.....	38
Tabla No 6 Resultados analíticos de cuantificación de <i>Caléndula officinalis</i>	58
Tabla No 7 Resultados analíticos de cuantificación de <i>Hamamelis virginiana</i>	60
Tabla No 8 Resultados analíticos de cuantificación de <i>Hippocratea excelsa</i>	62
Anexo 1: Calculo de concentraciones para las curvas de calibración.....	86
Anexo 2: Pruebas bioquímicas de identificación de cepas utilizadas.....	88

RESUMEN

Las infecciones cérvico-vaginales, son motivo de consulta y desórdenes ginecológicos muy frecuentes en mujeres en edad fértil. Se calcula que estos procesos suponen más de un tercio de la consulta ginecológica y su frecuencia parece estar aumentando. Es difícil estimar la incidencia real de ésta patología a nivel mundial debido a que también se presenta en su forma asintomática. Estas pueden ser causadas por diversos agentes etiológicos, desde bacterias aerobias y anaerobias, hongos, virus y parásitos, algunos de estos pueden o no ser transmitidos sexualmente. Algunos factores predisponen a la mujer en edad fértil como: los tratamientos hormonales, pH, el uso del dispositivo intrauterino, duchas vaginales y tener múltiples parejas (Cruz, R. et. al.1982).

Se determinó la actividad antimicrobiana de los extractos de *Hamamelis virginiana*, *Caléndula officinalis* e *Hippocratea excelsa*, obtenidos por varios procesos, y a partir de esto se elaboró un lote de 30 óvulos como forma farmacéutica local para el tratamiento de las infecciones vaginales, a base de glicerina-gelatina-agua, en una proporción de 60%, 10% y 30% respectivamente; utilizando el método de vaciado para la fabricación. Esta forma farmacéutica fue sometida a diversos ensayos estipulados en la farmacopea española, entre los cuales encontramos perfil de disolución, pruebas de esterilidad y uniformidad de masa; al igual analizamos si el efecto de los extractos es bactericida o bacteriostático en presencia de las bacterias y levaduras más comúnmente causantes de estos problemas ginecológicos.

Se realizó la cuantificación de principios activos en los extractos secos, que nos determinó una concentración en el ovulo como forma farmacéutica de polifenoles (equivalentes en pirogalol) de 20.43 mg, 80.66 mg de flavonoides (equivalentes a rutina) y 1.44 mg de taninos (ácido tánico) en el extracto de Cancerina, se obtuvo 3.13 mg de polifenoles, 5.18 mg de flavonoides y 1.24 mg de taninos en el extracto de Caléndula, y se obtuvo 23.35 mg de polifenoles, 15.00 mg de flavonoides y 1.41 mg de taninos en extracto de Hamamelis.

La forma farmacéutica local (óvulos) se realizó con una mezcla de excipientes glicerina-gelatina-agua (60:8.5:31.5) incorporando los extractos secos como principios activos utilizando el método de vaciado para su fabricación, los óvulos quedaron a una concentración efectiva de polifenoles totales de 46.91 mg equivalentes a pirogalol que representan el 9.19% de la formulación, de flavonoides totales obtuvimos 100.84 mg

equivalentes a rutina que representan el 19.77% en la formulación, y de taninos (ácido tánico) totales se obtuvo 4.09 mg representando el 0.80 % en la formulación.

Aunque solo observamos efecto bacteriostático de los óvulos con extractos en las bacterias *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, en *Cándida albicans* y *Escherichia coli* se visualizó un efecto muy marcado, el cual podría determinar si puede llegar a ser bactericida al administrarse un tratamiento, también observamos un efecto bactericida para *Gardnerella vaginalis*. Podemos mencionar que *Cándida albicans* es una levadura de flora normal pero oportunista por lo que no necesitamos un efecto bactericida ya que es parte del equilibrio de la flora vaginal. Por ello recomendamos que el estudio tenga un tratamiento prolongado de 5 a 7 días esto sustentado con pruebas posteriores in vitro.

JUSTIFICACION.

Actualmente en México la población ha generado un uso excesivo de antibióticos, lo que ha provocado que muchas bacterias desarrollen resistencia a los antimicrobianos. Con lo cual la industria se encuentra en una constante búsqueda de nuevos medicamentos, ya sean con mayor concentración o modificando la estructura molecular para potencializar el efecto bactericida. Sin embargo esto no ha sido suficiente para el mejoramiento de la salud humana, ya que la mayoría de los antibióticos ocasionan reacciones adversas como de hipersensibilidad en el organismo, trastornos del aparato reproductor, gastrointestinal, cutáneo, hematológico, provocando otras patologías como daño hepático. Una consecuencia importante de estos efectos adversos es la resistencia bacteriana lo cual reduce la efectividad de los tratamientos y un aumento de desperdicio de recursos económicos en los servicios de salud que a su vez incrementa los gastos y la mortalidad por enfermedades infecciosas generando un problema de salud pública.

Como resultado de un uso desmedido de antibióticos sin un control, ha generado que el sistema de salud regulé la venta de medicamentos con prescripción médica, lo que para muchas mujeres de escasos recursos sea más difícil la accesibilidad de un tratamiento eficaz contra patologías en tracto vaginal.

Es por ello que este trabajo de investigación se realizó con el objetivo de ofrecer una alternativa natural para mujeres que pueden desarrollar reacciones alérgicas a los antimicóticos y/o antibióticos, o sean muy sensibles al desarrollo de reacciones adversas a los tratamientos con grupos azoles y/o antibióticos, desarrollando una

alternativa natural y así poder atacar las infecciones sin generar reacciones alergias así como eliminarlas o disminuirlas lo más posible.

En nuestra investigación desarrollamos una alternativa natural para el tratamiento de vaginosis-vaginitis, mediante la utilización de extractos naturales (Caléndula, Cancerina y Hamamelis), incorporándolos en una forma farmacéutica local (óvulos) aprovechando sus propiedades antimicrobianas. Dichas pruebas realizadas en vitro, nos darán un soporte científico en la actividad antimicrobiana contra las bacterias de importancia clínica que son representativas de infecciones cérvico-vaginales.

INTRODUCCIÓN

1. ANATOMIA DEL SISTEMA GENITAL FEMENINO

El sistema genital femenino está conformado por órganos internos y externos, los primeros se integran de ovarios, trompas uterinas (conductos por donde se dirigen los óvulos al útero), útero (órgano que recibe y contiene el huevo fecundado) y vagina; los segundos están conformados por la vulva, junto con sus órganos anexos (Tortora, G.2003).

1.1 ÓRGANOS INTERNOS

Los órganos internos femeninos se integran por ovario, trompa uterina, útero y vagina, los cuales se describen a continuación:

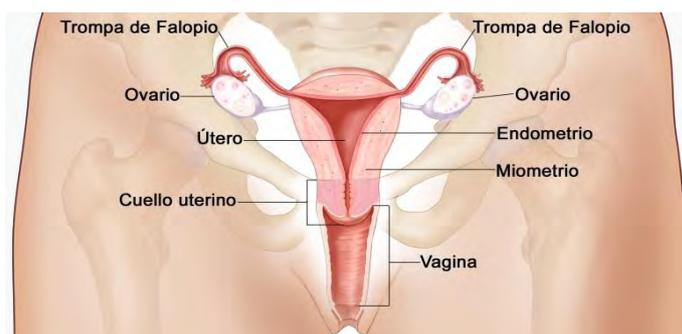


Figura No. 1 Órganos genitales femeninos internos.

a) OVARIO

Glándula sexual femenina que por su secreción interna (endócrina) asegura los caracteres de La mujer y por su secreción externa elabora los ovocitos primarios secundarios, células genitales femeninas. Tiene forma ovoide, algo aplastada, con una longitud de 2.5 a 4.5cm y un espesor de 0.5 a 1cm (Latarjet, M. 2005).

b) TROMPA UTERINA

También llamada trompa de Falopio u oviducto, es un conducto bilateral, extendido desde la extremidad tubárica del ovario (lateralmente), hasta el cuerno del útero (medialmente). Este conducto muscular, tapizado por una mucosa, conduce al ovocito hacia la cavidad uterina. Tiene una longitud de 10 a 12cm (Tortora, G. 2003).

c) ÚTERO

También llamado matriz, es un órgano muscular, hueco, se encuentra tapizada por mucosa, destinado a recibir el huevo fecundado, alberga el feto durante la gestación y lo expulsa en el momento del parto. Tiene forma de un cono aplanado de adelante hacia atrás. El cuerpo del útero, está constituido de una cara vesical, cara intestinal, fondo del útero, dos bordes laterales. El istmo del útero se encuentra entre el cuerpo y el cuello del útero, su longitud es de 1cm (Latarjet, M. 2005).

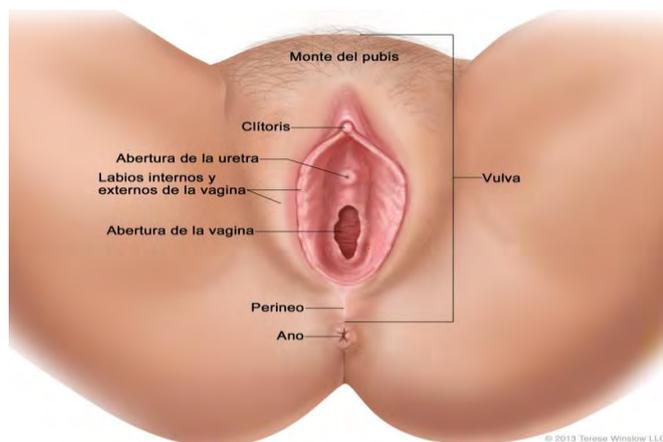
d) VAGINA

Órgano musculo membranoso que va desde el útero hasta la vulva, es el órgano femenino de la cópula, situado en la cavidad pelviana arriba y en el periné abajo. Su dirección es oblicua hacia abajo y adelante (Latarjet, M. 2005).

1.2 ORGANOS EXTERNOS

Se encuentran situados por debajo de la pared abdominal anterior, en el periné anterior (región urogenital), por delante del ano, por dentro y arriba de la cara medial de los muslos, como se muestra en la figura No. 2. La vulva esta coronada por el monte del pubis e incluye a las formaciones labiales entre las cuales se abren la uretra y la vagina (Latarjet, M. 2005).

Figura No. 2 Órganos genitales femeninos externos. Tomada de Ausina, V. (2006)



2. INFECCIONES GINECOLOGICAS

Las infecciones genitales representan una de las causas que con mayor frecuencia, son origen de consulta ginecológica en todo el mundo. Los agentes etiológicos de estas incluyen levaduras como *Candida albicans*, protozoarios, bacterias y virus. Por la sintomatología que presentan es clínicamente difícil de diferenciar; el diagnóstico se logra valiéndose de métodos de cultivo microbiológicos (Cruz, R. et. al.1982).

La flora vaginal en la mujeres está constituida por *Lactobacillus*, pero es fácil encontrar otros microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulasa* negativos, *Streptococcus viridans*, *Enterococos spp*, *Streptococcus agalatae*, *Peptostreptococcus*, *Corynebacterium*, *Actinomyces*, *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter*, *Gardnerella vaginalis*, *Clostridium*, *Micoplasma*, Levaduras, *Trichomonas*, etc. (Ausina, V. 2006).

Varios factores influyen en la cantidad y características de los microorganismos presentes en la flora vaginal; como pH, contenido de glucógeno y de glucosa, así como los *Lactobacillus*. Cuando el complejo equilibrio es alterado los microorganismos potencialmente patógenos proliferan a concentraciones suficientemente elevadas como para producir síntomas. Existen también otros factores para que esta flora pueda verse alterada como la hospitalización, la utilización de antibióticos aunque sea de forma profiláctica, las intervenciones quirúrgicas, el ciclo menstrual, la utilización de métodos anticonceptivos, duchas vaginales, la conducta sexual promiscua, el embarazo, los tratamientos hormonales y el padecimiento de enfermedades que produzcan depresión del sistema inmunológico, como la Diabetes Mellitus descompensada y el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.

Vaginitis no infecciosa: se presentan síntomas como ardor, comezón e incluso un flujo anormal sin tener una infección. La causa más común es una reacción alérgica a algún *spray* o sustancia que haya entrado en contacto con la vagina.

2.1 SÍNTOMAS GENERALES

Entre los síntomas comunes encontramos:

- General :** Flujo, ardor, comezón, dolor.
- Disuria:** Dolor e incompleta expulsión de la orina debido a procesos patológicos.
- Polaquiuria:** Signo urinario caracterizado por el aumento de número de micciones.
- Prurito vulvar:** Picazón, enrojecimiento, hinchazón de la piel de la vagina.
- Dispareunia:** Dolor durante el coito.
- Leucorrea:** Exceso de flujo o secreción vaginal o vulvar.

2.2 TIPOS DE INFECCIONES VAGINALES

2.2.1 Vaginitis y vaginosis bacteriana.

En las mujeres en la edad reproductiva, la secreción vaginal normal se caracteriza por ser inodora, clara y viscosa; con un pH ácido (<4.5) y ausencia de neutrófilos. En esta etapa la flora vaginal está constituida en su mayor parte por *Lactobacillus sp*, sin embargo, es común encontrar *Gardnerella vaginalis* y *Streptococcus* del grupo B así como *Candida albicans*.

La vaginitis es una inflamación del tejido vaginal que puede ser causada por una infección vaginal. Es una de las infecciones de genitales más comunes en la consulta general o ginecológica, así como en clínicas de perinatología y de transmisión sexual con los siguientes signos y síntomas: prurito, flujo, ardor, irritación, disuria, dispareunia, fetidez o mal olor vaginal; secundario a la presencia de microorganismos patógenos.

La vaginitis causada por diversas especies de *Candida*, sobre todo *albicans*, produce una alteración de la flora vaginal con un sobre crecimiento de estas levaduras lo que causa la infección. Actualmente se le concede gran importancia ya que se encuentra en relación directa con la enfermedad pélvica inflamatoria (Barrenetxea, G. 2002). Puede ser asintomática, aunque se puede presentar un exudado vaginal blanco-grisáceo y maloliente, existe irritación vaginal y vulvar, disuria, dispareunia o dolor abdominal.

La vaginosis bacteriana (VB), es un síndrome que se caracteriza por un sobre crecimiento de microorganismos principalmente *Gardenella vaginalis*, que pueden encontrarse en la vagina, que reemplaza a los *Lactobacillus* y se acompaña de un

aumento en el pH (hasta de 7.0). Se define como una infección a nivel vaginal, sin respuesta inflamatoria. Es la causa más común de descarga vaginal anormal. La VB puede tener un comienzo y remisión espontánea; aunque su prevalencia es mayor en las mujeres sexualmente activas que en las no activas. Actualmente no se considera de transmisión sexual.

La vaginosis, se ha relacionado con riesgo de complicaciones durante la gestación y de parto pretérmino, y aumenta el riesgo de enfermedad inflamatoria pélvica (López, J. 2005).

Puede ser asintomática, aunque se pueden presentar un exudado vaginal blanco grisáceo y mal oliente, existe irritación vaginal y vulvar, disuria, dispareunia, o dolor abdominal. La prevalencia de VB se encuentra entre un 15 a 30% en mujeres en edad reproductiva. En México, un estudio realizado en mujeres de bajo riesgo reveló una prevalencia del 32 % (López, J. 2005).

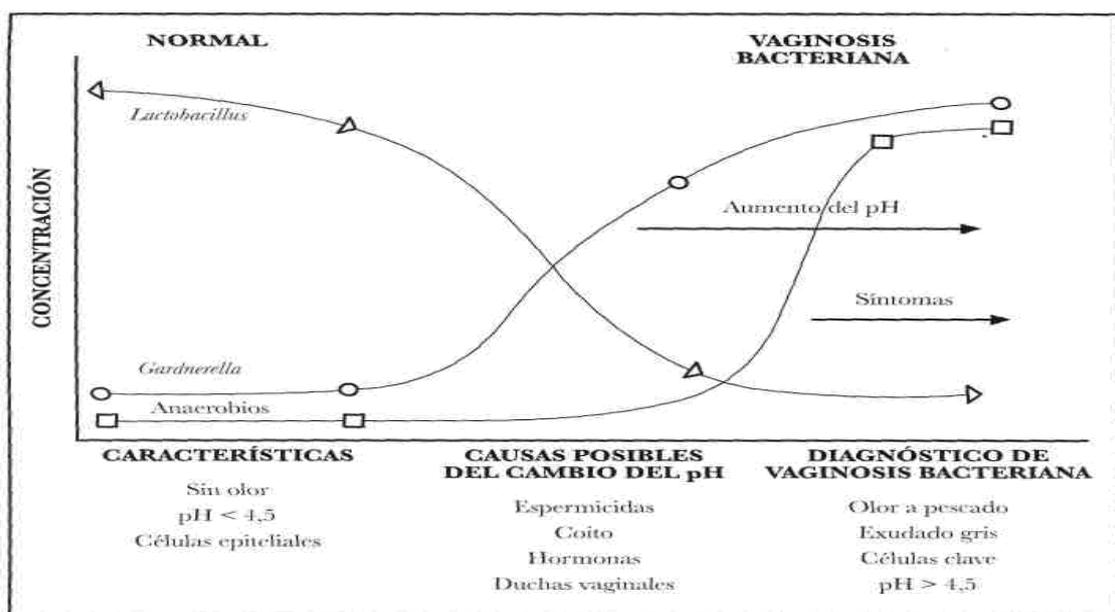


Fig. No. 3 Evolución de la flora bacteriana en mujeres normales y con vaginosis bacteriana. Características del exudado. Tomada de Latajet, M. (2005)

2.2.2. Vulvovaginitis

La micosis vulvovaginal fue descrita por primera vez en 1949 por JS Wilkinson, al establecer una relación entre la existencia de hongos en la vagina y la aparición de una vaginitis. A partir de ese momento los conocimientos fueron evolucionando progresivamente. Actualmente hablamos de vaginitis (vulvovaginitis) micótica o por

hongos levaduriformes ya que no todas las vaginitis son causadas por especies pertenecientes al género *Candida*, esta infección es un problema universal, que afecta a millones de mujeres en todo el mundo (Barrenextea, G. 2002).

Se refiere a una inflamación vulvar y vaginal, fisuras y presencia de un exudado adherente a la mucosa, blanquecino y amarillento, con grumos. El pH vaginal se mantiene en 4.5. Se diagnóstica en el 25% de mujeres que acuden a una consulta ginecológica, más de la mitad de los casos son de origen infeccioso causados por transmisión sexual, y los restantes se deben a otros factores predisponentes como la diabetes, embarazo, uso de anticonceptivos orales, obesidad o utilización de glucocorticoides.

Se presenta de forma recurrente, grave, puede estar producida por *Candida glabrata*, *Trichomonas* y vaginosis bacteriana; también puede ser causada por otros microorganismos como Herpes y gonococo (López, J.2005).

2.2.3 Cervicitis

Es la inflamación del cuello del útero o cérvix, es decir, de la porción inferior más estrecha del útero y que lo separa del canal vaginal, es causada por algunas infecciones las cuales pueden ser transmitidas sexualmente, entre las más comunes se encuentran las ocasionadas por estafilococos y estreptococos, sin embargo existen otros microorganismos causantes entre ellos: *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis* y herpes simple.

En sus paredes llamadas criptas cervicales se produce moco después de la menstruación, que al paso de los días (por efecto de las hormonas) adquiere características que denotan el periodo de fecundidad.

El moco cervical brinda el ambiente propicio para que los espermatozoides sobrevivan en el cuerpo femenino por aproximadamente 48 horas, de no ser así apenas subsistirían por 2 ó 3 horas. Por otra parte, el cérvix mide apenas 1 cm, es firme y duro, pero durante el embarazo cambia de color y se vuelve mucho más elástico durante el parto para que el bebé pase a través del mismo.

Los síntomas más comunes de la Cervicitis:

Sangrado vaginal anormal:	Después de relaciones sexuales, después de la menopausia, entre menstruaciones.
Flujo vaginal inusual:	Que no desaparece, de color gris, blanco o amarillo, puede tener olor.
Relaciones sexuales dolorosas:	Dolor vaginal, presión o pesadez pélvica.

2.3 DIAGNÓSTICO

Se fundamenta en la exploración y el estudio microbiológico del exudado vaginal y cervical, determinación de pH (4.5), examen microscópico en fresco, y ausencia de neutrófilos y prueba de las aminas.

La evaluación de mujeres con vaginitis infecciosa debe incluir una historia clínica enfocada a un espectro completo de los síntomas vaginales: secreción, olor, prurito, irritación, ardor así como la localización de los mismos, su relación con el ciclo menstrual así como la historia sexual para clasificación de riesgo en ETS.

El examen físico debe incluir una evaluación de la vulva y revisión con espejo vaginal en donde se pueden obtener las muestras para la medición de pH, prueba de las aminas, tinción de Gram del exudado, cultivos de cérvix para *Chlamydia* y *Neisseria gonorrhoeae* y citología.

Los cultivos vaginales se reservan para casos especiales de sospecha *Trichomona vaginalis*

El diagnóstico de otras enfermedades causadas por virus, puede efectuarse por medio de técnicas moleculares, serología y biopsias.

Transmisión Sexual	Vaginosis Bacteriana	Candidiasis	Tricomoniasis
	No	No	Sí
Factores Predisponentes	Frecuentemente ausentes Más común si hay actividad sexual Nueva pareja sexual Uso de DIU	Frecuentemente ausentes Mas común si hay actividad sexual Uso reciente de antibióticos o corticoides Embarazo Diabetes mal controlada Huésped con inmunocompromiso	Múltiples parejas
Síntomas	Presencia de flujo Olor a pescado 50% asintomático	Presencia de flujo Prurito Disuria externa Dispareunia superficial >20% asintomática	Presencia de flujo Prurito Disuria 10-50% asintomática (III)
Signos	Flujo blanco o gris, filante, abundante	Flujo blanco, grumoso Eritema y edema de vulva y vagina	Flujo blanco o amarillo, espumoso Eritema de vulva y cervix -aspecto de fresa-
pH vaginal	>4.5	<4.5	>4.5
Frotis fresco	Polimorfo nucleares Células clave*	Levaduras Pseudo hifas	Protozooario flagelado móvil (sensibilidad de 38 a 82 %)

3.0 BACTERIAS DE IMPORTANCIA MÉDICA ASOCIADAS A INFECCIONES VAGINALES

Según Vandeven y Emans la flora vaginal normal está constituida por microorganismos entéricos Gram negativos (generalmente *Escheriquia coli*, y otros miembros de la familia Enterobactereacea), miembros de la flora normal de la piel (*Staphylococcus epidermidis* y *Streptococcus* del Grupo A) y Lactobacilos.

Sin embargo la sintomatología referida por las pacientes que presentan una infección vaginal relacionada con las bacterias mencionadas (aisladas de hisopos vaginales) pueden presentarse por la deficiente higiene y limpieza de los genitales después de la evacuación intestinal y micción, por el uso de ropa interior muy apretada, sintética, por el uso tópico de cremas, talcos y perfumes desodorantes que afectan el equilibrio vaginal.

La secreción vaginal es frecuente en todas las edades, pero no siempre es patológica. Normalmente la cavidad vaginal presenta secreciones que varían en intensidad y características a lo largo de la vida de la mujer; puede originarse en la mucosa de las salpinges, en el endometrio, en el cérvix o en la propia mucosa vaginal, y constituye un “flujo” mucoide que viaja en sentido anterogrado y que arrastran microorganismos y partículas extrañas hacia el exterior. Las características de las secreciones vaginales son influenciadas por diversos factores y varían dependiendo el factor hormonal fisiológico, patológico o iatrogénico, presente en las diversas etapas de la mujer. Además existen factores propios de la vagina, como su temperatura, humedad, proximidad con el ano y el hecho de ser el órgano femenino de la copula, que la hacen un sitio ideal para el desarrollo de múltiples microorganismos.

En la mujer postmenarquica el endometrio secreta grandes cantidades de glucógeno después de la ovulación, que sirve de sustrato alimenticio para los lacto bacilos ácido, que lo transforma en ácido láctico, pero también para cualquier tipo de bacteria que se encuentre en la cavidad vaginal.

Fosch y Fogolin (2006) afirman en su estudio que la utilización de dispositivos intrauterinos está relacionada con un mayor riesgo de presentar vaginosis bacteriana, y que los anticonceptivos orales y antibióticos previos prescritos por otras causas son factores predisponentes relevantes para la candidiasis vaginal. Además que *Cándida albicans* tiene la capacidad de adherirse a diferentes partes del DIU, generando un Biofilm que parece tener relevancia a la hora de generar vulvovaginitis y recurrencia de las mismas, ya que se ha demostrado una tasa mayor de infección por *Cándida a.* en pacientes portadoras de DIU.

En la mayoría de los casos de infecciones vaginales también se asocia con frecuencia en mujeres usuarias de DIU. La frecuencia de colonización aumenta en forma exponencial al tiempo en que está instalado el DIU, especialmente después de los 4 años.

Un estudio realizado en Cuba por Cordoví y Castillo (2014) demuestra que las infecciones vaginales (Levaduras 47% y VB 40%) influyen de manera importante sobre la calidad del moco cervical.

El moco cervical es un fluido biológico secretado por las células del endocérnix, que cumple las funciones de selección, capacitación, nutrición, protección y guía del espermatozoide hasta el sitio de la fecundación, de manera que es considerado un factor importante para facilitar la fecundación.

Como se plantea, el moco cervical es importante en la fertilidad femenina, por sus funciones, pero su calidad se ve afectada por la sepsis vaginal endógena, por las malas técnicas de aseo y por el desconocimiento sobre el tema. Cuando el moco cervical es no apto imposibilita un embarazo. Mantener una flora vaginal óptima garantiza la calidad del moco cervical.

3.1 *Escherichia coli*

Se trata de una enterobacteria que se encuentra generalmente en los intestinos animales, y por ende en las aguas negras, pero se le puede encontrar en todos lados, dado que es un organismo ubicuo. Fue descrita por primera vez en 1885 por Theodore Von Escherich, bacteriólogo alemán, quien la denominó *Bacterium coli*. Posteriormente la taxonomía le adjudicó el nombre de *Escherichia coli*, en honor a su descubridor.

Las infecciones vaginales ocasionadas por *Escherichia coli* son muy comunes en mujeres por la corta longitud de la uretra (25 a 50 mm), en comparación con los hombres (unos 15 cm). Los malos hábitos sanitarios pueden predisponer a una infección, sin embargo, otros factores cobran importancia, como el embarazo y el uso indiscriminado de antibióticos.

3.2 *Proteus mirabilis*

Es una bacteria Gram-negativa, facultativamente anaeróbico en forma de bacilo que habita en el tracto intestinal del hombre y varios animales. Puede también ser aislado

de la tierra, agua y materia fecal. Se agrupa con las Enterobacteriaceae y es un patógeno oportunista en humanos causando infecciones urinarias, de heridas y abscesos hepáticos. Esta bacteria de colonias redondeadas tiene la habilidad de producir grandes niveles de ureasa.

Aunque es parte de la composición normal del intestino, también puede producir problemas graves, como varios tipos de infecciones. Las infecciones urinarias son la manifestación más común de las infecciones por *Proteus m.* causa aproximadamente el 90% de las infecciones por *Proteus m.* y es considerada una infección contagiosa.

3.3 *Staphylococcus aureus*

El *Staphylococcus aureus* pertenece a la familia *Micrococcaceae* en la que hay 20 especies diferentes, aunque el *Staphylococcus aureus* es el que con mayor frecuencia causa infecciones en el ser humano. Suele estar en la piel y en las membranas mucosas sin llegar a causar infección, pero cuando penetra en los tejidos, como puede ser en el caso de una herida, puede ocasionar una amplia gama de infecciones debido a su producción de toxinas o por la invasión y destrucción de los tejidos, lo que provoca otras enfermedades debido a la proliferación del estafilococo. En ocasiones puede entrar en el torrente sanguíneo desde el sitio de la infección y alcanzar otros tejidos distantes, como el cerebro o los pulmones.

3.4 *Staphylococcus epidermidis*

Es una de las 33 especies conocidas pertenecientes al género *Staphylococcus*. Es parte de la flora comensal de la piel y en consecuencia se considera parte de su flora normal. Aunque no suele ser patógeno, los pacientes con sistemas inmunes comprometidos son a menudo blanco de desarrollar una infección. Esas infecciones puede ser tanto nosocomiales o adquiridas en la comunidad, pero que representan una amenaza mayor para los pacientes del hospital. Este fenómeno puede ser el resultado de un uso continuo de antibióticos y desinfectantes en los hospitales.

4.0 FITOTERAPIA

La práctica de la Medicina Tradicional dio inicio en el momento mismo en que el hombre hizo uso de alguna parte de un vegetal, animal o mineral para contrarrestar sus padecimientos. Las plantas se usan para hacer medicinas, saborizantes o aceites aromáticos. A veces se usan las hojas, el tallo, las flores o las raíces. Algunas cualidades hacen que las plantas sean benéficas para el tratamiento de diversas patologías (Heinrich, M.2004).

Se han dado múltiples definiciones acerca de los diferentes términos utilizados para abordar el uso de las plantas naturales en la medicina, pero hasta ahora no existe uniformidad de criterios al respecto.

La fitoterapia es la ciencia que estudia la utilización de los productos de origen vegetal con la finalidad terapéutica, ya sea para prevenir, atenuar o curar un estado patológico.

La fitomedicina se define como la disciplina que emplea a las plantas medicinales como forma terapéutica desde un contexto científico, es decir, donde la droga vegetal (medicamento) ha sido analizada bajo criterios de investigación inertes a las diferentes fases de la metodología científica.

La fitoterapia clásica engloba el uso de las plantas medicinales en una práctica terapéutica pero bajo la perspectiva de uso empírico, folclórico o popular.

Las diversas formas de los productos medicinales tradicionales han evolucionado frente a entornos ampliamente diferentes en lo etnológico, cultural, climático, geográfico y aun filosófico.

Es por esta razón que decidimos utilizar la fitoterapia-fitomedicina como un tratamiento alternativo para las infecciones vaginales, incorporando los fitocomponentes de las plantas a través de extractos secos en una forma farmacéutica (ovulo) con la finalidad de que este contenga las propiedades esenciales suficientes para curar un padecimiento infeccioso vaginal.

Las principales propiedades que se buscaron en este trabajo:

- Antibióticas: ayuden a prevenir o eliminar la flora causante.
- Antiinflamatorias: ayuden a disminuir la irritación.
- Anti fúngico: ayuden a eliminar hongos y levaduras.
- Activadoras de la respuesta inmune: incrementen de la defensa celular.

Con todas estas propiedades medicinales de las plantas nos confieren la confianza para utilizarlas conjuntamente creando una sinergia entre ellas para un mejor resultado, dentro de estas plantas se tienen a: *Hippocratea exelsa* (antiinflamatoria y bactericida), *Hamamelis virginiana* (fortalece defensas y es antibiótico) y la *Caléndula officinalis* (antiinflamatoria con propiedad anti fúngica,) como la más importante, debido a que presenta todas las características antes mencionadas (Echemendia, C.2006).

4.1 PRINCIPIOS ACTIVOS DE LAS PLANTAS MEDICINALES

Los principios activos son sustancias que se encuentran en las distintas partes de las plantas y que alteran o modifican el funcionamiento de órganos y sistemas del cuerpo humano y animal. La investigación científica ha permitido descubrir una variada gama de principios activos, de los cuales los más importantes desde el punto de vista de la salud, son los aceites esenciales, alcaloides, glucósidos o heterosidos, mucilagos, gomas y taninos.

A partir de aminoácidos y de los ácidos grasos, las células vegetales forman miles de compuestos que tienen propiedades medicinales.

Los productos derivados del metabolismo secundario (no son esenciales para el metabolismo sino que son sintetizados como defensa, adaptación, etc.) se pueden clasificar en:

4.1.1 POLIFENOLES

Son sustancias que tienen un núcleo bencénico que soporta un grupo hidroxilo. Se suelen unir a azúcares para formar heterósidos pero también se pueden encontrar libres. Van desde sustancias muy simples, hasta complejas como las ligninas y taninos. Los grupos más importantes de este grupo son los ácidos fenólicos o fenoles, cumarinas, flavonoides, lignanos, taninos y quinonas.

a) ACIDOS FENOLICOS:

Los ácidos fenólicos son aril-carboxílicos, con uno o más grupos OH en el arilo. Sus acciones farmacológicas y aplicaciones son diversas, como antioxidantes, analgésicos, coleréticos, etc.

b) FLAVONOIDES:

Son los pigmentos naturales de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6) compuesto por dos anillos de fenoles ligados a través.

Son una familia muy diversa de compuestos, aunque todos los productos finales se caracterizan por ser poli fenólicos y solubles en agua.

Algunos dan color amarillo y el nombre general a estos principios, dado que flavus en latin significa amarillo, otros proporcionan la coloracion rojiza de las yemas, de los rebrotes o de las hojas de otoño. Tambien son responsables de los colores de muchos frutos.

La mayoría de los flavonoides tienen propiedades antioxidantes con la capacidad de neutralizar los radicales libres e impedir los perniciosos efectos que estos ejercen en la salud de nuestro organismo, tambien tienen propiedades anticancerosas, y cardiotonicas.

c) TANINOS

Son sustancias complejas que no es posible clasificar dentro de una estructura quimica unica, son sustancias polifenolicas hidrosolubles no nitrogenadas, de origen vegetal. Los hay hidrolizables y condensados.

Se encuentran principalmente en las raices, la corteza y pocas veces en las hojas de las plantas.

Estos compuestos tienen propiedades farmacológicas antibacterianas, astringentes, antisépticas, vasoconstrictoras (para hemorragias) y cicatrizantes (quemaduras). Internamente tienen propiedades antidiarreicas.

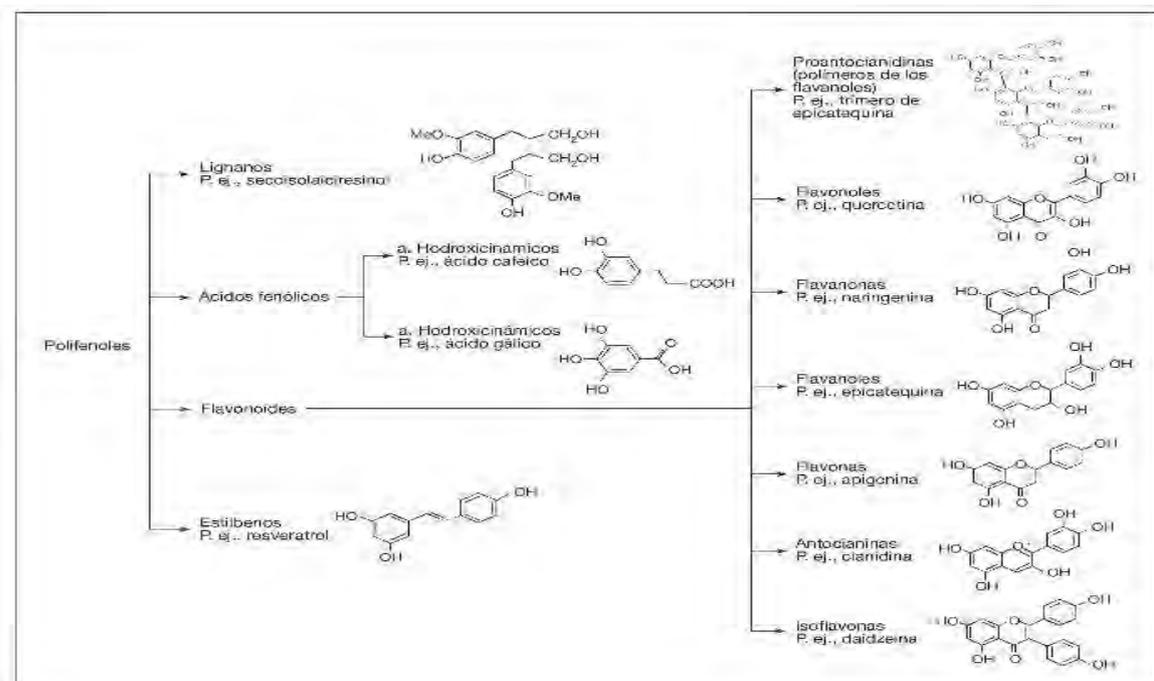


Figura No 4 Ejemplos de polifenoles y derivados.

5.0 PLANTAS MEDICINALES UTILIZADAS EN LA ELABORACION DE OVULOS VAGINALES.

5.1 CALÉNDULA: Caléndula officinalis.

5.1.1. GENERALIDADES

Caléndula officinalis	Datos generales	
	Nombre científico:	Caléndula officinalis
	Sinonimia popular:	Caléndula, azucena, clavel silvestre, flor de todos los meses, Maravilla, Reinita y Virreinita.
	Familia:	Asteráceas
	Parte utilizada:	Flor / pétalos

Figura No 5 Generalidades de *Caléndula officinalis*.

La primera referencia a esta planta se localiza en la obra de Vicente Cervantes, a finales del siglo XIII, comenta su uso por tener propiedades; emenagoga, sudorífica, vértigos y calenturas exantemáticas.

En el siglo XIX, Eleuterio González refiere a esta planta como antiespasmódica, resolutive. Se ha utilizado en amenorrea, clorosis, ictericia, escrófula, cáncer ulcerado, hipertrofias de matriz sin inflamación y contra las oftalmias crónicas.

En el siglo XX Maximino Martínez, la señala como: anticancerosa, antipalúdica, emenagoga, sedante analgésica, antiséptica. Finalmente Luis Cabrera la registra para amigdalitis, como antirreumática, antiséptica, conjuntivitis catarral y dispepsia.

La palabra "**caléndula**" viene del latín, de las *calendas* que designaban el primer día del mes. Ello se debe a que florece todos los meses del año, incluso en invierno, si éste no es muy frío. Los romanos, sin embargo, la llamaban Solsequium, que quiere decir "que sigue al sol" acción que realizan las flores de caléndula al igual que los girasoles (Gerhmann, B. (2005).

El botánico Dodoens escribía en 1578: "Tiene unas flores agradables, de color amarillo brillante, las cuales se cierran a la caída del sol y de nuevo se abren al alba" (Cechini, T. 2004).

5.1.2. DESCRIPCIÓN GLOBAL



Figura No. 6 Planta de Caléndula Tomada de Echemendia, C. (2006)

Planta anual o perene (dura más de un año) de 50 a 70 cm de alto. Las hojas no tienen soportes que las una con el tallo (sésiles) son más largas que anchas de 14cm de largo. Sus flores son cabezuelas del tipo de la margarita con lengüetas largas de color amarillo pálido a naranja, se cierra por la noche.

Generalmente sin jugo lechoso. Al menos las florecitas interiores del capítulo no tienen lígulas (Duke, J.2002).

Planta originaria del sur de Europa y de Oriente próximo, se encuentra presente en clima semiseco y templado. Cultivada en huertos familiares o asociada a bosque tropical caducifolio, matorral xerófilo y bosque mixto de pino-encino. Dispersa en todas partes, tanto en estado natural, como cultivada en baldíos y jardines (Cechini, T. 2004).

Cultivo y cosecha: la caléndula es de fácil cultivo, se siembran las semillas en un lugar soleado. Para una buena producción de flores, se recomienda sembrar en pleno sol durante el mes de Agosto. Para el fin de la temporada de lluvias las plantas comenzaran con su producción de flores, se pueden cosechar cada tres o cuatro días, así se estimulara su floración.

Conviene integrar la Caléndula a los cultivos de hortalizas y frutales, pues el olor distrae y aleja muchas plagas.

TALLO**HOJAS****FLORES****FRUTOS**

Figura No. 7 *Caléndula officinalis* y sus componentes

Tallos robustos y ramificados. Hojas de color verde pálido, alternas con dientes callosos, acintadas de hasta 14 cm de largo. Hojas muy aromáticas o brácteas, rara vez son espinosas. Estilo no engrosado ni peloso. Capítulos con flores hermafroditas. Todas las hojas son alternas o basales. Los capítulos no son pequeños y no están agrupados en glomérulos. Sin escamas en el receptáculo. Con lígulas. Los frutillos más externos son muy arqueados o anulares y con el dorso espinoso. Lígulas a menudo de 2 cm. Flores con sabor algo amargo, de 3 a 6 cm de diámetro. Sus colores oscilan entre el intenso anaranjado y el brillante amarillo y se cierran a media tarde (Gehrmann, B. 2005).

Los frutos son recurvados, casi anulares con espinas en su cara dorsal.

5.1.3. FITOQUIMICA Y PRINCIPIOS ACTIVOS

El órgano más estudiado en esta planta es la flor, la cual contiene un aceite esencial en el que se han identificado:

- Monoterpenos: carvona y geranil-acetona.
- Sesquiterpenos: dihidro-actinidiólido, epóxido de trans-cariofileno, alfa y beta-ionona, liliólido, oplapanona y penduculatina.
- Flavonoides: heterósidos de quercetol y de isorhamnetol, narcissina, isoquercetina e isoramnetina. (0.3 a 0.8%) (Duke. J. 2002).
- Glucosidos: ramnosil-rutinosido, D-glucósido, neohesperidosido y glucosidos del ácido oleanólico.
- Cumarinas: esculetin, escopoletin y umbeliferona.
- Triterpenos alfa y beta- amirína.
- Esteres: arnidenediol, arnidol, calenduladiol, calendulosido F, cofiladiol, metil ergostadienol, eritrodol, faradiol, heliantrol, longispinogeninaa, lupenetriol, lupeol, maniladiol y oleanetriol.
- Ácido y aldehído oleanólico y diez ésteres glucosídicos del ácido oleanólico, metil-estigmastadienol, taraxasterol y ácido málico (Ukiya, M., et.al.2006).
- Derivados de los ácidos: láurico, mirístico, palmítico y margárico.
- Esteroles: campesterol, ésteres de campesterol, colesterol, isofucosterol, beta-sitosterol y estigmasterol.
- Carotenoides: aurocromos, auroxantina, alfa, beta, gama, y épsilon caroteno, flavocromo, mutacromo, aurocromo, flavoxantina, crisantemaxantina, violaxantina, calendulina, zeina, licopeno y xantofilos (3%) (Bakó, E. et. al.2004).
- Polisacáridos: PS-I, PS-II, PS-III.
- Saponosidos: calenulósidos A, D, F, G y D2.
- Aceite esencial: pedunculatina, alfa y beta iononas trans cariofileno, lactona geranil y n-tricosamina.
- Sustancias amargas: calendina y caldeno (19%).
- Calendulina (sustancia amarillenta de consistencia mucilaginosa)
- Otros compuestos: agua, alcaloides, vitaminas, materias minerales, azúcares, albúmina, resinas, gomas, ácidos orgánicos (ácido salicílico) polinas, sales de magnesio y taninos (H, M. et. al.2003).

5.1.4. PROPIEDADES FARMACOLOGICAS Y PRINCIPIOS ACTIVOS

Principio activo	Efectos o propiedades	Aplicaciones
Aceite esencial (0.1-0.3%)	Antiséptico, antimicrobiano	Marcada actividad contra <i>staphylococcus spp</i>
Saponinas	Hipolipidémica, hipocolesterolémica	Auxiliar en enfermedades cardiovasculares.
Sesquiterpenos	paracitida	Frente a Tricomonas
Polisacáridos	Inmunoestimulantes	Activación del sistema inmune
Mucilagos, flavonoides, triterpenos, carotenos	Cicatrizante, antiinflamatorio	Para problemas dermatológicos
Flavonoides, fitoesteroles, aceite esencial	Estrogénico, emenagogo	Facilitadora de la menstruación
Calendeno	Aperitivo – eupéptico	Favorece la digestión
Aceite esencial, flavonoides	Colerético	Activa la producción de bilis, y sus sales biliares como función hepática

Tabla No 1 Propiedades de *Caléndula officinalis*

5.1.5 USOS Y APLICACIONES TERAPEUTICAS

Calendula officinalis: está indicado para úlceras, gastritis crónicas, amenorreas, dismenorreas, tratamiento de heridas, dermatosis secas, irritaciones cutáneas, quemaduras superficiales, picaduras de insectos, eritemas, prurito, conjuntivitis, vulvovaginitis, distrofia de la mucosa vulvovaginal.

La *Caléndula* no es irritante como fomento o ungüento para úlceras, quemaduras, hemorroides sangrantes y heridas. La *caléndula* se emplea con éxito como lavado nasal para problemas de los senos nasales.

También es valiosa para tratar infecciones vaginales, úlceras, prurito y sangrado. Como infusión caliente es apropiada para la fiebre, úlceras y calambres. El aceite se pone en los oídos y se deja toda la noche para dolor de oídos. El té fuerte puede emplearse como baño de asiento para hemorroides sangrantes (Humbart Santillo 2001).

5.1.6 PREPARACIONES DE APLICACIÓN GENERAL.

PREPARACIÓN	DOSIS	USOS RECOMENDADOS
Infusión	Remojar de 5 a 15 min. una cucharadita en un litro de agua hirviendo y tomar una taza al día.	Internos: hemorroides, fiebres, hemorragia, úlceras Externo: lavado de heridas
Tintura	De 15 a 30 gotas al día.	Internos: hemorroides, hemorragias, calambres, erupciones en la piel
Extracto líquido	½ a 1 cucharada tres veces al día	Internos: hemorroides, hemorragias, calambres, erupciones en la piel
Polvo	Capsulas de 15 a 60gr, tres veces al día	Tratamientos auxiliares
Tisana	Tomar una taza al día	antidismenorreico y emenagogo
Fomento	Colocar un paño o toalla remojada de te herbal sobre el área afectada. Repetir saturando la toalla con infusión periódicamente	Externo: Picadura de abeja, enfermedades de la piel, ulceraciones, heridas y venas varicosas.
Ungüento	Colocar sobre la piel o parte afectada, puede darse un ligero masaje si la zona no está muy afectada.	Externo: enfermedades de la piel, ulceraciones, venas varicosas.
Aceites	Gotas sobre la parte afectada, se aplica solo tópicamente.	Dolor de oídos

Tabla No 2 Aplicaciones de *Caléndula officinalis*

Las flores de *Caléndula officinalis* (Asteraceae) contiene glucósidos de iso-ranmetina y quercetina. En nuestro país es una droga de venta libre usada como antiinflamatoria y regeneradora del epitelio. El extracto alcohólico ha mostrado efecto positivo en el tratamiento de úlceras varicosas y lesiones en la piel.

5.2 CANCERINA: *Hippocratea excelsa*.

5.2.1 GENERALIDADES

<i>Hippocratea excelsa</i>	Datos generales	
	Nombre científico:	<i>Hemiangium excelsum</i> (sin. <i>Hippocratea excelsa</i>)
	Sinonimia popular:	Mata piojos, miseg-bat, barajillo, piojo zipche, palo de reguilete, yerba del cáncer, uluco.
	Nombre común:	Cancerina
	Familia:	Hippocrateaceae
	origen:	México
	Parte utilizada:	Corteza / Raíz

Figura No.8 Generalidades de *Hippocratea excelsa*

El nombre de Cancerina proviene del uso tradicional que se le da a esta planta en países de Latino América para los tumores y cáncer. La gente la usaba por sus propiedades de limpieza interna como infecciones uterinas.

En México la Cancerina ha sido y sigue siendo un recurso para buscar la cura a las enfermedades más comunes. Nuestro país ha sido geográficamente privilegiado, ya que posee una de las flores más ricas en el planeta y su herbolaria se ha enriquecido por la observación y paciencia de los pueblos que durante siglos, han buscado su poder en la curación.

5.2.2 DESCRIPCION GLOBAL

La Cancerina pertenece a la familia de plantas *Hippocrateaceae* que está integrada por más de 300 especies. La mayoría se encuentran en las regiones tropicales, de ambos hemisferios (Dodson y Robyns, 1995), que en su mayoría están contenidas en dos géneros: *Hippocratea* con alrededor de 100 especies y *Salacia* con 200 especies aproximadamente.

El género *Hippocratea* ha sido poco estudiado, la mayor cantidad de información existente es de tipo florístico o etnobotánico, con énfasis en el uso de la corteza para fines medicinales.

Debido principalmente a sus propiedades curativas, la especie ha sido objeto de una sobreexplotación que se piensa hoy podría llevarla a la extinción.



Figura No. 9 *Hippocratea excelsa* y sus componentes.

Arbusto o bejuco leñoso delgado más o menos erecto, crece sobre los arbustos o árboles pequeños de 10 cm de diámetro y hojas con consistencia de cuero. Crece en lugares secos o húmedos, con frecuencia se le encuentra en sitios pedregosos, en donde forma parte del bosque tropical caducifolio (Castillo, E.P, Monroy, O.C). Plantas medicinales utilizadas en el Estado de Morelos. Universidad del Estado de Morelos, México, 2000.) 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 abovado-dentados y se encuentran en racimos poco floreados. Sus frutos son elípticos capsulares de unos 6 cm. Fecha de floración: En el mes de noviembre.

5.2.3. FITOQUIMICA Y PRINCIPIOS ACTIVOS

De la corteza, raíz, tallo y hojas se han logrado aislar e identificar las siguientes sustancias químicas:

- Compuestos triterpenos: canofilol, ácido canafólico, friedelina, excelsita, pristimerina, celastridina y alcaloides
- Sesquiterpenos: emarginatina A
- Vitaminas: A, C y complejo B
- Minerales: calcio, cobre, potasio, fósforo, magnesio, hierro, zinc y sodio
- Otros componentes: β -amirina, sitosterol-3-O- β -glucosido, epicatechin, hidroxifriedelina, hidroxitaraxerol, hidroxiglutinol, esterol: 6 β -hidroxistigmast-4-en-3-one, hidroxiamirenona, dihidroxiamirenona, sesquiterpeno evoninoato, hoppelateina I y II, así como una mezcla de alcaloides sesquiterpénicos y taninos.

5.2.4 PROPIEDADES FARMACOLOGICAS Y PRINCIPIOS ACTIVOS

Se ha comprobado que ayuda a desinflamar moretones, lo que explica su uso para golpes y heridas. También se confirma un efecto gastroprotector por las fracciones activas: Sitosterol-3-O- β -glucosido, β -sitosterol, y epicatequina; en la pared del estómago.

La planta como un remedio contra la úlceras fue determinado por las fracciones aisladas de: friedelina, canopyullal y canofilol.

Con actividad anticancerígena en carcinoma epidermoide humano.

5.2.5 USOS Y APLICACIONES TERAPEUTICAS.

El nombre de Cancerina proviene del uso para tratar tumores o “áreas cancerosas”, es antiinflamatorio y cicatrizante.

Ha sido utilizada para el tratamiento de padecimientos renales y de vejiga (piedras).

Se emplea para curar la diarrea y el vómito en los niños, para matar piojos y otros ectoparásitos del hombre, tiene actividad insecticida contra cigarrita verde del arroz (*Nephotettix cincticeps* y *Nilaparvata lugens*). También se utiliza la corteza machacada, para inflamaciones e irritaciones de la piel. La cancerina es utilizada para problemas de úlceras gástricas, amenorrea y para problemas vaginales (flujo).

5.2.6 PREPARACIONES DE APLICACIÓN GENERAL

PREPARACIÓN	DOSIS	USOS RECOMENDADOS
Infusión	Remojar de 5 a 15 min. Una cucharadita en litro y medio de agua y tomar como agua de tiempo.	Internos: gastritis, úlceras, infección estomacal
Cocción	Hervir dos trozos pequeños en tres litros de agua.	Internos: para heridas y facilitar la cicatrización Antiinflamatorio
Extracto líquido	Hervir un pedazo grande de raíz, tomar como agua de uso	Inflamaciones y en lavados
Cocción	Un puñito de corteza en un litro de agua, como agua de uso	Para llagas crónicas y flujo vaginal blanco Exterior: lavado contra golpes y apostemas
Té herbal	Se hierve una cucharada (5 g) en un litro de agua	Aseo vaginal
Ungüento	Colocar sobre la piel o parte afectada, puede darse un ligero masaje si la zona no está muy afectada.	Externo: enfermedades de la piel

Tabla No 3 Propiedades de *Hippocratea excelsa*

Problemas en la vagina o flujos: Se utiliza la raíz de Cancerina y el Coscotomate (*Physalis coztomatl*), 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.

5.3 HAMAMELIS: *Hamamelis virginiana*

5.3.1 GENERALIDADES:

<i>Hamamelis virginiana</i>	Datos generales	
	Nombre científico:	<i>Hamamelis virginiana</i>
	Sinonimia popular:	Avellano mágico, avellano de bruja, nogal de las brujas, witch hazel (avellano flexible)
	Familia:	Hamamelidaceae
	Parte utilizada:	Hojas

Figura No. 10 Generalidades de *Hamamelis virginiana*

El Hamamelis es un arbusto floral originario de la región occidental de América del Norte, en especial Nebraska, Virginia, Minnesota, Texas y Florida, donde crece en bosques húmedos o empantanados de zonas templadas naturalmente. Fue introducido en Europa a finales del siglo XIX.

Los nativos americanos aprendieron a usar el Hamamelis con fines medicinales, utilizándolo para aliviar el sangrado, hinchazón, moretones, heridas externas, afecciones de la piel e infecciones vaginales.

El Hamamelis era altamente valorado en la medicina indígena, quienes le atribuyeron propiedades misteriosas. Muchas tribus lo frotaban sobre heridas, golpes y picaduras de insectos, articulaciones y músculos.

5.3.2. DESCRIPCIÓN GLOBAL

Hamamelis es un arbusto leñoso que puede alcanzar los 4 y 5 metros de altura.

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

Presenta un tallo ramificado y curvo, hojas ovaladas, delgadas, ligeramente coriáceas pero flexibles, con el margen entero o sinuoso-dentado de color verde oscuro en la cara superior y verde gris claro brillante en la inferior. Las flores pequeñas y de color amarillo brillante, presentan cuatro pétalos y solo florecen en otoño. Los frutos son pequeñas capsulas rodeadas en la base por el cáliz y la semilla es blanca.



Figura No 11 *Hamamelis virginiana* y sus componentes.

Las hojas se recolectan en verano y la corteza de las ramas en primavera. Como todas las sustancias que contienen taninos se recomienda que su conservación no sean superior a un año y se realice en ausencia de luz y humedad. Las semillas comestibles son expulsadas a larga distancia cuando el fruto madura y se abre.

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

5.3.3. FITOQUIMICA Y PRINCIPIOS ACTIVOS.

Los principales constituyentes de Hamamelis los podemos encontrar en las hojas y corteza:

Hojas:

- Taninos (7-10%): ácido gálico, elágicos y hamamelitanina.
- Ácidos fenólicos.
- Flavonoides: quercetina, quercitrina, kaempferol, isoquercitrina, l.-epicatequina, miricitina, flobaceno, leucociandina y leucodelfinidina.
- Trazas de aceite esencial: Safrol (0.02%), esterres alifáticos (15%) y alcohol alifático (40%)
- Proantocianocidos: principios amargos (0.01-0.50%)
- Saponinas
- Hidratos de carbono: hamamelosa

Corteza:

- Taninos: (10%) hamamelitaninos alfa, beta y gamma, condensados
- Trazas de aceite esencial:
- Saponosidos.
- Aceite esencial: sesquiterpeno.

La corteza de Hamamelis contiene taninos (hasta un 10%), contienen también una mezcla de galactanos y proantocianidinas, como en la hoja, sin embargo el contenido de hamamelitanino de la corteza es 30 veces superior al de la hoja, otros componentes son grasas y ceras.

La farmacopea española indica que la hoja de Hamamelis deberá contener como mínimo un 3.0% de taninos expresados como pirogalol, calculado a partir de droga desecada.

5.3.4. PROPIEDADES FARMACOLOGICAS Y PRINCIPIOS ACTIVOS

Entre las acciones farmacológicas del Hamamelis conviene destacar:

Taninos: producen un efecto astringente por lo que actúa como antidiarréico, hemostático local, cicatrizante y bactericida.

Los flavonoides ejercen un efecto venotónico y vasopresor; aumentan la elasticidad de las venas y la resistencia capilar, reducen la permeabilidad.

Acción antiinflamatoria, hemostática, antioxidante.

Un extracto concentrado de hoja de Hamamelis ha demostrado actividad antiviral *in vitro* contra virus de herpes HSV-1.

Por lo que se refiere a la corteza, el extracto acuoso y acetónico ha demostrado actividad antimicrobiana *in vitro* contra diferentes microorganismos (Bernat Vanaclocha, Cañigual; 2003).

5.3.5 USOS Y APLICACIONES TERAPEUTICAS.

El agua destilada de Hamamelis se utiliza como colirio en molestias oculares originadas por un esfuerzo ocular, irritaciones producidas tras baños en piscinas y en el mar y por irritaciones por humo. Tiene una interesante actividad antiinflamatoria y de ahí su uso como alternativa en tratamientos en lugar de corticoides en eritemas producidos por radiación UV.

Hamamelis está indicado para sangrado menstrual anormal, acné, antienvjecimiento, antiinflamatorio, antibacterial, antioxidante, ansiedad, pie de atleta, quemaduras, prevención del cáncer, trastornos circulatorios, resfríos, colitis, usos cosméticos, dermatitis, diarrea, edema, trastornos de la vista, fiebre, dolor de cabeza, hemorragia, virus del herpes simple, nivel elevado de azúcar en la sangre/intolerancia a la glucosa, picor, dolor, enfermedad periodontal, urticaria, psoriasis, dermatitis seborreica, brotes en la piel, tuberculosis, sequedad vaginal, enfermedad venérea, vómitos y prevención de arrugas.

5.3.6 PREPARACIONES DE APLICACIÓN GENERAL.

PREPARACIÓN	DOSIS	USOS RECOMENDADOS
Infusión	Una cucharadita por taza. Tomar dos tazas al día (hojas)	Interno: gastritis, úlceras y varices
Cocción	30 a 60 g/l, hervir 2 minutos, dos tazas al día. (corteza)	Interno: varices y facilitar la cicatrización y antiinflamatorio
Extracto liquido	1 a 4 g/día (1g = 38 gotas), en dosis de 30 gotas	Interno: Antiinflamatorio
Tintura	50-100 gotas, dos a tres veces al día.	Externo: dermatitis y eritemas
Extracto seco	0,3 a 1 g/día.	Afecciones de la piel
Ungüento/pomada	Colocar sobre la piel o parte afectada, puede darse un ligero masaje si la zona no está muy afectada.	Externo: infecciones vaginales prurito, eritemas y dermatitis

Tabla No 4 Aplicaciones de *Hamamelis virginiana*

6.0 FORMAS DE ADMINISTRACIÓN VAGINAL

Desde la Antigüedad y por mucho tiempo, los supositorios y óvulos fueron las formas utilizadas para la administración de sustancias medicamentosas por vía rectal y vaginal. Los excipientes utilizados para la preparación de estas formas farmacéuticas son las mismas y el método de preparación es análogo; sin embargo en la actualidad existen, otras formas diferentes, también de consistencia sólida o semisólida y líquida que también son empleadas.

La administración de medicamentos por vía vaginal se remonta a tiempos muy antiguos, el uso de esta vía persigue conseguir efectos locales: solo en casos excepcionales se utilizan fármacos destinados a ejercer efectos sistémicos (Palapop, R. 2003).

Consiste en introducir el medicamento en la vagina utilizandose diferentes formas farmacéuticas o preparaciones vaginales como:

a. Óvulos	b. Espumas vaginales
c. Comprimidos vaginales	d. Tampones vaginales medicamentosos
e. Cápsulas vaginales	f. Comprimido para disoluciones
g. Disoluciones, emulsiones y suspensiones vaginales	h. Pomadas o cremas

6.1. OVULOS VAGINALES

DEFINICIÓN

Preparaciones sólidas unidosis, con el propósito de lograr una acción local. Son de formas variables, pero generalmente ovoides, su volumen y consistencia están adaptados a la administración por vía vaginal. Contienen uno o más principios activos dispersados o disueltos en una base apropiada generalmente gelatina-glicerina que puede ser soluble o dispersable en agua, deben fundirse a la temperatura del cuerpo, la masa del ovulo varia de 1 a 15 g no superando este límite.

Se pueden colocar, mediante los dedos o con un aplicador. El principio activo se libera progresivamente en la vagina a medida que el ovulo se funde a la temperatura corporal.

Es recomendable colocar el ovulo a la hora de dormir por la noche para evitar goteo o escurrimiento fuera de la vagina, si se realiza en el día, usar compresas para no manchar la ropa.

6.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES

6.2.1. Excipientes

Los excipientes son sustancias inactivas utilizadas para incorporar uno o varios principios activos y también son útiles en el proceso de fabricación de un producto.

Los excipientes utilizados en la preparación tienen que ser adecuados para que la forma farmacéutica se funda a 37°C, además debe cumplir con una serie de propiedades como:

- a) Debe ser inocuo y bien tolerado por la mucosa vaginal.
- b) Inerte frente a los fármacos que se les incorporan y al mismo tiempo debe ser estable frente a la acción de agentes externos.
- c) Su consistencia no debe ser ni muy blanda ni muy rígida.
- d) Presentar poder de retracción al enfriarse para facilitar el vaciado del molde.
- e) Debe permitir la liberación rápida y completa.

6.2.1.1. Clasificación de los excipientes

Los excipientes empleados en la elaboración de la forma farmacéutica fueron seleccionados de manera apropiada para llegar a la formulación ideal, estos son inocuos debido a que no interfieren con las propiedades antiinflamatorias y antimicrobianas de los extractos, con lo que podemos afirmar que el producto terminado tendrá la eficacia esperada para un tratamiento completo contra infecciones cérvico-vaginales.

Para la preparación se emplean dos tipos de excipientes como se muestra en la tabla No.5, donde se aprecian sus características y ejemplos de los mismos.

Excipiente	Características	Ejemplos
Lipófilico	Más utilizado Acción emoliente Forman película hidrófoba protectora de la mucosa.	Manteca de cacao. Aceites hidrogenados. Aceites hidrogenados dispersables en agua.
Hidrofílico	No presenta problemas de conservación Irritación de la mucosa	A base de glicerina-gelatina. Polietilenglicoles.

Tabla No. 5 Clasificación de excipientes para la elaboración de óvulos.

El excipiente utilizado en la producción de los óvulos es a base de glicerol-gelatina, los cuales son una mezcla de estas: la gelatina es obtenida por hidrólisis parcial del colágeno animal, es una sustancia anfótera, incompatible con fármacos del tipo iónico. Este tipo de excipientes son adecuados en una concentración de 70% de glicerina, 14% gelatina, aunque puede aumentarse la proporción de esta última.

Bases gliceroladas; gelatina-glicerina está formada por un 60-70% de glicerina, 10% de gelatina y 30-20% de agua. Esta base es higroscópica y no recomendada para uso rectal. Actualmente la base glicerolada puede estar compuesta por glicerina (86%), estearato de sodio (9%) y agua (5%).

6.2.2. Elaboración

Los óvulos que se preparan en una base de gelatina-glicerina; primero disolviendo la gelatina en la mezcla glicerina-agua las cuales se encuentran a una temperatura de 30 – 35°C, y luego se le incorporan los extractos secos y se agita hasta su disolución completa. Después esta mezcla se vierte en moldes apropiados previamente desinfectados, se sellan por calor y el óvulo solidifica por enfriamiento, todo este procedimiento en condiciones estériles y con las medidas higiénicas adecuadas.

6.3. Ensayos

Dada la variedad de excipientes disponibles para la elaboración de los óvulos, es necesario realizar determinaciones físicas y químicas.

Dentro de estos ensayos se encuentran:

a) Datos generales de la muestra:

- | | |
|------------|-------------|
| 1. Color | 2. pH |
| 3. Textura | 4. Densidad |

b) Uniformidad de masa: Pesar individualmente 10 óvulos y determinar la masa media.

c) Disolución: Se utiliza para determinar la velocidad de disolución de los principios activos de formas sólidas.

7.0 METODOS

7.1 Metodo de Mossman

El MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazolio) es un reactivo de óxido-reducción que en condiciones de disminución de la concentración de oxígeno, como las generadas durante la actividad metabólica bacteriana, cambia de color: del amarillo (estado oxidado) al púrpura (estado reducido). Al reducirse, su solubilidad en medio acuoso disminuye y se produce la precipitación de cristales del reactivo. Esta técnica, permite la lectura visual de la reacción, de esta forma se determina si los extractos utilizados inhiben el crecimiento bacteriano.

Esta prueba se fundamenta en el uso de (MTT) como indicador, que detecta crecimiento y viabilidad celular.

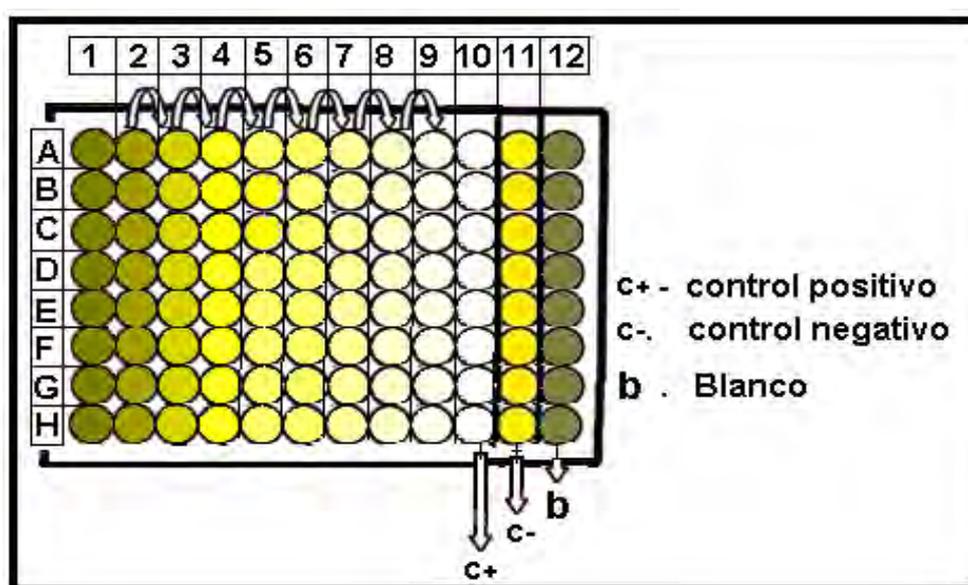


Figura No 12 Diagrama de diluciones por método de Mossman

7.2 Curva de calibración para flavonoides y polifenoles.

El método de química analítica que empleamos para medir la concentración de flavonoides y polifenoles es por medio de una curva de calibración directa y para la obtención de taninos es por medio de un kit espectrofotométrico.

Los datos proporcionados por Extractos Sigma S.A. de C.V. para las curvas de calibración utilizadas en la cuantificación son:

- **Cuantificación de flavonoides:**

Los flavonoides contienen al menos dos subunidades fenolicas; los compuestos que tienen 3 o más subunidades fenólicas se denominan taninos. Estos derivados fenólicos son sintetizados en cantidades substanciales por las plantas y comprenden alrededor de 4000 compuestos que poseen actividad antioxidante y capacidad para capturar radicales libres.

Peso del std se Rutina	15.2 mg
Volumen de aforo	10 ml
Absorbancia	510 nm
Concentración del estándar mg / mg	1.4288
Concentración del estándar mg / 100mg	142.88

Los cálculos para determinar la concentración de cada sistema se encuentran desglosados en el Anexo 2.

Preparación de sistemas:

Sistemas	1	2	3	4	5	6	7	8
ml std	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8
AlCl ₃	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
NaNO ₂	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
NaOH 1.0 M	2	2	2	2	2	2	2	2
Aforo (ml)	10	10	10	10	10	10	10	10
Concentración final(mg/100ml)	1.4288	2.8576	4.2864	5.7152	7.144	8.5728	10.0016	11.4304

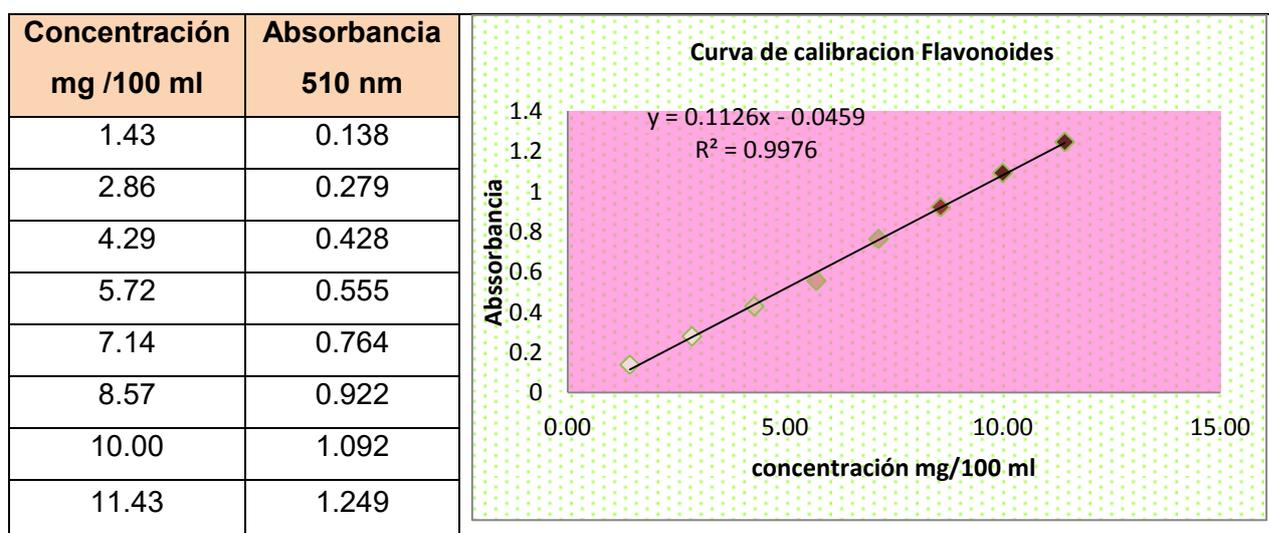


Figura No 13 Generalidades de curva de calibración para flavonoides.

- **Cuantificación de polifenoles**

Los polifenoles son un grupo de sustancias químicas encontradas en las plantas que cuentan por mas de un grupo fenol por molécula. Los polifenoles son generalmente subdivididos en taninos hidrolizables, esterres de ácido gálico de glucosa y otros azucares, fenilpropanoides, como lignina, flavonoides y taninos condensados.

Peso del std se Pirogalol	15.4 mg
Volumen de aforo	50 ml
Absorbancia	730 nm
Concentración del estándar mg / mg	0.30184
Concentración del estándar mg / 100mg	30.184

Preparación de sistemas:

Sistemas	0	1	2	3	4	5	6	7
ml std	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.35	4.0	4.5
Folin ml	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Na ₂ CO ₃ 5%	1	1	1	1	1	1	1	1
Aforo (ml)	10	10	10	10	10	10	10	10
Concentracion final(mg/ml)	0.30184	0.45276	0.60368	0.7546	0.90552	1.05644	1.20736	1.35828

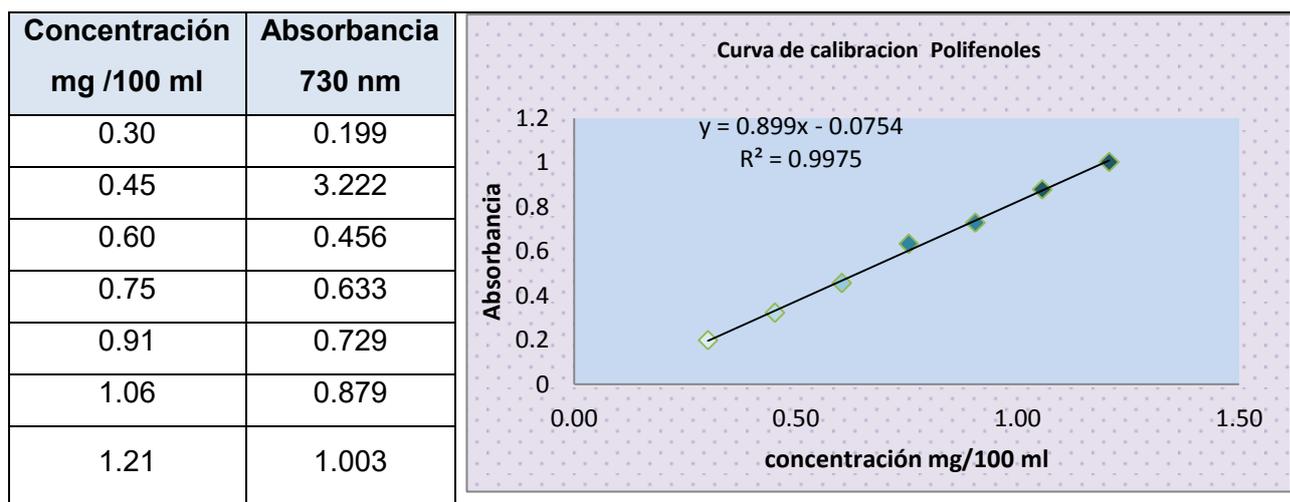


Figura No 14 Generalidades de curva de calibración para polifenoles.

La cuantificación de taninos se determina por un método integrado en el espectrofotómetro, solo se utilizo el método el método 8193 Tannin and Lignin (0.1 to 9.0 mg/L). y un kit para determinar la concentración de ácido tánico siguiendo la siguiente metodología:

Method 8193 Tannin and Lignin		
Reactivo	Blanco	Muestra
Agua desionizada	25 ml	-
Solución problema	-	25 ml
TanniVer® 3 tannin-Lignin	0.5 ml	0.5 ml
Sodium Carbonate	5.0 ml	5.0 ml
Tiempo de reacción	25 min	25min
Resultados	mg /L tannins	mg /L tannins

Figura No 15 Generalidades para la cuantificación de taninos.

8.0 OBJETIVO GENERAL

Elaboración de una forma farmacéutica sólida (óvulo) a base de los extractos secos de *Caléndula officinalis*, *Hamamelis virginiana* e *Hippocratea excelsa* para el tratamiento de infecciones cérvico vaginales humanas.

8.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener extractos etanólicos al 70 % de *Caléndula officinalis*, *Hamamelis virginiana* e *Hippocratea excelsa*.
2. Realizar pruebas de esterilidad y actividad microbiológica de cada uno de los extractos mencionados.
3. Cuantificar polifenoles, flavonoides y taninos, utilizando espectrofotometría UV.
4. Elaborar óvulos glicerinados por el método de inyección adaptado a las condiciones de trabajo.
5. Realizar pruebas de control al producto terminado.

9.0 PARTE EXPERIMENTAL

9.1 Material

- ✓ 6 Frasco vial de 5 Lt
- ✓ Embudo de filtración de plástico
- ✓ Papel filtro wathman poro mediano
- ✓ 3 Matraz Erlenmeyer de 1 Lt marca Pyrex
- ✓ 2 Membranas de filtración Millipore 0.45 μ
- ✓ Cristalizador marca Pyrex
- ✓ 4 Cajas Petri marca Kimax
- ✓ 1 Vaso de precipitado 1 Lt
- ✓ 2 Matraz Erlenmeyer de 250 ml Pyrex
- ✓ 3 Vasos de precipitado de 250 ml Pyrex
- ✓ Probeta de 250 ml Pyrex
- ✓ 4 Pipeta graduada de 10 ml Kimax
- ✓ Asa bacteriológica
- ✓ Mechero Fisher
- ✓ Pipetas volumétricas de 2 ml Kimax
- ✓ 2 Vaso de precipitado de 100 ml
- ✓ 4 Vial de 20 mL de capacidad
- ✓ 6 Viales de 60mL de capacidad
- ✓ 2 Espatulas
- ✓ 5 Barras magnéticas
- ✓ Papel aluminio
- ✓ 4 matraz aforado de 25 mL Pyrex
- ✓ 60 Tubos de ensaye
- ✓ 4 Vasos de precipitado de 50mL Pyrex
- ✓ 17 Tubos de ensaye grandes
- ✓ 3 Gradillas
- ✓ Vidrio de reloj Kimax
- ✓ Tijeras
- ✓ Pinzas
- ✓ Gasa
- ✓ Algodón
- ✓ Micropipetas de 100 μ

9.2 Reactivos

- ✓ Alcohol 70%
- ✓ SSF .9%
- ✓ Glicerina QP
- ✓ Gelatina grado USP
- ✓ Cloro concentrado
- ✓ Agua destilada
- ✓ Estericide desinfectante
- ✓ Benzal 0.5%
- ✓ Agua destilada
- ✓ DMSO (dimetilsulfóxido)
- ✓ Tren de Gram (tinción de Gram)
- ✓ MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol)

9.3 Medios de cultivo y Bioquímica

- ✓ Agar BHI
- ✓ Agar Cassman
- ✓ Agar McConkey
- ✓ Agar Sales y Manitol
- ✓ Agar Verde Brillante
- ✓ Agar Sangre
- ✓ Agar Nickerson
- ✓ Caldo BHI doble concentración
- ✓ Pruebas bioquímicas primarias
- ✓ Pruebas bioquímicas secundarias

9.4 Equipo e Instrumentos

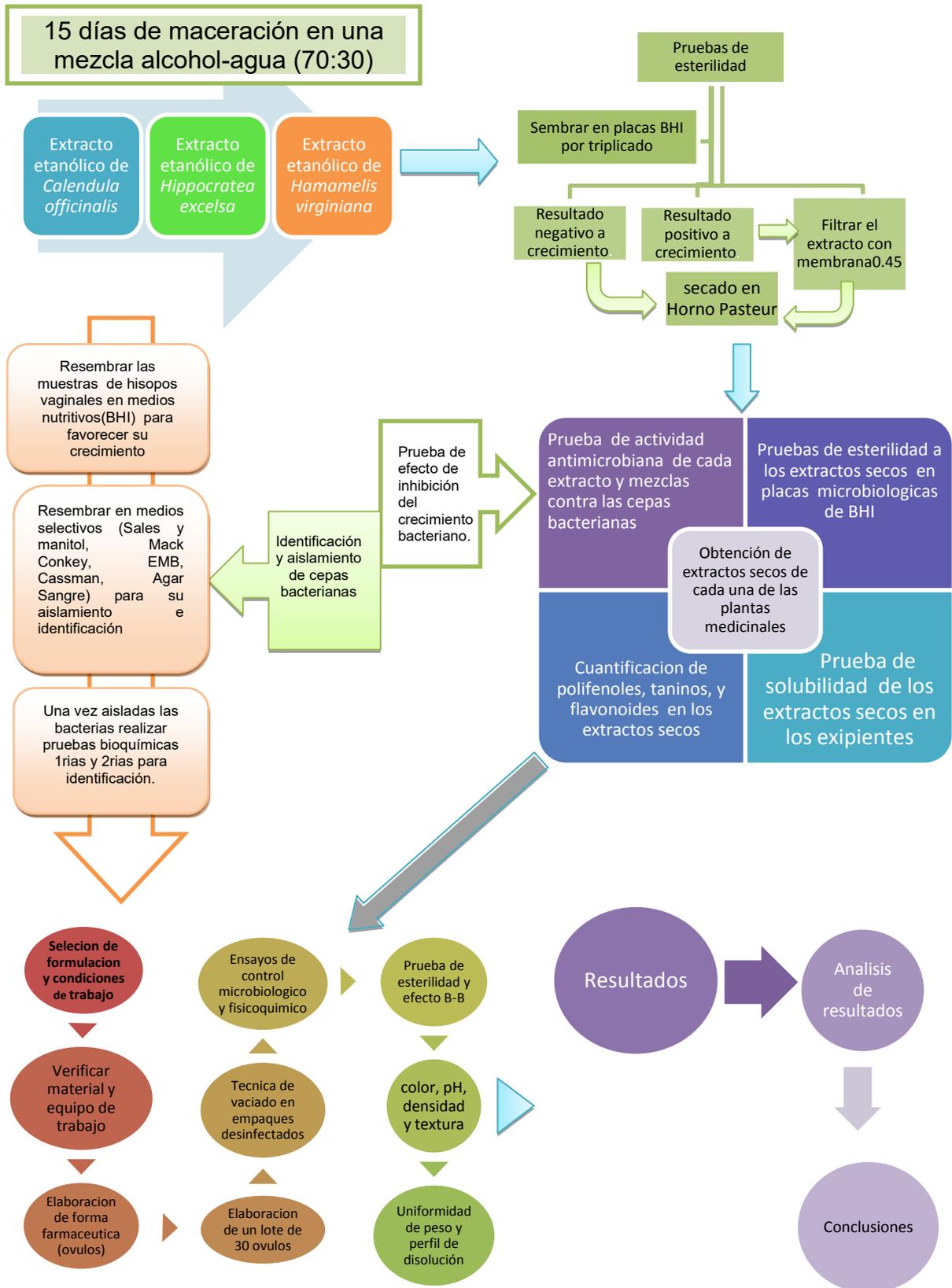
- ✓ Campana de flujo laminar VECO
- ✓ Parrilla electromagnética
- ✓ Autoclave
- ✓ Horno Pasteur Ríos S.A. Modelo HS-41
- ✓ Estufa Bacteriológica Ríos Rocha S.A.
- ✓ Mangueras de latex
- ✓ Soporte universal
- ✓ Nueces para soporte universal.
- ✓ Balanza analítica
- ✓ Bomba de aire
- ✓ Filtro de acero inoxidable
- ✓ Contenedor de acero
- ✓ Inoxidable
- ✓ Vortex
- ✓ Refrigerador

9.5. CEPAS BACTERIANAS:

Para realizar una de las pruebas más importantes que le da el soporte a este trabajo se recolectaron de muestras vaginales provenientes de mujeres con infecciones bacterianas, estas muestras fueron proporcionadas por el Departamento de Bacteriología del Hospital General de Zona (Nº 57 La Quebrada). Se trabajaron en el laboratorio de microbiología del área de posgrado realizando aislamiento e identificación de las siguientes bacterias:

- *Escherichia coli*
- *Candida albicans*
- *Gardnerella vaginalis*
- *Staphylococcus aureus*
- *Proteus mirabilis*
- *Staphylococcus epidermidis*

10.0 DIAGRAMA DE TRABAJO



11.0 METODOLOGÍA

11.1 Preparación de extractos etanólicos

1. Comprar las plantas medicinales de *Caléndula officinalis*, *Hippocratea excelsa*, y *Hamamelis virginiana*.
2. Secar las partes de cada planta a utilizar, en el caso de la Caléndula utilizamos los pétalos de las flores secas, de la Cancerina la raíz / corteza y del Hamamelis las hojas secas.
3. Pesar 20 g. de cada planta seca por cada litro de alcohol etílico, al 70%.
4. Preparar un volumen de extracto igual a 5 lt. para cada planta, en frascos vial de vidrio color ámbar.
5. Agitar tres veces por día la mezcla, para su maceración durante 15 días.
6. Filtrar con papel filtro la mezcla para eliminación de residuos orgánicos, en condiciones no estériles.
7. Filtrar nuevamente en condiciones de esterilidad, empleando una membrana Millipore de 0.45 con el equipo correspondiente estéril (vial contenedor) y en la campana de flujo laminar.
8. Guardar cada una de las mezclas en frascos color ámbar estériles rotulados con nombre, fecha y cantidad.

11.2 Prueba de esterilidad de los extractos etanólicos

1. Preparar Agar BHI para la prueba de esterilidad, siguiendo las indicaciones del medio de cultivo. Preparar 6 placas microbiológicas.
2. Utilizando un hisopo estéril para cada extracto, introducirlo en el extracto etanólico para que se humedezca.
3. Realizar un sembrado masivo en el Agar BHI, realizar la prueba por duplicado.
4. Incubar en la estufa bacteriológica a 37°C por 24-48hrs.
5. Revisar las cajas con el Agar BHI a las 24hrs y a las 48hrs.
6. Una vez que se verifico la esterilidad de cada extracto etanólico, continuar con la metodología para la obtención de los extractos secos.

11.3 Obtención de los extractos secos

1. Esterilizar los cristalizadores en los que se va a colocar los extractos fluidos.
2. Empleando la campana de flujo realizar el vaciado de los extractos etanólicos estériles en los cristalizadores, y colocar una doble tapa con aluminio.
3. Etiquetar cada uno de los cristalizadores con fecha y nombre del extracto.
4. Colocar el cristalizador en el Horno Pasteur a una temperatura no mayor de 45°C. hasta la sequedad del extracto, preferentemente entre 37°C y 40°C, abrir un poco un extremo de la tapa de aluminio para acelerar la evaporización de los solventes.
5. Una vez seco el extracto, desinfectar el área de trabajo con ESTERICIDE y con el apoyo de dos mecheros Fisher proseguir con la obtención del extracto.
6. Con una espátula estéril, realizar el raspado del cristalizador, en condiciones de esterilidad.
7. Almacenar el extracto seco (cristales) en un frasco ámbar, estéril y previamente pesado y rotulado con nombre del extracto, fecha y peso del vial.
8. Determinar el rendimiento del extracto seco, contemplando peso de los cristales por gramos de planta.
9. Repetir el procedimiento para cada extracto.

11.4 Prueba de esterilidad de los extractos secos

1. Pesar exactamente 50 mg extracto seco estéril.
2. Disolverlo en aproximadamente 0.5 ml de DMSO.
3. Llevar a un aforo de 10 ml con SSF estéril.
4. Sembrar en placas microbiológicas de BHI, realizar la prueba por duplicado.
5. Incubar en la estufa bacteriológica a 37°C por 24-48hrs.
6. Revisar las placas de BHI a las 24 hrs y a las 48 hrs.
7. Reportar la esterilidad de los extractos secos.

11.5 Cuantificación de polifenoles, flavonoides y taninos

1. Realizar una solución de cada extracto para su cuantificación.
2. Disolver 0.2 g aprox. de cada extracto y disolverlo en 10 ml de alcohol al 70 %.
3. Llevar a un aforo de 50 ml con agua destilada.
4. Tomar una alícuota y seguir la metodología para su cuantificación, tomando en cuenta los tiempos de cada reacción.

5. Metodología de cada reacción:

FLAVONOIDES			POLIFENOLES			TANINOS		
Reactivos	Vol.	Rxn	Reactivos	Vol.	Rxn	Reactivos	Vol.	Rxn
AlCl ₃	0.3 ml	6 min.	Folin	0.2 ml	0 min	TanniVer® 3 tannin-Lignin	0.5ml	-
NaNO ₂	0.3 ml	6 min.	Na ₂ CO ₃ 5%	1ml	2 hr			
NaOH 1.0 M	2 ml	6 min	Aforo	10ml	0 min	Sodium Carbonate	5.0 ml	25 min
Aforo (ml)	10 ml	0 min.						
Lectura		510 nm	Lectura		730 nm	Lectura		-

- Realizar la metodología de reacción por triplicado.
- Establecer el espectrofotómetro a la longitud de onda correspondiente a cada análisis.
- Calibrar el espectrofotómetro con el blanco correspondiente a cada análisis.
- Realizar las lecturas correspondientes.
- Reportar resultados y hacer cálculos para conocer la concentración de flavonoides, polifenoles y taninos en cada uno de los extractos secos.

11.6 Aislamiento e identificación de cepas bacterianas

- Recolectar muestras clínicas de exudados vaginales.
- Resembrar muestras en medios de cultivo nutritivos y posteriormente en medios de cultivo selectivos.
- Realizar pruebas bioquímicas primarias y secundarias para su identificación.
- Una vez identificadas y aisladas las cepas bacterianas, mantenerlas en un cepario.

11.7 Prueba de inhibición de crecimiento bacteriano en los extractos secos

- Preparar las soluciones madre de cada uno de los extractos secos pesando 1.5 g de cada uno de los extractos secos y disolverlos en 10 ml de SSF estéril y envasar la solución en frascos ámbar rotulados con nombre, fecha y cantidad.
- Preparar 10 ml de caldo BHI doble concentración y esterilizar 121°C/15lb/15 min en la autoclave para la realización de la prueba.
- Esterilizar a las mismas condiciones agua destilada y Solución Salina Fisiológica.
- Esterilizar material a trabajar como son pinzas de acero, tijeras, puntas para micro pipeta etc.
- Resembrar las cepas bacterianas en placas de BHI y Cassman para el caso de *Gardnerella vaginalis*. Para tener cepas jóvenes.

6. Realizar la prueba en una micro placa de la siguiente manera:

	P 1	P 2	P 3	P 4	P 5	P 6	P 7	P 8	P 9	C (+)	C (-)	B
A	100 µl de extracto concentrado + BHI 2 ()	100 µl de extracto concentrado + 100 µ de SSF								100 µl de SSF + 100 µ de cepa estandarizada	100 µl de SSF+ 100 µ de BHI 2 () sin cepa bac.	100 µl de BHI 2 () + 100 µ de extracto concentrado
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H			Volumen final 200 µl									

7. Incubar las placas en la estufa bacteriológica a 37°C por 24-48 hrs.
8. Revisar las placas para determinar la inhibición del crecimiento bacteriano.
9. Resembrar en una placa para evidenciar en crecimiento y/o inhibición del crecimiento bacteriano, empleando la reacción del MTT para realizar la lectura.
10. Observar la coloración morada para el crecimiento positivo.
11. Realizar cálculos para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria de cada extracto y obtener la cantidad proporcional al principio activo para la formulación de un lote de 50 óvulos a base de glicerina-gelatina.

11.8 Elaboración del lote de óvulos a base de glicerina-gelatina

Para la elaboración de la forma farmacéutica semisólida realizamos diferentes formulaciones cambiando las proporciones, se eligió la formulación con mejores resultados basándonos en el tiempo de disolución.

Se realizó un lote de 50 óvulos de glicerol-gelatina, y se prepararon de acuerdo con la siguiente formulación:

Ingrediente	Función	%	Cantidad por ovulo	Cantidad por lote (50 óvulos)
<i>Caléndula officinalis</i> extracto seco	Principio activo	-	170mg	8.5 g
<i>Hippocratea excelsa</i> extracto seco	Principio activo	-	170mg	8.5 g
<i>Hamamelis virginiana</i> extracto seco	Principio activo	-	170mg	8.5 g
Gelatina USP	Base c.b.p.	8.5	0.38g	19.12g
Glicerina	Disolvente	60	2.7ml	135ml
Agua destilada	Excipiente	31.5	1.41ml	70.87ml

Para la elaboración de un lote de 50 óvulos:

1. Mezclar las cantidades correspondientes de glicerina-gelatina-agua en una proporción (60:8.5:31.5).
2. Mezclar en su totalidad la gelatina con la mitad de volumen de glicerina y el agua. Agitar hasta disolución de la gelatina.
3. Esterilizar la mezcla anterior a 121°C/15lb/15 min en la autoclave y la glicerina sobrante.
4. En la campana de flujo laminar, agregar a la mezcla los extractos secos de cada planta al sobrante de glicerina.
5. Calentando y agitando suavemente para evitar la formación de burbujas, hasta la disolución y evitar que la temperatura sobrepase los 45°C.
6. Una vez que la mezcla es homogénea, mantener solo en agitación hasta que la mezcla disminuya su temperatura a aproximadamente a 37°C.
7. Realizar el vaciado en los empaques para óvulos previamente esterilizados, y esperar a la gelificación.
8. Guardar los óvulos empaquetados en refrigeración.
9. Realizar pruebas de control a los óvulos.

11.9 Pruebas de esterilidad del lote de óvulos.

1. Preparar 70 ml de Caldo BHI.
2. En 7 tubos grandes a cada uno añadirle 10 ml.
3. Esterilizarlos a 121°C/15lb/ 15 min.
4. Utilizar 5 tubos para realizar la prueba, colocarles 1 óvulo a cada tubo, en condiciones estériles.
5. Emplear un tubo sin ovulo como control negativo y otro como control positivo.
6. En el tubo empleado como control positivo, inocularlo con una bacteria de las cepas a trabajar.
7. Verificar que los tubos se encuentren bien cerrados herméticamente.
8. Incubar a 37°C en la estufa bacteriológica por 24 hrs.
9. Revisar los tubos, verificar la presencia de turbidez en los tubos como un resultado presuntivo y resembrar los tubos en una placa de BHI para un resultado confirmatorio.
10. Incubar a 37°C en la estufa bacteriológica por 24 hrs.
11. Revisar y reportar resultados.

11.10 Prueba de inhibición de crecimiento bacteriano.

1. Preparar 80 ml de Caldo BHI doble concentración, para las pruebas de inhibición y preparar 80 ml de de Caldo BHI doble concentración, para controles bacterianos.
2. En 8 tubos grandes a cada uno añadirle 10ml.
3. Esterilizarlos a 121°C/15lb / 15min.
4. Sembrar las siguientes bacterias empleando los 6 tubos con caldo BHI, ajustando al 0.5 de Mac Farland.

✓ *Candida albicans*

✓ *Proteus mirabilis*

✓ *Staphylococcus aureus*

✓ *Staphylococcus epidermidis*

✓ *Gardnerella vaginalis*

✓ *Escherichia coli.*

5. Usar otros 7 tubos de caldo BHI; 6 como control positivo de crecimiento de cada bacteria y un control negativo, los controles no llevan ovulo.
6. Para realizar la prueba se agrega un ovulo en el tubo de caldo BHI de cada bacteria.
7. Disolver el ovulo y después Incubar los tubos y los controles a 37°C por 24 hrs.
8. Realizar una lectura visual, para analizar la turbidez o nitidez de cada tubo.
9. Resembrar en Agar BHI comparando con los tubos controles.

10. Pasar 100 μ l de cada tubo a una placa para evidenciar en crecimiento y/o inhibición del crecimiento bacteriano, empleando la reacción del MTT para realizar la lectura.
11. Observar la coloración morada para el crecimiento positivo.

11.11 Prueba de efecto bactericida-bacteriostático

12. Tomar una asada de cada tubo que contiene óvulo y sembrarlo en Agar BHI.
13. Incubar 24 hrs a 37°C.
14. Revisar las placas para determinar tipo de efecto bactericida o bacteriostático, de acuerdo al crecimiento de las bacterias.
15. Reportar los resultados para cada una de las cepas bacterianas.

12.0 ENSAYOS PARA LA FORMA FARMACÉUTICA

12.1 Uniformidad de peso

1. Tomar una muestra aleatoria de 10 óvulos.
2. Pesar individualmente cada óvulo.
3. Registrar el peso de cada uno.
4. Promediar el peso de las muestras.
5. Anotar el peso promedio.

12.2 Perfil de disolución

1. Se emplearan 10 óvulos como muestra.
2. En 5 frascos viales colocar en cada uno 30 ml de Solución Salina Fisiológica y pH de 3, 4, 5, 6 y 7.
3. Colocarlos dentro de la estufa a 37°C.
4. Añadir a cada frasco un ovulo a 4°C (tiempo cero).
5. Repetir metodología con ovulo a 37°C.
6. Agitar suavemente con movimientos circulares cada minuto a partir del tiempo cero.
7. Tomar tiempo final de disolución y registrar los resultados para cada pH.
8. Repetir la metodología con óvulos a una temperatura de 37°C.

13.0 RESULTADOS EXPERIMENTALES

13.1 Plantas medicinales

Las plantas fueron obtenidas mediante un proveedor de plantas comercial, las cuales fueron sometidas a distintos análisis de identificación en el Laboratorio de Biología ubicado en la FES Cuautitlán Campo 4; y con los respectivos análisis de identidad de las plantas utilizadas verificamos realmente la autenticidad de las plantas para su posterior utilización.



Caléndula officinalis



Hippocratea excelsa



Hamamelis virginiana

Figura No 16 Plantas medicinales.

13.2 Extractos etanólicos de plantas medicinales

Los extractos etanólicos de ***Caléndula officinalis***, ***Hippocratea excelsa*** y ***Hamamelis virginiana*** fueron elaborados por medio de maceración durante 15 días, agitación constante y filtrados con membranas de 0.45-0.22 μ para verificar esterilidad. La prueba de esterilidad se realizó en medio de BHI, en el cual se sembró el extracto, en los resultados obtenidos no hubo desarrollo bacteriano. Los extractos analizados cumplieron con lo esperado en las pruebas de esterilidad.



Los extractos secos fueron obtenidos a través de la evaporación del solvente hidroalcohólico, en cristalizadores de vidrio y en un horno Pasteur a no más de 45°C,

aproximadamente de 15 a 20 días, la obtención de los extractos secos se realizo raspando el sedimento del cristalizador en condiciones estériles y guardando los extractos en un vial estéril de color ámbar, obteniendo el rendimiento de cada extracto partiendo de cuanta planta se peso: Caléndula 2.76 g / litro, de Cancerina 5.17g / litro y Hamamelis 2.92 g /litro.

EVAPORACIÓN DE SOLVENTE



OBTENCIÓN DEL EXTRACTO SECO



EXTRACTOS SECOS



Hamamelis virginiana



Hippocratea excelsa



Caléndula officinalis

La prueba de esterilidad de los extractos secos se realizó disolviendo 0.1 g en aproximadamente 3 gotas de DMSO, aforando a 3 ml SSF y sembrando en medio de BHI, los resultados obtenidos fueron positivos a esterilidad, no hubo desarrollo de crecimiento bacteriano.

Rendimiento final de los extractos secos:

Hamamelis virginiana: 14.6 g / lt

Hippocratea excelsa. 25.85 g /lt

Caléndula officinalis: 13.08 g /lt

13.3 Cuantificación de polifenoles, flavonoides y taninos en los extractos secos

Las plantas mediante el proceso de la fotosíntesis producen las sustancias necesarias para todos los ciclos vitales de la naturaleza. Mediante intrincados y cada vez más conocidos mecanismos bioquímicos las plantas tienen la capacidad de producir sustancias como los carbohidratos, las proteínas y las grasas, que los investigadores han denominado metabolitos primarios, existen otras que no se encuentran tan distribuidas y que se hallan restringidas solo a ciertas especies, géneros o familias como son los alcaloides, las saponinas esteroides, los aceites esenciales, los terpenoides, polifenoles, flavonoides, taninos, etc., a los cuales se les denomina metabolitos secundarios (Madellin Septiembre 2005).

Los flavonoides son un grupo de metabolitos ampliamente distribuidos en el reino vegetal presentes en diferentes órganos vegetales como frutos, hojas, flores y cortezas.

El empleo de estos compuestos en terapéutica ha sufrido varias fluctuaciones desde su introducción. En 1936 Rusznyak y Szent-Gyorgi fueron los primeros en poner de manifiesto sus efectos beneficiosos así como su actuación sinérgica con otros componentes como la vitamina C. El término flavonoide se introdujo hasta 1952 por Geissman y Hinreier. Desde entonces se les han atribuido un amplio número de actividades farmacológicas: antiinflamatoria, diurética, antiviral y antibacteriana, hepatoprotectora, estrogénica, antialérgica, antitrombótica, antiulcerosa y antioxidante.

En la actualidad, la búsqueda de nuevos fármacos que puedan ser empleados para el tratamiento de infecciones bacterianas ha generado estudios que demuestran la capacidad de los flavonoides para producir esta actividad sobre bacterias gran positivas y negativas. Un ejemplo de esta actividad es la inhibición del crecimiento bacteriano que parece ser dependiente de la estructura química de estos compuestos.

La cuantificación de flavonoides, polifenoles y taninos se llevó a cabo en la empresa de Extractos Sigma S.A. de C.V ubicada en Avenida Manuel Gómez Morín, No 25 Col. Ejido el Socorro, Cuautitlán Izcalli Edo de México (www.extractosigma.com.mx).

Se realizó la cuantificación de compuestos fenólicos (principios activos) de los extractos secos de cada una de las plantas utilizadas por medio de espectrofotometría, y por medio de una curva de calibración desarrollada por Extractos Sigma.

Resultados analíticos:

Los resultados obtenidos se interpolaron en la curva de calibración para obtener una concentración en la muestra:

1. Caléndula.

Peso del extracto seco: 0.2175 g

Volumen de aforo: 50 ml.

Resultados: Absorbancia

Caléndula officinalis					
Alícuota	Polifenoles	Alícuota	Flavonoides	Alícuota	Taninos: mg / ac tánico
2 ml	1.356	2 ml	0.338	25 ml	31.0
2 ml	1.360	2 ml	0.346	25 ml	32.0
2 ml	1.383	2 ml	0.352	25 ml	32.0
Promedio	1.366	Promedio	0.345	Promedio	31.66
Resultado mg eq pirogalol/100 ml	8.02	Resultado mg eq rutina/100 ml	13.28	Resultado Ovulo mg de Ac. tanico	1.24
Resultado ovulo 170mg	3.13	Resultado ovulo 170mg	5.18		

Tabla No 6 Resultados analíticos de las cuantificaciones de *Caléndula officinalis*.

Cálculos analíticos:

Tomando en cuenta la ecuación de la recta. Y: $mx + b$:

$$\frac{y-b}{m} = x$$

FLAVONOIDES

Y: Absorbancia

m: 0.1126

b: 0.0459

x: concentración ¿?

POLIFENOLES

Y: Absorbancia

m: 0.899

b: -0.0754

x: concentración ¿?

- FLAVONOIDES:

$$\frac{0.345 - 0.0459}{0.1126} = 2.66 \frac{\text{mg}}{100\text{ml}} \times \frac{10 \text{ ml}}{2\text{ml}} = 13.28 \text{ mg equivalentes a rutina/100ml}$$

Para calcular los mg de flavonoides por ovulo

$$\frac{13.28 \text{ mg de fl.}}{100 \text{ ml}} \times \frac{50 \text{ ml}}{100 \text{ ml}} = 6.64 \text{ mg de flavonoides}$$

$$\frac{6.64 \text{ mg de fl.}}{0.2175 \text{ g ex. seco}} \times \frac{0.17 \text{ g ovulo}}{100 \text{ mg}} = 5.18 \text{ mg de flavonoides por ovulo}$$

- POLIFENOLES:

$$\frac{1.366 - (-0.0754)}{0.899} = 1.603 \frac{\text{mg}}{100\text{ml}} \times \frac{10 \text{ ml}}{2\text{ml}} = 8.02 \text{ mg equivalentes a pirogalol/100ml}$$

Para calcular los mg de polifenoles por ovulo:

$$\frac{8.02 \text{ mg de Pf.}}{100 \text{ ml}} \times \frac{50 \text{ ml}}{100 \text{ ml}} = 4.01 \text{ mg de polifenoles}$$

$$\frac{4.01 \text{ mg de fl.}}{0.2175 \text{ g ex. seco}} \times \frac{0.17 \text{ g ovulo}}{100 \text{ mg}} = 3.13 \text{ mg de polifenoles por ovulo}$$

- TANINOS:

Para calcular los mg de acido tánico por ovulo:

$$\frac{31.66 \text{ mg de ac. tanico.}}{1000 \text{ ml}} \times \frac{50 \text{ ml}}{100 \text{ ml}} = 1.58 \text{ mg de ácido tánico}$$

$$\frac{1.58 \text{ mg de ac. tánico}}{0.2175 \text{ g ex. seco}} \times \frac{0.17 \text{ g ovulo}}{100 \text{ mg}} = 1.24 \text{ mg de ácido tánico por ovulo}$$

2. Hamamelis

Peso del extracto seco: 0.2215g

Volumen de aforo: 50 ml.

Resultados: Absorbancias

Hamamelis virginiana					
Alícuota	Polifenoles	Alícuota	Flavonoides	Alícuota	Taninos: mg / ac tánico
0.2 ml	1.034	0.5 ml	0.263	25 ml	36.0
0.2 ml	0.944	0.5 ml	0.260	25 ml	37.0
0.2 ml	1.031	0.5 ml	0.277	25 ml	38.0
Promedio	1.019	Promedio	0.266	Promedio	37.0
Resultado mg eq pirogalol/100 ml	60.87	Resultado mg eq rutina/100 ml	39.09	Resultado Ovulo mg de Ac. tanico	1.41
Resultado ovulo 170mg	23.35	Resultado ovulo 170mg	15.00		

Tabla No 7 Resultados analíticos de las cuantificaciones de *Hamamelis virginiana*

Cálculos analíticos:

Tomando en cuenta la ecuación de la recta. Y: $mx + b$: $\frac{y-b}{m} = x$

FLAVONOIDES

Y: Absorbancia

m: 0.1126

b: 0.0459

x: concentración ¿?

POLIFENOLES

Y: Absorbancia

m: 0.899

b: -0.0754

x: concentración ¿?

- FLAVONOIDES:

$$\frac{0.266 - 0.0459}{0.1126} = 1.95 \frac{mg}{100ml} \times \frac{10 ml}{0.5 ml} = 39.09 mg \text{ equivalentes a rutina}/100ml$$

Para calcular los mg de flavonoides por ovulo:

$$\frac{39.09 mg \text{ de fl.}}{100 ml} \times \frac{50 ml}{100 ml} = 19.54 mg \text{ de flavonoides}$$

$$\frac{19.54 mg \text{ de fl.}}{0.2215 g \text{ ex. seco}} \times \frac{0.17 g \text{ ovulo}}{100 ml} = 15.00 mg \text{ de flavonoides por ovulo}$$

- POLIFENOLES:

$$\frac{1.019 - (-0.0754)}{0.899} = 1.217 \frac{mg}{100ml} \times \frac{10 ml}{0.2ml}$$

$$= 60.87 mg \text{ equivalentes a pirogalol}/100ml$$

Para calcular los mg de polifenoles por ovulo:

$$\frac{60.87 mg \text{ de Pf.}}{100 ml} \times \frac{50 ml}{100 ml} = 30.43 mg \text{ de polifenoles}$$

$$\frac{30.43 mg \text{ de fl.}}{0.2215 g \text{ ex. seco}} \times \frac{0.17 g \text{ ovulo}}{100 ml} = 23.35 mg \text{ de polifenoles por ovulo}$$

- TANINOS:

Para calcular los mg de acido tánico por ovulo:

$$\frac{37.00 mg \text{ de ac. tánico.}}{1000 ml} \times \frac{50 ml}{100 ml} = 1.85 mg \text{ de ácido tánico}$$

$$\frac{1.85 mg \text{ de ac. tánico}}{0.2215 g \text{ ex. seco}} \times \frac{0.17 g \text{ ovulo}}{100 ml} = 1.41 mg \text{ de ácido tánico por ovulo}$$

3. Cancerina

Peso del extracto seco: 0.2218 g

Volumen de aforo: 50 ml.

Resultados: Absorbancia

Hippocratea excelsa					
Alícuota	Polifenoles	Alícuota	Flavonoides	Alícuota	Taninos: mg / ac tánico
0.3 ml	1.324	0.3ml	0.807	25 ml	36.0
0.3 ml	1.397	0.3 ml	0.740	25 ml	37.0
0.3 ml	1.367	0.3 ml	0.726	25 ml	38.0
Promedio	1.362	Promedio	0.757	Promedio	31.66
Resultado mg eq pirogalol/100 ml	53.30	Resultado mg eq rutina/100 ml	210.51	Resultado Ovulo mg de Ac. tanico	1.44
Resultado ovulo 170mg	20.43	Resultado ovulo 170mg	80.66		

Tabla No 8 Resultados analíticos de las cuantificaciones de *Hippocratea excelsa*.

Cálculos de cuantificación:

FLAVONOIDES

Y: Absorbancia

m: 0.1126

b: 0.0459

x: concentración ¿?

POLIFENOLES

Y: Absorbancia

m: 0.899

b: -0.0754

x: concentración ¿?

- FLAVONOIDES:

$$\frac{0.757 - 0.0459}{0.1126} = 6.32 \frac{mg}{100ml} \times \frac{10 ml}{0.3 ml} = 210.51 mg \text{ equivalentes a rutina/100ml}$$

Para calcular los mg de flavonoides por ovulo:

$$\frac{210.51 mg \text{ de fl.}}{100 ml} \times \frac{50 ml}{100 ml} = 105.25 mg \text{ de flavonoides}$$

$$\frac{105.25 mg \text{ de fl.}}{0.2218 g \text{ ex. seco}} \times \frac{0.17 g \text{ ovulo}}{100 mg} = 80.66 mg \text{ de flavonoides por ovulo}$$

- POLIFENOLES:

$$\frac{1.362 - (-0.0754)}{0.899} = 1.599 \frac{mg}{100ml} \times \frac{10 ml}{0.3 ml}$$

$$= 53.30 mg \text{ equivalentes a pirogalol/100ml}$$

Para calcular los mg de polifenoles por ovulo:

$$\frac{50.30 mg \text{ de Pf.}}{100 ml} \times \frac{50 ml}{0.2218 g \text{ ex. seco}} : 26.65 mg \text{ de polifenoles}$$

$$\frac{26.65 mg \text{ de fl.}}{0.2218 g \text{ ex. seco}} \times \frac{0.17 g \text{ ovulo}}{0.2218 g \text{ ex. seco}} = 20.43 mg \text{ de polifenoles por ovulo}$$

- TANINOS:

Para calcular los mg de acido tánico por ovulo:

$$\frac{37.66 mg \text{ de ac. tanico.}}{1000 ml} \times \frac{50 ml}{0.2218 g \text{ ex. seco}} : 1.88 mg \text{ de ácido tánico}$$

$$\frac{1.88 mg \text{ de ac. tánico}}{0.2218 g \text{ ex. seco}} \times \frac{0.17 g \text{ ovulo}}{0.2218 g \text{ ex. seco}} = 1.44 mg \text{ de ácido tánico por ovulo}$$

13.4 Aislamiento e Identificación de cepas bacterianas

Las muestras de hisopos vaginales provenientes de mujeres con infección vaginal fueron proporcionadas por el Hospital General de Zona # 57 (La Quebrada). Se procedió a trasladar las muestras al laboratorio 10 de Microbiología en el área de Posgrado, donde se realizó el procedimiento rutinario para el aislamiento e identificación de las bacterias implicadas. En primer lugar se realizo sembrado en medios de cultivo diferenciales y selectivos, posteriormente al tener las colonias aisladas se procedió a realizar pruebas bioquímicas primarias y secundarias para la identificación de cada cepa, manteniéndolas viables. En el anexo 2 podemos observar las pruebas realizadas a cada bacteria.

13.5 Prueba bactericida-bacteriostático en extractos secos

Esta prueba se realizo preparando cada solución madre tomando 1.5 g de extracto seco y se disolvió en 10 ml de SSF y tomando una alícuota de 100 µ para cada pozo en la prueba de micro placa, llevando a condiciones de incubación de 37°C / 24hrs y resembrando en

placa BHI cada prueba. Las cepas bacterianas se estandarizaron al nefelómetro de Mac Farland 0.5, y se utilizaron colonias de 24 hr. Este reto microbiano se trabajó para obtener la concentración mínima inhibitoria (CMI) y así conocer la efectividad de nuestro extracto seco como principio activo.

Calendula officinalis

A: *Gardnerella vaginalis*

B: *Escherichia coli*.

C: *Candida albicans*

D: *Staphylococcus aureus*

E: *Staphylococcus epidermidis*

F: *Proteus mirabilis*



Placa # 1 con extracto seco de Caléndula

En esta placa se observa que la CMI es de 7.5mg de extracto de Caléndula para ejercer un efecto antimicrobiano contra las bacterias utilizadas, a excepción de *Proteus mirabilis*

Hamamelis virginiana

A: *Gardnerella vaginalis*

B: *Escherichia coli*.

C: *Candida albicans*

D: *Staphylococcus aureus*

E: *Staphylococcus epidermidis*

F: *Proteus mirabilis*



Placa # 2 con extracto seco de Hamamelis

En esta placa se observa que la CMI es de 3.75mg de extracto de Hamamelis para ejercer un efecto antimicrobiano contra las bacterias utilizadas, a excepción de *Proteus mirabilis*.

Hipocratea excelsa

A: *Gardnerella vaginalis*

B: *Escherichia coli*.

C: *Candida albicans*

D: *Staphylococcus aureus*

E: *Staphylococcus epidermidis*

F: *Proteus mirabilis*



Placa # 3 con extracto seco de Cancerina

En esta placa se observa que la CMI es de 7.5mg de extracto de Cancerina para ejercer un efecto antimicrobiano contra las bacterias utilizadas, a excepción de *Proteus mirabilis*.

Caléndula officinalis, Hamamelis virginiana, Hipocratea excelsa

A: *Gardnerella vaginalis*

B: *Candida albicans*

C: *Escherichia coli*.

D. *Staphylococcus aureus*

E: *Staphylococcus epidermidis*

F: *Proteus mirabilis*



Placa # 4 con mezcla de los tres extractos secos

En esta placa se observa que la CMI es de 3.75mg de la combinación de los tres extractos para ejercer un efecto antimicrobiano contra las bacterias utilizadas, a excepción de *Proteus mirabilis*. Evidenciando la sinergia que existe entre los extractos.

La prueba colorimétrica de MTT demuestra que hay inhibición aproximadamente entre el pozo tres y cuatro, se confirmó el crecimiento bacteriano resembrando en placas BHI y se incubaron 24 /48 hr a 37 °C.

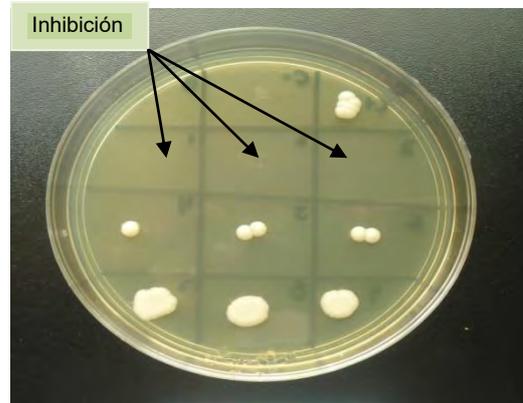
Inhibición del crecimiento bacteriano.

Resiembra en placas de BHI de la placa: resultados de la placa # 4

Candida albicans

Resultado: inhibición hasta el 3er pozo.

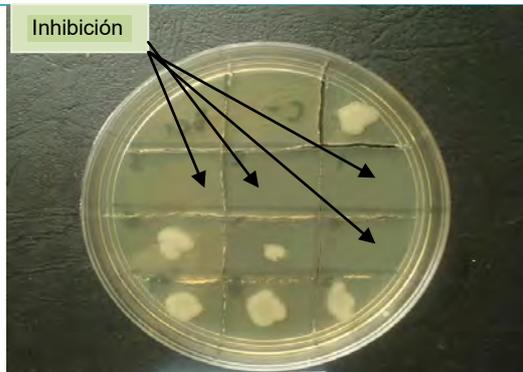
Concentración: 3.75 mg de extracto



Escherichia coli

Resultado: inhibición hasta el 4to pozo.

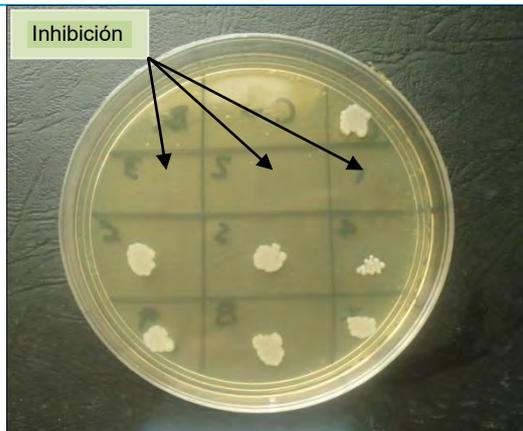
Concentración: 1.875 mg de extracto.



Staphylococcus aureus

Resultado: inhibición hasta el 3er pozo.

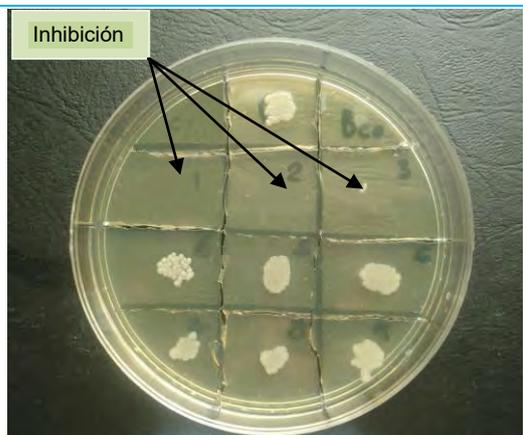
Concentración: 3.75 mg de extracto



Staphylococcus epidermidis

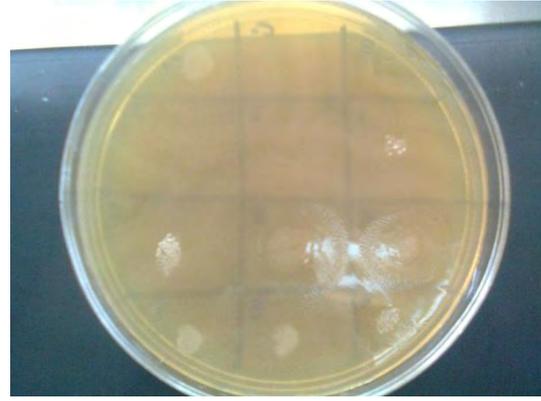
Resultado: inhibición hasta el 3er pozo.

Concentración: 3.75 mg de extracto



Proteus mirabilis

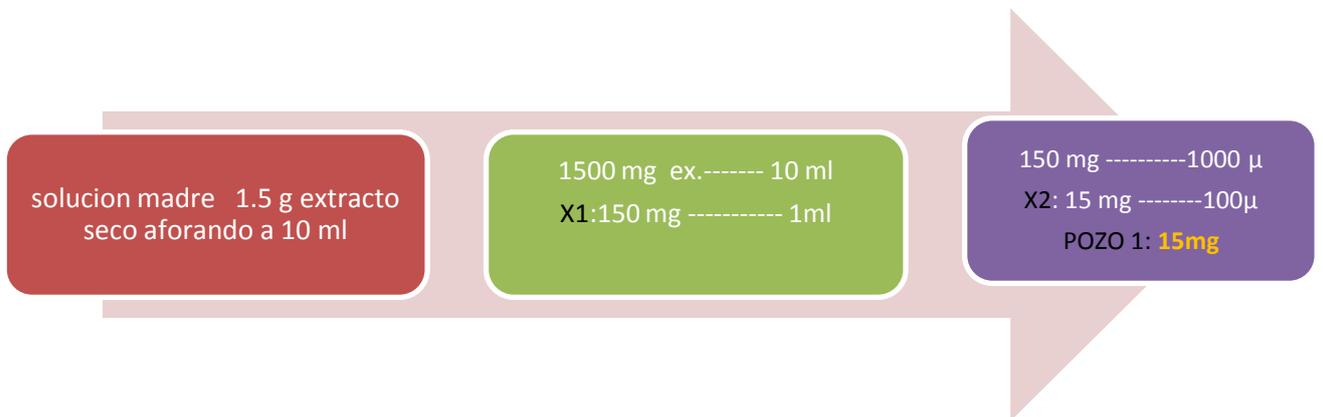
Resultado: no hubo inhibición



13.6 Concentración Mínima Inhibitoria efectiva para forma farmacéutica.

Para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria se hizo el cálculo de la siguiente manera:

Tomando en cuenta que se partió de una solución madre con 1.5 g de cada extracto seco:



Siguiendo la metodologia de las diluciones dobles en placa se tomó como pozo donde se observo la mayor inhibicion el cual se vio en el tercero pozo para todas las cepas bacterianas, la cual se consideró como la CMI para trabajar en la forma farmaceutica.

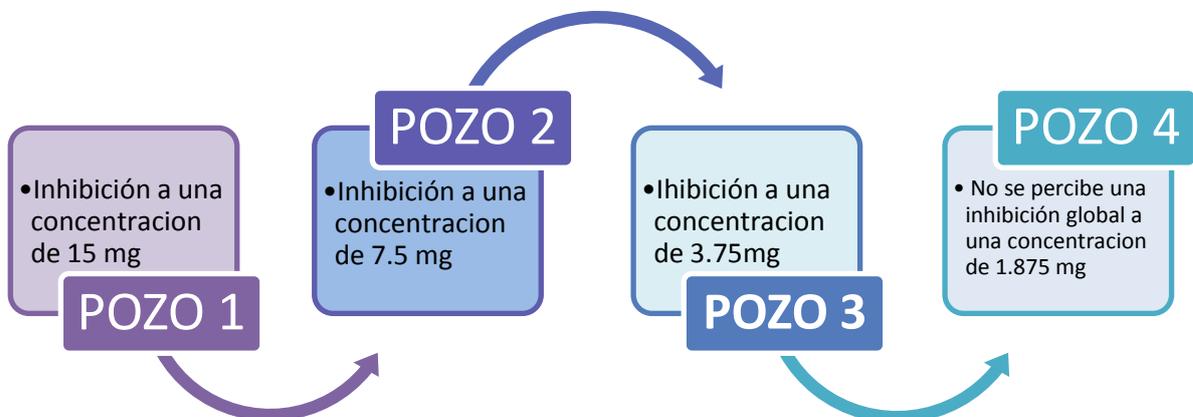


Figura No 17 Concentración Mínima Inhibitoria de extracto seco.

Haciendo los cálculos correspondientes tomando la CMI del 3er pozo para cada uno de los extractos obtenemos:

$$\frac{3.75 \text{ mg de ex. seco}}{100 \mu\text{l}} \times \frac{1000\mu\text{l}}{1} = 37.5 \text{ mg de extracto seco x ml}$$

Para calcular la cantidad en el ovulo:

Volumen de ovulo: 4.5 ml

$$\frac{37.5 \text{ mg de ex. seco}}{1 \text{ ml}} \times \frac{4.5 \text{ ml de ovulo}}{1} = 168.75 \approx 170 \text{ mg de extracto seco x ovulo}$$

Si partimos que de cada extracto necesitamos 170mg por extracto nuestra forma farmacéutica quedaría de 510mg de principio activo.

13.7 Elaboración de un lote de óvulos a base de glicerina – gelatina.

Para el lote de 50 óvulos se necesitan 8.5 g de cada extracto.

La elaboración de nuestro lote de óvulos se llevo a cabo siguiendo la metodología explicada anteriormente.

Mezcla de glicerina – gelatina



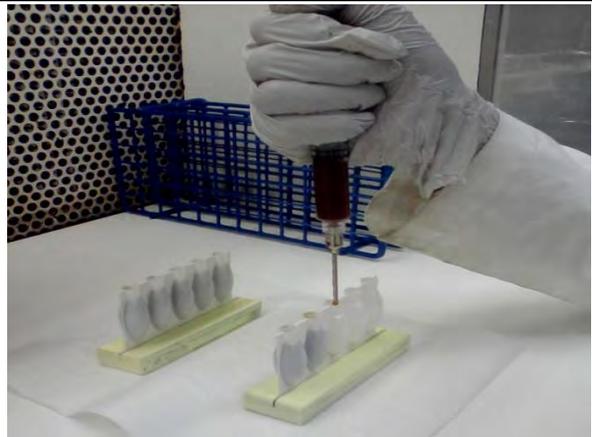
Mezcla glicerina – gelatina – extractos secos



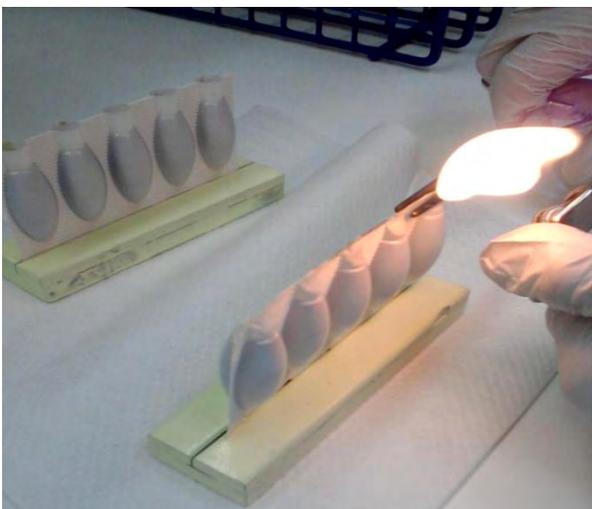
Mezcla homogénea de extractos secos



Llenado manual en blíster desinfectados



Sellado de los Empaques



Ovulo como Producto Final



Resultado final como forma farmacéutica; un lote de 50 óvulos a los cuales se les realizó pruebas de control:

Prueba de esterilidad al lote de 50 óvulos

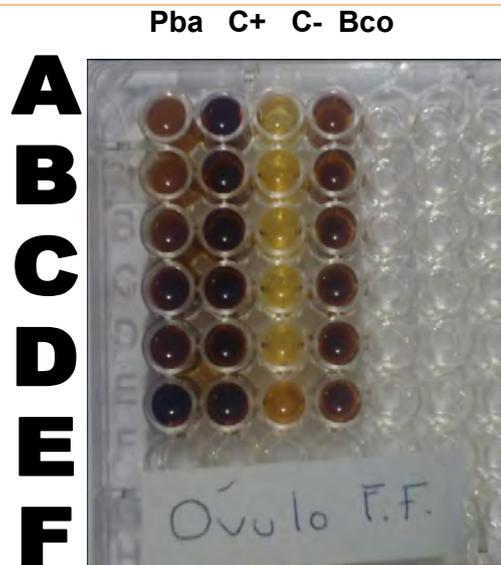


Prueba de esterilidad con cinco óvulos en BHI, incubados 24/48 hrs 37°C
Resultados: positivo a esterilidad; negativos a crecimiento bacteriano

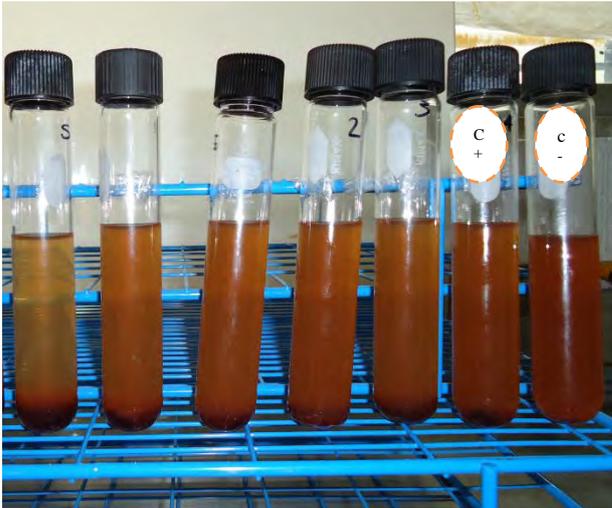
13.8 Prueba de inhibición del crecimiento bacteriano en el ovulo

En la prueba realizada se determino:

- A:** *Gardnerella vaginalis*: inhibición :+++
- B:** *Escherichia coli*: inhibición :+++
- C:** *Candida albicans*.: inhibición :++-
- D:** *Staphylococcus aureus*: inhibición :++-
- E:** *Staphylococcus epidermidis*: inhibición :++-
- F:** *Proteus mirabilis*: inhibición :- - -



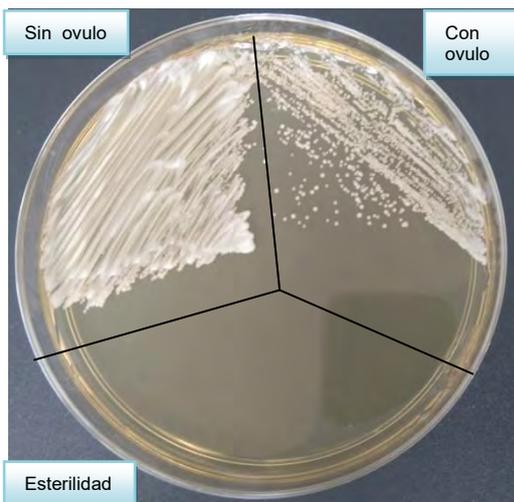
13.9 Prueba del efecto bactericida – bacteriostático en el ovulo



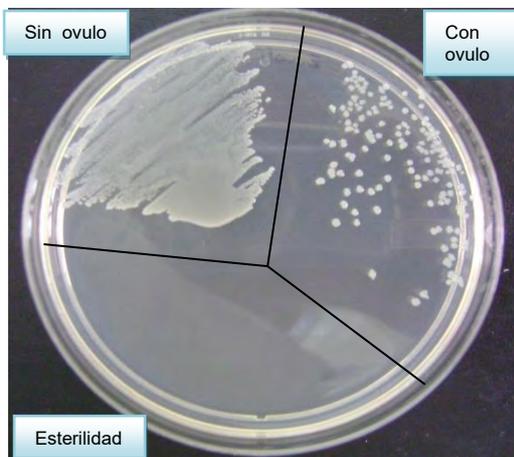
En esta prueba se enfrento un ovulo y cada cepa al 0.5 del Nef.de Mc F. incubando 24 hrs / 37 °C y resembrando en placas de BHI

Esta prueba se realizo con cada una de las bacterias utilizadas, posteriormente se resembró en placas obteniendo los siguientes resultados:

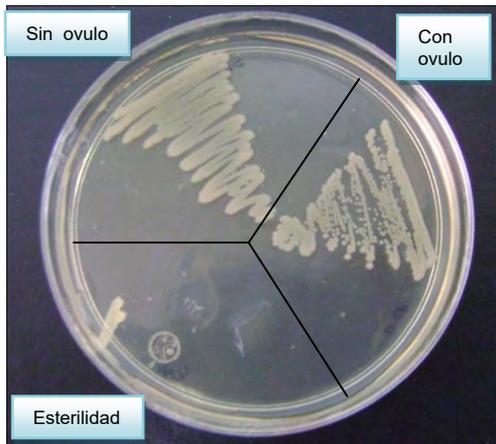
Placas de BHI:



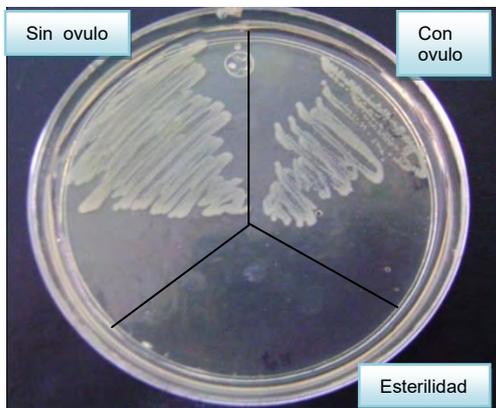
Escherichia coli: posible efecto bactericida con un tratamiento de 3 a 4 días.



Candida albicans: posible efecto bactericida con un tratamiento de 3 a 4 días.



Staphylococcus aureus: efecto bacteriostático



Staphylococcus epidermidis: efecto bacteriostático



Proteus mirabilis: efecto bacteriostático

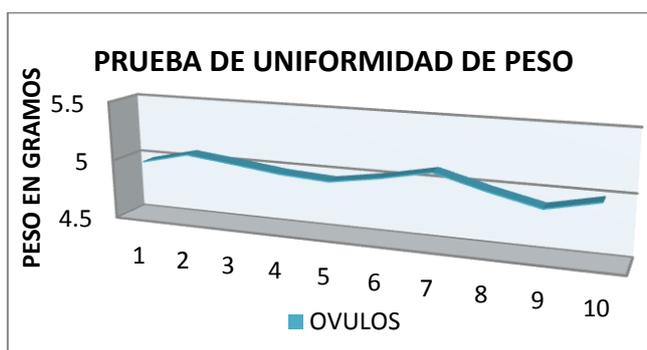
14.0 Ensayos para la forma farmacéutica.

El lote de 50 óvulos se analizó a través de las siguientes pruebas:

14.1 Uniformidad de peso

Los resultados observados la apariencia, la textura y el color de cada óvulo a emplear, factores indicaron que la forma farmacéutica fue elaborada con altos estándares de calidad.

<i>Número de óvulo</i>	<i>Peso</i>
1	4.9783
2	5.0720
3	5.0268
4	4.9780
5	4.9534
6	5.0180
7	5.1020
8	4.9904
9	4.8069
10	4.9881
Promedio	4.9913



Color: café – ámbar

Textura: Suave



Figura No 18 Prueba de Uniformidad de peso (g).

En la determinación de la uniformidad de peso observamos que el peso de los óvulos fue uniforme, teniendo un peso medio de 4.9913g. La apariencia de nuestra forma farmacéutica fue aceptable a simple vista, el color y la textura fue adecuada a la forma farmacéutica, realizamos ensayos de producción cambiando la concentración de cada uno de los excipientes; así obtuvimos nuestra formulación de trabajo.

14.2 Perfil de disolución

La prueba se realizó utilizando 10 óvulos; cambiando las condiciones de trabajo. Utilizamos dos temperaturas diferentes (4°C y 37°C) y cinco pH's diferentes (pH: 3, 4, 5, 6 y 7) con la finalidad de descartar que las condiciones como la temperatura a la que se encuentra el óvulo y el pH en la vagina afecten la liberación de los principios activos.

Para esta prueba se utilizó solución salina fisiológica 0.9 % estéril, realizando la simulación del movimiento corporal agitando levemente por intervalos de 60 segundos.

TIEMPO DE DISOLUCIÓN		
pH de solución de trabajo	Temperatura del ovulo	
	4°C	37 °C
3	6´ 20"	5´ 38"
4	6´ 50"	5´ 40"
5	6´ 42"	5´ 55"
6	5´ 02"	5´ 07"
7	6´ 36"	5´ 46"

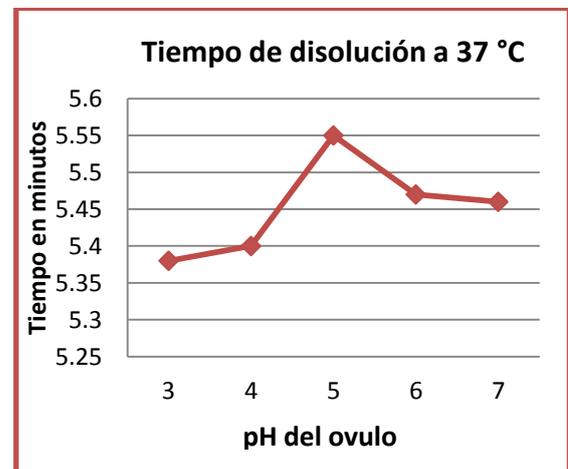
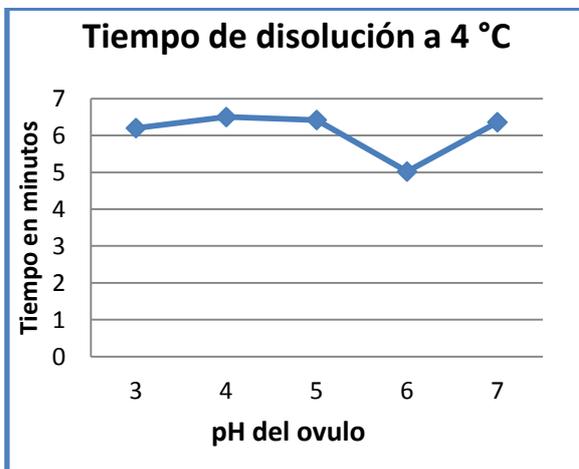
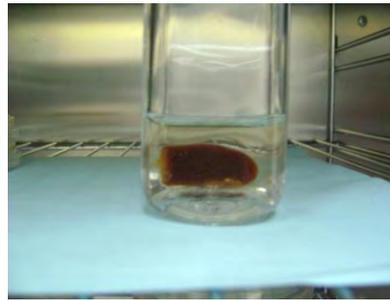
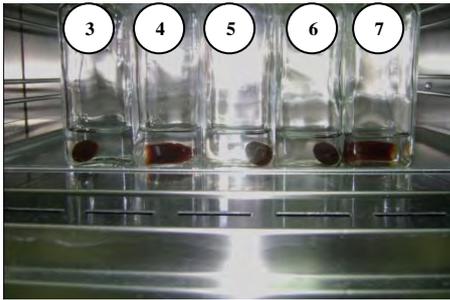
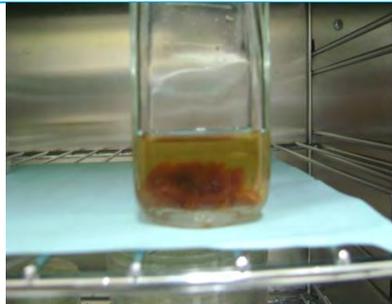
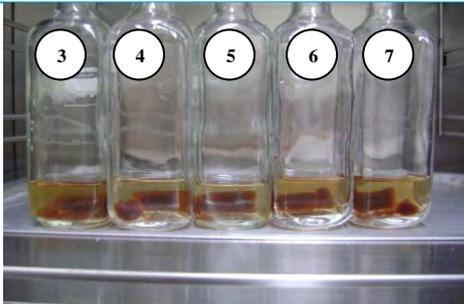


Figura No 19 Tiempo de disolución de la forma farmacéutica

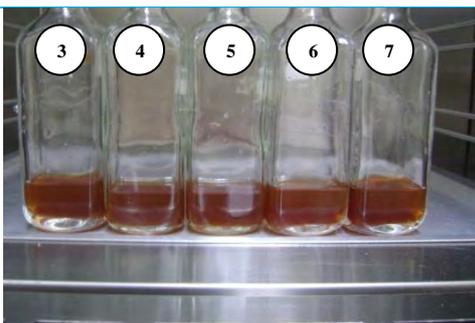
Prueba de disolución:



Tiempo cero, inicio de la prueba.



Tiempo aproximado a los 3 minutos.



Tiempo final de disolución.

La evaluación de la disolución, es una prueba de calidad in vitro, la cual proporciona información sobre el comportamiento de la forma farmacéutica in vivo. Con la información obtenida a partir de esta determinación, encontramos que el tiempo medio de disolución es de 6.13 minutos para la temperatura de 4°C y de 5.37 para la temperatura de 37°C, en donde aproximadamente el 80% del contenido activo se libera. En esta prueba evaluamos dos variables determinando también la estabilidad del ovulo a 4 °C, y 37°C, los resultados obtenidos determinan que las condiciones de pH no afectan de manera determinante la disolución de un ovulo para la liberación de nuestros principios activos.

15.0 DISCUSION Y ANALISIS DE RESULTADOS:

Con el paso de los años, la medicina tradicional toma importancia relevante como una alternativa en el tratamiento de diferentes enfermedades y padecimientos, esto aumenta la necesidad de conocer a detalle las propiedades implicadas en la actividad terapéutica de las plantas utilizadas para dicho fin.

La medicina tradicional, complementaria y alternativa suscita un amplio abanico de reacciones, desde el entusiasmo no crítico hasta el escepticismo no informado. El uso de la medicina tradicional (MT) sigue estando muy extendido en los países en vías de desarrollo, mientras que va aumentando rápidamente en los países desarrollados. En muchos lugares del mundo, los responsables de las políticas, los profesionales sanitarios y el público se debate con preguntas sobre la seguridad, la eficacia, la calidad, la disponibilidad, la preservación y con el desarrollo de este tipo de atención sanitaria.

Las infecciones vaginales son una de las principales causas de consulta ginecológica a nivel mundial. La vaginosis bacteriana (VB), la Tricomoniasis y la candidiasis son posiblemente los padecimientos ginecológicos más frecuentes. La VB ocurre por desplazamiento de la flora vaginal habitual constituida principalmente por Lactobacilos productores de H_2O_2 , siendo reemplazada por otras bacterias como: *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides spp*, *Prevotella spp*, *Mobiluncus spp* y *Mycoplasma hominis* (complejo GAMM). Al desaparecer la protección del Lactobacilo, disminuye la concentración de H_2O_2 y el ámbito vaginal pasa a tener una menor concentración de O_2 , favoreciendo la proliferación de anaerobios y *Gardnerella vaginalis*, habituales de la vagina en concentraciones no significativas (1.000 a 10.000 ufc/g). En el 80 a 90% de las vaginosis bacterianas se aísla *Gardnerella vaginalis* y aún en el 20 a 40% de las que no presentan la vaginosis.

Las decarboxilasas y aminopeptidasas de las bacterias anaerobias y *Mycoplasma hominis*, utilizan los productos de degradación proteica y transforman los aminoácidos producidos (lisina, ornitina y arginina) en aminas (trimetilamina, putrescina y cadaverina) responsables de la fetidez. Estas aminas aumentan el pH vaginal (por encima de 4,5) dificultando aún más la producción de Lactobacilos. Existe un aumento de ácidos orgánicos en especial el succínico junto a disminución del láctico. La vaginitis, caracterizada por ardor, comezón, flujo, inflamación de la vagina, es frecuente en la mujer. El principal agente etiológico de la candidiasis vaginal y el de otras infecciones ginecológicas como la Enfermedad pélvica inflamatoria es *C. albicans* (Flores, P., 2003).

De acuerdo a trabajos como los de Barrenextea (2002) y Meis (2001), el tratamiento recomendado en el caso de las infecciones vaginales humanas son los antibióticos que tienen en su estructura un anillo imidazólico, como lo es el clotrimazol, fluconazol y metronidazol, esta clase de fármacos actúan principalmente inhibiendo la síntesis de la pared celular y que son medicamentos de tercera generación, que también presentan reacciones adversas, contra los cuales podemos encontrar que ya existe resistencia a estos por parte de las bacterias causantes, es por ello la necesidad de una alternativa en contra de estas, y que mejor un producto herbolario el cual es fácil de elaborar y que presenta un bajo costo, el cual sería accesible para las mujeres que presentan esta enfermedad, en comparación con un medicamento de alto costo y que puede provocar los problemas antes mencionados (Angeles, R. 2008).

Para la realización de este trabajo se conto con el apoyo de la Responsable de laboratorio de Bacteriología del Hospital General de Zona No 57 (La Quebrada) quien nos proporciono las muestras de exudados vaginales provenientes de pacientes que presentaban diagnóstico de infección vaginal. Estas muestras se trabajaron en el Laboratorio 10 de Edificio de Posgrado de Campo 1 de la FES Cuautitlán, realizando el aislamiento e identificación de seis principales bacterias implicadas en estos padecimientos; *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Proteus mirabilis*. Flores Paz, R. (2003) mencionó que el microorganismo con mayor frecuencia encontrado en estas infecciones en México es *Gardnerella vaginalis* con una frecuencia de 22.5% seguido de *Candida albicans* con 19.13%, *E. coli* con el 13.76%, *S. aureus* con 1.2% y *P. mirabilis* con 1.07%.

Las plantas medicinales *Calendula officinalis*, *Hipocratea excelsa*, *Hamamelis virginiana* se compraron en el mercado Sonora y se realizó la identificación confirmatoria a cargo del Laboratorio de Biología de la FES Cuautitlan Campo 4. Para la obtención de los extractos secos de las mismas se realizó un proceso de secado de las partes a utilizar. Se ha demostrado desde el punto de vista farmacognóstico que la forma de secado no produce cambios significativos, ni tampoco incide sobre la presencia de los metabolitos secundarios (García, D. 1996). Empleamos el secado a la sombra de los capítulos y a una temperatura de 25°C, que es temperatura ambiente, el tiempo de secado fue durante 3 días, lo que concuerda con las referencias revisadas. Las plantas secas se colocaron en recipientes de color ámbar a una concentración de 2% de planta para su maceración en alcohol etílico al 70%, aproximadamente de 5 lt por planta durante 15 días con agitación constante. La elección de este disolvente, fue en base a lo reportado por Morales, M (2002) en el cual ha

demostrado que el empleo del mismo tiene la propiedad de bactericida y se extraen la mayor cantidad de principios activos de las plantas medicinales. Terminado el tiempo de maceración se prosiguió a la evaporación del solvente y posteriormente al raspado del extracto seco, obteniendo así los cristales como principio activo. Los extractos obtenidos se mantuvieron a 4°C hasta el momento de utilizarlos.

La extracción de los diferentes flavonoides se realiza a partir del material fresco o incluso seco, siempre y cuando no se altere su composición. Se utilizan inicialmente disolventes no polares o ligeramente polares para separar las clorofilas, gomas y agliconas de flavonoides altamente metoxiladas. Los flavonoides, que poseen un gran número de grupos hidroxilos insustituídos o azúcares, son considerados polares, por lo que son ligeramente solubles en disolventes polares, como el metanol, etanol, acetona, DMSO o agua. El filtrado final se concentra y todo el disolvente se remueve. Este proceso es favorable para la extracción de la mayoría de los flavonoides pero no para antocianidinas o flavonoides de baja polaridad los cuales aparecen en la superficie de las plantas.

Los extractos analizados poseen un contenido de compuestos fenólicos significativo que va íntimamente relacionado con las propiedades farmacológicas y medicinales atribuidas a las plantas cuyos extractos fueron analizados (Reinaldo Inés 2001).

Obtenidos los extractos hidroalcohólicos, se filtraron con papel Whatman para eliminar el material insoluble y sólidos de tamaño considerable, posteriormente se esterilizó por filtración con membranas de celulosa de 0.45 y 0.22 μ , teniendo los extractos estériles se les realizó prueba de esterilidad en medio BHI la cual resultó favorable, sin crecimiento microbiano, seguido a esto se llevaron los extractos al horno Pasteur para esperar el secado total de los mismos, en esta parte se tuvo un minucioso cuidado en la temperatura manteniéndola constante entre 45-50°C, Lastra,H.(1999) reporta que temperaturas mayores tienden a reducir la concentración de los principios activos.

Pasando aproximadamente 7 días, se recolectaron los cristales en condiciones estériles. El rendimiento que obtuvimos fue *Hamamelis virginiana*: 14.6 g. *Hippocratea excelsa*. 25.85 g. *Caléndula officinalis*: 13.08 g. por cada 5 litros. Jiménez V.E. (2009) reporto en su trabajo un rendimiento para *Caléndula officinalis* de 2.9 g/l, mientras que en un trabajo de Tesis realizado bajo la supervisión del profesor Gerardo Jiménez Cruz en la FES Cuautitlán se obtuvo un rendimiento para *Hamamelis virginiana* de 6.5918 g / 2 lt, lo que concuerda con nuestros resultados obtenidos.

El beneficio de emplear extractos elaborados en esta tesis, incide en que podemos determinar fácilmente cual es la concentración exacta del mismo, se pueden filtrar más rápidamente porque no existen tantas impurezas como las de un extracto comercial, ya que a estos en ocasiones se les tiene que colocar un conservador, o su fabricación es muy compleja, lo que provoca pérdidas en los principios activos, además de que desconocemos en su totalidad la metodología por medio de la cual se obtiene dichos extractos, así como el control de calidad que deben tener estos para poder ser empleados en la elaboración de productos para uso humano. Otra diferencia importante entre un preparado comercial y un preparado elaborado en el laboratorio es que los principios activos se encuentran exclusivamente en los pétalos de *Caléndula officinalis* (Muñoz, L. 2004) y los productos comerciales en su gran mayoría están hechos con pétalos, cabezuelas, hojas y tallos (Muñoz, L. 2004). En base a esto creemos que este extracto es de mayor calidad.

En la actualidad, la búsqueda de nuevos fármacos que puedan ser empleados para el tratamiento de infecciones bacterianas ha generado estudios que demuestran la capacidad de los flavonoides para producir esta actividad sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas. Un ejemplo de esta actividad es la inhibición del crecimiento bacteriano que parece ser dependiente de la estructura química de estos compuestos.

Hoy en día, el mejor conocimiento de su mecanismo de acción, así como la delimitación de sus actividades vinculadas a compuestos concretos ha hecho que los flavonoides tengan un efecto beneficioso en diversas enfermedades. De hecho en la actualidad los flavonoides son manejados como principios activos aislados que se comercializan en forma de medicamentos y son utilizados como flebotónicos. No obstante conviene destacar que estos compuestos evidencian eficacia clínica, si bien la investigación debería estar encaminada hacia el esclarecimiento de su mecanismo de acción (Revista de fitoterapia Volumen 2, N°I-abril 2002).

Es por eso que en este trabajo experimental apoyado con el desarrollo de Extractos Sigma se pudo realizar la cuantificación de polifenoles, flavonoides y taninos de los extractos secos de cada una de las plantas medicinales utilizadas con el objetivo de sustentar y evidenciar la actividad antimicrobiana que puede ser respaldada por la presencia de estos fitocomponentes como principios activos.

El método de cuantificación de polifenoles y flavonoides fue desarrollado por medio de una curva de calibración analítica, utilizando un espectrofotómetro, la cuantificación de

taninos se realizó por medio de un kit espectrofotométrico integrado en el mismo equipo. Los resultados efectivos de esta cuantificación de principios activos en la formulación; polifenoles de 9.19% (46.91mg), flavonoides 19.77% (100.84 mg) y taninos 0.80% (4.09 mg). Una vez determinado el contenido de fitocomponentes como principio activo se dio la pauta para llevar a cabo diferentes pruebas, una de ellas es la determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos solos y en combinación.

Una de las pruebas fundamentales para la justificación de este trabajo fue la determinación del efecto bactericida-bacteriostático comenzando por enfrentar cada extracto por separado ante las seis bacterias aisladas, posteriormente se hizo una combinación de dos extractos y finalmente se hizo la combinación de los tres extractos, obteniendo resultados efectivos contra las bacterias lo que representa una prueba certera para un tratamiento efectivo en pruebas in vivo.

En el primer reto microbiano se enfrentó *Caléndula officinalis* a las bacterias a trabajar, observando que tuvo un efecto bactericida con *Gardnerella vaginalis* con una inhibición a una concentración de 0.468mg de extracto seco, efecto bacteriostático con inhibición de crecimiento a una concentración de 3.75 mg para *Escherichia coli*, una concentración de 7.5 mg para *Candida albicans*, 15 mg para *Staphylococcus aureus*, 7.5 mg para *Staphylococcus epidermidis*, y no hubo efecto alguno contra *Proteus mirabilis*.

En el segundo reto microbiano se enfrentó *Hamamelis virginiana* a las bacterias a trabajar, observando que tuvo un efecto bactericida con *Gardnerella vaginalis* con una inhibición a una concentración de 0.468 mg de extracto seco, efecto bacteriostático con inhibición de crecimiento a una concentración de 1.875 mg para *Escherichia coli*, una concentración de 3.75 mg para *Candida albicans*, 3.75 mg para *Staphylococcus aureus*, 3.75 mg para *Staphylococcus epidermidis*, y no hubo efecto alguno contra *Proteus mirabilis*.

En el tercer reto microbiano se enfrentó *Hippocratea excelsa* a las bacterias a trabajar, observando que tuvo un efecto bactericida con *Gardnerella vaginalis* con una inhibición a una concentración de 0.935 mg de extracto seco, efecto bacteriostático con inhibición de crecimiento a una concentración de 1.875 mg para *Escherichia coli*, una concentración de 7.5 mg para *Candida albicans*, 7.5 mg para *Staphylococcus aureus*, 7.5 mg para *Staphylococcus epidermidis*, y no hubo efecto alguno contra *Proteus mirabilis*.

En cuarto y último reto microbiano se enfrentó la combinación por partes iguales de los tres extractos *Hamamelis virginiana*, *Hippocratea excelsa* y *Calendula officinalis* contra las

bacterias a trabajar, observando que tuvo un efecto bactericida con *Gardnerella vaginalis* con una inhibición a una concentración de 0.234 mg de extracto seco, efecto bacteriostático con inhibición de crecimiento a una concentración de 3.75 mg para *Candida albicans*, una concentración de 1.875 mg para *Escherichia coli*, 3.75 mg para *Staphylococcus aureus*, 3.75 mg para *Staphylococcus epidermidis*, y no hubo efecto alguno contra *Proteus mirabilis*.

Con estos resultados podemos evidenciar el efecto de la sinergia que puede presentar la combinación de los extractos, dando resultados favorables teniendo una inhibición promedio considerable a una concentración de 3.75 mg (pozo 3); lo que corresponde a 37.5 mg / ml de extracto seco equivalente a 170 mg de cada extracto dando un total de 510 mg de principio activo por cada óvulo en la formulación. Tomando en cuenta las pruebas se determina tratamiento efectivo para 4-5 días.

Al tener los extractos secos, pesados y al haber determinado su actividad antimicrobiana. Se prosiguió a la elaboración de nuestra forma farmacéutica, procedimiento que se describe en la metodología, la mezcla tenía una concentración de 510 mg/ml de extracto, los tres extractos tuvieron una excelente incorporación y disolución. Cabe mencionar que para poder obtener la concentración final de cada uno de los excipientes utilizados, realizamos diferentes ensayos a diferentes concentraciones de cada excipiente lo cual nos aportó información necesaria para que nuestro producto terminado tuviera las características óptimas para su futuro uso. Para llevar a cabo el vaciado esperamos a que la mezcla tuviera una temperatura apta para no derretir el material con el cual están fabricados los blíster, los cuales fueron donados por la QFB. Claudia Estrada, Supervisora de Producción de la Empresa Bonoplast S.A de C.V. ubicada en el Km 19.5 Antigua Carretera México Puebla, Los Reyes La Paz, Estado de México. El proceso para la realización del lote de óvulos se llevó a cabo en condiciones estériles con material previamente desinfectado y esterilizado. Una vez terminado el lote se tomaron muestras representativas para realizar las pruebas de control al producto terminado para evidenciar su calidad y eficacia.

La prueba inicial fue la de esterilidad, en la cual se utilizaron 5 óvulos, el resultado obtenido fue satisfactorio ya que no se presentó crecimiento bacteriano. Posteriormente se realizó la determinación de uniformidad de peso en la cual utilizamos 10 óvulos, pesamos cada uno y obtuvimos un promedio de 4.9913 g que se encuentra en el límite inferior a lo establecido en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos que es de 5 a 10 g.

También calculamos el tiempo de disolución comprobando en esta determinación la estabilidad del óvulo a diferentes variantes, las cuales se describen en la metodología, cabe destacar que en estas se utilizaron conjuntamente diferentes pH de la solución de trabajo (SSF 0.9%), Sánchez, J. (2005) mencionó que cuando existe alguna infección cérvico-vaginal el pH vaginal tiende a aumentar de 5 hasta 7.5 esto debido a la disminución de los Lactobacilos que son parte de la flora normal benéfica de la vagina. Por otro lado realizamos el ensayo del ovulo a diferentes temperaturas con el objetivo de descartar que estas dos variables influyeran en la liberación de los principios activos así como la estabilidad de los excipientes. Como resultado podemos destacar que el cambio de temperaturas no afecta la liberación del principio activo, así como tampoco el pH que se pudiera encontrar en la vagina. Con ello afirmamos la efectividad y estabilidad de nuestra forma farmacéutica en la prueba de disolución.

Posteriormente llevamos a cabo la determinación del efecto de inhibición sobre las seis bacterias; en donde pudimos observar la actividad de los extractos. La actividad bactericida se entiende como la acción de un fármaco para producir la muerte de más del 99.9% de las bacterias tratadas y la actividad bacteriostática es la acción de un fármaco de inhibir el desarrollo visible de las bacterias tratadas.

En general las bacterias Gram positivas fueron más sensibles que las Gram negativas, pudiendo tener su causa en la diferencia que presentan estas bacterias en cuanto a su pared celular, lo cual determinara la penetración o no de los principios activos para producir su acción bactericida.

Uno de los principales mecanismos de acción propuestos para los metabolitos secundarios consiste en la disrupción de la membrana bacteriana mediante tres posibles vías: aumentando la permeabilidad de la membrana a iones pequeños, afectando la estabilidad estructural de la membrana y desestabilizando el empaquetamiento de la bicapa lipídica, cualquiera de estos tres efectos produce la muerte de la célula bacteriana.

Por lo tanto podríamos considerar que el hecho de que las bacterias Gram negativas presentan mayor sensibilidad, entre otras cosas, puede deberse a su pared celular menos compleja dado que tiene una capa simple (red de mureína delgada), mientras que en las Gram positivas tienen una estructura de multicapa; red de mureína muy desarrollada y llega a tener hasta 40 capas (Lizcano, Vergara, 2008).

De este modo observamos que el efecto de los extractos sobre las bacterias fue: bactericida para *G. vaginalis* y bacteriostático para *C. albicans*, *S. aureus*, *S. epidermidis* y *E.coli*; mientras que para *P. mirabilis* no existió efecto alguno.

Basándonos en los resultados obtenidos a nivel in vitro se pudo demostrar y confirmar que los extractos etanólicos de *Calendula officinalis*, *Hippocratea excelsa* y *Hamamelis virginiana* tuvieron actividad antimicrobiana contra 5 de las principales bacterias responsables de provocar infecciones cérvico-vaginales presentan actividad bactericida sobre *Gardereella vaginalis* y efecto bacteriostático sobre *C. albicans*, *S. aureus*, *S epidermidis* y *E.coli*, esto nos hace afirmar que tenemos una alternativa viable y segura contra dichas infecciones.

16.0 CONCLUSIONES

El presente trabajo fue realizado con el objetivo de evidenciar con pruebas analíticas y retos microbianos las bondades de las plantas medicinales y la gran cantidad de aplicaciones que podemos obtener si las manejamos adecuadamente. Los resultados obtenidos cumplen cada uno de los objetivos propuestos y esperados.

- ⊕ Se lograron obtener los extractos etanólicos de cada planta. Y posteriormente los cristales de los mismos.
- ⊕ La prueba de esterilidad se llevo a cabo obteniendo los extractos libres de contaminantes pudiendo así medir la actividad microbiológica de cada uno de ellos, observando que el efecto bactericida bacteriostático de la combinación de los extractos secos no se vio disminuido por lo que podemos destacar la sinergia que se puede encontrar; aumentando la efectividad y comprobando que existe un efecto que contrarresta la viabilidad de las bacterias observando resultados convincentes en estas pruebas in vitro.
- ⊕ Se realizó la cuantificación de polifenoles, flavonoides y taninos de los extractos utilizados, de esta manera podemos asegurar la existencia de los principios activos en la forma farmacéutica; con ello se comprueba la actividad antimicrobiana contra bacterias de importancia médica en vaginosis-vaginitis, lo que nos da la pauta para generar un tratamiento efectivo contra un cuadro clínico muy frecuente en la población de mujeres en México, y ofrecer una alternativa herbolaria al alcance de muchas mujeres con este padecimiento con la ventaja que este tipo de tratamientos

no genera una resistencia microbiana como la generada por el uso descontrolado de antibióticos.

- ⊕ La elaboración de los óvulos glicerizados se llevo a cabo por el método de inyección adaptado a las condiciones del lugar de trabajo, tomando en cuenta esto se puede establecer que la forma farmacéutica elaborada en un proceso de paciencia y sumo cuidado tiene un impacto importante en la generación de alternativas naturales efectivas sin descuidar la calidad y eficacia del mismo.
- ⊕ Las pruebas de control realizadas al producto terminado pruebas adaptadas a un ovulo de primer nivel el cual se debe adaptar a una manufactura y fabricación y posibles controles más estrictos para su comercialización o difusión.

Podemos combatir principalmente las reacciones adversas causadas por los medicamentos y dar un punto a favor cuando hay alergias a medicamentos como algunos antimicóticos, aunque aún hay mucha investigación por descubrir en cuanto a los mecanismos de acción que pueden estar involucrados en estos procesos, podemos respaldar este trabajo en la experiencia empírica de usar las plantas medicinales, a través de su uso por muchos años por la gente conocedora de las propiedades de las plantas.

En este trabajo llegamos a resultados considerables cumpliendo cada uno de los objetivos propuestos y determinamos la actividad antimicrobiana contra bacterias de importancia médica en vaginosis-vaginitis, lo que nos da la pauta para generar un tratamiento efectivo contra un cuadro clínico muy frecuente en la población de mujeres en México, y ofrecer una alternativa herbolaria al alcance de muchas mujeres con este padecimiento con la ventaja que este tipo de tratamientos no genera una resistencia microbiana como la generada por el uso descontrolado de antibióticos.

Observamos en este trabajo fue que el efecto bactericida bacteriostático de la combinación de los extractos secos no se vio disminuido en el cuarto reto microbiano por lo que podemos destacar la sinergia que se puede encontrar aumentando la efectividad y comprobando que si hay un efecto que contrarresta la viabilidad de las bacterias observando resultados convincentes en estas pruebas in vitro.

Tomando en cuenta las condiciones de laboratorio en las que se realizó el trabajo podemos decir que la fórmula farmacéutica que elaboramos fue un proceso fácil y de paciencia que tuvo un impacto muy grande en generar alternativas naturales efectivas sin descuidar la calidad y pruebas adaptadas a un ovulo de primer nivel el cual se debe adaptar a una manufactura y fabricación y posibles controles más estrictos para su comercialización o difusión.

Esperamos que esta contribución al conocimiento de la actividad antimicrobiana de los extractos de estas plantas solos y en combinación apoye trabajos posteriores para lograr una exitosa evaluación a nivel in vivo.

ANEXOS:

Anexo 1

Calculo de las concentraciones en los sistemas de la curva de calibración.

- FLAVONOIDES

Se utilizó un estándar de Rutina con los siguientes datos:

Peso del Std: 15.2 mg

Pureza: 94 g

Volumen de aforro 10 ml

Concentración del estándar:

$$\frac{15.2 \text{ mg de rutina}}{10 \text{ ml}} \times \frac{94 \text{ mg RP}}{100 \text{ mg RA}} \times \frac{10 \text{ ml aforo}}{10 \text{ ml aforo}} = 1.4288 \text{ mg/ml}$$
$$= \mathbf{142.88 \text{ mg/100 ml}}$$

Concentración en cada sistema:

$$\text{Sistema 1: } \frac{(142.88 \text{ mg}) \cdot (0.1 \text{ ml})}{10 \text{ ml}} = 1.4288 \text{ mg/100 ml}$$

$$\text{Sistema 2: } \frac{(142.88 \text{ mg}) \cdot (0.2 \text{ ml})}{10 \text{ ml}} = 2.8576 \text{ mg/100 ml}$$

$$\text{Sistema 3: } \frac{(142.88 \text{ mg}) \cdot (0.3 \text{ ml})}{10 \text{ ml}} = 4.2864 \text{ mg/100 ml}$$

$$\text{Sistema 4: } \frac{(142.88 \text{ mg}) \cdot (0.4 \text{ ml})}{10 \text{ ml}} = 5.7152 \text{ mg/100 ml}$$

$$\text{Sistema 5: } \frac{(142.88 \text{ mg}) \cdot (0.5 \text{ ml})}{10 \text{ ml}} = 7.144 \text{ mg/100 ml}$$

$$\text{Sistema 6: } \frac{(142.88 \text{ mg}) \cdot (0.6 \text{ ml})}{10 \text{ ml}} = 8.5728 \text{ mg/100 ml}$$

$$\text{Sistema 7: } \frac{(142.88 \text{ mg}) \cdot (0.7 \text{ ml})}{10 \text{ ml}} = 10.006 \text{ mg/100 ml}$$

$$\text{Sistema 8: } \frac{(142.88 \text{ mg}) \cdot (0.8 \text{ ml})}{10 \text{ ml}} = 11.4304 \text{ mg/100 ml}$$

- POLIFENOLES:

Se utilizó un estándar de Pirogalol con los siguientes datos:

Peso del Std: 15.4 mg
Volumen de aforo 50 ml

Pureza: 98 g

Concentración del estándar:

$$\frac{15.4 \text{ mg de Std}}{100 \text{ mg RA}} \times \frac{98 \text{ mg RP}}{100 \text{ mg RA}} \times \frac{100 \text{ mg}}{50 \text{ ml aforo}} = 0.30184 \text{ mg/ml}$$

$$= \mathbf{30.184 \text{ mg/100 ml}}$$

Concentración en cada sistema:

Sistema 0: $\frac{(30.184 \text{ mg}) \cdot (0.1 \text{ ml})}{10 \text{ ml}} = 0.30184 \text{ mg/100 ml}$

Sistema 1: $\frac{(30.184 \text{ mg}) \cdot (0.15 \text{ ml})}{10 \text{ ml}} = 0.45276 \text{ mg/100 ml}$

Sistema 2: $\frac{(30.184 \text{ mg}) \cdot (0.2 \text{ ml})}{10 \text{ ml}} = 0.60368 \text{ mg/100 ml}$

Sistema 3: $\frac{(30.184 \text{ mg}) \cdot (0.25 \text{ ml})}{10 \text{ ml}} = 0.7546 \text{ mg/100 ml}$

Sistema 4: $\frac{(30.184 \text{ mg}) \cdot (0.3 \text{ ml})}{10 \text{ ml}} = 0.90552 \text{ mg/100 ml}$

Sistema 5: $\frac{(30.184 \text{ mg}) \cdot (0.35 \text{ ml})}{10 \text{ ml}} = 1.05644 \text{ mg/100 ml}$

Sistema 6: $\frac{(30.184 \text{ mg}) \cdot (0.4 \text{ ml})}{10 \text{ ml}} = 1.20736 \text{ mg/100 ml}$

Anexo 2

Pruebas Bioquímicas de identificación de cepas bacterianas:

BACTERIAS	MORFOLOGIA		PRUEBAS BIOQUIMICAS				
	Colonial	Microscópica	GRAM	OF	Catalasa	Oxidasa	Motilidad
<i>Gardnerella vaginalis</i>	Puntiformes	Bacilos cortos pleomórficos	-	F	-	-	-
<i>Escherichia coli.</i>	En EMB; colonias oscuras con brillo verde metalico	Bacilos	-	OF	+	-	-
<i>Candida albicans</i>	Colonias cafés en agar Cetrimida	Redondas u ovals	+			-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	Blancas- gris en agar SM	Cocos	+	F	+	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		Cocos	+	F	+	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	Efecto swarm	Bacilos	-	F	+	-	-

Pruebas bioquímicas secundarias en la identificación de las cepas bacterianas

BACTERIAS	PRUEBAS BIOQUIMICAS									
	Indol	MR/VP	Citratos	Coagulasa	Glucosa	Urea	NO ₃	Manitol	TSI	Lactosa
<i>Gardnerella vaginalis</i>	-	+/-				-	-	-	Ac/Ac	+
<i>Escherichia coli.</i>	+	+/-	-		+	-	+	+	Alc/Alc	+
<i>Candida albicans</i>			+		+		+			-
<i>Staphylococcus aureus</i>		-/+		+	+	+/-	+	+		+
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		-/+		-	+	+	-	-		
<i>Proteus mirabilis</i>	-	+/v	+		+	+	+	-	Ac/Ac	-

BIBLIOGRAFIA

1. AKHISA, T. (1996). Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. *Phytochemistry*. No. 43. pp. 1255-1260.
2. AUSINA, V. (2006). Tratado SEIMC de Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Ed. Médica Panamericana. España. pp 348-356.
3. ACOSTA, L. (2001). Instructivo técnico de *Caléndula officinalis*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. Vol. 1 pp. 23-27.
4. ANGELES, R. (2008). Elaboración de una forma farmacéutica sólida base de Glicero-gelatina con extracto de *Caléndula officinalis*, para el tratamiento de Ectropión e infecciones vaginales humanas. UNAM
5. BAKÓ, E. et. al. (2002). HPLC study on the carotenoid composition of Calendula products. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. Ed. Elsevier
6. BAÑOS, F. (2000). Efecto antimicrobiano “*in vitro*” de la tintura de *Árnica montana* y *Caléndula officinalis* sobre *Streptococcus mitis*. IPN
7. BARBOUR, E.K. (2004). Evaluation of homeopathy in broiler chickens exposed to live viral vaccines and administered *Caléndula officinalis* extract. *Med. Sci. Monit.* 10 (8). pp 281-288.
8. BARRENETXEA, G. (2002). Vulvovaginitis candidiásica. *Revista Iberoamerica de Micología*. Vol. 19. España. pp. 22-24
9. BLANCA, L. (1993). Control biológico para productos farmacéuticos. UAM Xochimilco.
10. BOUCAUD-MAITRE, Y. (1988). Cytotoxic and antitumoral activity of *Caléndula officinalis* extract. *Pharmazie*. No. 43 pp. 220-221.

11. CAÑIGUERAL, S. (2006). Las monografías de calidad, seguridad y eficacia en el uso racional de los preparados a base de plantas medicinales. Revista de Fitoterapia. Volumen 6. Suplemento 1. pp 25.
12. CAÑIGUERAL V.B. (2003) Fitoterapia: vademécum de prescripción 4ª ed. Editorial ELSEVIER.
13. CASTILLO G.E, Martínez S. I; (2007) Manual de fitoterapia Editorial Elsevier Barcelona España, pp 5.
14. CASTILLO, E.P, Monroy, O.C. Plantas medicinales utilizadas en el Estado de Morelos. Universidad del Estado de Morelos, México, 2000
15. CECHINI, T. (2004). El libro de las hierbas medicinales. Ed. De Vecchi. España. pp. 34-38.
16. CETKOVIÉ, G. et. al. (2004). Antioxidant properties of marigold extracts. Food Research International. Ed. Elsevier, pp. 643-650.
17. CRUZ, G. et.al. (2002). Elaboración de una forma farmacéutica sólida (bolo) con extracto de *Caléndula officinalis* para el tratamiento de vacas con retención placentaria. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, Vol. 33, No. Especial.
18. CRUZ, G.et. al. (2006). Efecto del extracto de *Calendula officinalis* (mercadela) y *Amphipterygium adstringens* (cuachalalate) en cultivos celulares evidenciándolo por el método colorimétrico de Mossman. Revista de Fitoterapia, No. 6, pp. 1-109.
19. CRUZ, R. CALDERON, E. (1985). Diagnóstico rápido de infecciones cervicovaginales. Infectología. Año VI. Num 5. pp. 115-120.
20. DEV, S. (1989). CRC. Handbook of terpenoids, tryterpenoids. Vol. I-II. Florida. pp 32, 36. 78,105, 178.
21. DUKE, J. (2002). Handbook of Medicinal Herbs. 2ª ed. Ed. CRC Press. USA. Pp 139-140.

22. DUMENIL G. (1980). Evaluation of antibacterial properties of *Calendula officinalis* Lin. flowers and mother homeopathic tinctures of *C. officinalis*. Ann Pharm Fr. Vol 38(6). pp 493-499.
23. ECHEMENDIA. C. (2006). Herbolaria. URL
<http://www.16deabril.sld.cu/apuntes/mnt>
24. FERIA, I. (2006). Nuevas herramientas de biología molecular para el control de calidad de las drogas vegetales. Revista de Fitoterapia. Vol. 6, Suplemento 1, pp. 79.
25. FLEISCHNER AM. (1985) Plants extract to accelerate healing and reduce inflammation. Cosmet Toilet, 45-46, 48-51, 54-58.
26. FLORES, P.R (2003). Etiología de la infección cérvico vaginal en pacientes de Hospital Juárez de México. Salud Pública de México. Vol. 45
27. GARCÍA, D. (1996). Estudio farmacognóstico de *Caléndula officinalis* L. (*Caléndula*). Revista Cubana. Plant Med. Vol 1. No. 3. pp. 21-25.
28. GARCÍA, J. (1998). Microbiología Médica. Vol. 2 Microbiología Clínica. Ed. Harcourt Brace. España. pp. 350-355.
29. GEHRMANN, B. (2005). Medicinal Herbs A Compendium. Ed. Oxford. pp. 42
30. HAMBURGER, M. et. al. (2003). Preparative purification of the major anti-inflammatory triterpenoid esters from Marigold (*Caléndula officinalis*). Fitoterapia. Vol. 74. Ed. Elsevier. pp. 328-338.
31. HARBORNE, J. (1999). The Handbook of Natural Flavonoids. Vol I. Ed. John Wiley & Sons. New York. pp. 1875- 1880.
32. HEINRICH, M. (2004). Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy. Ed. Churchill Livingstone. España. pp. 27, 34, 270
33. HELMUT H. W & MEINHARD K (2007) Hamamelis in children with skin disorders and skin injuries: results of an observational study, Eur J Pediatr (2007) 166:943–948.

34. KONEMAN W.E (2006) Diagnóstico microbiológico. 6° ed. Editorial Médica Panamericana. pp. 232-233,623-624,1171.
35. KOSTENNIKOVA, A. (1984). UV spectrofotometric quantitative determination of flavonoids in *Caléndula* tincture. *Farmatsiya*. Vol. 33, No. 6, pp. 33-35.
36. LASTRA, H. (1999). *Caléndula officinalis*. Artículos de Revisión. *Revista Cubana de Farmacología*. Tomo 33. Núm. 3. pp188-194.
37. LATARJET, M. (2005). *Anatomía Humana*. 4ª ed. Tomo 2. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. pp. 1607-1643.
38. LICEA, J.A. et.al. (1998). Uso del extracto vegetal de pétalos de *Caléndula officinalis* en el tratamiento de metritis crónica purulenta del ganado Holstein Frisian. XXXIV Reunión Nacional de investigación Pecuaria.
39. LIZCANO, R.A., VERGARA G. (2008). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales *Valeriana pilosa*, *Hesperomeles ferruginea*, *Myrcianthes rhopaloides* y *Passiflora manicata* frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia.
40. LOPEZ, J. et al (2005). Vulvovaginitis. *Guías Clínicas*.
41. MAC FADDIN. J (1990). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Médica Panamericana. Argentina.
42. MATHIOWITZ, E. (1999). *Enciclopedia of Controlled drug delivery*. Vol 2. Ed. John Wiley & Sons. New York.
43. MEIS J, Verweij PE. (2001). Current treatment of micotic infections. *Drugs*, No. 61 (suppl): 15-26
44. MICHEL F. (1977). *Apis mellifica* and *Calendula officinalis* Lin. combination active against sunburn. *Ger Offen*.

45. MORALES, M. (2002). Efecto de la *Caléndula officinalis* en *Pseudomonas aeruginosa* evidenciada por microscopia electrónica. UNAM. pp. 18-19, 25-27.
46. OMELCHUK MA, Krivut BA, Voroshilov A. (1984)Efectos de las condiciones de secado en la calidad de *Calendula officinalis* Lin. como materia prima para medicamentos. Khim Farm Zh. Vol 18, pp 329-331
47. OMS.(2005) Guías para el tratamiento de las infecciones de transmisión sexual. Ed. Catalogación por la Biblioteca de la OMS, Ginebra, Suiza,
48. O'GORMAN, H. (1963). Plantas y Flores de México. UNAM. México. pp 188.
49. PALAPOP, R. (2003). Real Farmacopea Española. 2ª ed. Publicada por el Ministerio de Sanidad y Consumo por Mandato de la Ley 25/1990. Madrid. pp. 208-209, 215, 240-241, 616-619, 897-898.
50. PEREZ, J. (2001). Genotoxic and anti-genotoxic properties of *Calendula officinalis* extracts in rat liver cell cultures treated with diethylnitrosamine. *Toxicology in Vitro* 16. Ed. Elsevier. pp 253-258.
51. PIRES, M. (2002). Nuevo dentífrico fitoterapéutico con acción bactericida y antiinflamatoria. Facultad de Farmacia. Sevilla.
52. QUATTROCCHI, U. (2000). CRC World Dictionary of Plant names, common names, scientific names, eponyms, Synonyms and Etymology. Vol. 1. New York. pp 395.
53. QUER, Font P. (1985). Plantas Medicinales. Ed. Labor. México. pp. 832-834.
54. SCAGLIONE, F. (2006). Molecular bases of the immunomodulatory activity of medicinal plant extracts. *Revista de Fitoterapia*. Volumen 6. Suplemento 1. pp. 43.
55. TORTORA, G. REYNOLDS, S. (2003). Principios de Anatomía y Fisiología. 9ª ed. Ed. Oxford University Press. México. pp. 1055-1060.
56. UKIYA, M., et.al. (2006). Anti-inflammatory, Anti-tumor-promoting and Cytotoxic Activities of constituents of Marigold (*Calendula officinalis*) flowers.

57. VILA, JL. (2001). Tecnología Farmacéutica. Vol. II. Ed. Síntesis. España.
58. VILLA, F.M.G., et al.(1998). Estudio anatómico de *Hippocratea excelsa* HBK. (Hippocrateaceae). Acta Botánica Mexicana. UNAM. México. Vol. 43, pp 7-21.
59. ZARAZUA, A. (2000). Frecuencia de vaginosis bacteriana en la amenaza de parto pretermino (APP). UNAM. México.