



## **FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA**

EFFECTO ANTIMICROBIANO DE EXTRACTO DE HOJA DE BIXA ORELLANA L.  
FRENTE A MICROORGANISMOS CAUSANTES DE INFECCIONES VAGINALES

### **Línea de investigación:**

**Microbiología, parasitología e inmunología**

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciada en Biología

### **Autora:**

Marcas Gutiérrez, Jenny Nadiezhda

### **Asesora interna:**

Yupanqui Siccha, Gisela

(ORCID: 0000-0003-3950-3943)

### **Asesor externo:**

Tamariz Ortiz, Jesús Humberto

(ORCID: 0000-0002-4192-1397)

### **Jurado:**

La Torre Acuy, María Isabel

Lizárraga Travaglini, Alfonso Diulio

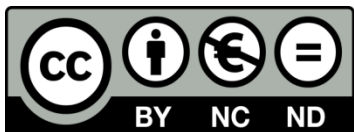
López Bulnes, Jorge Luis

**Lima - Perú**

**2021**

**Referencia:**

Marcas, J. (2022). *Efecto antimicrobiano de extracto de hoja de Bixa Orellana L. frente a microorganismos causantes de infecciones vaginales*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Federico Villarreal]. Repositorio Institucional UNFV. <https://hdl.handle.net/20.500.13084/6184>



**Reconocimiento - No comercial - Sin obra derivada (CC BY-NC-ND)**

El autor sólo permite que se pueda descargar esta obra y compartirla con otras personas, siempre que se reconozca su autoría, pero no se puede generar obras derivadas ni se puede utilizar comercialmente.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>



Universidad Nacional  
**Federico Villarreal**

**VRIN** | VICERRECTORADO  
DE INVESTIGACIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

**EFECTO ANTIMICROBIANO DE EXTRACTO DE HOJA DE *BIXA ORELLANA* L.  
FRENTE A MICROORGANISMOS CAUSANTES DE INFECCIONES VAGINALES**

Línea de investigación:

Microbiología, parasitología e inmunología

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciada en Biología

Autor:

Marcas Gutiérrez, Jenny Nadiezhda

Asesora interna:

Yupanqui Siccha, Gisela

Asesor externo:

Tamariz Ortiz, Jesús Humberto

Jurado:

La Torre Acuy, María Isabel

Lizárraga Travaglini, Alfonso Diulio

López Bulnes, Jorge Luis

Lima – Perú

2021

## **AGRADECIMIENTOS**

En estas líneas quiero agradecer a todas las personas que hicieron posible esta investigación y que de alguna manera estuvieron conmigo en los momentos difíciles, alegres, y tristes. Estas palabras son para ustedes. A mi hermana y padres por todo su amor, comprensión y apoyo, pero sobre todo gracias infinitas por la paciencia que me han tenido. No tengo palabras para agradecerles las incontables veces que me brindaron su apoyo.

Al Dr. Jesús Tamariz, por recibirme en su laboratorio y por su orientación durante el desarrollo de esta investigación. A la Mg. Gisela Yupanqui Siccha por su apoyo con el desarrollo del proyecto y de la tesis. A la profesora Gloria Saez por su apoyo durante la elaboración del proyecto. A la empresa Hersil, y la Universidad Científica del Sur que mediante el convenio 030-INNOVATEPERU-ITAI-2016 permitieron que este proyecto siga adelante. A INNOVATE, que promueven el desarrollo de la investigación en nuestro país. Al Dr. Oswaldo Tipiani y Msc. Steev Loyola, por su apoyo durante el desarrollo de la investigación y a todos los miembros del Laboratorio de Resistencia a Antimicrobianos e Inmunopatología de la UPCH por su apoyo y amistad.

## ÍNDICE

	Pág.
I INTRODUCCIÓN	11
1.1 Descripción y formulación del problema	12
1.2 Antecedentes	13
1.3 Objetivos	
<i>1.3.1 Objetivos Generales</i>	16
<i>1.3.2 Objetivos Específicos</i>	16
1.4 Justificación	17
1.5 Hipótesis	18
II MARCO TEÓRICO	
2.1 Extractos Vegetales	19
<i>2.1.1 Métodos de Extracción</i>	19
2.2 <i>Bixa orellana</i> L.	20
<i>2.2.1 Clasificación Taxonómica</i>	21
<i>2.2.2 Descripción Botánica</i>	21
<i>2.2.3 Usos Tradicionales</i>	22

2.3 Microorganismos Causantes de Infecciones Vaginales	22
2.3.1 <i>Candida</i>	22
2.3.2 <i>Gadnerella vaginalis</i>	24
2.3.3 <i>Mobiluncus sp.</i>	25
2.3.4 <i>Prevotella sp.</i>	26
2.3.5 <i>Peptostreptococcus sp.</i>	27
2.3.6 <i>Peptococcus sp.</i>	28
2.3.7 <i>Veillonella sp.</i>	29
2.3.8 <i>Atopobium sp.</i>	29
2.3.9 <i>Lactobacillus sp.</i>	30
III MÉTODO	
3.1 Tipo de Investigación	32
3.2 Ámbito temporal y espacial	32
3.3 Variables	32
3.4 Población y Muestra	33
3.4.1 <i>Material Vegetal</i>	33
3.4.2 <i>Cepas Estándar Candida</i>	33
3.4.3 <i>Cepas Bacterianas Estándar</i>	33

3.4.4 <i>Aislamientos de Origen Clínico</i>	34
3.5 Instrumentos	34
3.5.1 <i>Equipos</i>	34
3.5.2 <i>Materiales</i>	35
3.5.3 <i>Reactivos</i>	35
3.6 Procedimientos	35
3.6.1 <i>Preparación de Extractos de Bixa orellana</i>	35
3.6.2 <i>Recolección de Aislados Clínicos</i>	36
3.6.3 <i>Identificación de Microorganismos</i>	37
3.6.4 <i>Reactivación de Microorganismos</i>	38
3.6.5 <i>Determinación de la Susceptibilidad Antimicrobiana de los Extractos</i>	39
3.6.5.1 <i>Método de Difusión de Disco en Agar</i>	39
3.6.5.2 <i>Método de Dilución en Agar</i>	41
3.6.5.3 <i>Cálculo de la Concentración Mínima Bactericida (CMB)</i>	42
3.7 <i>Análisis de datos</i>	43
3.8 <i>Consideraciones Éticas</i>	43
IV RESULTADOS	44
4.1 <i>Efecto de DMSO Frente a Cepas ATCC de Candida y Bacterias Anaerobias</i>	44

4.2 Efecto Antimicótico del Extracto de <i>B. orellana</i>	45
4.3 Efecto Antibacteriano del Extracto de <i>B. orellana</i>	46
4.4 CMI y CMB de las Cepas ATCC	47
4.5 CMI y CMB de los Aislados Clínicos	49
4.6 Análisis Estadístico	51
V DISCUSIÓN DE RESULTADOS	52
VI CONCLUSIONES	58
VII RECOMENDACIONES	59
VIII REFERENCIAS	60
IX ANEXOS	78

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Fig. 1: Distribución de Discos y Pocillos para la Prueba de Sensibilidad	40
Fig. 2: Distribución de Alícuotas en las Placas	42

**ÍNDICE DE TABLAS**

	Pág.
Tabla 1: Promedios de los Halos de Inhibición	45
Tabla 2: Valores de la CMI y la CMB de las cepas ATCC	48
Tabla 3: CMI y CMB de los Aislados Clínicos de <i>G. vaginalis</i> y <i>Lactobacillus spp.</i>	50
Tabla 4: Promedios de CMI y CMB de los Aislados Clínicos y sus Valores Mínimos y Máximos	51

## RESUMEN

Se empleó extracto metanólico de hojas de *Bixa orellana* contra 4 especies de *Candida* (*C. albicans* ATCC 10231, *C. glabrata* ATCC 2001, *C. parapsilosis* ATCC 22019 y *C. tropicalis* ATCC 13803), 8 bacterias de la flora vaginal (*G. vaginalis* ATCC 14018, *P. bivia* ATCC 29303, *P. niger* ATCC 27731, *P. anaerobius* ATCC 27337, *M. curtisii* ATCC 43063, *A. vaginae* ATCC BAA-55, *V. parvula* ATCC 10790 y *L. crispatus* ATCC 33197) y 11 aislados clínicos de *G. vaginalis* y *Lactobacillus spp* respectivamente. La actividad antimicrobiana fue determinada por el método de difusión en agar, la Concentración Mínima Inhibitoria, mediante el método de dilución en agar y la Concentración Mínima Bactericida, empleando una adaptación del método de dilución en placa. No se encontró efecto antimicrobiano frente a *Candida*, sin embargo, se observó elevada actividad frente a las especies causantes de vaginosis bacteriana. Dos especies manifestaron poca susceptibilidad *P. bivia* con una CMI y CMB de 32 mg/ml y *V. parvula* con una CMI de 32 mg/ml y CMB mayor a 32 mg/ml. *G. vaginalis* fue la especie más sensible, obtuvo una CMI de 1mg/mL (ATCC) y 2 mg/mL (aislados clínicos) y una CMB de 4 mg/mL (ATCC y aislados clínicos). Los *Lactobacillus* presentaron muy baja susceptibilidad al extracto, con una CMI y CMB de 32 mg/mL (ATCC y aislados clínicos). Los resultados sugieren que el extracto de achiote puede ser una nueva fuente de compuestos antimicrobianos en el tratamiento de vaginosis bacteriana.

*Palabras clave:* *Bixa orellana*, vaginosis bacteriana, *Candida*, *G. vaginalis*, *Lactobacillus*.

## ABSTRACT

Methanolic extract of *Bixa orellana* was examined against 4 *Candida* species (*C. albicans* ATCC 10231, *C. glabrata* ATCC 2001, *C. parapsilosis* ATCC 22019 and *C. tropicalis* ATCC 13803), 8 bacterias from the vaginal flora (*Gardnerella vaginalis* ATCC 14018, *Prevotella bivia* ATCC 29303, *Peptococcus niger* ATCC 27731, *Peptostreptococcus anaerobius* ATCC 27337, *Mobiluncus curtisii* ATCC 43063, *Atopobium vaginae* ATCC BAA-55, *Veillonella parvula* ATCC 10790 y *Lactobacillus crispatus* ATCC 33197) and 11 clinical isolations of *G. vaginalis* and *Lactobacillus* were collected additionally. Agar diffusion was the selected procedure to measure extract sensibility by the microorganism, Minimal Inhibitory Concentration was calculated by agar dilution method and Minimal Bactericidal Concentration by an adaptation of dilution plating method. *B. orellana* had not antimicrobial activity against candida species; however, it manifested high activity against anaerobic bacteria related to bacterial vaginosis. Only two species showed low susceptibility to the extract, *P. bivia* with a MIC and MBC equal to 32 mg/mL and *V. parvula* with a MIC of 32 mg/mL and an MBC higher than 32 mg/mL. *G. vaginalis* showed the highest antibacterial activity by the extract, the MIC values are 1 mg/mL (ATCC) and 2 mg/mL (clinical isolates), and the MBC 4 mg/mL (ATCC and clinical isolates). *Lactobacillus* species were less sensible to the extract, MIC and MBC value was 32 mg/mL (ATCC and clinical isolates). The obtained results suggest “achiote” extract can be used as a new source of antimicrobials compounds for bacterial vaginosis therapy.

*Keywords:* *Bixa orellana*, bacterial vaginosis, *Candida*, *G. vaginalis*, *Lactobacillus*.

## I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas representan un problema crítico para la salud, y son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. La aparición de resistencia de los microorganismos a antibióticos sintéticos, junto con la toxicidad y efectos adversos en el tratamiento prolongado, hace necesario continuar la búsqueda de nuevas sustancias antimicrobianas (Wen et al., 2011).

Las infecciones vulvovaginales son un motivo frecuente de consulta a un especialista en mujeres en edad reproductiva (Arnold et al., 2014); las cuales, además de los problemas físicos y emocionales que ocasionan en las pacientes, constituyen una pérdida económica de proporciones apreciables al sistema de salud, tanto en las mujeres de países industrializados, como en vías de desarrollo (Alemán et al., 2010).

Tres son las infecciones vaginales más frecuentes: vaginosis bacteriana, tricomoniasis y candidiasis vaginal (Medina et al., 1999).

Durante el periodo entre la menarquía y la menopausia, aproximadamente el 75% de las mujeres sufren al menos un episodio de candidiasis; de ellas, el 40% tuvieron más de un episodio y 5% presentaron 4 o más episodios anuales (Correa et al., 2009).

La vaginosis bacteriana se presenta entre 21 a 34 % de las mujeres de la población general (Fernández et al, 2010), de las cuales el 50% o más son asintomáticas (Llanes et al., 2014).

Las bacterias involucradas en la vaginosis bacteriana son capaces de formar una biopelícula biofilm en la superficie de las células epiteliales vaginales. La composición química y la estructura de la matriz del biofilm, le proporciona resistencia frente al peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y a los

antibióticos, y éste parece ser un aspecto importante en la resistencia antimicrobiana y en la recurrencia de la enfermedad (Martínez, 2013).

### 1.1 Descripción y formulación del problema

Las bacterias más conocidas de la microbiota vaginal normal son los *Lactobacilos*, constituyen un sistema natural de protección, producen ácido láctico, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y bacteriocinas; las cuales son sustancias no favorables para otras especies bacterianas, la deficiencia de estos se relaciona con una mayor presencia de microorganismos anaeróbicos en el ecosistema vaginal (Martínez et al., 2013).

los Imidazoles son los agentes antifúngicos más utilizados en el tratamiento de infecciones vaginales. Algunas especies de *Candida* han adquirido resistencia a los fármacos antimicóticos, tales como *C. krusei* que presenta resistencia al ketoconazol y *C. dubliniensis*, con un fenotipo estrechamente relacionado con *C. albicans*, que ha adquirido resistencia al fluconazol (Rodríguez y PARRALES, 2016).

Para el tratamiento de la vaginosis bacteriana se emplea generalmente metronidazol y clindamicina, sin embargo, se ha reportado especies de *Mobiluncus* y *Atopobium* con resistencia a metronidazol (Gatti, 2000; Lopes dos Santos et al., 2012) y pacientes con vaginosis bacteriana recurrente, que presentan hasta un 53% de resistencia a Clindamicina (Lopes dos Santos et al., 2012).

De otra parte, los fármacos más empleados para el tratamiento de estas infecciones presentan una toxicidad importante, y el incremento de la resistencia antibiótica los está haciendo menos efectivos. Como una medida para controlar estos problemas se está promoviendo la

investigación de nuevos agentes antimicrobianos, más potentes, pero, sobre todo, más seguros que los existentes. En este contexto, los compuestos derivados de plantas son de interés como una terapia alternativa al uso de medicamentos sintéticos producidos por la industria farmacéutica (Huamán et al., 2009; Churata et al., 2016).

En el presente trabajo de investigación, se buscó determinar el efecto antimicrobiano de las hojas de “Achiote” como una alternativa para el tratamiento frente a gérmenes causantes de infecciones vaginales.

## 1.2 Antecedentes

A nivel mundial varios autores han estudiado la actividad de extractos de plantas contra especies de *Candida*.

Mariita et al. (2010), evaluaron la actividad antifúngica de los extractos metanólicos de *Entada abyssinnca* frente a *C. albicans*, el halo de inhibición fue de 14.10 mm, su CMI de 1.875 mg/mL. Concluyendo que *C. albicans* es susceptible a los extractos de *E. abyssinnca*.

Negi y Dave (2010), determinaron la actividad antimicrobiana de *Acacia catechu*. Los halos inhibitorios de extractos de *A. catechu* en metanol, hexano, acetona, y acuoso frente a *C. albicans* fueron de 20, 12, 11, 0 mm respectivamente, el extracto de hoja en metanol obtuvo una CMI de 1500 µg/mL. Concluyendo que *A. catechu* posee actividad antimicótica.

Chipeva et al. (2013), evaluaron la actividad antimicrobiana de extractos acuoso, clorofórmico y metanólico de hojas y flores de *Lamiun album*, frente a *C. albicans* y *C. glabrata*. Sólo los extractos acuosos fueron considerados antifúngicos con 14 y 20 mm para *C. albicans* y

*C. glabrata* respectivamente, su CMI fue de 10 mg/mL en ambos casos, concluyendo que los extractos acuosos de *L. album* presentan actividad antifúngica.

Sousa et al. (2012), probaron los extractos de *Chenopodium ambrosioides* Lineu y *Kielmeyera neglecta* Saddi en Hexano, diclorometano, etil acetato y etanol probados en levaduras *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. Krusei*, sólo los extractos de Hexano de *C. ambrosioides* fueron efectivos contra *C. krusei*, en cambio los demás preparados no presentaron actividad, concluyendo que *C. ambrosioides* solo es efectivo contra *C. krusei*.

Respecto al efecto antimicrobiano de plantas frente a agentes causantes de vaginosis bacteriana.

O.O. Aiyelaagbe et al. (2007), investigaron la actividad antimicrobiana de la raíz de *Jatropha curcas* sobre *Gardnerella vaginalis* y otras bacterias; el extracto presentó actividad, observándose halos de inhibición de hasta 27 mm.

Kumari y Beena (2016), evaluaron extractos etanólicos y acuosos de las especies *Allium sativum* L. y *Sapindus lauriflora* Vahl y observaron el efecto inhibitorio de estos sobre *G. vaginalis*. Como resultado obtuvieron que el efecto del extracto etanólico de ambas plantas es más eficiente que el extracto acuoso. En la mayoría de los aislados de *G. vaginalis* se observó mayor sensibilidad a *S. lauriflora*.

Ha, Yu Mi et al. (2014), realizaron un estudio sobre el efecto antibacteriano del extracto de 44 especies de algas contra *G. vaginalis*. De las 44 especies, *Chlorophyta* y *Ulva pertusa* presentaron la mayor actividad con halos de 11.3 mm a una concentración de 5 mg/disco.

La literatura científica también reporta estudios con *Bixa Orellana*, así:

Castello et al. (2002), investigaron el potencial antimicrobiano de *Bixa orellana* y observaron que el extracto de Achiote presenta actividad contra *Bacillus punilis* con halos de 20 mm; sin embargo, de los extractos analizados, ninguno presentó actividad contra *Candida*.

Fernández-Calienes et al. (2011), realizaron un estudio en Cuba de extractos hidroalcohólicos de semillas de *Bixa orellana* L., destinados al estudio de la actividad antimalárica, obteniendo un valor de concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) de 11,6 µg/mL, concentración citotóxica media (CC<sub>50</sub>) de 60,2 µg/mL e índice de selectividad (IS) de 5,1. Concluyendo que posee actividad moderada frente al parásito.

Medina (2015), realizó evaluaciones del efecto antibacteriano del extracto metanólico de *Bixa orellana* L. en *Streptococcus*. El extracto metanólico de las semillas presenta halos de 15.11 mm y 16.15 mm frente a *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis* respectivamente; el extracto metanólico de hojas, generó halos de inhibición de 19.97 mm para ambas especies.

Freixa et al. (1998) evaluaron la actividad antifúngica de 19 plantas latinoamericanas, dentro de las cuales se encontraba *Bixa orellana*, observaron que ésta no presenta actividad contra *Candida*.

Tamil et al. (2011) estudiaron extractos metanólicos de hojas y semillas de *Bixa orellana* L. El extracto de hojas presentó actividad contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Vibrio cholerae*, *Moraxella catarrhalis*, *Acinetobacter sp.* y *Brucella sp.* a una concentración de 1000 µg/mL. Así mismo, se observó que *C. albicans* presentó un porcentaje de inhibición del 36.36%.

## 1.3 Objetivos

### 1.3.1 Objetivos Generales

Determinar el efecto antimicrobiano de extractos de hoja de *Bixa orellana* L., “Achiote” frente a microorganismos causantes de infecciones vaginales.

### 1.3.2 Objetivos Específicos

Determinar:

- La actividad antimicótica de extractos de hoja de *Bixa Orellana* L. frente a *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* y *Candida tropicalis*.
- La actividad antibacteriana de extractos de hoja de *Bixa Orellana* L. frente a *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella bivia*, *Peptococcus niger*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Mobiluncus curtisii*, *Atopobium vaginae* y *Veillonella párvula*.
- La actividad antibacteriana del extracto de hoja de *Bixa Orellana* L. frente a *Lactobacillus crispatus*.
- La concentración mínima inhibitoria, bactericida y fungicida de los extractos de *Bixa orellana* L. frente a las bacterias y levaduras causantes de infecciones vaginales, tanto en las cepas ATCC como en los aislamientos clínicos.

## 1.4 Justificación

El Perú es un país mega-diverso, que posee una gran diversidad de flora y fauna. Dichas plantas han sido utilizadas de manera tradicional por los nativos desde épocas milenarias para el tratamiento de distintas enfermedades, actividad conocida como fitoterapia (Medina, 2015).

La fitoterapia es el estudio del tratamiento de las distintas enfermedades utilizando plantas medicinales, basada principalmente en la experiencia popular. Las plantas presentan principios activos con diversas actividades biológicas, actualmente el interés de estas sustancias está basado en el uso médico, veterinario, cosmético y agroquímico (Paredes et al., 2004).

El avance de la fitoterapia como disciplina médica es cada vez mayor, esto se evidencia en que las plantas medicinales representan casi el 25% del total de las prescripciones médicas en países industrializados y en los países en desarrollo su uso alcanza hasta el 80% (Huamán et al., 2009). Entre estas plantas medicinales se encuentra *Bixa Orellana* L.

Las hojas, frutos y corteza de *Bixa orellana* L. se emplean principalmente para el uso medicinal; del fruto se extrae una sustancia llamada “achiote” utilizada en tintorerías y como colorante natural (Lourido y Martínez, 2010), además, presenta propiedades antimicrobianas (Cáceres et al., 1995; Fleischer et al., 2003), antileishmánica (Raga et al., 2007), antimalárica, antitumoral, entre otras. Es por ello por lo que, debido a la gran variedad de propiedades medicinales y al reducido efecto tóxico que estas presentan (Lourido et al., 2010), se ha elegido a *Bixa orellana* L. como sujeto de estudio para determinar la actividad antimicrobiana que presente frente a levaduras del género *Candida*, así como de bacterias anaeróbicas causantes de vaginosis bacteriana.

De obtener resultados positivos, este estudio proporcionará información valiosa como una alternativa de bajo costo para tratamientos contra infecciones vaginales; beneficiando, además, a las regiones donde esta planta crece de manera natural.

### **1.5 Hipótesis**

El extracto de hojas de *Bixa orellana* L. presenta actividad antimicrobiana frente a *Candida* *sp* y bacterias causantes de vaginosis bacteriana.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Extractos Vegetales:

Los extractos vegetales son compuestos concentrados obtenidos a partir del tratamiento de partes de especies vegetales, a las cuales se les ha aplicado solventes adecuados (Agua, etanol, metanol, acetona, dimetilsulfóxido (DMSO), éter, etc.) para extraer componentes solubles. Los extractos contienen una mezcla de principios activos y sustancias inertes, las cuales se producen en la totalidad o en partes de una planta sea fresca o seca (Lizcano y Vergara 2008).

#### 2.1.1 Métodos de Extracción

Deben obedecer a la naturaleza química de las sustancias presentes en la planta y al propósito de la investigación; es un proceso muy importante porque se debe evitar la pérdida de los compuestos activos. Algunas veces es conveniente desengrasar el material vegetal con éter de petróleo (extracto etéreo) o hexano. El alcohol es generalmente más eficaz para recuperar la mayoría de los metabolitos secundarios.

Los compuestos pueden ser polares, no polares y termolábiles; por ello, métodos como maceración, percolación, sonicado, calentamiento bajo reflujo y extracción por soxhlet son comúnmente empleados. Para los compuestos hidrofílicos, se emplean solventes polares como el metanol, etanol o etil acetato; diclorometano o diclorometano/metanol 1:1 se emplean para compuestos más lipofílicos. En algunas ocasiones se emplea hexano para remover la clorofila. El extracto obtenido debe ser almacenado protegido de la luz, bien tapado y en un ambiente seco (Sasidharan et al., 2011; Cos et al., 2006; Lizcano y Vergara, 2008).

## 2.2 *Bixa orellana* L.

*Bixa orellana* L., es una planta de origen americano que se cultiva de manera nativa en distintos países suramericanos como Perú, Brasil, Ecuador y Bolivia. Esta especie crece en tierras bajas preferentemente (100 a 800 m. de altitud) y en regiones montañosas o con altas elevaciones (hasta 1500 m.s.n.m.) (Villar y Villavicencio, 2001). En el Perú, *B. orellana* L. se encuentra en la zona de montaña y selva baja de los departamentos de Junín, Amazonas, Cusco, Ayacucho y San Martín (Huamán et al., 2009).

*B. orellana* L. pertenece a la familia botánica Bixáceae, la planta tiene diversos nombres comunes o populares: axiote, achiote, achiotec, bijol, urucú, urucum, rocú, annatto, orellana, changerica entre otros.

La bixina (un carotenoide presente en la planta) es utilizada como condimento, laxante, cardiotónico, hipotensor, expectorante y antibiótico, además tiene actividad antiinflamatoria para las contusiones y heridas y acelera la cicatrización. La Infusión de las hojas es eficaz contra la bronquitis, dolor de garganta e inflamación (INS, 2015).

Entre los principales componentes de la planta se encuentran los carotenoides, especialmente los apocarotenoides (bixina, isobixina y norbixina) como también betacarotenos, criptoxantina, luteína, entre otros. Sus semillas contienen lípidos como el ácido linoleico, aminoácidos como el glutamato y aspartato, en el caso de elementos, posee una alta cantidad de fósforo, hierro, zinc y pequeñas cantidades de calcio (Sepúlveda et al., 2016; Lourido et al., 2010).

### **2.2.1 Clasificación Taxonómica**

Superdivisión: Spermatophyta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Sub-clase: Rosidae

Orden: Malvales

Familia: Bixaceae

Género: *Bixa*

Especie: *Bixa orellana* L. (1753)

### **2.2.2 Descripción Botánica**

Arbusto o árbol pequeño, perennifolio o caducifolio, de 2 a 5 m. (hasta 10 m.) de altura, con un diámetro a la altura del pecho de 20 a 30 cm. Copa redondeada y densa. Hojas simples, alternas, ovadas de punta larga en el ápice. Tronco cilíndrico de corteza externa café claro, la parte interna es amarillo o amarillo-anaranjado.

Las flores son grandes y vistosas, dispuestas en corimbos terminales, los pedúnculos presentan de 2 a 4 flores de color rosado, rojizo o blanco (conabio.gob.mx). El fruto tiene forma oval, una baja espinosidad y un buen número de semillas (10 a 50 unid.) pequeñas, poliédricas; las cuales se encuentran cubiertas con una sustancia viscosa rojiza o anaranjada que contiene la bixina (López et al., 2018).

### **2.2.3 Usos Tradicionales**

En las zonas de cultivo, los pobladores hacen referencia que desde tiempos muy remotos se tiene conocimiento medicinal del achiote para tratar diferentes enfermedades. Adicionalmente esta planta ha demostrado una alta importancia en el área de la salud, ya que se le atribuye un uso terapéutico muy variado. Antes de que sus propiedades fueran evaluadas científicamente, éstas eran conocidas por los nativos de la Amazonía, quienes realizaban distintas preparaciones para ayudar a la población (Huamán et al., 2009).

Los aborígenes usan el achiote para teñir, se obtiene como una mezcla y es empleado para colorear cerámicas y otros envases de uso doméstico. Se emplea también para colorear la piel de los nativos durante los rituales religiosos y principalmente para protegerse de los rayos ultravioleta y las picaduras de mosquitos. La fibra se usa para la elaboración de cuerdas y el polvo producido, luego de moler las semillas, como afrodisiaco.

Finalmente, la infusión de los brotes se emplea para el lavado de ojos inflamados, mientras que la cocción de las hojas se usa como antiemético durante el embarazo (Vilar et al., 2014).

## **2.3 Microorganismos Causantes de Infecciones Vaginales**

### **2.3.1 *Candida***

Aproximadamente el 85% a 90% de candidiasis vulvovaginal es causada por *Candida albicans*, las otras especies asociadas a este tipo de infección son: *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* y *Candida guilliermondii* (Ciudad-Reynaud, 2007).

Los hongos del género *Candida* son un grupo de levaduras con características muy diversas. Este género abarca más de 160 especies, de las cuales se considera que sólo 18 son patógenos para el ser humano (López et al., 2005).

El género *Candida* presenta un tamaño de 3 a 7  $\mu\text{m}$ , de paredes delgadas que se reproducen por gemación, dependiendo del medio donde residen pueden ser celulares levaduriformes, pseudohifas e hifas. Este género es altamente invasivo causando inflamación en la mucosa (Medina, 2015). Forman parte de la flora de la boca, tracto digestivo y tracto genital femenino; pueden ser responsables de patologías como lesiones en la piel, uñas, cavidad oral, bronquios, pulmones y otros órganos del cuerpo mediante la diseminación de levaduras por medio sanguíneo, al cual se le denomina fungemia o candidemia (Rippon, 1990).

La membrana citoplasmática de *Candida* es una estructura de gran importancia, contiene las enzimas responsables de sintetizar la pared celular y es el objeto de ataque de los antimicóticos. La pared celular de *Candida* es esencial para su patogenicidad desde el momento en que es requerida para su crecimiento, además, de proporcionar rigidez y protección. La composición química del género *Candida* está representada por proteínas, polisacáridos y lípidos; entre estos lípidos está el ergosterol, el cual representa aproximadamente el 25 % de la membrana celular. El género *Candida* tiene la capacidad de asimilar azúcares tales como glucosa, sacarosa, xilosa, fructosa, galactosa y celobiosa y no asimila lactosa (Brooks et al., sf).

### 2.3.2 *Gardnerella vaginalis*

*Gardnerella vaginalis* (*G. vaginalis*), es una bacteria anaerobia que coloniza la superficie del epitelio vaginal y está frecuentemente asociada a vaginosis (Gonzales-Dominguez et al., 2016).

*G. vaginalis* forma parte de la microbiota vaginal comensal del 16-48% de mujeres en edad fértil. También participa en la patogenia de la vaginosis bacteriana (VB), en sinergia microbiana junto a algunas especies de bacterias anaerobias y a *Mycoplasma hominis* (Martínez et al., 2004). *G. vaginalis* es un bacilo inmóvil no encapsulado, puede presentar fimbrias y es corto, con una longitud de 0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$ , lo que hace que aparezca como un cocobacilo pleomórfico, que usualmente se tiñe como Gram negativo o Gram variable. Ultraestructuralmente, su pared corresponde a la de un Gram positivo y la discrepancia en su carácter tintorial radica en el poco espesor de su capa de peptidoglicano, que hace que se decolore fácilmente durante el proceso de la tinción de Gram, y que, por lo tanto, aparece como Gram negativo.

Es un organismo anaerobio facultativo y se aísla en agar sangre incubado en anaerobiosis o en una atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$ , a 35°C por 48 horas, luego del cual se originan colonias translúcidas de 0,3 a 0,5 mm de diámetro, con hemólisis tipo beta. La hemólisis se presenta en agar sangre con eritrocitos de origen humano o de conejo, pero no de otros animales. Además, es catalasa y oxidasa negativo. Estas características aunadas al carácter tintorial de formas cocobacilares Gram negativas, permiten identificarla, y también puede confirmarse mediante el sistema API-20 u otro similar (Hernández, 1998; Arnold et al., 2014).

Infecciones con *G. vaginalis* son asociadas con proteólisis, generando productos nitrogenados como cadaverinas y putrecinas, los cuales contribuyen al olor característico de este tipo de infección. La habilidad para lisar glóbulos rojos ofrece un mecanismo de adquisición de

hierro metabólico y quizás contribuya a la multiplicación de la especie. De forma similar *G. vaginalis* puede adquirir iones férricos de la lactoferrina humana. Produce varias mucinasas, como sialidasa y prolin dipeptidasa, las cuales se cree dañan la mucosa vaginal como parte del proceso patogénico (Greenwood et al., 2012; Espinoza et al., 2005).

### **2.3.3 *Mobiluncus* sp.**

Entre 1980 y 1990 se le dio importancia a este género por su presencia en gran parte de los extendidos de frotis vaginales de pacientes con VB, donde se describía la presencia de bacterias curvas en las células guía (Belmonte, 2012). El nombre *Mobiluncus* deriva de los términos griegos: móvil y gancho (uncus), son un género de bacterias bacilares, Gram variables, anaerobios estrictos, móviles y curvados, no esporulados, semejantes a vibrios. Las pruebas de indol, catalasa y oxidasa son negativas para este género (Arnold et al., 2014).

En 1984, Spiegel y Roberts, reconocen dos especies: *M. mulieris* y *M. curtisii*, basándose en reacciones bioquímicas y estudios de homología del ADN. *M. curtisii* fue posteriormente dividido en dos subespecies: *M. curtisii* subespecie *curtisii* y *M. curtisii* subespecie *holmesii*. Las infecciones por *Mobiluncus* se asocian con la producción de abscesos umbilicales (Belmonte, 2012; Acuña et al., 1994). En 1993 Taylor-Robinson y col., identificaron la citotoxina de *Mobiluncus* que es capaz de desprender monocapas celulares o inducir la pérdida de cilios en células cultivadas de oviducto. Si bien la excreción de la toxina es leve, su efecto parece potenciarse cuando este germen coloniza el epitelio vaginal adhiriéndose mediante su flagelo (Belmonte, 2012).

El cultivo de esta bacteria se hace en agar sangre o en medios selectivos con antibióticos, la muestra recomendada es el líquido obtenido del lavado vaginal, realizado con solución salina estéril. Luego de un periodo de incubación mínimo de 10 días a 35°C, se examinan las placas en busca de colonias de menos de 1 mm de diámetro, translúcidas e incoloras, compuestas por bacilos curvos Gram negativos; para esta tinción de Gram se sustituye la contratinción de safranina por fucsina básica (Hernández, 1998).

#### **2.3.4 *Prevotella sp.***

Son bacilos Gram negativos anaerobios, que anteriormente eran considerados parte del género *Bacteroides* (Marcos et al., 2003), el género *Prevotella* se encuentra dentro del phylum Bacteroidetes, el cual incluye a los géneros *Bacteriodes* y *Porphyromonas*. Metabolizan la glucosa (glucólisis), sin embargo, no emplean la ruta pentosa-fosfato porque carecen de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y gluconato-6-fosfato deshidrogenasa. No se desarrollan adecuadamente en presencia de bilis al 20% y presentan resistencia a vancomicina.

*Prevotella* es considerado comensal, ya que se encuentra distribuida ampliamente en el cuerpo y raramente son causantes de infecciones (Madura, 2017). En el proceso de transición de comensal a patógeno, *Prevotella sp.* presenta factores de patogenicidad como: adhesión a la mucosa, evasión del sistema inmune y el incremento de factores de virulencia (Hupp y Ferneini, 2016).

Especies de *Prevotella* producen poliaminas (putrescina, cadaverina y trimetilamina) como productos normales de su metabolismo. Estas aminas pueden favorecer el incremento del pH, lo cual favorecería el crecimiento de otros anaerobios relacionados con vaginosis bacteriana. Los

aminoácidos producidos por especies como *G. vaginalis* estimulan el crecimiento de *Prevotella bivia*, la cual a su vez produce amoniaco, que facilita el desarrollo de *G. vaginalis* y *Peptostreptococcus sp.*; el ciclo continúa, obteniendo como resultado la presencia de altas concentraciones de las especies mencionadas (Pybus y Onderdonk, 1998).

Las especies del género *Prevotella* son exigentes en cuanto a vitamina k, hemina y sangre se refiere, su consumo depende de la producción de pigmento (melanina), que varía de tonos marrones oscuros a negro, lo cual permite que se clasifiquen en especies pigmentadas y no pigmentadas (Liebana, 2002). Pigmentadas: Productores de melanina, presentando colonias marrón oscuro a negro. *P. intermedia*, *P. negriscens*, *P. corporis*, *P. melaninogenica*, *P. loescheii*, *P. denticola*. No pigmentadas: *P. buccae*, *P. bivia*, *P. oralis*, *P. oris*, *P. buccalis* y *P. veroralis* (Liebana, 2002).

### **2.3.5 *Peptostreptococcus sp.***

Las bacterias del género *Peptostreptococcus* son cocos anaerobios Gram positivos, componentes habituales de la flora normal de superficies mucocutáneas, que incluyen boca, tracto intestinal, vagina, uretra, piel, tracto respiratorio superior, huesos y articulaciones. *Peptostreptococcus* es aislado con una alta frecuencia, ocupa el segundo lugar como anaerobio recuperado de muestras clínicas, representando un cuarto de todos los aislados anaeróbicos; está implicado en una gran variedad de infecciones clínicamente significativas (Bassa et al., 2008).

Con relativa frecuencia se pueden aislar en infecciones, asociadas o no a otras bacterias anaerobias; a pesar de que los aislados de este género son considerados oportunistas o patógenos sinérgicos, han sido implicados en infecciones del tracto genital femenino, como infección

inflamatoria pélvica y vaginosis bacteriana; también se les ha encontrado en infecciones anaeróbicas mixtas o en cultivos puros de infecciones de tejidos blandos (NG et al., 1994).

Los aislados más frecuentes de este género incluyen: *Peptostreptococcus magnus*, *P. asaccharolyticus*, *Peptostreptococcus prevotii*, *Peptostreptococcus anaerobius* y *P. micros* (Bassa et al., 2008).

### **2.3.6 *Peptococcus sp.***

Género que comprende bacterias estrictamente anaerobias, no móviles, cocos Gram positivos, se les puede encontrar solitarios, en parejas o en tétradas. Son bioquímicamente inactivos y forman parte de la flora normal de la boca, vagina y piel (Sanderson, 1977).

En este género se encontraban anteriormente varias especies, sin embargo, al analizar el contenido de guaninas y citosinas en el ADN, se perdieron varias especies. La especie tipo de este género, *Peptococcus niger*, presenta 51 mol% de contenido de G+C mientras que varias de las otras especies incluidas anteriormente (*Peptococcus asaccharolyticus*, *Peptococcus indolicus*, *Peptococcus prevotii* y *Peptococcus magnus*) presentan de 29-34 mol% de G+C (Ezaki et al., 1983).

En agar sangre, luego de 5 días, las colonias de *P. niger* se observan como pequeñas perlas negras, redondas, suaves y brillantes. No realiza hemólisis, no metaboliza gelatina o suero, no digiere leche y no fermenta carbohidratos, sin embargo, produce H<sub>2</sub>S, NH<sub>3</sub> y H<sub>2</sub>. Así mismo *P. niger* produce grandes cantidades de Acido butírico, isovalérico y cáprico; también produce catalasa (Murdoch y Mitchelmore, 1991).

### **2.3.7 *Veillonella sp.***

Son cocos Gram negativos que pertenecen a la familia Veillonellaceae, presentan forma de cocos dispuestos en pares (diplococos), son anaerobios estrictos, no poseen flagelos, esporas ni capsula. *Veillonella* es parte de la flora normal de boca y tracto gastrointestinal, así como también se le puede encontrar en la vagina. En algunas situaciones se comportan como patógenos oportunistas que pueden producir abscesos en senos, amígdalas, cerebro e infecciones mixtas causadas por anaerobios (Mashima et al., 2016).

Los miembros de este género obtienen la energía a partir de ácidos orgánicos de cadena corta, metabolizan lactato y succinato, reducen la cisteína, cistina, tiosulfato y dan lugar a la formación de radicales sulfhidrilos SH<sub>2</sub> (Brook, 1996).

*Veillonella spp* es generalmente susceptible a la mayoría de los antibióticos que se emplean para el tratamiento de infecciones anaeróbicas, incluyendo antibióticos betalactámicos (penicilina y cefalosporina), clindamicina y metronidazol, sin embargo, presenta resistencia a tetraciclina y susceptibilidad intermedia a eritromicina (Brook, 1996).

### **2.3.8 *Atopobium sp.***

El género *Atopobium* fue descrito por primera vez en 1992, comprende bacterias que originalmente fueron clasificadas como *Lactobacillus*. *A. vaginae* fue descrito por primera vez en un estudio de *Lactobacillus* vaginales. Género conformado por bacterias anaeróbicas, Gram positivas, cocos elípticos o cocobacilos productores de ácido láctico. Algunas especies de

*Atopobium* tienen actividad dipeptidil peptidasa y producen cantidades significantes de amoniaco, es conocido que el amoniaco favorece el desarrollo de *G. vaginalis* y que éste a su vez tiene una relación de comensalismo con *Prevotella*; por lo cual es probable que otro tipo de relaciones similares existan. Estudios anteriores han demostrado que existe una relación entre la presencia de, vaginosis bacteriana, especies de *Atopobium* y *G. vaginalis* (Bretelle et al., 2015).

*A. vaginae* es un componente mayoritario de los biofilms asociados a vaginosis bacteriana, representando del 1 al 40% del volumen total; *G. vaginalis* representa el 60-95% y *Lactobacillus* el 5%. Teniendo esto en consideración y sumándole los productos de su actividad metabólica, nos sugiere que *Atopobium* no es necesariamente el único agente causante de vaginosis, pero sí un cómplice de ello (Polatti, 2012).

En la coloración de Gram, *A. vaginae* se encuentra como cocos pequeños ovalados o redondos o bacilos, visibles como células únicas, en pares o en cadenas cortas (Polatti, 2012). *Atopobium spp* es de cultivo lento y no presenta reacción a las pruebas bioquímicas convencionales (Burton et al., 2004).

### **2.3.9 *Lactobacillus sp.***

Los lactobacilos presentan formas variadas, algunos son alargados, otros más cortos; algunos presentan formas rectas y algunos son curvos, e incluso espiralados. Son bacterias Gram positivas, no producen esporas y son fermentadores de azúcares. Son anaerobios aerotolerantes y nutricionalmente muy exigentes (Martín et al., 2008).

La microbiota vaginal se encuentra conformada por varias especies de *Lactobacillus*; las especies predominantes son *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus jensenii*,

*Lactobacillus vaginalis* y *Lactobacillus iners*. La presencia de *Lactobacillus*, promueve un ambiente saludable en la vagina al producir ácido láctico y  $H_2O_2$ , productos que dificultan el crecimiento de otras especies bacterianas (Pradenas, 2014).

De las especies de *Lactobacillus* que se encuentran en la vagina, *L. crispatus* parece ser la que presenta un mayor rol protector; debido a que posee la capacidad de reducir la habilidad de adherencia a las células epiteliales de *G. vaginalis* (Abdelmaksoud et al., 2016).

### III. MÉTODO

#### 3.1 Tipo de Investigación

El tipo de investigación de este trabajo es cuasi experimental, analítico y transversal. En el cual, el objeto de estudio (microorganismos causantes de infecciones vaginales), fue manipulado por el investigador (enfrentados a extractos de *Bixa orellana*), para evaluar la actividad de esta sobre el objeto de estudio. El proyecto no considera la aleatorización de individuos, objeto de estudio. El presente trabajo fue desarrollado en dos fases. La primera parte corresponde al estudio del efecto del extracto sobre las cepas ATCC, la segunda parte se llevó a cabo empleando los aislamientos de origen clínico. El presente estudio forma parte del proyecto “Desarrollo de un óvulo para el tratamiento de infecciones vaginales en mujeres en edad fértil a partir de compuestos polifenólicos de Achiote (*Bixa orellana* L.).

#### 3.2 Ámbito temporal y espacial

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Resistencia a Antimicrobianos e Inmunopatología, dentro de las instalaciones de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia durante el año 2019 hasta enero del 2020.

#### 3.3 Variables

Variable independiente: Extracto de *Bixa orellana* L.

Co variable independiente: Hongos y bacterias.

Variable dependiente: Efecto antimicrobiano.

### **3.4 Población y Muestra**

#### ***3.4.1 Material Vegetal***

*Bixa orellana* L., recolectado de los distritos de Chanchamayo, San Ramón y Pichanaqui ubicados en la Provincia de Chanchamayo, Departamento de Junín; durante el periodo de diciembre 2018- enero 2019. La identificación botánica de la planta a nivel de género y especie fue realizada por el Biólogo José Campos De La Cruz (Anexo A).

#### ***3.4.2 Cepas Estándar de Candida:***

*Candida albicans* (ATCC 10231)

*Candida glabrata* (ATCC 2001)

*Candida parapsilosis* (ATCC 22019)

*Candida tropicalis* (ATCC 13803)

#### ***3.4.3 Cepas Bacterianas estándar:***

*Gardnerella vaginalis* (ATCC 14018)

*Prevotella bivia* (ATCC 29303)

*Peptococcus niger* (ATCC 27731)

*Peptostreptococcus anaerobius* (ATCC 27337)

*Mobiluncus curtisii* (ATCC 43063)

*Atopobium vaginae* (ATCC BAA-55)

*Veillonella parvula* (ATCC 10790)

*Lactobacillus crispatus* (ATCC 33197).

#### **3.4.4 Aislamientos de Origen Clínico:**

Se incluyeron en el estudio 11 aislamientos de *Gardnerella vaginalis* y 11 aislamientos de *Lactobacillus spp*, obtenidos a partir de muestras de secreción vaginal de mujeres en edad adulta asistidas en el Hospital Municipal de Surco de la Ciudad de Lima. Los aislamientos clínicos se obtuvieron durante los meses de septiembre a diciembre del año 2019.

### **3.5 Instrumentos**

Para el desarrollo de los procesos de estandarización y análisis de muestras, se emplearon diversos, equipos, materiales y reactivos.

#### **3.5.1 Equipos**

Incubadora, refrigeradora, congeladora -70°C, cámara de flujo laminar, equipo VITEK2, vortex, turbidímetro, micropipetas, balanza electrónica, microscopio.

### **3.5.2 Materiales**

Jarras de anaerobiosis gas pak 100 (BBL), generadores de anaerobiosis y microaerofilia (OXOID), controladores de anaerobiosis (OXOID), discos de papel en blanco 6 mm (BBL), placas petri descartables 90x15mm, puntas de micropipeta de 10 µl, 200 µl y 1 ml, tubos de ensayo de vidrio 100x13mm, tubos de ensayo descartables para equipo vitek, tarjetas VITEK 2 ANC y NH, beakers, papel aluminio, varilla de vidrio, espátulas, papel Kraft.

### **3.5.3 Reactivos**

Dimetilsulfoxido DMSO (Sigma Aldrich), agar MRS (Sigma Aldrich), agar Columbia (BBL), agar Brucella (BBL), vitamina k (Sigma Aldrich), hemina (Sigma Aldrich), kanamicina (Sigma Aldrich), vancomicina (OXOID), colistina (Sigma Aldrich), ácido nalidixico (Sigma Aldrich), anfotericina B (Sigma Aldrich), proteosa peptona (OXOID), tween 80 (Merk), skin milk (OXOID), sangre humana, sangre de cordero.

## **3.6 Procedimientos**

### **3.6.1 Preparación de los Extractos de *Bixa orellana* L:**

Las hojas recolectadas se limpiaron y secaron en la estufa (40 °C) envueltas en papel kraft, por un periodo aproximado de 4 días; posteriormente las mismas fueron molidas empleando un mortero, finalmente pasaron por un proceso de tamizaje empleando un colador de metal (500 micras).

Para la elaboración del extracto se empleó la técnica descrita por Cáceres et al. (1995) modificada.

Lo obtenido luego de realizar el tamizaje, se colocó dentro de un envase ámbar, se le agregó el solvente (metanol), en una relación de 1:5. La mezcla resultante se dejó macerando por un periodo de 7 días a temperatura ambiente, agitándolo diariamente. La mezcla fue filtrada con papel whatman N°2; posteriormente, el líquido se colocó en la estufa a 40°C hasta la evaporación del disolvente empleado. El extracto final se almacenó en refrigeración (4 °C) hasta su posterior uso.

### ***3.6.2 Recolección de Aislados Clínicos***

Antes de la recolección de la muestra, el Ginecólogo, miembro del equipo de investigación, solicitó a cada paciente que lea y firme el consentimiento informado. (Anexo B).

Se empleó un espéculo para abrir las paredes vaginales. La colección se realizó por succión con jeringa estéril de 5 mL. El material aspirado se inoculó en el medio de transporte Amies con carbón (Marca Remel); se realizaron hisopados vaginales para medir el pH del exudado y se hicieron frotices en dos láminas portaobjetos (Correa, 2009; Money, 2005)

Las muestras fueron transportadas al laboratorio en un cooler con paquetes de hielo, guardando las medidas de bioseguridad correspondientes. El tiempo que transcurrió entre la obtención de muestra y el cultivo en el laboratorio fue menor a 2 horas; así mismo no se dejó pasar más de 10 minutos entre la colecta y el guardado en el medio de transporte.

Para determinar presencia de vaginosis bacteriana se consideraron los criterios de Amsel:

- pH vaginal mayor a 4.5
- Presencia de células clave o guía
- Prueba de aminas positiva (KOH al 10%)
- Secreción fina, homogénea y grisácea.

Una prueba positiva para vaginosis bacteriana debía cumplir con al menos tres de los criterios de Amsel (Morales, 2015).

### **3.6.3 Identificación de Microorganismos**

Se procedió a cultivar la secreción vaginal en cinco agares diferentes: agar MRS (Sigma Aldrich) (Martinez et al., 2013) para el crecimiento de *Lactobacillus*, agar HBT (Human blood tween) (Totten et al., 1982), que permite el crecimiento y observación de colonias típicas de *Gardnerella vaginalis*, agar Columbia (BBL) sangre (Lopes dos Santos et al., 2012 ), *Brucella* (BBL) sangre suplementado con vitamina k (Sigma Aldrich) y hemina (Sigma Aldrich) (Schwebke et al., 1990; Alcalá et al., 2004), columbia sangre suplementado con vitamina k y hemina (NG et al., 1994) y agar *Brucella* sangre suplementado con vitamina k, hemina, kanamicina (Sigma Aldrich) y vancomicina (OXOID) (Pybus y Onderdonk, 1996), para favorecer el crecimiento de las otras especies bacterianas.

Las placas se incubaron en jarras Gas Pak 100 (BBL) en un ambiente anaerobio (OXOID) o microaerofílico (OXOID), según sus requerimientos específicos. Luego de un periodo de 48 a 72 horas de incubación se procedió a observar las colonias crecidas sobre los agares. A partir de

las colonias aisladas, se realizaron subcultivos para garantizar la pureza del germen. Luego del periodo de incubación se abrieron las jarras y se procedió a realizar las pruebas de identificación, para lo cual se emplearon tarjetas ANC VITEK 2 y NH VITEK 2. Los gérmenes identificados fueron inoculados en crioviales con skim milk (OXOID) y almacenados a -20°C, hasta su uso.

### **3.6.4 Reactivación de Microorganismos:**

Los microorganismos por analizar fueron reactivados en los medios adecuados para su crecimiento a 35°C +/- 2°C. Las bacterias se incubaron en jarras Gas Pak 100 (BBL) en un ambiente anaerobio o microaerofílico, según sus requerimientos específicos; a excepción de *Candida* que se incubó en aerobiosis.

Para el cultivo de *G. vaginalis*, se empleó el medio HBT (Human blood tween), este medio consiste en una capa basal de agar Columbia, colistina (Sigma Aldrich) y ácido nalidixico (Sigma Aldrich) más anfotericina B (Sigma Aldrich), presenta también, una capa superior con la misma composición más 5% de sangre humana. HBT agar incluye proteosa peptona (OXOID) y tween 80 (Merk) en la capa basal y superficial (Totten et al., 1982; Cheong et al., 1992). La revisión de las placas se realizó a las 48 y 72 horas para observar el crecimiento.

Para las especies *Mobiluncus sp.* y *Peptococcus sp.*, se empleó agar Brucella adicionando hemina, vitamina K y 5% de sangre de oveja (Schwebke et al., 1990; Alcalá et al., 2004). La lectura de placas de *Mobiluncus* se realizó entre los días 4<sup>to</sup> y 7<sup>mo</sup> luego de la siembra. En el caso de *Peptococcus* se observaron las placas entre el 3<sup>ro</sup> y 5<sup>to</sup> día.

*Prevotella sp.*, se sembró en agar Brucella con hemina, vitamina k, 5% de sangre de oveja, kanamicina y vancomicina (Pybus y Onderdonk, 1996; Padilla et al., 2007). Las lecturas se llevaron a cabo luego de 10 o 12 días de incubación.

*Veillonella sp.*, se sembró en agar Brucella con vitamina k más kanamicina y vancomicina (Brook, 1996). A partir de las 48 horas se realizó la lectura de placas.

*Atopobium sp.*, se sembró agar Columbia con 5% de sangre de oveja (Dos Santos et al., 2012). Se incubó por un periodo mínimo de 3 días. Para la especie *Peptoestreptococcus sp.*, se adicionó hemina y vitamina k (NG et al., 1994). Se observó el crecimiento a las 24 y 48 horas.

Se empleó agar MRS (De Man, Rogosa y Sharpe) para *Lactobacillus sp.* (Martinez et al., 2013), las placas se incubaron por un periodo de 48 horas.

Las especies de *Candida* se sembraron en agar Saboraud (OXOID), las lecturas se realizaron a las 24 y 48 horas (Olivieira et al., 2011).

### ***3.6.5 Determinación de la Susceptibilidad Antimicrobiana de los Extractos***

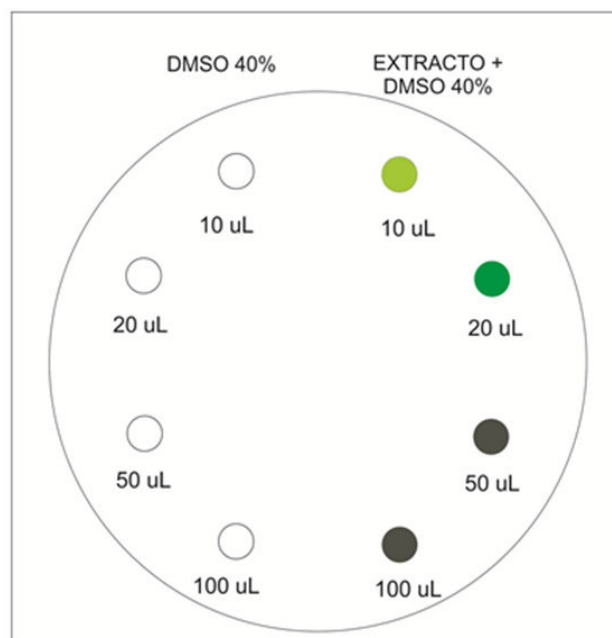
**3.6.5.1 Método de Difusión de Disco en Agar.** Con un asa de cultivo se obtuvo 4 a 5 colonias de las cepas previamente preparadas; las colonias se depositaron en 5 mL de solución salina al 0.85% (8.5 g/L NaCl), se homogenizó en un vortex por 15 segundos, obteniendo una solución equivalente al tubo 0.5 de la escala de McFarland ( $1.5 \times 10^8$  U.F.C.) (Fernandez et al., 2000).

Con la ayuda de un hisopo estéril se esparció el inóculo sobre la placa Petri con agar Saboraud (*Candida*), agar Columbia sangre (anaerobios y *Gardnerella*) y agar MRS

(Lactobacilos). Se dejó reposar por 5 minutos. Con la parte posterior de una punta de pipeta estéril (1 mL), se realizaron los pocillos en el medio de cultivo. Adicionalmente, para volúmenes pequeños del extracto, se colocaron discos de papel filtro (OXOID) de 6 mm sobre el agar a una distancia de 24 mm del centro de la placa, cada disco de papel filtro contenía el extracto (10µL y 20µL), al igual que los pocillos (50µL y 100µL). Se empleó DMSO (Sigma Aldrich) al 40% como control de no inhibición del solvente. Las placas se incubaron en anaerobiosis por 72 horas y microaerofilia por 48 horas, a una temperatura de  $35 \pm 2$  °C. (Hudzicki, 2009; Tamil et al., 2011; Andrews, 2006).

### Figura 1

#### *Distribución de Discos y Pocillos para la Prueba de Sensibilidad*



Finalizado el periodo de incubación, se midieron los diámetros de los halos de inhibición. (Hudzicki, 2009; Tamil et al., 2011).

Para la interpretación de los resultados del efecto inhibitorio de los extractos, se empleó la escala de Duraffourd (Duraffourd, et al., 1987).

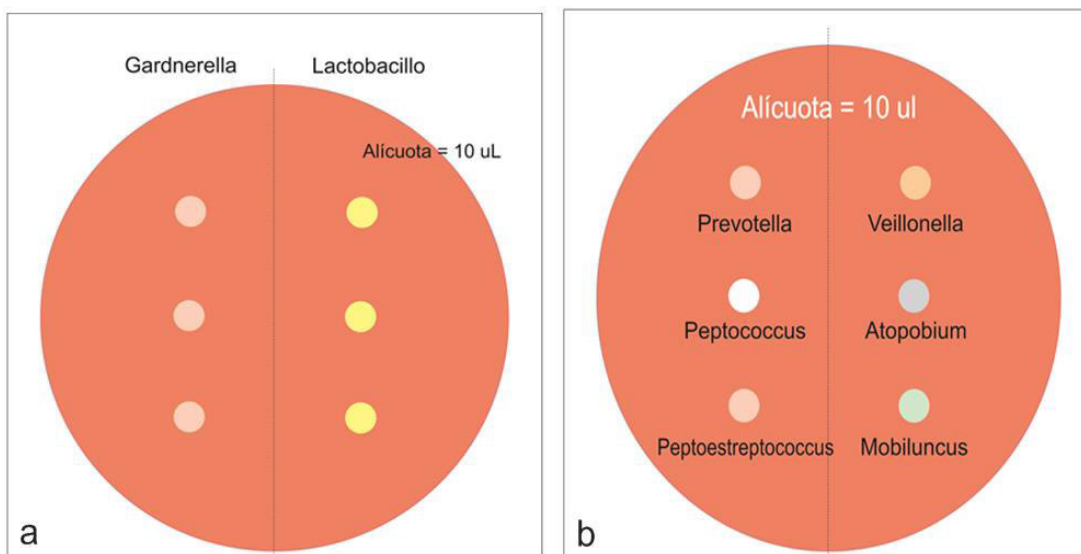
- Nula (-) para un diámetro inferior a 8 mm.
- Sensibilidad límite (sensible = +) para un diámetro comprendido entre 8 a 14 mm.
- Medio (muy sensible = ++) para un diámetro entre 14 y 20 mm.
- Sumamente sensible (+++) para un diámetro superior a 20 mm.

**3.6.5.2 Método de Dilución en Agar.** Para el método de dilución en agar se empleó la técnica descrita por Klancnik et al. (2010). Se prepararon 6 concentraciones diferentes de extracto (Anexo D, fotografía 1), mezclado con agar Columbia sangre al 5% a 40°C (1, 2, 4, 8, 16 y 32 mg/mL), se mezcló vigorosamente y cada dilución se vertió en placas petri estériles. Se dejó solidificar y se realizó un control de esterilidad por 24 horas. Sobre la superficie del agar se colocaron 10 µL de una suspensión bacteriana con concentración equivalente a la escala N° 0.5 de Mc Farland. Las placas de agar se incubaron en anaerobiosis o microaerofilia según la especie a 35± 2°C por un periodo de 2 días para microaerofílicos y 3 días para anaerobios; realizándose una segunda lectura 24 horas después, si no se observaba crecimiento.

La CMI se definió como la menor concentración del extracto en medio sólido donde no se evidenciaba crecimiento bacteriano (Cruz et al., 2010). Placas con agar Columbia sangre inoculadas con la bacteria en prueba, se emplearon como controles positivos. Los ensayos se realizaron por triplicado.

## Figura 2

### *Distribución de Alícuotas en las Placas*



**3.6.5.3 Cálculo de la Concentración Mínima Bactericida (CMB).** A partir de la determinación la concentración mínima inhibitoria se preparó placas de agar Columbia sangre con diferentes concentraciones de extracto, Luego del periodo de incubación, se evidencio crecimiento de la bacteria sobre el medio de cultivo en el punto de inoculación. La ausencia de crecimiento se observó como una “huella” del inóculo sobre la superficie del agar, sin crecimiento visible del germen (Anexo D, fotografía 2).

Para el cálculo de concentración mínima bactericida (CMB), se realizó un raspado con el asa de siembra sobre los puntos con ausencia de crecimiento sobre la placa del agar (huellas), el asa de siembra fue inoculado sobre la superficie de un medio de cultivo estéril y sin inhibidores, la placa fue incubada en las condiciones descritas anteriormente. Se interpretó como la CMB, la concentración de extracto más baja que no permitía la recuperación del germen.

### **3.7 Análisis de datos**

Los replicados técnicos de los halos de inhibición fueron analizados en términos del coeficiente de variación para aproximar su distribución y evaluar valores extremos. Debido a la poca variación y ausencia de valores extremos, los datos fueron resumidos y graficados usando el promedio de los halos +/- la desviación estándar de acuerdo con cada volumen del extracto/DMSO.

La CMI y CMB fueron descritas usando la mediana, valor mínimo y máximo. Finalmente, se evaluó la diferencia del CMI y CMB entre aislamientos clínicos de *G.vaginalis* y *Lactobacillus* usando la prueba de U de Mann Whitney. El análisis de datos fue realizado en Stata v15, considerando un valor de  $p < 0.005$  como significativo.

### **3.8 Consideraciones Éticas:**

El proyecto, con el código de inscripción 104179, fue aprobado por el comité de ética de la Universidad Cayetano Heredia el 14 de septiembre del año 2019 (Anexo C).

## IV. RESULTADOS

### 4.1 Efecto del DMSO Frente a Cepas ATCC de *Candida* y Bacterias Anaerobias

Las pruebas de susceptibilidad para determinar el efecto del disolvente (DMSO más agua destilada en proporción 2:3) sobre las cepas ATCC de levaduras a 5 volúmenes diferentes (5, 10, 20, 50 y 100  $\mu\text{L}$ ), muestran que el solvente no presenta efecto inhibitorio frente a ninguna de las especies de *Candida*.

Las cuatro especies de *Candida* (*C. albicans* ATCC 10231, *C. glabrata* ATCC 2001, *C. parasilopsis* ATCC 22019 y *C. tropicalis* ATCC 13803) no presentan halo de inhibición alrededor de los inóculos de DMSO, lo cual se puede apreciar en el anexo D, fotografía 3.

Resultados similares se obtuvieron con la evaluación de la actividad antibacteriana frente a las bacterias anaerobias. Los 4 volúmenes de disolvente (10, 20, 50 y 100  $\mu\text{L}$ ), no tienen efecto frente a la cepa *G. vaginalis* ATCC 14018, lo que se evidencia con un crecimiento absoluto de la bacteria alrededor del inóculo del disolvente (Anexo D, fotografía 4).

Los resultados de las pruebas para determinar la actividad antibacteriana del DMSO frente a las otras especies de bacterias anaerobias y microaerofílicas ATCC, son similares a los obtenidos con *G. vaginalis*, estos se pueden apreciar en la Tabla 1 y en el anexo D, fotografía 5.

**Tabla 1***Promedios de los Halos de Inhibición*

	EXTRACTO + DMSO (mm)				DMSO (mm)			
	10 ul	20ul	50 ul	100ul	10ul	20ul	50ul	100ul
<i>Gardnerella vaginalis</i> (ATCC 14018)	14	20.33	24.66	30.33	0	0	0	0
<i>Lactobacillus crispatus</i> (ATCC 33197)	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Atopobium vaginae</i> (ATCC BAA-55)	0	12	14	18.33	0	0	0	0
<i>Mobiluncus curtisii</i> (ATCC 43063)	0	12.33	18.33	20	0	0	0	0
<i>Peptococcus niger</i> (ATCC 27731)	13.33	15	22.33	25	0	0	0	0
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> (ATCC 27337)	14	18.66	25.66	28.33	0	0	0	0
<i>Prevotella bivia</i> (ATCC 29303)	0	10.33	12	18.66	0	0	0	0
<i>Veillonella parvula</i> (ATCC 10790)	0	0	0	12.33	0	0	0	0

*Nota.* Actividad del extracto de *B. orellana* y del disolvente DMSO sobre las cepas ATCC. En la tabla se muestran los promedios de los diámetros de los halos de inhibición obtenidos con diferentes volúmenes de extracto y disolvente. Los halos incluyen el diámetro del disco o pocillo del inóculo.

#### 4.2 Efecto Antimicótico del Extracto de *Bixa orellana*

Las pruebas realizadas para evaluar el efecto antimicótico del extracto de *B. orellana* frente a las cepas ATCC de *Candida* muestran que no existe actividad inhibitoria de los diferentes volúmenes de extracto empleadas (5, 10, 20, 50 y 100  $\mu$ L), en todos los casos se observó el crecimiento de las levaduras alrededor de los inóculos del extracto.

Se puede observar en el anexo D, fotografías 6 y 7 la ausencia de actividad inhibitoria de los extractos de *B. orellana* frente a *Candida tropicalis* ATCC 13803, *Candida parasilopsis* ATCC 22019, *Candida glabrata* ATCC 2001 y *Candida albicans* ATCC 10231.

### 4.3 Efecto Antibacteriano del Extracto de *Bixa orellana*

Los resultados de las pruebas de evaluación de la actividad antibacteriana del extracto de *B. orellana* frente a bacterias anaerobias y microaerofílicas ATCC, muestran que existe inhibición del crecimiento en todas las bacterias evaluadas, excepto en *Lactobacillus crispatus* ATCC 33197.

Siguiendo los parámetros de la escala de Duraffourd, *G. vaginalis*, *P. niger* y *P. anaerobius* presentaron sensibilidad límite, frente al menor volumen (10 $\mu$ L) de extracto, con halos de 14, 13.33 y 14 mm respectivamente; sensibilidad media (*P. niger* y *P. anaerobius*) frente al volumen de 20  $\mu$ L, con halos de 15 y 18.66 mm respectivamente; a esa misma concentración *G. vaginalis* resultó sumamente sensible (20.33 mm). Las 3 bacterias mencionadas se mostraron sumamente sensibles al efecto del extracto frente a las alícuotas de 50  $\mu$ L y 100  $\mu$ L, llegando incluso a alcanzar valores de 30.33 mm de halo de inhibición para la especie *G. vaginalis* frente al volumen de 100  $\mu$ L.

Las especies *M. curtisii*, *A. vaginae* y *P. bivia*, no presentaron sensibilidad frente al menor volumen (10  $\mu$ L) de extracto, los halos de inhibición para estas especies se registraron a partir del segundo volumen (20 $\mu$ L), presentando halos de inhibición de 12.33, 12 y 10.33 mm respectivamente, lo que se considera dentro del rango de sensibilidad límite, así mismo los valores de halo de inhibición de *A. vaginae* y *P. bivia* frente a la alícuota de 50  $\mu$ L se encuentran dentro del rango de sensibilidad límite (14 y 12 mm respectivamente), sin embargo *M. curtisii* presentó sensibilidad media a este mismo volumen (18.33 mm de halo de inhibición). Las 3 bacterias presentaron sensibilidad media frente al mayor volumen (100  $\mu$ L) con halos de 20, 18.33 y 18.66 mm respectivamente.

*V. parvula* es la única, de las bacterias anaerobias que presentó sensibilidad nula a 3 de los volúmenes del extracto (10, 20 y 50  $\mu\text{L}$ ), sólo se obtuvo sensibilidad límite frente a la alícuota de 100  $\mu\text{L}$  con un halo de 12.33 mm.

Es importante resaltar que *L. crispatus* presentó resistencia total al efecto del extracto, como se muestra en el anexo D, fotografía 8, no se aprecia halo de inhibición a ninguno de los volúmenes analizados.

Los resultados muestran una relación directamente proporcional entre el halo de inhibición y el volumen de extracto de *B. orellana* empleado en cada prueba, así se puede apreciar en el anexo D, fotografía 9, que a medida que el volumen de extracto se incrementa, también lo hace el promedio de los halos de inhibición.

#### **4.4 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) de las Cepas ATCC**

El formato metodológico empleado para evaluar la CMI y CMB, resultó adecuado, como se puede apreciar en el anexo D, fotografía 10, todas las cepas ATCC empleadas en el estudio, crecieron de manera adecuada en las condiciones y medios de cultivo empleados

La CMI obtenida para *G. vaginalis* ATCC 14018, fue la más baja (1 mg/mL) de todas las bacterias analizadas, seguida por *A. vaginae* ATCC BAA55, *M. curtisii* 43063 y *P. anaerobius* 27337 con una CMI de 4 mg/mL cada una. La especie *P. niger* ATCC 27731 presentó una CMI de 8 mg/mL y las especies *L. crispatus* ATCC 33197, *P. bivia* ATCC 29303 y *V. parvula* ATCC 10790 una CMI de 32 mg/mL, siendo este el valor más alto de todas las concentraciones evaluadas.

**Tabla 2**

Valores de la CMI y de la CMB de las Cepas ATCC

Cepa	CMI (mg/mL)		CMB (mg/mL)	
	mediana	(min - max)	mediana	(min - max)
<i>Gardnerella vaginalis</i> ATCC 1401	1	(1 - 1)	4	(4 - 4)
<i>Lactobacillus crispatus</i> ATCC 331	32	(32 - 32)	32	(32 - 32)
<i>Atopobium vaginae</i> ATCC BAA-5.	4	(4 - 4)	4	(4 - 4)
<i>Mobiluncus curtisii</i> ATCC 43063	4	(4 - 4)	8	(8 - 8)
<i>Peptococcus niger</i> ATCC 27731	8	(8 - 8)	8	(8 - 8)
<i>P. anaerobius</i> ATCC 27337	4	(4 - 4)	8	(8 - 8)
<i>Prevotella bivia</i> ATCC 29303	32	(32 - 32)	32	(32 - 32)
<i>Veillonella parvula</i> ATCC 10790	32	(32 - 32)	>32	(>32 - >32)

*Nota.* En la tabla se muestran los promedios de las réplicas realizadas (3 réplicas) y los valores mínimos y máximos de estas.

Los valores obtenidos de la CMB varían desde 4 mg/mL hasta 32 mg/mL. Las bacterias que mostraron la menor CMB (4mg/mL) fueron *G. vaginalis* ATCC 14018 y *A. vaginae* ATCC BAA55; las cepas de *P. niger* ATCC 27731, *P. anaerobius* ATCC 27337 y *M. curtisii* ATCC 43063 presentaron una CMB de 8 mg/mL, mientras que *L. crispatus* ATCC 33197 y *P. bivia* ATCC 29303 una CMB de 32 mg/mL. *V. párvula* ATCC 10790 fue la única bacteria que presentó actividad bacteriostática a 32 mg/mL., siendo la bacteria menos sensible al efecto del extracto. No se realizaron pruebas a mayores concentraciones, por ello en el caso de *V. párvula* sólo se indica como una concentración mayor a 32 (> 32 mg/mL).

#### **4.5 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) de los Aislados Clínicos**

Se evaluaron 11 aislados clínicos de *G. vaginalis* y *Lactobacillus spp.* respectivamente, al igual que con las cepas ATCC los aislados clínicos fueron sembrados en agar Columbia sangre, como se observa en anexo D, fotografía 11, todos los aislamientos clínicos crecieron adecuadamente.

La CMI para los aislamientos clínicos de *G. vaginalis* se encontró entre 1 mg/mL y 2 mg/mL. Los aislamientos con código MD y M10 fueron los más sensibles al efecto del extracto con una CMI de 1 mg/mL, mientras que los 9 aislados restantes (MG, M5, M8, M9, M23, M26, M29, M30 y M31) presentaron una CMI de 2 mg/mL. La CMI<sub>50</sub> y la CMI<sub>90</sub> obtuvieron un valor de 2 mg/mL cada una.

La CMI de *Lactobacillus* fue de 32 mg/mL para todos los aislados clínicos sembrados. Se observó que todas crecieron de manera abundante desde la concentración 1 mg/mL hasta la concentración 16 mg/mL, sin embargo, en la placa con la máxima concentración (32 mg/mL) no hubo crecimiento de ninguno de los aislamientos y sólo se pudo observar las huellas que dejó la alícuota de cada una de estas. Se obtuvo una CMI<sub>50</sub> y una CMI<sub>90</sub> de 32 mg/mL.

En el anexo D, fotografía 12 y 13 se puede observar las placas empleadas para las pruebas de CMI de *G. vaginalis* y *Lactobacillus spp.*

**Tabla 3**

*CMI y CMB de los Aislados Clínicos de G. vaginalis y Lactobacillus spp.*

MUESTRAS DE ORIGEN CLÍNICO					
<i>Gardnerella vaginalis</i>	CMI	CMB	<i>Lactobacillus spp</i>	CMI	CMB
ATCC	1 mg/ml	4 mg/ml	ATCC	32 mg/ml	32 mg/ml
MD	1 mg/ml	4 mg/ml	MA	32 mg/ml	32 mg/ml
MG	2 mg/ml	4 mg/ml	MB	32 mg/ml	32 mg/ml
M5	2 mg/ml	4 mg/ml	M1	32 mg/ml	> 32 mg/ml
M8	2 mg/ml	4 mg/ml	M4	32 mg/ml	> 32 mg/ml
M9	2 mg/ml	4 mg/ml	M6	32 mg/ml	> 32 mg/ml
M10	1 mg/ml	1 mg/ml	M7	32 mg/ml	32 mg/ml
M23	2 mg/ml	2 mg/ml	M24	32 mg/ml	32 mg/ml
M26	2 mg/ml	4 mg/ml	M25	32 mg/ml	32 mg/ml
M29	2 mg/ml	4 mg/ml	M27	32 mg/ml	> 32 mg/ml
M30	2 mg/ml	4 mg/ml	M33	32 mg/ml	32 mg/ml
M31	2 mg/ml	4 mg/ml	M1A	32 mg/ml	> 32 mg/ml

*Nota.* La tabla muestra los promedios obtenidos de 4 repeticiones.

Los resultados de las pruebas de CMB para la especie *G. vaginalis*, mostraron que la cepa M10 es la más sensible al efecto del extracto con una CMB de 1 mg/mL, seguida por la cepa M23 con una CMB de 2 mg/mL, las 9 cepas restantes (MD, MG, M5, M8, M9, M26, M29, M30 y M31) obtuvieron una CMB de 4 mg/mL al igual que la cepa ATCC. Los valores de CMB<sub>50</sub> y CMB<sub>90</sub> fueron de 4 mg/mL cada uno.

Los resultados obtenidos con los aislados de *Lactobacillus* nos muestran que 6 de estos (MA, MB, M7, M24, M25 y M33) presentaron un valor de CMB de 32 mg/mL, los 5 aislamientos remanentes (M1, M4, M6, M27 y M31) obtuvieron una CMB > 32 mg/mL. Se coloca el símbolo mayor que (>) debido a que no se realizaron pruebas a mayores concentraciones que 32 mg/mL. Así mismo el valor de la CMB<sub>50</sub> fue de 32 mg/mL y el de la CMB<sub>90</sub> de > 32 mg/mL.

En la tabla 4 se muestra los promedios de las medianas de los aislados clínicos analizados, se observa que el crecimiento de las cepas de *G. vaginalis* fue inhibido a valores bajos de la concentración del extracto (CMI: 2 mg/mL, CMB: 4 mg/mL), mientras que las cepas de *Lactobacillus* fueron inhibidas a la mayor concentración evaluada (CMI: 32 mg/mL, CMB: 32 mg/mL).

**Tabla 4**

*Promedios de CMI y CMB de los Aislados Clínicos, y sus Valores Mínimos y Máximos*

Cepa	CMI (mg/mL)		CMB (mg/mL)	
	mediana	(min - max)	mediana	(min - max)
<i>Gardnerella vaginalis</i>	2	(1 - 2)	4	(1 - 4)
<i>Lactobacillus spp.</i>	32	(32 - >32)	32	(32 - >32)

Nota: cada aislamiento clínico fue procesado usando cuatro replicados técnicos

#### 4.6 Análisis Estadístico

Para determinar si los datos obtenidos para los valores de la CMI y la CMB de los aislados clínicos son significativos, se empleó la prueba de Man Whitney, obteniéndose un valor de  $p < 0.001$  en ambos casos. Con lo cual se demuestra que la diferencia del efecto del extracto sobre las cepas de *Gardnerella* y de *Lactobacillus* es altamente significativa; la diferencia observada podría estar explicada por un verdadero efecto diferencial del extracto para los géneros evaluados, así como por la falta de cepas con resistencia natural/adquirida al extracto y que están sesgando nuestros hallazgos. El procedimiento de obtención del p-valor se observa en el anexo E.

## V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las plantas medicinales han sido usadas por siglos para el tratamiento de enfermedades, sin embargo, en los últimos años, se ha incrementado el interés por su investigación y empleo con sustento científico (Razmavar et al., 2014; Bereksi et al., 2018). Las propiedades medicinales de las plantas son preferidas debido a su potente actividad farmacológica, baja toxicidad y accesibilidad económica (Atef et al., 2019; Manandhar et al., 2019; Nascimento et al., 2000).

Un gran número de plantas medicinales son reconocidas como valiosas fuentes de compuestos antimicrobianos, una alternativa que puede ser potencialmente efectiva en el tratamiento de diversas infecciones bacterianas (Manandhar et al., 2019). Las plantas son poseedoras de una amplia variedad de metabolitos secundarios como taninos, terpenoides, alcaloides, flavonoides, glicósidos, saponinas, esteroides, quinonas y cumarinas; los cuales poseen propiedades antioxidantes y antimicrobianas (Obeidat et al., 2012; Gonelimali et al., 2018; Elisha et al., 2017).

*Bixa orellana* es ampliamente conocida por su importancia industrial debido a que sus semillas son empleadas en diversos productos alimenticios, cosméticos y textiles (Rivera et al., 2016), además, los extractos de hojas, semillas y raíces de *B. orellana* han sido utilizados de manera tradicional con propósitos medicinales para tratar una variedad de enfermedades (Srineraja, 2015). Estudios realizados en los últimos años demuestran que *B. orellana* presenta actividad antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, antiinflamatoria, anticarcinogénica, anticonvulsiva, analgésica, antidiarreico, antiparasitario, diurético y antipirético (Shahid-ul-Islam et al., 2016; Lourido y Martínez, 2010), sin embargo, no se encontraron estudios sobre la actividad antimicrobiana de *B. orellana* frente a bacterias microaerofílicas y anaerobias causantes de vaginosis bacteriana.

El dimetilsulfoxido (DMSO) fue el disolvente empleado en este trabajo debido a que es una molécula anfipática usada comúnmente como solvente de sustancias que son insolubles en agua (Pal et al., 2011). En la etapa inicial del estudio se evaluó su actividad antimicrobiana, los resultados demostraron que el DMSO al 40%, empleado en diferentes volúmenes (máximo 100  $\mu$ L), no presentó actividad frente a las cepas ATCC de *Candida* ni las bacterias ATCC anaeróbicas y microaerofilicas empleadas en el estudio, lo que permitió validar su empleo como solvente.

Uno de los objetivos del estudio fue evaluar la actividad antimicótica de los extractos de *B. orellana* frente a especies de *Candida*, nuestros resultados descartan tal actividad. Se ha encontrado estudios contradictorios respecto a la actividad antimicótica. Así, Fleischer et al. (2003), probaron extractos de *B. orellana* contra *C. albicans*, obteniendo halos de inhibición de 22 y 20 mm para los extractos etanólicos de hojas y semillas respectivamente. Ogunshe et al (2008), analizaron 55 aislamientos de *Candida* (15 *C. albicans*, 16 *C. glabrata*, 15 *C. tropicalis* y 9 *C. pseudotropicalis*), las cuales fueron enfrentadas al extracto etanólico de hojas de achiote; reportaron una efectividad de 35.7% para *C. albicans*, 31.2% para *C. glabrata*, 20% para *C. tropicalis* y 33.3% para *C. pseudotropicalis*. Así mismo, estudios realizados en Perú por Espíndola, (2015) y Poma-Castillo et al. (2019), reportan que el extracto etanólico de hojas achiote presenta actividad contra cepas ATCC de *Candida albicans*, llegando a obtener halos de inhibición contra el extracto al 100% de 33.8 mm (*C. albicans* ATCC 10231) y 21.4 mm (*C. albicans* ATCC 90028) respectivamente.

De otra parte, investigadores como Castello et al., (2002), analizaron 6 extractos etanólicos de hojas, raíces e hipocotilo de *B. orellana* contra *C. albicans* y ninguno de los ellos manifestó actividad contra la levadura. Vilar et al. (2014), realizaron una revisión sobre la actividad antimicrobiana de *B. orellana*, donde reportan estudios llevados a cabo en Argentina usando

extracto etanólico de hojas (5 mg/mL) contra *C. albicans* CCM 29-1; en Ecuador con extracto metanólico y diclorometano de hojas (10mg/ disco) contra *C. albicans* ATCC 10231 y Guatemala con extracto acuoso, diclorometano y etanólico de hojas (10 mg/mL) contra *C. albicans* ATCC 10231, obtuvieron resultados negativos para la actividad antimicótica. Braga et al. (2007), estudiaron extractos metanólicos de Frutos y semillas de *B. orellana*, observando que dichos extractos no poseen actividad contra *C. albicans*. En el año 2003 Galindo-Cuspinera et al, analizaron extractos comerciales de *B. orellana* frente a hongos y levaduras, observando que el extracto no presentaba actividad contra *C. parasitopsis* ATCC 22019, inclusive mencionan la posibilidad que el extracto fomente el crecimiento de las levaduras.

Los resultados del presente estudio coinciden con los obtenidos por el segundo grupo de investigadores, demostrando que el extracto metanólico de *B. orellana* estudiado no presenta actividad antimicrobiana contra cepas estándar de *C. albicans* ATCC 10231, *C. glabrata* ATCC 2001, *C. parasitopsis* ATCC 22019 y *C. tropicalis* ATCC 13803.

Las diferencias obtenidas por ambos grupos de investigadores respecto a la actividad antimicótica de extractos de *B. orellana*, podrían estar relacionadas las concentraciones de metabolitos secundarios, los cuales pueden clasificarse en tres grupos: terpenos, compuestos fenólicos y alcaloides (González et al., 2019). Es importante mencionar que los extractos no necesariamente son los mejores indicadores del potencial de las plantas en la producción de ciertos compuestos, debido a que es posible que su producción haya sido reprimida antes de cuantificarlos (Bourgau et al., 2001). Los metabolitos secundarios tienen un rol importante en la interacción de la planta con su entorno, su producción es baja (menos del 1% del peso seco) y dependen del estado fisiológico y de crecimiento de la planta, la expresión de dichos compuestos es fácilmente alterada por factores externos. Gouvea et al. en el 2012, analizaron la concentración de metabolitos

secundarios de *Eremanthus matto grossensis*, observando que la cantidad de compuestos fenólicos se encuentra altamente relacionada con la temporada de lluvias. Otros factores influyentes en la concentración de metabolitos secundarios son: niveles de nutrientes, factores de estrés, luz y reguladores de crecimiento (Namdeo, 2007; Rao y Ravishankar, 2002).

El segundo objetivo del estudio fue evaluar la actividad de los extractos de *B. orellana* frente a las bacterias relacionadas con Vaginosis Bacteriana, enfermedad que se caracteriza por cambios drásticos en la flora vaginal, se han identificado 5 grupos de microbios predominantes en mujeres saludables, *Lactobacillus iners*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii* y una mezcla de bacterias anaeróbicas respectivamente (Borgdorff et al., 2014; Amabebe y Anumba, 2018). La vaginosis bacteriana se presenta como una reducción de los Lactobacilos protectores y un incremento de bacterias que normalmente se encuentran en muy bajas concentraciones (Schwebke et al., 2014); *L. crispatus* es la especie predominante en la flora vaginal normal (Santiago et al., 2012) además parece ser la especie más eficiente en inhibir a las bacterias relacionadas con esta afección, ello debido a que produce elevadas cantidades de peróxido de hidrógeno (Abdelmaksoud et al., 2016).

*G. vaginalis* está presente casi en todas las mujeres con vaginosis bacteriana, se encuentra acompañada de flora anaeróbica (Grmek et al., 2016) como *Atopobium vaginae* (productora de biofilms) y *Prevotella sp*, causante del olor a pescado característico de la enfermedad (Srinivasan et al., 2012). Otras de las especies que se han encontrado de manera frecuente, son *Peptoestreptococcus* y *Mobiluncus* (Srinivasan y Fredricks, 2008).

El extracto de *B. orellana* presentó elevada actividad antimicrobiana frente a las especies anaerobias causantes de vaginosis bacteriana, solamente dos especies manifestaron poca susceptibilidad al efecto del extracto; *P. bivia* con una CMI y CMB de 32 mg/mL y *V. parvula* con

una CMI de 32 mg/mL y CMB mayor a 32 mg/mL. No se realizaron pruebas con concentraciones mayores a 32 mg/mL debido a que la naturaleza del extracto no permitía la manipulación adecuada a mayores concentraciones.

El estudio realizado demuestra que, entre todas las bacterias analizadas, *G. vaginalis* fue la especie más sensible al extracto, obtuvo una CMI de 1mg/mL para la cepa ATCC y 2 mg/mL para los aislados clínicos y una CMB de 4 mg/mL para la cepa ATCC y los aislados clínicos.

No se ha encontrado bibliografía sobre el efecto del extracto de *B. orellana* contra *G. vaginalis*, sin embargo, existen estudios sobre la actividad antibacteriana de otras plantas; en Nigeria, Aiyelaagbe et al. (2007) analizaron el extracto de *Jatropha curcas* contra *G. vaginalis*, obteniendo halos de 17 mm para el extracto metanólico. En Korea, Ha, Yu-Mi et al. (2014), publicaron un estudio sobre el efecto del extracto de algas marinas contra *G. vaginalis*, el extracto etanólico de *Ulva pertusa* presentó un mayor efecto inhibitorio, obteniendo halos de inhibición de 11 mm a una concentración de 5 mg/disco. Kumari y Beena, (2016), analizaron extractos de *Allium sativum* y *Sapindus laurifolia* contra 72 aislados de *G. vaginalis*, los extractos etanólicos de *A. sativum* y *S. laurifolia* presentaron un 59.7% y 83.3% de efectividad respectivamente. No todos los estudios resultaron positivos, en Indonesia, Yuniarti L. et al. (2016), analizaron el efecto del extracto etanólico, acetil acetato y acuoso de guanábana (*Annona muricata*) contra *G. vaginalis* ATCC 14018, ninguno de los extractos presentó actividad antimicrobiana contra la bacteria.

En el caso de las especies de *Lactobacillus*, los resultados fueron diferentes, se obtuvo una CMI y CMB de 32 mg/mL tanto para la cepa ATCC, como para los aislados clínicos, lo que muestra una mínima actividad antibacteriana de los extractos de *B. orellana*, frente a la principal bacteria protectora de la mucosa vaginal. Los análisis realizados demostraron que el extracto metanólico de achiote tiene poca actividad contra *L. crispatus*. Los resultados obtenidos difieren

de los de Ogunshe et al., (2008), quienes probaron el efecto del extracto de achiote sobre 37 aislados de *Lactobacillus*, 4 de los aislados analizados resultaron sensibles al extracto de achiote; así mismo, Galindo-Cuspinera et al., (2003) analizaron el efecto del extracto de frutos y semillas de *B. orellana* observando que estos poseen actividad antimicrobiana contra *L. plantarum* ATCC 700210 y *L. casei* ATCC 39539, no se observó actividad contra *L. lactis* ATCC 11454. Las diferencias en el resultado podrían deberse a que los extractos provienen de diferentes partes de la planta, así como en la cantidad de aislamientos clínicos procesados y la diferencia de especies de *Lactobacillus* analizadas.

Con el estudio realizado se ha contribuido a incrementar el conocimiento de las propiedades del extracto de achiote, siendo el primer reporte en bacterias productoras de vaginosis bacteriana. Esta planta posee muchas cualidades y es una buena fuente de compuestos que pueden favorecer el cuidado de la salud. Los resultados sugieren que el extracto de achiote puede ser empleado como una nueva fuente de compuestos antimicrobianos en el tratamiento de vaginosis bacteriana, toda vez que nuestros resultados muestran escasa actividad frente a las bacterias protectoras y una selectividad frente a las patógenas, lo que confiere al producto interesantes propiedades terapéuticas cuyo estudio es necesario profundizar.

## VI. CONCLUSIONES

Los resultados del estudio nos permiten concluir:

- No se encontró actividad del extracto metanólico de achiote contra las cepas estándar de candida. *C. albicans* ATCC 10231, *C. glabrata* ATCC 2001, *C. parasilopsis* ATCC 22019 y *C. tropicalis* ATCC 13803.
- El extracto metanólico de achiote presenta muy buena actividad contra las cepas estándar de *Gardnerella vaginalis* ATCC 14018, *Atopobium vaginae* ATCC BAA-55, *Mobiluncus cutisii* ATCC 43063 y *Peptoestreptococcus anaerobius* ATCC 27337; actividad media contra *Peptococcus niger* ATCC 27731 y poca actividad contra *Prevotella bivia* ATCC 29303 y *Veillonella párvula* ATCC 10790.
- El extracto metanólico de achiote posee mínima actividad antimicrobiana contra la cepa *Lactobacillus crispatus* ATCC 33197.
- Los aislados clínicos de *G. vaginalis* resultaron sensibles al extracto registrando valores de CMI y CMB iguales a los obtenidos por la cepa ATCC.
- Los aislados clínicos de *Lactobacillus* presentaron bajos niveles de sensibilidad al extracto.
- El extracto de *B. orellana* posee actividad antibacteriana frente a anaerobios relacionados con Vaginosis Bacteriana, lo que le confiere un potencial terapéutico que es necesario profundizar en estudios posteriores.

## VII. RECOMENDACIONES

Luego de la realización del estudio se elaboraron las siguientes recomendaciones:

- Ejecutar más estudios in vitro relacionados a la actividad de *B. orellana* contra bacterias causantes de vaginosis bacteriana debido a los resultados positivos obtenidos en nuestro estudio.
- Realizar estudios in vivo con animales de laboratorio que presenten vaginosis bacteriana para conocer mejor el efecto del extracto de *B. orellana* frente a este tipo de infección.
- Promover la investigación científica de plantas medicinales como *B. orellana* para así ampliar la oferta de tratamientos contra infecciones como vaginosis bacteriana.

## VIII. REFERENCIAS

- Acuña, M., Hernández, F., Rodríguez, E., Del Mar Gamboa, M., Coto, O. y San Román, M. (1994). *Mobiluncus* spp. En la vaginosis bacteriana: Criterios diagnósticos. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*, 15(3-4), 13-18. <https://www.binasss.sa.cr/revistas/rccm/v15n3-4/art1.pdf>
- Abdelmaksoud, A. A., Koparde, V. N., Sheth, N. U., Serrano, M. G., Glascock, A. L., Fettweis, J. M., Strauss, J. F., Buck, G. A., y Jefferson, K. K. (2016). Comparison of *Lactobacillus crispatus* isolates from *Lactobacillus*-dominated vaginal microbiomes with isolates from microbiomes containing bacterial vaginosis-associated bacteria. *Microbiology (Reading, England)*, 162(3), 466–475. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000238>
- Aiyelaagbe, O., Adeniyi, B., Fatunsin, O. y Arimah B. (2007). In vitro Antimicrobial Activity and Phytochemical Analysis of *Jatropha curcas* Roots. *International Journal of Pharmacology*, 3(1), 106-110. <https://doi.org/10.3923/ijp.2007.106.110>
- Alcalá, L., Betriu, C., García J. y Reig, M., (2004). Bacterias Anaerobias. SEIMC - *Procedimientos de Microbiología Clínica*. (2<sup>a</sup> ed). 2-22. <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia16.pdf>
- Alemán, L., Almanza, C., y Fernández, O. (2010). Diagnóstico y prevalencia de infecciones vaginales. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*, 36(2), 62-103. <http://scielo.sld.cu/pdf/gin/v36n2/gin08210.pdf>
- Amabebe, E. y Anumba, D. (2018). The Vaginal Microenvironment: The Physiologic Role of *Lactobacilli*. *Frontiers in medicine*, 5, 181. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00181>

- Andrews J.M. (2006). BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 5), *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58 (3), 511–529. <https://doi.org/10.1093/jac/dk1277>
- Arnold, M., González, A. y Carbonell T. (2014). Diagnóstico de vaginosis bacteriana. Aspectos clínicos y estudios microbiológicos. *Revista Médica Electrónica*, 36(3), 325-338. <http://www.revmedicaelectronica.sld.cu/index.php/rme/article/view/1094/html>
- Atef, N., Shanab, S., Negm S. y Abbas Y. (2019). Evaluation of antimicrobial activity of some plant extracts against antibiotic susceptible and resistant bacterial strains causing wound infection. *Bulletin of the National Research Centre*, 43, 144. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0184-9>
- Bassa A., García M., Cladera, A. y Gaeau, M. (2008). Endocarditis por *Peptostreptococcus*: presentación de dos casos y revisión de la literatura. *Anales de Medicina Interna*, 25(5), 226-228. <https://scielo.isciii.es/pdf/ami/v25n5/nota1.pdf>
- Belmonte, A. (2012), Estudio de factores de patogenicidad de cepas colonizantes e infectantes de *Gardnerella vaginalis* y su asociación con bacterias anaerobias. [Tesis doctoral, Universidad Nacional del Rosario]. <https://rehip.unr.edu.ar/xmlui/handle/2133/10175>
- Bereksi, M., Hassaine, H., Bekhechi, C. y Abdelouahid, D. (2018). Evaluation of antibacterial activity of some medicinal plant extracts used in Algerian traditional medicine against some pathogenic bacteria. *Pharmacognosy Journal*, 10 (3), 507-512. <https://doi.org/10.5530/pj.2018.3.83>
- Borgdorff, H., Tsivtsivadze, E., Verhelst, R., Marzorati, M., Jurriaans, S., Ndayisaba, G. F., Schuren, F. H. y Van de Wijgert, J. H. (2014). Lactobacillus-dominated cervicovaginal microbiota associated with reduced HIV/STI prevalence and genital HIV viral load in

- African women. *The ISME journal*, 8(9), 1781–1793.  
<https://doi.org/10.1038/ismej.2014.26>
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S. y Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 161 (5), 839-851.  
[https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00490-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00490-3)
- Braga, F., Bouzada, M., Fabri, R., de O Matos, M., Moreira, F., Scio, E. y Coimbra, E. (2007). Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *Journal of ethnopharmacology*, 111(2), 396–402.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.12.006>
- Bretelle, F., Rozenberg, P., Pascal, A., Favre, R., Bohec, C., Loundou, A., Senat, M. V., Aissi, G., Lesavre, N., Brunet, J., Heckenroth, H., Luton, D., Raoult, D., Fenollar, F. y Groupe de Recherche en Obstetrique Gynecologie. (2015). High *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis* vaginal loads are associated with preterm birth. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 60(6), 860–867. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu966>
- Brook, I. (1996). *Veillonella* Infections in Children. *Journal of Clinical Microbiology*, 34 (5), 1283-1285. <https://doi.org/10.1128/jcm.34.5.1283-1285.1996>
- Burton, J., Devillard, E., Cadieux, P., Hammond, J. y Reid, G. (2004). Detection of *Atopobium vaginae* in postmenopausal women by cultivation-independent methods warrants further investigation. *Journal of clinical microbiology*, 42(4), 1829–1831.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.42.4.1829-1831.2004>
- Cáceres, A, Menéndez, H, Méndez, E, Cohobón, E, Samayoa, B, Jauregui, E. y col. (1995). Antigonorrhoeal activity of plants used in Guatemala for the treatment of sexually

- transmitted diseases. *J Ethnopharmacol.*, 48, 85-8. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(95\)01288-o](https://doi.org/10.1016/0378-8741(95)01288-o)
- Castello, M., Phatak, A., Chadra, N. y Madhuri, S. (2002). Antimicrobial activity of crude extracts from plant parts and corresponding calli of *Bixa Orellana* L. *Indian Journal of Experimental Biology*, 40, 1378-1381. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12974400/>
- Cheong, Y. M., Ng, Y. P., Chin, C. S. y Thambu, J., (1992). A microbiological study of vaginal discharge in women attending a Malasyan gynaecological clinic. *Med. J. Malaysia*, 47 (1), 44-50. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1387449/>
- Chipeva, V. A., Petrova, D. C., Geneva, M. E., Dimitrova, M. A., Moncheva, P. A. y Kapchina-Toteva, V. M. (2013). Antimicrobial activity of extracts from in vivo and in vitro propagated *Lamium album* L. plants. *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines: AJTCAM*, 10(6), 559–562. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v10i6.30>
- Churata, D. E., Ramos, D., Moromi, H., Martínez, E., Castro, A. y Garcia, R. (2016). Efecto antifúngico de *Citrus paradisi* “toronja” sobre cepas de *Candida albicans* aisladas de pacientes con estomatitis subprotésica. *Revista Estomatológica Herediana*, 26(2), 78-84. <https://doi.org/doi:10.20453/reh.v26i2.2869>.
- Ciudad-Reynaud A. (2007). Infecciones vaginales por cándida: Diagnóstico y tratamiento. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*, 53, 159-166. <https://doi.org/10.31403/rpgo.v53i1005>
- Cos, P., Vlietinck, A. J., Berghe, D. V. y Maes, L. (2006). Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of ethnopharmacology*, 106(3), 290–302. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.04.003>

- Corrêa, P., David, P. R., Peres, N. P., Cunha, K. y Almeida, M. T. (2009). Caracterização fenotípica de leveduras isoladas da mucosa vaginal em mulheres adultas. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, 31(4), 177-181. <https://doi.org/10.1590/S0100-72032009000400004>
- Cruz-Carrillo A., Rodríguez N. y Rodríguez, C. (2010). Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de los extractos de *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* Y *Silybum marianum*. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 13(2), 117-124. <https://doi.org/10.31910/rudca.v13.n2.2010.738>
- Duraffourd, C., Lapraz, J. y D' Hervicourt, L. (1987). Cuadernos de fitoterapia clínica. (1ra ed.). Masson S.A.
- Elisha, I. L., Botha, F. S., McGaw, L. J. y Eloff, J. N. (2017). The antibacterial activity of extracts of nine plant species with good activity against *Escherichia coli* against five other bacteria and cytotoxicity of extracts. *BMC complementary and alternative medicine*, 17(1), 133. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1645-z>
- Espíndola, R. (2015). Efecto antifúngico in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L. “achiote” sobre *Candida albicans* ATCC 10231. [Tesis de pregrado Universidad Privada Antenor Orrego]. Repositorio institucional UPAO <https://repositorio.upao.edu.pe/handle/20.500.12759/1736>
- Espinosa, I., Lorenzo, M., Betancourt, A., Riverón, Y., Romero, M. y Álvarez, E. (2005). Caracterización bioquímica y antigénica de diferentes aislamientos de *Gardnerella vaginalis*. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 24(2). [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S086403002005000200003&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S086403002005000200003&lng=es&tlng=es).

- Ezaki T., Yamamoto N., Ninomiya K., Suzuki S. y Yabuuchi E. (1983). Transfer of *Peptococcus indolicus*, *Peptococcus asaccharolyticus*, *Peptococcus prevotii*, and *Peptococcus magnus* to the Genus *Peptostreptococcus* and Proposal of *Peptostreptococcus tetradius* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 33 (4), 683-698. <https://doi.org/10.1099/00207713-33-4-683>
- Fernández, C., Lemus, D. y Martínez, G. (2000). Sensibilidad de aislamientos clínicos de *Candida albicans* frente a la 5-fluorocitosina. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 52(3), 191-196. [https://www.researchgate.net/publication/11532892\\_Sensitivity\\_of\\_clinical\\_isolates\\_of\\_Candida\\_albicans\\_to\\_5-fluorocytosine](https://www.researchgate.net/publication/11532892_Sensitivity_of_clinical_isolates_of_Candida_albicans_to_5-fluorocytosine)
- Fernández-Calienes, A., Mendiola, J., Acuña, D., Scull, R. y Gutiérrez, Y. (2011). Actividad antimalárica de un extracto hidroalcohólico de *Bixa orellana*. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 63(2), 181-185. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07602011000200013&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602011000200013&lng=es&tlng=es).
- Fernández, J., Martínez, A., Castellón, R. y Tamariz, J. (2010). Vaginosis bacteriana en trabajadoras sexuales que acuden a un centro especializado de referencias de enfermedades de transmisión sexual y SIDA. *Revista Médica Herediana*, 21(1), 32-38. <https://doi.org/10.20453/rmh.v21i1.1143>
- Fleischer, T., Ameade, E., Mensah, M. y Sawyer, I. (2003). Antimicrobial activity of the leaves and seeds of *Bixa orellana*. *Fitoterapia*. Feb, 74, 136-8. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(02\)00289-7](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(02)00289-7)

- Freixa, B., Vila, R., Vargas, L., Nancy L., Tomás A. y Salvador C. (1998). Screening for antifungal activity of nineteen Latin American Plants. *Phytotherapy Research*, 12 (6), 427-430. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199809\)12:6<427::AID-PTR338>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199809)12:6<427::AID-PTR338>3.0.CO;2-X)
- Galindo-Cuspinera, V., Westhoff, D., C. y Rankin, S. A. (2003). Antimicrobial properties of commercial annatto extracts against selected pathogenic, lactic acid, and spoilage microorganisms. *Journal of food protection*, 66(6), 1074–1078. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-66.6.1074>
- Gatti M. (2000). Isolation of *Mobiluncus* species from the human vagina. *Zentralblatt für Bakteriologie: international journal of medical microbiology*, 289 (8), 869-78. [https://doi.org/10.1016/S0934-8840\(00\)80017-1](https://doi.org/10.1016/S0934-8840(00)80017-1)
- Gonelimali, F. D., Lin, J., Miao, W., Xuan, J., Charles, F., Chen, M. y Hatab, S. R. (2018). Antimicrobial Properties and Mechanism of Action of Some Plant Extracts Against Food Pathogens and Spoilage Microorganisms. *Frontiers in microbiology*, 9, 1639. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01639>
- Gonzales-Dominguez, M., Aspiróz, C., Ferrer, I. y Toyas, C. (2016). Bacteremia por *Gardnerella vaginalis* en una paciente con urolitiasis complicada. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 34(6), 329-396. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.08.002>
- González, I., González, D. y Morera, V. (2019). Secondary metabolites in plants: main clases, phytochemical analysis and pharmacological activities. *Revista Bio natura*, 4(4), 1000-1009. <https://doi.org/10.21931/RB/2019.04.04.11>
- Gouvea, D. R., Gobbo-Neto, L., Sakamoto, H. T., Lopes, N. P., Lopes, J. L., Meloni, F. y Amaral, J. G. (2012). Seasonal variation of the major secondary metabolites present in the extract

- of *Eremanthus mattogrossensis* Less (Asteraceae: Vernonieae) leaves. *Química Nova*, 35(11), 2139-2145. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012001100007>
- Greenwood, D., Slack, R., Barer, M. y Will, I., (2012). *Vibrio*, *Mobiluncus*, *Gardnerella* and *Spirillum*: Cholera; Vaginosis; Rat bite fever. *Medical Microbiology*, (18), 314-323. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-4089-4.00045-7>
- Grmek Košnik, I., Dermota, U. y Golle, A. (2016). Frequency of detection of *Gardnerella vaginalis* in vaginal smears in the Upper Carniola region. *Acta dermatovenerologica Alpina, Pannonica, et Adriatica*, 25(2), 31–33. <https://doi.org/10.15570/actaapa.2016.9>
- Ha, Y. M., Choi, J. S., Lee, B. B., Moon, H. E., Cho, K. K. y Choi, I. S. (2014). Inhibitory effect of seaweed extracts on the vaginal bacterium *Gardnerella vaginalis*. *Journal of Environmental Biology*, 35(3), 537-542. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24813010/>
- Hernández F. (1998). *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* en la etiología de la vaginosis bacteriana. *Rev Costarricense de Ciencias Médicas*, 19, 57-61. [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0253-29481998000100010&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-29481998000100010&lng=en&tlng=es).
- Huamán, O., Sandoval, M., Arnao, I. y Béjar, E. (2009). Efecto antiulceroso del extracto hidroalcohólico liofilizado de hojas de *Bixa orellana* (achiote), en ratas. *Anales de la Facultad de Medicina*, 70(2), 97-102. <https://doi.org/10.15381/anales.v70i2.956>
- Hudzicki, J. (2009). Kirby Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. American Society for Microbiology. <https://asm.org/Protocols/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Pro>

- Hupp, J. y Ferneini, E. (2016). Head, Neck and Orofacial Infections. A Multidisciplinary Approach. Elsevier. <https://www.sciencedirect.com/book/9780323289450/head-neck-and-orofacial-infections>
- Intituto Nacional de Salud (INS), (2015), Monografías de plantas medicinales, *Bixa Orellana* L. [https://web.ins.gob.pe/sites/default/files/Archivos/censi/Achiote\\_Vademecum.pdf](https://web.ins.gob.pe/sites/default/files/Archivos/censi/Achiote_Vademecum.pdf)
- Klancnik, A., Piskernik, S., Jersek, B. y Mozina, S. S. (2010). Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of microbiological methods*, 81(2), 121–126. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.02.004>
- Kumari, N. y Beena, A. (2016). In vitro Antibacterial activity of the Aqueous and Ethanol extracts of *Allium sativum* L. (Garlic) and *Sapindus laurifolia* Vahl (Soap nut) against clinical isolates of *Gardnerella vaginalis*. *International Journal of Contemporary Medical Research*. 3(11), 3266-3270. <https://www.researchgate.net/publication/312525460>
- Liébana J. (2002). Microbiología oral. (2da ed.). Mc Graw-Hill Interamericana.
- Lizcano, A. y Vergara, J. (2008). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o Aceites Esenciales de las especies vegetales, *Valeriana pilosa*, *Hesperomeles ferruginea*, *Myrcianthes rhopaloies* y *Passiflora manicata* frente a microorganismos patógenos y fitopatógeno. [Tesis pregrado, Pontificia Universidad Javeriana]. Repositorio Universidad Javeriana. <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8688/tesis151.pdf?sequence=1>
- Llanes, M., González, O., Sánchez, L. y Fernández, O. (2014). Prevalencia de trichomonas vaginalis, candida albicans y gardnerella vaginalis en mujeres sin síntomas de vaginitis. *Medimay*, 20(2), 164-174. <http://revcmhabana.sld.cu/index.php/rcmh/article/view/377>

- Lopes dos Santos Santiago, G., Grob, P., Verstraelen, H., Waser, F. y Vaneechoutte, M. (2012). Susceptibility testing of *Atopobium vaginae* for dequalinium chloride. *BMC research notes*, 5, 151. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-151>
- López, C., Giro, L., Ramos, L., Ramadán, S. y Bulacio, L. (2005) Comparación de diferentes métodos para la identificación de especies del género *Candida*. *Revista Argentina de Microbiología*, 37, 16-21. [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0325-75412005000100003&lng=es](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412005000100003&lng=es).
- López, S., Caicedo, M., Gil, A., López, A. y Pazos, A. (2018) Morfometría de fruto y semilla de *Bixa orellana* L. “achiote”. *Sciéndo*. 21 (2), 213-216. <https://doi.org/doi:10.17268/sciendo.2018.022>
- Lourido, H. y Martínez, G. (2010). La *Bixa orellana* L. en el tratamiento de afecciones estomatológicas, un tema aún por estudiar. *Revista Cubana de Farmacia*, 44(2), 231-244. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75152010000200012&lng=pt](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152010000200012&lng=pt).
- Madura Larsen J. (2017). The immune response to *Prevotella* bacteria in chronic inflammatory disease. *Immunology*, 151 (4), 363-374. <https://doi.org/10.1111/imm.12760>
- Manandhar, S., Luitel, S. y Dahal, K. (2019). In Vitro Antimicrobial activity of some medicinal plants against Human pathogenic bacteria. *Journal of Tropical Medicine*, 2019. ID. 1895340. <https://doi.org/10.1155/2019/1895340>
- Marcos, F., Albo, I., Arbol, F. y Celdrán, J. (2003). Abscesos pulmonares por *Prevotella oralis* y *Prevotella ruminicola* en paciente VIH. *Anales de Medicina Interna*, 20(3), 62-63. <https://doi.org/10.4321/S0212-71992003000300017>

- Mariita, R. M., Orodho, J. A., Okemo, P. O. y Mbugua, P. K. (2010). Antifungal, antibacterial and antimycobacterial activity of *Entada abyssinnica* Steudel ex A. Rich (Fabaceae) methanol extract. *Pharmacognosy research*, 2(3), 163–168. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.65511>
- Martín, R., Soberón, N., Vázquez, F. y Suárez, J. (2008). La microbiota vaginal: composición, papel protector, patología asociada y perspectivas terapéuticas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 26 (3), 160-167. <https://doi.org/10.1157/13116753>
- Martínez-Peña, M. D., Castro-Escarpulli, G. y Aguilera-Arreola, M. G. (2013). Lactobacillus species isolated from vaginal secretions of healthy and bacterial vaginosis-intermediate Mexican women: a prospective study. *BMC infectious diseases*, 13, 189. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-189>.
- Martínez Martínez, W. (2013). Actualización sobre vaginosis bacteriana. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*, 39(4), 427-441. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0138-600X2013000400012&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-600X2013000400012&lng=es).
- Martínez T., M. Angélica, Ovalle S., Alfredo, Reid S., Iván, Céspedes P., Pablo, Martínez T., M. Cristina, y Gaete C., Germán. (2004). Biotipos y susceptibilidad antimicrobiana de *Gardnerella vaginalis*. *Revista chilena de obstetricia y ginecología*, 69(6), 441-445. <https://doi.org/10.4067/S0717-75262004000600006>
- Mashima, I., Theodora, C. F., Thaweboon, B., Thaweboon, S. y Nakazawa, F. (2016). Identification of *Veillonella* Species in the Tongue Biofilm by Using a Novel One-Step Polymerase Chain Reaction Method. *PloS one*, 11(6), e0157516. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157516>

- Medina D. (2015). Evaluación in vitro del efecto antibacteriano citotóxico del extracto de metanólico de *Bixa orellana* L. (Achiote) sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556). [Tesis pregrado, Universidad Peruana Ciencias Aplicadas]. Repositorio académico UPC. <http://hdl.handle.net/10757/584214>
- Medina, R., Rechkemmer, A. y Garcia-Hjarles, M. (1999). Prevalencia de vaginitis y vaginosis bacteriana en pacientes con flujo vaginal anormal en el Hospital Nacional Arzobispo Loayza. *Revista Médica Herediana*, 10(4), 144-150. <https://doi.org/10.20453/rmh.v10i4.617>
- Money, D. (2005). The laboratory diagnosis of bacterial vaginosis. *The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology*, 16(2), 77-79. <https://doi.org/10.1155/2005/230319>
- Morales Parra, G. I. (2015). Aspectos clínicos y diagnóstico de laboratorio de la vaginosis bacteriana. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 14(5), 611-623. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1729-519X2015000500008&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2015000500008&lng=es).
- Murdoch, D. A. y Mitchelmore, I. J. (1991). The laboratory identification of gram-positive anaerobic cocci. *Journal of medical microbiology*, 34(5), 295-308. <https://doi.org/10.1099/00222615-34-5-295>.
- Nascimento, G., Locatelli, J., Freitas, P. y Silva, G. (2000). Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31(4), 247-256. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822000000400003>
- Namdeo, A. (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review. *Pharmacognosy Reviews*, 1(1), 69-79. <https://www.phcogrev.com/article/2007/1/1-6>

- Negi, B. S. y Dave, B. P. (2010). In Vitro Antimicrobial Activity of *Acacia catechu* and Its Phytochemical Analysis. *Indian journal of microbiology*, 50(4), 369–374. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0061-1>
- Ng, J., Ng, L. K., Chow, A. W. y Dillon, J. A. (1994). Identification of five *Peptostreptococcus* species isolated predominantly from the female genital tract by using the rapid ID32A system. *Journal of clinical microbiology*, 32(5), 1302–1307. <https://doi.org/10.1128/jcm.32.5.1302-1307.1994>
- Obeidat, M., Shatnawi, M., Al-alawi, M., Al-Zu bi E. y col. (2012). Antimicrobial Activity of Crude Extracts of Some Plant Leaves. *Research Journal of Microbiology*, 7 (1), 59-67. <https://doi.org/10.17311/jm.2012.59.67>
- Ogunshe, A., Lawal, O. y Iheakanwa, C. (2008). Effects of Simulated Preparations of Plants used in Nigerian Traditional Medicine on *Candida* spp. Associated with Vaginal Candidiasis. *Ethnobotany Research And Applications*, 6, 373-383. <https://ethnobotanyjournal.org/index.php/era/article/view/165>
- Oliveira, P. M., Mascarenhas, R. E., Lacroix, C., Ferrer, S. R., Oliveira, R. P., Cravo, E. A., Alves, A. P., y Grassi, M. F. (2011). *Candida* species isolated from the vaginal mucosa of HIV-infected women in Salvador, Bahia, Brazil. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, 15(3), 239–244. [https://doi.org/10.1016/s1413-8670\(11\)70182-9](https://doi.org/10.1016/s1413-8670(11)70182-9)
- Padilla, C., Lobos, O., Padilla, R., Fuentes, L. y Núñez, L. (2007). Aislamiento de cepas de *Escherichia coli* desde casos clínicos de infección vaginal: asociación con otros microorganismos y susceptibilidad antibacteriana. *Revista chilena de obstetricia y ginecología*, 72(4), 222-228. <https://doi.org/10.4067/S0717-75262007000400005>

- Pal, R., Mamidi, M. K., Das, A. K. y Bhone, R. (2012). Diverse effects of dimethyl sulfoxide (DMSO) on the differentiation potential of human embryonic stem cells. *Archives of toxicology*, 86(4), 651–661. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0782-2>
- Paredes A, Pérez Z. y Palacios V. (2004). Determinación de la actividad antimicrobiana de los frutos de *Bixa orellana* L. en cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* y *Klebsiella Pneumoniae*. [Tesis pregrado, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua]. Repositorio de la UNAN <http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/bitstream/123456789/639/1/191883.pdf>
- Polatti F. (2012). Bacterial vaginosis, Atopobium vaginae and nifuratel. *Current clinical pharmacology*, 7(1), 36–40. <https://doi.org/10.2174/157488412799218824>
- Poma-Castillo, L., Espinoza-Poma, M., Mauricio, F., Mauricio-Vilchez, C., Alvétez-Temoche, D. y Mayta-Tovalino, F. (2019). Antifungal Activity of Ethanol-extracted *Bixa orellana* (L) (Achiote) on *Candida albicans*, at Six Different Concentrations. *The journal of contemporary dental practice*, 20(10), 1159–1163. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10024-2672>
- Pradenas A. (2014). Infecciones cervico vaginales y embarazo. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 25 (6), 925-935. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(14\)70640-6](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(14)70640-6)
- Pybus, V. y Onderdonk, A. B. (1996). The Effect of pH on Growth and Succinate Production by *Prevotella bivia*, *Microbial Ecology in Health and Disease*, 9(1), 19-25. <https://doi.org/10.3109/08910609609167725>
- Pybus, V. y Onderdonk, A. B. (1998). A commensal symbiosis between *Prevotella bivia* and *Peptostreptococcus anaerobius* involves amino acids: potencial significance to the

- pathogenesis of bacterial vaginosis. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, 22 (4), 317-327.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1998.tb01221.x>
- Raga, F, Bouzada, M, Fabri, R, de O Matos, M, Moreira, F, Scio, E. y Col. (2007) Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *J Ethnopharmacol*, 111, 396-402. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.12.006>
- Rao, S. R. y Ravishankar, G. A. (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology advances*, 20(2), 101–153. [https://doi.org/10.1016/s0734-9750\(02\)00007-1](https://doi.org/10.1016/s0734-9750(02)00007-1)
- Razmavar, S., Abdulla, M. A., Ismail, S. B. y Hassandarvish, P. (2014). Antibacterial activity of leaf extracts of *Baeckea frutescens* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *BioMed research international*, 2014, 521287. <https://doi.org/10.1155/2014/521287>
- Rippon, J. W. (1990) Tratado de Micología Médica. (3ª ed.). Interamericana. McGraw Hill.
- Rivera-Madrid, R., Aguilar-Espinosa, M., Cárdenas-Conejo, Y. y Garza-Caligaris, L. E. (2016). Carotenoid Derivates in Achiote (*Bixa orellana*) Seeds: Synthesis and Health Promoting Properties. *Frontiers in plant science*, 7, 1406. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01406>
- Rodriguez B. y Parrales S.M. (2016). Eficacia antifúngica in vitro de *Uncaria tormentosa* frente a *Eucalyptus globulus* sobre *Candida sp.* [Tesis pregrado, Universidad privada Antenor Orrego]. <https://hdl.handle.net/20.500.12759/2421>
- Sanderson, P. J. (1977). Infection of the foot with *Peptococcus magnus*. *Journal of clinical pathology*, 30(3), 266–268. <https://doi.org/10.1136/jcp.30.3.266>
- Santiago, G. L., Tency, I., Verstraelen, H., Verhelst, R., Trog, M., Temmerman, M., Vancoillie, L., Decat, E., Cools, P. y Vaneechoutte, M. (2012). Longitudinal qPCR study of the

- dynamics of *L. crispatus*, *L. iners*, *A. vaginae*, (sialidase positive) *G. vaginalis*, and *P. bivia* in the vagina. *PloS one*, 7(9), e45281. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045281>
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M. y Yoga Latha, L. (2011). Extraction, isolation, and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines: AJTCAM*. 8(1), 1–10. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3218439/>
- Schwebke, J., Hillier, S., Fohn, M. y Lukehart, S. (1990). Demonstration of Heterogeneity among the Antigenic Proteins of *Mobiluncus* Species. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(3), 463-468. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.3.463-468.1990>
- Schwebke, J. R., Muzny, C. A. y Josey, W. E. (2014). Role of *Gardnerella vaginalis* in the pathogenesis of bacterial vaginosis: a conceptual model. *The Journal of infectious diseases*, 210(3), 338–343. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu089>
- Sepúlveda, C. T., Ciro, G. L. y Zapata, J. E. (2016). Extracción de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de hojas de *Bixa orellana* L. (achiote). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(2), 133-144. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962016000200002&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962016000200002&lng=es).
- Shahid-Ul-Islam, Rather, L. J. y Mohammad, F. (2016). Phytochemistry, biological activities and potential of annatto in natural colorant production for industrial applications - A review. *Journal of advanced research*, 7(3), 499–514. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2015.11.002>
- Sousa, Z. L., de Oliveira, F. F., da Conceição, A. O., Silva, L. A., Rossi, M. H., Santos, J. y Andrioli, J. L. (2012). Biological activities of extracts from *Chenopodium ambrosioides*

- Lineu and Kielmeyera neglecta Saddi. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 11, 20. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-11-20>
- Spiegel, C. y Roberts, M. (1984). Mobiluncus gen. nov.; Mobiluncus curtisii subsp. Curtisii sp. Nov., Mobiluncus curtisii subsp. Holmensii subsp. Nov., and Mobiluncus mulieris sp. Nov., Curved Rods from the human vagina. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34 (2), 177-184. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0b013e318167b105>
- Srineeraja, P. (2015). Pharmacological properties of Bixa orellana: Review. *International Journal of Science and Research*, 6 (7), 751-755. [https://www.ijsr.net/get\\_abstract.php?paper\\_id=ART20175183](https://www.ijsr.net/get_abstract.php?paper_id=ART20175183)
- Srinivasan, S. y Fredricks, D. N. (2008). The human vaginal bacterial biota and bacterial vaginosis. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, 2008, 750479. <https://doi.org/10.1155/2008/750479>
- Srinivasan, S., Hoffman, N. G., Morgan, M. T., Matsen, F. A., Fiedler, T. L., Hall, R. W., Ross, F. J., McCoy, C. O., Bumgarner, R., Marrazzo, J. M. y Fredricks, D. N. (2012). Bacterial communities in women with bacterial vaginosis: high resolution phylogenetic analyses reveal relationships of microbiota to clinical criteria. *PloS one*, 7(6), e37818. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037818>
- Tamil Selvi, Dinesh, M., Satyan, R., Chandrasekaran B. y Rose, C. (2011). Leaf and seed extracts of Bixa Orellana L. exert anti-microbial activity against bacterial pathogens. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 01 (09), 116-120. [https://japsonline.com/admin/php/uploads/273\\_pdf.pdf](https://japsonline.com/admin/php/uploads/273_pdf.pdf)

- Totten, P., Amsel, R., Hale, J., Piot, P. y Holmes, K. (1982). Selective differential human blood bilayer media for isolation of Gardnerella (Haemofilus) vaginalis. *Journal of Clinical Microbiology*, 15(1), 141-147. <https://doi.org/10.1128/jcm.15.1.141-147.1982>.
- Vilar, D., Vilar, M. S., de Lima e Moura, T. F., Raffin, F. N., de Oliveira, M. R., Franco, C. F., de Athayde-Filho, P. F., Diniz, M. y Barbosa-Filho, J. M. (2014). Traditional uses, chemical constituents, and biological activities of Bixa orellana L.: a review. *TheScientificWorldJournal*. 2014, 857292. <https://doi.org/10.1155/2014/857292>
- Villar, M, y Villavicencio, O. (2001) Manual de fitoterapia. EsSalud-OPS. <https://hdl.handle.net/20.500.12959/674>
- Wen, L., Haddad, M., Fernández, I., Espinoza, G., Ruiz, C., Neyra, E., Bustamante, B. y Rojas, R. (2011). Actividad antifúngica de cuatro plantas usadas en la medicina tradicional peruana: aislamiento de 3'- formil - 2',4',6' - trihidroxidihidrochalcona, principio activo de Psidium acutangulum. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 77(3), 199-204. [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1810-634X2011000300005&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2011000300005&lng=es&tlng=es).
- Yuniarti, L., Purbaningsih, W., Fauzan, W., Mualifa, U., Ananto, L. Trusdan, S. y Tejasari, M. (2016). *Gardnerella vaginalis* ATCC 14018 resistant to metronidazol and soursop leaves (*Annona muricata* Linn) preparation. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, 3(3), 01-09. [https://www.ejpmr.com/home/abstract\\_id/769](https://www.ejpmr.com/home/abstract_id/769)

## IX ANEXOS

A: Identificación botánica de *Bixa orellana* L.

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ  
CONSULTOR BOTÁNICO  
C. B. P. Nº 3796  
Tel: 017512863 - Cel. 963689079



### CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACION BOTÁNICA

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ. BIÓLOGO COLEGIADO- Nº 3796 – INSCRITO CON EL Nº 36 EN EL REGISTRO DE PROFESIONALES QUE REALIZAN CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE ESPECÍMENES Y PRODUCTOS DE FLORA - RESOLUCIÓN DIRECTORAL Nº 0311-2013- MINAGRI-DGFFS-DGEFFS.

#### CERTIFICA:

Que, Hersil S.A. Laboratorio Industriales Farmacéuticos, con RUC 20100060150, ha solicitado la identificación y certificación botánica de la planta conocida con el nombre vulgar de "achiote", la muestra ha sido estudiada e identificada con el nombre científico de *Bixa orellana* L., y en el Sistema Integrado de Clasificación de las Angiospermas de Arthur Cronquist. (1981), ocupa las siguientes categorías taxonómicas.

REINO : Plantae  
DIVISIÓN : Magnoliophyta  
CLASE : Magnoliopsida  
SUBCLASE : Dilleniidae  
ORDEN : Violales  
FAMILIA : Bixaceae  
GENERO : *Bixa*  
ESPECIE : *Bixa orellana* L.

Nombre vulgar: "achiote"

Se expide la presente certificación para los fines que la empresa estime conveniente.

Lima, 27 de marzo del 2019

  
José R. Campos de La Cruz  
BIÓLOGO  
C. B. P. 3796

## B: Consentimiento Informado

---

**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN**

(Adultos)

<b>Título del estudio :</b>	EFEECTO ANTIMICROBIANO DE EXTRACTOS DE HOJA DE <i>Bixa orellana</i> L. FRENTE A MICROORGANISMOS CAUSANTES DE INFECCIONES VAGINALES
<b>Investigador (a) :</b>	JESUS TAMARIZ ORTIZ
<b>Institución :</b>	UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

**Propósito del estudio:**

Lo estamos invitando a participar en un estudio para ver la efectividad del extracto de *Bixa orellana* L. "Achiote" contra microorganismos causantes de infecciones vaginales. En las últimas décadas la resistencia bacteriana representa uno de los mayores desafíos para la salud, es por ello que se están buscando nuevos compuestos que nos permitan contar con una nueva alternativa de solución al creciente problema.

**Procedimientos:**

Si decide participar en este estudio se realizará lo siguiente:

1. Se empleará un espéculo para abrir las paredes de la vagina y se desinfectará la apertura cervical con hisopos de povidona-iodina.
2. Se procederá a recolectar la muestra por succión con jeringa.
3. Se tomarán hisopados vaginales (2)
4. Se medirá el Ph de la secreción, y se preparará dos frotis en láminas portaobjetos.
5. Se procederá a cultivar la secreción vaginal.

**Riesgos:**

La toma de muestra de secreción vaginal podría generar alguna incomodidad al momento de rozar con las paredes vaginales.

**Beneficios:**

Se beneficiará de una evaluación clínica para el despistaje de esta enfermedad. Se le informará de manera personal y confidencial los resultados que se obtengan de los exámenes realizados.

**Costos y compensación**

Los costos de todos los exámenes serán cubiertos por el estudio y no le ocasionaran gasto alguno. No deberá pagar nada por participar en el estudio. Igualmente, no recibirá ningún incentivo económico ni de otra índole.

**Confidencialidad:**

Nosotros guardaremos su información con códigos y no con nombres. Sólo los investigadores tendrán acceso a las bases de datos. Si los resultados de este seguimiento son publicados, no se mostrara ninguna información que permita la identificación de las personas que participaron en este estudio.

---

**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN**

**(Adultos)**

<b>Título del estudio :</b>	<b>EFFECTO ANTIMICROBIANO DE EXTRACTOS DE HOJA DE Bixa orellana L. FRENTE A MICROORGANISMOS CAUSANTES DE INFECCIONES VAGINALES</b>
<b>Investigador (a) :</b>	<b>JESUS TAMARIZ ORTIZ</b>
<b>Institución :</b>	<b>UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA</b>

**USO FUTURO DE INFORMACIÓN**

Deseamos almacenar los datos recaudados en esta investigación por 20 años. Estos datos podrán ser usados para investigaciones futuras. (*Estudios de prevalencia, etc*).

Estos datos almacenados no tendrán nombres ni otro dato personal, sólo serán identificables con códigos.

Si no desea que los datos recaudados en esta investigación permanezcan almacenados ni utilizados posteriormente, aún puede seguir participando del estudio. En ese caso, terminada la investigación sus datos serán eliminados.

Previamente al uso de sus datos en un futuro proyecto de investigación, ese proyecto contará con el permiso de un Comité Institucional de Ética en Investigación.

Autorizo a tener mis datos almacenados por 20 años para un uso futuro en otras investigaciones. (Después de este periodo de tiempo se eliminarán).

SI (  ) NO (  )

**USO FUTURO DE MUESTRAS**

Deseamos conservar las especies aisladas a partir de las muestras de secreción vaginal que usted proporcionó, almacenándolas por 10 años. Estas muestras serán usadas para investigaciones futuras. (*Pruebas de sensibilidad, PCR, etc*). También usaremos esto para diagnosticar otras enfermedades infecciosas.

Estas muestras almacenadas no tendrán nombres ni otro dato personal, sólo serán identificables con códigos.

Si no desea que sus muestras permanezcan almacenadas ni utilizadas posteriormente, aún puede seguir participando del estudio. En ese caso, terminada la investigación sus muestras serán eliminadas.

Previamente al uso de sus muestras en un futuro proyecto de investigación, ese proyecto contará con el permiso de un Comité Institucional de Ética en Investigación. Asimismo se aclara que ninguna de sus muestras será usada para estudios genéticos.

Autorizo a tener las cepas obtenidas a partir de las muestras de secreción vaginal almacenadas por 20 años para un uso futuro en otras investigaciones. (Después de este periodo de tiempo se eliminarán).

SI (  ) NO (  )

---

**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN**

(Adultos)	
<b>Título del estudio :</b>	EFEECTO ANTIMICROBIANO DE EXTRACTOS DE HOJA DE Bixa orellana L. FRENTE A MICROORGANISMOS CAUSANTES DE INFECCIONES VAGINALES
<b>Investigador (a) :</b>	JESUS TAMARIZ ORTIZ
<b>Institución :</b>	UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

**De derechos del participante:**

Si decide participar en el estudio, puede retirarse de éste en cualquier momento, o no participar en una parte del estudio sin daño alguno. Si tiene alguna duda adicional, por favor pregunte al personal del estudio o llame al *Dr. Jesús Tamariz Ortiz*, al teléfono 969 754 426.

Si tiene preguntas sobre los aspectos éticos del estudio, o cree que ha sido tratado injustamente puede contactar a la Dra. Frine Samalvides Cuba, presidenta del Comité Institucional de Ética en Investigación de la Universidad Peruana Cayetano Heredia al teléfono 01-3190000 anexo 201355 o al correo electrónico: [duict.cieh@oficinas-upch.pe](mailto:duict.cieh@oficinas-upch.pe)

Una copia de este consentimiento informado le será entregada.

**DECLARACIÓN Y/O CONSENTIMIENTO**

Acepto voluntariamente participar en este estudio, comprendo de las actividades en las que participaré si decido ingresar al estudio, también entiendo que puedo decidir no participar y que puedo retirarme del estudio en cualquier momento.

---

**Nombres y Apellidos  
Participante**

---

**Fecha y Hora**

---

**Nombres y Apellidos  
Testigo (si el participante  
es analfabeto)**

---

**Fecha y Hora**

---

**Nombres y Apellidos  
Investigador**

---

**Fecha y Hora**

## C: Aprobación del comité de ética



UNIVERSIDAD PERUANA  
CAYETANO HEREDIA

Dirección Universitaria de  
**INVESTIGACIÓN, CIENCIA Y  
TECNOLOGÍA (DUICT)**

**CONSTANCIA 503-21-19**

El Presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación (CIEI) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia hace constar que el proyecto de investigación señalado a continuación fue **APROBADO** por el Comité Institucional de Ética en Investigación, bajo la categoría de revisión **EXPEDITA**. La aprobación será ratificada en la sesión del comité más próxima a la fecha de emisión de este documento.

Título del Proyecto : **"Efecto antimicrobiano de extractos de hoja de *Bixa Orellana* L. Frente a microorganismos causantes de infecciones vaginales".**

Código de inscripción : **104179**

Investigador principal : **Romero Salcedo, Liz Estrellita**

La aprobación incluyó los documentos finales descritos a continuación:

1. **Protocolo de investigación**, versión recibida de fecha 27 de agosto del 2019.
2. **Consentimiento informado**, versión 1.0 de fecha 02 de mayo del 2019.

La **APROBACIÓN** considera el cumplimiento de los estándares de la Universidad, los lineamientos Científicos y éticos, el balance riesgo/beneficio, la calificación del equipo investigador y la Confidencialidad de los datos, entre otros.

Cualquier enmienda, desviaciones, eventualidad deberá ser reportada de acuerdo a los plazos y normas establecidas. El investigador reportará cada seis meses el progreso del estudio y alcanzará un informe al término de éste. La aprobación tiene vigencia desde la emisión del presente documento hasta el **13 de setiembre del 2020**.

Si aplica, los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

Lima, 14 de setiembre del 2019.

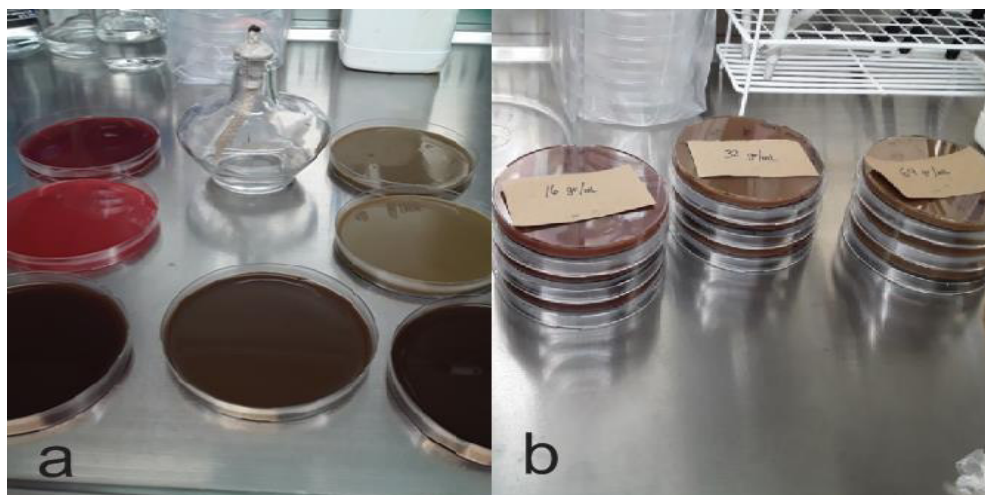
  
Dra. Frine Samalydes Cuba  
Presidenta  
Comité Institucional de Ética en Investigación



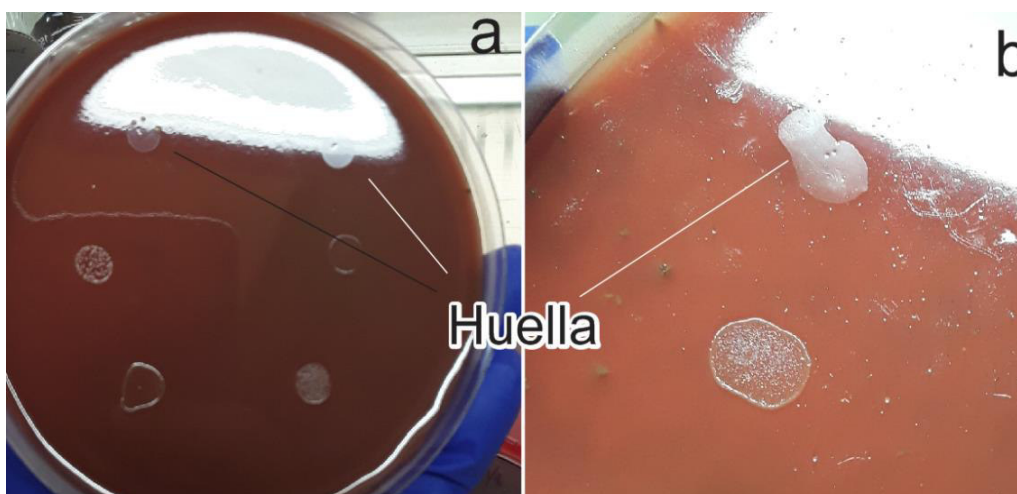
1/20

Av. Honorio Delgado 430, SMP 15102   
Apartado postal 4314  
(511) 319-0000 anexo 201352   
duict@oficinas-upch.pe   
[www.cayetano.edu.pe](http://www.cayetano.edu.pe) 

## D: Reporte fotográfico

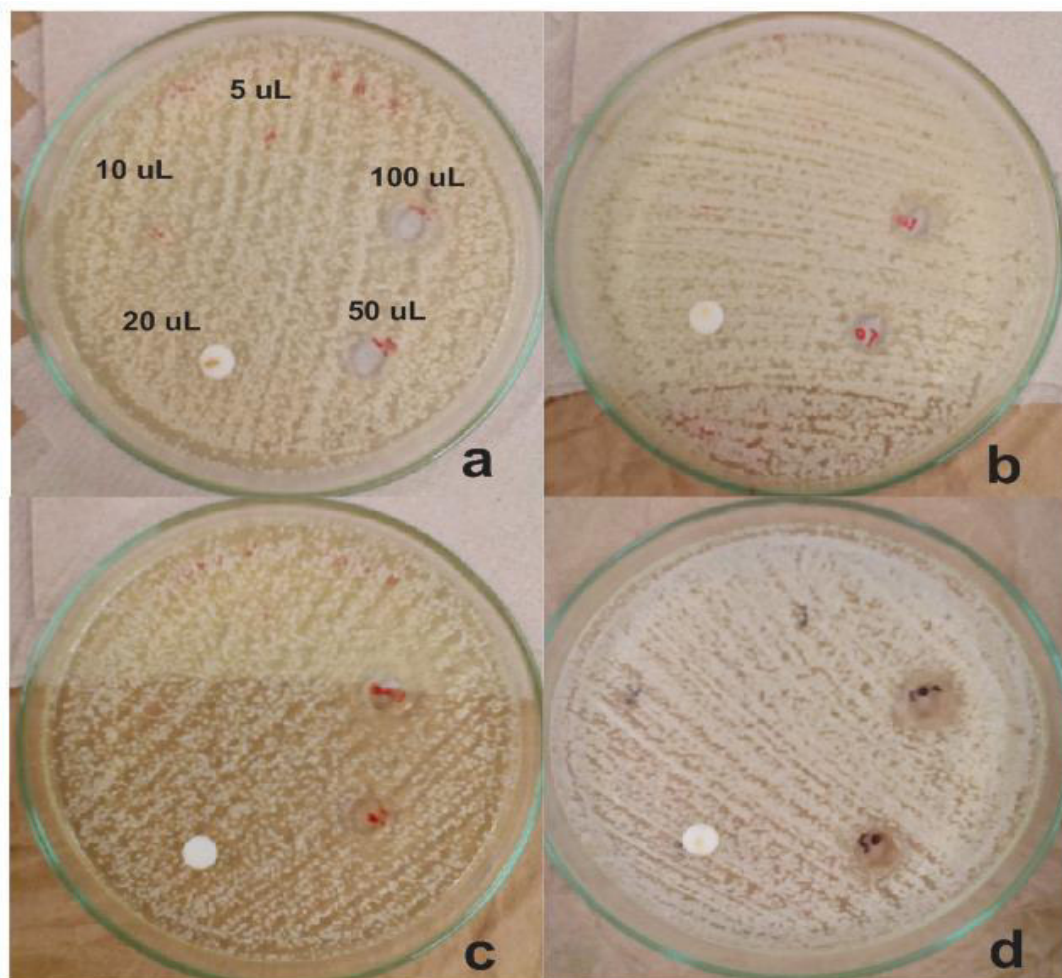
**Fotografía 1:** *Placas de Agar con Extracto*

Nota. La imagen de la izquierda (a) nos muestra las diferentes concentraciones de extracto en las placas, conforme se incrementa la concentración de extracto, las placas presentan un color más oscuro. En la derecha (b) se observan las 3 placas que se emplean por cada concentración.

**Fotografía 2:** *Placas con “Huellas” que Muestran la Ausencia de Crecimiento Bacteriano*

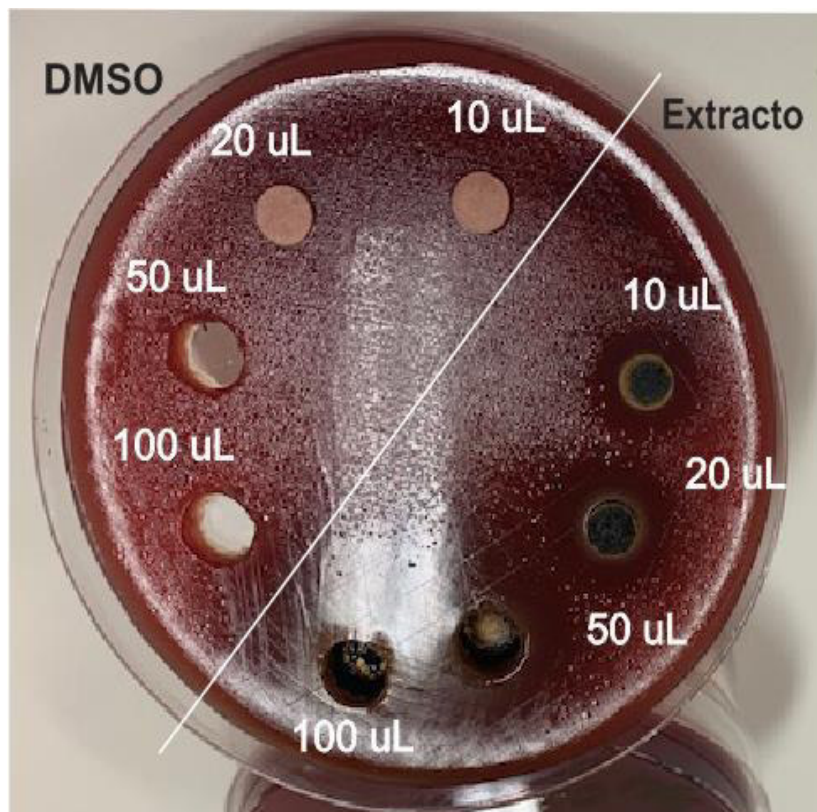
Nota. En la placa de la izquierda (a) se observa que los inóculos superiores no han desarrollado colonias a diferencia de las otras especies. En la imagen de la derecha (b) se muestra un acercamiento a la placa para observar mejor la “huella” que deja la alícuota.

**Fotografía 3:** Pruebas de sensibilidad del DMSO frente a *Candida*



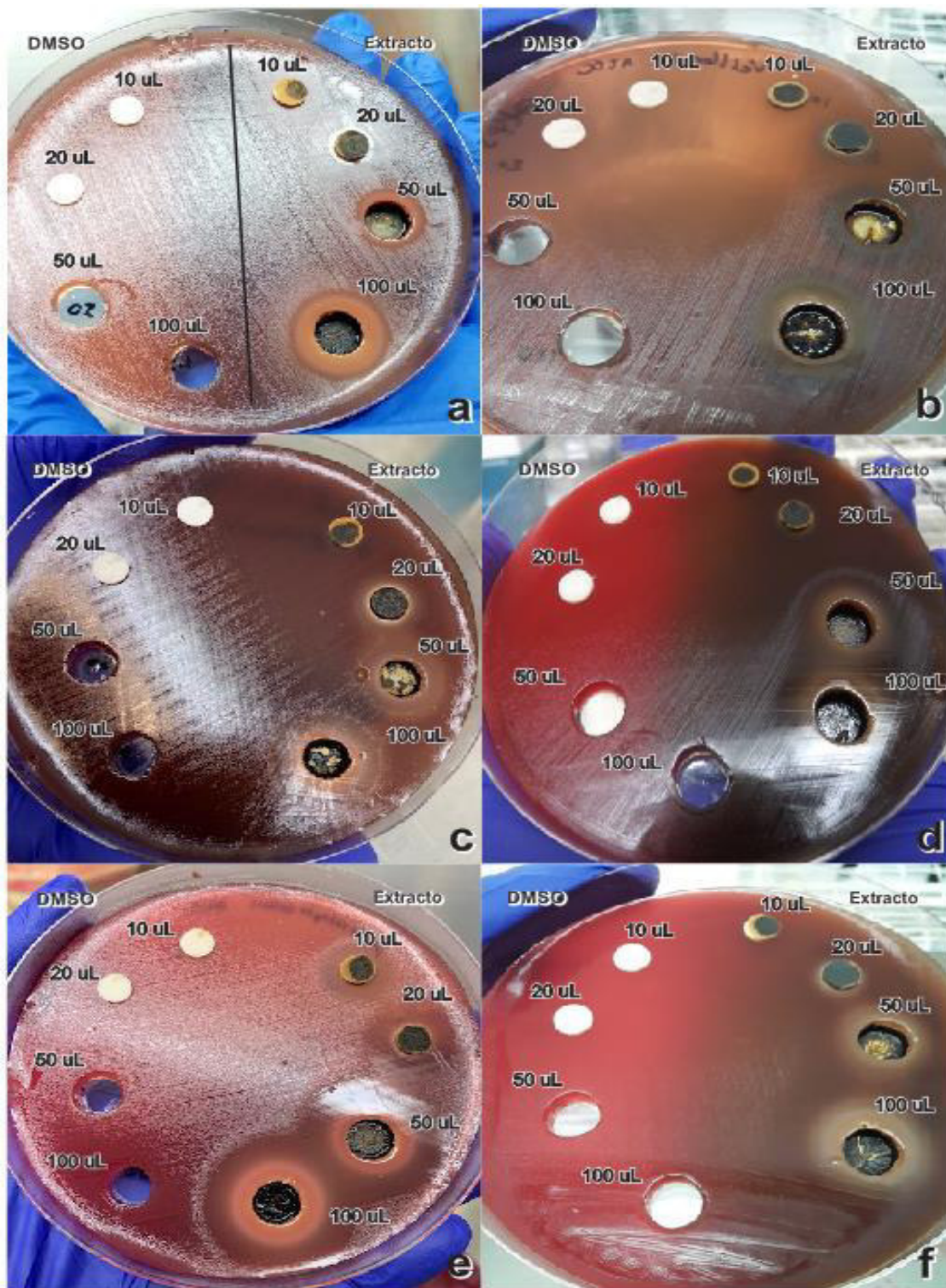
Nota. Resultados de las pruebas de susceptibilidad de las cepas ATCC de *Candida*. *Candida albicans* (a), *Candida tropicalis* (b), *Candida glabrata* (c) y *Candida parasilopsis* (d) frente al disolvente DMSO. En la figura a se observa la posición de las alícuotas, disco y pocillos empleados para colocar los diferentes volúmenes de disolvente. En todos los casos no se observa halo de inhibición lo que descarta el efecto inhibitorio de los diferentes volúmenes de disolvente.

**Fotografía 4:** Prueba de susceptibilidad de *Gardnerella vaginalis*



Nota. Prueba de susceptibilidad de *G. vaginalis* ATCC 14018 frente a DMSO y extracto de *B. orellana*. A la izquierda de la placa se aprecia el crecimiento de la bacteria frente a los diferentes volúmenes de DMSO, a diferencia de los halos de inhibición crecientes que se producen con los diferentes volúmenes de extracto de *B. orellana* (derecha).

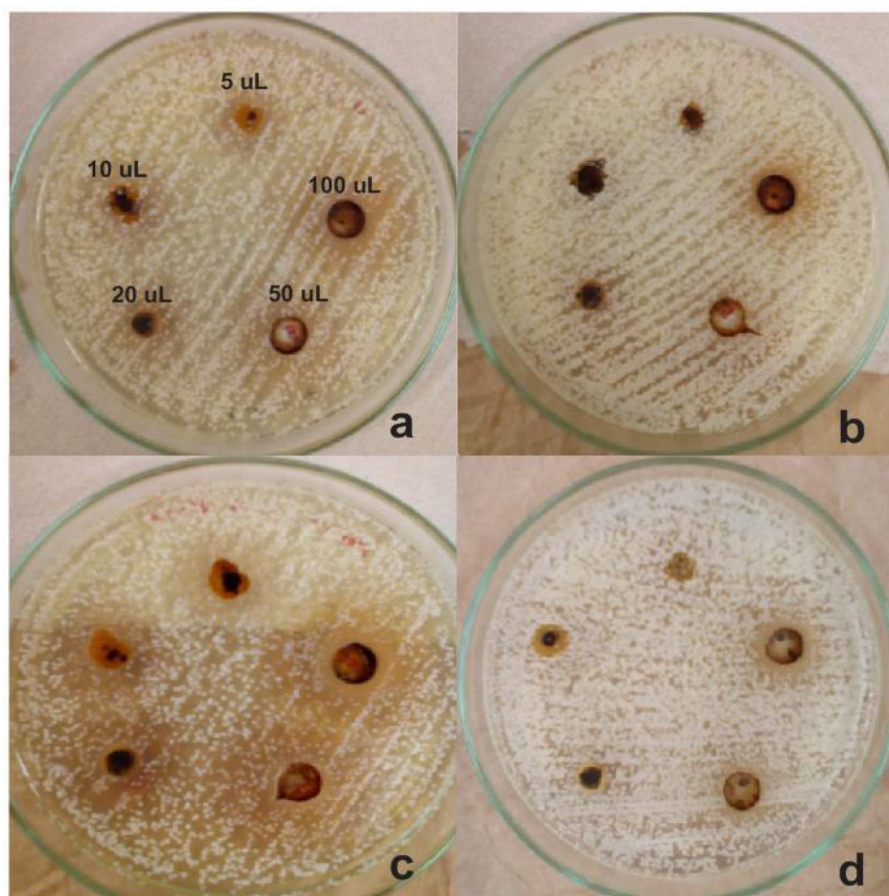
**Fotografía 5:** *Antibiogramas de Bacterias Anaerobias*



Nota. Pruebas de susceptibilidad de bacterias anaerobias frente a DMSO (izquierda) y extracto de *B. Orellana* (derecha). *P. bivia* ATCC 29303 (a), *V. parvula* ATCC 10790 (b), *A. vaginae* ATCC

BAA-55 (c), *M. curtisii* ATCC 43063 (d), *P. anaerobius* ATCC 27337 (e), *P. niger* ATCC 27731 (f). Se observa crecimiento de las bacterias en presencia del DMSO y halos de inhibición frente al extracto.

**Fotografía 6:** Pruebas de Sensibilidad del Extracto contra *Candida*



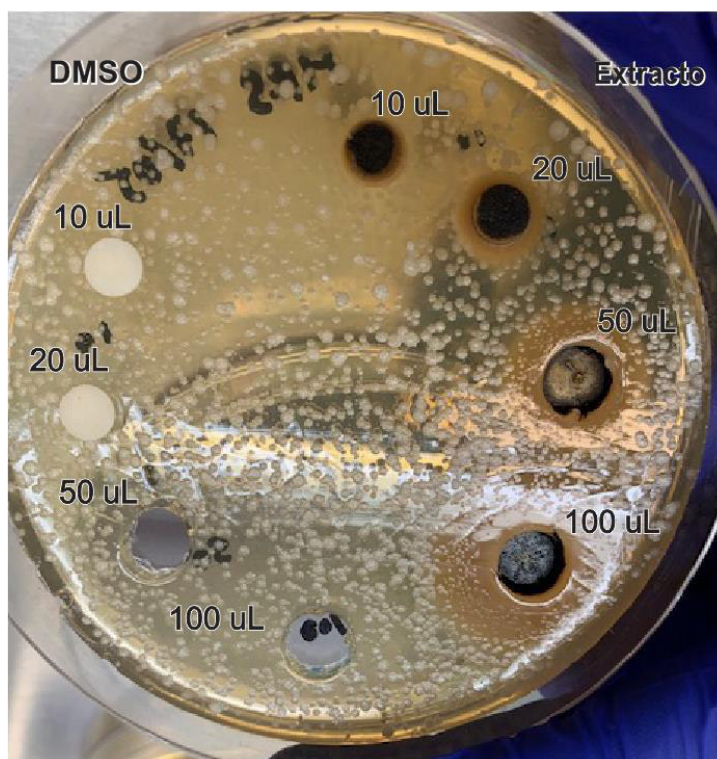
Nota. Pruebas de susceptibilidad de las cepas ATCC de *Candida* frente al extracto de achiote, *C. albicans* ATCC 10231 (a), *C. tropicalis* ATCC 13803 (b), *C. glabrata* ATCC 2001 (c) y *C. parasilopsis* ATCC 22019 (d). En la figura “a” se observa la posición de las alícuotas, disco y pocillos empleados para colocar los diferentes volúmenes del extracto.

**Fotografía 7:** Prueba de Sensibilidad *Candida glabrata*

Acercamiento de la Fotografía 6-c, se observa el crecimiento de colonias de *Candida glabrata* ATCC 2001 en los bordes de los pocillos que contienen el extracto.

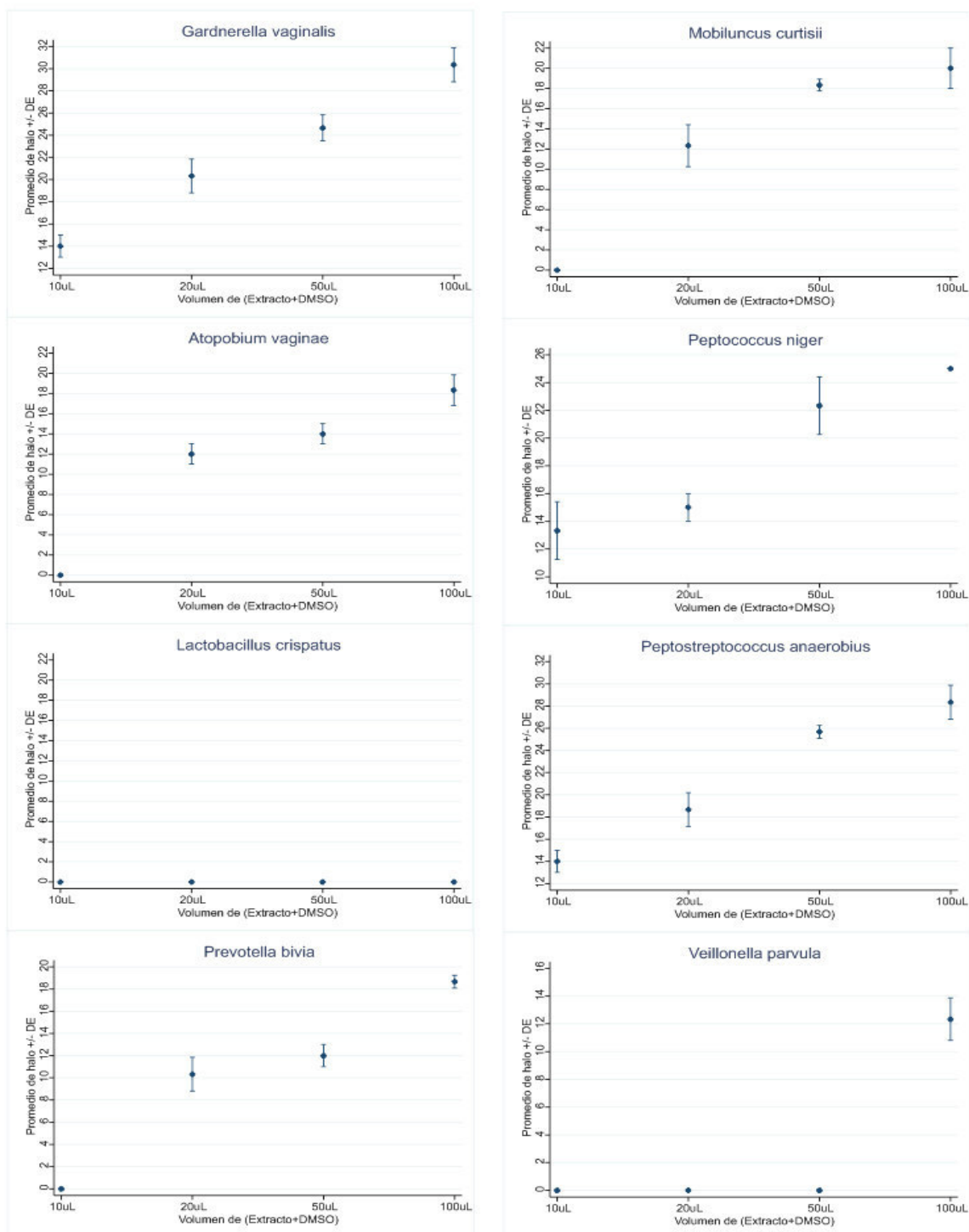


**Fotografía 8:** Prueba de Sensibilidad de *Lactobacillus crispatus*



Nota. Se observa la ausencia de halo de inhibición a los distintos volúmenes de extracto de *B. orellana* frente a *Lactobacillus crispatus* ATCC 33197.

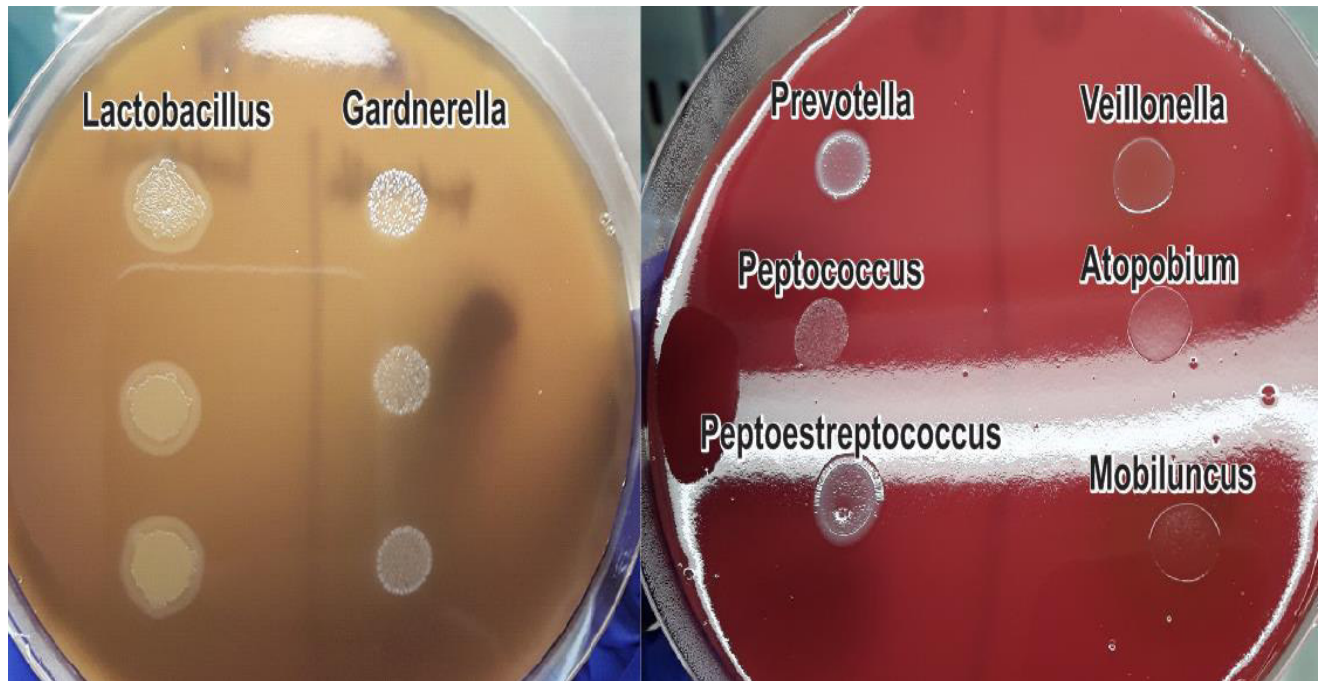
**Fotografía 9:** Promedio de Halos de Inhibición Versus Volúmen de Extracto



Nota. Relación entre promedio de halo de inhibición y el volumen del extracto de *B. orellana* frente a las bacterias anaerobias y microaerofílicas ATCC. En el eje de las ordenadas se muestran

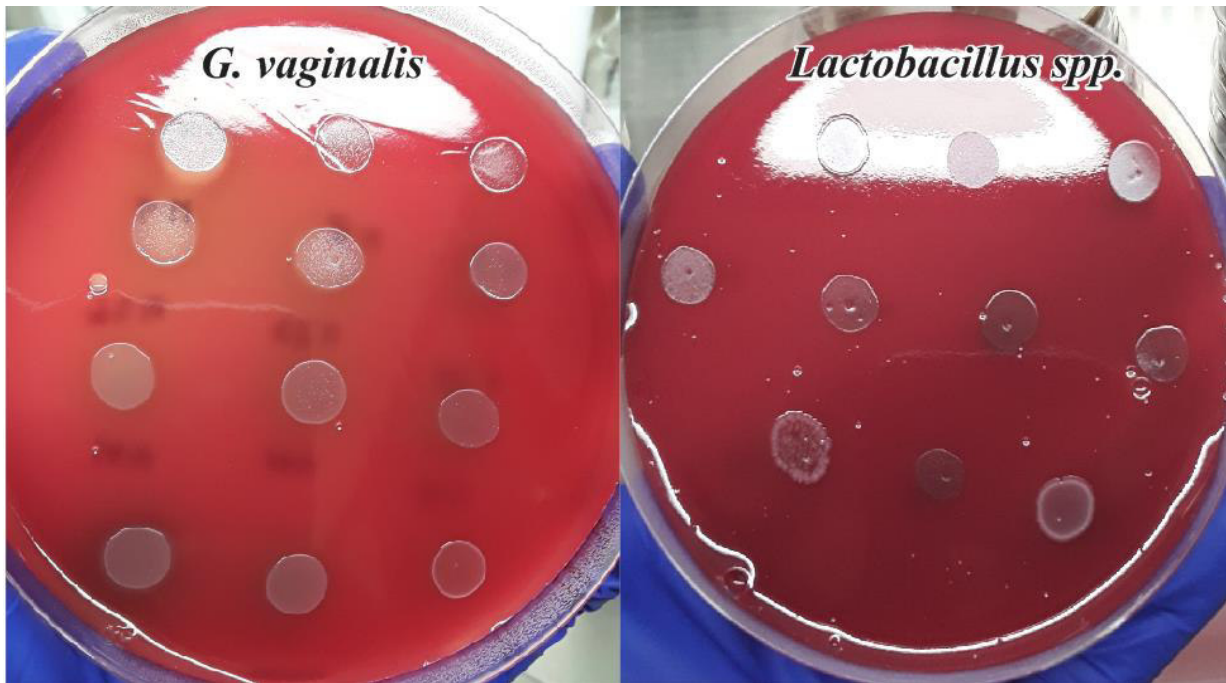
los promedios de halos de inhibición en mm, en el eje de las abscisas se muestran los volúmenes de extracto probados.

**Fotografía 10:** *Placas Control con Bacterias Microaerófilicas y Anaerobias*



Nota. Crecimiento de las cepas ATCC en el medio de cultivo agar Columbia sangre (medio control). Se puede apreciar el crecimiento copioso de las bacterias microaerófilicas (izquierda) y anaerobias (derecha).

**Fotografía 11:** Aislados Clínicos de *G. vaginalis* y *Lactobacillus spp.*



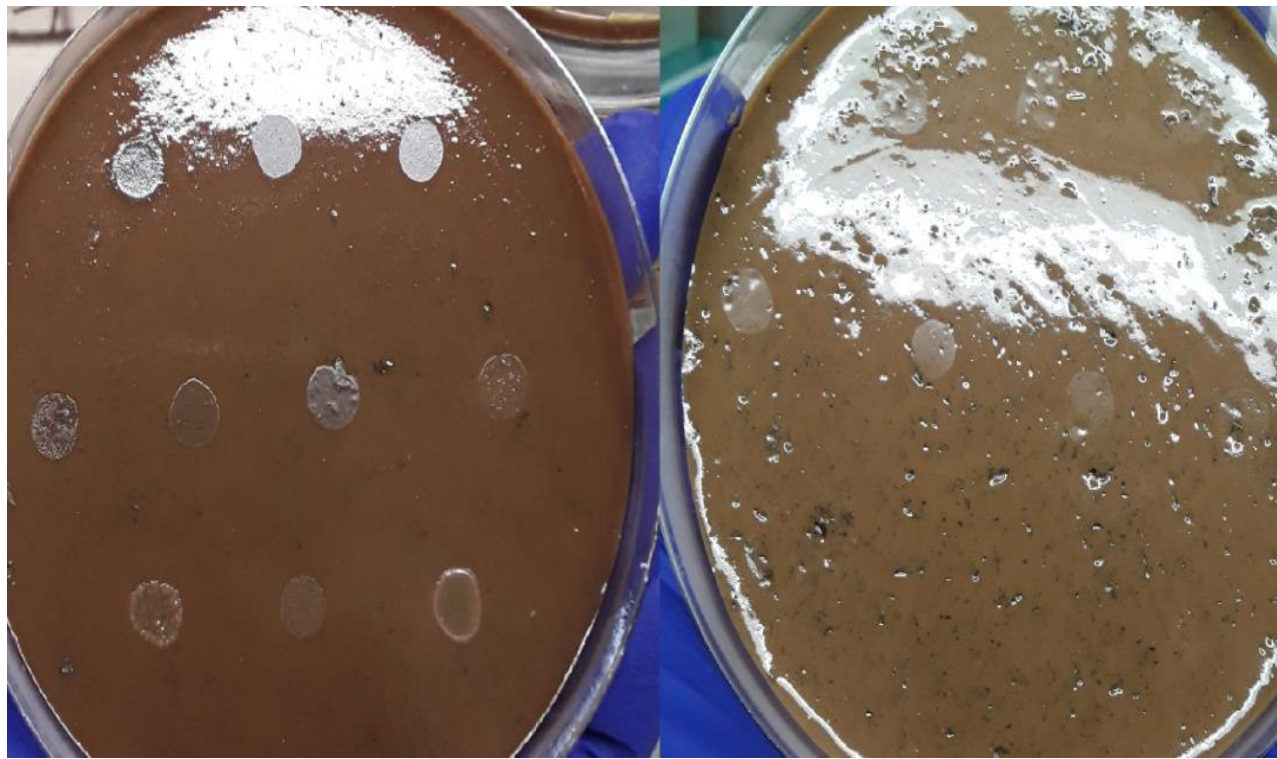
Nota. Se aprecia crecimiento abundante de todos los aislados clínicos sembrados en Agar Columbia sangre.

**Fotografía 12:** Placas de prueba de CMI para *G. vaginalis* y *Lactobacillus* spp.



Nota. Izquierda: placa con extracto concentración 2 mg/ml, no se observa crecimiento de *Gardnerella*, solo manchas de la alícuota colocada sobre el agar. Derecha: placa concentración 32 mg/ml, no se observa crecimiento de los aislados clínicos de *Lactobacillus*.

**Fotografía 13:** *Placas con Cepas de Lactobacillus a Dos Concentraciones Diferentes*



Nota. Izquierda: placa con extracto concentración 16 mg/ml, se aprecia el crecimiento de los aislados clínicos de *Lactobacillus*, mientras que al lado derecho en la placa con 32 mg/mL de extracto no se observa crecimiento de ninguna de las bacterias sembradas, solo se observan las huellas de la alícuota.

## E. Obtención del p-valor de las CMI empleando la prueba de Mann Whitney

## Prueba de U-Mann Whitney para dos muestras independientes

Genero	N	Suma de rangos	Suma de rangos esperada
0	44	990	1958
1	44	2926	1958
total	88	3916	3916

Varianza sin ajustar	14358.67
ajuste de ligaduras	<u>-2592.46</u>
varianza ajustada	11766.21

Ho: CMI(Gardnerella = 0) = CMI(Lactobacilo = 1)  
 $z = -8.924$   
 Prob > |z| = 0.0000  
 P < 0.001

## Prueba de U-Mann Whitney para dos muestras independientes

Genero	N	Suma de rangos	Suma de rangos esperada
0	44	990	1958
1	44	2926	1958
total	88	3916	3916

Varianza sin ajustar	14358.67
ajuste de ligaduras	<u>-1257.29</u>
varianza ajustada	13101.38

Ho: CMB(Gardnerella = 0) = CMB(Lactobacilo = 1)  
 $z = -8.457$   
 Prob > |z| = 0.0000  
 P < 0.001