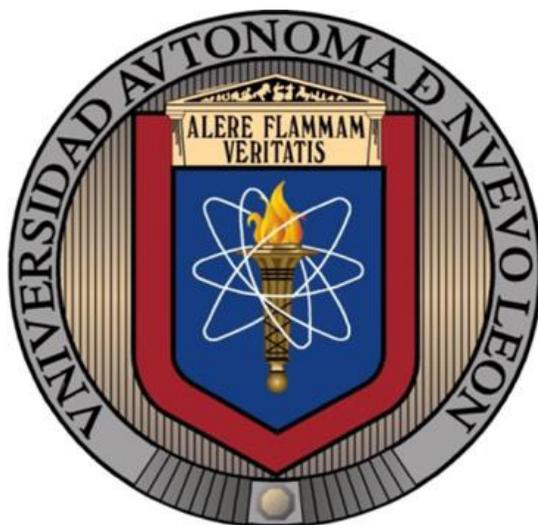


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS

**ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE TRES PLANTAS DEL NORESTE DE MÉXICO
PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL**

POR

PATRICIA GARCÍA PALENCIA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN QUÍMICA
DE PRODUCTOS NATURALES**

AGOSTO, 2017

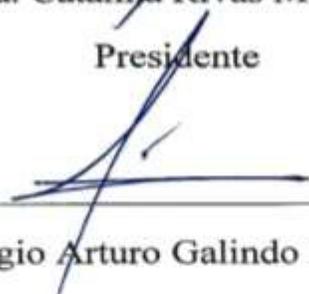
ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE TRES PLANTAS DEL NORESTE DE MÉXICO
PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL

Comité de Tesis



Dra. Catalina Rivas Morales

Presidente



Dr. Sergio Arturo Galindo Rodríguez

Secretario



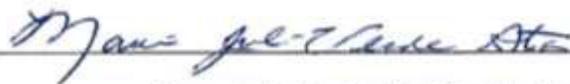
Dra. Catalina Leos Rivas

Vocal



Dra. Azucena Oranday Cárdenas

Vocal



Dra. María Julia Verde Star

Vocal

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE TRES PLANTAS DEL NORESTE DE MÉXICO
PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL

Dirección de Tesis



Dra. Catalina Rivas Morales

Director



Dra. Myriam Angelica de la Garza Ramos

Director externo

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, en particular a la Facultad de Ciencias Biológicas, por permitirme llevar a cabo el desarrollo de mi formación en el grado de Doctor.

Al Sistema Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo otorgado con la beca No. 557089 en 2013 para el desarrollo de este trabajo.

A la Facultad de Odontología por acceder a incrementar mi conocimiento fuera de sus instalaciones.

Al Centro de Investigación y Desarrollo de Ciencias de la Salud (CIDICS) por permitirme desarrollar parte de este trabajo en sus instalaciones.

AGRADECIMIENTOS

A mis dos grandes maestras la Dra. Catalina y a la Dra. Azucena por estar a mi lado siempre al pendiente de mi desenvolvimiento, por sus consejos, su paciencia y hacerme sentir como familia.

A la Dra. Myriam por su apoyo, su amistad y hacerme sentir parte del equipo de la unidad de odontología integral y especialidades.

A la Dra. Rosaisela por depositar su confianza en mi capacidad para lograr esta meta, pero sobre todo por el apoyo que me brindo para poder cubrir mis grupos y no descuidarlos.

Al Maestro Sergio García por su ayuda y consejos en el área de la fitoquímica.

A Mizael por su amistad por ser un excelente compañero, pero sobre todo por tener el Don de servir, gracias por sus consejos, sus enseñanzas por la paciencia que me tuvo durante toda mi formación y siempre tener las palabras indicadas cuando sentía que todo estaba mal.

A la Dra. Erandi y la Dra. Andrea por estar al pendiente de mi durante mi estancia en el CIDICS.

Al Dr. Sergio Galindo por las recomendaciones y consejos para lograr un trabajo de calidad.

Al Dr. Ernesto Torres, por ser un gran maestro, compañero y un excelente amigo, gracias por la paciencia que me tuvo durante mi estancia en su laboratorio.

A mis compañeros y amigos de Doctorado: Lily, Janeth, David Gilberto, Brenda, Mayra, Lorena, Deniss gracias por su amistad, sus consejos y su apoyo.

A Sonia, por ser una asistente de laboratorio ejemplar siempre al pendiente de lo que necesite gracias por el apoyo, así como a mis preparadores de Microbiología.

A mis amigas de la familia Salamanca, gracias por respetar mi gusto de estudiar y siempre estar al pendiente de mi en especial Alicia, Irma, Josefina y Priscilia.

DEDICATORIA

Agradecida con Dios por permitirme poner a personas muy valiosas en mi camino profesional y personal para realizar este proyecto en mi vida.

A mis padres Ramiro y Sara Alicia, que desde el cielo se que están felices por este logro y hacer de mi una persona de bien, pero en especial a mi madre, por ser un ejemplo de tenacidad y dedicación, por tener siempre las palabras de aliento que necesite aun y cuando no esta presente de manera física, pero si en mi corazón.

A mi esposo Francisco por respetar mi gusto de crecer profesionalmente, por estar a mi lado, pero principalmente por su apoyo y su amor.

A mis hijos Heriberto, Enrique, Leonardo y Viviana por la paciencia, el amor y los consejos brindados a su corta edad, pero sobre todo por robarles parte de su tiempo y nunca reclamarme sino siempre alentándome a seguir, los amo.

A mi hermana Rosy por ser parte de mi pequeña familia, siempre presente en mi corazón.

INDICE GENERAL

TITULO	PÁGINA
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Enfermedad Periodontal	3
2.1.1. Placa dental	5
2.1.2. Cálculo dental	6
2.1.3. Microorganismos más frecuentes en el cálculo dental	7
2.2. Plantas	9
2.2.1. <i>Eriogonum ciliatum</i>	13
2.2.1.2. Clasificación taxonómica	13
2.2.2. <i>Scopulophila parryi</i>	14
2.2.2.1. Clasificación taxonómica	14
2.2.3. <i>Psacalium decompositum</i>	15
2.2.3.1. Clasificación taxonómica	16
2.2.3.2. Composición química	17
2.2.3.3. Usos en la medicina tradicional	17
2.3. Plantas con uso en la medicinal empleadas en la Odontología	19
2.4. Generalidades de las propiedades de las plantas medicinales	20
2.4.1. Actividad antimicrobiana	20
2.4.2. Actividad antiinflamatoria	21
2.4.3. Citotoxicidad	23
3. JUSTIFICACIÓN	25
4. HIPÓTESIS	25
5. OBJETIVO GENERAL	26
5.1. Objetivos Particulares	26
6. MATERIALES Y MÉTODOS	27
6.1. Colecta e identificación del material vegetal de estudio	27
6.1.1. Obtención y preparación del material vegetal	27

6.1.2. Tamizaje Fitoquímico	28
6.2. Evaluación <i>in vitro</i> del grado de disolución del cálculo dental por los extractos de las plantas en estudio	29
6.2.1. Disolución del cálculo dental	29
6.2.2. Difracción de rayos x y composición del cálculo dental	30
6.3. Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos en estudio por el método de difusión de placa	30
6.3.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos metanólicos de las plantas en estudio	30
6.4. Valoración de la citotoxicidad de los extractos activos mediante el método de MTT	32
6.5. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los extractos activos sobre monocitos de sangre periférica	32
6.5.1. Obtención y cultivo celular de los monocitos de sangre periférica humana	33
6.5.2. Extracción de RNA de las células Mononucleares de Sangre Periférica (CMSP)	35
6.5.3. Síntesis de DNA complementario (cDNA) a partir de mRNA de las CMSP	35
6.5.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de las CMSP	36
6.6. Desarrollo de una formulación con los extractos metanólicos activos	37
7. RESULTADOS	38
7.1 Extractos vegetales	38
7.1.1. Obtención de los porcentajes de los rendimientos de los diferentes extractos del material vegetal	38
7.1.2. Identificación parcial de los compuestos presentes en los extractos metanólicos de <i>E. ciliatum</i> , <i>S. parryi</i> y <i>P. decompositum</i>	39
7.2. Actividad bactericida de los extractos metanólicos de las tres plantas en estudio	39

7.3. Disolución del cálculo dental tratado con los extractos de las plantas en estudio	44
7.3.1. Difracción de rayos x y composición del cálculo dental	44
7.4. Citotoxicidad de los extractos activos mediante el método de MTT	50
7.5. Actividad Antiinflamatoria de los extractos metanólicos <i>S. parryi</i> y <i>P. decompositum</i> sobre células mononucleares de sangre periférica (CMSP)	53
7.6. Formulación farmacéutica	57
8. DISCUSIÓN	58
9. CONCLUSIONES	66
10. PERSPECTIVAS	67
11. BIBLIOGRAFÍA	68
12. RESUMEN BIOGRÁFICO	78

INDICE DE TABLAS

TABLA No	TÍTULO	PÁGINA
I	Rendimiento de los extractos metanólicos y parte utilizada de las plantas.	38
II	Perfil fitoquímico de los extractos metanólicos de <i>E. ciliatum</i> , <i>S. parryi</i> y <i>P. decompositum</i> .	39
III	Actividad antibacteriana del extracto metanólico <i>S. parryi</i> sobre bacterias periodontopatógenas.	40
IV	Actividad antibacteriana del extracto metanólico <i>P. decompositum</i> sobre bacterias periodontopatógenas.	41
V	Actividad antibacteriana del extracto metanólico <i>E. ciliatum</i> sobre bacterias.	42
VI	Dosis Letal Media (DL ₅₀) de los extractos metanólicos <i>S. parryi</i> y <i>P. decompositum</i> sobre células VERO a las 24 h.	51
VII	DL ₅₀ de los extractos metanólicos <i>S. parryi</i> y <i>P. decompositum</i> sobre la línea celular Detroit 551(fibroblastos de piel) a 24h.	53

INDICE DE FIGURAS

FIGURA No	TÍTULO	PÁGINA
1	<i>Eriogonum ciliatum</i>	14
2	<i>Scopulophila parryi</i>	15
3	<i>Psacalium decompositum</i>	16
4	Halos de inhibición del extracto <i>S. parryi</i>	40
5	Halos de inhibición del extracto <i>P. decompositum</i>	41
6	Halos de inhibición del extracto <i>E. ciliatum</i>	42
7	Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos metanólicos de <i>P. decompositum</i> y <i>S. parryi</i> sobre <i>P. gingivales</i> , <i>P. intermedia</i> y <i>S. mutans</i> .	43
8	Disolución del cálculo dental tratado con los extractos metanólicos <i>S. parryi</i> y <i>P. decompositum</i> .	44
9	Patrones de difracción de rayos X (DRX) de cálculo sin tratar (M226-A), Cálculo dental tratado con el extracto metanólico <i>P. decompositum</i> (Cálculo_PD).	45
10	Superficie del cálculo dental sin tratar a 5,000 magnificaciones.	46
11	Superficie del cálculo dental sin tratar a 10,000 magnificaciones.	47
12	Superficie del cálculo dental sin tratar a 20,000 magnificaciones.	47
13	Superficie del cálculo dental tratado con extracto <i>P. decompositum</i> a 5,000 magnificaciones.	48
14	Superficie del cálculo dental tratado con extracto <i>P. decompositum</i> a 10,000 magnificaciones.	49
15	Superficie del cálculo dental tratada con el extracto <i>P. decompositum</i> a 20,000 magnificaciones.	49
16	Viabilidad de las células VERO tratadas con diferentes tratamientos.	50
	Sp 35 – 60 = <i>S. parryi</i> 35-60 µg/mL, CC = Medio de cultivo celular con	

células VERO sin tratamiento Control - = Etanol 2%, Control + = Tritón 2%

- 17** Viabilidad de las células VERO tratadas con diferentes tratamientos. 51
Pd 20 – 120 = *P. decompositum* 20-120 µg/mL, CC= Medio de cultivo celular con células VERO sin tratamiento, Control - = Etanol 2%, Control + = Tritón 2%
Citotoxicidad del extracto metanólico *S. parryi* sobre células Detroit 551.
- 18** Sp 15 – 500 = *S. parryi* 15-500 µg/mL, CC= Medio de cultivo celular con células Detroit 551 sin tratamiento, Control - = Etanol 2%, Control + = Tritón 2% 52
Citotoxicidad del extracto metanólico *P. decompositum* sobre
- 19** células Detroit 551. Pd 20 – 700 = *P. decompositum* 20-120 µg/mL, CC= Medio de cultivo celular con células Detroit 551 sin tratamiento, Control - = Etanol 2%, Control + = Tritón 2% 52
Expresión génica de IL-1 en CMSP tratadas con *P. decompositum*.
- 20** Pd 400 – 700 = *P. decompositum*. 400-700 µg/mL, CC= células CMSP sin tratar, Control + = LPS 53
Expresión génica de IL-1 en CMSP tratadas con *S. parryi*.
- 21** Sp 300 – 500 = *S. parryi*. 300-500 µg/mL, CC= células CMSP sin tratar, Control + = LPS 54
Expresión génica de IL-6 en CMSP tratadas con *P. decompositum*.
- 22** Pd 400 – 700 = *S. parryi*. 400-700 µg/mL, CC= células CMSP sin tratar, Control + = LPS 55
Expresión génica de IL-6 en CMSP tratadas con *S. parryi*.
- 23** Sp 300 – 500 = *S. parryi*. 300-500 µg/mL, CC= células CMSP sin tratar, Control + = LPS 55
Expresión génica de IL-8 en CMSP tratadas con *P. decompositum*.
- 24** Pd 400 – 700 = *P. decompositum*. 400-700 µg/mL, CC= células 56

	CMSP sin tratar, Control + = LPS	
	Expresión genética de IL-6 en CMSP tratadas con <i>S. parryi</i> .	
25	Sp 300 – 500 = <i>S. parryi</i> . 300-500 µg/mL, CC= células CMSP sin tratar, Control + = LPS	57
26	Formulación farmacéutica de un gel anticálculo (antisarro) con el extracto <i>P. decompostium</i> .	57

LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

Símbolo/ Abreviatura	Significado
%	Porcentaje
OMS	Organización Mundial de la Salud
DRX	Difracción de Rayos x
DL ₅₀	Dosis letal media
IL-1 β	Interlucina uno beta
IL-6	Interlucina seis
IL-8	Interlucina ocho
μ g	Microgramo
mL	Mililitro
UCE	Unión cemento esmalte
mm	Milímetro
Ca ₃ (PO ₃) ₄	Fosfato de calcio
CaCO ₃	Carbonato de calcio
Mg ₃ (PO ₃) ₄	Fosfato de magnesio
ISE	Índice de Severidad y Extensión
AAP	Academia Americana de Periodoncia
Sp	Especie
Spp	Conjunto de especies de un género
a.C.	Antes de Cristo
s.v.a.C.	Siglo quinto antes de Cristo
SIDA	Síndrome de Inmuno Deficiencia Humana
E.E.U.U.	Estados Unidos
IPNI	Índice Internacional de Nombre de las Plantas
m	Metro
cm	Centímetro
E.U.A.	Estados Unidos de América
AAS	Ácido acetilsalicílico
TPA	13-acetato del 12-O-tetradecanoilforbol
PMN	Leucocitos polimorfo nucleares
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
LPS	Lipopolisacarido
BACE-1	Enzima beta-secretasa 1
PCR	Proteína C reactiva
CTGF	Factor de crecimiento del tejido conectivo
MTT	(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoilo
SLP	San Luis Potosí
NL	Nuevo León
FCB	Facultad de Ciencias Biológicas
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
d	Días
N°	Número
°C	Grados centígrados

h	Hora
min	Minuto
μL	Microlitro
mg	Miligramo
L	Litro
g	Gramo
ATCC	American Type Culture Collection
DO	Densidad óptica
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
nm	nanómetro
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
rpm	Revoluciones por minuto
PBS	Phosphate buffered saline
pH	Potencial de hidrógeno
CO ₂	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
CMSP	Células Mononucleares de Sangre Periférica
UI	Unidad internacional
Cel	Célula
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RNA	Ácido ribonucleico
DNasa	Deoxiribonucleasa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	DNA complementario
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
mM	Milimolar
s	segundo
C	Carbono
Na	Sódio
Mg	Magnesio
Ca	Calcio
P	Fósforo
O	Oxígeno
XEDS	Espectrometría de dispersión de energía de Rayos x
M226-A	Cálculo sin tratar
<i>Sp</i>	<i>Scopulophila parryi</i>
<i>Pd</i>	<i>Psacalium decompositum</i>
fig	Figura
RIPs	Proteínas inactivadoras de ribosomas tipo 1
IFN-γ	Interferón gamma
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
pp	Página

RESUMEN

Las plantas constituyen un recurso valioso en los sistemas de salud de los países en desarrollo y en la literatura se han reportado cerca de 500,000 especies vegetales en el mundo de las cuales un porcentaje del 10% son empleadas con fines medicinales; y la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que más del 80% de la población mundial utiliza, rutinariamente, la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud. Así mismo a partir de los años 50's, la Organización Mundial de la Salud se interesó por primera vez en evaluar a la enfermedad periodontal. Y en México, en el 2011 la prevalencia de la periodontitis era del 67.2% en adultos de 40-49 años y del 90% entre los de 69-90. La destrucción periodontal se incrementa por factores locales como el cálculo dental. En este trabajo se evaluó la acción antimicrobiana sobre patógenos bucales, la actividad antiinflamatoria y citotóxica, se determinó el porcentaje de disolución del cálculo dental *in vitro*, así como su análisis con microscopía electrónica y a través de la difracción de rayos X (DRX), también se identificó parcialmente la presencia de compuestos químicos de los extractos metanólicos *Eriogonum ciliatum*, y *Scopulophila parryi*, *Psacalium decompositum* para realizar con ellos un formulado que coadyuve al tratamiento de la enfermedad periodontal. De los extractos en estudio el de mayor rendimiento fue *S. parryi* 19.45%, de los metabolitos secundarios identificados en los extractos con actividad destaca la presencia de las sesquiterpenlactonas y cumarinas, los cuales pueden ser los responsables de la actividad antimicrobiana, así como los esteroides que le confieren la actividad antiinflamatoria. El extracto metanólico de *P. decompositum* logra la disolución del cálculo dental hasta en el 39%, lo cual puede justificar la imagen de microscopio electrónico a 20,000 magnificaciones donde la superficie del cálculo tratado se observa una superficie cristalina muy porosa y una matriz desorganizada; con patrones de difracción de rayos X (DRX) con desmineralización del cálculo dental tratado con éste extracto; además este extracto presentó menos toxicidad sobre la línea celular normal VERO y la línea celular Detroit 551 (fibroblastos de piel) con una DL₅₀ de 77,30 µg/mL y 150,58 µg/mL respectivamente. Destaca que ambos extractos logran de manera significativa reducir la expresión de las citocinas IL-1β, IL-6 y IL-8 en la menor concentración evaluada.

ABSTRACT

Plants are a valuable resource in the health systems of developing countries and in the literature there have been reported about 500,000 plant species in the world of which a percentage of 10% are used for medicinal purposes; And the World Health Organization (WHO) has estimated that more than 80% of the world's population routinely uses traditional medicine to meet their primary health care needs. Also from the 50's, the World Health Organization was first interested in assessing periodontal disease. And in Mexico, in 2011 the prevalence of periodontitis was 67.2% in adults aged 40-49 years and 90% in those aged 69-90. Periodontal destruction is increased by local factors such as dental calculus. In this work we evaluated the antimicrobial action on oral pathogens, the antiinflammatory and cytotoxic activity, the percentage of dissolution of the dental calculus in vitro, as well as its analysis with electron microscopy and through X-ray diffraction (XRD) The presence of chemical compounds from the methanolic extracts *Eriogonum ciliatum*, and *Scopulophila parryi*, *Psacalium decompositum*, were also partially identified to produce a formulation that contributes to the treatment of periodontal disease. Of the extracts under study the highest yield was *S. parryi* 19.45%, of the secondary metabolites identified in extracts with activity highlights the presence of sesquiterpenlactones and coumarins, which may be responsible for antimicrobial activity, as well as sterols which confer anti-inflammatory activity. The methanolic extract of *P. decompositum* achieves dissolution of the dental calculus up to 39%, which can justify the electron microscope image at 20,000 magnifications where the surface of the treated calculation shows a very porous crystalline surface and a disorganized matrix; With X-ray diffraction patterns (XRD) with demineralization of the dental calculus treated with this extract; in addition, this extract showed less toxicity on the normal VERO cell line and the Detroit 551 cell line (skin fibroblasts) with an LD50 of 77.30 µg / mL and 150.58 µg / mL respectively. It is noteworthy that both extracts significantly reduce the expression of IL-1β, IL-6 and IL-8 cytokines at the lowest concentration evaluated.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades bucales constituyen un problema general de salud pública, para la Organización Mundial de la Salud (OMS), la salud bucodental puede definirse como la ausencia de dolor orofacial crónico, cáncer de boca o garganta, llagas bucales, defectos congénitos como paladar hendido, enfermedades periodontales (de las encías), caries dental y pérdida de dientes, entre otras enfermedades y trastornos que afectan a la boca y la cavidad bucal (OMS, 2007).

Las periodontopatías, por su magnitud y trascendencia, representan uno de los principales problemas de salud bucal, las cuales se caracterizan por producir inflamación y destrucción de los tejidos de soporte de los dientes y en la etapa final de ellas ocasionando la movilidad y pérdida de las piezas afectadas (Medina et al., 2006).

La presencia del cálculo está invariablemente asociada a la enfermedad periodontal, el cual puede ejercer un efecto perjudicial sobre los tejidos blandos del periodonto a causa de su superficie áspera, lo que permite que actúe como un punto de retención para la placa y cuando se tienen grandes cantidades de cálculo pueden obstaculizar la eficacia de la higiene bucal y por lo tanto acelerar la formación de cálculo. Además de que el depósito calcificado puede contener productos tóxicos para los tejidos blandos, que pueden persistir en el cálculo desde el período previo a su calcificación o puede penetrar en su superficie porosa desde la capa de placa suprayacente. Es por esto que la presencia del cálculo es considerado como un factor de riesgo importante en el avance de la pérdida de la inserción epitelial, la cual se refiere a la distancia de la unión cemento esmalte (UCE) al fondo del surco gingival o fondo de la bolsa periodontal; esto es determinado por las medidas realizadas con sondas periodontales calibradas, delgadas, milimetradas con un diámetro de 0.5 mm en su punta, su índice excluye a la gingivitis (Rojo et al., 2011).

Además estas calcificaciones sólidas están formadas por contenido inorgánico de 75.9% de fosfato de calcio, $\text{Ca}_3 (\text{PO}_4)_2$; 3.1% de carbonato de calcio, CaCO_3 , residuos de fosfato de magnesio, $\text{Mg}_3 (\text{PO}_4)_2$ y otros minerales. Y por su contenido orgánico, que consiste en una mezcla de complejos proteína-polisacáridos, células epiteliales

descamadas, leucocitos, microorganismos tales como: bacterias, hongos y flora normal de la cavidad bucal. Los microorganismos encontrados con más frecuencia de acuerdo al estudio realizado en el Hospital UNIVALLE en Cochabamba- Bolivia, fueron: *Streptococcus viridans*, *Porphyromona gingivalis*, *Agregatibacter actinomycetemcomitans*, *Candida sp.* (Flores et al., 2011).

En México, la enfermedad periodontal está situada como de alta prevalencia y se puede observar en etapas iniciales del individuo, pero principalmente en adultos entre 40-49 años en un 67.2% y en un 90% en aquellos con una edad de entre 60-90 años. Los estudios demuestran que la prevalencia y la severidad de la periodontitis del adulto aumenta no con la edad de la persona sino por el efecto acumulado de la destrucción periodontal ocasionado por factores irritativos locales tales como la placa dentobacteriana y el cálculo dental (Rojo et al., 2011).

Por lo antes mencionado y debido a que la única opción de tratamiento para remover el cálculo de la superficie dental es a través de medios mecánicos y/o por medio de aparatos como el ultrasonido manejado por el odontólogo; en este estudio se pretende encontrar otra opción para removerlo. Algunas plantas de la medicina tradicional presentan propiedades para disolver estas calcificaciones por tal motivo es de gran relevancia realizar la evaluación de las propiedades biológicas de los extractos del *Eriogonum ciliatum*, *Scopulophila parryi* y *Psacalium decompositum*; lo cual permitirá determinar cuál de ellos puede emplearse como una alternativa para su disolución, así como la acción antimicrobiana, antiinflamatoria y citotóxica; como parte de la terapia periodontal o gingival para mejorar la recuperación de los tejidos afectados.

2. ANTECEDENTES

2.1 Enfermedad Periodontal

A partir de los años 50's, la Organización Mundial de la Salud se interesó por primera vez en evaluar a la enfermedad periodontal en el Lejano Oriente, para clasificarla como buena, regular o mala, por lo que fue necesario establecer índices periodontales; pero no fue sino hasta 1986 que Carlos y col. desarrollaron el índice de Severidad y Extensión (ISE), que se enfoca a la pérdida del nivel de inserción epitelial (Rojo et al., 2011).

La periodontitis se caracteriza por ser una enfermedad inflamatoria de los tejidos de soporte también causada por microorganismos específicos que ocasionan la destrucción progresiva del ligamento periodontal y del hueso alveolar con la formación de bolsas, recesión o ambas características (Carranza y Newman, 2004 a; Botero y Bedoya, 2010) En estudios de las enfermedades gingivales, la gingivitis es la forma más frecuente relacionada con la formación de placa dental con o sin pérdida de la inserción gingival, así como la interacción de los microorganismos que se hallan en la biopelícula de la placa dental y los tejidos y células inflamatorias del huésped.

En decenios recientes, el conocimiento de la causa de los padecimientos periodontales experimentó avances notables. A mediados del siglo XX se creía que todas las especies bacterianas halladas en la placa dental poseían igual capacidad de causar enfermedad. Asimismo, se daba por un hecho que la periodontitis era el resultado de la exposición acumulada a la placa dental y la relación de especies bacterianas específicas con el trastorno se estableció a principios de la década de 1960, al encontrar a través de exámenes microscópicos distintos morfotipos bacterianos en sitios periodontales sanos comparados con otros dañados. En 1970 se desarrollaron técnicas para aislar, cultivar e identificar los microorganismos periodontales, lo cual contribuyó a tener una mejor taxonomía bacteriana y delimitar los grupos específicos de gérmenes presentes en las alteraciones periodontales, siendo algunos de ellos: *Campylobacter rectus*, *Porphyromona endodontalis*, *Porphyromona gingivalis*, *Prevotella denticola*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella loescheii*, *Prevotella melaninogenica*, y las nuevas especies:

Campylobacter showae, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella pallens*, *Treponema amylovorum*, *Treponema lecithinolyticum*, *Treponema maltophilum*, *Treponema médium*. Así en 1990, con la aplicación de técnicas moleculares se mejoró el reconocimiento de una diversidad mayor de especies de microorganismos en el medio periodontal que la ya identificada hasta entonces y a medida que se avanzó en el conocimiento de la ecología microbiana periodontal y también en la etiología de las enfermedades (Wiebe y Putrins, 2000). En el estudio Revisión de la periodontitis crónica: Evolución y su aplicación, describe a la enfermedad periodontal como un proceso infeccioso de la encía y del aparato de inserción adyacente, producido por diversos microorganismos que colonizan el área supra y subgingival, desde el punto de vista histológico, las características que se encuentran son bolsas periodontales, localización de la unión epitelial apical a la línea amelocementaria, una pérdida de fibras colágenas, una elevada concentración de leucocitos polimorfonucleares en la unión y bolsa epitelial, y una migración del infiltrado celular inflamatorio hacia el tejido conectivo. A lo largo de los años se han realizado varias clasificaciones de la enfermedad, cabe destacar la de Page y Schroeder en 1985, en la que describieron en su libro de “Periodontitis in man and other animals” los diferentes tipos de periodontitis. En 1989 se reúnen un grupo de especialistas y tomando como referencia la de Page y Schroeder; y a través del World Workshop se le da el nombre de periodontitis del adulto, la cual se caracteriza por presentarse en personas de 35 años o más, de progresión lenta, reabsorción ósea horizontal, ausencia etiológica sistémica, en 1993 unos años más tarde en Europa, la periodontitis del adulto esta descrita como un factor primario y se describen factores secundarios como son la distribución en la dentición, ritmo de progresión, respuesta microbiológica y hasta 1999 se sustituye por el nombre de periodontitis crónica, ya que la evidencia epidemiológica hasta el momento había puesto de manifiesto la afectación en individuos de cualquier grupo de edad, incluso en dentición primaria y, a pesar de su ritmo lento de progresión, algunos individuos presentaban periodos cortos de exacerbación (Escudero et al., 2008). El entendimiento de la enfermedad periodontal está cambiando continuamente en la medida que surge nueva evidencia, por consiguiente la clasificación de la enfermedad periodontal actual presentada por Genco & Williams, en el 2011 se basa en los resultados del taller

organizado por la Academia Americana de Periodoncia (AAP) en 1999, la cual incluye ocho tipos generales:

1. Gingivitis
2. Periodontitis crónica
3. Periodontitis agresiva
4. Periodontitis como una manifestación de enfermedades sistémicas
5. Enfermedades periodontales necrosantes
6. Abscesos del periodonto
7. Periodontitis asociadas con lesiones endodónticas
8. Deformidades y condiciones del desarrollo o adquiridas (Genco and Williams, 2011).

2.1.1. Placa dental

La placa dental es un depósito blando que forma una biopelícula adherida a la superficie dentaria u otras superficies duras de la boca del huésped; en un principio se forma por interacción bacteriana con el diente y luego mediante uniones físicas y fisiológicas entre especies diferentes en la masa microbiana. Se diferencia de otros depósitos que se encuentran en la superficie dental como son la materia alba y el cálculo dental, siendo la primera una acumulación blanda de bacterias y células hícticas que carecen de la estructura organizada de la placa dental y se desprende fácilmente con un chorro de agua. La placa, se clasifica como supragingival, si se localiza en el margen gingival o por encima de éste, si está en contacto directo con el margen gingival se le denomina marginal y subgingival, cuando se encuentra por debajo del margen gingival, es decir entre el diente y el tejido del surco gingival (Carranza y Newman, 2004 b).

2.1.2. Cálculo dental

El cálculo dental es un depósito sólido que se forma por mineralizaciones de la placa dental, por lo general está cubierto por una capa de placa sin mineralizar, se forma sobre las superficies de los dientes naturales y las prótesis dentales y al igual que la placa se clasifica como supragingival y subgingival según su relación con el margen gingival. El cálculo supragingival es coronal al margen de la encía y puede apreciarse en la cavidad bucal, por lo general es de color blanco o amarillo blanquecino, posee consistencia dura, arcillosa, y se desprende sin dificultad de la superficie dentaria; los dos lugares que con más frecuencia se localiza son las caras vestibulares de los molares superiores y las caras linguales de los dientes anteriores inferiores. Y el cálculo subgingival, se encuentra por debajo de la cresta de la encía marginal, por lo que en la exploración clínica no es visible, suele ser duro y denso, de color pardo oscuro o negro verdoso, unido con firmeza a la superficie en la mayoría de los casos el cálculo supragingival y subgingival se presentan juntos, pero uno puede estar sin el otro (Díaz, 2011).

Se ha demostrado la alta prevalencia global de cálculo de 91.8% de personas con una extensión de 50.3% de dientes por persona (NHANE III), donde se evaluaron 9,689 adultos en los Estados Unidos entre 1988 y 1994, donde los varones tenían más prevalencia que las mujeres y mayor extensión del total de cálculos (Garza, 2009).

La composición del cálculo dental es principalmente inorgánica, en donde el cálculo supragingival se compone de elementos inorgánicos (70 a 90%) y orgánicos. La porción inorgánica está formada por 75.9% de fosfato de calcio, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; 3.1% de carbonato de calcio, CaCO_3 , y rastros de fosfato de magnesio, $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ y otros minerales. El porcentaje de los componentes orgánicos en el cálculo es similar al de otros tejidos calcificados del cuerpo.

Por lo menos dos tercios del componente inorgánico poseen estructura cristalina. Las principales formas son aproximadamente:

- Hidroxiapatita: 58%
- Whitlockita de magnesio: 21%

- Fosfato octacálcico: 12%
- Brushita: 9%

Frecuentemente en una muestra de cálculo se encuentran dos o más formas de cristales, la hidroxiapatita y el fosfato octacálcico de un 97 a 100% dentro de la composición del cálculo supragingival. La brushita es más frecuente en la región mandibular anterior y la whitlockita de magnesio, en las zonas posteriores. La incidencia de las cuatro formas de cristales depende de la antigüedad del depósito.

El componente orgánico del cálculo dental, consiste en una mezcla de complejos proteína-polisacáridos, células epiteliales descamadas, leucocitos y varios tipos de microorganismos. Entre 1.9 y 9.1% son carbohidratos, el cual consta de galactosa, glucosa, ramnosa, manosa, ácido glucurónico, galactosamina y en ocasiones de arabinosa, ácido galacturónico y glucosamina. Estos componentes se encuentran en la glucoproteína salival, excepto la arabinosa y la ramnosa. Las proteínas de la saliva constituyen del 5.9 a 8.2% de la composición orgánica del cálculo e incluyen la mayor parte de los aminoácidos. Los lípidos constituyen 0.2% en la forma de grasa neutra, ácidos grasos libres, colesterol, ésteres de colesterol y fosfolípidos. La composición del cálculo subgingival es similar a la del supragingival, con las siguientes variantes el contenido de hidroxiapatita es el mismo, pero el de whitlockita de magnesio es mayor y menor de brushita y fosfato octacálcico. El fosfato de calcio es mayor por debajo de la encía y el contenido de sodio aumenta con la profundidad de la bolsa periodontal (Carranza y Newman, 2004c)

2.1.3. Microorganismos más frecuentes en el cálculo dental

El cálculo dental se relaciona con la presencia de bacterias, hongos y flora normal de la cavidad bucal, además de otros microorganismos patógenos orales. Los microorganismos encontrados con más frecuencia en el estudio realizado en el Hospital

UNIVALLE en Cochabamba- Bolivia, fueron: *Streptococcus viridans*, *Porphyromona gingivalis*, *Agregatibacter actinomycetemcomitans*, *Candida sp* (Flores et al., 2011).

Los microorganismos periodontales patógenos no actúan aisladamente y la interacción entre especies patogénicas y benéficas afectan a la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento (Negroni, 2009). En el estudio Complejos microbianos en la placa subgingival, reportado en 1998 por Socransky y colaboradores se describe por primera vez los cinco complejos microbianos: el rojo, está formado por *Porphyromona gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*; (Socransky et al., 1998; Farías y Souza, 2012) el naranja, tiene un núcleo central bastante estable, formado por *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *P. micros*, *F. nucleatum* y *Fusobacterium periodonticum* y bacterias asociadas a ellas, como *Eubacterium nodatum*, *C. rectus*, *Streptococcus constellatus*, *Campylobacter gracilis* y otros campilobacter, los que están estrechamente asociadas con el grupo anterior. Grupo amarillo se encuentran en el núcleo *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* y *S. sanguis* y otro núcleo en el que se incluyen a *Streptococcus intermedius* y otras especies de estreptococos. El grupo verde con *E. corrodens*, *Capnocytophaga spp.*, *Campylobacter concisus* y *Agregatibacter actinomycetemcomitans* serotipo a. El grupo púrpura, sólo incluye a la *Veillonella parvula* y *Actinomyces odontolyticus*, muy asociados entre sí y microorganismos sin un grupo que incluye especies sin asociaciones claras son *Agregatibacter actinomycetemcomitans* serotipo b, *A. naeslundii*, *S. noxia* y *Campylobacter showae* (Liebana, 2002). De estos microorganismos los relacionados con el surco gingival sano pasarían a formar la placa subgingival adherida al diente siendo estos microorganismos los primeros colonizadores que son los del grupo amarillo y púrpura, posteriormente llegan los del grupo verde y luego los del grupo naranja que actúan como puente para el acceso del grupo rojo. Los colonizadores del complejo naranja y rojo son prevalentes en etapas avanzadas. Las diferencias entre salud y enfermedad se basan en el predominio de los complejos rojo y naranja que son prevalentes en la biopelícula subgingival asociada a la gingivitis y periodontitis (Negroni, 2009; Carranza y Newman, 2004b).

2.2. Plantas

En la literatura se han reportado cerca de 500,000 especies vegetales en el mundo de las cuales un porcentaje del 10% son empleadas con fines medicinales (Rodríguez, 2015); las plantas verdes son esenciales en la vida de hombre y de los animales, debido a que convierten la energía solar en compuestos de carbono que a su vez producen otros alimentos importantes (Valencia, 1995). Todos los pueblos primitivos han adquirido información sobre las propiedades medicinales de gran número de plantas propias de su ambiente. Así en la Biblia están descritas unas 200 plantas medicinales y sus aplicaciones. El papiro de Ebers, escrito hace aproximadamente 3500 años, contiene descripciones de enfermedades e indicaciones para tratarlas con plantas entre las que se han identificado la Scilla marítima, empleada con el mismo fin 1000 años después, por Hipócrates quien, además conocía los usos del ajeno, cicuta, beleño, ruibarbo y manzanilla. En el año 372 a. C., Teofrasto, discípulo de Aristóteles, escribió 10 libros sobre la historia de las plantas y otros ocho sobre las causas de las plantas, en los que menciona los usos de la canela, el cornezuelo de centeno, el apio y el helecho. En el año 77 a.C., Dioscórides escribió De materia médica, en la que menciona todas las plantas y medicinas conocidas por los griegos. Esta fue considerada por 15 siglos la obra cumbre en botánica y farmacéutica. Los conocimientos sobre las plantas de América fueron transmitidos por los aborígenes a misioneros y viajeros españoles, quienes los inmortalizaron en diversas obras como las de Gonzalo Fernández de Oviedo, Sumario de la natural historia de las Indias e Islas y tierra firme del mar océano, publicado en 1535. En estas obras aparece la descripción de muchas plantas medicinales, entre ellas el achiote, guaco, tabaco y cacao. De 1570 a 1577 el protomédico del Rey Felipe II, don Francisco Hernández, recorre México y sus observaciones forman una obra de la que sólo se pudo publicar una parte con el título de Historia Plantarum Novae Hispaniae, la cual ha sido reeditada en español por la Imprenta Universitaria de la Universidad Autónoma de México (Háud, 2010).

En la antigüedad mítica, tres grandes temas evocan la existencia de un lugar feliz, en el que las plantas constituyen la esencia de esa felicidad: Edad de Oro, Campos Elíseos e Islas Afortunadas. En los umbrales de la historia griega no se conocía el jardín como un

lugar de reposo y recreo. Incluso entre las clases más ricas, la familia sólo cultivaba un huerto, más o menos extenso, en torno a su vivienda. Los antiguos escritores griegos relacionaban la horticultura con la agricultura. Poco a poco, la civilización y la influencia extranjera fueron desarrollando entre los griegos el gusto por el lujo y el deseo de buscar en la residencia en el campo una tregua a la vida ajetreada de la ciudad. En el s. v a.C., el cultivo de las flores, junto con el de las frutas, hortalizas y legumbres, logro ocupar un lugar importante en la vida griega (Segura y Torres, 2009).

La botánica es la ciencia, parte de la biología, que estudia lo referente a los vegetales. Esta constituye un estudio integral de las formas de vida, fisiología, evolución, ecología y distribución de este grupo. La botánica ha existido desde la antigüedad y ha pasado de ser un simple conocimiento empírico a ser una ciencia. Desde tiempos históricos el ser humano ha dependido de los vegetales en gran medida y por ello se ha evocado a su estudio. Estos son los organismos productores primarios, base de la cadena trófica, por ello, las plantas son tanto alimento directo como indirecto para el hombre, puesto que son también el alimento de diversos animales, de los que también éste se alimenta. Una de las teorías más modernas y aceptadas acerca del origen de la vida plantea que inicialmente la Tierra era un conjunto de elementos químicos inorgánicos en constante transición por medio de diversas reacciones, y gracias a las descargas eléctricas atmosféricas se fueron formando moléculas cada vez más complejas, las que a su vez dieron origen a compuestos orgánicos y estos posteriormente a los primeros seres vivos. Hace 2.000 millones de años, los seres vivos han dominado todos los ambientes anaeróbicos. Los organismos presentes en estos sistemas fueron heterótrofos, y gracias a la simplicidad de su organización (procariotas) y su diversidad metabólica consiguieron alimentarse de materia química, orgánica e inorgánica.

El estudio más detallado del Reino Plantae llevó a dividir el gran conjunto de individuos que abarca este término en dos partes: plantas inferiores y plantas superiores. Sin embargo, los términos superior e inferior no son correctos para denominar a estos grupos de plantas porque ambos poseen características propias y un desarrollo individual, estos términos fueron remplazados por plantas vasculares y no vasculares respectivamente y haciendo alusión a la característica de presentar o no un sistema interno de transporte.

Usualmente se incluyen a los hongos y protistas afines en las plantas no vasculares para fines prácticos. La botánica comprende tres ramas fundamentales: la sistemática, que es teórica y descriptiva y se encarga de los estudios de la taxonomía, clasificación y en cierta medida de la genética; la económica, es de naturaleza práctica, es decir está dirigida a obtener beneficios a través de las ciencias como la farmacología, fitoquímica y la etnobotánica, entre otras; la ecológica, es aquella que integra las dos anteriores y comprende especialidades como la geobotánica, la botánica marina y la fisiología, es decir se encarga de establecer las relaciones del mundo vegetal (a nivel de poblaciones y comunidades) con el entorno y así explicar las relaciones que existen entre los organismos vivos con los factores abióticos. Según Engler (1964), en la Tierra se distinguen siete reinos florales, identificados con números romanos y el nombre de una característica o lugar representativo, así tenemos los siguientes Reinos: Holoártico (I), Paleotropical (II), Neotropical (III), del Cabo Esperanza o Capense (IV), Australiano V), Antártico (IV) y floral de los océanos (VII); de todos ellos el que incluye al sur de México, Centroamérica y la mayor parte de Sudamérica es el Neotropical (III), existen pocas familias endémicas pero presenta una riqueza florística. Las familias más características son: *Tropaeolaceae*, *Malpighiaceae*, *Vochysiaceae*, *Marcgraviaceae*, *Quiinaceae*, *Tovariaceae*, *Bixaceae*, *Turneraceae*, *Loasaceae*, *Cactaceae*, *Onagraceae*, *Melastomataceae*, *Myrtaceae*, *Solanaceae*, *Cyclanthaceae*, *Raceae*, *Rapateaceae*, *Triocaulaceae*, *Agavaceae*, *Bromeliaceae*, *Tannaceae*, *Caryocaraceae*, *Brunelliaceae*, *Cryllaceae*, *Polygonaceae*, entre otras (Fontúrbel et al., 2007).

Las plantas constituyen un recurso valioso en los sistemas de salud de los países en desarrollo. Aunque no existen datos precisos para evaluar la extensión del uso global de plantas medicinales, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que más del 80% de la población mundial utiliza, rutinariamente, la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud y que gran parte de los tratamientos tradicionales implica el uso de extractos de plantas o sus principios activos (Loraine y Mendoza, 2010). De acuerdo a la OMS (1979) una planta medicinal es definida como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos. A más de veinte años de la declaración

de Alma-Ata, existen otras razones que justifiquen la investigación sobre plantas medicinales. En primer lugar, aunque menos del 10% de las especies de angiospermas existentes en el mundo han sido evaluadas para determinar su composición química y sus propiedades farmacológicas, el valor potencial de los medicamentos derivados de plantas tropicales es considerable. En algunos países se han desarrollado programas de prospección para investigar la actividad farmacológica de los componentes de plantas tropicales, tales como el Convenio Merck-INBio en Costa Rica, el programa de búsqueda de compuestos activos contra el Cáncer y el SIDA del Instituto Nacional del Cáncer en EEUU y el proyecto de prospección bioquímica del bosque tropical de Yutajé, en Venezuela, entre otros. Sin embargo, en muchos países en desarrollo ha ocurrido una pérdida importante del conocimiento tradicional sobre el uso de plantas medicinales y de otras plantas útiles, transmitido de padres a hijos. Aunado a ello, la disponibilidad de tales plantas se ha visto reducida por la degradación de los bosques y su conversión a bosques secundarios y campos agrícolas. En consecuencia, la cadena de transmisión de dicho conocimiento se encuentra en riesgo. Por otra parte, no existe suficiente información sobre la abundancia y distribución de las plantas medicinales en el trópico y, menos aún, sobre los efectos de su extracción en las poblaciones naturales. Es necesario, hacer esfuerzos para evitar la pérdida definitiva del conocimiento tradicional sobre plantas medicinales, no solo para preservar esta herencia cultural, sino también para registrar la información sobre ciertas especies útiles, que podrían ser relevantes para el desarrollo de nuevas fuentes de medicamentos y de otros beneficios para la humanidad, contribuyendo, al mismo tiempo, a proteger la biodiversidad (Bermúdez et al., 2005).

Existen escasos reportes acerca de las propiedades y componentes activos en la literatura de las plantas a estudiar *Psacalium decompositum*, *Eriogonum ciliatum* y *Scopulophila parryi* a continuación se hará una descripción breve de cada una de ellas.

2.2.1. *Eriogonum ciliatum*

Históricamente el *Eriogonum cilatum*, fue descrito por primera vez por Jhonston, se recolectó en un suelo arenoso cerca de Buena Vista por Edwards y cerca de Monterrey por Gregg (Jhonston, 1944). *E. ciliatum*, es el nombre aceptado para la especie del género *Eriogonum* que pertenece a la familia Polygonaceae la cual se encuentra en los principales grupos de angiospermas (plantas con flores) Se pueden encontrar como arbustos, subarbustos o hierbas, a veces casi arborescentes, perennes, bienales o anuales, policárpicas o, raramente, monocárpica (subg. *Pterogonum*), *synoecious* (a veces *polygamodioecious* en subg. *micrantha* y *Oligogonum*, raramente dioicas en subg. *Oligogonum*); su raíz es pivotante delgada a gruesa, sólida, (subg. *Pterogonum*) sus tallos están postrados o decumbentes para erigir, con poca frecuencia ausente, glabros o pubescentes, a veces glandular. *Eriogonum* es un grupo basal de subfamilia *Eriogonidaea*, como todos sus géneros afines, es un taxón tetraploide altamente derivado que ha experimentado una rápida evolución en las regiones áridas del oeste de América del Norte. Especies de *Eriogonum* han sido consideradas como una de las más difíciles en América del Norte de distinguir (Revelar, 1973).

2.2.1.2. Clasificación taxonómica:

Clase: *Equisetopsida* C. Agardh

Subclase: *Magnoliidae* Novák ex Takht.

Superorden: *Caryophyllanae* Takht.

Orden: *Caryophyllales* Juss. ex Bercht. & J. Presl

Familia: *Polygonaceae* Juss

Género: *Eriogonum* Michx

Especie: *E. ciliatum*



Fig. 1 *Eriogonum ciliatum*

2.2.2. *Scopulophila parryi*

Se distribuye desde el centro de México al norte del margen sur del desierto de Chihuahua. Este Género *Scopulophila* está estrechamente relacionada con congéneres y posiblemente con *Achyronychia* (Jhonston, 1940). También se reporta en el Índice Internacional de Nombres de las Plantas (IPNI), que es una base de datos de los nombres y detalles bibliográficos de las plantas con semilla, helechos y lycophytes.

2.2.2.1. *Clasificación taxonómica:*

Clase: *Equisetopsida* C. Agardh

Subclase: *Magnoliidae* Novák ex Takht.

Superorden: *Caryophyllanae* Takht.

Orden: *Caryophyllales* Juss. ex Bercht. & J. Presl

Familia: *Caryophyllaceae* Juss

Género: *Scopulophila* ME Jones

Especie: *S. parryi*



Fig.2 *Scopulophila parryi*

La *S. parryi*, se caracteriza ser una hierba anual o perenne, dioica, con grueso, leñosas raíces pivotantes, presenta tallos ascendentes erguidos, ramificados, cilíndricos con base densamente lanosa; tiene hojas opuestas, conectadas por un reborde espesado o con una ala transversal de la que surgen espículas, sésiles; estípulas dos por nodo, blanco, triangular, márgenes dentados de ciliados, ápice entero para dos lóbulos, con venas, lineales a lanceoladas, ligeramente succulento, ápice agudo a apiculados oscuramente hoja inflorescencias reducidas cimas axilares, proliferando con la edad; brácteas emparejado, asemejándose a estípulas más pequeñas, escariosas; flores funcionalmente unisexuales, sésiles; hipantio cónica para urceolate, de 4-5 sépalos libres o fusionados, elípticos a orbiculante, 1.1 a 2.1 mm, herbácea, los márgenes blancos, scarious, ápice ampliamente redondeada, no encapuchado, no aristado y pétalos generalmente de 4 a 5, sus estambres de 8 a 10 y su fruto es una cápsula con muchas semillas (Jhonston, 1940).

2.2.3. *Psacalium decompositum*

Se distribuye en México, crece desde Chihuahua hasta Chiapas, se le conoce con varios nombres populares Matarique en Chiapas, Chihuahua, Distrito Federal, Nuevo León, San Luis Potosí y Texas; Matari, Materi, Matariki, así es conocida por los tarahumaras

de Chihuahua; como Maturín, Maturi, Mataril en Chihuahua y como Pitacawi también por los tarahumaras de Chihuahua. Es una planta de 1 a 1.5 m de alto, de tallo delgado, de 3 a 4 cm, más grueso en la base, densamente pubescente; hojas partidas, en la base, empiezan opuestas y después se vuelven alternas, flores en panícula o corimbosa, pedicelo de 1 a 1.5 cm de largo.

2.2.3.1. Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Subfamilia: Asteroideae

Tribu: Senecioneae

Subtribu: Tussilagininae

Género: *Psacalium*

Especie: *P. decompositum*

(A.Gray) H.Rob. & Brettell



Fig. 3 *Psacalium decompositum*

Tiene varios sinónimos:

De acuerdo a Conabio *Cacalia decomposita* A.Gray, Smithsonian Contr.Knowl.4:361. 1853. *Odontotrichom decompositum* (A. Gray) Rydb., Bull. Torrey Bot. Club 51. 414.1925. (Conabio, Villaseñor, 2005). Y en el volumen 1 de Plantas medicinales de Chihuahua la reconocen con diferentes nombres según el lugar con el nombre de Matarique (Chiapas, Chihuahua, D. F., Nuevo León, San Luis Potosí y Texas). Matari, Materi, Matariki, Matariqui (Tarahumaras de Chihuahua). Maturín, Maturi, Mataril (Chihuahua, Santa María, 1978). Pitcawi (Tarahumaras de Chihuahua). (Olivas, 1999)

2.2.3.2. Composición química

Esta planta contiene químicamente: alcaloides, aceite esencial, resina, taninos y glucósidos (Cabrera, 1958).

2.2.3.3. Usos en la medicina tradicional

Se realiza té con sus raíces para tratar el reumatismo, resfriado y para dolores de espalda, ictericia, cólicos en bebés y como diurético y tónico, tratamiento para la diabetes, enfermedades renales, malaria y fiebre. Una cataplasma de las raíces es aplicada a las heridas. Para aliviar dolores de los dientes, un pedazo de la raíz se coloca en la caries dental. El machacado de las raíces es usado para el tratamiento de mordeduras de serpientes. La infusión se usa como lavado antiséptico para las heridas. Las irritaciones de la piel son tratadas con un lavado o un preparado de polvo de las raíces. El té es utilizado para el tratamiento de la artritis, dolores musculares y enfermedades del tracto urinario, vejiga y cicatrizante. También se puede mezclar con hierbanís (*Tagetes sp.*), para disminuir la temperatura (Olivas, 1999).

El efecto hipoglucemiante de la raíz y la decocción acuosa de la rizoma *P. decompositum* (Asteraceae), una hierba medicinal de México, se ha demostrado experimentalmente, lo que lleva a la identificación de varios sesquiterpenoides

hipoglucemiantes, como cacalol, y la mezcla de 3-hidroxicacalolide y epi -3-hidroxicacalolide, sin embargo, el mecanismo de acción de estos compuestos es desconocida.

Otros padecimientos en los que se aplican sus usos medicinales son para las anginas.

Dentro de la historia se describe que en el siglo XX, el Instituto Médico Nacional la señala como antineurálgica y antirreumática. Alfonso Herrera menciona que esta planta es utilizada para aliviar los dolores reumáticos de las articulaciones, especialmente los gotosos, los neurálgicos, se calman por la aplicación "loco dolenti" de la tintura. Añade, "la cicatrización rápida de las úlceras y de las heridas, se favorece lavándolas con una mezcla de la tintura y agua o con la tintura sola, empleada como tópico". Posteriormente, Maximino Martínez reporta su empleo como antidiabético, antidisentérico, antineurálgico, antipodágrico, antirreumático, astringente, catártico, cefaleas, congestiones hepáticas y vulnerario. Luis Cabrera la cita a su vez como antidiabética, antidiarréica, antineurálgica, antirreumática, catártica y vagotonismo. Finalmente, la Sociedad Farmacéutica de México la describe como: antineurálgico, antiséptico y astringente.

A los extractos obtenidos de las plantas que se usan directamente en terapéutica se les llaman preparaciones galénicas estas son económicas y se usan para preparar aditivos, saborizantes y para propósitos culinarios. Aunque las preparaciones galénicas producen las acciones farmacológicas requeridas sin una purificación completa, es conveniente saber las dosis exactas para evitar interacciones. Las preparaciones galénicas son la primera etapa en el aislamiento de los principios activos y se obtiene por varias técnicas:

- Infusión: consiste en dejar la planta en contacto con el agua o caliente poco tiempo.
- Decocción: cuando la parte de la planta se hierve en agua.
- Maceración: es una infusión prolongada, a menudo en alcohol acuoso.
- Percolación: es una maceración seguida por la adición de disolvente fresco para reemplazar el disolvente que se ha dejado pasar a través de la droga en polvo.

- Extracción continua: es una infusión repetida con disolventes caliente. Este método se emplea en el laboratorio como en la industria, el aparato que se utiliza en el laboratorio es el extractor Soxhlet (Valencia, 1995).

2.4 Plantas con uso medicinal empleadas en la Odontología

Las plantas medicinales en la odontología son empleadas a la información de la medicina tradicional y diversos preparados como son pastas dentales, colutorios, geles, pasta tópica, entre otros, para el tratamiento de aftas, gingivitis, procesos inflamatorios, odontalgias y como antimicrobianos y antifúngicos (Calixto 2006). La cavidad oral es una puerta de entrada al resto del cuerpo humano puede verse afectada por diversas enfermedades y desde los tiempos de los mayas prehispánicos y sus descendientes ya se conocía el uso de diferentes plantas con propiedades terapéuticas, las cuales se han transmitido en el transcurso del tiempo; actualmente y a pesar de los avances registrados en el área de la farmacología, las personas siguen recurriendo a las plantas medicinales para aliviar las diferentes afecciones que se manifiestan en la cavidad bucal desde odontalgias, parodontopatías, entre otras algunas de las plantas empleadas por los mayas para tratar la gingivitis era el Nance (*Brysonima crassifolia*), el pomoché (*Jatropha curcas*), la anona (*Annona glabra*), para odontalgias empleaban la flor de mayo (*Plumeria rubra*), el nicté (*Plumeria obtusa*), entre otras (Rodríguez, 2015). Se han realizado numerosos informes sobre el uso de plantas tradicionales y productos naturales para el tratamiento de enfermedades bucales. Muchas medicinas derivadas de plantas usadas en sistema medicinal tradicional han sido registradas en farmacopeas como agentes usados para tratar infecciones y varias de ellas han sido investigadas recientemente por su eficacia contra patógenos microbianos orales. Se han realizado numerosos estudios *in vitro* para investigar la actividad de sustancias vegetales naturales contra bacterias orales; dichos estudios se han centrado en las bacterias que participan en la etiología de las enfermedades bucales y dentales, estableciendo claramente que una serie de sustancias tienen potencial para ser utilizadas en la industria dental, dada su actividad contra las bacterias cariogénicas y las asociadas con las enfermedades periodontales (Palombo EA., 2011).

2.5 Generalidades de las propiedades de las plantas medicinales.

El lograr el restablecimiento de la salud con las plantas medicinales es un proceso tan antiguo como la misma humanidad. La conexión entre el hombre y su búsqueda de drogas en la naturaleza es de tiempos remotos, del cual se tiene una amplia evidencia de diversas fuentes: documentos escritos, monumentos conservados, e incluso medicamentos originales de plantas. El conocimiento del uso de las plantas medicinales es el resultado de muchos años de luchas contra las enfermedades debido a que el hombre aprendió a conseguir drogas en las cortezas, las semillas, los cuerpos frutales y otras partes de las plantas. La ciencia contemporánea ha reconocido su acción activa, y ha incluido en la farmacoterapia moderna una gama de fármacos de origen vegetal, conocidos por las civilizaciones antiguas y utilizadas a lo largo de los milenios (Petrovska, 2012). A las plantas se les debe evaluar su actividad biológica para su comprobación científica de su uso terapéutico a través de ensayos *in vivo* e *in vitro*, tales como: su actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, analgésica, entre otras. Así como también la toxicidad y citotoxicidad de los extractos obtenidos de las diferentes partes de las plantas sobre organismos o células para determinar su posible efecto tóxico (Rivas et al. 2016a).

2.5.1. Actividad antimicrobiana

En la actualidad ha surgido el interés por los agentes antimicrobianos de origen natural (derivados de vegetales), por lo que se busca la combinación de dos o más factores que interactúen aditiva o sinérgicamente controlando a la población microbiana, permitiendo con esto productos semejante al producto fresco pero con menos aditivos, no se debe olvidar que la velocidad de deterioro microbiológico no sólo depende de los microorganismos presentes, sino también de la combinación química del producto y del tipo de carga microbiana inicial. Cada vez se descubre más plantas o partes de estas que contienen antimicrobianos naturales, por ejemplo los que incluyen compuestos fenólicos provenientes de corteza, tallo, hoja, flor, ácidos orgánicos presentes en fruto y fitoalexinas producidas en plantas, buscando una mayor seguridad y una mejor calidad

de alimentos ya que este tipo de antimicrobianos se consideran potencialmente seguras (Rodríguez, 2011). Así mismo existen otros compuestos como son los aceites esenciales derivados de las plantas aromáticas y algunas especies han mostrado tener efecto antimicrobiano sobre levaduras, mohos y bacterias con la ventaja de que en la extracción en algunos casos no daña al medio ambiente (Reyes et al, 2014).

Se cuenta con diversos métodos para evaluar la actividad antimicrobiana de sustancias sintéticas; estos métodos se aplican ampliamente en el ámbito hospitalario tal es el caso del método de difusión de disco (método de KirbyBauer), el método de pozos en agar y el método de dilución en tubos (turbidimétrico) para encontrar no sólo la potencia sino también la resistencia de algunos microorganismos a ciertos antibióticos. Aun y cuando en teoría cualquiera de los métodos descritos se puede emplear para hallar la actividad antimicrobiana de extractos vegetales cada uno tiene ciertas características, motivo por el que al momento de realizar las pruebas se deben hacer ciertas modificaciones para que la metodología a utilizar sea la adecuada, reproducible y fiable (Rojas et al., 2005, Rivas et al., 2016b).

2.5.2 Actividad Antiinflamatoria

En los últimos años la actividad antiinflamatoria ha despertado el interés científico en el área farmacológica, principalmente en la propiedad que poseen ciertos compuestos para interferir en la evolución de enfermedades que cursan con procesos inflamatorios. Dentro del contexto de los productos antiinflamatorios, la medicina tradicional se ha utilizado para tratar pacientes con enfermedades que conllevan procesos inflamatorios; por ejemplo en África su uso es superior al 80%, en China alrededor del 40% mientras que en Asia y América Latina su uso está ligada a las creencias culturales y a las circunstancias históricas y en países desarrollados utilizan más que la medicina tradicional, la medicina complementaria y alternativa así: 75% en Francia, 70% en Canadá, 42% en EUA. (Gómez et al. 2011).

La incorporación y utilización de las plantas medicinales en el tratamiento de las reacciones inflamatorias, son prácticas comunes en la medicina tradicional. En la

actualidad es evidente el interés por las sustancias antiinflamatorias de origen vegetal debido a que ofrecen ventajas en relación a los antiinflamatorios clásicos, como es la baja incidencia de efectos secundarios, algunas de las drogas utilizadas tradicionalmente en el tratamiento de patologías reumáticas, y estudiadas recientemente se encuentran la corteza del sauce (*Salix alba*), la raíz harpagofito (*Harpagohytum procumbens* DC), las hojas del eucalipto (*Eucalyptus globulus*) y algunos medicamentos empleados como antiinflamatorios que han sido obtenidos de fuentes naturales se puede citar a la aspirina, denominada ácido acetilsalicílico (AAS), es un antiinflamatorio no esteroideo que deriva de la salicilina que es un glicoósido de la corteza del sauce blanco. El pimecrolimus (*Streptomyces hygroscopicus*) que es la ascomicina, FK520, es un fármaco inhibidor selectivo de la liberación de citosinas fue desarrollado para tratar enfermedades inflamatorias de la piel.

La evaluación de la actividad antiinflamatoria se puede realizar empleando modelos *in vivo e in vitro*, dentro de los primeros se puede citar los modelos de inflamación aguda y dentro de ellos se pueden citar tres métodos, cada uno con características especiales dependiendo de las condiciones bajo las cuales se realice el estudio. El primero de ellos es el edema plantar por carragenina, fue descrito por primera vez por Winter and Porter, y modificado por Sughisita et al., 1981. Ha sido uno de los métodos de mayor utilidad en la discriminación de fármacos antiinflamatorios por su sencillez y reproducibilidad; el segundo es el protocolo experimental por aceite de crotón, este consiste en la administración tópica del aceite de crotón, una mezcla de ésteres y otros componentes, los cuales poseen propiedades irritantes se emplea farmacológicamente para provocar una inflamación localizada en las orejas de los animales de laboratorio; y el tercero es el edema auricular en ratón inducido por el 13-Acetato del 12-O-tetradecanoilforbol (TPA), esta técnica fue descrita por (De Young et al., 1989), y modificada por (Payá et al., 1993). De los aceites de crotón (*Croton tiglium* L) el TPA es el más potente de todos, este posee propiedades irritantes, pro-inflamatorias y promotora de tumores (Franco et al., 2007).

En los modelos de evaluación *in vitro*, las células fagocíticas como son los leucocitos polimorfonucleares (PMN) y los macrófagos responden a una variedad de estímulos de

membrana por la producción y liberación extracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS). Los macrófagos juegan un rol importante al modular la iniciación y perpetuación de la respuesta inflamatoria la cual es modulada por su capacidad de sintetizar mediadores biológicos; otro elemento importante es el lipopolisacárido (LPS), el cual es un polímero que está presente en la pared celular de bacterias Gram negativas y estimulan a los macrófagos que liberen citosinas y esta estimulación *in vitro* de ellos proporciona una estimación del efecto antiinflamatorio de los mismos. Otros ensayos para evaluar la actividad antiinflamatoria *in vitro* están dirigidos a cuantificar la expresión de enzimas y/o mediadores antiinflamatorios como son la enzima b secretasa 1 (BACE-1) proteína C reactiva (PCR), el factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF), entre otros (Gómez et al. 2011).

2.5.3 Citotoxicidad

El objetivo básico de la experimentación toxicológica es contribuir al conocimiento de los peligros, o toxicidad intrínseca, de las sustancias; de los efectos tóxicos provocados y de su reversibilidad; de los mecanismos moleculares y de las células diana biológicas sobre las que actúan; la diferente susceptibilidad tóxica de especies, sexo y grupos poblacionales; de la cinética y el metabolismo en los organismos y en el ambiente; de la sensibilidad y especificidad de los medios diagnósticos; de la eficacia de las medidas terapéuticas y profilácticas; finalmente de integrar toda la información disponible para estimar el riesgo que conlleva su utilización en diferentes aplicaciones, estableciendo niveles de seguridad en la exposición a las mismas. A diferencia de la mayoría de las disciplinas experimentales existen normativas muy rígidas que deben ser seguidas en la experimentación toxicológica, lo que exige la evaluación de las sustancias con diferentes requerimientos según su uso previsto aplicando protocolos de ensayos estandarizados, así como el cumplimiento de las buenas prácticas de laboratorio y la normativa establecida. Entre los parámetros que las normativas exigen para valorar la toxicidad sobresale la dosis letal media (DL₅₀) la cual ha variado actualmente. Es relevante insistir

en que los ensayos de toxicidad no se diseñan para demostrar que un compuesto es seguro, sino para caracterizar los efectos que puede producir.

Según la finalidad se establecen tres tipos de investigaciones toxicológicas experimentales: la regulada o reglamentada, la no regulada y la experimentación docente y formativa. La regulada es denominada generalmente “evaluación de la toxicidad” pretende la clasificación de las sustancias y la evaluación del riesgo de las mismas; las investigaciones toxicológicas no regulada, no está impuesta por normativas y puede dividirse en básica y aplicada. La primera tiene como finalidad esencial la búsqueda del conocimiento en sí mismo, sin implicaciones prácticas directas incluye el estudio de mecanismos de acción, interacciones, efectos entre otros. Y la aplicada está dirigida a contestar preguntas con un objetivo práctico como son la selección o tamizado de entre nuevas sustancias, comparando la actividad biológica de las mismas (Repetto y Repetto, 2009).

La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conllevan a un daño que puede ser detectado. Diferentes autores han desarrollado varias pruebas *in vitro* para predecir los efectos tóxicos de drogas y compuestos químicos utilizando como modelos experimentales cultivos primarios y órganos aislados como líneas celulares establecidas, dentro de los ensayos *in vitro* se encuentra el ensayo de capacidad de rojo neutro, enlazamiento al azul de kenacid y el método del MTT, el cual determina el posible efecto citotóxico de un agente basándose en la reducción metabólica del Bromuro 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)2, 5-difeniltetrazol (MTT) (Arencibia et al., 2009; Morantes et al., 2006)

3. JUSTIFICACIÓN

En México la caries y la enfermedad periodontal son las principales enfermedades orales que ocupan el 1° y 2° lugar respectivamente (OMS, 2007). Los estudios epidemiológicos realizados por la Revista Odontológica Mexicana, demuestran que el progreso de la enfermedad periodontal es generalmente lento y continuo y la severidad de ella se relaciona directamente con la presencia de placa bacteriana y cálculo dental. Este último está asociado a la enfermedad periodontal y puede ejercer un efecto perjudicial sobre los tejidos blandos del periodonto a causa de su superficie áspera, el efecto primario del cálculo, la presencia de este es considerado como un factor de riesgo importante en el avance de la pérdida de la inserción dental y se deteriora la belleza de la sonrisa. Las plantas pueden ser una alternativa como control o coadyuvante en los tratamientos de esta enfermedad. En este trabajo se evaluaron las propiedades biológicas de los extractos de *Eriogonum ciliatum*, *Scopulophila parryi* y *Psacalium decompositum* para determinar la dosis adecuada para disolver el cálculo dental y desarrollar una formulación farmacéutica aplicada a enfermedades periodontales.

4. HIPÓTESIS

Los extractos del *Eriogonum ciliatum*, *Scopulophila parryi* y *Psacalium decompositum* disuelven el cálculo dental, presentan acción antiinflamatoria, antimicrobiana y no son citotóxicos.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad biológica de tres plantas del noreste de México para el tratamiento de la enfermedad periodontal.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener los extractos metanólicos del *Eriogonum ciliatum*, y *Scopulophila parryi*, *Psacalium decompositum*, por el método de maceración.
2. Evaluar *in vitro* el grado de disolución del cálculo dental por los extractos de las plantas en estudio.
3. Determinar la actividad antimicrobiana de los extractos por el método de difusión de placa sobre *Porphyromona gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *Streptococcus mutans*.
4. Valorar la citotoxicidad de los extractos activos mediante el método de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoilo (MTT).
5. Evaluar la actividad antiinflamatoria de los extractos activos sobre monocitos de sangre periférica.
6. Desarrollar una formulación con los extractos que presenten características farmacéuticas apropiadas para su aplicación periodontal.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Colecta e identificación del material vegetal de estudio

El camote de lipana y la hierba de la tarántula o matarique se colectarán en Real de Catorce, SLP y la hierba de la hormiga de la región de Galeana, N L, se identificaron en el Herbario de la FCB, UANL.

Material vegetal

Nombre científico	Nombre común	Parte empleada
<i>Eriogonum ciliatum</i>	Hierba de la hormiga	Raíz
<i>Scopulophila parryi</i>	Camote de Lipana	Raíz
<i>Psacalium decompositum</i>	Hierba de la tarántula, Matarique	Raíz

6.1.2. Obtención y preparación del material vegetal

Se separó la parte de la planta a utilizar (raíz), se lavó con un cepillo de cerdas suaves, se cortó en rebanadas y se secó a la sombra por un lapso de 7 d para posteriormente triturarlo en un molino.

La extracción de las plantas se realizó mediante la técnica de maceración; Esta técnica es utilizada en la elaboración del vino y ha sido adoptada y ampliamente utilizada en la investigación de plantas medicinales. La maceración implica mantener en contacto la planta ya sea en trozos o molida con un disolvente en un recipiente tapado y deja reposar a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo mínimo de 3 d con agitación frecuente (Sukhdev et al., 2008; Azwanida, 2015).

Se tomaron 200 g de la raíz de cada una de las plantas: *S. parryi*, *P. decompositum* y *Eriogonum ciliatum* pre-tratada y se depositó en un matraz Erlenmeyer de 500 mL, se le adicionaron 120 mL de metanol al 99.9%, se selló herméticamente, se dejó en agitación constante por 7 d en un Agitador Dual Action Shaker Lab-line, se separó el solvente del resto del material vegetal mediante filtración con papel Whatman N° 1, posteriormente el mismo material vegetal se extrajo 2 veces más. El extracto metanólico se concentró en un rotavapor tipo Büchi a una temperatura menor a 60° C, se llevó a sequedad total a temperatura ambiente y se almacenó en viales color ámbar a 4°C, hasta su uso.

Se obtuvo el rendimiento del extracto de la siguiente fórmula:

$$(\%) \text{ Rendimiento} = \frac{\text{peso obtenido}}{\text{peso inicial}} \times 100$$

Dónde:

peso obtenido = peso obtenido del material vegetal después la extracción

peso inicial = peso del material vegetal antes de la extracción.

6.1.3. Tamizaje Fitoquímico

Las plantas medicinales tradicionalmente usadas han atraído recientemente la atención de las comunidades científicas biológicas. Esto ha implicado el aislamiento y la identificación de los metabolitos secundarios producidos por las plantas y su uso como principios activos en preparaciones medicinales (Taylor et al., 2001).

Las plantas tienen miles de constituyentes, las cuales son moléculas nuevas y biológicamente activas con propiedades antimicrobianas; para la medicina moderna es necesario e importante el estudio etnobotánico de las plantas para conocer la utilidad de ellas pero a través métodos estandarizados para obtener resultados comparables y reproducibles; es por ellos que los metabolitos fitoquímicos con efectos inhibitorios sobre diferentes microorganismos *in vitro* se les debe estudiar para evaluar su eficacia (Das et al., 2010).

Se realizaron las pruebas fitoquímicas a los extractos en estudio para determinar la presencia de insaturaciones (tetranitrometano), taninos (oxhidrilos fenólicos), esteroides y triterpenos (Liebermann-Burchard), saponinas, carbohidratos (antrona), quinonas, coumarinas, alcaloides (Dragendorff), sesquiterpenlactonas (Baljet) y flavonoides (Shinoda) (Rivas et al., 2016a).

6.2. Evaluación *in vitro* del grado de disolución del cálculo dental por los extractos de las plantas en estudio.

6.2.1. Disolución del cálculo dental

La disolución se llevó a cabo solamente en el extracto metanólico que mostró actividad antimicrobiana. Se recolectó cálculo dental de paciente se lavó con agua destilada para retirarle los restos de materia orgánica, posteriormente se secó en una estufa a una temperatura de al menos de 120°C por 5 h para eliminar la humedad posteriormente las muestras se colocaron a un desecador por 20 min y se pesaron en una balanza analítica. Las muestras de cálculo sin tratar fueron analizadas por microscopia electrónica de barrido (Fei, modelo nova-nanosem200), a diferentes magnificaciones. Para el análisis de disolución se preparó un stock del extracto para lo cual se pesaron 50 mg del extracto obtenido y se disolvió en 1 mL de etanol a 99.9% y de ahí se tomaron 50 µL y se aforó a 1000 µL y así tener una solución madre. A las muestras de cálculo se les adicionó al menos 400 µg/mL de la solución del extracto, manteniendo constante la relación cálculo/solución de extracto (1mg/10 mL) y se incubaron a 37°C en una incubadora orbital por 15 d, posteriormente el cálculo se secó, pesó y se analizaron los cambios de superficie en microscopio electrónico de barrido a diversas magnificaciones. Todos los experimentos se realizaron por triplicado con sus respectivos controles. Se llevó a cabo un análisis estadístico: t Student, intervalo de confianza 95%.

6.2.2. Difracción de rayos X y composición del cálculo dental

Para el análisis de difracción de rayos X y composición del cálculo, se realizó en 1.501 g de cálculo dental con extracto metanólico de *P. decompositum* a 400 µg/mL en un volumen final de 1 L, se incubó a 37°C en una incubadora orbital (INO-650 M) por 15 d realizando cambio del extracto cada 24 h. Después de este período de incubación, se secó en una estufa (Drying Over DX602C) a 150°C por 1 h y se colocó en un desecador. Se pesó 1 g de la muestra tratada y se pulverizó en un mortero, se colocó en un vial y se etiquetó; el mismo procedimiento se realizó con 1 g de cálculo dental sin tratamiento. Las muestras se llevaron a analizar por difracción de rayos X (XRD) en un difractómetro Bruker D8 Advance para observar las diferentes fases cristalinas de las muestras a partir de 10 elementos conocidos.

6.3. Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos en estudio por el método de difusión de placa.

Esta se determinó por el método de difusión de placa. Se sembraron 100 µL del sobrenadante bacteriano en agar sangre de carnero, con la técnica de plaqueo, se dividieron las cajas en cinco zonas, en tres de ellas se colocó un papel filtro estéril whatman #1, con 10 µL del extracto a evaluar, en la zona cuatro el control negativo etanol al 99.9% dependiendo del extracto y en la cinco clorhexidina al 0.12% como control positivo, esto se realizó por triplicado; se incubaron las cajas por 24h a 37°C en anaerobiosis y se midieron los halos de inhibición para determinar su actividad.

6.3.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos metanólicos de las plantas en estudio.

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) con la técnica de microdilución en placa de 96 pozos. (Andrews, 2001) las concentraciones evaluadas fueron: 1000, 900, 700, 500, 400, 300, 200, 100 y 50 µg/mL, se realizó cuatro veces cada concentración por triplicado. Se incluyeron muestras blanco con medio de cultivo tripticaseína de soya con

el extracto, con el control positivo clorhexidina al 0.2% (concentración final en el medio) y de este se evaluaron diferentes concentraciones 1200, 1000, 900, 700, 500 y 400 µg/mL, y como control negativo etanol 5% y con los microorganismos como control de crecimiento, cada uno se realizó cuatro veces por triplicado.

Se activaron las cepas *S. mutans* ATCC® 700610TM UA159 [UAB577], *P. gingivales* ATCC® BAA-308TM W83 y *P. intermedia* ATCC® 25611TM, se tomaron 100 µL de cada cepa y se inocularon en 5 mL de caldo de tripticaseína de soya, se incubaron a 37°C por 12 h en las condiciones de óxido-reducción necesarias para cada cepa bacteriana; se preparó el inóculo ajustándolo a la escala 0.5 de McFarland (1.5×10^8). Se preparó la solución madre del extracto, se pesaron 50 mg del extracto y se solubilizaron en 1 mL del solvente (etanol 100 %) y se realizó una dilución 1/20, se toman 50 µL de la solución inicial del extracto y 950 µL de medio líquido a un volumen final de 1 mL (2500 µg/mL), a partir de ella se realizaron las diferentes concentraciones ya mencionadas. Se preparó la solución stock del control positivo (clorhexidina) a partir de una concentración de 2000 µg/mL y se realizaron las diferentes concentraciones ya mencionadas del control positivo. Para el control negativo se preparó una solución stock con etanol al 100% y medio de cultivo líquido ambos en la misma proporción que el extracto en estudio.

Se depositó en una microplaca un volumen final de 200 µL por pozo, con un volumen diferente de la solución madre para cada concentración del extracto a evaluar, más 100 µL del inóculo de cada cepa bacteriana y se completó el volumen final de cada pozo con medio líquido esto se corrió por cuadruplicado, para el blanco del extracto un volumen diferente de la solución madre, para el control de clorhexidina se agregó un volumen diferente de la solución stock para cada concentración del control positivo a evaluar, para el control negativo se agregó un volumen diferente de la solución stock para cada concentración, para el control de crecimiento se agregó 100 µL del inóculo de cada cepa bacteriana y 100 µL de medio líquido. La placa fue incubada a 37°C durante 24 h, en condiciones de óxido-reducción apropiadas para cada cepa bacteriana, después de éste tiempo se midió la densidad óptica (DO) a 595nm en un lector de placas modelo iMark™ Microplate Reader marca BIO-RAD®. La menor absorbancia entre las

concentraciones evaluadas, después de restar la turbidez del extracto se considera como concentración mínima inhibitoria.

6.4. Valoración de la citotoxicidad de los extractos activos mediante el método de MTT.

Se evaluó la citotoxicidad *in vitro* de los extractos metanólicos activos empleando el ensayo de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoilo) en dos líneas celulares: células VERO ATCC®CCL-81™ y fibroblastos humanos Detroit 551 ATCC®CCL-110™. Se descongeló un vial de las células empleando un vaso precipitado con agua a 37°C sumergiéndolo aproximadamente por 2 min. Después se re suspendió en un tubo falcón con 9 mL de medio DMEM y se centrifugó a 1200 rpm por 5 min, después se decantó el medio de cultivo y se re suspendió el pellet en 5 mL de PBS y se volvió a centrifugar a 1200 rpm por 5 min este procedimiento se realizó dos veces para posteriormente re suspender en 5 mL de medio DMEM y transferir a un frasco de cultivo celular T-25 (25 cm²) e incubar a 37°C/5% de CO₂/100% Humedad. Una vez que se tuvo una confluencia celular del 100% se realizó el conteo de células en una cámara de Neubauer y en una microplaca de 96 pozos se inocularon 100 µL de suspensión celular (20,000 células de D551 y 10,000 células VERO por pozo) y se incubó por 24 h a 37°C/5% de CO₂/100% humedad; se aplicaron los tratamientos 100 µL (extractos a diferentes concentraciones y controles); se incubaron nuevamente por 24h a 37°C 5% CO₂; después se eliminó el medio y se agregó 10 µL de MTT a 0.5 mg/mL y se incubaron por 4h, 37°C / 5% de CO₂/100 % humedad; finalmente se agregó 100 µL de DMSO para lisar las células, se agitaron por 5 min y se tomó la lectura a 570nm en un espectrofotómetro para Microplacas Epoch de la marca BioTeK.

6.5. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los extractos activos sobre monocitos de sangre periférica.

6.5.1. Obtención y cultivo celular de los monocitos de sangre periférica humana.

La evaluación de la actividad antiinflamatoria se realizó con monocitos de sangre periférica humana. Se realizó una extracción sanguínea venosa con el sistema Vacutainer®, de un donante voluntario al cual se le realizó una punción intravenosa de la vena mediana cefálica, se colocó un torniquete en la parte media superior del brazo para facilitar la punción; una vez identificada la vena se realizó la asepsia con alcohol etílico al 70% se dejó secar, y se insertó en el adaptador del sistema Vacutainer®. Se inmovilizó la vena colocando el dedo pulgar debajo del área de la punción. Se realizó la punción de la piel con el bisel hacia arriba con un movimiento suave y rápido, se encajó el tubo con anticoagulante (BD®EDTA-K₂) en el extremo y se dejó llenar hasta agotar el vacío del tubo. Se agitó cada tubo suavemente invirtiéndolo 6 veces. Una vez llenos todos los tubos se retiró la aguja rápidamente hacia atrás y se aplicó presión con el algodón. Se obtuvo un volumen de 25 mL de sangre venosa.

Se realizó el aislamiento de las Células Mononucleares de Sangre Periférica (CMSP) por medio del gradiente de Ficoll-Hypaque™ PLUS (GE Healthcare Life Sciences). En condiciones estériles se coloca la sangre en un tubo de fondo cónico de 50 mL y se resuspende en PBS estéril (pH 7.4) en una proporción 1:1 y se homogeniza suavemente. Se prepararon 5 tubos de 15 mL de fondo cónico con 5 mL de Ficoll-Hypaque™ PLUS y con una pipeta estéril de 10 mL se dispensaron 10 mL de la mezcla de la sangre y PBS estéril lentamente sobre la pared del tubo sin mezclar con el Ficoll-Hypaque™ PLUS quedando dos fases, en la parte inferior va estar el Ficoll-Hypaque™ PLUS y en la parte superior la mezcla de la sangre y el PBS estéril. Se procedió a centrifugar los tubos a 1,400 rpm durante 30 min a 20°C, sin el freno de mano. Se retiraron los tubos de la centrifuga cuidadosamente sin perturbar los estratos formados. Con una pipeta estéril de 1 mL se aspiró cuidadosamente el estrato correspondiente a las CMSP y se transfirieron a un tubo de fondo cónico de 15 mL. Se aforó el tubo con las CMSP a 10 mL con PBS estéril y se homogenizó por inversión. Se centrifugó a 900 rpm por 10 min a 20°C; se descartó el sobrenadante por decantación y se resuspendieron las células nuevamente en 10 mL de PBS estéril y se centrifugó a 900 rpm por 10 min a 20°C; se descartó el

sobrenadante por decantación y se resuspendieron las células nuevamente en 10 mL de PBS estéril y se centrifugó finalmente a 900 rpm por 10 min a 20°C. Se descartó el sobrenadante por decantación y se agregó 1 mL de medio de cultivo RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL estreptomicina y 0.5mL de glutamina 100X (GlutaMAXTMSupplement) y se resuspendieron las células por golpeteo digital (English y Andersen, 1974; Ovalle 2015). Después se realizó el conteo celular en cámara de Neubauer, en un tubo Eppendorf® se diluyeron 10 µL de las CMSP en suspensión y 10 µL de azul de tripano al 4%. Se colocaron 10 µL de la solución en cada cámara de Neubauer y se leyó bajo el microscopio a 40X para determinar el promedio de los 4 cuadrantes grandes angulares. Se aplicó la fórmula del cálculo de concentración celular para obtener una concentración celular óptima de 1X10⁶cell/mL.

$$\text{Concentracion cell/mL} = \frac{\text{Total Células Contadas X 10,000}}{\text{Número de Cuadrantes}}$$

Para el ensayo de la expresión de los genes de citosinas proinflamatorias seleccionadas, en cada pozo se cultivaron 148,327 cel/mL (tres pozos por tratamiento). Los tratamientos son: extracto metanólico de *P. decompositum* a las siguientes concentraciones 700, 500 y 400 µg/mL, *S. parryi* a las concentraciones de 500, 400 y 300 µg/mL. Control positivo (LPS a una concentración de 1 mg/mL) y el control negativo o control de crecimiento (células CMSP sin tratar) en placas de 6 pozos con un volumen final de 2 mL el ensayo se realizó por triplicado. Se incubaron las microplacas de 6 pozos con las células CMSP por 24h, 37°C / 5% de CO₂/100 % Humedad. Posteriormente se realizó un pre-tratamiento a las células CMSP con los extractos a evaluar, se retiró de cada pozo 100 µL de medio RPMI suplementado y se depositó 100 µL de los extractos a las diferentes concentraciones y se incubó por 2 h, 37°C/5% de CO₂/100 % humedad; posteriormente se estimularon las células a excepción del control negativo con 10 µL de LPS a una concentración de 1 mg/mL y se incubó nuevamente por 24 h, 37°C/5% de CO₂/100 % humedad.

6.5.2. Extracción de RNA de las Células Mononucleares de Sangre Periférica (CMSP).

Para la extracción de RNA, se empleó el kit Direct-zolTMRNA MiniPrep marca ZYMO RESEARCH, inicialmente se retiró el medio RPMI suplementado de los pozos de las microplacas por aspiración con pipetas de 5 mL estériles, para lisar las muestras se resuspendieron las células con 300 µL de TRI Regent en cada pozo y se incubó por 5 min y con una espátula se removieron del fondo de los pozos las CMSP y se transfirieron por aspiración con una pipeta estéril a tubos Eppendorf® de 1.5 mL rotulados con las concentraciones a evaluar, se centrifugaron a 12,000 rpm por 30 s las muestras y se transfirió el sobrenadante a un tubo Eppendorf® nuevo. Después se añadió etanol en una proporción 1:1 al sobrenadante, se homogenizó muy bien y se transfirió a una columna de IIC Zymo-SpinTM en un tubo de recolección y se vuelve a centrifugar 12,000 rpm por 30 s para después descartar el medio. Al tubo se agregó 400 µL de RNA Wash Buffer y se centrifugó 10,000 rpm por 30 s, en otro tubo estéril se añade 5 µL DNasa I, 75 µL de DNA Digestión Buffer y se mezcla. Se agregó esta mezcla directamente a la matriz de la columna. Se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Después de este período de tiempo se añadieron 400 µL de Direct-zolTM RNA Prewash a la columna y se centrifugó a 12,000 rpm por 30 s, se descartó el medio y se repite este procedimiento nuevamente. Se añadió 700 µL de RNA Wash Buffer a la columna y se centrifugó a 12,000 rpm por 2 min para asegurar la eliminación completa del tampón de lavado y se transfiere la columna con cuidado a otro tubo Eppendorf® nuevo libre de RNasa. Se añadió 50 µL de agua libre de DNasa/RNasa en la columna y se centrifugó a 12,000 rpm por 30 s (ZYMO RESEARCH, 2015).

6.5.3. Síntesis de DNA complementario (cDNA) a partir de mRNA de las CMSP

Para la síntesis de cDNA se utilizó un kit comercial ImProm-IITM Reverse Transcription System de Promega. Se preparó la mezcla de reacción combinando los siguientes componentes del ImProm-IITM, de acuerdo a las especificaciones recomendadas por el fabricante. En un tubo Eppendorf® estéril de 1.5 mL sobre hielo se preparó una mezcla suficiente de 15 µL para cada reacción de síntesis de cDNA que se realizó, se determinó

los volúmenes necesarios para cada componente: agua libre de nucleasas, ImPromII™ 5X Buffer de reacción, MgCl₂ a 1.5 mM, dNTP Mix a 0.5mM y ImProm-II™ Transcripción reversa, se agitó suavemente con un vórtex para mezclar y se mantuvo en hielo antes de la reacción. A cada tubo Eppendorf® con 5 µL del RNA extraído (10 ng) de las diferentes muestras, además de los controles negativo y positivo, se agregaron 15 µL del mix de transcripción reversa dando un volumen final de 20 µL, se colocaron los tubos en un bloque a temperatura de 25°C y se incubó por 5 min, posteriormente se incuban los tubos en un bloque a una temperatura de 42°C por 1h, por último se incubó en el Thermomixer confort a 70°C por 5 min para detener la síntesis (Promega, 2014).

6.5.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de las CMSP

Para esta reacción se empleó el kit Maxima SYBR Green qPCR de la marca Thermo SCIENTIFIC, se preparó la mezcla de reacción con los siguientes elementos Máxima SYBER Green qPCR Master Mix (2X), no ROX 12.5 µL, Forward primer 0.4 µM, Reverse primer 0.4 µM, Template DNA 1 µL (10 ng) y agua libre de nucleasas 10.3 µL para obtener un volumen final de 25 µL por cada reacción. Se programó el termociclador lightCycler®480II bajo las siguientes condiciones con cuatro programas: desnaturalización con un ciclo de 95°C por 10 min y una rampa 4.4°C/s; amplificación con 40 ciclos y cada ciclo tiene las siguientes condiciones: 95°C por 15s y una rampa de 4.4°C/s, 52°C por 22s y una rampa de 2.2°C/s y 72°C por 25s y una rampa de 4.4°C/s; el programa de la Curva Melting con las siguientes condiciones: primero: 95°Cx5ss y una rampa de 4.4°C/s, segundo: 65°Cx1m y una rampa de 2.2°C/s y tercero: 95°C continuo y una rampa de 0.11°C/s; y un programa de enfriamiento(Cooling) a 40°Cx5s y una rampa de 2.2°C/s; una vez obtenidos los resultados de la expresión de los genes de citocinas proinflamatorias Il-6, IL-8, IL-1, INF y TNF sobre las CMSP se aplicó un análisis estadístico con el programa REST 2009 para determinar el número de veces que se expresó cada gen analizado, mediante el método del $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Life-Technologies,2011).

6.6. Desarrollo de una formulación con los extractos metanólicos activos.

Una vez evaluada la actividad biológica de los extractos metanólicos del *E. ciliatum*, *S. parryi* y *P. decompositum*, se eligió el que presentó mayor actividad anticálcico el de *P. decompositum* para lo cual se pesó 50 mg de él y se disolvió en 1 mL de etanol sonicando por 10 min a 27°C en un sonicador de la marca Symphony. Después se preparó una formulación de un gel empleando un polímero el Carbopolol® 971P NF, se pesó 344 mg en un vaso precipitado en una balanza analítica y se midió en una probeta 50 mL de agua bidestilada, de aquí se retiraron 700 µL del volumen medidos para agregar 700 µL del extracto a una concentración de 400 µg/mL con una concentración de etanol al 1.4%; se mantuvo en agitación constante y se agregó poco a poco el polímero, se tuvo en hidratación por 24 h para evitar la formación de grumos. Después a la solución del polímero se le agregó un agente viscostante la trietanolamina (Tris(2-hydroxyethyl)); posteriormente se evaluó el aspecto físico de la formulación diseñada, se realizó una inspección visual donde se observó: color, homogeneidad, consistencia y la presencia de partículas. La formulación se ajustó y amortiguó a pH 7, usando un potenciómetro el cual se calibró con soluciones tampón estándar a pH 4 y 7; posteriormente se midió el pH del gel con el electrodo, que se calibró antes de cada medición de pH, se determinó el pH a las 24 y 48 h para detectar cualquier fluctuación de éste y se obtuvo el gel bioactivo (Aslani et al., 2013).

7. RESULTADOS

7.1 Extractos vegetales.

7.1.1. Obtención de los porcentajes de los rendimientos de los diferentes extractos del material vegetal

A las tres plantas empleadas en el estudio se les realizaron extracciones con metanol, cada extracto se mantuvo en agitación constante, se evaporó el solvente a temperatura ambiente y se determinó el porcentaje de rendimiento con la siguiente formula:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{peso obtenido}}{\text{peso inicial}} \times 100$$

En donde el peso obtenido se refiere al peso obtenido en la extracción y el peso inicial es el peso del material vegetal a extraer

En la tabla I se muestra el rendimiento porcentual de las plantas estudiadas, observando que la de mayor rendimiento fue la *S. parryi* con un 19.45%, el extracto de *S. parryi* se liofilizó obteniendo un rendimiento de 12.68%.

Tabla I. Rendimiento de los extractos metanólicos y parte utilizada de las plantas en estudio.

Especie vegetal	Parte utilizada	% p/p	% p/p liofilizado
<i>E. ciliatum</i>	Raíz	17.7	
<i>S. parryi</i>	Raíz	19.45	12.68
<i>P. decompositum</i>	Raíz	8.1	

7.1.2. Identificación parcial de los compuestos presentes en los extractos metanólicos de *E. ciliatum* , *S. parryi* y *P. decompositum*.

En la tabla II, se muestran los resultados del perfil fitoquímico para grupos funcionales y metabolitos secundarios de los extractos metanólicos de las tres plantas en estudio.

Tabla II. Perfil fitoquímico de los extractos metanólicos de *E. ciliatum*, *S. parryi* y *P. decompositum*.

Prueba	<i>E. ciliatum</i>	<i>S. parryi</i>	<i>P. decompositum</i>
Insaturación	+	+	+
Carbonilo	+	+	+
Taninos-Oxhidrilo fenólico	+	+	+
Esteroles y Triterpenos	+	+	+
Saponinas	-	-	+
Cumarinas	+	+	+
Carbohidratos	+	+	+
Sesquiterpenlactonas	-	-	+
Quinonas	-	+	-

7.2. Actividad bactericida de los extractos metanólicos de las tres plantas en estudio.

En la tabla III, se muestran los halos de inhibición del extracto metanólico *S. parryi* sobre bacterias periodontopatógenas los resultados de la actividad bacteriana muestran mayor actividad del extracto contra *P. intermedia* con un halo de inhibición de 18.1 mm, y de 9.3 mm del control positivo (clorhexidina al 0.12%), el control negativo no presentó actividad contra las tres bacterias en estudio.

Tabla III. Actividad antibacteriana del extracto metanólico *S. parryi* sobre bacterias periodontopatógenas.

Bacteria	Halos de Inhibición (mm)		
	<i>S. parryi</i>	Control positivo	Control negativo
<i>P. gingivalis</i>	16.8	12	0
<i>P. intermedia</i>	18.1	9.3	0
<i>S. mutans</i>	17.4	10.3	0

Control positivo = Clorhexidina 0.12%, Control negativo = Solvente

En la figura 4, se observan los halos de inhibición generados por el extracto metanólico *S. parryi* sobre las bacterias en estudio.



Fig.4 Halos de inhibición del extracto *S. parryi*.

Tabla IV. Actividad antibacteriana del extracto metanólico *P. decompositum* sobre bacterias periodontopatógenas.

Bacteria	Halos de Inhibición (mm)		
	<i>P. decompositum</i>	Control positivo	Control negativo
<i>P. gingivalis</i>	10.4	12	0
<i>P. intermedia</i>	9.3	8.6	0
<i>S. mutans</i>	9	9.6	0

Control positivo = Clorhexidina 0.12%, Control negativo = Solvente

En la tabla IV, se muestran los halos de inhibición del extracto metanólico *P. decompositum* sobre bacterias periodontopatógenas los resultados de la actividad bacteriana muestran mayor actividad del extracto contra *P. gingivalis* con un halo de inhibición de 10.4 mm, y de 12 mm del control positivo (clorhexidina al 0.12%), el control negativo no presentó actividad contra las tres bacterias en estudio.

En la figura 5, se observan los de halos de inhibición generados por el extracto metanólico *P. decompositum* sobre las bacterias en estudio.



Fig.5 Halos de inhibición del extracto *P. decompositum*

Tabla V. Actividad antibacteriana del extracto metanólico *E. ciliatum* sobre bacterias periodontopatógenas.

Bacteria	Halos de Inhibición (mm)		
	<i>E. ciliatum</i>	Control positivo	Control negativo
<i>P. gingivalis</i>	0	11	0
<i>P. intermedia</i>	0	9	0
<i>S. mutans</i>	0	9.6	0

Control positivo = Clorhexidina 0.12%, Control negativo = Solvente

En la tabla V, se muestran los halos de inhibición del extracto metanólico *E. ciliatum* sobre bacterias peridontopatógenas y el extracto no presentó actividad contra ninguna de las bacterias en estudio.

En la figura 6, se observan los halos de inhibición generados por el extracto metanólico *E.ciliatum* sobre las bacterias en estudio.



Fig.6. Halos de inhibición del extracto *E.ciliatum*

En la figura 7. Se muestran los resultados de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los diferentes extractos metanólicos. La concentración mínima inhibitoria del extracto *P. decompositum* sobre *P. gingivalis* y *P. intermedia* fue de 500 $\mu\text{g/mL}$ y de 700 $\mu\text{g/mL}$ sobre *S. mutans*. La concentración del extracto de *S. parryi* sobre *S. mutans* y *P. gingivalis* fue de 500 $\mu\text{g/mL}$ y de 400 $\mu\text{g/mL}$ sobre *P. intermedia*. Y la concentración mínima inhibitoria del control positivo (Clorhexidina) fue de 900 $\mu\text{g/mL}$ para las tres bacterias en estudio. Diferencia significativa para el extracto metanólico *P. decompositum* $p < 0.002$ y para el extracto metanólico *S. parryi* $p < 0,000$.

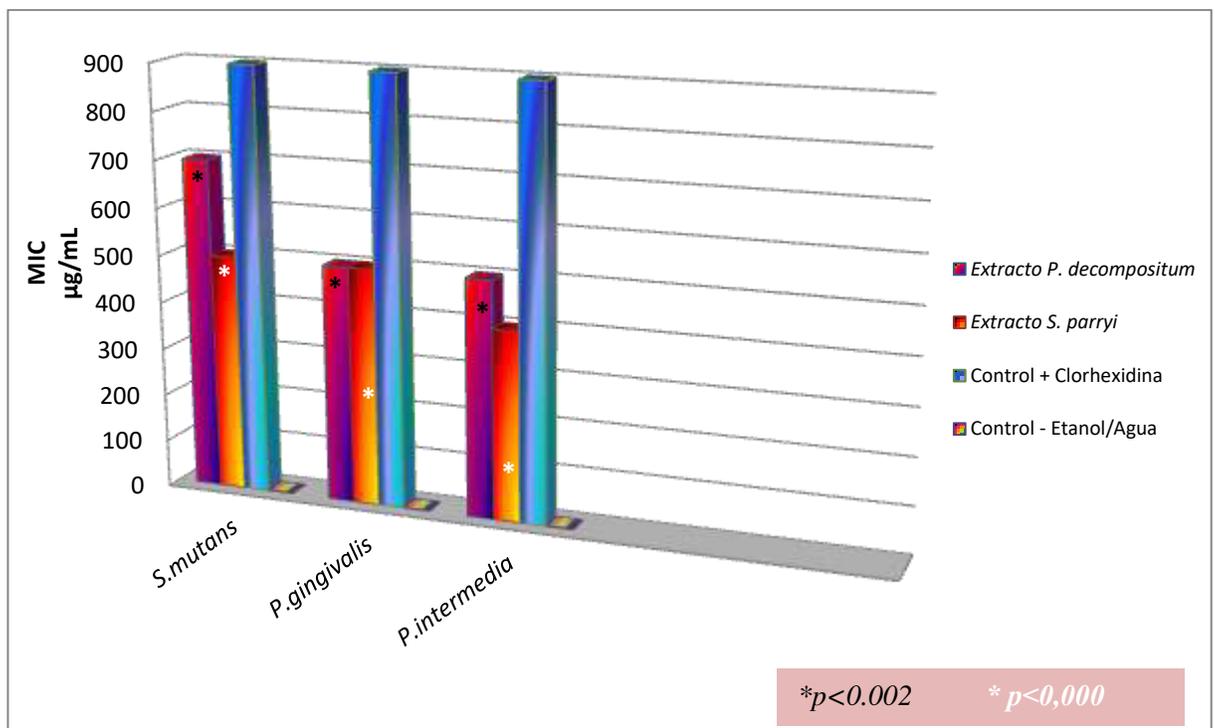


Figura 7. Concentración mínima inhibitoria (CIM) de los extractos metanólicos de *P. decompositum* y *S. parryi* sobre *P. gingivales*, *P. intermedia* y *S. mutans*.

En la figura 8. Se observa el porcentaje de disolución del cálculo dental obtenido por el tratamiento con el extracto metanólico de *P. decompositum* *S. parryi* y los controles.

7.3 Disolución del cálculo dental tratado con los extractos de las plantas en estudio.

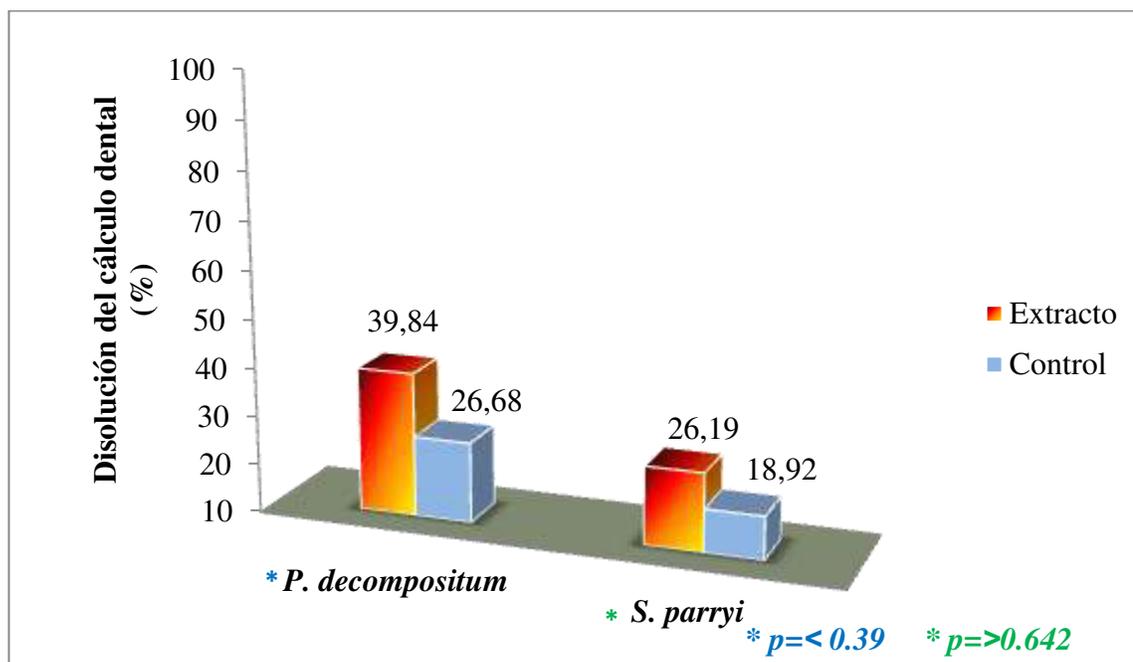


Figura 8. Disolución del cálculo dental tratado con los extractos metanólicos *S. parryi* y *P. decompositum*.

El extracto metanólico de *P. decompositum* logra la disolución del cálculo dental más del 39% con una diferencia significativa respecto al control.

7.3.1 Difracción de rayos X y composición del cálculo dental

En la figura 9, se observan los patrones de difracción de rayos X (DRX) del cálculo sin tratar (M226-A), Cálculo dental tratado con el extracto metanólico *P. decompositum* (Cálculo_PD). Aún y cuando hay una pérdida de peso del cálculo dental después del tratamiento con el extracto descrito, se muestra un patrón de difracción de las muestras analizadas. En este patrón se observa la presencia de reflexiones relacionadas a las fases Dahllita (+) e Hidroxiapatita (*), tanto en las muestras tratadas como en la muestra sin tratar; siendo la Dahllita la fase relacionada al conteo de carbono (C) y sodio (Na) en los espectros de la muestra tratada con *P. decompositum*. A este respecto es importante aclarar que el conteo de magnesio (Mg) no se relaciona a ninguna fase que pueda

“resolverse” por la técnica de difracción de rayos X (XRD) en un difractómetro Bruker D8 Advance. Además, la estequiometría de ambas fases es cerca de la relación en átomos obtenida por XEDS de la muestra tratada con el extracto *P. decompositum* de Ca:P:O de 1.2:1.0:3.3 (Calculo_PD).

Asimismo, de la comparación entre los patrones de difracción obtenidos de la muestra tratada y la muestra sin tratar es posible elucidar la aparición de reflexiones relacionadas a la fase Dahllita; así como la atenuación de aquellas relativas a la Hidroxiapatita, en la muestra tratada. Esta característica puede atribuirse a la “desmineralización” del cálculo dental como resultado de su tratamiento con el extracto metanólico *P. decompositum* (Calculo_PD).

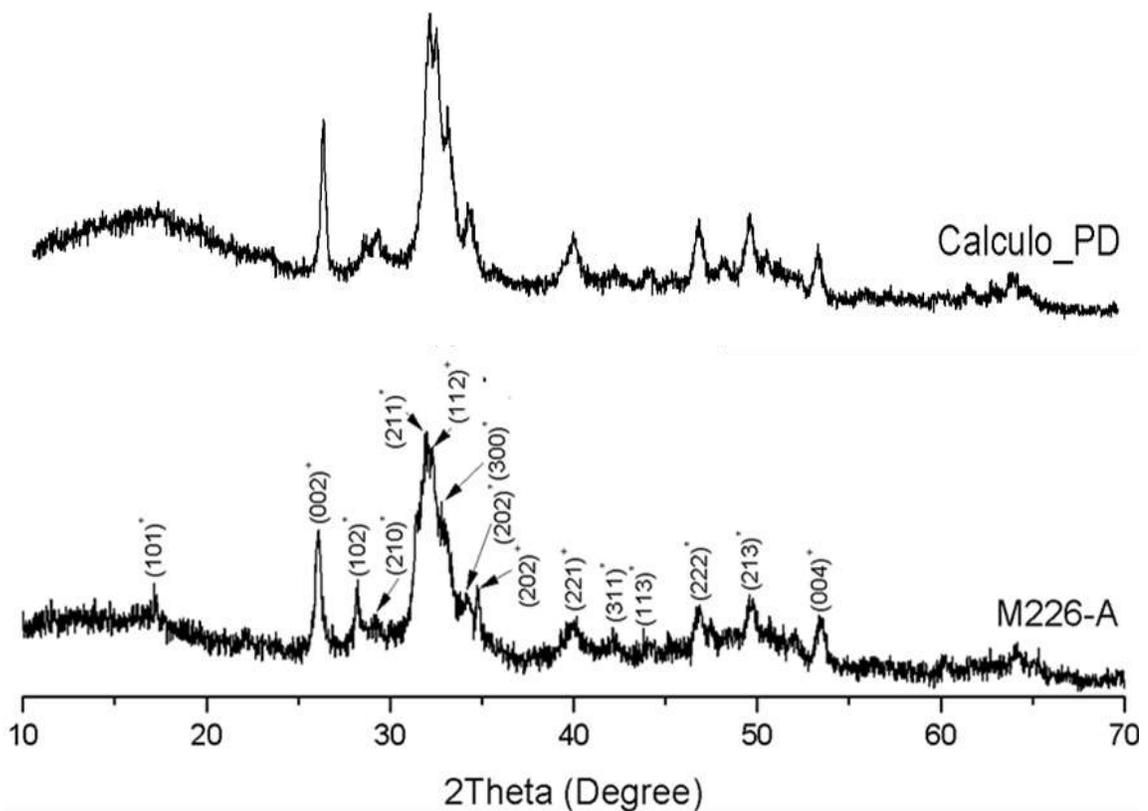


Figura 9. Patrones de difracción de rayos X (DRX) de cálculo sin tratar (M226-A), Cálculo dental tratado con el extracto metanólico *P. decompositum* (Cálculo_PD).

En las figuras 10, 11 y 12, se aprecia a diferentes magnificaciones la superficie del cálculo sin tratar con el extracto metanólico de *P. decompositum* cada una de las imágenes presenta diferentes características; en la primera se aprecia la presencia de una matriz lisa con depósitos sobrepuestos bien definidos y compactados a 5,000 magnificaciones. En la segunda a 10,000 magnificaciones la superficie tiene la presencia de una matriz lisa con depósitos sobrepuestos bien definidos y compactados. Y en la tercera a 20,000 magnificaciones la superficie tiene una matriz con aspecto liso y con depósitos sobrepuestos bien definidos y compactados.

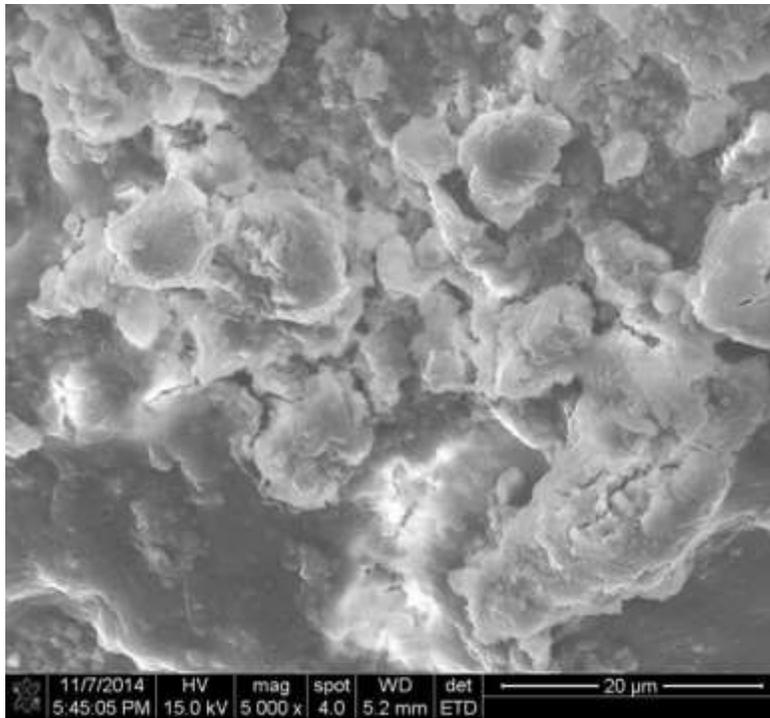


Figura 10. Superficie del cálculo dental sin tratar a 5,000 magnificaciones.

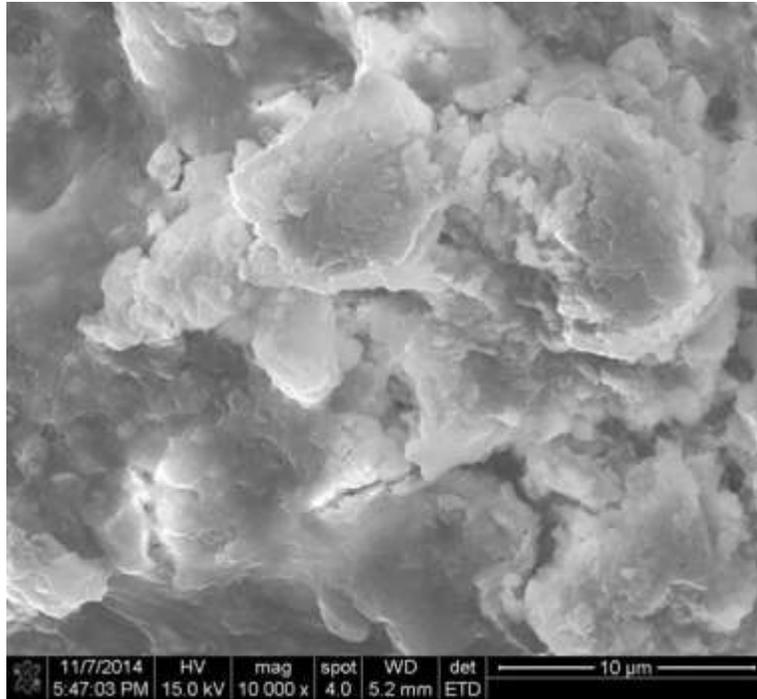


Figura 11. Superficie del cálculo dental sin tratar a 10,000 magnificaciones.

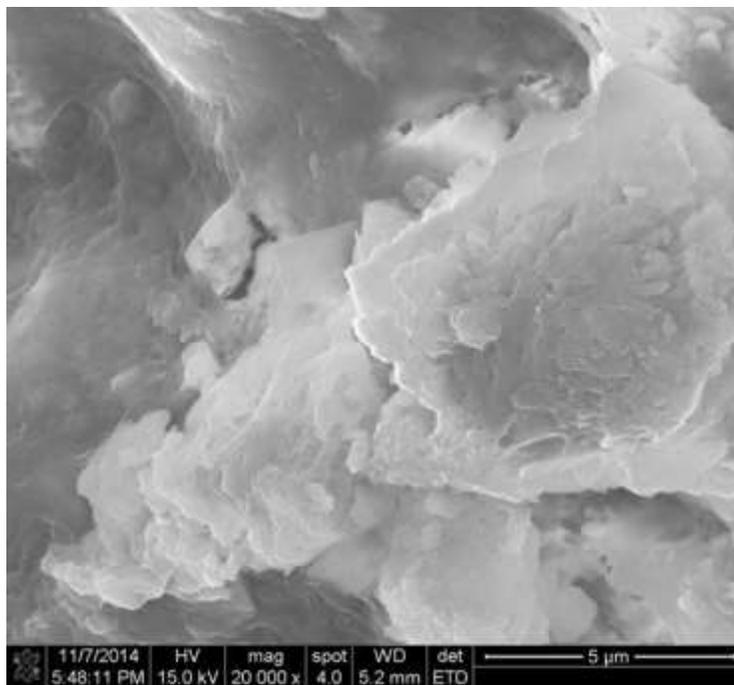


Figura 12. Superficie del cálculo dental sin tratar a 20,000 magnificaciones.

En las figuras 13, 14 y 15, se observa a diferentes magnificaciones la superficie del cálculo tratado con el extracto metanólico de *P. decompositum*. En la primera se aprecia una matriz desorganizada y con pequeños poros en la superficie cristalina a 5,000 magnificaciones. En la segunda a 10,000 magnificaciones prevalece una matriz desorganizada y con pequeños poros en la superficie cristalina. Y a 20,000 magnificaciones la superficie del cálculo tratado se observa una superficie muy porosa.

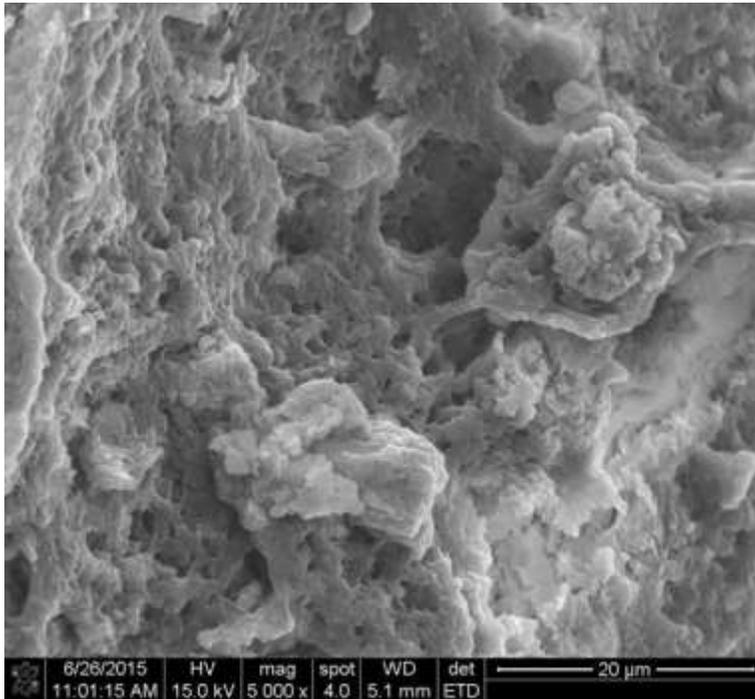


Figura 13. Superficie del cálculo dental tratado con extracto *P. decompositum* a 5,000 magnificaciones.

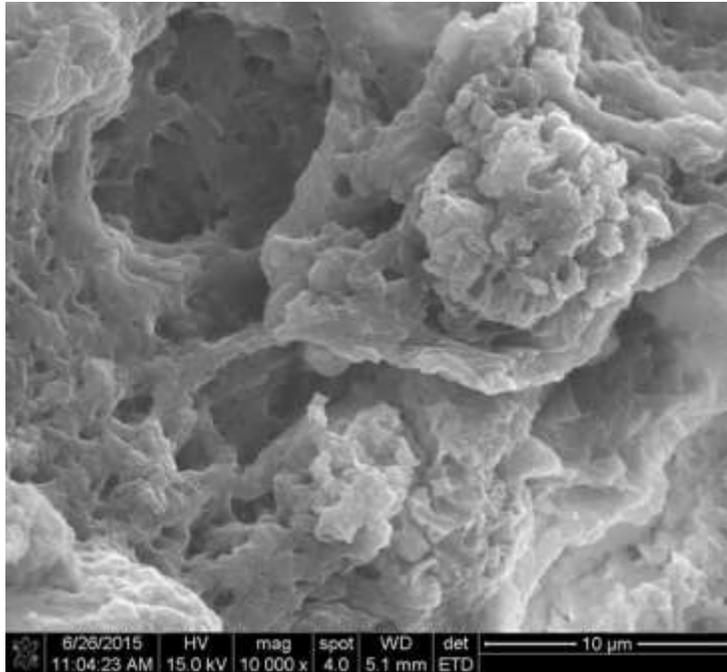


Figura 14. Superficie del cálculo dental tratado con extracto *P. decompositum* a 10,000 magnificaciones.

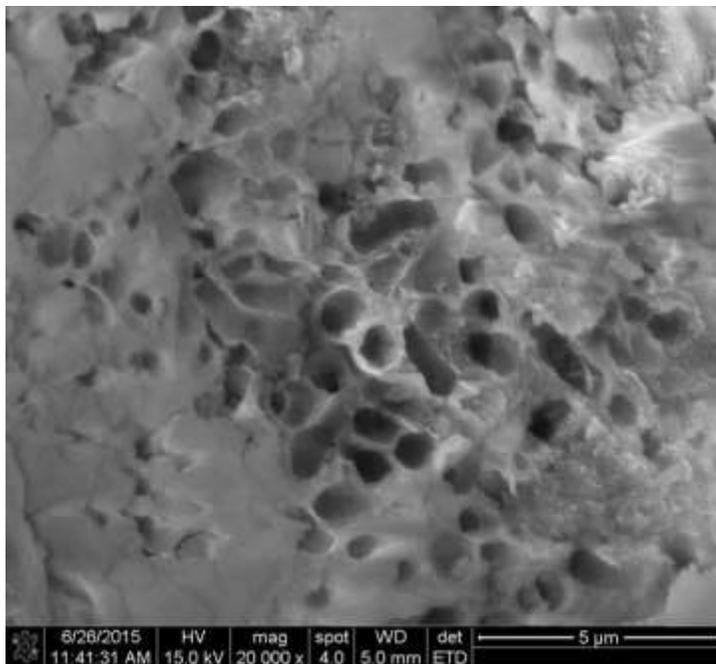


Figura 15. Superficie del cálculo dental tratada con el extracto *P. decompositum* a 20,000 magnificaciones.

7.4 Citotoxicidad de los extractos activos mediante el método de MTT.

Se encontró que los extractos metanólicos *S. parryi* (Sp) y *P. decompositum* (Pd) redujeron la viabilidad de las células VERO después de 24 h de tratamiento, siendo el porcentaje de viabilidad menor 17,25% para *S. parryi* como se muestra en la figura 16 y para *P. decompositum* fue de 32,38% como se observa en la figura 17. Se determinó la DL₅₀ mediante un análisis de regresión de Probit con el programa PASW Statistics 18.0, los resultados se presentan en la tabla 6, donde se observa que el extracto de *S. parryi* presentó los valores de la DL₅₀ más bajos de 52,70 µg/mL, y para *P. decompositum* de 77,30 µg/mL.

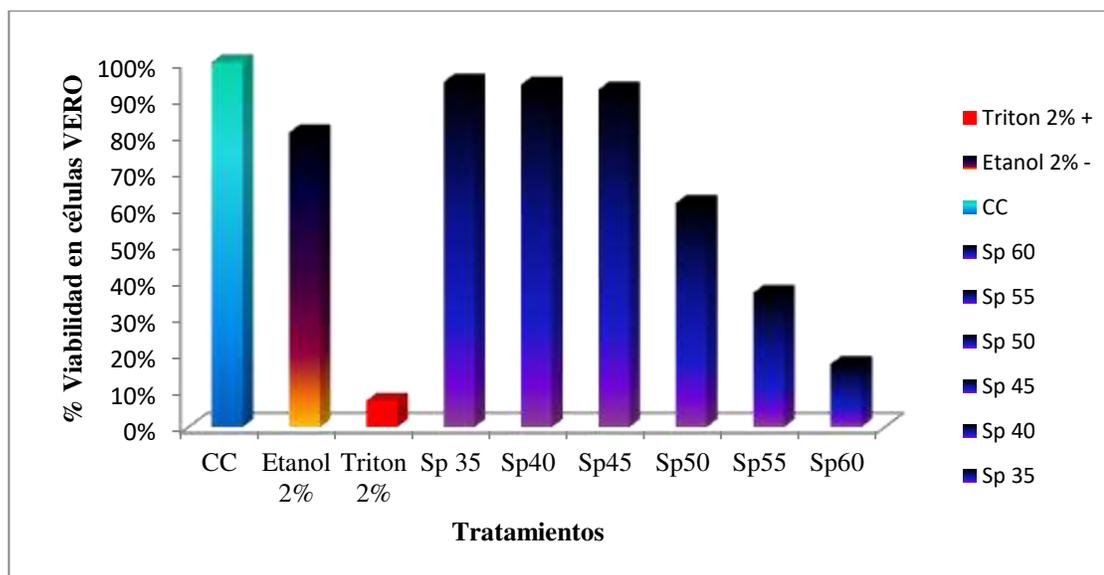


Figura 16. Viabilidad de las células VERO tratadas con diferentes tratamientos.

Sp 35 – 60 = *S. parryi* 35-60 µg/mL, CC = Medio de cultivo celular con células VERO sin tratamiento
Control - = Etanol 2%, Control + = Tritón 2%

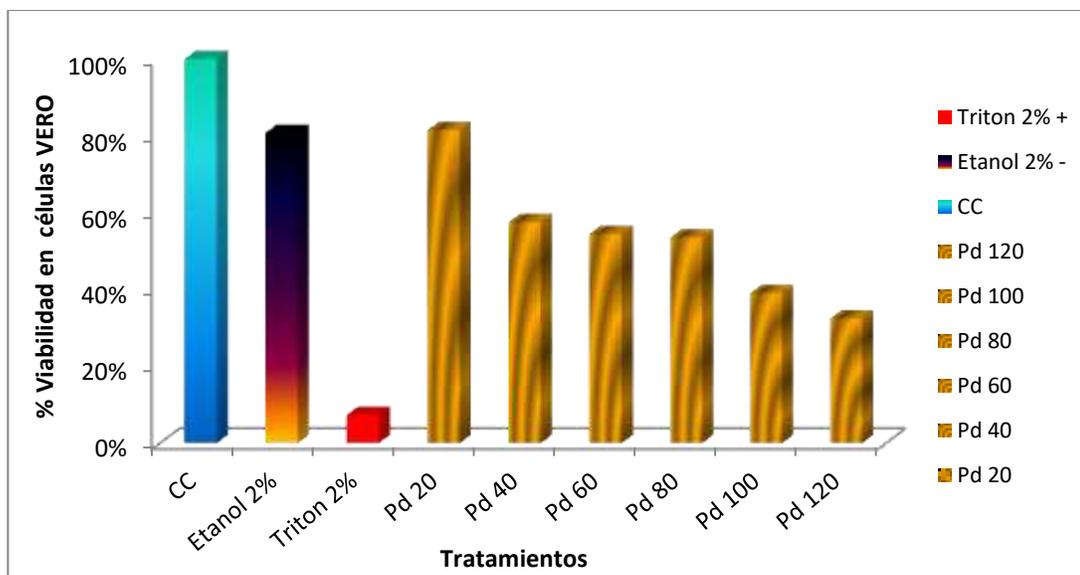


Figura 17. Viabilidad de las células VERO tratadas con diferentes tratamientos.

Pd 20 – 120 = *P. decompositum* 20-120 $\mu\text{g/mL}$, CC= Medio de cultivo celular con células VERO sin tratamiento, Control - = Etanol 2%, Control + = Tritón 2%

Tabla 6. Dosis Letal Media (DL_{50}) de los extractos metanólicos *S. parryi* y *P. decompositum* sobre células VERO a las 24 h.

Extractos	DL_{50} $\mu\text{g/mL}$
<i>S. parryi</i>	52,70
<i>P. decompositum</i>	77,30

El comportamiento de los extractos metanólicos *S. parryi* y *P. decompositum* sobre la línea celular Detroit 551 (fibroblastos de piel) indica que redujeron la viabilidad de las células al estar bajo tratamiento por 24h, siendo el porcentaje de viabilidad menor 13,51% para *S. parryi* como se muestra en la figura 18 y para *P. decompositum* fue de 20,82% como se observa en la figura 19. Se determinó la DL_{50} mediante un análisis de regresión de Probit con el programa PASW Statistics 18.0, los resultados se presentan en la tabla 7, donde se observa que el extracto de *P. decompositum* presentó los valores de la DL_{50} más bajos a las 24h.

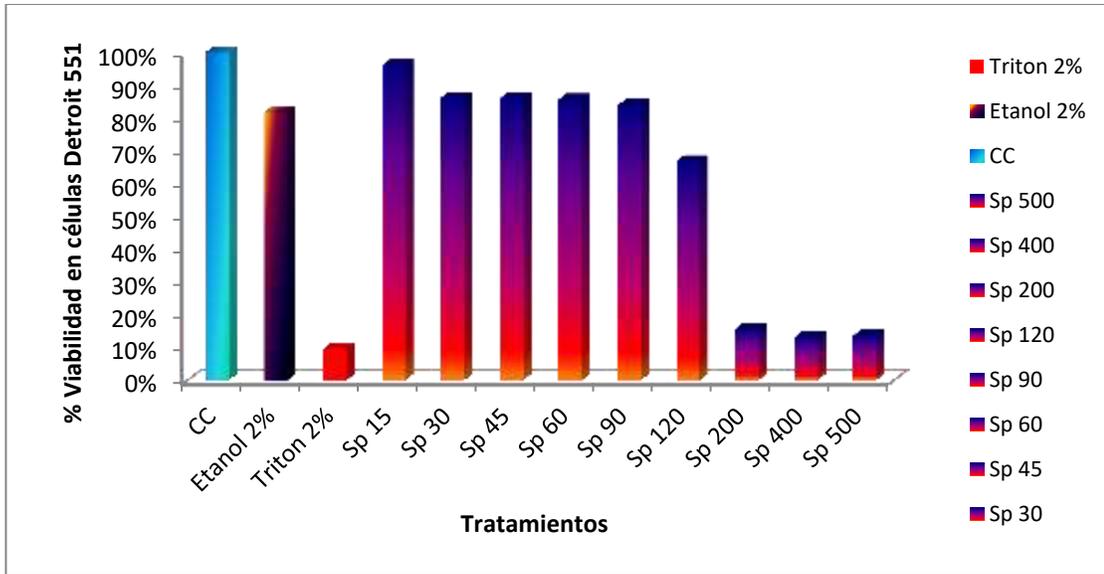


Figura 18. Citotoxicidad del extracto metanólico *S. parryi* sobre células Detroit 551.

Sp 15 – 500 = *S. parryi* 15-500 $\mu\text{g/mL}$, CC= Medio de cultivo celular con células Detroit 551 sin tratamiento, Control - = Etanol 2%, Control + = Tritón 2%

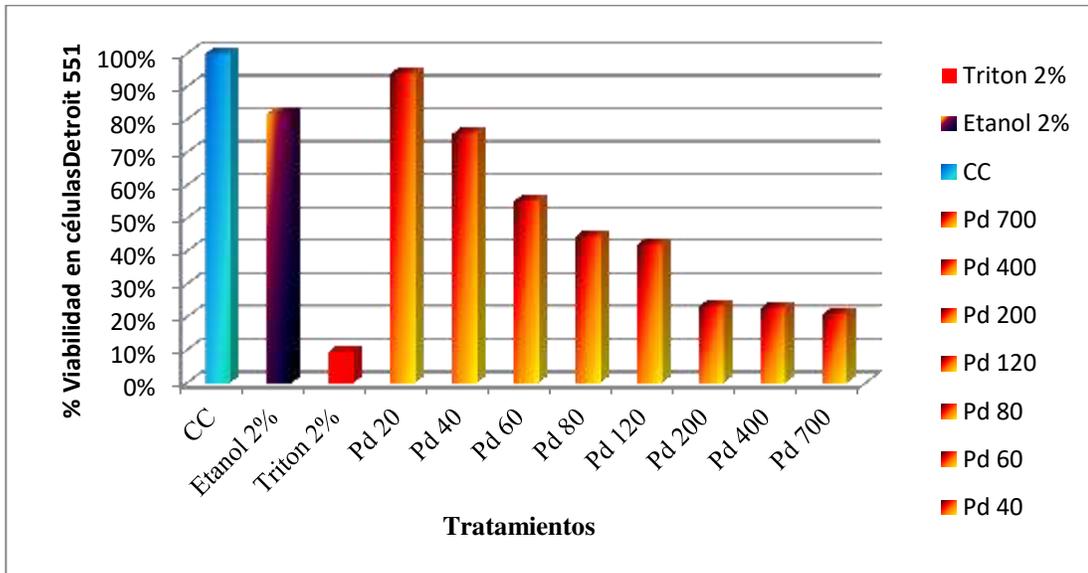


Figura 19. Citotoxicidad del extracto metanólico *P. decompositum* sobre células Detroit 551.

Pd 20 – 700 = *P. decompositum* 20-120 $\mu\text{g/mL}$, CC= Medio de cultivo celular con células Detroit 551 sin tratamiento, Control - = Etanol 2%, Control + = Tritón 2%

Tabla 7. DL₅₀ de los extractos metanólicos *S. parryi* y *P. decompositum* sobre la línea celular Detroit 551(fibroblastos de piel) a 24h.

Extractos	DL ₅₀ µg/mL
<i>S. parryi</i>	203,63
<i>P. decompositum</i>	150,58

7.5. Actividad Antiinflamatoria de los extractos metanólicos *S. parryi* y *P. decompositum* sobre células monoclonales de sangre periférica (CMSP)

A las plantas *S. parryi* y *P. decompositum* se les evaluó la actividad antiinflamatoria sobre CMSP y la interpretación estadística de los resultados se realizó con el programa Rest 2009 mediante el método $2^{-\Delta\Delta ct}$ con un índice de confiabilidad del 95%.

En la figura 20, se muestra la expresión génica de interleucinas-1 (IL-1) en CMSP tratadas con el extracto metanólico *P. decompositum* a concentración de 400, 500 y 700 µg/mL. La IL-1 fue normalizada por la expresión del gen endógeno β-Actina, existe diferencia significativa en las tres concentraciones evaluadas con respecto al control lipopolisacárido (LPS).

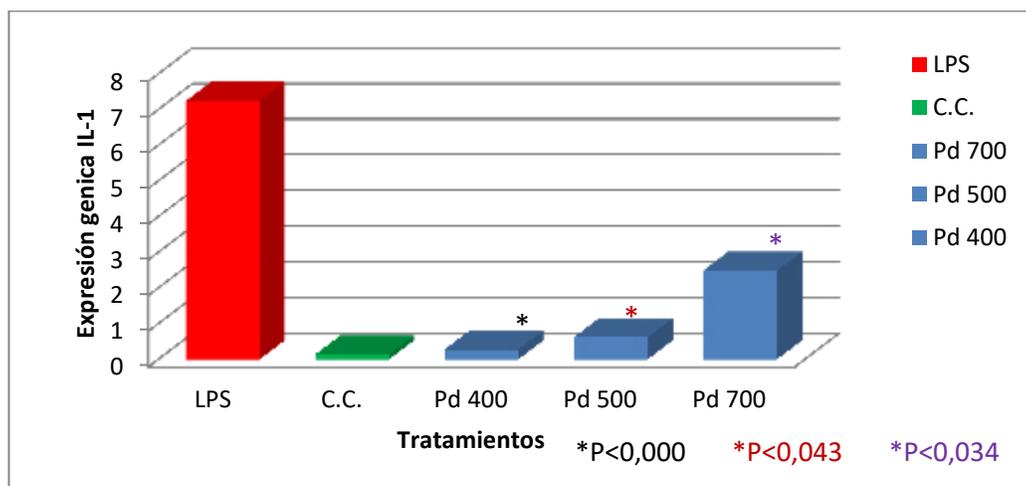


Figura 20. Expresión génica de IL-1 en CMSP tratadas con *P. decompositum*.

Pd 400 – 700 = *P. decompositum*. 400-700 µg/mL, CC= células CMSP sin tratar, Control + = LPS

En la figura 21, se muestran la expresión génica de IL-1 en CMSP tratadas con el extracto metanólico *S. parryi* en concentración de 300, 400 y 500 $\mu\text{g/mL}$. La IL-1 fue normalizada por la expresión del gen endógeno β -Actina, existe diferencia significativa en las tres concentraciones evaluadas con respecto al control LPS.

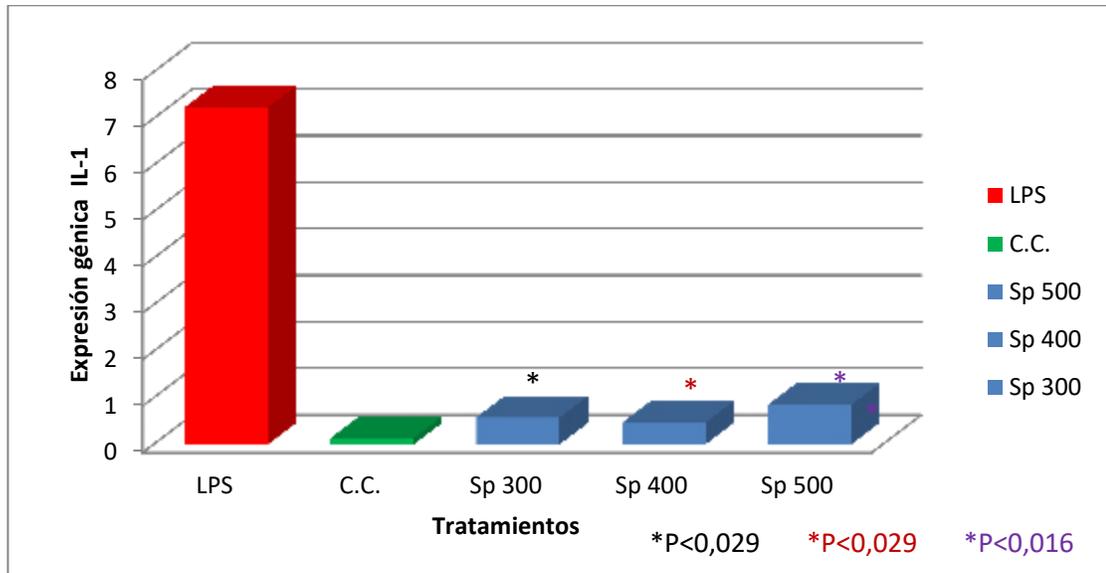


Figura 21. Expresión génica de IL-1 en CMSP tratadas con *S. parryi*.

Sp 300 – 500 = *S. parryi*. 300-500 $\mu\text{g/mL}$, CC= células CMSP sin tratar, Control + = LPS

En la figura 22, se muestran la expresión génica de IL-6 en CMSP tratadas con el extracto metanólico *P. decompositum* en concentración de 400, 500 y 700 $\mu\text{g/mL}$. La IL-6 fue normalizada por la expresión del gen endógeno β -Actina, existe diferencia significativa solo en la concentración de 400 $\mu\text{g/mL}$ con respecto al control LPS.

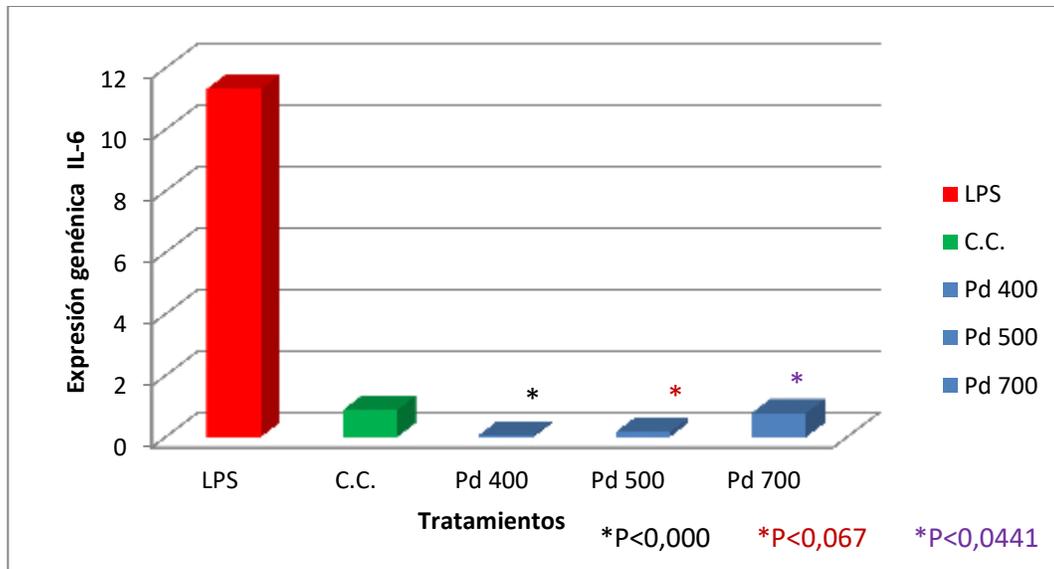


Figura 22. Expresión génica de IL-6 en CMSP tratadas con *P. decompositum*.

Pd 400 – 700 = *S. parryi*. 400-700 µg/mL, CC= células CMSP sin tratar, Control + = LPS

En la figura 23, se muestran la expresión génica de IL-6 en CMSP tratadas con el extracto metanólico *S. parryi* en concentración de 300, 400 y 500 µg/mL. La IL-6 fue normalizada por la expresión del gen endógeno β-Actina, existe diferencia significativa en las tres concentraciones evaluadas con respecto al control LPS.

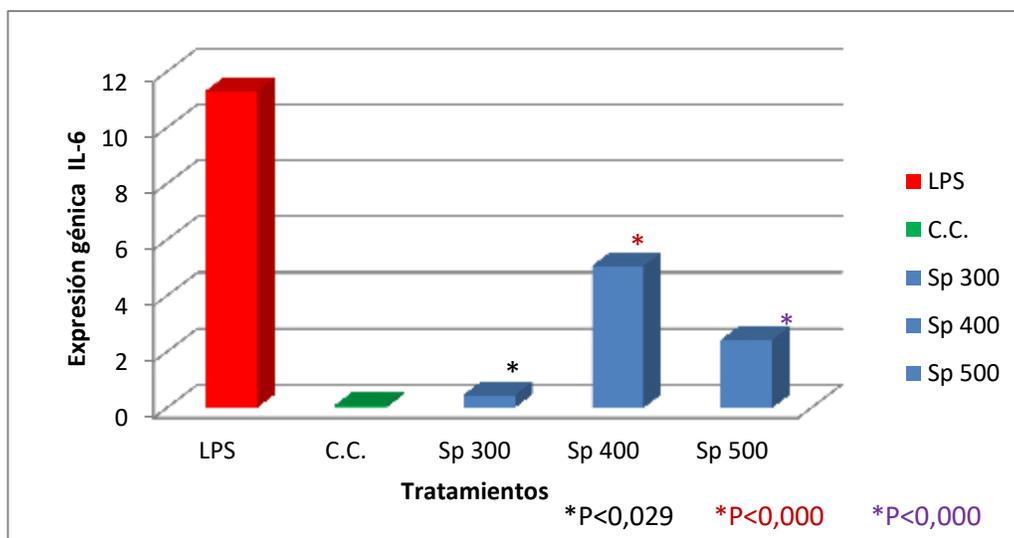


Figura 23. Expresión génica de IL-6 en CMSP tratadas con *S. parryi*.

Sp 300 – 500 = *S. parryi*. 300-500 µg/mL, CC= células CMSP sin tratar, Control + = LPS

En la figura 24, se muestran la expresión génica de IL-8 en CMSP tratadas con el extracto metanólico *P. decompositum* en concentración de 400, 500 y 700 $\mu\text{g/mL}$. La IL-8 fue normalizada por la expresión del gen endógeno β -Actina, existe diferencia significativa en la concentración de 400 y 500 $\mu\text{g/mL}$ con respecto al control LPS.

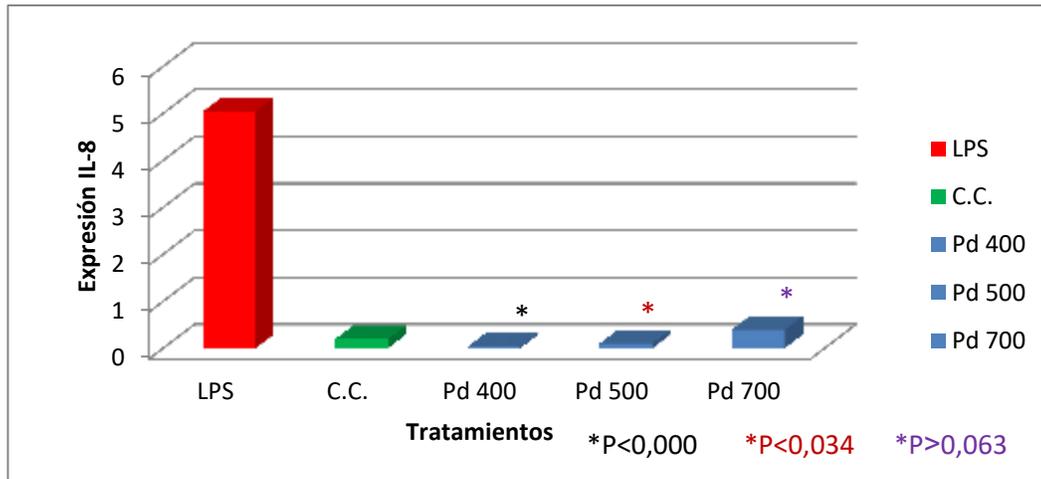


Figura 24. Expresión génica de IL-8 en CMSP tratadas con *P. decompositum*

Pd 400 – 700 = *P. decompositum*. 400-700 $\mu\text{g/mL}$, CC= células CMSP sin tratar, Control += LPS

En la figura 25, se muestran la expresión génica de IL-8 en CMSP tratadas con el extracto metanólico *S. parryi* en concentración de 300, 400 y 500 $\mu\text{g/mL}$. La IL-8 fue normalizada por la expresión del gen endógeno β -Actina, existe diferencia significativa solo en la concentración de 300 $\mu\text{g/mL}$ con respecto al control LPS.

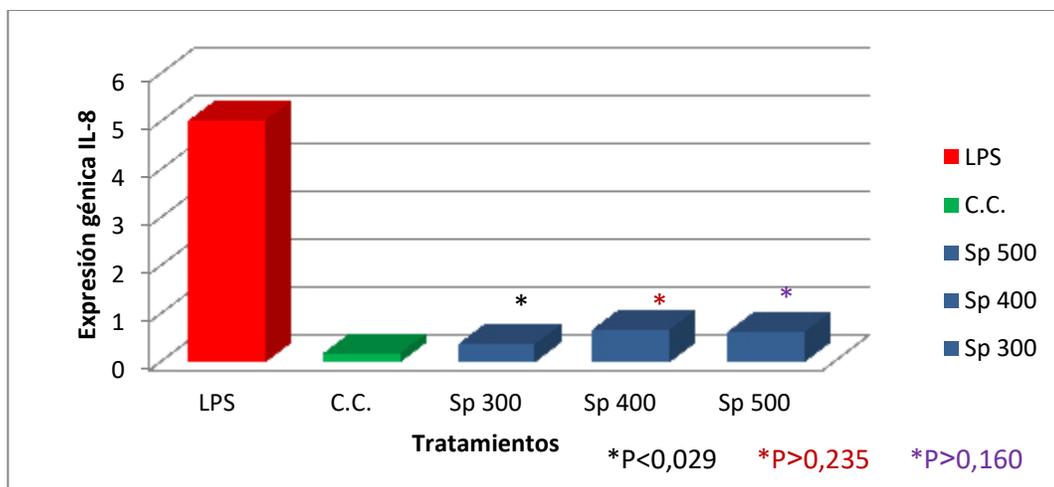


Figura 25. Expresión génica de IL-6 en CMSP tratadas con *S. parryi*.

Sp 300 – 500 = *S. parryi*. 300-500 µg/mL, CC= células CMSP sin tratar, Control + = LPS

7.6. Formulación farmacéutica

Se formuló un gel a base de un polímero el Carbopolol® 971P NF y como ingrediente activo extracto metanólico *P. decompositum*, a 400 µg/mL, que presentó mayor actividad anticálcico, así como antimicrobiano contra *P. gingivalis*, *P.intermedia* y *S. mutans*, además de reducir la expresión de las citocinas inflamatorias IL-1β, IL-6 y IL-8 en la concentración que fue formulado como se muestra en la figura 26.



Figura 26. Formulación farmacéutica de un gel anticálcico (antisarro) con el extracto *P. decompositum*.

8. DISCUSIÓN

A través de los años, y con la ayuda de la investigación científica, ha sido posible validar experimentalmente los beneficios curativos de muchas plantas mediante protocolos de investigación que incluyen ensayos de laboratorio, pruebas en animales y estudios clínicos controlados practicados en humanos (Villarreal et al., 2014). En la actualidad el estudio de las plantas medicinales como uno de los recursos más importantes de la Medicina Tradicional Popular Mexicana, entra en una etapa de habitual interés en el medio médico y científico nacional (Cirilo et al., 2011). Y esto se confirma debido a que el 30 por ciento de los fármacos utilizados en medicina proceden del reino vegetal, y hay una tendencia notable a elevar esta cifra, debido al constante descubrimiento de nuevos principios activos de origen botánico (Villarreal et al., 2014).

Las plantas evaluadas en este trabajo fueron seleccionadas debido a su uso frecuente en la medicina popular, a los pocos estudios etnofarmacológicos y a su distribución en el noroeste de nuestro país México. Uno de los objetivos de este trabajo fue la obtención de los extractos metanólicos de *E. ciliatum*, *S. parryi* y *P. decompositum*, de acuerdo a los resultados obtenidos observamos que el mejor rendimiento se obtuvo en la especie *S. parryi* con 19.45%, siendo este rendimiento superior en un 41% aproximadamente en comparación con el obtenido de la especie *P. decompositum*.

En el perfil fitoquímico de los extractos metanólicos de *E. ciliatum*, *S. parryi* y *P. decompositum*, los tres fueron positivos a las insaturaciones, al grupo carbonilo, a los taninos, esteroides y triterpenos, cumarinas, carbohidratos y solamente fue positivo a las saponinas y sesquiterpenlactonas el extracto *P. decompositum*, las cuales de acuerdo a varios autores (Jiménez et al. 1992, Alarcón et al. 2000, Villar 2001, Sepúlveda et al. 2003) reportan su presencia como los compuestos más abundantes, aunque fueron analizados en un extracto hexánico y en este estudio fue metanólico y también están presentes; las cumarinas le confieren actividad antimicrobiana concordando con (Avalos y Perez 2009). En *S. parryi*, no se tienen reportes de fitoquímicos presentes en la planta, siendo estos tal vez los primeros en documentarse. Las tres plantas de este estudio dieron negativa la prueba para alcaloides, pero sin embargo en estudios fitoquímicos

preliminares revelaron que las raíces de *P. peltatum* otra especie del género *Psacalium* probablemente también contiene saponinas y esteroides (terpenoides) así como alcaloides, según estudios realizados por (Rivera et al., 2004) y ambos metabolitos secundarios están presentes en *P. decompositum*, pero no los alcaloides los cuales también han sido reportados en rizomas y raíces de *P. peltatum* por Casillas et al. (2006) y han sido descritos como fitoquímicos que proporcionan beneficios para la salud al actuar como antioxidantes y antiinflamatorios (Dillard y Bruce, 2000, Rivera et al., 2004).

Dentro de la actividad antimicrobiana *S. parryi* presentó acción contra las bacterias periodontopatógenas presentando halos de inhibición de hasta 18.1 mm contra *P. intermedia*, sin embargo no hay antecedentes publicados sobre actividad biológica para esta planta. En esta investigación se observó que el extracto *P. decompositum* inhibió el crecimiento de las tres bacterias en estudio teniendo un efecto antimicrobiano mayor destacando su acción contra *P. gingivalis* con halos de inhibición de 10.4 mm; esto puede deberse a que como Jiménez *et al* (1992), Lang (2003) y Merino *et al.* (2015); reportaron que compuestos como el cacalol y algunos de sus derivados le confiere actividad antimicrobiana, contra microorganismos como *S. aureus*, *S. pyogenes*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis* y hongos como *C. albicans*, *C. neoformans*. Se observó que *P. decompositum* tiene un efecto antimicrobiano mayor ya que inhibió el crecimiento de las tres bacterias en estudio en comparación con los resultados obtenidos por Almanza (2004), más amplio, el cual utilizó los extractos hexánico y diclorometánico de una planta del mismo género la especie *P. peltaum*, el cual inhibió el crecimiento sobre solo una bacteria *Bacillus subtilis* de seis evaluadas a una concentración de 10 y 100 µg/mL con ambos extractos (Almanza Pérez et al. 2004). Se han reportado diversas plantas pertenecientes a la familia Asteracea con actividad antimicrobiana como las referidas por Vega & López (2014) en los extractos hidroalcohólicos de *Baccharis genistelloides* (callua), *Jungia paniculata* (matico) y *Perezia multiflora* (escorzonera) inhibiendo a bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Bacillus subtilis* ATCC 11774.25. Y el extracto metanólico de *E. ciliatum*, no presentó actividad antimicrobiana en contra de ninguno de los microorganismos en estudio.

El cálculo dental es considerado como el biofilm dental mineralizado, el cual está relacionado con la progresión de la enfermedad periodontal, es un factor que predispone al desarrollo de una bolsa periodontal proporcionando así una superficie que facilita la adhesión de los microorganismos. El cálculo es muy variable en la composición química, cristalinidad y tamaño de los cristales (Hayashizaki J. et al. 2008). Frecuentemente en una muestra de cálculo se encuentran dos o más formas de cristales, la hidroxiapatita y el fosfato octacálcico de un 97 a 100% dentro de la composición del cálculo supragingival. La brushita es más frecuente en la región mandibular anterior y la whitlockita de magnesio, en las zonas posteriores. Aún y cuando hay pérdida de peso del cálculo dental después del tratamiento con los extractos metanólicos, sólo el extracto *P. decompositum* logra la disolución del cálculo dental en más del 39.84%, en la fig.9 se muestran los patrones de difracción de las muestras tratadas es evidente la aparición de picos de difracción, siendo estos los relacionados a la fase dahllita, la cual sugiere la “desmineralización” del cálculo dental, se puede apreciar cualitativamente una leve ausencia de la intensidad de la señal de la fase dahllita y esto puede ser debido a que esta fase corresponde a una forma poco cristalina de carbonato de calcio, fósforo, magnesio y sodio. Es relevante mencionar que la técnica de difracción por rayos X (XRD) permite visualizar las fases que al menos tengan el 1% en peso de sólidos totales, por tal motivo sólo se detectaron las fases Dahllita e Hidroxiapatita. Los resultados obtenidos son semejantes a los descritos por (Shu-Dong Jiang, et al., 2015). Así mismo estos resultados son importantes debido a que los agentes anticálculo en los años 50's fueron ideados para disolver y descalcificar los depósitos de cálculo dental y estos eran quelantes que lesionaban la estructura dental (cemento). El ricinoleato sódico, reducía los depósitos de cálculo, pero de sabor desagradable. En los 60's, los agentes empleados fueron antiséptico y antibióticos, enzimas y combinaciones de estos, componentes catiónicos de superficie activa y urea a altas concentraciones. Ninguno se mostró como definitivo para el control del cálculo. En los 70's, la estrategia anticálculo se basó en la inhibición del crecimiento de los cristales de HAP mediante pirofosfatos y sus análogos. Los estudios preliminares demostraron que en boca, era hidrolizado por pirofosfatasas bacterianas y reducía la formación de cálculo pero no a la gingivitis. (Mandel & Úaffar., 1986). Las sales de zinc fueron como agentes antiplaca y anticálculo. (Lobene, R. A. et al., 1987),

tanto el cloruro de zinc como el citrato de zinc (Ingram et al., 1992). La clorhexidina y el cloruro de bencetonio, han sido investigados como agentes antiplaca y antibacterianos, sin embargo, aun y cuando se utiliza de manera conjunta con un agente anticálculo de zinc, no son eficaces, pero los colutorios de clorhexidina, son magníficos agentes antiplaca y reductores de gingivitis y sangrado, no reducen al cálculo y tiñe las piezas dentales (Yates et al., 1993). En el estudio “Cambios clínicos producidos por una pasta dental con digluconato de clorhexidina y lactato de cinc en pacientes con gingivitis” llevado a cabo por Alonso y Plana (1995) los resultados indicaron que la cantidad de cálculo presente en los pacientes se mantuvo igual después de someterse al ensayo aún y cuando indican que las sales de zinc combinadas con la clorhexidina pueden disminuir la cantidad de él. Estos resultados coinciden con los resultados presentados por Curull y Arias (2001), donde hablan de los dentífricos, geles y colutorios. ¿Por qué y para qué? Revisión y actualización; en donde los componentes pirofosfatasas solubles, sales de zinc (cloruro de zinc y citrato de zinc) difosfonatos y la combinación con agentes antimicrobianos como el triclosan con un polímero (Lacer oros) o con citrato de zinc (Gingilacer), otro con fluoruro sódico, triclosán y un copolímero (Colgate total), además posee acción antigingivitis, anti-caries y anti-placa. El mecanismo de acción de estos compuestos se basa en: retención activa en saliva y placa, interferir en la fase de formación del cálculo y un efecto en la mineralización-eliminación de placa; reducen el cálculo supragingival pero su relevancia clínica todavía no ha sido probada. En el caso del extracto metanólico *S. parryi* no presentó la actividad de disolución del cálculo dental.

De las imágenes que se presentan en los resultados de la fig. 10 a la fig.15 se puede apreciar el cálculo dental con y sin tratamiento y a diferentes magnificaciones donde sobresalen la de 10,000 y 20,000 magnificaciones porque en ellas se puede observar claramente la presencia de una superficie porosa prevaleciendo una matriz desorganizada y al menos dentro de la literatura no se encontraron estudios semejantes al realizado en este trabajo, donde se estudie la superficie del cálculo dental después de ser sometido a un determinado tratamiento ya sea con algún colutorio, pasta o dentífrico dental.

En la citotoxicidad de los extractos metanólicos de *S. parryi* y *P. decompositum* indicaron que la viabilidad celular por la técnica de MTT manifestada en diferentes líneas celulares es reducida, en el caso de *P. decompositum* con las células VERO fue de 32,38% a una concentración de 120 µg/mL y con las células Detroit 551 fue de 20,82% a una concentración de 700 µg/mL y ésta fue mayor comparada con la viabilidad reflejada por el extracto metanólico *S. parryi* ya que con las células VERO fue de 17,25% a una concentración de 60 µg/mL y con las células Detroit 551 fue de 13,51 a una concentración de 500 µg/mL; el resultado presentado por *P. decompositum* difieren de los presentados en el estudio realizado por (García.G.V. et al., 2013) con el ácido cumárico obtenido del extracto acuoso de *P. decompositum* para tratar la línea celular HepG2 donde la viabilidad fue del 97% a una concentración de 5,2 µg/mL. En cuanto al extracto metanólico de *S. parryi* hay escasos reportes sobre su actividad biológica y con respecto a su toxicidad no existen reportes en la literatura sobre ello; lo más sobresaliente es lo que se mencionan sobre la familia *Caryophyllaceae* Juss a la cual pertenece la planta *S. parryi* y en la publicación sobre “Las plantas de extractos. Bases para un plan de desarrollo del sector” por la fundación Alonso Martín Escudero (Gómez y Villarino, 1995) en donde la planta *Saponaria officinalis*, es tóxica como consecuencia del contenido de saponinas por lo que no se debe sobrepasar de la dosis recomendada ya que puede producir por sobredosis o por hipersensibilización individual, irritación de mucosas digestivas y depresión con disminución de la actividad de los centros nerviosos respiratorios y cardíacos. Así como también en el libro de Toxic Plants of North América (Burrows y Tyrl, 2012) donde de la familia *Caryophyllaceae* Juss, se reconocen cuatro géneros *Agrostemma*, *Drymaria*, *Saponaria* y *Vaccaria* que pueden causar intoxicación debido a que contienen saponinas esteroides que son glucósidos de oleananos pentacíclicos, sin embargo algunas saponinas similares a las presentes en los géneros tóxicos conocidos también se encuentran en algunos otros géneros, por ejemplo, *Doanthis* y *Gypsophila* (Connolly y Hill 1991). Aunque las especies de estos taxones no han sido reportadas como tóxicas, pueden en circunstancias inusuales causar efectos adversos cuando se ingieren grandes cantidades de ellas, además, las proteínas

inactivadoras de ribosomas tipo 1 (RIPs) están presentes en algunos géneros (Gasperi-Campani *et al*, 1985).

Con respecto a los resultados obtenidos de la actividad antiinflamatoria el extracto metanólico *S. parryi* reprime de manera significativa con respecto al control la expresión de las citosinas IL-1 β , IL-6 ambas en las concentraciones que se probaron de 300, 400 y 500 $\mu\text{g/mL}$ y en la IL-8 solo en la concentración de 300 $\mu\text{g/mL}$, es relevante mencionar que no hay informes de esta actividad reportados en la literatura siendo estos los primeros de ellos. Y el extracto metanólico *P.decompositum* reprime de forma significativa con respecto al control (LPS) la expresión de las citosinas IL-1 β en las tres concentraciones que se probaron 400, 500 y 700 $\mu\text{g/mL}$ y en la IL-6, reprime la expresión sólo en la concentración de 400 $\mu\text{g/mL}$ y en la IL-8 reprime la expresión de en la concentración de 400 y 500 $\mu\text{g/mL}$. Aun y cuando hay pocos reportes sobre esta actividad en el estudio *in vivo* “Efecto de fructooligosacaridos aislados de *Psacalium decompositum* sobre el perfil inflamatorio de ratas obesas” donde probaron una fracción de carbohidratos tipo inulina (fructooligosacaridos) donde además de reducir significativamente el peso corporal de los especímenes de experimentación (ratas Wistar) generó cambios importantes en el perfil inflamatorio, afectando las concentraciones séricas de IL-6, IL-1 β , las cuales coinciden con las citosinas que se estudiaron en nuestra investigación, también las concentraciones séricas de IFN- γ , MCP-1, y VEGF se vieron afectadas. (Almanza et al., 2013). Así mismo en trabajo realizado para evaluar la Actividad antiinflamatoria de compuestos aislados de *Psacalium decompositum* en vivo e *in vitro* (macrófagos), mismas células en las cuales se realizó el presente estudio en el ensayo *in vivo* tanto el cacalol y el acetato de cacalol (sustancias aisladas de la raíz de *P. decompositum*) inhiben significativamente el desarrollo del edema auricular hasta en un 40% con respecto al control. Y los cultivos tratados con los compuestos disminuyeron significativamente las concentraciones de TNF- α , IL-6 e IL-1 β lo que se concluye con la reducción de la inflamación a través de la modulación de las citosinas inflamatorias; estas últimas citosinas coinciden con las evaluadas en nuestro estudio donde se disminuye también significativamente la expresión de ellas pero al tratarlas con todo el extracto metanólico de *P. decompositum* no solamente con un compuesto específico de la planta (Mora et al., 2016).

La formulación del gel a base de polímero (Carbopolol® 971P NF) donde el ingrediente activo es el extracto metanólico *P. decompositum* a una concentración de 400 µg/mL, el cual presenta actividad anticálculo, así como antimicrobiano contra *P. gingivalis*, *P. intermedia* y *S. mutans*, además de reducir la expresión de las citosinas inflamatorias IL-1β, IL-6 y IL-8, esto es debido a las propiedades fueron probadas *in vitro*, lo cual puede ser una alternativa en la que destaca la propiedad anticálculo, esto es debido a que en la literatura existen escasos reportes de formulaciones con estas cualidades o propiedades y solamente sobresale la propiedad antimicrobiana, antiplaca lo que coadyuva al tratamiento de la enfermedad periodontal en conjunto con la remoción mecánica realizada por el individuo que presenta enfermedad periodontal; tal es el caso del estudio donde se realizó la formulación de un gel a base de extracto de granada, siendo este efectivo para el control de placa. (Somu, CA et al., 2012). Sin embargo en España se presentó la patente con el número de solicitud: 8800251 “Una composición oral antibacteriana antiplacas y anticálculos, que contiene polifosfato”, en la que están incorporadas, en un vehículo oralmente aceptable, una cantidad anticálculo eficaz de un material que comprende al menos una sal de polifosfato deshidratado molecularmente, lineal, como agente anticálculo esencial, y una cantidad antiplaca eficaz de un agente antibacteriano no catiónico, sustancialmente insoluble en agua y esta composición es utilizable como dentífrico, enjuague o chicle. (Gaffar et al., 1989). Así como también en el 2005 se presentó otra patente con la formulación de “Oral anti-calculus compositions and methods of use thereof” con número de publicación: 20080031831; esta invención en particular se refiere a composiciones a base de aceite formuladas para su uso como productos de higiene oral, la invención proporciona nuevas composiciones orales antisarro que comprenden una mezcla de aceite vegetal sustancialmente anhidra y aditivos así como portadores oralmente aceptables, es una mezcla de aceite vegetal como constituyente principal y otro aceite en una proporción de al menos 10/1, respectivamente, en el que el constituyente principal de aceite comprende un aceite vegetal comestible y la constituyente de aceite menor comprende un aceite emulsionante, aromatizante, aceite antiséptico, aceite anti-inflamatorio, o una combinación de los mismos. El aceite principal comprende al aceite de girasol y el constituyente de aceite de menor comprende aceite de cítricos, aceite de menta, aceite de

romero, aceite de manzanilla, o aceite de clavo, o una combinación de los mismos, además aceite de eucalipto, aceite esencial de aguja de pino, zalby, o una combinación de los mismos. La composición oral anti-cálculo de la invención se puede convertir en diversidad de formulaciones orales incluyendo formulación seca, en gel, o una emulsión. Las formulaciones orales incluyen pasta de dientes, dentífrico de gel, polvo dental, enjuague bucal, enjuague bucal, endurecedor diente, composición antiplaca, goma o pastilla (Moein 2008). Ambas formulación tienen la misma intención de reducir la formación del cálculo dental más no de disolver el cálculo dental una vez presente en la superficie dental que es lo que el extracto metanólico *P. decompositum* lleva a cabo de acuerdo a los resultados obtenidos en los ensayos realizados *in vitro* por otra parte la formulación realizada en el presente estudio difiere en que no se ha probado en pacientes al igual que la patente generada en España con el número de solicitud: 8800251 y solamente la patente realizada en Estados Unidos con número de publicación: 20080031831, si fue probada en pacientes obteniendo resultados en la reducción de la formación de cálculo dental supragingival de hasta un 55%, sin embargo no especifica la dosis proporcionada para llevar a cabo dicha aplicación solamente menciona que la dosificación de las composiciones dependerá de un estado dental y/o enfermedad de las encías específico y otros factores clínicos tales como la edad, y física y el estado del humano o animal y la vía de administración de los compuestos o composiciones, es decir la dosis precisa a emplear de la formulación, debe ser recomendada de acuerdo al juicio del médico de atención dental y circunstancias de cada paciente.

9. CONCLUSIONES

- ❖ De los extractos metanólicos obtenidos de la raíz de *E. ciliatum*, *S. parryi* y *P. decompositum*, el que produjo mayor rendimiento fue *S. parryi* 19.45% y el de menor rendimiento fue el extracto de *P. decompositum* 8.1%.
- ❖ Se identificó la presencia de insaturaciones, taninos, carbohidratos, esteroides, triterpenos, cumarinas, en las tres plantas en estudio; además de saponinas y sesquiterpenlactonas en *P. decompositum* y quinonas en *S. parryi*.
- ❖ Los tres extractos metanólicos de *E. ciliatum*, *S. parryi* y *P. decompositum* mostraron actividad antibacteriana sobre los microorganismos evaluados, el de mayor actividad fue de *S. parryi*.
- ❖ El extracto metanólico de *P. decompositum* disolvió el cálculo dental en un 39%, ocasionando una superficie cristalina muy porosa y una matriz desorganizada observada por difracción de rayos X (DRX).
- ❖ La citotoxicidad de los extractos activos de *P. decompositum* y *S. parryi* sobre la línea célula normal VERO y la línea celular Detroit 551 (fibroblastos de piel), el más tóxico fue el de *S. parryi* en ambas líneas celulares; con una DL₅₀ de 77,30 µg/mL para *P. decompositum* y de 203,63 µg/mL para *S. parryi* sobre las células VERO y una DL₅₀ de 52,70 para *P. decompositum* y 150,58 para *S. parryi* sobre los fibroblastos de piel.
- ❖ La actividad antiinflamatoria de los extractos en estudio redujeron la expresión de las citocinas IL-1β, IL-6 y IL-8 a concentraciones de 300 µg/mL para *S. parryi* y 400 µg/mL para *P. decompositum*.

10. PERSPECTIVAS

Con los resultados obtenidos se puede determinar que el extracto metanólico *P. decompositum* puede ser una nueva alternativa como coadyuvante en el tratamiento de la enfermedad periodontal esto es debido a que presenta actividad relevante sobre *P. gingivalis* y *P.intermedia* con una CIM de 500 µg/mL y de 700 µg/mL sobre *S. mutans*, Sobresale la propiedad de disolver el cálculo dental (sarro dental) a una concentración de 400 µg/mL, además de presentar actividad antiinflamatoria en células monoclonales de sangre periférica (CMSP) debido a que logra de manera significativa reducir la expresión de las citosinas IL-1β, IL-6 y IL-8, y aún y cuando presenta una moderada citotoxicidad tanto en células normales VERO con una DL₅₀ de 77,30 µg/mL y en fibroblastos de piel con una DL₅₀ de 150,58 µg/mL; es necesario evaluar a diferentes periodos de tiempo, porque el tiempo de enjuague bucal es de 30 s (Parashar 2015) y así determinar si en este tiempo puede ser tóxico para la mucosa oral.

En cuanto al extracto metanólico *S. parryi* es relevante mencionar que existe poca información reportada sobre las propiedades o cualidades de esta planta sobresaliendo su actividad antimicrobiana contra microorganismos periodontopatógenos, además de presentar actividad antiinflamatoria sobre CMSP debido a que logra de manera significativa reducir la expresión de las citosinas IL-1β, IL-6 y IL-8; y al igual que *P. decompositum* debe evaluarse la citotoxicidad a diferentes periodos de tiempo sobre todo si la aplicación es en cavidad bucal.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Alarcón A FJ, Jiménez E M, Reyes CH R, Román R R. 2000. Hypoglycemic effect of extracts and fractions from *Psacalium decompositum* in healthy and alloxan-diabetic mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 72. pp.21–27.
2. Almanza P JC. (2004). Efecto de tres extractos orgánicos y dos acuosos de *Psacalium peltatum* sobre la proliferación in vitro de células hematopoyéticas y células humanas transformadas. Iztapalapa, México.
3. Almanza P JC, Merino A H, Rosiles A W, Jiménez E M, Magos G G, Román R R, Alarcón A FJ. 2013. Efecto de fructooligosacaridos aislados de *Psacalium decompositum* sobre el perfil inflamatorio de ratas obesas. El XXII Congreso de la Sociedad Italo Latinoamericana de Etnomedicina “Hernán Arguedas Soto”. Puntarenas, Costa Rica. Septiembre. pp.302-303.
4. Alonso M S & Plana N V. 1995. Cambios clínicos producidos por una pasta dental con digluconato de clorhexidina y lactato de cinc en pacientes con gingivitis. pp.1-168.
5. Andrews J M, (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*. Vol.48. Núm. 1. pp. 5-16.
6. Arencibia DF, Rosario LA, Curveco DL.2009. Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones su utilidad. *Revista de Toxicología en línea (RETEL)* 19:41-52.
7. Aslani A., Ghannadi A., & Najafi H. 2013. Design, formulation and evaluation of a mucoadhesive gel from *Quercus brantii* L. and *Coriandrum sativum* L. as periodontal drug delivery. *Advanced Biomedical Research*. Vol.2, No. 21. <http://doi.org/10.4103/2277-9175.108007>
8. Avalos G A & Pérez UC E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología) Serie Fisiología Vegetal* 2 (3):119-145
9. Azwanida NN. 2015.} A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*. Vol. 4: núm. 6. doi:10.4172/2167-0412.1000196

10. Bermúdez A, Oliveira MA and Velázquez D. 2005. La Investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: Una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *Interciencia* . 30(8):453-459.
11. Botero JE, Bedoya E. 2010. Determinantes del Diagnóstico Periodontal. *Rev. Clínica Periodoncia Implantología Rehabilitación Oral* Vol. 3(2). pp. 94-99.
12. Burrows E G, Tyrl J R. 2012. Chapter twenty-one: *Caryophyllaceae*. In: *Toxic Plants of North America*. Wiley-Blackwell.
13. Cabrera L. 1958. Plantas curativas de México: propiedades medicinales de las más conocidas plantas de México. Editores Unidos. México. pp. 147-151.
14. Calixto Cotos, M. R. 2006. Plantas medicinales utilizadas en odontología (Parte I). *Kiru*. 3(2):80-85.
15. Casillas I L, Dávalos K V, Hurtado M, Cruz A, Aguilar M A, Velasco-Lezama R, Alarcón F. 2006. Cyto and genotoxic evaluation of the aqueous extract from *Psacalium peltatum* (matarique) in human lymphocyte cultures. *Pharmacologyonline* 3: 449-453.
16. Carranza F. Newman M. 2004. Clasificación de enfermedades y lesiones que afectan el periodonto. En: *Periodontología Clínica*. McGraw-Hill Interamericana: México, pp. 66-70 (a).
17. Carranza F. Newman M. 2004. Microbiología periodontal. En: *Periodontología Clínica*. McGraw-Hill Interamericana: México, pp. 100-102 (b).
18. Carranza F. Newman M. 2004. Función del cálculo dental y otros factores predisponentes. En: *Periodontología Clínica*. McGraw-Hill Interamericana: México, pp. 194-197 (c).
19. Cirilo A. BG., Cantú M PC., Verde S MJ., Mata C B., 2011. Uso de la herbolaria en el cuidado de la salud. *Revista de Salud Pública y Nutrición*. Vol. 12 No. 2.

20. Connolly JD, Hill RA, (Hrsg.).1991Dictionary of Terpenoids, Vol. 1: Mono- and Sesquiterpenoids, Vol. 2: Di- and higher Terpenoids, Vol. 3: Indexes, Chapman & Hall, London, New York, Tokyo, Melbourne, Madras.
21. Curull G C, Arias F A. 2001. Dentífricos, geles y colutorios. ¿Por qué y para qué? Periodoncia. Vol. 11. Número 1. pp. 61-70.
22. Das K., Tiwari R KS., Shrivastava D K. (2010). Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. Journal of Medicinal Plants Research. Vol. 4. Núm. 2. pp. 104-111.
23. De Young LM., Kheifets JB., Ballaron SJ., Young JM. 1989. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separated and can be differentially modulated by pharmacologic agents. Agents Actions. Vol. 26. pp. 335-341.
24. Díaz AJ, Fonseca MA, Parra CE. 2011. Cálculo Dental una Revisión de Literatura y Presentación de una Condición Inusual. Acta Odontológica Venezolana 49 (3):1-11.
25. Dillard CJ, Bruce GJ, 2000. Phytochemical: nutraceuticals and human health. Journal of the Science of Food and Agriculture 80, 1756–1774.
26. English D, & Andersen B. R. (1974). Single-step separation of red blood cells, granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque. Journal of immunological methods, 5(3), 249-252.
27. Escudero N, Perea MA, Bascones A. 2008. Revisión de la periodontitis crónica: Evolución y su aplicación clínica. Avances en Periodoncia. 20(1):27-37.
28. Farías BC, Souza PRE. 2012. Occurrence of periodontal pathogens among patients with chronic periodontitis. Brazilian Journal Microbiology. 43 (3): 909-916.
29. Flores L, Gamarra N, Borda J. 2011. Bacteriological Agents Found In Dental Calculus from Patients Attending Univalle Hospital. Revista de Investigación e Información en Salud. 6(13): 7-15.

30. Franco LA., Ospina LF., Matiz GE., & Gaitan, R. 2007. Utilización del modelo de edema auricular inducido por tpa en la evaluación farmacológica de los cálices de *Physalis peruviana* L. Scientia et technica, vol.1.núm.33. pp.1-2.
31. Fontúrbel F, Achá D, Moncada DA. 2007. En Introducción a la botánica. Botánica de América Latina. Manual de Introducción a la Botánica. Publicaciones Integrales, La Paz. Bolivia. pp. 21-27.
32. Gaffar, A, Nabi N, Jannone B S. 1989. Una composición oral antibacteriana antiplacas y anticálculos, que contiene polifosfato. Registro de la propiedad Industrial. Número de solicitud: 8800251. España. pp. 1-17.
33. García V G, Vargas J X, Román R R, Hernández P E, 2013. Efecto hepatoprotector de *Psacalium decompositum* en células HEPG2. Revista Latinoamericana de Química. pp.93.
34. Garza E.M. 2009. Índice de enfermedad periodontal en adultos de 20 a 74 años en el estado de Nuevo León, México. Tesis Doctoral. Facultad de Odontología, Universidad de Granada.
35. Gasperi C A, Barbieri L, Batelli MG, Stripe F. 1985. On the distribution of Ribosome-inactivating proteins Amongst Plants. Journal of Natural Products. Vol.48. no. 3. pp. 446-454.
36. Genco RJ, Williams RC. 2011. En Presentación de la Enfermedad Periodontal: Causas, Patogénesis y Características. Enfermedad Periorontal y Salud General: Una Guía para el Clínico. Yardley, Pennsylvania USA. pp. 5-11.
37. Gómez E. HA., González R. KN., Domingo M. J. 2011. Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, Santiago, Chile vol. 10, núm. 3, pp. 182-217
38. Gómez O. D., Villarino V. T., 1999. LAS PLANTAS DE EXTRACTOS. BASES PARA UN PLAN DE DESARROLLO DEL SECTOR. “Trabajos de Investigación sobre Plantas Medicinales, Aromáticas y Condimentarias”. Parte segunda. pp.192.

39. Háuad ML. 2010 Manual de fitoterapia. 1ª.edición. Trillas. Nuevo León, México. 39-47pp.
40. Hayashizaki J, Ban S, Nakagaki H, Okumura A, Yoshii S, Robinson C. 2008. Site specific mineral composition and microstructure of human supra-gingival dental calculus. In Archives of Oral Biology. Vol. 53. Núm.2 pp. 168-174.
41. Ingram, G. S., Hora Y., C. P., Stead, W. J. Interaction of zinc with dental mineral. Caries Res. 1992; 26: 248-53.
42. Jiménez E M, Cruz R, Valdez J, León, J, Alarcón G, Svestarova B, 1992. Actividad antimicrobiana del cacalol y sus derivados. Revista Latinoamericana de Química 22, 14-17.
43. Jhonston. 1944. Plants of Coahuila, eastern Chihuahua, and adjoining Zacatecas and Durango, V1. Journal of the Arnold Arboretum Harvard University. 25: 133-182.
44. Jhonston I. 1940. New Phanerogams from Mexico. Journal of the Arnold Arboretum Harvard University. 21: 69-75.
45. Lang, A. L. (2003). Ecología Química. México: Plaza y Valdés, S. A. de C. V.
46. Liebana U. 2002. Microbiología Periodontal y Periimplantaria. En Microbiología Oral. McGraw-Hill Interamericana: México, pp. 578-579.
47. Life-Technologies. (2011). SYBR Green PCR Master Mix and SYBR Green RT-PCR Reagents Kit User Guide, 1-48. Retrieved from http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_041053.pdf%5Cnpapers3://publication/uuid/32687140-3E25-4A66-B58A-ED792D5D3C76
48. Loraine S., Mendoza E. JA., 2010. Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, vol. 41, núm. 4, Distrito Federal, México. pp. 18-27.
49. Lobene RR, Soparker PM, Newman M, Kohut BE.1987. Reduced formation of supragingival calculus with the use of fluoride-zinc chloride dentifrice. JADA 114:350-352.

50. Mandel L D, Úaffar A.1986. Calculus revisited a review. J. Clin. Periodontol. 13:249.
51. Medina CE, Maupomé G, Burgos L, Pérez R, Villafuerte B, Pontigo A. 2006. Políticas de salud bucal en México: Disminuir las principales enfermedades. Una descripción. Revista Biomédica.17:269-286.
52. Merino A H, Alarcón A, F, Jiménez E M. and Magos G G. 2015. Efecto *Psacalium decompositum* (A. GRAY) H. ROB. & BRET. en la prevención y desarrollo del Síndrome Metabólico inducido por fructosa en ratas. Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana.
53. Moein L. 2008. Oral anti-calculus compositions and methods of use thereof. Registro de la propiedad Industrial. Número de solicitud: 11 / 255.248. USA. pp. 1-11.
54. Morantes SJ, Páez A, Cordero CP, Rincón J, Aristizábal FA. 2006. Actividad Ciótoxica y Análisis Fitoquímico de Fracciones Aisladas del Extracto Etanólico total de *Acnistus arborescens*. Acta Farmacéutica Bonaerense. 25 (4):491-496.
55. Mora R B, Alarcón A FJ, Jiménez E M, Alvarado S JJ, Almanza P JC, 2016. Actividad antiinflamatoria de compuestos aislados de *Psacalium decompositum* en modelo de tpa y en macrófagos Raw.264.7. Revista Latinoamericana de Química. En: 12a Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales. Xalapa, Veracruz. pp. 126.
56. Negroni M. 2009. Microbiología de las enfermedades gingivoperiodontales. En Microbiología Estomatológica. Fundamentos y guía práctica. Panamericana: México, pp. 281-283.
57. Olivas MP. 1999. Plantas Medicinales de Chihuahua Volumen I. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Chihuahua, México. pp. 89.
58. OMSI Salud Bucodental. 2007: Salud Bucodental. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/es/index.html>.
59. Ovalle M A. (2015). Extractos de maqui Calafate inhiben mecanismos inflamatorios característicos de la obesidad, en un modelo in vitro de adipocitos y macrófagos humanos. Santiago, Chile. pp 15-23.

60. Palombo EA. 2011. Extractos Tradicionales de Plantas Medicinales y Productos Naturales con Actividad contra las Bacterias Orales: Posible Aplicación en la Prevención y Tratamiento de las Enfermedades Orales. Medicina complementaria y alternativa basada en la evidencia: <http://doi.org/10.1093/ecam/nep067>.
61. Parashar A. 2015. Mouthwashes and Their Use in Different Oral Conditions. Scholars Journal of Dental Sciences. Vol-2, Iss-2B. pp. 186-191.
62. Payá M., Ferrándiz ML, Sanz MJ, Bustos G., Blasco R., Rios JL, Alcaraz MJ., 1993. Study of the antioedema activity of some seaweed and sponge extracts from the mediterranean coast in mice. *Phytother. Res.* Vol.7, p.159-162.
63. Petrovska BB. 2012. Revisión histórica del uso de plantas medicinales. *Pharmacognosy Reviews.* 6 (11), 1-5. [Http://doi.org/10.4103/0973-7847.95849](http://doi.org/10.4103/0973-7847.95849).
64. Promega. (2014). ImProm-II TM Reverse Transcription System ImProm-II TM Reverse Transcription System. Retrieved from https://www.promega.es/products/pcr/rt-pcr/improm_ii-reverse-transcription-system/
65. Repetto M, Repetto K. 2009. Toxicología Fundamental. En Evaluación de la toxicidad y del riesgo. Toxicología Experimental. Díaz Santos Enpses Mercie Group. España. p.p. 404-427.
66. Revelar JL. 1973. Eriogonum (Polygonaceae) de Uta. *Phytologia.* 25: 169: 172.
67. Reyes J F., Palou E., López M A. 2014. Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos.* Vol. 1 núm. 8. pp. 68-78.
68. Rivera N ME, Almanza P JC, Pérez A C, Ruiz A C, Vega AE, Alarcón A FJ, 2004. Estudio fitoquímico preliminar de extractos y fracciones de origen vegetal con actividad hipoglucemiante. IX Simposio del Departamento de Ciencias de la Salud Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, p. 74.
69. Rivas M C., Oranday C MA., Verde S MJ. (2016). Metodología científica para el estudio de plantas medicinales. En: Investigación en plantas de importancia médica. *OmniaScience.* México. pp. 1-36 (a).

70. Rivas M C, Oranday C MA., Verde S MJ., García G. S., (2016). Actividad antimicrobiana. En: Investigación en plantas de importancia médica. OmniaScience Monographs. México. pp.77-88(b).
71. Rodríguez LM, 2015. Etnobotánica maya: Algunas plantas de uso medicinal en estomatología. Revista ADM 2015; 72 (1): 21-25.
72. Rodríguez S EN. 2011. Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. Ra Ximhai, vol. 7. núm. 1. pp. 153-170.
73. Rojas J J, García A M., López A J. 2005. Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. Vol. 4, núm. Santiago, Chile. pp. 28-32.
74. Rojo BN, Flores EA, Arcos CM. 2011. Prevalencia, severidad y extensión de periodontitis crónica. Revista Odontológica Mexicana. 15:31-39.
75. Segura S, Torres J. 2009. En Las Plantas y los Jardines en la Antigüedad. Historia de las Plantas en el mundo antiguo. Publicaciones de la Universidad de Degusto. España. pp. 23-25.
76. Sepúlveda J G, Rocha S M, Porta D H, 2003. La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. Revista Mexicana de Fitopatología. 355-363.
77. Shu-Dong J, Qi-Zhi Y, Yi-Fei M, Gen-Tao Z. Sheng-Quan F. 2015. Phosphate-dependent morphological evolution of hydroxyapatite and implication for biomineralisation. Gondwana Research. Volume 28, Issue 2. pp. 858-868.
78. Socransky SS. Haffajee AD. Cugini MA. Smith C. Kent RL. 1998. Microbial complexes in subgingival plaque. Journal of Clinica Periodontology. 25 (2):134-144.
79. Somu C A, Ravindra S, Ajith S, & Ahamed M G. 2012. Efficacy of a herbal extract gel in the treatment of gingivitis: A clinical study. Journal of Ayurveda and Integrative Medicine, 3(2), 85–90. <http://doi.org/10.4103/0975-9476.96525>
80. Sugishita E., Amagaya S., Ogihara Y. 1981. Anti-inflammatory testing methods: comparative evaluation of mice and rats. J. Pharmacobiodyn. 8:565–575.

81. Sukhdev S H., Suman P SK., Gennaro L., Dev D R. (2008). Maceration, Percolation and Infusion Techniques for the Extraction of Medicinal and Aromatic Plants. In: Extraction technologies for medicinal and aromatic plants, International centre for science and high technology. pp. 67-74.
82. Taylor JL S., Rabe T., McGaw LJ, Jäger AK., Van SJ. (2001). Towards the scientific validation of traditional medicinal plants. *Plant Growth Regul.* Vol.34. núm.1. pp. 23-37.
83. Valencia C. 1995. En constituyentes secundarios de las plantas. *Fundamentos de Fitoquímica.* Trillas. México. pp. 11-18.
84. Vega PE, López E. (2014). Concentración Mínima Inhibitoria del extracto hidroalcohólico de tallos y hojas de *Baccharis genistelloides*, *Perezia multiflora*, *Senecio sublutescens* y *Jungla paniculata* del Parque Nacional Huascarán (Perú) frente a cepas bacterianas de interés clínico. *REBIOLEST*, 43-49.
85. Villar L MV. 2001. *Manual de Fitoterapia.* Lima, Perú: Organización Panamericana de la Salud.
86. Villarreal ML., Cardoso T. A., Ortíz A., Sharma A., 2014. Biotecnología para producir Medicinas de plantas mexicanas. *Revista Digital Universitaria.* UNAM. Vol. 15. Núm. 8.
87. Villaseñor Rios, J. L., Ortíz E. y G. Segura, 2005. Catálogo taxonómico-geográfico de las Seneciona mexicanas. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biología. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. CE031. México D. F.
88. Weibe CB, Putrins EE. 2000. The periodontal disease classification system of the American Academy of Periodontology-an upadate. *Journal Asociacion Dental Canadiense.*66 (11): 594-597.
89. Yates R, Jenkins S, Newcombe R, Wade W, Moran J, & Addy M. 1993. A 6-month home usage trial of a 1% chlorhexidine toothpaste. *Journal of Clinical Periodontology*, 20(2), 130-138.

90. ZYMO RESEARCH, C. (2015). *Direct-zolTM RNA MicroPrep Catalog Nos. R2060, R2061, R2062, & R2063. INSTRUCTION MANUAL*. Retrieved from <http://www.zymoresearch.com/downloads/dl/file/id/693/R2060i.pdf>

12. RESUMEN BIOGRÁFICO

Patricia García Palencia

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Acentuación en

Química de Productos Naturales

Tesis: ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE TRES PLANTAS DEL NORESTE DE MÉXICO PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León el 14 de Septiembre de 1974, hija de Ramiro García Verastegui y Sara Alicia Palencia Rodríguez

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido como Cirujano Dentista en 1996. Maestro en Educación Odontológica en el 2002. Doctorado en Ciencias becado por CONACyT No. 557089 en 2013.

Experiencia Profesional: Maestro de Tiempo Completo de la Universidad Autónoma de Nuevo León desde 2004, de las unidades de aprendizaje Microbiología y Control de Infecciones y Seguridad Ocupacional.