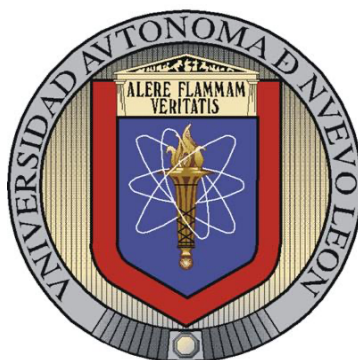


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES
COMO POTENCIAL ALTERNATIVA EN EL TRATAMIENTO
TERAPÉUTICO PULPAR

Por

SONIA MARTHA LÓPEZ VILLARREAL

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

2022

EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES
COMO POTENCIAL ALTERNATIVA EN EL TRATAMIENTO
TERAPÉUTICO PULPAR

Comité de Tesis

Dr. Abelardo Chávez Montes
Presidente

Dra. Rocío Castro Ríos
Secretario

Dr. José Ezequiel Viveros Valdez
Vocal

Dra. Azucena del Carmen González Horta.
Vocal

Dra. Catalina Leos Rivas
Vocal



Dra. Katiushka Arévalo Niño
Subdirectora de Posgrado

**DIRECCIÓN
DE POSGRADO**

EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES
COMO POTENCIAL ALTERNATIVA EN EL TRATAMIENTO
TERAPÉUTICO PULPAR

Dirección de Tesis



Dr. Abelardo Chávez Montes
Director de Tesis



Dra. Osvelia Esmeralda Rodríguez Luis
Codirector

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

Sin sueños, las pérdidas se vuelven insoportables,

Las piedras del camino se tornan montañas,

Los fracasos se transforman en golpes fatales.

Más, si tenemos grandes sueños...

Los errores producirán crecimiento,

Los desafíos producirán coraje.

Augusto Cury

AGRADECIMIENTOS

A Dios por la vida, la salud y tantas bendiciones.

Al Dr. Abelardo Chávez Montes por dirigir este proyecto, acompañarme en mi formación con su experiencia profesional y brindarme la oportunidad de realizar este proyecto en mi vida.

A la Dra. Osvelia Rodríguez Luis gracias por invitarme, asesorarme, y apoyarme. Mi admiración y respeto a su calidad como investigadora, profesional y su gran calidad humana, pero sobre todo por brindarme su amistad que no tengo como pagar.

A la Dra. Rocío Castro Ríos por su experiencia profesional por sus sugerencias, su disposición, su amabilidad y por su valiosa colaboración en el presente trabajo.

Al Dr. José Ezequiel Viveros Valdez por apoyarme y orientarme. Por el análisis y revisión de este trabajo. Gracias por todo.

A la Dra. Azucena del Carmen González Horta por su ejemplo, sus consejos, orientación y apoyo en cada seminario.

A la Dra. Catalina Leos Rivas por toda su orientación y ayuda incondicional en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Ricardo Martínez Pedraza, por su amistad, gracias por su tiempo, su disposición, y su valiosa colaboración en este proyecto, por su inteligencia y gran calidad humana, por tantas horas que pasamos en el microscopio.

Al Dr. Ramón Padilla Orozco, por su orientación, asesoría y amistad. Por las horas en el bioterio y guiarme y acompañarme en el proceso del modelo animal y ser el referente para el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Myriam De la Garza Ramos, por su amistad y por las facilidades otorgadas para realizar parte de este trabajo en el CIDICS Centro de Investigación y Desarrollo

en Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Nuevo León. A la Dra. Laura Villarreal García, por su amistad, orientación para seguir creciendo en el área de la investigación y apoyo constante. Por el honor de compartir muchos trabajos de investigación.

Al Dr. Gustavo Israel Martínez González por su amistad, mi más profunda gratitud por asesorarme guiarme y apoyarme durante todo el proyecto y por ser una persona de gran inteligencia y profesionalismo.

A la Dra. María Concepción Espinosa Rivera mi amiga que tanto admiro con quien comparto profesión, sueños y proyectos. Gracias por estar siempre.

A todas y cada una de las personas que contribuyeron con su tiempo a enriquecer este proyecto, porque sin duda, cada uno de ustedes deja aprendizajes valiosos en mi persona, de corazón mil gracias.

DEDICATORIA

A mis padres porque todo lo que soy y siento es gracias a ellos,
su amor, su formación.

A mi esposo por su comprensión y ayuda.

A mis queridos hijos Arturo, Lucía y Andrés por ser lo más importante en mi vida,
por apoyarme siempre, los amo y me siento muy orgullosa de ustedes.

Con todo mi amor

ÍNDICE

Sección	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Dentición temporal y permanente	3
2.2. Caries	4
2.3. Terapia Pulpar	5
2.3.1. Recubrimiento pulpar indirecto	6
2.3.2. Pulpotomía	6
2.3.3. Indicaciones y contraindicaciones de la pulpotomía	8
2.3.4. Criterios de éxito o fracaso del tratamiento	8
2.3.5. Procedimiento convencional del tratamiento de pulpotomía	8
2.3.6. Pulpectomía	9
2.4. Alternativas de medicamentos utilizados en la pulpotomía	10
2.4.1. Formocresol	10
2.4.2. Toxicidad del formocresol	10
2.4.3. Glutaraldehído	11
2.4.4. Sulfato férrico	12
2.4.5. Agente trióxido agregado MTA	12
2.4.6. Hidróxido de calcio	13
2.5. Plantas medicinales	13
2.5.1. Medicina alternativa	14
2.5.2. Productos naturales y herbolaria	14
2.5.3. <i>Mimosa tenuiflora</i> (Tepezcohuite)	15
2.5.4. <i>Equisetum arvense</i> (Cola de caballo)	17
2.5.5. <i>Syzygium aromaticum</i> (Clavo)	18
2.5.6. <i>Lippia graveolens</i> (Orégano)	19

2.5.7. <i>Aloe vera</i> (Sábila)	21
2.6. Técnicas de extracción	22
2.6.1. Extracción soxhlet	22
2.7. Pruebas fitoquímicas	23
2.8. Pruebas de actividad antimicrobiana y microorganismos evaluados	23
2.8.1. Bacterias de interés odontológico	24
2.8.2. <i>Streptococcus mutans</i>	24
2.8.3. <i>Streptococcus sobrinus</i>	26
2.9. Actividad coagulante de las plantas sobre la pulpa dental y sus células	27
2.9.1. Pruebas de coagulación	27
2.9.2. Características de la pulpa dental	28
2.9.3. Fibroblastos	30
2.10. Ensayo FMCA (Fluorometric microculture cytotoxicity assay)	30
2.11. Expresión de Citocinas en células	31
2.11.1. TNF alfa	31
2.11.2. Interleucina IL-1 β	32
2.11.3. Interleucina IL-10	32
2.12. Modelo animal murino	33
3. JUSTIFICACIÓN	34
4. HIPÓTESIS	35
5. OBJETIVOS	35
5.1. Objetivo general	35
5.2. Objetivos específicos	35
6. MATERIAL Y MÉTODOS	37
6.1. Obtención y preparación del material vegetal y el extracto	37
6.2. Análisis fitoquímico	40
6.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos	40

6.3.1. Evaluación de la actividad antimicrobiana de la formulación	42
6.4. Evaluación de la actividad coagulante de los extractos	43
6.4.1. Obtención de la muestra biológica	43
6.4.2. Evaluación del efecto anticoagulante in vitro	44
6.5. Evaluación de la actividad citotóxica mediante ensayo FMCA	44
6.6. Evaluación y expresión de citocinas en fibroblastos gingivales	46
6.6.1. Preparación del stock	47
6.7. Evaluación en modelo animal	47
6.7.1. Grupos de estudio para el ensayo en el modelo animal	48
6.8. Análisis estadístico	53
7. RESULTADOS	54
7.1. Obtención y rendimiento de los extractos	54
7.2. Pruebas fitoquímicas	55
7.3. Actividad antimicrobiana de los extractos	56
7.3.1. Actividad antimicrobiana de la formulación	66
7.3.2. Pruebas viabilidad celular mediante MTT	76
7.4. Pruebas de coagulación	88
7.5. Pruebas de citotoxicidad	89
7.6. Pruebas de citocinas	91
7.7. Resultados histológicos en el modelo animal	97
8. DISCUSIÓN	107
9. CONCLUSIONES	116
10. PERSPECTIVAS	117
11. BIBLIOGRAFÍA	118

ÍNDICE DE TABLAS

Tablas		Página
2.1	Valores normales de las pruebas de coagulación.	28
6.1	Género, especie, nombre común, aplicación y compuestos químicos presentes en las diferentes plantas.	38
6.2	Plantas y parte utilizada.	39
6.3	Diferentes pruebas fitoquímicas. La primera columna muestra el nombre de la prueba realizada, la siguiente corresponde al compuesto a identificar.	40
6.4	Preparación de tres stocks para la medición de citocinas.	47
6.5	Diseño para la colocación de los extractos en los pozos para probar las diferentes concentraciones.	47
6.6	Criterios para la evaluación histológica.	53
7.1	Identificación química de grupos funcionales presentes en los extractos de <i>M. tenuiflora</i> , <i>E. arvense</i> , <i>S. aromaticum</i> , <i>L. graveolens</i> , y <i>A. vera</i> .	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
2.1	Fotomicrografías de gérmenes dentales en desarrollo.	3
2.2	Dentición primaria y permanente.	3
2.3	Caries de la infancia temprana.	5
2.4	Esquema que muestra el tratamiento de pulpotomía.	7
2.5	Fotografía clínica de la eliminación de la pulpa cameral.	7
2.6	Árbol de <i>M. tenuiflora</i> .	16
2.7	Corteza y polvo de <i>M. tenuiflora</i> .	16
2.8	Ramas y partes aéreas de <i>E. arvense</i> .	18
2.9	Hojas en forma de vaina de <i>E. arvense</i> .	18
2.10	Árbol de clavo de olor (<i>S. aromaticum</i>).	19
2.11	Orégano mexicano (<i>L. graveolens</i>) planta (a) y molido (b).	20
2.12	<i>A. vera</i> .	21
2.13	<i>S. mutans</i> visto al microscopio.	25
2.14	<i>S. sobrinus</i> visto al microscopio.	26
2.15	Tejidos que conforman al diente.	29
2.16	Cultivo de fibroblastos.	30
6.1	Proceso que muestra la obtención de los extractos y el liofilizado de <i>A. vera</i> .	39
6.2	Técnica de pozo en agar.	41
6.3	Proceso para evaluar la actividad antimicrobiana.	42
6.4	Proceso para evaluar viabilidad celular.	43
6.5	Proceso para evaluar la actividad coagulante.	44
6.6	Esquema que muestra el ensayo FMCA (Fluorometric microculture cytotoxicity assay).	45
6.7	Ensayo FMCA (Fluorometric microculture cytotoxicity assay) para evaluar los extractos de <i>M. tenuiflora</i> , <i>E. arvense</i> , <i>S. aromaticum</i> , <i>L. graveolens</i> , y <i>A. vera</i> .	46
6.8	Elección y transporte del modelo animal.	48

6.9	Distribución de grupos en el modelo animal.	49
6.10	Proceso de ensayo en modelo animal.	50
6.11	Tratamiento del espécimen en la cámara de seguridad.	51
6.12	Muñones pulpares posterior al tratamiento con formulación (a) y formocresol (b).	51
6.13	Proceso de sacrificio, obtención de mandíbula y colocación en formol al 10%.	52
6.14	Proceso que muestra la descalcificación de la mandíbula para procesar mediante la técnica histológica.	53
7.1	Especimen control en donde se observa tejido pulpar sano.	99
7.2	Ratas tratadas con formocresol para realizar observación a los 3 días (72 horas).	100
7.3	Ratas tratadas con la formulación de los extractos para realizar observación a los 3 días (72 horas).	101
7.4	Ratas tratadas con formocresol para realizar observación a los 8 días.	101
7.5	Ratas tratadas con extractos para realizar observación a los 8 días.	102
7.6	Especimen tratado con extractos para realizar observación a los 8 días. Se observa la zona odontoblástica definida.	102
7.7	Ratas tratadas con formocresol para realizar observación a los 15 días.	103
7.8	Ratas tratadas con extractos para realizar observación a los 15 días.	103
7.9	Corte histológico teñido con hematoxilina y eosina observado al microscopio a 10x y 40x que muestra los dientes tratados con formocresol y con la formulación de extractos a las 72 horas.	104
7.10	Corte histológico teñido con hematoxilina y eosina observado al microscopio a 40x que muestra los dientes tratados con formocresol y con la formulación a los 8 días.	104

7.11	Corte histológico teñido con hematoxilina y eosina observado al microscopio a 10x y 40x que muestra los dientes tratados con formocresol y con la formulación a los 15 días.	105
7.12	Corte histológico teñido con hematoxilina y eosina observado al microscopio a 10x y 40x que muestra los dientes tratados con formocresol y observados a los 3 (a), 8 (b) y 15 (c) días y con la formulación a los a los 3 (a), 8 (b) y 15 (c) días.	115

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráficos		Página
7.1	Porcentaje de rendimiento en peso seco de cada planta.	55
7.2	Actividad antimicrobiana de los extractos de las plantas de <i>M. tenuiflora</i> , <i>E. arvense</i> , <i>S. aromaticum</i> , <i>L. graveolens</i> , y <i>A. vera</i> sobre cepas de <i>S. mutans</i> . Concentración 3000 ppm.	57
7.3	Actividad antimicrobiana de los extractos de las plantas de <i>M. tenuiflora</i> , <i>E. arvense</i> , <i>S. aromaticum</i> , <i>L. graveolens</i> , y <i>A. vera</i> sobre cepas de <i>S. mutans</i> . Concentración 2000 ppm.	58
7.4	Actividad antimicrobiana de los extractos de las plantas de <i>M. tenuiflora</i> , <i>E. arvense</i> , <i>S. aromaticum</i> , <i>L. graveolens</i> , y <i>A. vera</i> sobre cepas de <i>S. mutans</i> . Concentración 1000 ppm.	59
7.5	Actividad antimicrobiana de los extractos de las plantas de <i>M. tenuiflora</i> , <i>E. arvense</i> , <i>S. aromaticum</i> , <i>L. graveolens</i> , y <i>A. vera</i> sobre cepas de <i>S. mutans</i> . Concentración 500 ppm.	60
7.6	Actividad antimicrobiana de los extractos de las plantas de <i>M. tenuiflora</i> , <i>E. arvense</i> , <i>S. aromaticum</i> , <i>L. graveolens</i> , y <i>A. vera</i> sobre cepas de <i>S. mutans</i> . Concentración 250 ppm.	61
7.7	Actividad antimicrobiana de los extractos de las plantas de <i>M. tenuiflora</i> , <i>E. arvense</i> , <i>S. aromaticum</i> , <i>L. graveolens</i> , y <i>A. vera</i> sobre cepas de <i>S. sobrinus</i> . 3000 ppm.	62
7.8	Actividad antimicrobiana de los extractos de las plantas de <i>M. tenuiflora</i> , <i>E. arvense</i> , <i>S. aromaticum</i> , <i>L. graveolens</i> , y <i>A. vera</i> sobre cepas de <i>S. sobrinus</i> . 2000 ppm.	63
7.9	Actividad antimicrobiana de los extractos de las plantas de <i>M. tenuiflora</i> , <i>E. arvense</i> , <i>S. aromaticum</i> , <i>L. graveolens</i> , y <i>A. vera</i> sobre cepas de <i>S. sobrinus</i> . 1000 ppm.	64
7.10	Actividad antimicrobiana de los extractos de las plantas de <i>M. tenuiflora</i> , <i>E. arvense</i> , <i>S. aromaticum</i> , <i>L. graveolens</i> , y <i>A. vera</i> sobre cepas de <i>S. sobrinus</i> . 500 ppm.	65
7.11	Actividad antimicrobiana de los extractos de las plantas de <i>M. tenuiflora</i> , <i>E. arvense</i> , <i>S. aromaticum</i> , <i>L. graveolens</i> , y <i>A. vera</i> sobre cepas de <i>S. sobrinus</i> . 250 ppm.	66
7.12	Porcentaje del efecto de inhibición sobre cepas de <i>S. mutans</i> y <i>S. sobrinus</i> de la formulación.	67
7.13	Actividad antimicrobiana de diferentes combinaciones de los extractos de las plantas sobre cepas de <i>S. mutans</i> . Concentración 1000 ppm.	68

7.14	Actividad antimicrobiana de diferentes combinaciones de los extractos de las plantas sobre cepas de <i>S. mutans</i> . Concentración 500 ppm.	69
7.15	Actividad antimicrobiana de diferentes combinaciones de los extractos de las plantas sobre cepas de <i>S. mutans</i> . Concentración 250 ppm.	70
7.16	Actividad antimicrobiana de diferentes combinaciones de los extractos de las plantas sobre cepas de <i>S. mutans</i> . Concentración 125 ppm.	71
7.17	Actividad antimicrobiana de diferentes combinaciones de los extractos de las plantas sobre cepas de <i>S. sobrinus</i> . Concentración 1000 ppm.	72
7.18	Actividad antimicrobiana de diferentes combinaciones de los extractos de las plantas sobre cepas de <i>S. sobrinus</i> . Concentración 500 ppm.	73
7.19	Actividad antimicrobiana de diferentes combinaciones de los extractos de las plantas sobre cepas de <i>S. sobrinus</i> . Concentración 250 ppm.	74
7.20	Actividad antimicrobiana de diferentes combinaciones de los extractos de las plantas sobre cepas de <i>S. sobrinus</i> . Concentración 125 ppm.	75
7.21	Efecto de <i>S. aromaticum</i> en la viabilidad celular sobre cepas de <i>S. mutans</i> .	76
7.22	Efecto de <i>M. tenuiflora</i> , <i>E. arvense</i> , <i>A. vera</i> y <i>S. aromaticum</i> en la viabilidad celular sobre cepas de <i>S. mutans</i> .	77
7.23	Evaluación de viabilidad celular de los extractos de <i>M. tenuiflora</i> , <i>E. arvense</i> y <i>A. vera</i> sobre cepas de <i>S. mutans</i> .	78
7.24	Evaluación de viabilidad celular del extracto de <i>L. graveolens</i> sobre cepas de <i>S. mutans</i>	79
7.25	Evaluación in vitro de la viabilidad celular de los extractos de <i>M. tenuiflora</i> , <i>E. arvense</i> , <i>A. vera</i> y <i>L. graveolens</i> sobre cepas de <i>S. mutans</i> .	80
7.26	Evaluación in vitro de la viabilidad celular de los extractos de <i>M. tenuiflora</i> , <i>E. arvense</i> , <i>A. vera</i> , <i>S. aromaticum</i> y <i>L. graveolens</i> sobre cepas de <i>S. mutans</i>	81
7.27	Evaluación in vitro de la viabilidad celular del extracto de <i>S. aromaticum</i> sobre cepas de <i>S. sobrinus</i> .	82
7.28	Evaluación in vitro de la viabilidad celular de los extractos de <i>M. tenuiflora</i> , <i>E. arvense</i> , <i>A. vera</i> y <i>S. aromaticum</i> contra <i>S. sobrinus</i> .	83

7.29	Evaluación in vitro de la viabilidad celular de los extractos de <i>M. tenuiflora</i> , <i>E. arvense</i> y <i>A. vera</i> contra <i>S. sobrinus</i> .	84
7.30	Evaluación in vitro de la viabilidad celular del extracto de <i>L. graveolens</i> contra <i>S. sobrinus</i> .	85
7.31	Evaluación in vitro de la viabilidad celular de los extractos de <i>M. tenuiflora</i> , <i>E. arvense</i> , <i>A. vera</i> y <i>L. graveolens</i> contra <i>S. sobrinus</i> .	86
7.32	Evaluación in vitro de la viabilidad celular de los extractos de <i>M. tenuiflora</i> , <i>E. arvense</i> , <i>A. vera</i> , <i>S. aromaticum</i> y <i>L. graveolens</i> contra <i>S. sobrinus</i> .	87
7.33	Evaluación in vitro del tiempo de protombina (TP) de los extractos de <i>M. tenuiflora</i> , <i>E. arvense</i> , <i>A. vera</i> , <i>S. aromaticum</i> y <i>L. graveolens</i> .	88
7.34	Evaluación in vitro del tiempo de tromboplastina parcial activada (TPPA) de los extractos de <i>M. tenuiflora</i> , <i>E. arvense</i> , <i>A. vera</i> , <i>S. aromaticum</i> y <i>L. graveolens</i> .	89
7.35	Ensayo Fluorometric microculture cytotoxicity assay (FMCA) que muestra la viabilidad celular en porciento de los extractos de <i>M. tenuiflora</i> , <i>E. arvense</i> , <i>A. vera</i> , <i>S. aromaticum</i> y <i>L. graveolens</i> aplicados a la línea celular de fibroblastos gingivales humanos.	90
7.36	Cuantificación de citocinas mediante ELISA en sobrenadantes de cultivos de fibroblastos gingivales humanos estimulados con el extracto de <i>M. tenuiflora</i> . Se probaron TNF alfa, IL-1 β IL-10.al tiempo inicial, 24, 48 y 72 horas.	92
7.37	Cuantificación de citocinas mediante ELISA en sobrenadantes de cultivos de fibroblastos gingivales humanos estimulados con el extracto de <i>E. arvene</i> . Se probaron TNF alfa, IL-1 β IL-10.al tiempo inicial, 24, 48 y 72 horas.	93
7.38	Cuantificación de citocinas mediante ELISA en sobrenadantes de cultivos de fibroblastos gingivales humanos estimulados con el extracto de <i>S. aromaticum</i> .. Se probaron TNF alfa, IL-1 β IL-10.al tiempo inicial, 24, 48 y 72 horas.	94
7.39	Cuantificación de citocinas mediante ELISA en sobrenadantes de cultivos de fibroblastos gingivales humanos estimulados con el extracto de <i>L. graveolens</i> .. Se probaron TNF alfa, IL-1 β IL-10.al tiempo inicial, 24, 48 y 72 horas.	95
7.40	Cuantificación de citocinas mediante ELISA en sobrenadantes de cultivos de fibroblastos gingivales humanos estimulados con el extracto de <i>A. vera</i> . Se probaron TNF alfa, IL-1 β IL-10.al tiempo inicial, 24, 48 y 72 horas.	96

7.41	Respuesta histológica de la pulpa dental tratada con formocresol a las 72 horas, 8 y 15 días.	98
7.42	Respuesta histológica de la pulpa dental tratada con los extractos de la formulación a las 72 horas, 8 y 15 días.	99

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

MH	Agar Muller Hinton
ATCC	American Type Culture Collection
<i>Mt</i>	<i>Mimosa tenuiflora</i>
<i>Ea</i>	<i>Equisetum arvense</i>
<i>Sa</i>	<i>Syzygium aromaticum</i>
<i>Lg</i>	<i>Lippia graveolens</i>
<i>Av</i>	<i>Aloe vera</i>
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CMB	Concentración Mínima Bactericida
<i>Sm</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>Ss</i>	<i>Streptococcus sobrinus</i>
h	Hora
µL	Microlitro
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mm	Milímetro
cm	Centímetro
µg	Microgramo
pg	Picogramos
ppm	Partes por millón
Seg	Segundos
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
conc	Concentración
°C	Grado centígrado
Nm	Nanómetro
%	Por ciento
Abs	Absorbancia
Cel	Células
Cm	Centímetros
DMSO	Dimetilsulfóxido, CH ₃ SOCH ₃
msc	Células madre mesenquimales
g	Gramos
h	Horas
EtOH	Etanol
min	Minutos
nn	Nanómetros
TP	Tiempo de protrombina
TTPA	Tiempo de tromboplastina parcial activado
TNF-a	Factor de necrosis tumoral
IL-10	Interleucina 10
IL-1beta	Interleucina 1 beta

RESUMEN

La caries dental es una enfermedad de origen multifactorial que afecta entre el 60% y 90% de la población escolar causando la pérdida prematura de los dientes infantiles y provocando problemas funcionales, estéticos, psicológicos y sociales al niño, interfiriendo con el patrón de erupción de los dientes permanentes y con el crecimiento y desarrollo de los maxilares. La pulpotomía es el tratamiento más común y consiste en eliminar la pulpa cameral afectada y preservar la radicular con el fin de conservar el diente. Para realizar este tratamiento se emplean diferentes sustancias químicas, con distintas propiedades, pero existe controversia en cuanto a su uso ya que no existe un agente que reúna todas propiedades indispensables en cuanto a efectividad y seguridad para tratarlos. El objetivo de este trabajo fue realizar la evaluación y caracterización de extractos vegetales de *Mimosa tenuiflora*, *Equisetum arvense*, *Syzygium aromaticum*, *Lippia graveolens* y *Aloe vera* como potencial alternativa en el tratamiento terapéutico pulpar, comparando la efectividad de los extractos con el formocresol, una de las sustancias empleada actualmente en el tratamiento de las pulpotomías. Los resultados de las diferentes pruebas muestran que los extractos presentan efecto antimicrobiano, no alteran los tiempos de coagulación y en el modelo animal se observa una diferencia significativa ya que mantiene la vitalidad pulpar, observándose regeneración celular al microscopio mientras que el formocresol produce necrosis en el 100% de las piezas tratadas.

ABSTRACT

Dental caries is a disease of multifactorial origin that affects between 60% and 90% of the juvenile population, causing premature loss of infant teeth, which causes problems in functional, aesthetic, psychological and social aspects, interfering with the child's eruption pattern of permanent teeth and the growth and development of the jaws. Pulpotomy is the most common treatment and consists of removing the affected pulp and preserving the root in order to preserve the tooth. To carry out this treatment, different chemical substances are used with different properties, but there is controversy regarding the use of these since there is no agent that gathers all the essential properties in terms of effectiveness and safety. The purpose of this is to carry out the evaluation and characterization of plant extracts of *Mimosa tenuiflora*, *Equisetum arvense*, *Syzygium aromaticum*, *Lippia graveolens* and *Aloe vera* as a potential alternative in the pulps therapeutic treatment, comparing the effectiveness of the extracts with formocresol, one of the substances currently used in the treatment of pulpotomies. The results of the different tests show that the formulation has an antimicrobial effect, this does not alter coagulation times. In the animal model a significant difference is observed between the formulation that maintains pulp vitality, observing a regeneration of cells on the microscope while the formocresol proceeds with necrosis in a 100% of the parts treated.

1. INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la caries dental, es la enfermedad bucal con mayor prevalencia. Afecta entre el 60% y 90% de la población infantil. Las alteraciones que se llevan a cabo durante esta etapa tienen efectos en el desarrollo de la dentición permanente. La pérdida prematura de los dientes temporales provoca serios problemas tales como: maloclusiones, pérdida del perímetro del arco dental, inclinación de piezas, disminución de la dimensión vertical cuando se trata de molares, mordida cerrada en caso de incisivos, pérdida de estética, trastornos psicológicos, problemas del lenguaje, defectos en el habla, problemas de nutrición, efectos sociales y desarrollo de malos hábitos como lengua protráctil, entre otros (Boj, 2007). Por lo tanto, preservar un diente primario resulta muy importante. La pulpa se puede exponer debido a caries o trauma y se corre el riesgo de infectarla con bacterias que causan dolor, en estos casos el tratamiento ideal es la pulpotomía (Ranly, 2000).

El objetivo de realizar el tratamiento de pulpotomía en los dientes temporales es tratar de conservar el diente hasta la exfoliación natural y permitir la erupción del sucesor permanente en los tiempos correctos y sin alteraciones de erupción y espacio. El tratamiento de pulpotomía consiste en la eliminación de la pulpa localizada en la corona o pulpa coronal, la colocación de medicamento en la entrada de los conductos radiculares para conservar la pulpa radicular y la restauración permanente final que tradicionalmente es una corona de acero (Fuks, 2002). El material o sustancia colocado en contacto con la pulpa radicular debe reunir como condiciones ideales ser bactericida, inofensivo para la pulpa y los tejidos circundantes, que promueva la conservación y reparación de la pulpa radicular y no debe interferir con el proceso fisiológico de la reabsorción de la raíz en el recambio de la dentición primaria por la permanente (Fuks, 2002). En la historia del tratamiento de pulpotomía, están los medicamentos que en diferentes épocas han sido o han presentado efectividad clínica, uno de los mas empleados es el formocresol.

Buckley utilizó por primera vez formocresol hace muchos años y posteriormente Sweet en 1920 lo usó en tratamientos de dientes vitales temporales y llamó a este tratamiento pulpotomía medicamentosa. El tratamiento consiste en fijar la pulpa radicular mediante el formocresol, el cual es un agente cuyas propiedades bacteriostáticas y coagulantes permiten

su empleo; y aunque ha sido de elección desde hace décadas se le ha asociado a la desvitalización pulpar. Por otro lado, se ha comprobado que tiene efectos tóxicos, y se le ha considerado como potencial carcinogénico, presentado además citotoxicidad, mutagenicidad, así como efectos embriotóxicos y teratogénicos (Peng, 2007).

Durán (2008) menciona que el formocresol ha sido utilizado a lo largo de los años en el área de la odontología y que a pesar de que no presenta propiedades curativas ha demostrado ser una alternativa clínica. Está comprobado que presenta toxicidad celular y en estudios en humanos demostró causar inflamación y necrosis de la pulpa en casi el 50% de los casos. Por lo tanto, este proyecto pretende indagar en el reino vegetal mediante la evaluación de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *S. aromaticum*, *L. graveolens*, y *A. vera* ya que por sus propiedades reportadas como antibacterianos, cicatrizantes, analgésicos, antiinflamatorios y favorecedores de la reparación tisular entre otras, representan una alternativa potencial en el tratamiento terapéutico pulpar.

2. ANTECEDENTES

2.1. Dentición temporal y permanente

Existen dos denticiones, los dientes primarios, temporales, infantiles o también llamados “de leche” y los dientes permanentes secundarios, definitivos o sucedáneos. Los dientes infantiles comienzan su desarrollo en el feto de seis semanas y posteriormente al nacimiento erupcionan alrededor de los seis meses (Figura 2.1).

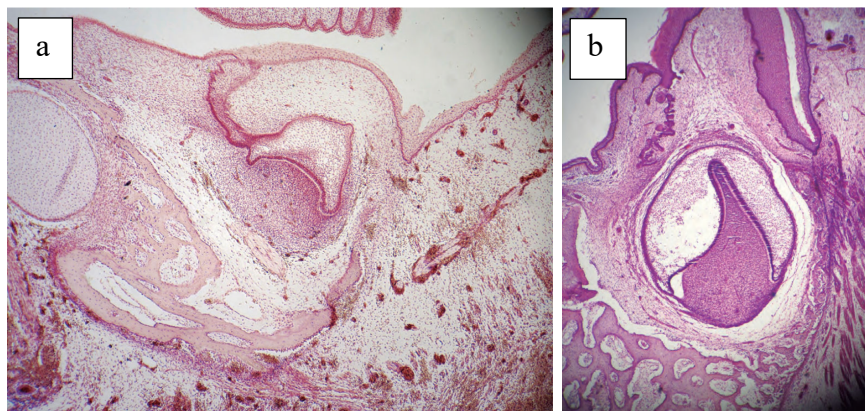


Figura 2.1. Fotomicrografías de gérmenes dentales en etapa de casquete (a) y campana (b). Tinción hematoxilina y eosina. Aumento 10x (López *et al.*, 2014).

La dentición primaria es igual de importante que la dentición permanente (Boj *et al.*, 2007). Los niños tienen 20 dientes en su dentición primaria que se completa alrededor de los dos a tres años y cada diente tiene su tiempo propio de erupción, además es normal que pueda variar por algunos meses (Figura 2.2). Es muy importante que se cumpla una secuencia de erupción correcta y que los dientes alcancen una posición correcta para que el niño pueda tener un buen desarrollo de su cara (Dean *et al.*, 2014).



Figura 2.2. Dentición primaria y permanente (Boj, Catalá, 2007).

2.2. Caries

La Organización Mundial de la Salud (2020) ha definido la caries dental como un proceso localizado de origen multifactorial que comienza cuando erupcionan los dientes, que puede llegar a reblandecer a los tejidos duros de los dientes y que al avanzar puede ocasionar una cavidad. Por años se ha considerado a la caries dental como una enfermedad multifactorial, además como el padecimiento de mayor prevalencia y costo en el mundo. Durante muchos años, se pensó que la caries era inevitable y que siempre se trataba con la remoción del tejido afectado para colocar restauraciones que por lo general, eran metálicas. En la actualidad el concepto ha cambiado ya que las lesiones de caries iniciales pueden revertirse o incluso detenerse. Una alternativa muy eficaz es el uso de los fluoruros y otras tecnologías modernas, sin embargo cuando la caries es profunda o ya alcanzó al tejido pulpar debe realizarse un tratamiento más invasivo. La boca contiene la segunda comunidad microbiana más diversa del cuerpo (después del intestino), con más de 700 especies de bacterias. Es muy importante mantener el equilibrio porque cuando se rompe el lábil equilibrio del ecosistema oral, se produce una disbiosis (Kilian *et al.*, 2016). La colonización bacteriana se inicia en el nacimiento. Algunas formas en las que los niños adquieren la microbiota pueden ser al nacimiento durante el parto y la lactancia que puede ser materna o fórmula y que están relacionadas a la microbiota oral y sistémica (Lif Holgerson *et al.*, 2011). La colonización de bacterias tipo lactobacilos en la boca de los bebés está más relacionada a la lactancia materna que a los productos de fórmula, además cuando erupcionan los dientes infantiles y durante el recambio de la dentición primaria por permanente se contribuye a tener más superficies para las bacterias y a modificar la flora oral (Holgerson *et al.*, 2013). De acuerdo con Zemaitiene (2016) la salud bucodental es fundamental para gozar de buena salud en general y una buena calidad de vida, para ello es importante encontrarse exentos de caries, pérdida de dientes y otras enfermedades que limitan a la persona la capacidad de morder, masticar, sonreír y hablar; al mismo tiempo repercutiendo en su bienestar psicosocial. La caries dental es una enfermedad bucal, de origen multifactorial, infecciosa y en algún momento fue considerada transmisible y está establecido que se manifiesta cuando existe falta de balance entre la tríada etiológica o factores que la originan que incluye al diente, a la bacteria y a los azúcares de la

dieta pero también podemos considerar que a lo largo de la vida existen factores considerados de riesgo, entre los que destacan los malos hábitos de higiene y alimenticios y factores que son protectores como los buenos hábitos los cuales debemos cuidar (Zemaitienė *et al.*, 2016). Desde 1960 Keyes, Gordon y Fitzgerald afirman que la etiopatología de la caries dental es la interacción de tres factores importantes o principales: el factor microorganismo que en presencia del sustrato afecta al factor diente que es el huésped. Para representarlo se hizo una gráfica de tres círculos que se interceptan o que se conoce como triada de Keyes (Negroni, 2009). La definición de caries de la infancia temprana por la Academia Americana de Odontología Pediátrica (AAPD) es la presencia de uno o más dientes con caries, perdidos por caries u obturados, en niños de 71 meses de edad o menores (Figura 2.3).



Figura 2.3. Caries de la infancia temprana.

2.3. Terapia Pulpar

La odontología pediátrica tiene como uno de sus objetivos la conservación de la dentición primaria en un estado intacto hasta su exfoliación natural y permitir la correcta erupción de los dientes permanentes. A lo largo del tiempo se han establecido muchas medidas preventivas, sin embargo, seguimos encontrando una alta prevalencia de caries dental en la población infantil y vemos como se incrementan las lesiones traumáticas (Mamani, 2014). Esto hace que la terapia pulpar siga siendo una necesidad en el paciente pediátrico. Por muchos años se consideró que una pulpa inflamada estaba condenada, y no tenía ningún poder de recuperación. Las investigaciones de Mamani y colaboradores en 2014 demostraron que el órgano dentino pulpar tiene capacidad de reparación y, además, tiene poder regenerativo. Los odontoblastos primarios mantienen su capacidad de producir dentina en dientes vitales durante el ciclo de vida del diente y, al destruirse, las células madre de la pulpa

pueden diferenciarse en células parecidas a los odontoblastos. Algunos tratamientos que corresponden a la terapia pulpar son el recubrimiento pulpar indirecto, la pulpotomía y la pulpectomía.

2.3.1. Recubrimiento pulpar indirecto

De acuerdo con Boj (2007) el recubrimiento pulpar indirecto (RPI) es un tratamiento conservador alternativo del complejo dentino pulpar. Se trata de la eliminación de la dentina reblandecida infectada, que no ofrece resistencia a la excavación manual, dejando intencionalmente una capa de dentina afectada en el piso de la cavidad. El recubrimiento pulpar indirecto puede ser realizado como tratamiento único, sin requerir una segunda intervención. Está indicado en caso de caries extensas profundas, sin sintomatología ni signos inflamatorios; es muy importante pues su objetivo es evitar la exposición pulpar. La guía de práctica clínica en salud oral, infancia y adolescencia de la Secretaría Distrital de Salud en Bogotá (2010) menciona que está indicado en dientes que no han comenzado el proceso de reabsorción radicular, también que se encuentre asintomático y que radiográficamente no muestra radiolucidez periapical ni en la zona de furca ya que tienen mejores posibilidades de éxito. El tratamiento está contraindicado en antecedentes de dolor espontáneo, dolor a la masticación y percusión, inflamación, movilidad, reabsorción radicular, zona radiolúcida en el periápice o en la furca o en presencia de calcificaciones pulpares.

2.3.2. Pulpotomía

El tratamiento llamado pulpotomía se realiza cuando la pulpa de la corona de los dientes presenta inflamación, por lo tanto se retira y se coloca un material que la reemplace cuidando de conservar la pulpa de la raíz en las mejores condiciones posibles para que el diente se reabsorba de manera normal. Está indicada en casos de haber exposición pulpar durante un tratamiento o iatrogénica en un medio previamente anestesiado y aislado con aislamiento absoluto. De acuerdo con Barbería *et al.*, (2001) la pulpotomía en molares temporales es un tratamiento que consiste en retirar la pulpa de la corona que debe estar inflamada y conservar la pulpa de la raíz mediante la fijación de la misma (Figuras 2.4 y 2.5).

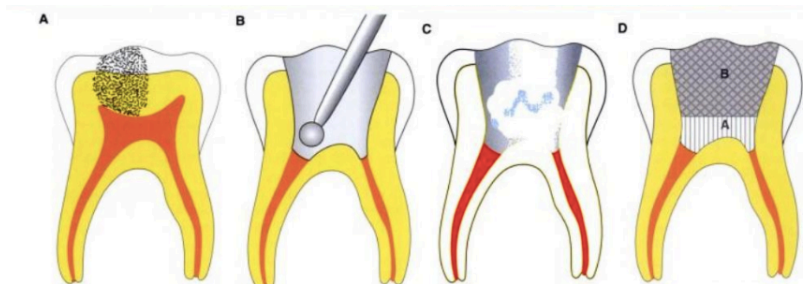


Figura 2.4. Esquema del procedimiento clínico de una pulpotomía con formocresol. A) Lesión cariosa que afecta la pulpa. B) Remoción de tejido pulpar coronario. C) Colocación de torunda de algodón con formocresol. D) Restauración con IRM (A) y cemento de ionómero de vidrio (B) (Bordoni, Escobar, 2010).



Figura 2.5. Fotografía clínica de la eliminación de la pulpa cameral (pulpotomía) en un molar temporal.

El tratamiento de pulpotomía en dientes primarios para conservarlos y evitar extraerlos antes del tiempo correcto se realiza desde hace muchos años. En la antigüedad los fármacos empleados eran resina fenicada; discos desvitalizantes de arsénico y novocaína; pasta de alumbre y algunos otros que fueron desechados con el uso (Jordon, 1934). Aunque se aceptaba la utilidad de la pulpotomía como un tratamiento eficaz para niños, pocos odontólogos dominaban la técnica (Jordon, 1934). Al comenzar el siglo XX Buckley experimentó mezclando tricresol y formaldehído para probarlo en molares colocándolo con un algodón varios días observando éxito en el tratamiento, nombró al medicamento la fórmula de Buckley o formocresol el cual todavía se utiliza en algunas clínicas del mundo (Nunn, 1996; Roberts, 1996). Algunos años después (Sweet, 1937) le agregó óxido de zinc y eugenol a la mezcla. Desde entonces, numerosos autores utilizaron el medicamento y lo llevaron a la práctica (Nunn, 1996), (Roberts, 1996), (Lewis, 1998), (Méndez, 1995). Debido a la acción bactericida y antiséptica de las sustancias utilizadas y gracias a la facilidad del procedimiento, el tratamiento fue un éxito y se utiliza todavía y se considera el tratamiento

pulpar más frecuentemente realizado en dentición infantil (Waterhouse, 2000), (Farooq, 2004).

2.3.3. Indicaciones y contraindicaciones de la pulpotomía

La inflamación de la pulpa es llamada pulpitis y en algunos casos el dolor puede ir acompañado de tejido coronal que está irreversiblemente infectado, entonces debemos retirarlo realizando una pulpotomía y respetar el tejido radicular remanente que permanece vital, de acuerdo a criterios radiológicos y clínicos. El tratamiento es muy importante porque la pulpa de la raíz debe permanecer vital (Canalda, 2001). En algunos casos, la pulpotomía no se indica, en aquellos casos con pulpa o tejidos inflamados por absceso que puede presentar incluso una fístula, si la pieza presenta movilidad o radiográficamente se encuentra alguna lesión que contraindique el tratamiento, la hiperemia pulpar también es una contraindicación, un drenaje seroso purulento, también cuando existe historia de dolor espontáneo o nocturno, sensibilidad a la percusión o palpación o una destrucción coronaria que no permita una restauración bien sellada (Fuks, 1996).

2.3.4. Criterios de éxito o fracaso del tratamiento

El éxito en el tratamiento se considera cuando se conserva la vitalidad de la mayor parte de la pulpa radicular, con el tiempo, la ausencia de síntomas o signos clínicos patológicos también es señal de éxito ya que no debe haber dolor, sensibilidad; inflamación y radiográficamente no se debe observar reabsorción patológica interna o externa ni lesiones en los dientes permanentes de reemplazo (Maroto, 2004). Se considera que la pulpotomía fracasa cuando existe evidencia radiográfica de reabsorción radicular interna y se piensa que debió realizarse una mejor selección diagnóstica (Cohen, 2004.), (Waterhouse, 2000).

2.3.5. Procedimiento convencional del tratamiento de pulpotomía

Tomando en consideración que el diagnóstico para realizar una pulpotomía se establece mediante el protocolo de un examen clínico y radiográfico, los criterios a seguir serán una evaluación clínica, con la historia clínica y dental y una evaluación radiográfica que en

conjunto establecerán la posibilidad de considerar la pulpotomía como alternativa de tratamiento tomando en consideración las indicaciones y contraindicaciones de una pulpotomía. Boj y cols. (2007) proponen la técnica o pasos a seguir para realizar una pulpotomía convencional que consiste en lo siguiente: se debe administrar anestesia local, posteriormente se coloca el aislamiento del campo operatorio con dique de hule para proceder a la apertura de la cavidad y eliminar la dentina cariada si existe, con este procedimiento se impide la contaminación bacteriana pulpar y se obtiene una correcta observación de la zona a tratar. Se realiza la eliminación del techo de la cámara pulpar con una fresa de tungsteno no. 330 a alta velocidad y refrigeración con agua. Posteriormente se procede a la extirpación de la pulpa de la cámara con un excavador o cucharilla de dentina bien afilada, también puede hacerse con una fresa redonda grande no. 4 o 6 a baja velocidad con cuidado de no lesionar el tejido y siempre realizando el lavado con suero fisiológico para controlar la hemorragia presionando con bolitas de algodón estéril. Para fijar la pulpa se coloca un pequeño algodón con formocresol durante aproximadamente cuatro minutos. si hubiera hemorragia persistente nos indica una hiperemia radicular y entonces se debe decidir pulpectomía o extraer el diente. Finalmente la obturación se realiza con una mezcla de óxido de zinc y eugenol que se condensa suavemente sobre el piso de la cámara con torundas de algodón estéril y se procede a la obturación definitiva del diente. Es muy importante considerar que el formocresol puede afectar histológicamente a la pulpa ya que se ha observado que en la zona que se aplica se produce una región acidófila, hacia apical tejido eosinófilo y si al microscopio no se observan células, se interpreta como necrosis por coagulación.

2.3.6. Pulpectomía

Cuando se quieren conservar los dientes con afección pulpar que no son candidatos a pulpotomía, poder mantener el espacio y que funcionen como un componente integral de la dentición hasta su exfoliación natural sin poner en peligro la dentición permanente o la salud del niño se puede realizar una pulpectomía la cual está indicada en casos de pulpitis irreversible, necrosis de la pulpa, incisivos deciduos con trauma o con pulpa necrótica, también cuando el diente al que se le va a hacer pulpotomía presenta hemorragia excesiva o

hiperemia pulpar, sin embargo, una condición indispensable es que los dientes deciduos deben presentar mínima o ninguna reabsorción radicular (Boj, 2014).

2.4. Alternativas de medicamentos utilizados en la pulpotomía

2.4.1. Formocresol

En 1904 comenzó a utilizarse el formocresol por Buckley y su fórmula todavía se utiliza en la actualidad. En 1923 Sweet realizó el primer tratamiento de pulpotomía en dientes infantiles y utilizó formocresol y le llamó al tratamiento pulpotomía medicamentosa. Este tratamiento lo efectuó en cinco citas en las que desvitalizó y produjo la momificación de los tejidos del diente. Con el tiempo, se realizó el tratamiento en una cita convirtiéndose en un tratamiento muy popular (Bellet, 2006), (Patchett, 2006). De acuerdo con Ordoñez (1980) el formocresol contiene 19% de formaldehído, 35% de tricresol, 15% de glicerina y 31% de agua destilada. El formocresol es un agente fijador que actúa como momificante y que provoca desnaturalización de las proteínas de la pulpa de la raíz más cercana a la cámara pulpar, sin embargo, presenta el inconveniente que se difunde hacia la pulpa del ápice fijando los tejidos en mayor o menor medida o causando necrosis. Por lo general permite una reabsorción normal y exfoliación de los dientes en el tiempo que debe ocurrir (Estela, 2008). No se ha demostrado que tenga propiedades curativas y su moderado éxito clínico le ha causado popularidad (Gutiérrez, 2003), (Moretti, 2008). Sin embargo, los buenos resultados y su utilización son cuestionados por ciertos estudios que le han atribuido efectos negativos, entre los que destacan toxicidad sistémica, potencial mutagénico y potencial carcinogénico (Bellet, 2007).

2.4.2. Toxicidad del formocresol

Durante los años en que se ha utilizado el formocresol, han surgido dudas acerca de la posible toxicidad. El formocresol tiene dos componentes que se consideran tóxicos, el formaldehído y el cresol. El formaldehído no es reconocido por el sistema inmune y por lo tanto, activa su respuesta. El cresol es cáustico que produce desintegración celular. Esta sustancia en contacto

con la pulpa produce que se inflame y paulatinamente una necrosis (Ibricevic, 2000), (Fernández, 2001), (Fadavi, 1989). El problema es que los efectos indeseables del formocresol no se observan clínicamente y de forma inmediata como un fracaso de la técnica, sino que se observan mucho después en estudios histológicos realizados posteriormente sobre las muestras (Méndez, 1995). En algunos países como en El Salvador se ha prohibido su uso por su toxicidad, sin embargo la técnica todavía se enseña en algunas escuelas dentales de Estados Unidos, México y algunos otros países (Bellet, 2007), (Gutiérrez, 2003). El formocresol se metaboliza y excreta por vía renal y pulmonar, también puede fijarse a tejidos de riñón, pulmón e hígado, en altas dosis produce toxicidad aguda (Cohen, 2004). En 1994 la agencia internacional para la investigación sobre el cáncer de la OMS lo clasificó como cancerígeno (Fuks, 2008). El instituto nacional de seguridad en el trabajo y salud en los Estados Unidos declaró que es peligroso en concentraciones de 20 partes por millón (ppm) (Milnes, 2006). En los últimos años han surgido numerosas líneas de investigación para conseguir alternativas, sin embargo, hasta que este objetivo se logre, el formocresol debería seguir utilizándose en el tratamiento pulpar en pediatría (Milnes, 2006). Estas son las causas por las que tantos investigadores y universidades apuntan a descubrir nuevos medicamentos (Lewis, 1998), (Fuks, 2008).

2.4.3. Glutaraldehído

El glutaraldehído se propuso por un tiempo como alternativa ya que también fija la pulpa aunque es más suave que el formocresol y se consideraba con menor toxicidad. También es antibacteriano y no se distribuye como el otro medicamento vía sistémica ya que presenta una molécula mayor. (Castillo, 2011). Es un aldehído que puede fijar tejidos, se relaciona a menores fracasos por necrosis pulpar y algunos autores consideraban que se podían tener mejores resultados y éxito clínico (Srinivasan, 2006). El tratamiento de la pulpotomía y los casos en los que se indicaba eran los mismos que para formocresol así también como el procedimiento (Cohen, 2004). En cuanto al tiempo en que se debía aplicar el glutaraldehído se decidió realizando pulpotomías con glutaraldehído al 2% en primates y los resultados mostraron que era mejor el resultado al aplicarlo durante cinco minutos (Milnes, 2008). Uno de los efectos adversos que cuestionó su uso fue la distribución sistémica elevada y además que causaba toxicidad celular parecida al formocresol por lo tanto se dejó de utilizar

(Srinivasan, 2006). En un estudio en el que se evaluaron dientes tratados con glutaraldehído al 2% y se dio seguimiento por dos años se observó que fracasaron el 18% de los dientes tratados (Cohen, 2004).

2.4.4. Sulfato Férrico

El sulfato férrico, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, es un hemostático que también fue utilizado como alternativa por algún tiempo. Su respuesta durante el tratamiento consistía en que al contactar con sangre hacer contacto con la sangre se formaba una proteína y un coágulo que ayudaba a controlar el sangrado. En cirugía oral y prostodoncia se había utilizado para controlar sangrados y para toma de impresiones (Fuks, 2008), (Camp, 2002), (Smith, 2000). Ibricevic y colaboradores publicaron un estudio clínico en humanos comparando este material y el formocresol en pulpotomías y lograron evaluar 35 molares por grupo a 20 meses. En ese tiempo demostraron un gran éxito clínico de 100% y un éxito radiográfico de 97.2% y solo 3% de fracasos. Los autores concluyeron que teniendo resultados exitosos y no presentar toxicidad podía ser una alternativa valiosa para realizar pulpotomías (Ibricevic, 2000). Sin embargo, con los años se observó que el sulfato férrico pigmentaba los dientes permanentes que se formaban entre las raíces de los dientes primarios cuestionando su uso y también dejó de utilizarse.

2.4.5. Agente Trióxido Agregado (MTA)

El MTA o Mineral Trióxido Agregado fue desarrollado por un grupo de investigadores en la Universidad de Loma Linda, California en los años noventas y fue aprobado por la Federación Dental Americana (FDA) para utilizarse en tratamientos dentales en 1998; contiene varios ingredientes, entre los que destacan un silicato, un aluminato, óxido tricálcico, óxido de silicato y un poco de óxido de bismuto que deben mezclarse con agua estéril logrando un cemento en forma de gel cuya importancia clínica radica en que presenta un pH de 10.2 a 12.5, condición excelente durante un tratamiento dental (Torabinejad, 1995). Otra ventaja es que trabaja con los osteoblastos y cementoblastos para formar nuevo tejido y producir matriz de dentina. Es un antimicrobiano por su pH elevado y en las radiografías se observa más radiopaco que la dentina, además se adapta y provoca un buen sellado marginal en las restauraciones comparado con otros materiales, se mantiene estable no corrosivo y sin

pigmentaciones. Es muy utilizado para sellar conductos accesorios en endodoncia entre el sistema de conductos radiculares y el diente. En 1993 lo describieron Lee, Monsef y Torabinejad, ha continuando desde entonces la investigación al respecto y ha sido utilizado en múltiples tratamientos y especialidades de la odontología (Torabinejad, 1997). Una de las desventajas es su alto costo que lo hace poco accesible a los servicios de salud pública.

2.4.6. Hidróxido De Calcio

En los años cuarentas y cincuentas se estudió al hidróxido de calcio como un material alternativo al tratamiento de pulpotomía ya que este material se consideró biológicamente aceptable porque ayudaba a mantener la pulpa vital y ayudaba en la formación de un puente de dentina (Estela, 2008). El hidróxido de calcio $[Ca(OH)_2]$ se ha usado siempre en el área odontológica puesto que tiene propiedades antibacterianas, es biológicamente compatible y provoca formación de dentina, por lo tanto se pensó que podía ser usado para realizar pulpotomías (Srinivasan, 2006), (Castillo, 2010). Presenta algunas características favorables como su color blanco cristalino, presenta un pH alcalino y es algo soluble (Huth, 2005). La respuesta histológica de la pulpa en contacto con este material es de tipo inflamación crónica de la pulpa y reabsorción radicular lo cual puede ser un problema clínico ya que la finalidad de la pulpotomía es la conservación del diente primario (Srinivasan, 2006). Una de las principales contraindicaciones para el uso de este material es que provoca reabsorción interna la cual es debida a un coágulo que interviene durante su aplicación (Castillo, 2010). En el año de 1962 se realizó un estudio para comparar dientes tratados con ambos materiales (formocresol e hidróxido de calcio). Al año, el formocresol tuvo éxito en el 95% de los casos conservando vitalidad pulpar en el ápice de las raíces, mientras que el hidróxido un éxito del 61%, sin embargo la pérdida prematura por reabsorción representó un problema y dejó de ser una alternativa como material para pulpotomías (Estela, 2008).

2.5. Plantas medicinales

Las plantas medicinales y su uso terapéutico como sustitutas de las medicinas farmacéuticas se aplica desde la antigüedad para curar o aliviar las enfermedades. Los remedios con plantas son comunes en muchas culturas que las usan en una variedad de presentaciones y dosis (Lannitti y col., 2016). Con mucha frecuencia no se conocen los principios activos que son los responsables de los efectos y beneficios. Los investigadores han estudiado sus beneficios en los últimos años y tratar de identificar los compuestos con actividad biológica importante que permitan desarrollar nuevos productos en esta área, sin embargo, lograr la caracterización química de todas las especies es casi imposible. También es importante conocer la toxicidad de las plantas, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, por sus siglas en inglés) ha publicado un libro con todas aquellas plantas que debemos conocer presentan sustancias tóxicas de riesgo (EFSA, 2012). Las personas deberían conocer los riesgos de algunas plantas al consumirlas como alimentos o especies, en México es común el uso de la medicina herbolaria que tiene sus inicios en las culturas de nuestro país.

2.5.1. Medicina Alternativa

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (2002) la medicina tradicional o alternativa son todas las prácticas en el área de la salud que no pertenecen al sistema de salud formal, pero en la historia sabemos que siempre se ha incluido el uso de plantas para curar enfermedades. En la mayoría de los países es una práctica aceptada por las autoridades y es común que las personas utilicen la medicina tradicional. En África se reportó en el año 2000 según los informes que el 80% de su población utilizaba esta medicina.

2.5.2. Productos naturales y herbolaria

El uso de plantas medicinales o sus extractos es considerada medicina herbolaria, su finalidad es tratar o prevenir enfermedades y es una costumbre desde la antigüedad puesto que las personas siempre han recurrido al uso de éstas para mejorar su calidad de vida y curar enfermedades (González, Cardentey, 2016). En muchos países, se vuelve un reto la atención odontológica y muchas personas no tienen acceso a los servicios de salud básicos, por lo tanto recurrir a la medicina tradicional es común al ser un recurso mucho más accesible

(Guillen, 2017). En la historia podemos ver como las plantas y los productos naturales se han empleado siempre, incluso los neandertales que vivieron hace 60,000 años ya usaban plantas para curar sus enfermedades, esto es importante porque en algunas ocasiones lograban contrarrestar la enfermedad pero también algunas veces ocasionaban envenenamientos y la muerte sin comprender lo que pasaba (Repetto, 2009). Aproximadamente la mitad de los fármacos a base de plantas fabricados en Estados Unidos son antimicrobianos (Murphy, 1999) y existen aproximadamente entre 250,000 y 500,000 especies de plantas en el mundo (Borris, 1996) pero sólo un pequeño porcentaje (1 al 10%) de ellas, son usadas en nuestra vida diaria como alimento y otras aplicaciones del ser humano. Son muy interesantes las descripciones realizadas en la Biblia en donde se presentan alrededor de treinta plantas como el mirro que presentaban propiedades curativas. Las culturas árabe y asiática describen una gran cantidad de plantas con propiedades curativas y en Estados Unidos los nativos americanos y los migrantes europeos fueron muy importantes en la tradición del uso de plantas medicinales. Las plantas contienen numerosas sustancias químicas con diferentes propiedades, por ejemplo el tomillo contienen ácido cafeico, un antimicrobiano potente contra hongos, virus y bacterias (Murphy, 1999). Los principios activos de una planta y su producción va a depender de muchos factores entre los que destacan el crecimiento, zona, cuidados y extracción de la planta. Conocer la influencia del medio y de éstos factores en la producción de los fitofármacos es indispensable para asegurar estandarizar un producto y su calidad química, además durante la colecta, se debe observar el desarrollo de la planta pues varían los principios activos de acuerdo a la época (Oliveira *et al.*, 1998). Los horarios también son considerados muy importantes ya que determinan sustancias presentes en la planta y su nivel de concentración lo que obliga a los expertos a conocer todas éstas variantes y condiciones (Vigo *et al.*, 2004).

2.5.3. *Mimosa tenuiflora* (tepezcohuite)

El tepezcohuite o *Mimosa tenuiflora* fue descrita por Wild en 1810, también llamado árbol de la piel es un arbusto que se distribuye por el estado de Chiapas y el Istmo de Tehuantepec en Oaxaca, México; se utiliza para trabajar con diferente ganado y ha demostrado tener propiedades cicatrizantes en piel debido a quemaduras que pueden ser de sol, de fuego, en úlceras y en preparados cosméticos. Se han fabricado productos artesanales e industrializados

a partir de su corteza contra heridas y quemaduras de la piel que han sido muy populares desde los años ochenta (Camargo-Ricalde, 2000). En la prehispania en México, se utilizaba una planta llamada “tepezcuahuitl” derivada de los vocablos tepus (fierro) y cuahuitl (árbol), aludiendo a la dureza de su madera (Sánchez León, 1987), que en castellano se tradujo como “árbol del cerro que sangra” y era muy popular porque tenía muchos beneficios, tales como, la cura de enfermedades de la piel usado por algunos pueblos mayas. Su amplitud altitudinal va del nivel del mar hasta 1000 m (Miranda, 1975). En su descripción botánica podemos encontrar que es un arbusto o arbolito espinoso hasta de ocho metros de alto con hojas y hojuelas muy pequeñas, presenta flores blancas, pequeñas y espigas largas (Figura 2.6). Se considera un arbusto muy llamativo y con una gran vista cuando está cubierto por sus flores blancas (Chicago Natural History Museum 1946; Miranda 1975, Sánchez León 1987; Instituto de Historia natural, 2012).



Figura 2.6. Árbol de *Mimosa tenuiflora* (tepezcohuite) (Cadena, Cruz, 2018).

Anton *et al.* (1993) señalan que la corteza de *M. tenuiflora* presenta algunos compuestos abundantes, entre los que destacan taninos, saponinas, alcaloides y muchos compuestos más que son valiosos para tener las propiedades que favorecen el tratamiento contra quemaduras y que se vuelven químico importantes en la regeneración de la piel (Figura 2.7).



Figura 2.7. Corteza tostada y molida de Tepezcohuite (*Mimosa tenuiflora* (L) Willd) (Cadena, Cruz, 2018).

La cicatrización es uno de los efectos favorecedores con el uso de esta planta, sus extractos y compuestos químicos, principalmente extraídos de la corteza, se considera que la actividad biológica más importante es debido a sus taninos y saponinas. La corteza de *M. tenuiflora* se ha estudiado en muchos ensayos con resultados favorables por ejemplo, para tratar úlceras venosas de pierna, pero también es importante insistir en el control de calidad y la responsabilidad de las autoridades al comercializar los fitoquímicos de ésta planta a través de productos como cremas y pomadas fabricadas de la corteza.

2.5.4. *Equisetum arvense* (cola de caballo)

Equisetum arvense o cola de caballo fue descrita por Carlos Linneo en 1753, su nombre deriva del latín: equus (caballo) y seta (crin). Esta planta es muy especial ya que contiene gran cantidad de sales de sílice. Las sales de sílice se requieren para formar huesos, uñas y tejido conectivo, también suele contener flavonoides (Leung, Foster, 1996). Se puede encontrar cola de caballo en suelos húmedos y puede tener dos tipos de tallos aéreos considerados unos fértiles y otros estériles. Se puede observar a los tallos fértiles de color rojizos mientras que los estériles que son comunes en el verano son verdes y hasta 50 cm de altura (fig. 2.8). presenta unas áreas llamadas nudos con hojas verticiladas que parecen una vaina alrededor del tallo (fig. 2.9). Algunos compuestos químicos presentes son fenoles, alcaloides, flavonoides, esteroides y grupos carboxilos que distinguen a los diferentes tipos de esta planta. En la medicina tradicional esta planta es muy utilizada en inflamaciones, infecciones de vías urinarias, cálculos, dermatitis etc. En animales de experimentación se ha reportado como analgésico y antiinflamatorio. Se considera segura, sin embargo existen otras especies del mismo género que pueden contener alcaloides (Pyeovich, Bogenschutz, 2001).



Figura 2.8. Ramas y partes aéreas de *Equisetum arvense* (Villar, Iglesias, 2006).



Figura 2.9. Hojas verticiladas en forma de vaina del equiseto (Villar, Iglesias, 2006).

2.5.5. *Syzygium aromaticum* (clavo)

Por muchos años se han utilizado y consumido los aceites esenciales de plantas y especias en la medicina, la industria de los alimentos, etc. *Syzygium aromaticum* o clavo de olor, recibe varios nombres, también es llamado *Eugenia caryophyllata* y fue descrito por L. Merr y L. M. Perry en 1929. Los extractos y aceites esenciales del clavo han sido estudiados y al analizarlos y caracterizarlos fitoquímicamente se descubre que presentan una acción antimicrobiana muy potente. El clavo de olor se considera una especia que pertenece a la familia Myrtaceae propia de climas tropicales (Singh, Baghotia y Goel, 2012; Moura *et al.*, 2012). Originalmente se encuentra en Indonesia para posteriormente cultivarse en varios países como México, Brasil, India, Tanzania y muchos más. La planta puede crecer en diferentes tipos de suelo tanto cálidos como húmedos (Orwa Mutua, Kindt, Jamnadass y Anthony, 2009). El clavo es una planta obtenida de un árbol que dos veces al año florece, sus botones de flor presentan al principio un color pálido, posteriormente verde y finalmente se convierte en un color rojo o marrón oscuro (Singh *et al.*, 2012). Los clavos utilizados en la

cocina son los capullos de la planta sin abrir y se cosechan cuando las hojas verdes cambian de color a amarillo oro (Pandey y Singh, 2011). Para la extracción del aceite esencial es común utilizar botones, tallos y hojas (Srivastava y Syamsundar, 2005) (Figura 2.10). Muchos autores han investigado las propiedades del clavo que son consideradas medicinales. Moura *et al.* (2012) mencionan que el clavo tiene muchos efectos, entre los que destacan propiedades antimicrobianas, antisépticas, analgésicas, antifúngicas, anestésicas y como antimutagénico. De acuerdo con Pandey y Singh (2011) y Rana, Rana y Charan (2011) los botones de clavo han tenido éxito en la medicina tradicional porque se han usado en odontología, diurético, antiséptico, cardiotónico y como condimento con actividad carminativa. El eugenol es el aceite esencial de clavo, sus características son que se presenta como un líquido incoloro o de color amarillo marrón claro, con un aroma característico y sabor pungente (Japanese Pharmacopoeia, 2001). En un estudio realizado por Rahnama *et al.* (2012) se reportó que los fenoles contenidos en el aceite esencial eran los responsables de la actividad antimicrobiana, por lo tanto la concentración de los fenoles está en relación a su actividad antimicrobiana. Otra actividad importante reportada por el aceite esencial de *S. aromaticum* es la antifúngica, la cual abarca diversas especies de hongos y levaduras, por ejemplo: especies de *Candida* (principalmente *Candida albicans*).



Figura 2.10. Árbol de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*). Botones florales (a) y clavo seco (b) (Kuetze, 2017).

2.5.6. *Lippia graveolens* (orégano)

El orégano fue descrito por Kunth en 1818, es una planta herbácea arbustiva comúnmente utilizada en la industria gastronómica (Arcila *et al.*, 2004). Existen varias especies de orégano en el mundo, por ejemplo *Origanum migare* es el orégano griego, *Coridohymus capitatus* es

español, *Origanum onites* es el orégano turco y *Lippia graveolens* se le conoce al orégano mexicano, sin embargo, en México existen alrededor de 40 especies de orégano con muchas propiedades medicinales debido a su composición química y compuestos (Huerta, 1997). El orégano mexicano se encuentra en estado silvestre en tierras áridas y semiáridas en 24 estados de la república (Huerta, 1997). La planta de *L. graveolens* (orégano) se caracteriza por ser un arbusto delgado de aproximadamente dos metros de alto, presenta un olor o aroma característico; hojas de dos a cuatro centímetros de largo, y frutos pequeños, secos, encerrados en el cáliz (Nash y Nee, 1984), (Figura 2.11). El comportamiento en el crecimiento de la planta es muy variable dependiendo los meses del año, ya que en diciembre, enero y febrero la planta se encuentra en un período de latencia, posteriormente crece y florece en marzo, abril, mayo y junio, formando el fruto en los meses de agosto y septiembre para finalmente, madurar en noviembre y diciembre (Olhagaray *et al.*, 2005). Podemos encontrar orégano en climas secos, lomas, valles, lugares con rocas, llanuras, arroyos, etc. (Olhagaray *et al.*, 2005; Galván *et al.*, 2005). Los compuestos químicos encontrados en el orégano más importantes son fenoles, flavonoides, taninos y el aceite esencial carvacrol y timol. El aceite de orégano, ha sido expuesto a numerosas investigaciones científicas y ha demostrado tener un poderoso efecto antibiótico al eliminar bacterias, hongos y virus de todo tipo con pequeñas cantidades, se considera que no presenta efectos secundarios, es seguro y no se requiere receta médica para su venta.



Figura 2.11. Orégano mexicano (*Lippia graveolens*) planta (a) y molido (b) (Sánchez, Quezada, 2011).

2.5.7. *Aloe vera* (sábila)

El *Aloe vera* es una planta muy conocida y con muchos usos en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética; fue descrita por Carlos Linneo en 1753, una de las partes más utilizadas de esta planta es el gel debido a sus propiedades funcionales, antioxidantes y terapéuticas. Se conocen alrededor de 360 especies diferentes de esta planta y pertenece a la familia de las asfodeláceas o liláceas y puede medir desde unos centímetros hasta más de 50 cm (Reynolds y Dweck, 1999; Choi y Chung, 2003; Ramachandra y Srinivasa, 2008).

En los Papiros de Ebers se mencionaba ya a esta planta y muchas culturas la nombran a través de la historia destacando su uso en medicina y cosmética. La cultura egipcia, griega, árabe, etc. hablaban de su empleo y su nombre proviene del griego *aloe* que significa: “la sustancia amarga brillante” y *vera* viene del latín que significa: “verdad” (Boudreau y Beland, 2006; Surjushe *et al.*, 2008). La planta de sábila posee raíz, tallo, hojas y flores (Reynolds y Dweck, 1999). Las hojas son dentadas, presentan picos en la superficie que le sirven de protección a la planta y están formadas por la corteza, la cual está cubierta de una delgada cutícula (Fig. 2.12).



Figura 2.12. Planta de *Aloe vera* (Vega, Nevenka, 2005).

El 20 al 30% del peso de toda la planta se lo da la corteza la cual es color verde o verde azulado, el color puede variar por varios factores como el clima, lugar o nutrición de la planta. La pulpa o gel de la planta es llamada también parénquima y está localizada en el interior de las hojas representando entre el 65 al 80 % del peso total de la planta. Los conductos de aloína son una parte muy importante de la planta localizados entre la corteza y la pulpa por donde circula la savia de la planta, conocida como acíbar. El acíbar presenta algunas propiedades importantes medicinales (Ramachandra y Srinivasa, 2008). El acíbar presenta gran cantidad

de aloína, la cual es una antraquinona (Reynolds, 2004). La sábila presenta una composición química constituida por una mezcla de muchos compuestos con actividades medicinales importantes (Pritam *et al.*, 2007; Jia *et al.*, 2008). El *A. vera* y su gel es muy demandado y consumido en todo el mundo y la industria le ha dado aplicaciones importantes en el área médica, cosmética y de los alimentos y bebidas incluso trabajado de manera artesanal (OBrien, 2005). La mejora en la cicatrización de las heridas y la reducción de edema y dolor es una propiedad muy importante demostrada por el gel e investigada en la actualidad (Davis *et al.*, 1987). Algunas otras propiedades observadas en el gel de sábila fueron por ejemplo la propiedad antioxidante que se observó en estudios al probar polisacáridos del gel y efectos protectores en células lo cual es una alternativa muy valiosa en la medicina (Wu *et al.*, 2006).

2.6. Técnicas de extracción

Las técnicas de extracción son las técnicas utilizadas para aislar los principios activos de las plantas que tienen efectos terapéuticos. Primeramente, para obtener un extracto, es importante recolectar e identificar la planta deseada, secarla, además conocer cuales son sus compuestos químicos y la parte de la planta que contiene estos compuestos para proceder a trabajar con ella. Se conocen varios métodos de extracción, entre los que destacan los medios mecánicos en los que se obtienen fluidos de la planta con los principios activos, la destilación que utiliza calor pero que no debe emplearse ante compuestos sensibles a este, la extracción con gases que es un proceso selectivo y la extracción con disolventes en la cual se utiliza el tiempo, la temperatura y un disolvente elegido para extraer el compuesto químico. Algunos ejemplos de técnicas de extracción con disolventes son la maceración y la percolación en las cuales se utiliza temperatura ambiente y el soxhlet en donde se utiliza temperatura a 100°C (Molnar *et al.*, 2017).

2.6.1. Extracción soxhlet

Un método muy usado a través de los años para extraer los compuestos químicos de las plantas es mediante un dispositivo llamado soxhlet, el cual sirve para extraer aquellos

compuestos generalmente lípidos que están dentro de un sólido y la manera de realizarlo es aplicando un solvente elegido mediante su competencia (Subramanian *et al*, 2016). Un soxhlet es un dispositivo que contiene un extractor y un condensador que generalmente tiene forma de matraz. Mediante el calor el solvente sufre evaporación subiendo para ser condensado en un ciclo en el que regresa y a su paso va extrayendo los compuestos químicos hasta concentrarlos, esto puede tardar horas o días (Azuola, 2007). Nuñez (2008) menciona que la extracción mediante soxhlet sirve para realizar una extracción sólido-líquido de forma continua, para poder efectuarla se utiliza un disolvente afín, posteriormente el disolvente tendrá que evaporarse y la que se obtiene se pesa para obtener el rendimiento final de la extracción. El resultado final contiene las sustancias que se extrajeron que pueden ser grasas, vitaminas, pigmentos, etc.

2.7. Pruebas fitoquímicas

De acuerdo con Sharapin (2002) para determinar si en una planta están presentes o no algunos metabolitos como terpenos, taninos, flavonoides, alcaloides, etc. es necesario realizar pruebas de tipo fitoquímicas las cuales se llaman pruebas preliminares. Es importante recordar que cada compuesto químico tendrá actividad específica biológica de algún tipo como antimicrobiano, analgésico, antiinflamatorio, antioxidante, etc. y cuando se realizan las pruebas preliminares para el estudio fitoquímico se puede establecer la orientación del estudio o la investigación de esa planta en particular, sus principios activos y su actividad biológica.

2.8. Pruebas de actividad antimicrobiana y microorganismos evaluados

Para determinar la susceptibilidad de un microorganismo frente a un medicamento de tipo antimicrobiano se pueden realizar ensayos llamados antibiogramas que consisten en pruebas de sensibilidad en las cuales se expone la bacteria a una concentración estándar del fármaco o sustancia a evaluar. Estas pruebas se pueden realizar en diferentes microorganismos como virus, bacterias y hongos y se realiza mediante diferentes métodos. Un método muy utilizado en microbiología para microorganismos de crecimiento rápido es la prueba de disco o de

pozo mediante difusión en agar. Es un método estandarizado y también se le puede llamar de sensibilidad en disco en el cual se obtienen resultados cualitativos y cuantitativos que se pueden correlacionar mediante la determinación de los halos de inhibición y de la concentración mínima inhibitoria (Cona, 2002).

2.8.1. Bacterias de interés odontológico

La cavidad bucal es un sitio con gran cantidad de bacterias entre las que destacan las que pertenecen al género *Streptococcus*, sin embargo, las especies *mutans* (con sus serotipos c, e y f) y *sobrinus* son las que con más frecuencia se asocian a la caries, tanto en animales de experimentación como en humanos. La caries dental es una enfermedad multifactorial asociada a varios factores entre los que destacan tres, uno de ellos es el huésped que es considerado el diente, la dieta alta en consumo de carbohidratos y las bacterias que solo necesitan el tiempo para convertir los hidratos de carbono en ácidos que destruyen el esmalte y la dentina de los dientes produciendo la caries (Usha, 2018). Los principales microorganismos asociados a la caries son los *Streptococcus* del grupo *mutans* que también pueden asociarse a otras bacterias como lactobacilos y bacterias periodontales y juntas pueden variar el desarrollo de las lesiones cariosas. El microorganismo mayormente aislado en las lesiones de caries humanas es el *Streptococcus mutans* que coloniza al diente desde el momento en que erupciona y tiene la capacidad de producir ácidos que destruyen los tejidos del diente hasta llegar a la pulpa la cual presenta síntomas de dolor y de inflamación denominada pulpitis y que puede ser reversible e irreversible para posteriormente, en caso de no ser tratada, avanzar a necrosis pulpar. El nombre de *mutans* lo recibe por su tendencia a cambiar de forma, y se puede encontrar como coco o de forma más alargada como bacilo (Escribano, 2005).

2.8.2. *Streptococcus mutans*

De acuerdo con Hung *et.al.* (2005) la bacteria mas relacionada a la caries dental es el *S. mutans*. La teoría de la placa ecológica nos menciona que la caries dental se produce debido

a un desbalance natural de la microflora oral y esto es debido a una alteración de las condiciones normales del ambiente bucal entre las que juega un papel muy importante la flora microbiana. Al estudiar como las bacterias colonizan la boca y los dientes, se comprende su participación e interacción con otros microorganismos y se entiende la dinámica de la biopelícula dental. El estudio de la biología molecular en años recientes, nos ayuda a identificar todos los tipos de bacterias que colonizan la boca, como producen los ácidos y como participan con otros microorganismos en el proceso de la caries dental. La caries es una enfermedad compleja por todos los factores que se asocian para que se desarrolle y porque cada factor de riesgo asociado permite el desbalance y produce la patología. Es muy importante que los cambios en el medio dentro de la biopelícula hacen que se favorezca la proliferación de especies patogénicas acidúricas y acidogénicas y tomen posesión de esta (Milicich, 2008). La microflora oral es un complejo ecosistema que contiene muchas especies microbianas. Normalmente y desde el nacimiento, la boca posee microorganismos y los recién nacidos son esencialmente libres de estos, pero al erupcionar los dientes el biofilm se desarrolla en las superficies de los dientes expuestas principalmente con glicoproteínas salivales. Uno de los factores de riesgo más importantes para que se desarrolle la caries dental son los hábitos de higiene, pues cuando no existe higiene oral se acumula más cantidad de *S. mutans* en las superficies y esta bacteria fermenta los azúcares convirtiéndolos en ácido. De acuerdo a su clasificación, los estreptococos del grupo *mutans* pueden ser de ocho serotipos según su composición y enlaces (Nakano *et al.*, 2004) (Figura 2.13).

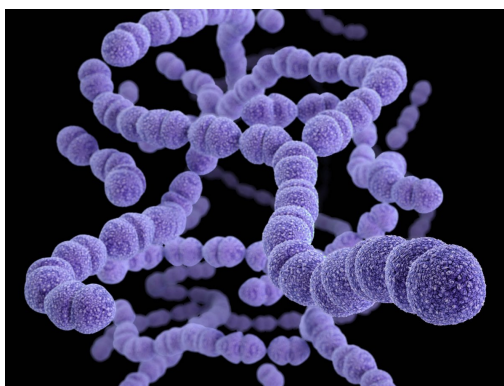


Figura 2.13. *S. mutans* visto al microscopio. Fuente: American Society of Microbiology.

Existen dos factores que indican que *S. mutans* pueda aparecer durante la etapa pre dental, el primero es que *S. mutans* y *S. sobrinus* son capaces de colonizar superficies mucosas y el segundo es que algunos niños desarrollan caries de manera muy temprana casi inmediatamente después de la erupción de los dientes o simultánea a la erupción entre los seis meses y los dos años. La cantidad de bacterias en boca y que los microorganismos colonicen antes de que los dientes erupcionen puede ser un factor de riesgo a la caries de la infancia temprana (Martínez *et al.*, 2009).

2.8.3. *Streptococcus sobrinus*

La flora bucal humana es muy compleja en géneros y especies. En investigaciones publicadas se habla de aproximadamente 600 especies de bacterias en la boca que se interrelacionan y que están expuestas a todos los factores de riesgo descritos anteriormente como dieta y hábitos que definen su comportamiento (Rodríguez, González, 2000). La biología molecular aporta los conocimientos recientes sobre estos microorganismos que nos ayuda a entenderlos. Dewhirst (2010) consideró un nicho ecológico con gran biodiversidad a la cavidad oral y aunque se sabe que los microorganismos son responsables del balance químico y ecológico de la boca, se sabe muy poco de la dinámica entre las bacterias. El *S. sobrinus* es una variedad de *S. viridans* que vive en la flora bacteriana de la boca humana y es uno de los causantes de la caries dental, es capaz de regular la adherencia a la película o biofilm dental. Tiene un número menor de sistemas de señalización de dos componentes y genes relacionados con la bacteriocina que *S. mutans*, pero todas o incluso más proteínas inmunitarias. Las dos bacterias son diferentes al regular los fructanos, sin embargo las dos se consideran importantes en el desarrollo y establecimiento de la caries (Figura 2.14).

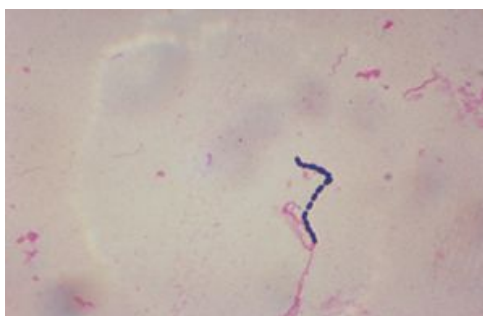


Figura 2.14. *Streptococcus sobrinus* bajo tinción de Gram. Cortesía del Departamento de Agricultura de EE. UU.

2.9. Actividad coagulante de las plantas sobre la pulpa dental y sus células

Cuando se consumen plantas medicinales o suplementos naturales que en su composición tienen partes de plantas para tratar dolor, inflamación, etc. es muy importante conocer la composición científica para asegurar la seguridad del consumo y el efecto deseado ya que algunos compuestos químicos de las plantas pueden tener efectos secundarios como sangrados durante cirugías o potencializar el efecto durante el consumo de fármacos anticoagulantes. En estudios se sabe que algunos extractos y productos naturales pueden actuar favoreciendo o retrasando el proceso de coagulación *in vitro* e *in vivo*, estudios *in vitro* de plantas medicinales realizados en Guatemala indicaron ser inhibidores de la agregación de trombina de plaquetas humanas (Yamada, 2006).

2.9.1. Pruebas de coagulación

El mecanismo de la coagulación es un proceso complejo en el que intervienen proteínas de la sangre, de la matriz y células, se vuelve difícil medirlo mediante pruebas de laboratorio ya que solo es posible medir las proteínas de la coagulación, sin embargo no es posible medir los elementos vasculares (López, 2016). El conteo plaquetario durante una biometría es indispensable para evaluar su función y las técnicas automáticas de laboratorio son valiosas en la actualidad ya que nos permiten conocer el volumen plaquetario que en valores normales van de 150 a 450,000/mL. Los factores TP y TTPa de la sangre también se pueden medir, las pruebas que normalmente se utilizan para conocer los factores de la coagulación son el tiempo de protrombina o TP y el tiempo de tromboplastina parcial activado o TTPa (Zimring, 2009). Estos factores son importantes pues indican diferentes cosas, el TTPa nos indica los factores involucrados en la vía intrínseca de la coagulación y la vía extrínseca es evaluada mediante el TP. Para realizar estas pruebas se requiere sangre anticoagulada con citrato de sodio, que funciona como un quelante de calcio y cuando encontramos alterados tanto el tiempo de protrombina como el tiempo de tromboplastina parcial activado nos indica que

están alteradas ambas vías (Delabranche *et al.*, 2017). La tabla 2.1 muestra los valores normales de las pruebas de coagulación.

Prueba	Valores normales
Tiempo de protrombina	10-14 segundos >60%
Tiempo de tromboplastina parcial activado	24-45 segundos
Tiempo de trombina	9-35 segundos

Tabla 2.1. Valores normales de las pruebas de coagulación.

2.9.2. Características de la pulpa dental

La odontología actual requiere numerosas alternativas para conservar la vitalidad pulpar y evitar la pérdida prematura de piezas dentales. La ingeniería tisular es un concepto que ha venido a cambiar la manera de realizar diagnósticos y tratamientos en odontología ya que en la actualidad incorpora las células madre como una opción a través de los biomateriales para reconstruir y regenerar los tejidos del diente. El esmalte es el tejido dental que se encuentra en la parte más externa de los dientes, por debajo de este se encuentra la dentina y por debajo de la dentina encontramos un tejido conectivo laxo llamado pulpa dental. La pulpa dental tiene su origen en las células del ectomesénquima de la papila dental durante la formación de los dientes que ocurre en el período embrionario en la sexta semana. En la pulpa se pueden encontrar diferentes tipos de células como endoteliales y perivasculares dispuestas en una matriz extracelular (Bianco, 2008) también encontramos algunas células asociadas como los odontoblastos encargados del depósito de dentina; células inmunitarias de defensa; fibroblastos para renovar la matriz y células madre de mesénquima (MSC) muy importantes en la regeneración y reparación de la pulpa (Goldberg, Smith, 2004).

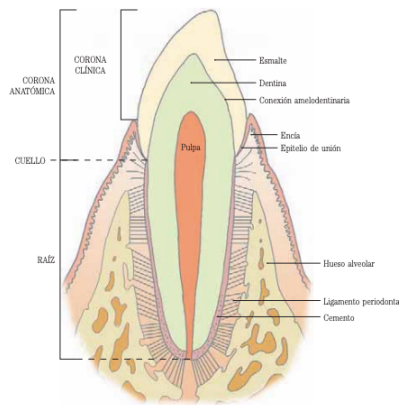


Figura 2.15. Esquema de los tejidos dentales y periodontales (Gómez, Campos, 2009).

Rodeando la pulpa dental se localiza la dentina, un tejido mineralizado elaborado por células especializadas denominadas odontoblastos (Figura 2.15). Las lesiones traumáticas, las cavidades profundas o lesiones de caries pueden alterar el equilibrio de la pulpa y entonces los odontoblastos actúan debido a su ubicación en la periferia y son capaces de formar y sintetizar una capa de dentina llamada dentina terciaria o de reparación que puede aislar a la pulpa de la agresión (Huang *et al.*, 2018). Si la agresión a la pulpa dental permanece poco tiempo, la cicatrización, reparación y regeneración tisular permite que la pulpa retorne a su estado original, sin embargo si la agresión es continua, puede haber una inflamación del tejido que provoca una extravasación sanguínea que puede evolucionar a una necrosis de la pulpa. En este momento es importante la ingeniería tisular pues ha desarrollado materiales capaces de rehabilitar o reemplazar los tejidos no funcionales o muy dañados y su principio radica en el conocimiento de los mecanismos que regulan la formación de los tejidos en el desarrollo embrionario (Albuquerque *et al.*, 2014). Sansilio y colaboradores en el 2018 mencionan que el éxito de la regeneración pulpar depende de la migración de células madre mediante la utilización de una matriz biocompatible. En investigaciones recientes se ha demostrado el potencial pro angiogénico de las células pulpares contribuyendo a la posibilidad de ser utilizadas en ingeniería pulpar (Goldberg, *et al.*, 2004).

2.9.3. Fibroblastos

El fibroblasto es una célula que al principio fue considerada como una célula sencilla cuya función carecía de complejidad, se consideraba que brindaba soporte a otras células, hoy en día este concepto cambió y el fibroblasto que es la célula más común del tejido conectivo es muy importante en la cicatrización de heridas, la segregación de proteínas y mantenimiento de la matriz extracelular (Ivanovski *et al.*, 2001). La Figura 2.16 muestra cultivos de fibroblastos marcados con técnicas de inmunofluorescencia (Rojas, Venegas, 2004).

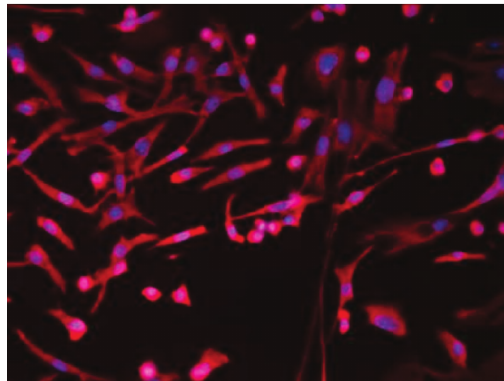


Figura 2.16. Cultivos de fibroblastos marcados con técnicas de inmunofluorescencia (Rojas, Venegas, 2004).

Es una célula que constantemente está cambiando, en algunos cultivos se ha encontrado que no son iguales entre sí y que presentan diferencias en cuanto a forma y función dependiendo de su ubicación (Ivanovski *et al.*, 2001). Entre las funciones más importantes encontramos que son encargados de formar las fibras de colágeno y elastina del tejido conectivo, produce la sustancia fundamental, sintetiza colágeno, contribuye en la organización de la estructura del tejido conectivo durante la formación embrionaria, también produce citoquinas y estimula la reabsorción del hueso la cual es mediada por osteoclastos. Ten Cate (1998) lo describió como “el arquitecto responsable de mantener al tejido conectivo”.

2.10. Ensayo FMCA (Fluorometric microculture cytotoxicity assay)

El ensayo de citotoxicidad de microcultivo fluorométrico (FMCA) es un ensayo de viabilidad celular no clonogénico basado en microplacas el cual es empleado para medir el efecto citotóxico o citostático de compuestos *in vitro*. El ensayo se realiza en células con membranas

plasmáticas intactas y está basado en la hidrólisis (Lindhagen, *et al.*, 2008). El ensayo está disponible como una configuración de placa de 96 pocillos semiautomatizada y una versión de placa de 384 pocillos totalmente adaptable a la robótica. Las placas experimentales se preparan con una pequeña cantidad de solución de fármaco y se pueden almacenar congeladas. Las células se siembran en las placas y se evalúa la viabilidad celular después de 72 horas.

2.11. Expresión de Citocinas en células

Las citocinas originalmente fueron llamadas linfocinas o monocinas, algunas se identificaron a través de la función que ejercían como el factor de necrosis tumoral (TNF) o el transformante de crecimiento (TGF). Bezbradica, Medzhitov (2009) mencionan que también se les conoce como interleucinas (IL) porque actúan como señales de comunicación entre distintos leucocitos. La nomenclatura correspondiente a IL resulta útil para continuar con su clasificación ya que se numeran secuencialmente conforme a su descubrimiento o como fueron identificándose. Se consideran péptidos o glicoproteínas de bajo peso molecular y se producen en los primeros segundos de la activación celular, presentan vida media limitada y estimulan a otras células con receptores específicos. Se asocian a diferentes procesos como inflamación, hematopoyesis, antitumorales, supresores, interferones y quimiocinas. Casi todas las células sintetizan citocinas que participan en la homeostasis del organismo, por lo tanto se puede llegar a una patología si disminuye o aumenta su producción. Hoy en día, se pueden administrar o bloquear las citocinas en algunas enfermedades como deficiencias inmunes, hipersensibilidad, autoinmunidad y cáncer (Bezbradica, Medzhitov, 2009).

2.11.1. TNF alfa

El factor de necrosis tumoral es una citocina liberada por las células del sistema inmunitario que interviene en la inflamación, la apoptosis y la destrucción articular secundarias a la artritis reumatoide, así como en otras patologías. Es considerada como una potente citocina pleiotrópica con múltiples funciones celulares y se le ha relacionado de manera crítica con la patogénesis de diversas enfermedades crónicas inflamatorias incluyendo enfermedades autoinmunes, entre otras (Zhang *et al.*, 2009). El TNF alfa también regula eventos biológicos

fundamentales de las células tales como la activación de los leucocitos, la liberación de diversas citocinas y quimiocinas y la producción de especies reactivas de oxígeno. Esta es una de las principales citocinas que juega un papel determinante en la inflamación, inicio, progresión, riesgo y gravedad a padecer diversas enfermedades cardiovasculares (McKellar, *et al.*, 2009).

2.11.2. Interleucina IL-1beta

La interleucina 1 beta es también conocida como pirógeno leucocitario, mediador endógeno leucocítico, factor de células mononucleares, factor activador de linfocitos y otros nombres, es una proteína citocina proinflamatoria que en los seres humanos está codificada por el gen IL-1beta (Zhang, 2007). Los leucocitos (glóbulos blancos) y otras células del cuerpo elaboran esta interleucina que ayuda a los macrófagos los cuales son otro tipo de glóbulos blancos, a combatir infecciones, también ayudan a los leucocitos a atravesar las paredes de los vasos sanguíneos para llegar a la infección y también causa fiebre ya que afecta zonas del cerebro que controlan la temperatura del cuerpo.

2.11.3. Interleucina IL-10

Es una citocina con propiedades antiinflamatorias que es capaz de inhibir la síntesis de citocinas proinflamatorias por los linfocitos T y los macrófagos, también es conocida como factor de inhibición de la síntesis de citocinas y es considerada de gran poder antiinflamatorio, además su mecanismo de acción es la supresión de las células Th1, un subtipo de células T que sintetiza citoquinas inflamatorias. La capacidad antiinflamatoria es aprovechada en clínica en el tratamiento de los pacientes con inmunocompromiso y transplantados para evitar el rechazo de los trasplantes y como tratamiento de enfermedades autoinmunes. Esta interleucina es importante en la diferenciación de algunos tipos celulares como linfocitos B, células T reguladoras y esto explicaría su importancia en el control de respuestas autoinmunes (Sohn *et al.*, 2007). Las enfermedades relacionadas con una elevada secreción de IL-10 son la hepatitis B y C, dermatitis atópica, asma, colitis ulcerosa crónica y por el contrario, los niveles bajos de esta citocina se han relacionado con aumento de riesgo cardiovascular.

2.12. Modelo animal murino

En la investigación de enfermedades se puede hacer uso de modelos animales que, a pesar de que no presentan por completo las características humanas, sirven como evidencia valiosa del curso de la enfermedad (Goldberg, 1996). Existen varios aspectos a considerar en la elección del modelo animal que se utilizará en un estudio como por ejemplo cuestiones inmunológicas, similitud con los humanos en el proceso a estudiar, costos, disponibilidad, espacio y por supuesto la bioseguridad. Cada modelo animal representa un reto y sus diferencias propias, así que los recursos disponibles pueden influir en los resultados y eficacia del modelo y el éxito del proyecto. Kramnik, Beamer (2017) reportan que en el desarrollo de vacunas y tratamiento de enfermedades se vuelve muy importante el modelo animal ya que determinan el curso, el mecanismo y la transmisión de la enfermedad, también como responde el sistema inmune del huésped. Una condición muy importante para aceptar incluir animales en los proyectos de investigación o de enseñanza es solamente si su contribución es indispensable para comprender los principios biológicos o si genera conocimientos que beneficien a humanos o a otros animales. Siempre que sea posible se deben encontrar alternativas al empleo de animales como ensayos *in vitro* o el uso de líneas celulares y solamente en aquellos casos que esto no sea posible, podrán utilizarse considerando el menor número de especímenes (Combrisson, 2017). Blake (2001) nos recuerda que el uso de animales debe regirse por los enunciados de Russell y Burch (1959), conocidos como las tres R's que se refieren a reducción, refinamiento y reemplazo. En cuanto a la reducción nos dice que el tamaño de la muestra debe ser apropiado considerando el menor número de animales posibles para obtener resultados confiables, en cuanto al refinamiento menciona que son los métodos que minimizan la incomodidad ocasionada a los animales y en cuanto al reemplazo se refiere a tratar de utilizar especies bajas en la escala evolutiva ya sea de modelos de computadora, cultivos de células, o cadáveres. Uno de los animales más utilizados en experimentación es la rata, de ellas, la raza Sprague Dawley la cual es una rata albina, es de amplio uso en investigación médica y nutricional. Esta raza tiene varias ventajas entre las que destacan que es muy apacible y de fácil manejo, tienen la cola más larga respecto a la longitud de su cuerpo comparado con otras razas de rata. Su tamaño promedio es de aproximadamente 10.5 y el peso de una rata adulta es entre 250g a 300g para las hembras y 450g a 520g para los machos, su vida es de aproximadamente 2.5 años a 3.5 años.

3. JUSTIFICACIÓN

Los dientes temporales o dientes infantiles son importantes pues realizan varias funciones para el normal crecimiento y desarrollo del niño por lo que deben ser vigilados y tratados de la misma forma en que se trata la dentición permanente. La prevención es la base fundamental de la odontología pediátrica y conservar los dientes primarios en los niños es de vital importancia debido a que esto favorece un correcto crecimiento y desarrollo de los maxilares y la región craneofacial en los niños. La pérdida de estos dientes en forma temprana, provoca que se desarrollen problemas en varios aspectos que pueden interferir con un desarrollo correcto durante el recambio de los dientes primarios por los permanentes, el proceso de erupción y el establecimiento de una correcta oclusión y por lo tanto el crecimiento y desarrollo de los maxilares. Realizar pulpotomías representa la única alternativa para poder conservar los dientes infantiles que presentan caries profunda o penetrante en donde está involucrada la pulpa y evitar una extracción. La pulpa coronal situada junto a la exposición de la caries contiene microorganismos y presenta signos inflamatorios, por lo tanto, uno de los pasos más importantes durante la técnica de la pulpotomía consiste en colocar medicamentos antimicrobianos y que estimulen la cicatrización pulpar, además que permitan el desarrollo normal del diente hasta su exfoliación en forma natural. La técnica más utilizada desde 1950 para la realización de pulpotomías es la técnica que utiliza el formocresol, ésta ha sido exitosa debido a que reporta una efectividad entre 80 y 90%, sin embargo, su utilización genera gran controversia debido a que en los últimos años se ha considerado importante el dejar de utilizar la solución de Buckley basándose en el reporte de prensa que hizo la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer en junio de 2014 y que consideró al vapor del formaldehído un carcinógeno, ya que la extensa revisión sistemática concluyó que está relacionado con el carcinoma nasofaríngeo del tracto respiratorio alto, de la mucosa nasal y senos paranasales. Esto motivó a que por años la investigación esté dirigida a encontrar nuevos productos que sean una alternativa eficaz a este medicamento en el tratamiento de la pulpotomía.

Las propiedades de las plantas son innegables, la importancia del presente estudio es que propone la evaluación y caracterización de extractos vegetales como potencial alternativo en el tratamiento terapéutico pulpar de dientes infantiles.

4. HIPÓTESIS

Los extractos vegetales de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *S. aromaticum*, *L. graveolens* y *A. vera* presentan propiedades como potencial alternativa en el tratamiento terapéutico pulpar.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Evaluar y caracterizar los extractos vegetales de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *S. aromaticum*, *L. graveolens* y *A. vera* mediante distintas pruebas como alternativa al tratamiento pulpar.

5.2. Objetivos Específicos

1. Obtener extractos etanólicos de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *S. aromaticum*, *L. graveolens*, y el liofilizado de *A. vera*.
2. Caracterizar fitoquímicamente de forma preliminar los extractos obtenidos por identificación parcial de compuestos presentes mediante reacciones coloridas y por medio de separaciones cromatográficas.
3. Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos sobre las bacterias *S. mutans* y *S. sobrinus* mediante la técnica de difusión en agar.
4. Evaluar la actividad coagulante de los extractos anteriormente obtenidos y verificar que no interfieran con el proceso de coagulación mediante las pruebas de TP (tiempo de protrombina) y TTPa (tiempo de tromboplastina parcial activado).
5. Determinar la citotoxicidad de los extractos a través del ensayo de FMCA (Fluorometric microculture cytotoxicity assay) en línea celular de cultivo de fibroblastos gingivales humanos.
6. Valorar y evaluar la expresión de citocinas TNF- α , IL-10 e IL-1beta en línea celular de cultivo de fibroblastos gingivales humanos.
7. Evaluar la respuesta pulpar en modelo animal murino en dientes de rata usando como agente de pulpotomía los extractos estudiados seleccionados y la solución de Buckley (formocresol) comparando histológicamente mediante análisis morfométrico las áreas de inflamación de la pulpa.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

La terapia pulpar en dientes primarios y permanentes jóvenes requiere un medicamento con propiedades clínicas que pueda ser utilizado para realizar pulpotomías como una alternativa segura al formocresol y que tenga propiedades ideales al tratamiento entre las que destacan: que sea antimicrobiano, que no interfiera con el proceso de coagulación y cicatrización, que no presente toxicidad, que no dañe la pulpa y que no interfiera con el proceso normal de reabsorción radicular, además que sea de fácil manipulación y colocación. Habiendo analizado las propiedades de cada uno se proponen los extractos de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *S. aromaticum*, *L. graveolens*, y el liofilizado de *A. vera* y se contempla la combinación de ellos y las concentraciones tras el análisis de resultados de cada prueba.

6.1. Obtención y preparación del material vegetal y el extracto

El material vegetal utilizado en este estudio fue obtenido de lugares reconocidos para su venta, recolectadas y autenticadas por el Dr. Mauricio González Ferrara. Se obtuvieron las plantas *M. tenuiflora* (tepezcohuite), *E. arvense* (cola de caballo), *S. aromaticum* (clavo), *L. graveolens* (orégano) y *A. vera* (sábila). La familia a la que pertenecen y los compuestos químicos, se muestran en la Tabla 6.1.






GÉNERO	ESPECIE	NOMBRE COMÚN	APLICACIÓN	COMP. QUÍMICOS	IMAGEN
<i>Mimosa</i>	<i>tenuiflora</i>	<i>tepezcohuite</i> <i>árbol de la piel</i>	Heridas, Quemaduras Antimicrobiano Analgésico Regenerativo Antiinflamatorio	Flavonoides Taninos Saponinas Alcaloides	
<i>Equisetum</i>	<i>arvense</i>	<i>cola de caballo</i>	Diurético Sangrados Antimicrobiano	Flavonoides Saponinas	
<i>Syzygium</i>	<i>aromaticum</i>	<i>clavo</i>	Analgésico Antiinflamatorio Antimicrobiano Antiséptico	Aceite esencial Eugenol Alcaloides Terpenos Cumarinas	
<i>Lippia</i>	<i>graveolens</i>	<i>orégano</i>	Analgésico Antiinflamatorio Antimicrobiano Antiséptico	Aceite esencial Timol Carbaccol Vitaminas Taninos Flavonoides	
<i>Aloe</i>	<i>vera</i>	<i>sábila</i>	Regenerar las células Analgésico Antiinflamatorio Cicatrizante Coagulante	Vitaminas Minerales Acido fólico	

Tabla 6.1. Género, especie, nombre común, aplicación y compuestos químicos presentes en las diferentes plantas seleccionadas.

M. tenuiflora (tepezcohuite). Lote de producción TCO001270818. El extracto etanólico se realizó a partir de la corteza seca y molida obteniéndose un líquido de color rojo oscuro y de olor característico que posteriormente del secado se convierte en polvo.

E. arvense (cola de caballo). Lote de producción CCP001071119. El extracto etanólico se realizó a partir de partes áreas secas y molidas obteniéndose un líquido de color verde y de olor característico que posteriormente del secado se convierte en una sustancia cremosa.

S. aromaticum (clavo). Lote de producción CLO190717. El extracto etanólico de esta planta se obtuvo de los botones secos y molidos y se obtuvo un aceite de color ámbar y de olor característico.

L. graveolens (orégano). Lote de producción ORO190720. El extracto etanólico de orégano fue a partir de las hojas secas y molidas obteniéndose un aceite de color ámbar y de olor característico.

A. vera (sábila). Se obtuvo un polvo blanco mediante liofilizado del gel.

Los extractos y el liofilizado se obtuvieron en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Los extractos se obtuvieron mediante soxhlet con muestras de entre 250 g y 1200 g cada una de las plantas. En la tabla 6.2 se muestra la parte seca y molida utilizada de cada producto vegetal.

Planta	Nombre común	Parte seca utilizada
<i>Mimosa tenuiflora</i>	Tepezcohuite	Corteza molida
<i>Equisetum arvense</i>	Cola de caballo	Partes aéreas molidas
<i>Syzygium aromaticum</i>	Clavo	Botones o girofles molidos
<i>Lippia graveolens</i>	Orégano	Hojas molidas
<i>Aloe vera</i>	Sábila	Gel liofilizado

Tabla 6.2. Plantas y parte utilizada.

El material vegetal seco y molido se colocó en diferentes soxhlet y se adicionaron 500 mL del solvente etanol durante 72 horas. Posteriormente se eliminó el solvente mediante un rotoevaporador a presión reducida y se filtró y se llevó a sequedad para obtener los rendimientos. Para obtener el liofilizado primero se obtuvo el extracto acuoso de *A. vera*, 250 g de la pulpa fueron macerados obteniendo el gel para posteriormente, filtrarse, congelarse y obtener el liofilizado. Los extractos fueron colocados en frasco ámbar estéril a temperatura de 4°C para su conservación y posterior empleo (Figura 6.1).

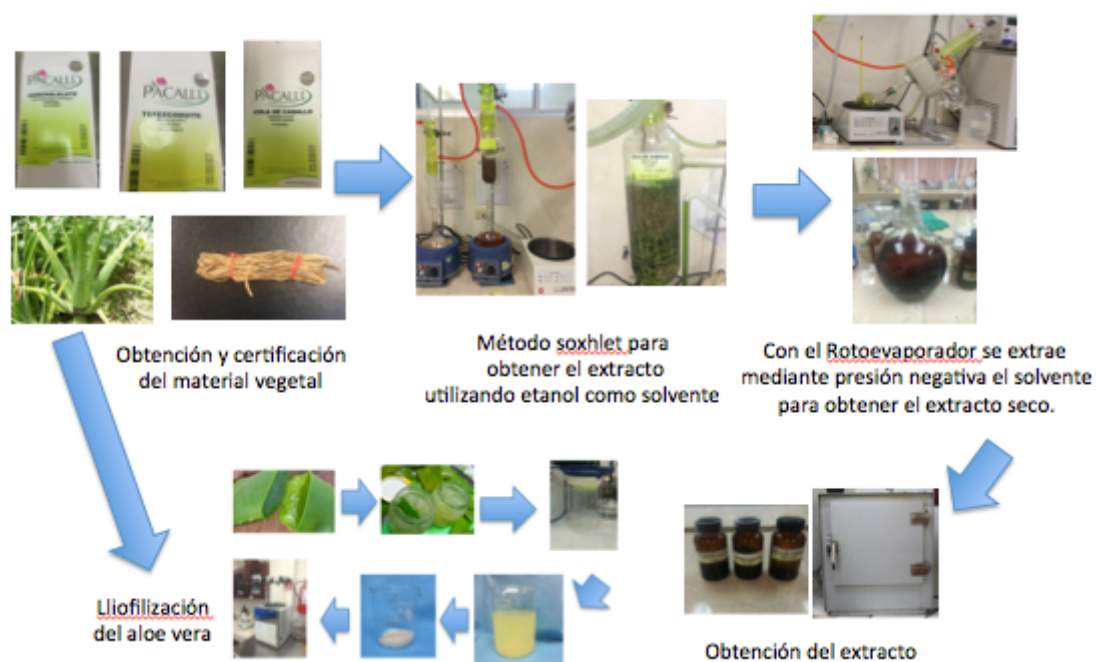


Figura 6.1. Proceso que muestra la obtención de los extractos y el liofilizado de *A. vera*.

6.2. Análisis Fitoquímico

Una vez obtenidos los extractos se realizó el análisis fitoquímico preliminar para la identificación parcial de compuestos presentes mediante reacciones colorimétricas y cromatografía en capa fina empleando diversos sistemas eluentes para caracterizar el extracto mediante sus factores de retención. La tabla 6.3 nos muestra las diferentes pruebas fitoquímicas a realizar.

Prueba	Compuesto a identificar
Permanganato de potasio	Dobles enlaces
Dinitrofenilhidrazona	Grupo carbonilo
Liebermann-Buchard	Esteroles y triptenos
Hidróxido de sodio	Cumarinas
Bajlet	Sesquiterpenlactonas
Ácido sulfúrico	Quinonas
Bicarbonato de sodio	Grupo carboxilo
Dragendorff	Alcaloides
Cloruro férrico	Taninos
Saponinas	Saponinas
Shinoda	Flavonoides
Antrona	Carbohidratos

Tabla 6.3. Diferentes pruebas fitoquímicas.. La primera columna muestra el nombre de la prueba realizada y la segunda corresponde al compuesto a identificar.

6.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos

Se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos de *M. Tenuiflora*, *E. Arvense*, *S. aromaticum*, *L. graveolens* y *A. vera* contra cepas bacterianas de *S. mutans* (ATCC700611) y *S. sobrinus* (ATCC33478) procedentes del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS). Los estudios experimentales in vitro se realizaron con cepas procedentes de la American Type Culture Collection y fueron elegidas por ser consideradas

como los principales microorganismos causantes de la caries y las patologías pulpares entre las que destaca la pulpitis. La evaluación de la actividad antimicrobiana se realizó mediante prueba de técnica de pozo en agar (Figura 6.2).

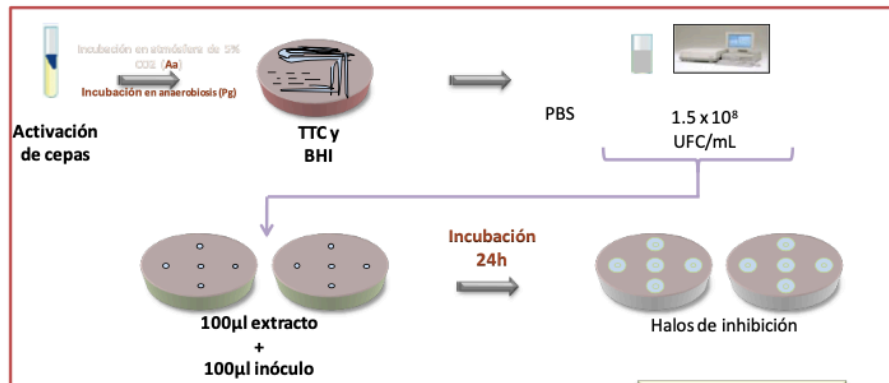


Figura 6.2. Técnica de pozo en agar.

Se preparó inicialmente una suspensión de microorganismos a 0.05 de la escala de Mc Farland, lo cual representa 1×10^6 UFC/mL y se evaluaron concentraciones de 250-3000 ppm de cada extracto. Se inocularon y sembraron 100µL de cada cepa sobre medio de cultivo Muller Hinton. Se fabricaron los extractos con las diferentes plantas y en cada ensayo se respetó el siguiente orden metodológico *M. Tenuiflora* (1), *E. Arvense* (2), *S. aromaticum* (3), *L. graveolens* (4), y *A. vera* (5) en diferentes concentraciones y se empleó la técnica de pozo en agar para probar si los extractos presentaban actividad antimicrobiana. Se realizaron cinco pozos en el agar y se adicionarán 20µL de cada extracto a evaluar. Las cajas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas para evaluar posteriormente la actividad (Figura 6.3).

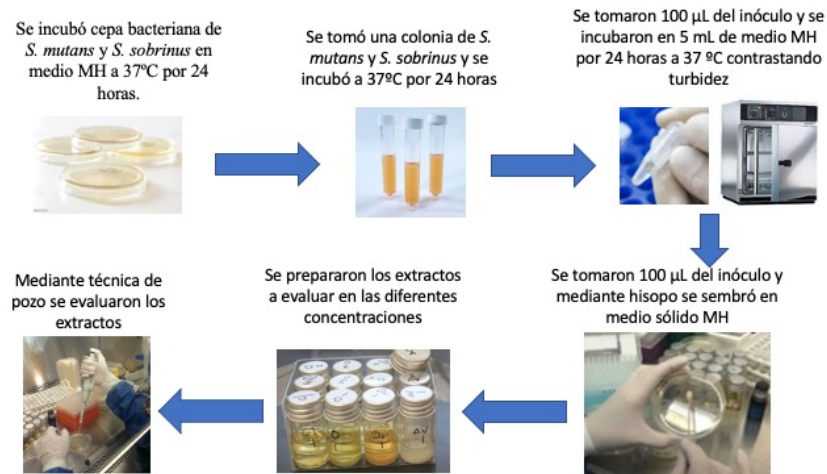


Figura 6.3. Proceso para evaluar la actividad antimicrobiana.

6.3.1. Evaluación de la viabilidad celular mediante ensayo MTT

Mediante ensayo MTT de viabilidad celular (actividad metabólica) se determinó la actividad antimicrobiana de la formulación en varias combinaciones sobre las bacterias de estudio. Para las pruebas se utilizaron una placa de 96 pozos para *S. mutans* (ATCC700611) y una para *S. Sobrinus* (ATCC33478) probando los extractos en combinaciones y en diferentes concentraciones. Se preparó inicialmente una suspensión de microorganismos a 0.05 de la escala de Mc Farland, lo cual representa 1×10^6 UFC/mL y se evaluaron concentraciones de 125-1000 ppm de cada extracto. Se colocaron 100µL de medio en cada pozo agregando 10µL de bacteria y 10µL de extracto en las diferentes concentraciones. Los platos de cultivo se dejaron incubar durante 24h a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. Posteriormente se prepararon 0.2mg/mL de la sal de MTT y se agregan 100µL de MTT a cada pocillo de cultivo dejando incubar de 4-7h a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. La placa se introduce en el lector de microplacas y se realiza la lectura de absorbancia (densidad óptica) a 570 nm (Figura 6.4).



Figura 6.4. Proceso para evaluar la viabilidad celular.

Se identificó el nivel de citotoxicidad con base a la Norma ISO 10993 la cual evalúa la toxicidad celular *in vitro* de los productos describiendo los métodos de ensayo. En los métodos se describe la incubación de las células de cultivo al ponerse en contacto con un producto describiendo la clasificación de citotoxicidad el cual se realiza basado en el porcentaje de viabilidad celular considerando no citotóxico con una viabilidad celular de 100 a 75%; ligeramente citotóxico con una viabilidad celular de 74 a 50%; moderadamente citotóxico con una viabilidad celular de entre 49 a 25% y extremadamente citotóxico con una viabilidad celular de entre 24 a 0%.

6.4. Evaluación de la actividad coagulante de los extractos

6.4.1. Obtención de la muestra biológica

La actividad coagulante de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *S. aromaticum*, *L. graveolens* y *A. vera* se analizó mediante pruebas de coagulación para verificar que los extractos no interfirieran con el proceso de coagulación. Se midieron los tiempos TP (tiempo de protrombina) y TTPa (tiempo de tromboplastina parcial activado) verificando el comportamiento del extracto en muestras de sangre venosa humana previa selección del paciente y verificando que cumpliera con las condiciones para la prueba. Se identificó al paciente, se le pidió que firmara la hoja de consentimiento informado para la toma y procesamiento de muestra, se extrajeron

muestras de sangre venosa periférica del donante sano colocándola en tubos de 4.5 mL (Vacutainer®) los cuales contenían citrato de sodio al 3.2% según los protocolos establecidos, posteriormente se enviaron las muestras al laboratorio certificado para obtener los resultados. La figura 6.5 muestra el proceso para realizar las pruebas de coagulación.

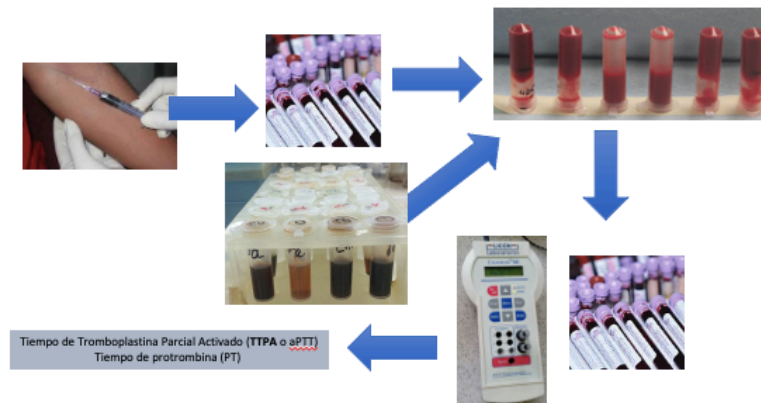


Figura 6.5. Proceso para evaluar la actividad coagulante.

6.4.2. Evaluación del efecto anticoagulante in vitro

La muestra de sangre humana se recolectó y centrifugó la muestra de sangre a 5000 rpm por quince minutos, posteriormente se colocó 2.9mL de plasma a seis tubos, uno representó el control y a los siguientes tubos se agregaron 100μL de cinco extractos a diferentes concentraciones realizando un triplicado de cada uno. Las muestras se incubaron por cinco minutos a 37°C para posteriormente realizar la mediante el coagulómetro expresando los resultados en segundo, el instrumento marca exactamente el momento en el que se produce el coágulo, para todas las concentraciones se procede de la misma manera verificando por triplicado.

6.5. Evaluación de la actividad citotóxica mediante ensayo FMCA (Fluorometric microculture cytotoxicity assay)

Se midió la viabilidad celular a través del ensayo de citotoxicidad de microcultivo fluorométrico (FMCA) (Figura 6.6).

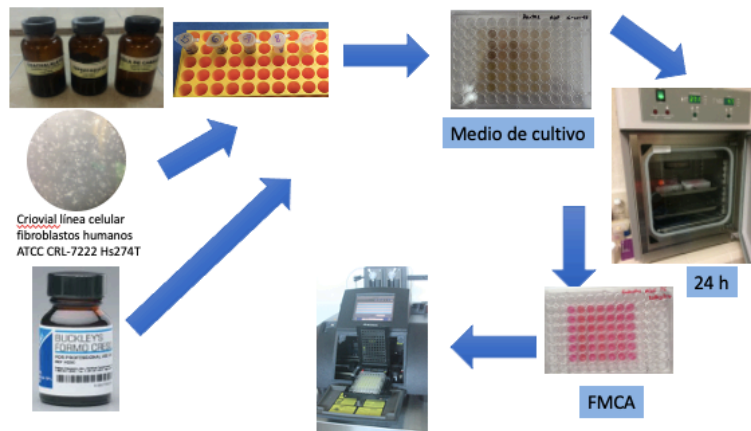


Figura 6.6. Esquema que muestra el ensayo FMCA (Fluorometric microculture cytotoxicity assay).

Para el ensayo se dispuso de fibroblastos gingivales humanos (HFG-1) de ATCC CRL-7222. Previo al procedimiento se preparó el medio de cultivo introduciendo los contenedores donde se encuentran los fibroblastos (a -80°C) en agua destilada a 37°C hasta descongelar. Se colocaron los fibroblastos en una caja de Petri con una micropipeta agregando 10mL de medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium). Posteriormente se colocó en la incubadora a 37°C , 5% de CO_2 y una atmósfera de 95% de humedad. Se agregó 1 mL de tripsina EDTA para desprender las células incubando a 37°C con 5% de CO_2 durante 5 minutos y comprobar con ayuda del microscopio el desprendimiento celular. Para neutralizar la reacción provocada por la tripsina EDTA con las células despegadas, se agregó medio de cultivo a 4 veces el volumen (4 mL) de tripsina EDTA, se centrifugaron las células, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet agregando medio de cultivo fresco. Se procedió al conteo de células, utilizando una cámara de Neubauer. Enfocadas las células, se procedió a realizar el conteo. Posteriormente se sembraron las células, se colocaron en cada pozo con los diferentes extractos en las diferentes concentraciones y por triplicado llevando a incubadora de CO_2 a 37°C por 24 horas, posteriormente se eliminó el extracto y se añadió el FMCA para leer las unidades de fluorescencia mediante espectroscopia. Para evaluar la viabilidad celular se cuantificó la intensidad de fluorescencia proporcional a la cantidad de células vivas posterior al tratamiento, considerando como control el 100% de viabilidad celular se obtuvo el porcentaje de células vivas en cada experimento por triplicado. La figura 6.7 muestra el ensayo.

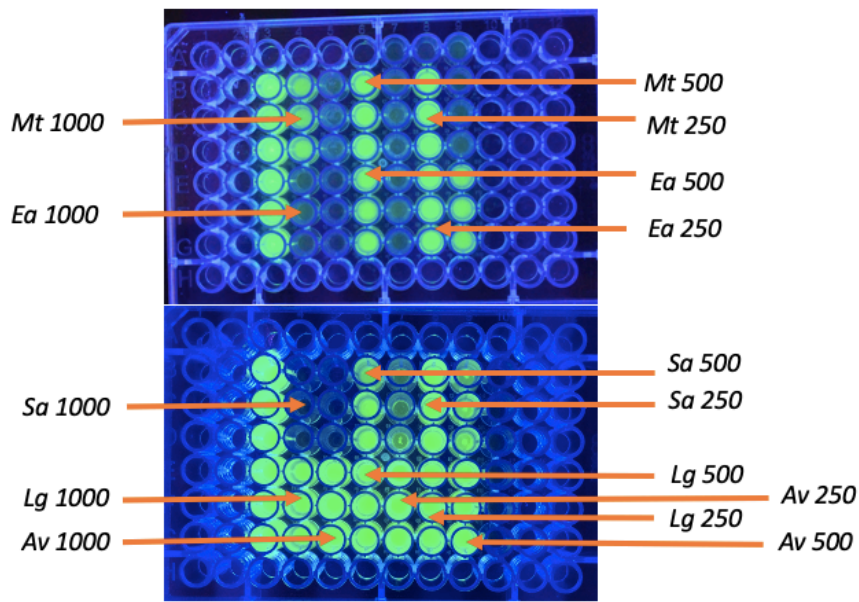


Figura 6.7. Ensayo FMCA (Fluorometric microculture cytotoxicity assay) para evaluar los extractos de *M. Tenuiflora* (Mt), *E. Arvensis* (Ea), *S. aromaticum* (Sa), *L. graveolens* (Lg), y *A. vera* (Av).

Para evaluar la toxicidad celular se consideró la Norma ISO 10993 la cual evalúa la toxicidad celular *in vitro* de los productos describiendo los métodos de ensayo. En los métodos se describe la incubación de las células de cultivo al ponerse en contacto con un producto describiendo la clasificación de citotoxicidad el cual se realiza basado en el porcentaje de viabilidad celular considerando no citotóxico con una viabilidad celular de 100 a 75%; ligeramente citotóxico con una viabilidad celular de 74 a 50%; moderadamente citotóxico con una viabilidad celular de entre 49 a 25% y extremadamente citotóxico con una viabilidad celular de entre 24 a 0%.

6.6. Evaluación y expresión de citocinas en fibroblastos gingivales humanos expuestos a los extractos en diferentes concentraciones

Para este ensayo se utilizaron fibroblastos gingivales humanos ATCC CRL-7222 obtenidos del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Se realizó el cultivo celular de acuerdo con las recomendaciones de la ATCC agregando medio D-MEM suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) al 10%, 100 U/mL de penicilina, 100 ug/mL de estreptomycin (SIGMA, USA) a 37°C durante 2 minutos.

Posteriormente se procedió a inactivar la tripsina con medio DMEM para centrifugar durante cinco minutos a 2000rpm. Se realizó el ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (ELISA) para poder establecer los perfiles de las citocinas. Fueron utilizadas cajas de cultivo colocando 500,000 células por caja manteniendo la misma proporción de células que en la prueba de citotoxicidad. Posterior a las 24 horas se tomaron los sobrenadantes colocándolos a -70°C hasta su uso y determinar la concentración de las interleucinas adicionando los extractos de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *S. aromaticum*, *L. graveolens* y *A. vera* a diferentes concentraciones.

6.6.1. Preparación del stock

Para este ensayo se prepararon tres soluciones stock de extractos de la siguiente manera:

Stock	mg/mL	ppm
1	50	50000
2	5	5000
3	.5	500

Tabla 6.4. Preparación de soluciones stock para la medición de citocinas.

La siguiente tabla muestra el diseño para la colocación de los extractos en los pozos para probar las diferentes concentraciones. Se siguió el protocolo indicado en el inserto del Kit con una sensibilidad menor a 60pg/mL y posteriormente se procedió a las lecturas a 450 nm en un lector de placas.

Diseño para colocación de extracto en pozos utilizando las diferentes soluciones stock			
ppm del Extracto	ppm	Stock	Colocar
500 ppm/200 μL	50000	1	2 μL de extracto stock 1
250 ppm/200 μL	50000	1	1 μL de extracto stock 1
100 ppm/200 μL	50000	1	.4 μL de extracto stock 1
50 ppm/200 μL	5000	2	2 μL de extracto stock 2
10 ppm/200 μL	5000	2	.4 μL de extractos stock 2
1 ppm/200uL (pozo)	500	3	.4 uL de extractos stock 3

Tabla 6.5. Diseño para la colocación de los extractos en los pozos para probar las diferentes concentraciones.

6.7. Evaluación en modelo animal para determinar la respuesta inflamatoria en pulpa dental

Previo consentimiento del Comité de Bioética (Anexo 1) se realizó un ensayo “in vivo” en dientes de rata Sprague Dawley. La muestra para este estudio fue de 21 especímenes hembras de la raza Sprague-Dawley cuyo peso osciló entre 150 y 250 gramos, procedentes del bioterio de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT), las cuales fueron enviadas por paquetería de aerolínea comercial con su correspondiente certificado zoosanitario emitido por la UJAT y por la SAGARPA (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural). Las ratas fueron recibidas y adaptadas en el bioterio de la Unidad de Apoyo e Investigación en Modelos Biológicos del CIDICS (Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (Figura 6.8).



Figura 6.8. Elección y transporte del modelo animal procedentes del bioterio de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT) vía Aeroméxico con su correspondiente certificado zoosanitario emitido por la UJAT y por la SAGARPA (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural).

Por sus condiciones de adaptación ambiental, fisiología, genética y su embriogénesis similar al humano se eligió la rata Sprague-Dawley. El experto en veterinaria recomendó dos a tres semanas de adaptación desde la llegada de los especímenes al bioterio del centro de investigación para comenzar el tratamiento ya que este tiempo de adaptación se considera indispensables para trabajar en cualquier modelo animal, durante los días de adaptación se les peso y proporcionó alimento, el cual consistió en 200g de nutricubos por semana y 350 mL de agua *ad libitum* (libre demanda).

6.7.1. Grupos de estudio para el ensayo en el modelo animal

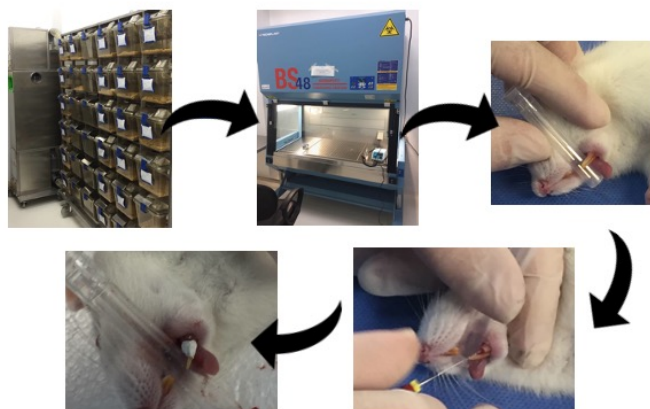


Figura 6.10. Proceso de ensayo en modelo animal.

Todos los especímenes fueron tratados en una estación o cabina de bioseguridad Beli Tecniplast BS48 y sometidos a anestesia de corta duración sugerida por el veterinario (Figura 6.11). El tratamiento pulpar se realizó según la técnica propuesta por Boj y cols. (2007). A partir de la llegada de los especímenes, esperamos dos semanas para adaptación del modelo animal en sus jaulas con supervisión constante, alimento y agua. Se obtuvo el peso de cada espécimen, para la inducción del anestésico a la rata se utilizó la vía intraperitoneal ya que 10 minutos después de la inoculación del anestésico el animal entra en anestesia profunda dando un tiempo de trabajo mayor a media hora; tiempo suficiente para la realización del tratamiento. El tratamiento consistió en desgaste del diente con fresa de carburo no. 699 y posteriormente, la apertura del diente para ingresar y ampliar la cámara pulpar con fresa de carburo no. 0.05 de baja velocidad colocada en contrángulo en un motor de baja velocidad. Se procede a la extirpación de la pulpa cameral con un excavador o cucharilla de dentina lavando con suero fisiológico y algodón estéril, posteriormente se colocó el medicamento que correspondía a cada espécimen con un algodón o punta de papel ligeramente humedecido en solución de formocresol de Buckley (Grupo A) y los extractos combinados en formulación (Grupo B), presionando ligeramente durante 4 minutos. Se retiró el algodón para observar los muñones pulpares en cuanto a su coloración y condición (Figura 6.12). Finalmente, se procedió a la obturación de la cavidad con una mezcla de óxido de zinc y eugenol (cemento IRM de la casa comercial DENTSPLY CAULK®) el cual se condensó suavemente sobre el piso de la cámara con torundas de algodón estéril e inmediatamente después realizar la obturación definitiva del diente. Los especímenes se mantuvieron en recuperación y

observación por dos horas en una jaula a temperatura ambiente y al pasar el efecto anestésico se les ofreció agua y alimento en forma normal. Los animales permanecieron durante el tiempo de estudio en el bioterio a una temperatura de 20-25°C, con una humedad del 60-65% y con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas diarias revisando su peso, alimentación e higiene diariamente.

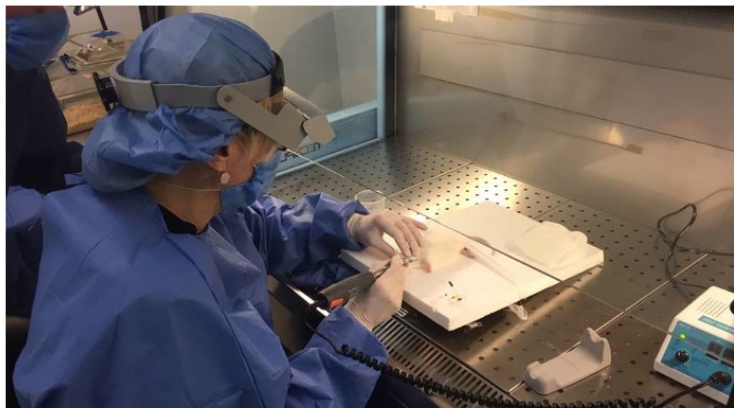


Figura 6.11. Tratamiento del espécimen en la cámara de seguridad.

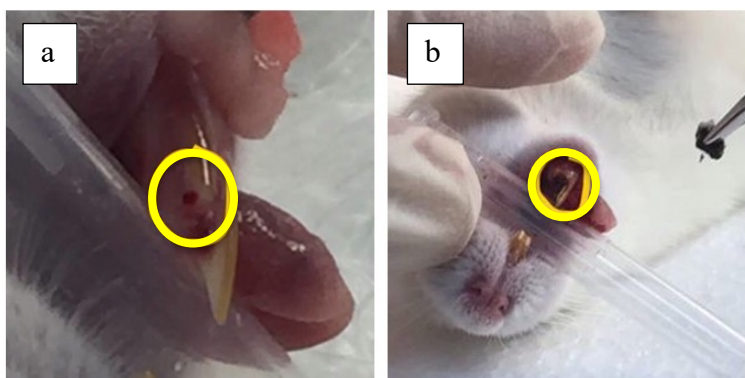


Figura 6.12. Muñones pulpaes posterior al tratamiento con formulación (a) y formocresol (b).

Posteriormente los especímenes fueron sacrificados a las 72 horas (3 días), 8 días y 15 días en grupos de 3 ratas mediante la técnica de sobredosis de anestesia. Cada sacrificio fué de 7 ratas, de las cuales, 3 ratas habían sido tratadas con formocresol, 3 ratas tratadas con extractos y 1 rata control.

La programación del sacrificio de las ratas fue de la siguiente manera: El grupo A se sacrificó a las 72 horas después de la pulpotomía, el grupo B se sacrificó a los 8 días después de la pulpotomía y el grupo C se sacrificó a los 15 días después de la pulpotomía. Se estableció un cronograma de actividades de trabajo por día y una vez sacrificadas las ratas, se realizó la disección de la mandíbula para proceder a su estudio histológico. Las muestras obtenidas se colocaron en frascos con solución de formol al 10%, cada uno debidamente etiquetado según su grupo y número de rata (Figura 6.13). Posteriormente las muestras de las secciones de hemimaxila se descalcificaron en una solución de ácido fórmico y ácido clorhídrico en los tiempos establecidos para la muestra. Una vez descalcificadas las muestras, se colocaron en las rejillas para procesar el tejido mediante la técnica histológica utilizando coloración de HyE (hematoxilina y eosina) y posteriormente los dientes fueron analizados histológicamente mediante análisis morfométrico de áreas de inflamación al microscopio óptico (Figura 6.14).

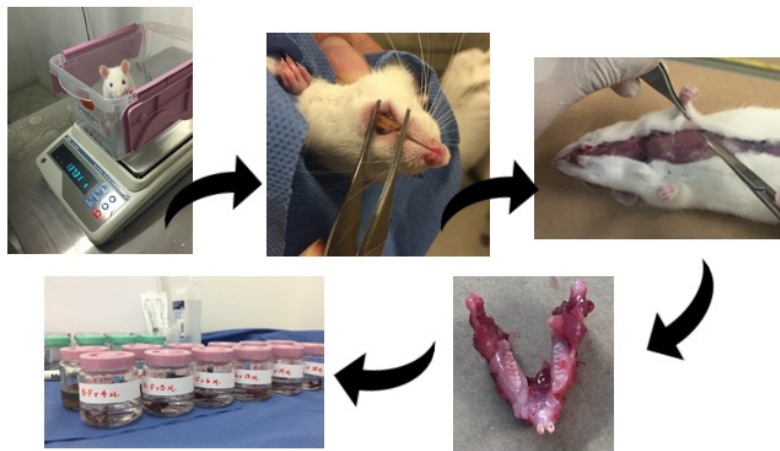


Figura 6.13. Proceso de sacrificio, obtención de mandíbula y colocación en formol al 10%.

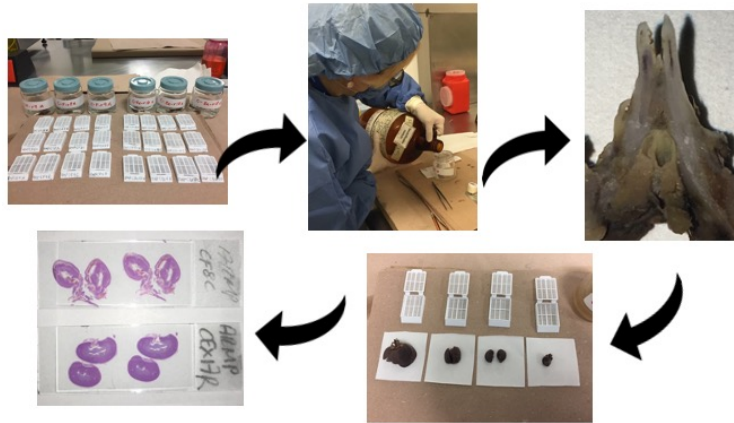


Figura 6.14. Proceso que muestra la descalcificación de la mandíbula para procesar mediante la técnica histológica.

Los cortes fueron procesados en el Departamento de Patología del Hospital Universitario de la UANL. Al obtener las muestras se procedió a realizar el análisis histopatológico para determinar la respuesta pulpar de cada diente. La evaluación histológica y la respuesta pulpar al formocresol y los extractos de todas las muestras fue realizada por un anatómopatólogo y el análisis histológico de los dientes consistió en evaluar el tercio superior, medio y apical de la pulpa. Para la lectura en el microscopio óptico se utilizaron los objetivos panorámico 4x, 10x y 40x y se procedió al llenado de la ficha de recolección de datos. La tabla 6.6 muestra los criterios para la evaluación histológica de la respuesta de las células.

Criterios para la evaluación histológica: Respuesta de la pulpa	
Sana	Pulpa sana con reparación celular.
Muy leve	Edema, congestión vascular, ausencia de inflamación.
Leve	Edema, congestión vascular, focos hemorrágicos, infiltrado agudo o crónico.
Moderado	Edema, congestión vascular, infiltrado agudo o crónico que sobrepasa pulpa coronal.
Severo	Edema, congestión vascular, infiltrado agudo o crónico que sobrepasa hasta pulpa radicular.
Necrosis	Ausencia de células y/o tejido pulpar

Tabla 6.6. Criterios para la evaluación histológica.

6.8. Análisis estadístico

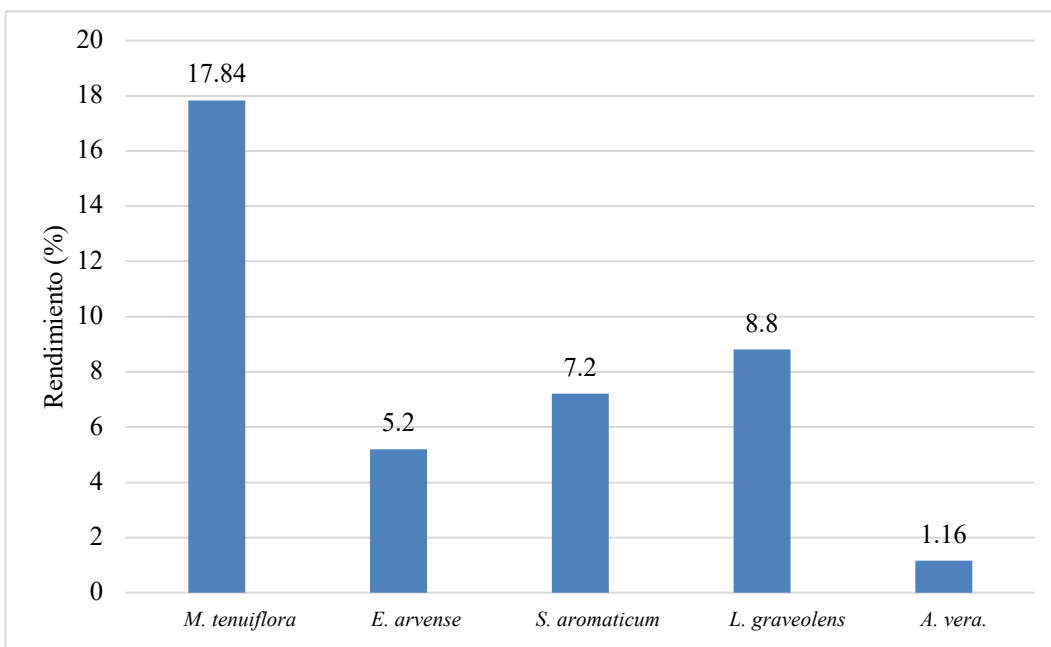
Para el análisis estadístico de cada ensayo se empleó el programa estadístico IBM SPSS (Statistical Program for Social Sciences) versión 26.0. Para evaluar la obtención y rendimiento de los extractos se realizó estadística descriptiva. Para evaluar las propiedades antimicrobianas y el ensayo de viabilidad celular con MTT de los extractos se realizaron tres repeticiones y los datos se analizaron por medio de una prueba t de student con diferencia de medias con 95% de Intervalo de Confianza (IC) y un valor $p < 0.05$. Para las pruebas de coagulación, citotoxicidad y citocinas se realizaron tres repeticiones, y los datos se analizaron por medio de una prueba t de student con un IC del 95% ($p < 0.05$). Para el modelo animal se realizó estadística descriptiva y por las condiciones de la variable a evaluar se estima el tamaño de la muestra con la aplicación de la siguiente fórmula general:

7. RESULTADOS

7.1. Obtención y rendimiento de los extractos

Se obtuvieron los extractos de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *S. aromaticum*, *L. graveolens* y *A. vera*. En el gráfico 7.1 se observa el rendimiento en porcentaje obtenido de cada planta en donde destaca *M. tenuiflora* con un rendimiento de 17.84%.

Gráfico 7.1. Rendimiento del proceso de extracción en peso seco de cada planta. La primera columna muestra un 17.84 % de rendimiento de *M. tenuiflora*, la segunda columna un 5.2 % de *E. arvense*, la tercer columna muestra un 7.2 % de *S. aromaticum*, La cuarta columna un 8.8 % de rendimiento de *L. graveolens*, y finalmente un 1.16 % de *A. vera*.



7.2. Pruebas fitoquímicas

En los resultados obtenidos en las pruebas fitoquímicas, destacan compuestos con dobles enlaces, grupo carbonilo, esteroides y triterpenos. La tabla 7.1 muestra diferentes pruebas fitoquímicas realizadas a *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *S. aromaticum*, *L. graveolens* y *A. vera*. La primera columna muestra el nombre de la prueba realizada, la siguiente corresponde al compuesto a identificar y posteriormente los resultados observados (Tabla 7.1).

M. tenuiflora, *E. arvense*, *S. aromaticum* y *L. graveolens* presentaron esteroides y triterpenos, importantes componentes con propiedades o actividad antiinflamatoria, antimicrobiana,

antitumoral y antiviral, además los extractos de *M. tenuiflora*, *S. aromaticum* y *L. graveolens* dieron positivo a sesquiterpenlactonas, taninos y flavonoides, los cuales brindan propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias y antioxidantes y *A. vera* considerado un regenerador celular fué positivo para saponinas, importantes en actividad antioxidante, surfactante y antiinflamatoria. Todas estas propiedades encontradas resultan de gran beneficio en la terapéutica pulpar. Al combinar los cinco extractos en un medicamento o formulación tepezcohuite, cola de caballo, clavo y orégano aportan efecto antimicrobiano y antiinflamatorio, tepezcohuite brinda opción como cicatrizante y reparador de tejido conectivo y sábila acción antioxidante y antiinflamatoria.

Prueba	Compuesto a identificar	Resultados				
		<i>Mt</i>	<i>Ea</i>	<i>Sa</i>	<i>Lg</i>	<i>Av</i>
Permanganato de potasio	Dobles enlaces	+	+	+	+	+
Dinitrofenilhidrazona	Grupo carbonilo	+	+	+	+	-
Liebermann-Buchard	Esteroles y triterpenos	+	+	+	+	-
Hidróxido de sodio	Cumarinas	-	+	+	+	-
Bajlet	Sesquiterpenlactonas	+	-	+	+	-
Ácido sulfúrico	Quinonas	+	-	+	+	-
Bicarbonato de sodio	Grupo carboxilo	-	-	-	-	+
Dragendorff	Alcaloides	+	-	-	-	-
Cloruro férrico	Taninos	+	-	+	+	-
Saponinas	Saponinas	-	-	-	-	+
Shinoda	Flavonoides	+	-	+	+	-
Antrona	Carbohidratos	+	+	-	+	+

Tabla 7.1. Identificación química de grupos funcionales presentes en los extractos de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *S. aromaticum*, *L. graveolens*, y *A. vera*.

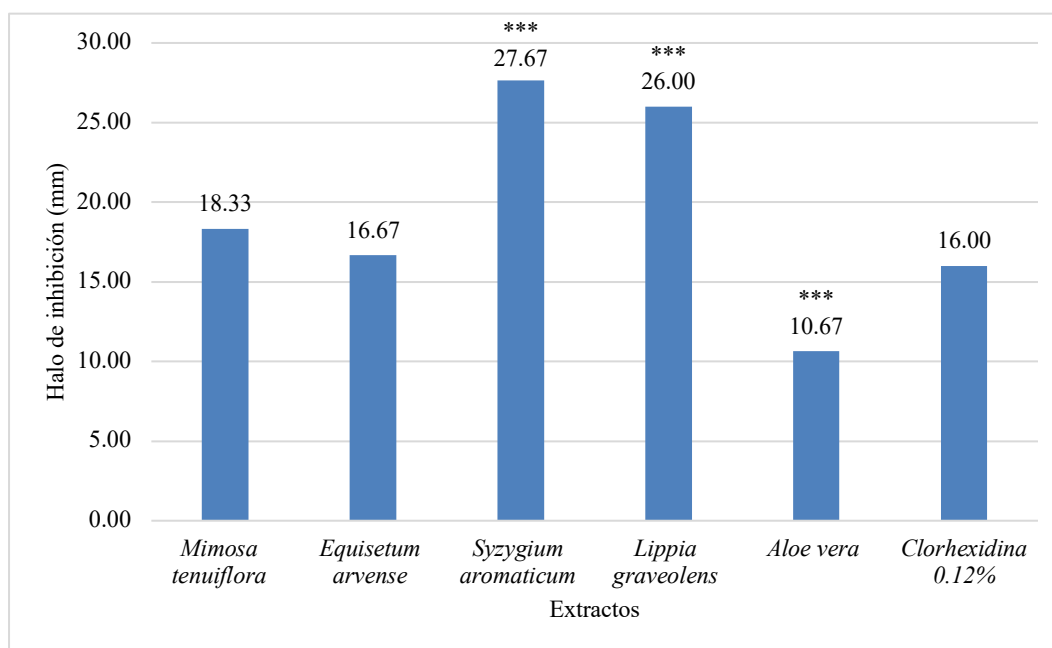
7.3. Actividad antimicrobiana de los extractos

Los siguientes gráficos muestran la media de los halos de inhibición de los diferentes extractos en sus distintas concentraciones comparando con el control positivo que fue clorhexidina al 0.12% la cual se eligió por ser utilizada en odontología en el manejo clínico de pacientes contra *S. mutans* y *S. sobrinus*. Se consideró significación estadística una

$p < 0.05$. Podemos observar que contra *S. mutans*, *S. aromaticum* presenta efecto antimicrobiano a 3000 ppm, *E. arvense*, y *L. graveolens* presentan mejor efecto inhibitorio en concentraciones de 3000, 2000, 1000 y 500 ppm, sin embargo, al disminuir la concentración a 500 y 250 ppm *E. arvense*, *S. aromaticum* disminuyen el efecto inhibitorio mientras que el efecto de *L. graveolens* se mantiene a 500 ppm ($p = 0.0000$) y a 250 ppm ($p = 0.0001$).

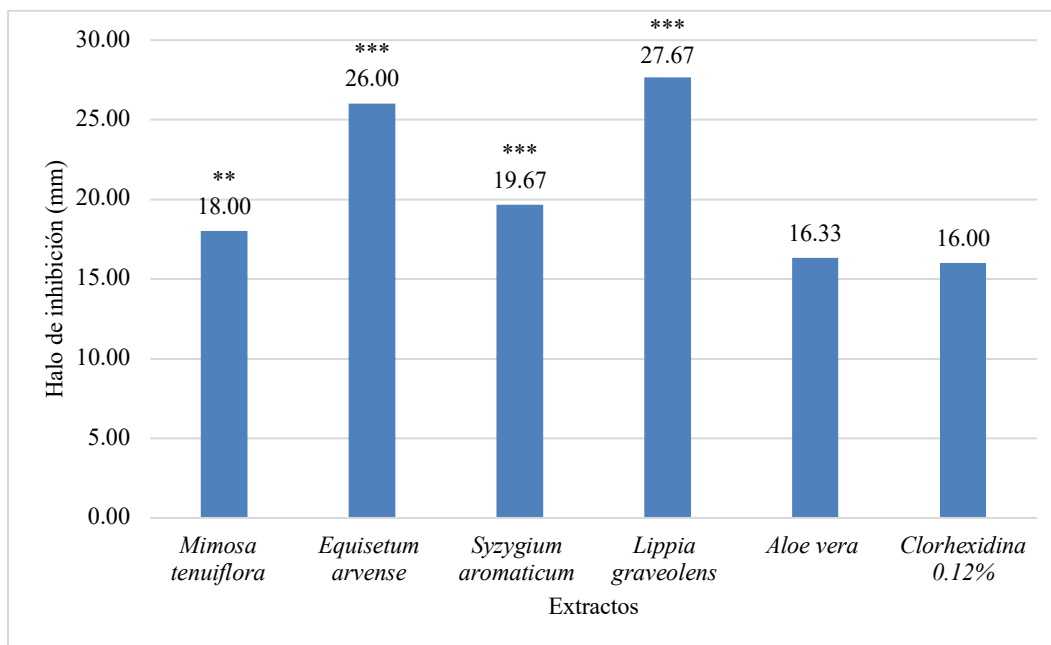
El gráfico 7.2 muestra la actividad antimicrobiana de los extractos de las plantas de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *S. aromaticum*, *L. graveolens* y *A. vera* sobre cepas de *S. mutans* a 3000 ppm en donde se observa una diferencia estadística altamente significativa de los extractos de *S. aromaticum* y *L. graveolens* ($p = 0.000$) los cuales muestran un efecto antimicrobiano superior a clorhexidina.

Gráfico 7.2. Actividad antimicrobiana de los extractos de las plantas de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *S. aromaticum*, *L. graveolens*, y *A. vera* sobre cepas de *S. mutans*. Concentración 3000 ppm. Las barras representan el promedio del triplicado de tres ensayos totalmente independientes.



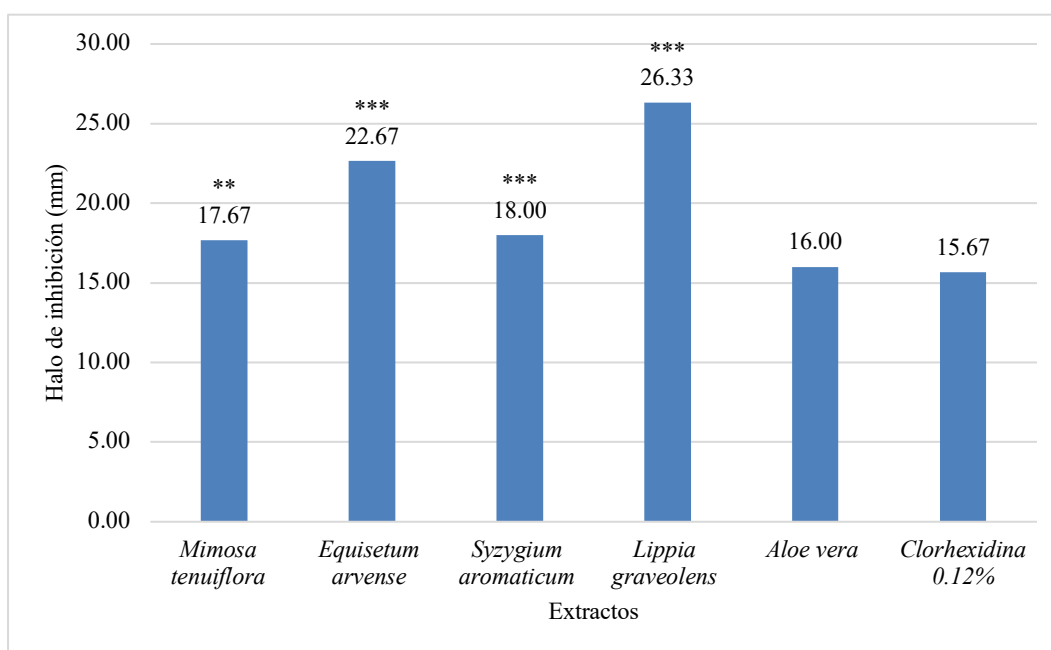
El gráfico 7.3 muestra la actividad antimicrobiana de los extractos de las plantas de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *S. aromaticum*, *L. graveolens* y *A. vera* sobre cepas de *S. mutans* a 2000 ppm en donde se observa una diferencia estadística altamente significativa de los extractos de *E. arvense* y *L. graveolens* ($p= 0.0005$) y ($p= 0.0000$) respectivamente, los cuales muestran un efecto antimicrobiano superior a clorhexidina.

Gráfico 7.3. Actividad antimicrobiana de los extractos de las plantas de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *S. aromaticum*, *L. graveolens*, y *A. vera* sobre cepas de *S. mutans*. Concentración 2000 ppm. Las barras representan el promedio del triplicado de tres ensayos totalmente independientes.



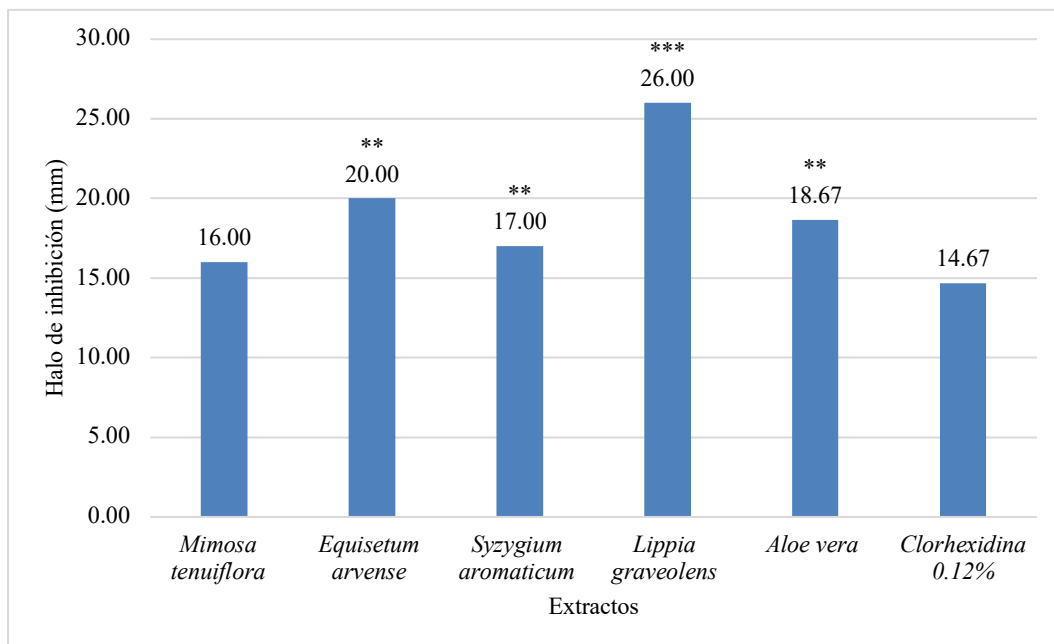
El gráfico 7.4 muestra la actividad antimicrobiana de los extractos de las plantas de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *S. aromaticum*, *L. graveolens* y *A. vera* sobre cepas de *S. mutans* a 1000 ppm en donde se observa una diferencia estadística altamente significativa de los extractos de *E. arvense* y *L. graveolens* ($p= 0.0001$) los cuales muestran un efecto antimicrobiano superior a clorhexidina.

Gráfico 7.4. Actividad antimicrobiana de los extractos de las plantas de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *S. aromaticum*, *L. graveolens*, y *A. vera* sobre cepas de *S. mutans*. Concentración 1000 ppm. Las barras representan el promedio del triplicado de tres ensayos totalmente independientes.



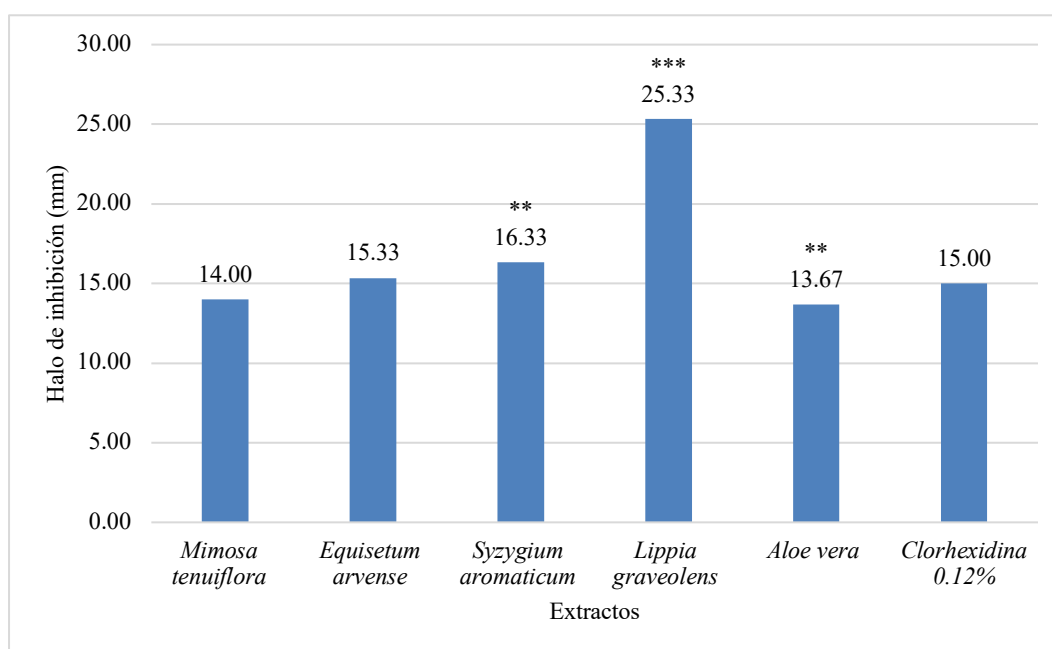
El gráfico 7.5 muestra la actividad antimicrobiana de los extractos de las plantas de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *S. aromaticum*, *L. graveolens* y *A. vera* sobre cepas de *S. mutans* a 500 ppm en donde se observa una diferencia estadística altamente significativa de los extractos de *E. arvense* y *L. graveolens* ($p= 0.0057$) y ($p= 0.0000$) respectivamente, los cuales muestran un efecto antimicrobiano superior a clorhexidina.

Gráfico 7.5. Actividad antimicrobiana de los extractos de las plantas de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *S. aromaticum*, *L. graveolens*, y *A. vera* sobre cepas de *S. mutans*. Concentración 500 ppm. Las barras representan el promedio del triplicado de tres ensayos totalmente independientes.



El gráfico 7.6 muestra la actividad antimicrobiana de los extractos de las plantas de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *S. aromaticum*, *L. graveolens* y *A. vera* sobre cepas de *S. mutans* a 250 ppm en donde se observa una diferencia estadística altamente significativa del extracto *L. graveolens* ($p= 0.0001$) el cual muestra un efecto antimicrobiano superior a clorhexidina.

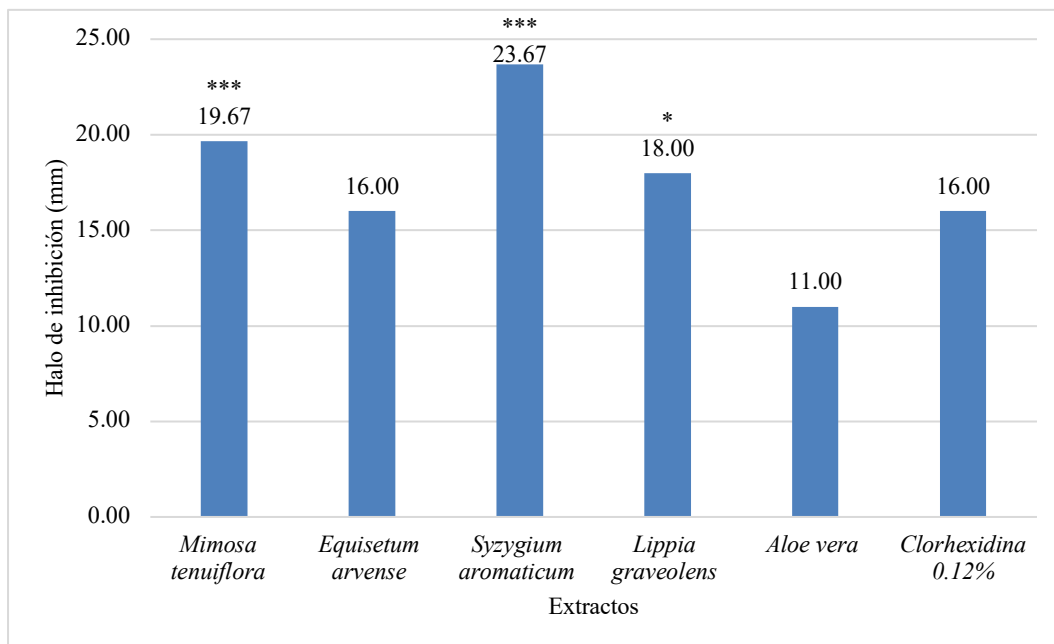
Gráfico 7.6. Actividad antimicrobiana de los extractos de las plantas de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *S. aromaticum*, *L. graveolens*, y *A. vera* sobre cepas de *S. mutans*. Concentración 250 ppm. Las barras representan el promedio del triplicado de tres ensayos totalmente independientes.



En cuanto a la actividad de los extractos contra cepas bacterianas de *S. sobrinus* podemos observar que *M. tenuiflora* y *S. aromaticum* presentan mejor efecto inhibitorio en concentraciones de 3000 ppm mientras que en concentraciones de 2000, 1000 y 500 ppm *L. graveolens* presentó mejor efecto inhibitorio y a 250 ppm *S. aromaticum* ($p= 0.0011$) y *L. graveolens* ($p= 0.0581$) presentan efecto inhibitorio similar a la sustancia control.

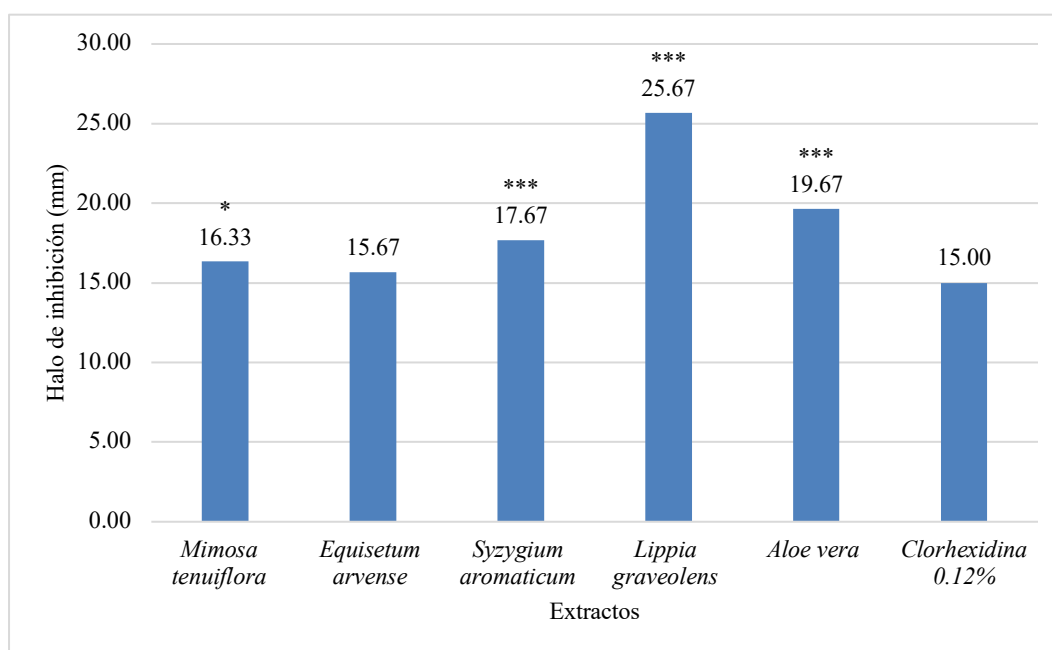
El gráfico 7.7 muestra la actividad antimicrobiana de los extractos de las plantas de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *S. aromaticum*, *L. graveolens* y *A. vera* sobre cepas de *S. sobrinus* a 3000 ppm en donde se observa una diferencia estadística altamente significativa de los extractos de *M. tenuiflora* ($p= 0.0002$), *S. aromaticum* ($p= 0.0005$) y *L. graveolens* ($p= 0.0005$), los cuales muestran un efecto antimicrobiano superior a clorhexidina.

Gráfico 7.7. Actividad antimicrobiana de los extractos de las plantas de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *S. aromaticum*, *L. graveolens*, y *A. vera* sobre cepas de *S. sobrinus*. Concentración 3000 ppm. Las barras representan el promedio del triplicado de tres ensayos totalmente independientes.



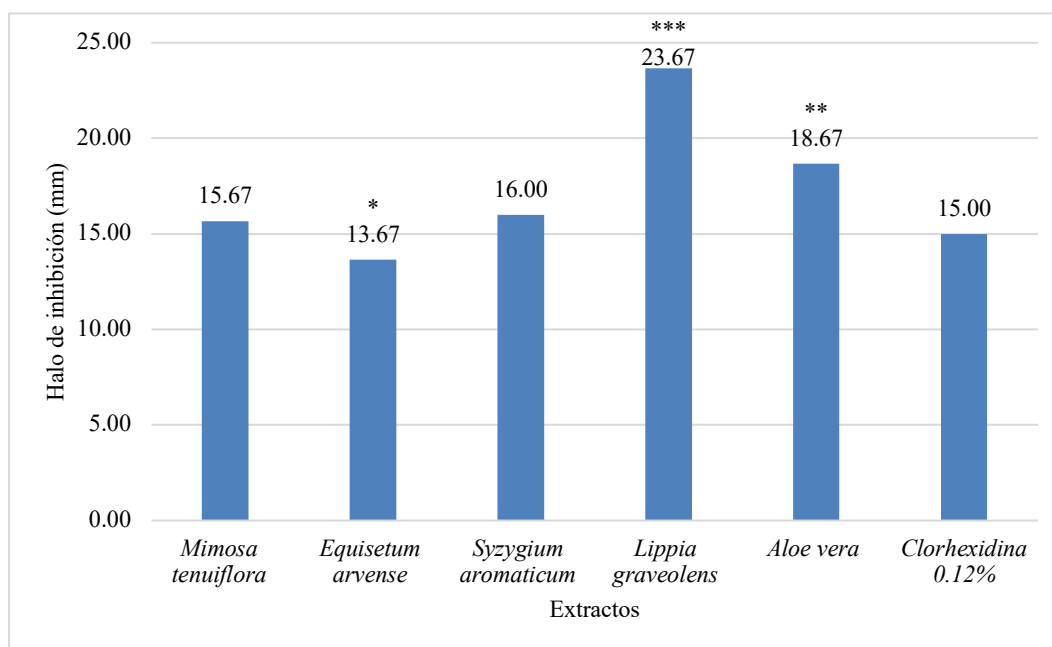
El gráfico 7.8 muestra la actividad antimicrobiana de los extractos de las plantas de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *S. aromaticum*, *L. graveolens* y *A. vera* sobre cepas de *S. sobrinus* a 2000 ppm en donde se observa una diferencia estadística altamente significativa de los extractos de *A. vera* ($p= 0.0011$), *S. aromaticum* ($p= 0.0081$) y *L. graveolens* ($p= 0.0000$), los cuales muestran un efecto antimicrobiano superior a clorhexidina.

Gráfico 7.8. Actividad antimicrobiana de los extractos de las plantas de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *S. aromaticum*, *L. graveolens*, y *A. vera* sobre cepas de *S. sobrinus*. Concentración 2000 ppm. Las barras representan el promedio del triplicado de tres ensayos totalmente independientes.



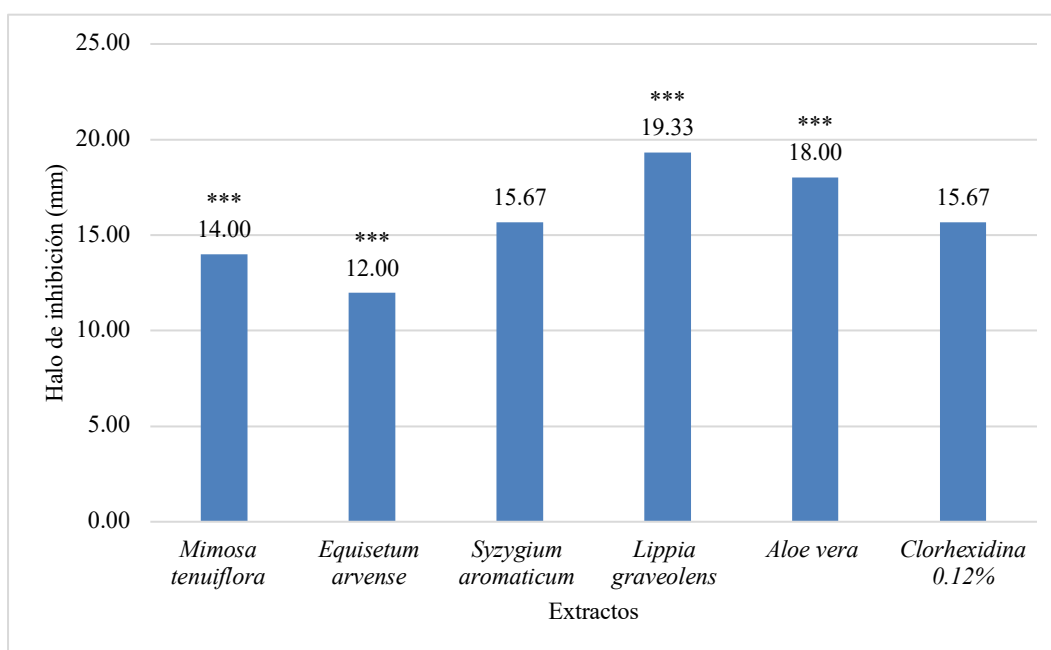
El gráfico 7.9 muestra la actividad antimicrobiana de los extractos de las plantas de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *S. aromaticum*, *L. graveolens* y *A. vera* sobre cepas de *S. sobrinus* a 1000 ppm en donde se observa una diferencia estadística altamente significativa de los extractos de *A. vera* ($p= 0.0127$) y *L. graveolens* ($p= 0.0006$), los cuales muestran un efecto antimicrobiano superior a clorhexidina.

Gráfico 7.9. Actividad antimicrobiana de los extractos de las plantas de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *S. aromaticum*, *L. graveolens*, y *A. vera* sobre cepas de *S. sobrinus*. Concentración 1000 ppm. Las barras representan el promedio del triplicado de tres ensayos totalmente independientes.



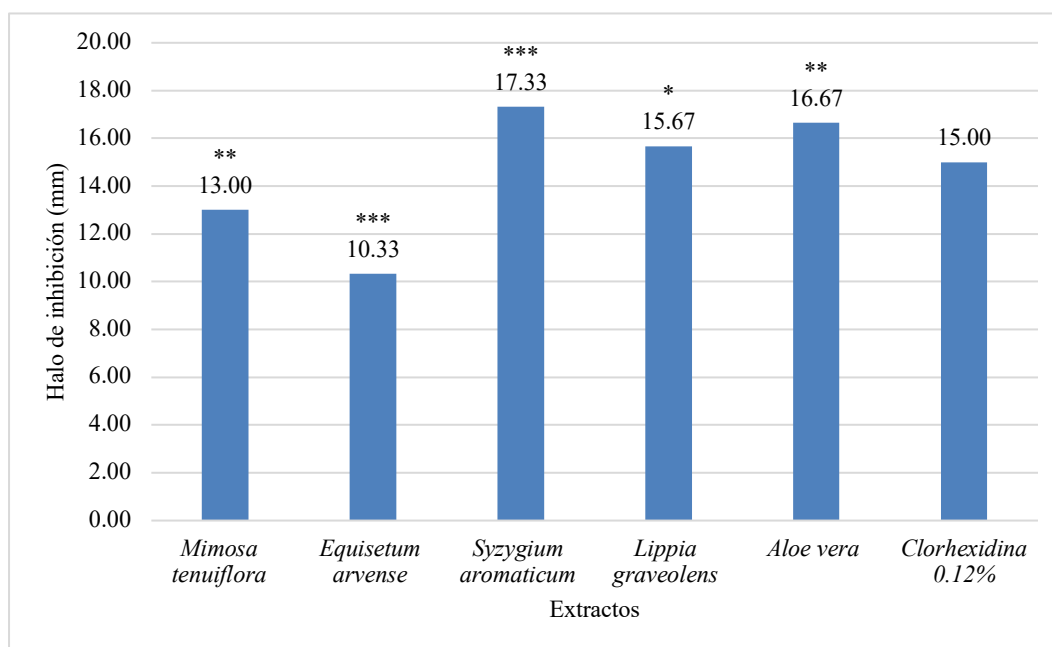
El gráfico 7.10 muestra la actividad antimicrobiana de los extractos de las plantas de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *S. aromaticum*, *L. graveolens* y *A. vera* sobre cepas de *S. sobrinus* a 500 ppm en donde se observa una diferencia estadística altamente significativa de los extractos de *A. vera* ($p= 0.0011$) y *L. graveolens* ($p= 0.0089$), los cuales muestran un efecto antimicrobiano superior a clorhexidina.

Gráfico 7.10. Actividad antimicrobiana de los extractos de las plantas de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *S. aromaticum*, *L. graveolens*, y *A. vera* sobre cepas de *S. sobrinus*. Concentración 500 ppm. Las barras representan el promedio del triplicado de tres ensayos totalmente independientes.



El gráfico 7.11 muestra la actividad antimicrobiana de los extractos de las plantas de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *S. aromaticum*, *L. graveolens* y *A. vera* sobre cepas de *S. sobrinus* a 250 ppm en donde se observa una diferencia estadística altamente significativa de los extractos de *A. vera* ($p= 0.0037$), *S. aromaticum* ($p= 0.0011$) y *L. graveolens* ($p= 0.0581$), los cuales muestran un efecto antimicrobiano superior a clorhexidina.

Gráfico 7.11. Actividad antimicrobiana de los extractos de las plantas de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *S. aromaticum*, *L. graveolens*, y *A. vera* sobre cepas de *S. sobrinus*. Concentración 250 ppm. Las barras representan el promedio del triplicado de tres ensayos totalmente independientes.



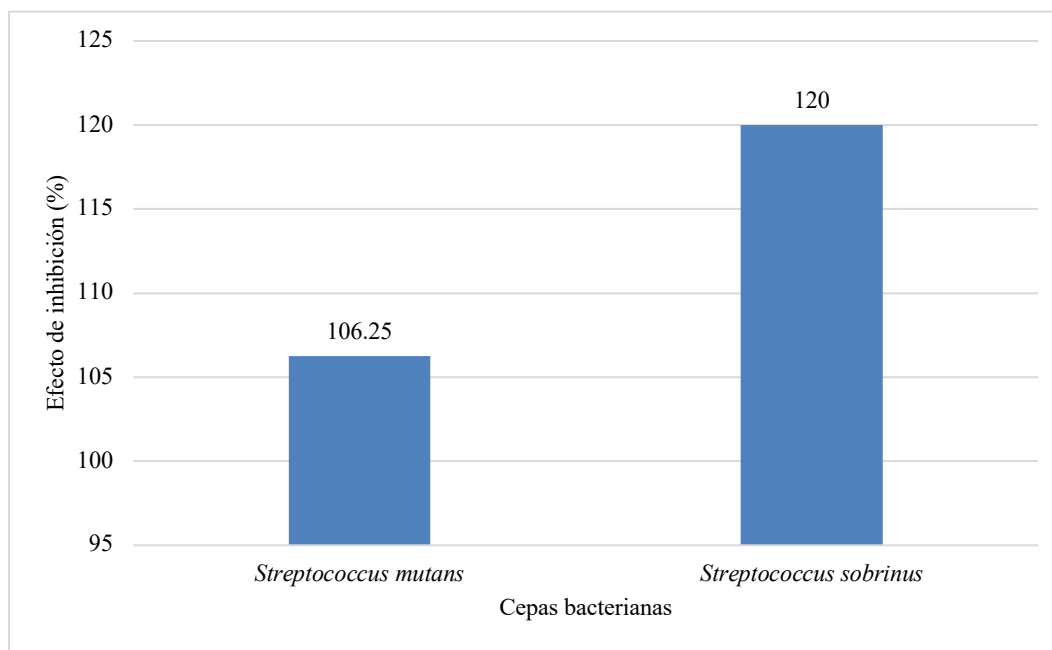
7.3.1. Actividad antimicrobiana de la formulación

Con los resultados anteriores, se probaron diferentes combinaciones y concentraciones de los cinco extractos para evaluar el efecto antimicrobiano. Los siguientes gráficos muestran la actividad antimicrobiana de la formulación compuesta por los cinco extractos: *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *S. aromaticum*, *L. graveolens* y *A. vera* sobre cepas de *S. mutans* y *S. sobrinus* en diferentes concentraciones y combinaciones. Se preparó una base compuesta de *M. tenuiflora*, *E. arvense* y *A. vera* para probar en forma aislada y en formulación con clavo, con orégano y con clavo y orégano, es decir, base/clavo, base/orégano y base/clavo/orégano. Contra *S. mutans* los más efectivos a 500 y 1000 ppm fueron base/orégano y

base/clavo/orégano, sin embargo al disminuir la concentración el efecto se mantiene en la mezcla base/clavo/orégano. a 250 ppm ($p= 0.0007$) y 125 ppm ($p= 0.0506$). Contra *S. sobrinus* a 1000 ppm tuvieron efectividad base/clavo, base/orégano y base/clavo/orégano, sin embargo al disminuir la concentración el efecto se mantiene en la mezcla base/clavo/orégano a 500 ppm ($p= 0.0081$), 250 ppm ($p= 0.1439$) y 125 ppm ($p= 0.1870$) con respecto a la sustancia control, clorhexidina al 0.12%.

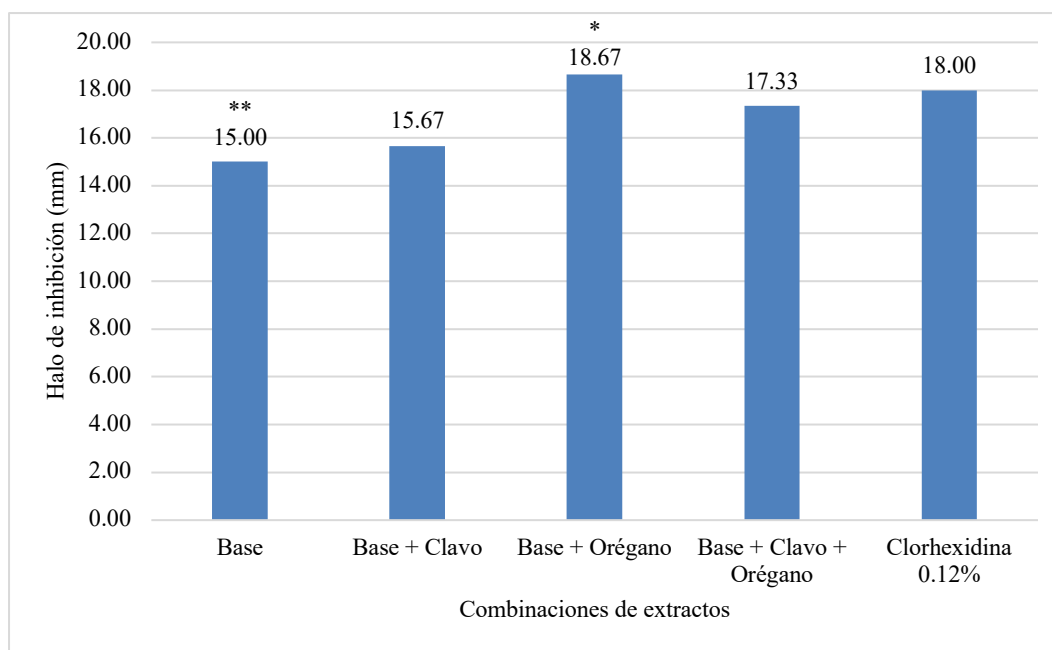
El siguiente gráfico (Gráfico 7.12) muestra el efecto de inhibición de la formulación compuesta por los cinco extractos: *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *S. aromaticum*, *L. graveolens* y *A. vera* sobre cepas de *S. mutans* y *S. sobrinus* en donde se observa el efecto superior contra la cepa de *S. sobrinus*.

Gráfico 7.12. Porcentaje del efecto de inhibición sobre cepas de *S. mutans* y *S. sobrinus* de la formulación. Las barras representan el promedio del triplicado de tres ensayos totalmente independientes tomando como control (100%) el efecto de la clorhexidina al 0.12%.



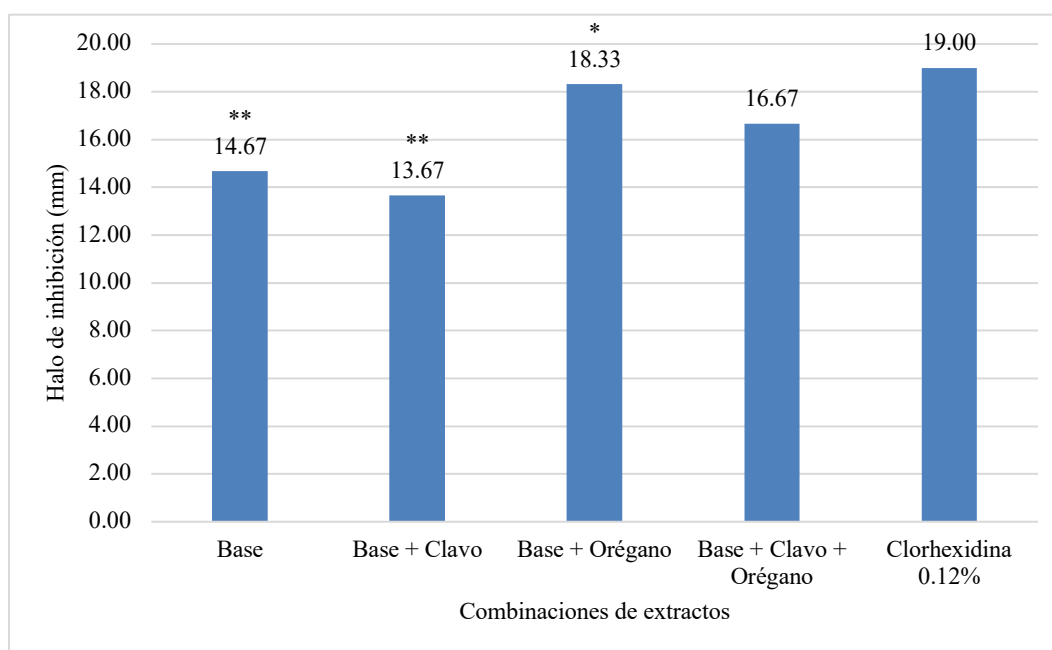
El gráfico 7.13 muestra la actividad antimicrobiana de diferentes combinaciones de los extractos sobre cepas de *S. mutans* en una concentración de 1000 ppm en el cual la base se compone de *M. tenuiflora*, *E. arvense* y *A. vera*. Observamos que no existe diferencia estadística significativa de las combinaciones de extractos de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *A. vera* y *L. graveolens* ($p= 0.3623$) y la mezcla de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *A. vera*, *S. aromaticum* y *L. graveolens* ($p= 0.3217$) los cuales muestran un efecto antimicrobiano muy similar a clorhexidina.

Gráfico 7.13. Actividad antimicrobiana de diferentes combinaciones de los extractos de las plantas sobre cepas de *S. mutans*. Concentración 1000 ppm. Las barras representan el promedio del triplicado de tres ensayos totalmente independientes. La base se compone de *M. tenuiflora*, *E. arvense* y *A. vera*.



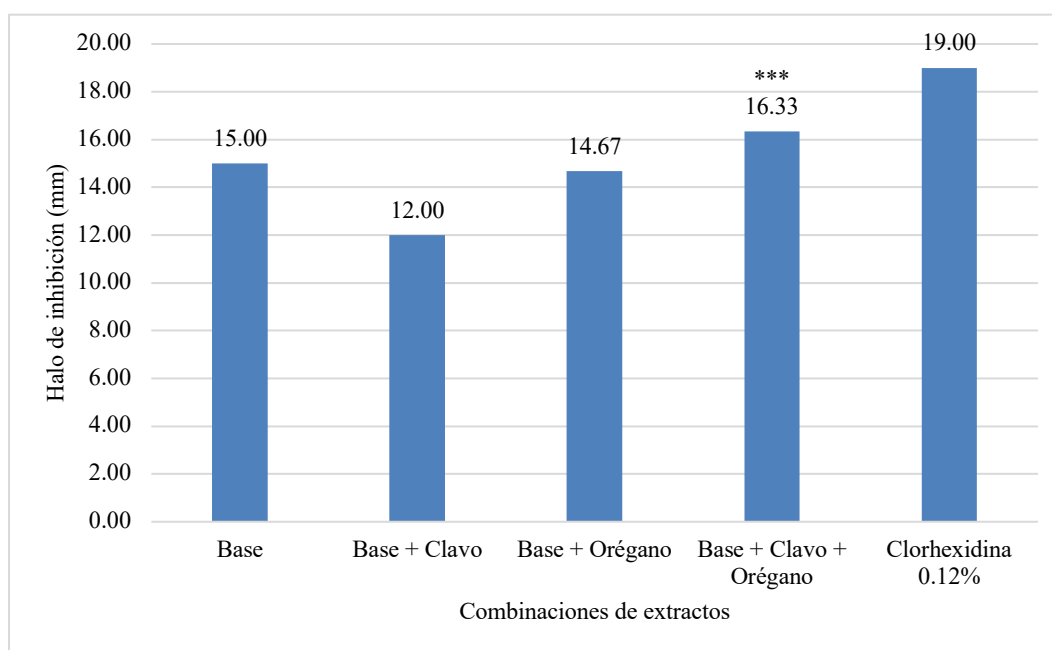
El gráfico 7.14 muestra la actividad antimicrobiana de diferentes combinaciones de los extractos sobre cepas de *S. mutans* en una concentración de 500 ppm en el cual la base se compone de *M. tenuiflora*, *E. arvense* y *A. vera*. Observamos que no existe diferencia estadística significativa de las combinaciones de extractos de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *A. vera* y *L. graveolens* ($p= 0.2807$) los cuales muestran un efecto antimicrobiano muy similar a clorhexidina.

Gráfico 7.14. Actividad antimicrobiana de diferentes combinaciones de los extractos de las plantas sobre cepas de *S. mutans*. Concentración 500 ppm. Las barras representan el promedio del triplicado de tres ensayos totalmente independientes. La base se compone de *M. tenuiflora*, *E. arvense* y *A. vera*.



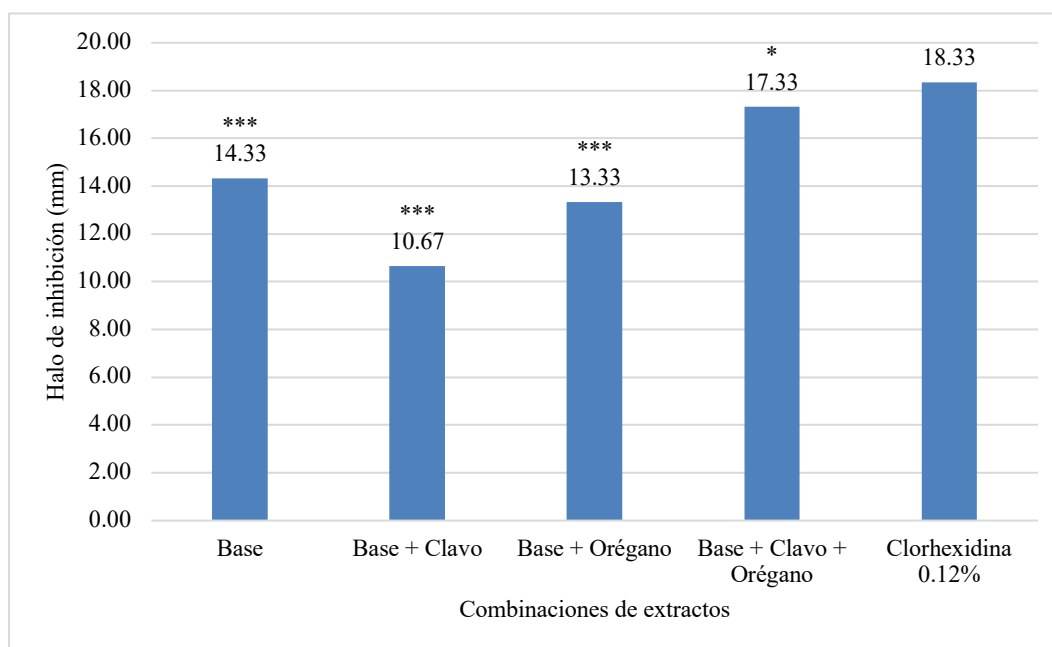
El gráfico 7.15 muestra la actividad antimicrobiana de diferentes combinaciones de los extractos sobre cepas de *S. mutans* en una concentración de 250 ppm en el cual la base se compone de *M. tenuiflora*, *E. arvense* y *A. vera*. Observamos una diferencia estadística significativa de las combinaciones de extractos de la mezcla de la base con orégano y la base con el clavo y orégano ($p= 0.0001$) y ($p= 0.0007$) respectivamente con mejor efectividad que la sustancia control.

Gráfico 7.15. Actividad antimicrobiana de diferentes combinaciones de los extractos de las plantas sobre cepas de *S. mutans*. Concentración 250 ppm. Las barras representan el promedio del triplicado de tres ensayos totalmente independientes. La base se compone de *M. tenuiflora*, *E. arvense* y *A. vera*.



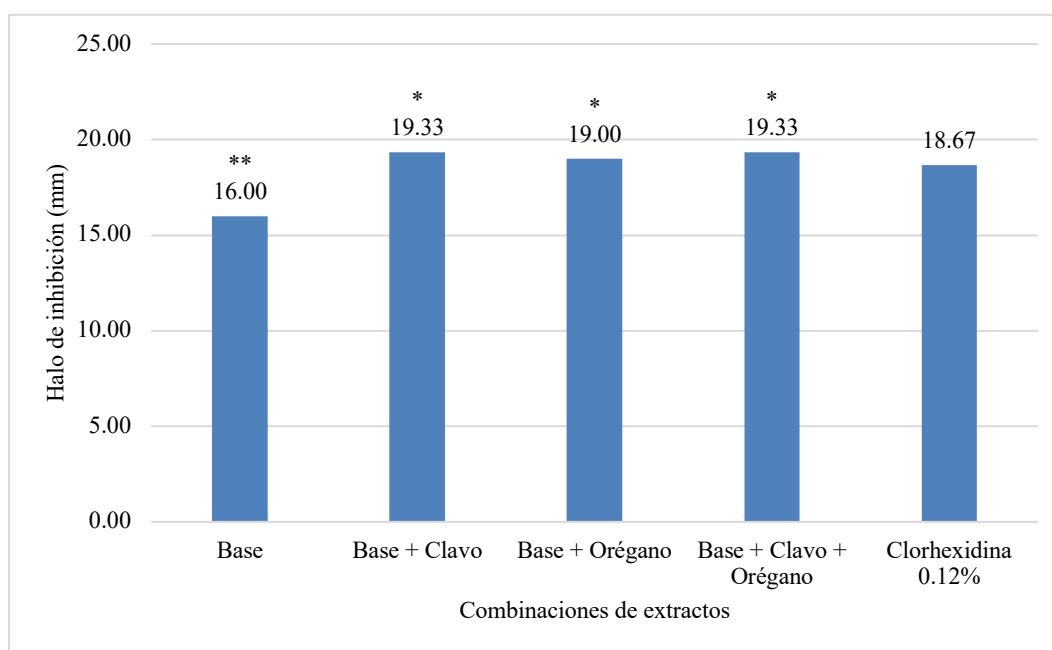
El gráfico 7.16 muestra la actividad antimicrobiana de diferentes combinaciones de los extractos sobre cepas de *S. mutans* en una concentración de 125 ppm en el cual la base se compone de *M. tenuiflora*, *E. arvense* y *A. vera*. Observamos una diferencia estadística significativa de las combinaciones de extractos de la mezcla de la base con el clavo y orégano ($p= 0.0506$) muy cerca de la sustancia control.

Gráfico 7.16. Actividad antimicrobiana de diferentes combinaciones de los extractos de las plantas sobre cepas de *S. mutans*. Concentración 125 ppm. Las barras representan el promedio del triplicado de tres ensayos totalmente independientes. La base se compone de *M. tenuiflora*, *E. arvense* y *A. vera*.



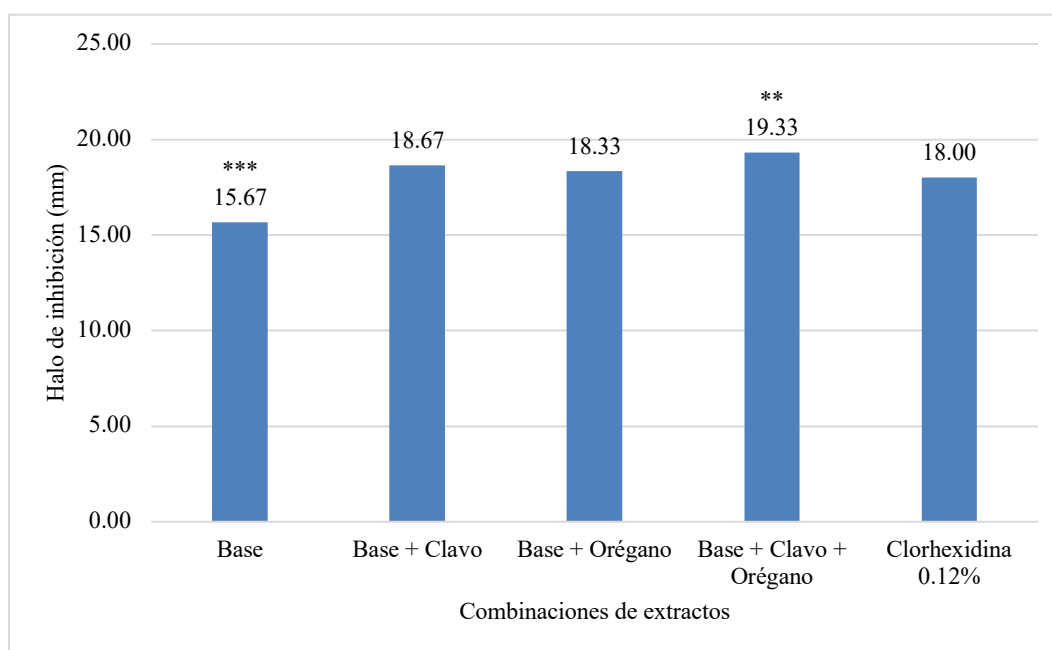
El gráfico 7.17 muestra la actividad antimicrobiana de diferentes combinaciones de los extractos sobre cepas de *S. sobrinus* en una concentración de 1000 ppm en el cual la base se compone de *M. tenuiflora*, *E. arvense* y *A. vera*. Observamos que no existe una diferencia estadística significativa de las combinaciones de extractos de la mezcla de la base con clavo ($p= 0.2593$), la base con orégano ($p= 0.3838$) y la base con el clavo y orégano ($p= 0.2895$) con respecto al control ya que se comportan muy parecido.

Gráfico 7.17. Actividad antimicrobiana de diferentes combinaciones de los extractos de las plantas sobre cepas de *S. sobrinus*. Concentración 1000 ppm. Las barras representan el promedio del triplicado de tres ensayos totalmente independientes. La base se compone de *M. tenuiflora*, *E. arvense* y *A. vera*.



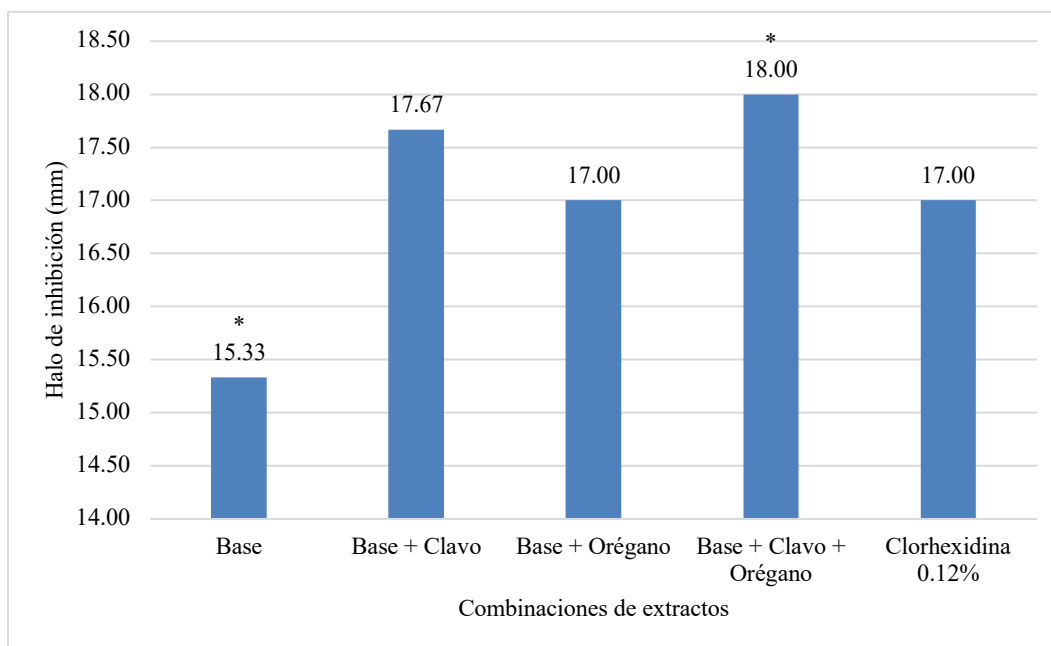
El gráfico 7.18 muestra la actividad antimicrobiana de diferentes combinaciones de los extractos sobre cepas de *S. sobrinus* en una concentración de 500 ppm en el cual la base se compone de *M. tenuiflora*, *E. arvense* y *A. vera*. Observamos que existe una diferencia estadística significativa superior en la mezcla *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *A. vera*, *S. aromaticum* y *L. graveolens* ($p= 0.0081$) con respecto a la sustancia control.

Gráfico 7.18. Actividad antimicrobiana de diferentes combinaciones de los extractos de las plantas sobre cepas de *S. sobrinus*. Concentración 500 ppm. Las barras representan el promedio del triplicado de tres ensayos totalmente independientes. La base se compone de *M. tenuiflora*, *E. arvense* y *A. vera*.



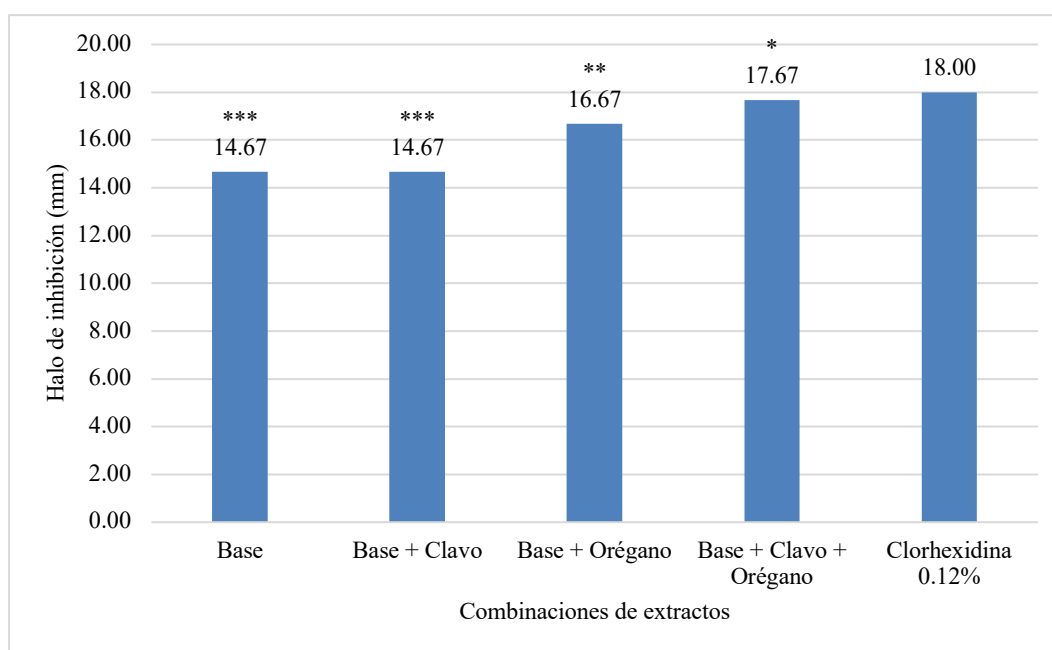
El gráfico 7.19 muestra la actividad antimicrobiana de diferentes combinaciones de los extractos sobre cepas de *S. sobrinus* en una concentración de 250 ppm en el cual la base se compone de *M. tenuiflora*, *E. arvense* y *A. vera*. Observamos que no existe una diferencia estadística significativa de las combinaciones de extractos de la mezcla de la base con clavo ($p= 0.2259$), la base con orégano ($p= 0.5000$) y con mejor efectividad la base con el clavo y orégano ($p= 0.1439$) con respecto al control.

Gráfico 7.19. Actividad antimicrobiana de diferentes combinaciones de los extractos de las plantas sobre cepas de *S. sobrinus*. Concentración 250 ppm. Las barras representan el promedio del triplicado de tres ensayos totalmente independientes. La base se compone de *M. tenuiflora*, *E. arvense* y *A. vera*.



El gráfico 7.20 muestra la actividad antimicrobiana de diferentes combinaciones de los extractos sobre cepas de *S. sobrinus* en una concentración de 125 ppm en el cual la base se compone de *M. tenuiflora*, *E. arvense* y *A. vera*. Observamos que no existe una diferencia estadística significativa de las combinaciones de extractos de la mezcla de la base con el clavo y orégano ($p= 0.1870$) con respecto al control ya que se comportan muy parecido.

Gráfico 7.20. Actividad antimicrobiana de diferentes combinaciones de los extractos de las plantas sobre cepas de *S. sobrinus*. Concentración 125 ppm. Las barras representan el promedio del triplicado de tres ensayos totalmente independientes. La base se compone de *M. tenuiflora*, *E. arvense* y *A. vera*.



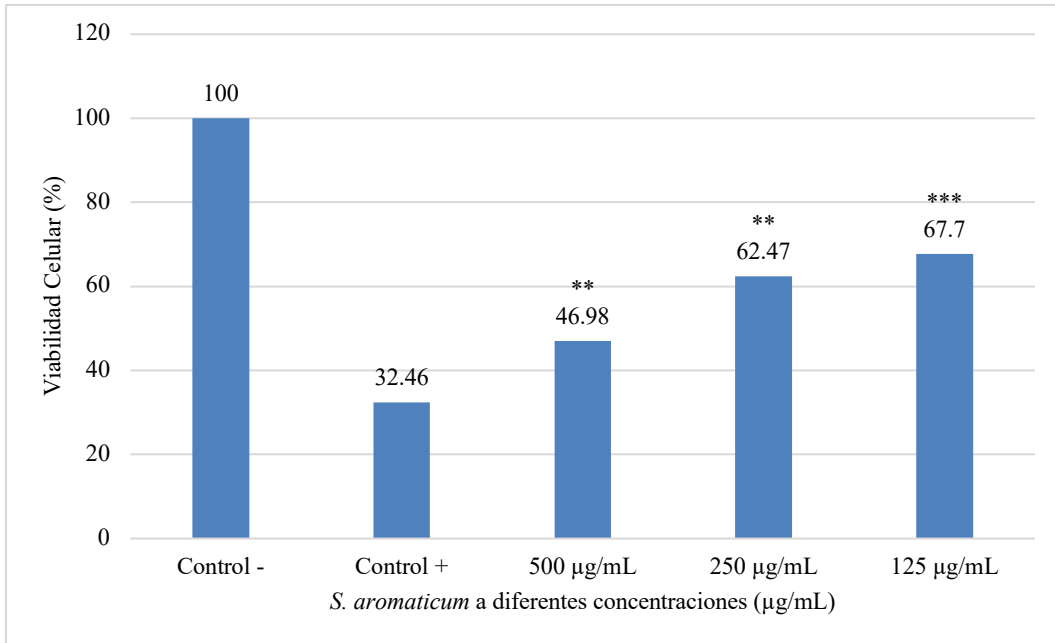
7.3.2. Viabilidad celular mediante ensayo MTT

Los siguientes gráficos muestran la viabilidad celular mediante ensayo MTT de la formulación compuesta por los cinco extractos: *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *S. aromaticum*, *L. graveolens* y *A. vera* sobre cepas de *S. mutans* y *S. sobrinus* en diferentes concentraciones y combinaciones. Podemos observar un efecto antimicrobiano contra *S. mutans* del clavo a 500 ppm, el orégano en todas sus concentraciones y la mezcla base/clavo/orégano en todas sus concentraciones. Contra *S. sobrinus* se observa el efecto antimicrobiano del clavo en todas

sus concentraciones, el orégano a 1000 y 500 ppm y la mezcla base/clavo/orégano en todas sus concentraciones.

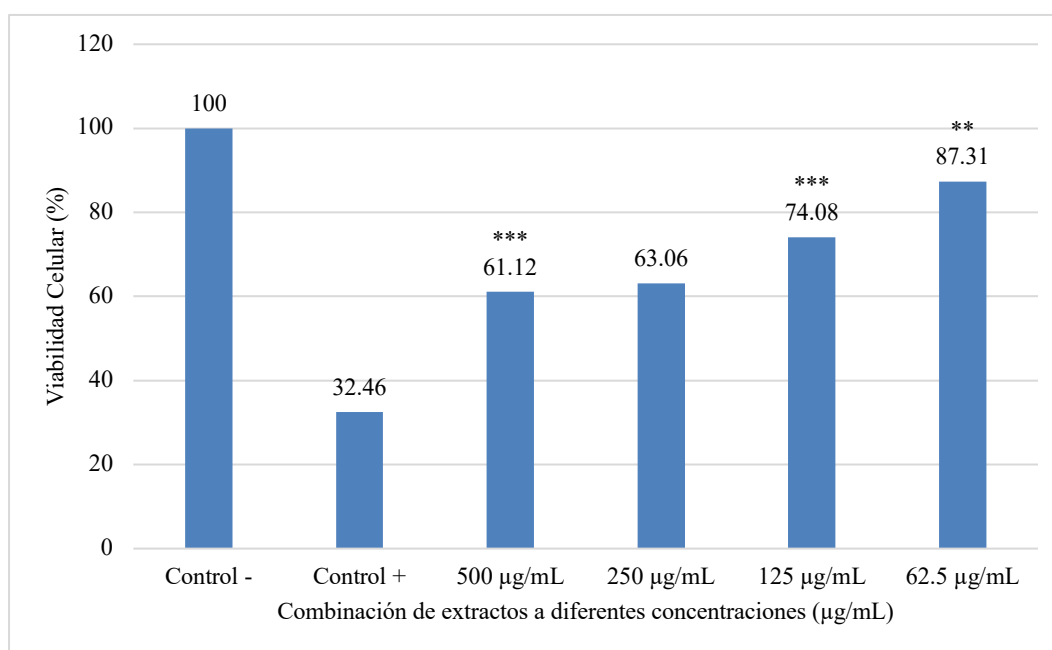
El gráfico 7.21 muestra el efecto de *S. aromaticum* en la viabilidad celular sobre cepas de *S. mutans*. Observamos que existe una diferencia estadística significativa en las concentraciones 500 µg/mL ($p= 0.0030$) 250 µg/mL ($p= 0.0002$) y 125 µg/mL ($p= 0.0001$) con respecto a la clorhexidina al 0.12%.

Gráfico 7.21. Efecto de *S. aromaticum* en la viabilidad celular sobre cepas de *S. mutans*. La viabilidad celular se determinó mediante ensayo de MTT donde la densidad óptica a 570 nm es proporcional a la cantidad de células viables. Cada grupo de datos representa el promedio de tres réplicas. Los datos representan las medias de las células viables, tomando como control negativo las células sin tratar y como control positivo clorhexidina al 0.12%.



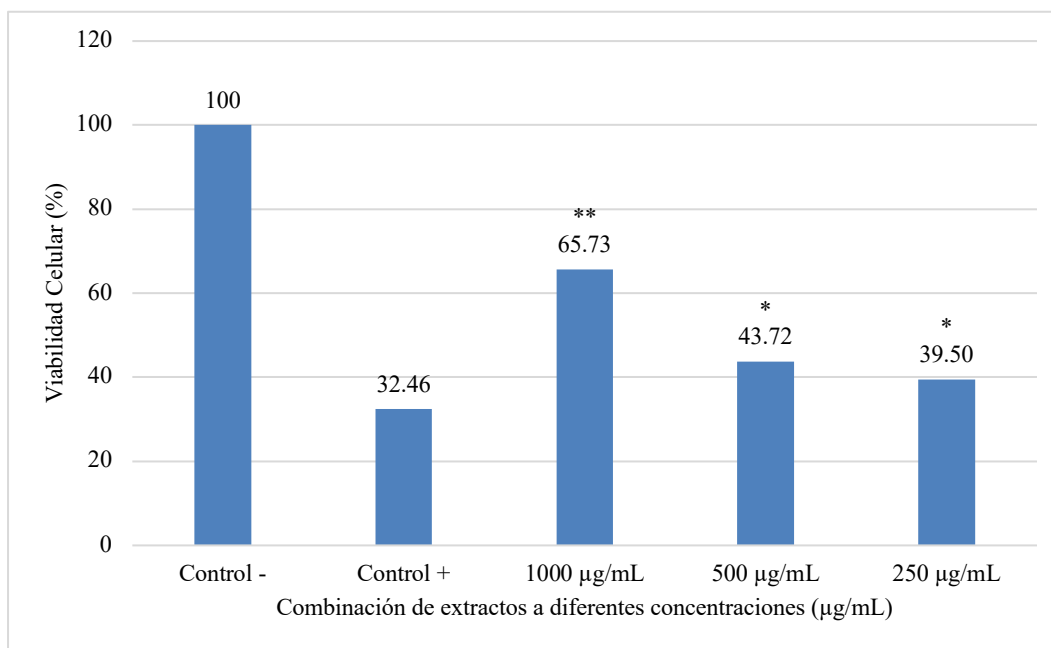
El gráfico 7.22 muestra el efecto de la formulación a base de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *A. vera* y *S. aromaticum* en la viabilidad celular sobre cepas de *S. mutans*. Observamos que existe una diferencia estadística significativa en las concentraciones 125 µg/mL ($p= 0.0009$) y 62.5 µg/mL ($p= 0.0186$) con respecto a la clorhexidina al 0.12%.

Gráfico 7.22. Efecto de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *A. vera* y *S. aromaticum* en la viabilidad celular sobre cepas de *S. mutans*. La viabilidad celular se determinó mediante ensayo de MTT, donde la absorbancia a 570 nm es proporcional a la cantidad de células viables. Cada grupo de datos representa el promedio de tres réplicas. Los datos representan las medias de las células viables, tomando como control negativo las células sin tratar y como control positivo clorhexidina al 0.12%. La base está compuesta de la mezcla de base de *M. tenuiflora*, *E. arvense* y *A. vera*.



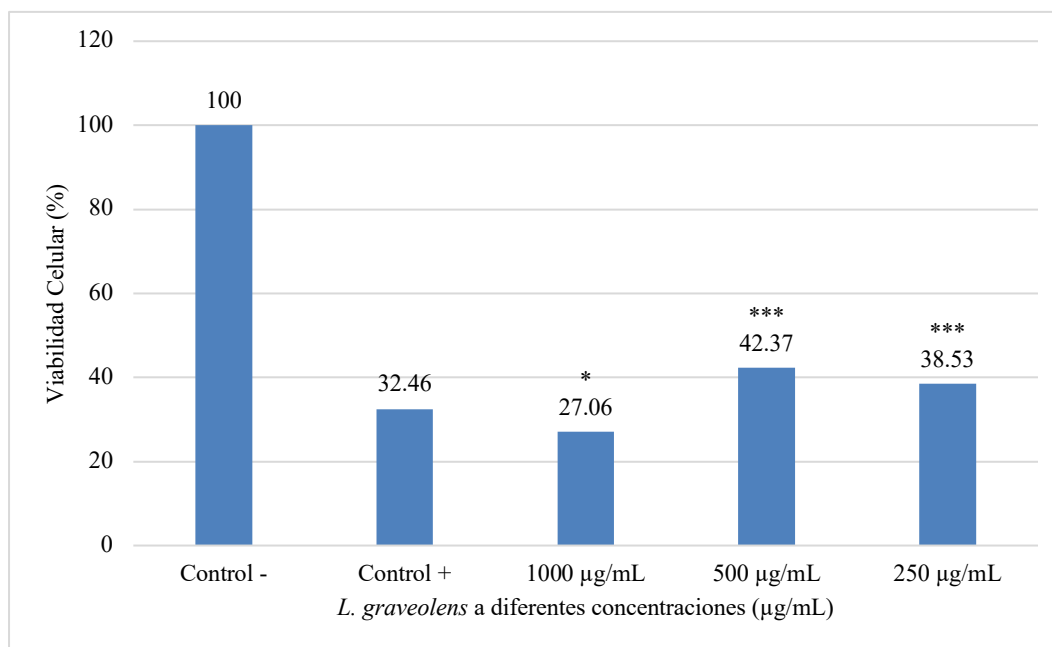
El gráfico 7.23 muestra el efecto de la base (*M. tenuiflora*, *E. arvense* y *A. vera*) en la viabilidad celular sobre cepas de *S. mutans*. Observamos que existe una diferencia estadística significativa en la concentración 1000 µg/mL ($p= 0.0153$) con respecto a la clorhexidina al 0.12%.

Gráfico 7.23. Evaluación de viabilidad celular de los extractos de *M. tenuiflora*, *E. arvense* y *A. vera* sobre cepas de *S. mutans*. La viabilidad celular se determinó mediante ensayo de MTT, donde la absorbancia a 570 nm es proporcional a la cantidad de células viables. Cada grupo de datos representa el promedio de tres réplicas. Los datos representan las medias de las células viables, tomando como control negativo las células sin tratar y como control positivo clorhexidina al 0.12%.



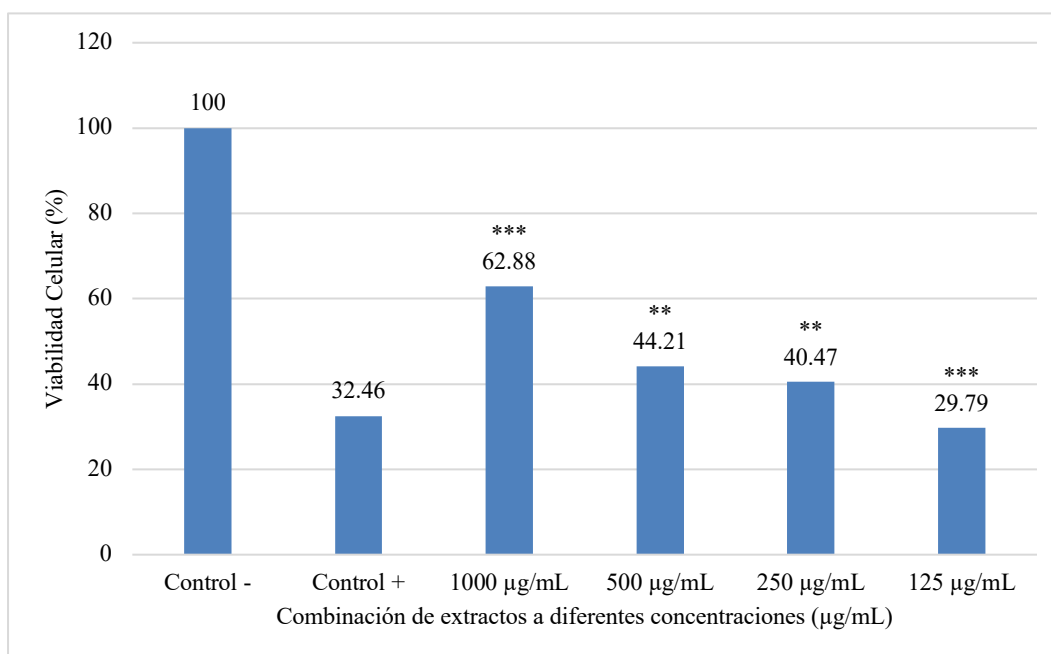
El gráfico 7.24 muestra el efecto de *L. graveolens* en la viabilidad celular sobre cepas de *S. mutans*. Observamos que existe una diferencia estadística significativa provocando efecto antimicrobiano en la concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$ ($p= 0.0491$) con respecto a la clorhexidina al 0.12%.

Gráfico 7.24. Evaluación de viabilidad celular del extracto de *L. graveolens* sobre cepas de *S. mutans*. La viabilidad celular se determinó mediante ensayo de MTT, donde la absorbancia a 570 nm es proporcional a la cantidad de células viables. Cada grupo de datos representa el promedio de tres réplicas. Los datos representan las medias de las células viables, tomando como control negativo las células sin tratar y como control positivo clorhexidina al 0.12%.



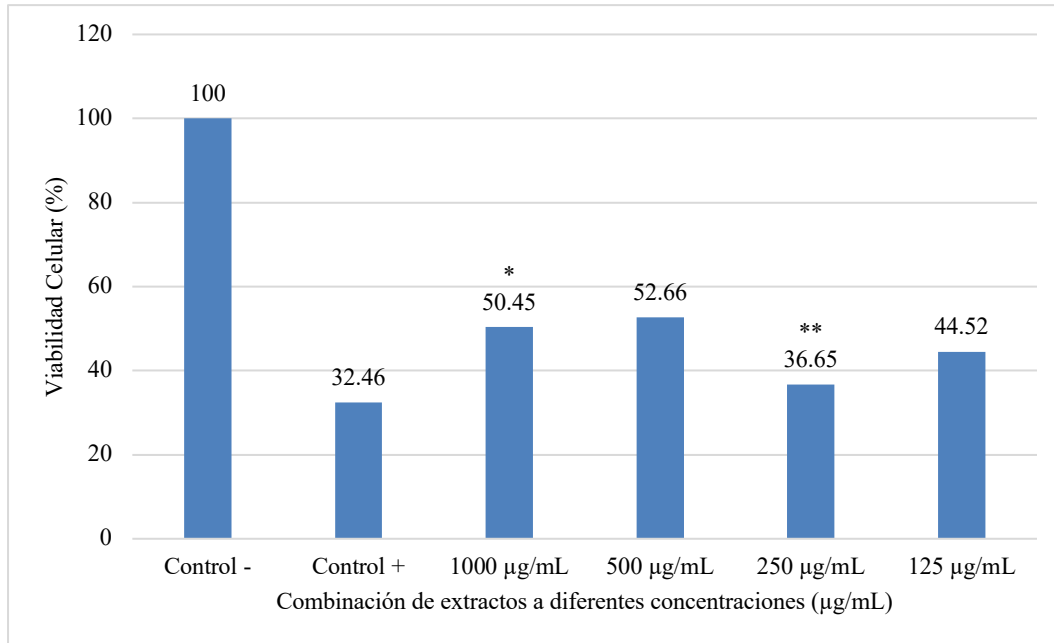
El gráfico 7.25 muestra el efecto de la base compuesta de *M. tenuiflora*, *E. arvense* y *A. vera* agregando *L. graveolens* en la viabilidad celular sobre cepas de *S. mutans*. Observamos que existe una diferencia estadística significativa manteniendo la viabilidad celular en la concentración 1000 $\mu\text{g/mL}$ ($p= 0.0005$) con respecto a la clorhexidina al 0.12%.

Gráfico 7.25. Evaluación in vitro de la viabilidad celular de los extractos de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *A. vera* y *L. graveolens* sobre cepas de *S. mutans*. La viabilidad celular se determinó mediante ensayo de MTT, donde la absorbancia a 570 nm es proporcional a la cantidad de células viables. Cada grupo de datos representa el promedio de tres réplicas. Los datos representan las medias de las células viables, tomando como control negativo las células sin tratar y como control positivo clorhexidina al 0.12%.



El gráfico 7.26 muestra el efecto de la base compuesta de *M. tenuiflora*, *E. arvense* y *A. vera*, al añadir *S. aromaticum* y *L. graveolens* en la viabilidad celular sobre cepas de *S. mutans*. Observamos que existe una diferencia estadística significativa manteniendo la viabilidad celular en la concentración 500 µg/mL ($p= 0.0005$) con respecto a la clorhexidina al 0.12% mientras que las concentraciones a 1000 µg/mL y 250 µg/mL presentan un efecto antimicrobiano cercano al control.

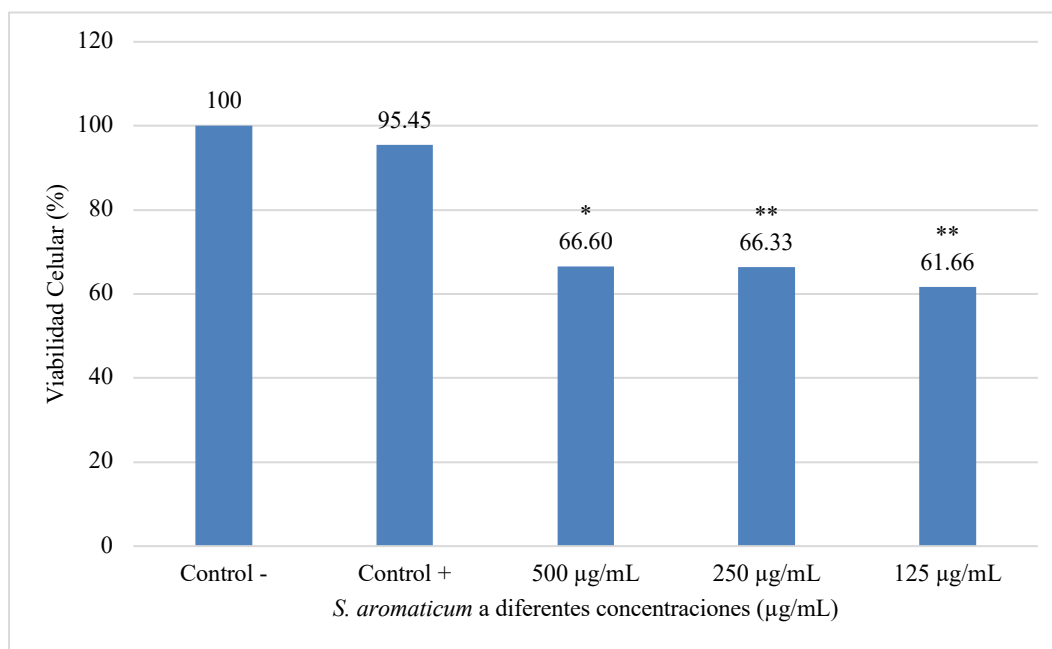
Gráfico 7.26. Evaluación in vitro de la viabilidad celular de los extractos de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *A. vera*, *S. aromaticum* y *L. graveolens* sobre cepas de *S. mutans*. La viabilidad celular se determinó mediante ensayo de MTT, donde la absorbancia a 570 nm es proporcional a la cantidad de células viables. Cada grupo de datos representa el promedio de tres réplicas. Los datos representan las medias de las células viables, tomando como control negativo las células sin tratar y como control positivo clorhexidina al 0.12%.



Los siguientes gráficos muestran el efecto de los mismos extractos en las mismas concentraciones contra cepas bacterianas de *S. sobrinus*.

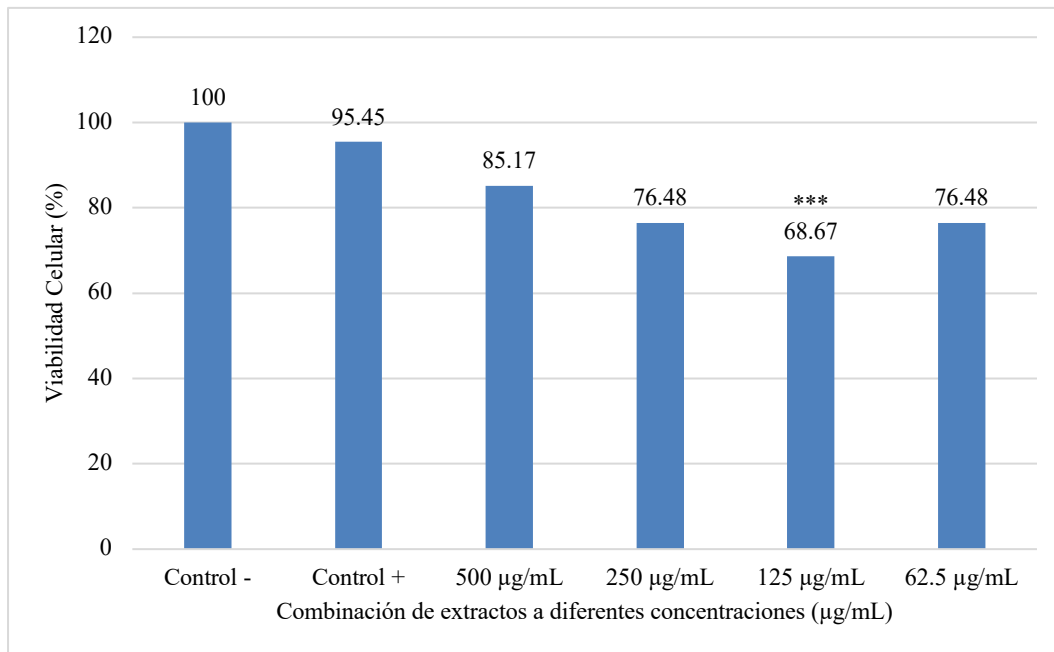
El gráfico 7.27 muestra el efecto de *S. aromaticum* en la viabilidad celular sobre cepas de *S. sobrinus*. Observamos que existe una diferencia estadística significativa en la concentración 500 µg/mL ($p= 0.0395$), 250 µg/mL ($p= 0.0028$) y 125 µg/mL ($p= 0.0096$) con respecto a la clorhexidina al 0.12%.

Gráfico 7.27. Evaluación in vitro de la viabilidad celular del extracto de *S. aromaticum* sobre cepas de *S. sobrinus*. La viabilidad celular se determinó mediante ensayo de MTT, donde la absorbancia a 570 nm es proporcional a la cantidad de células viables. Cada grupo de datos representa el promedio de tres réplicas. Los datos representan las medias de las células viables, tomando como control negativo las células sin tratar y como control positivo clorhexidina al 0.12%.



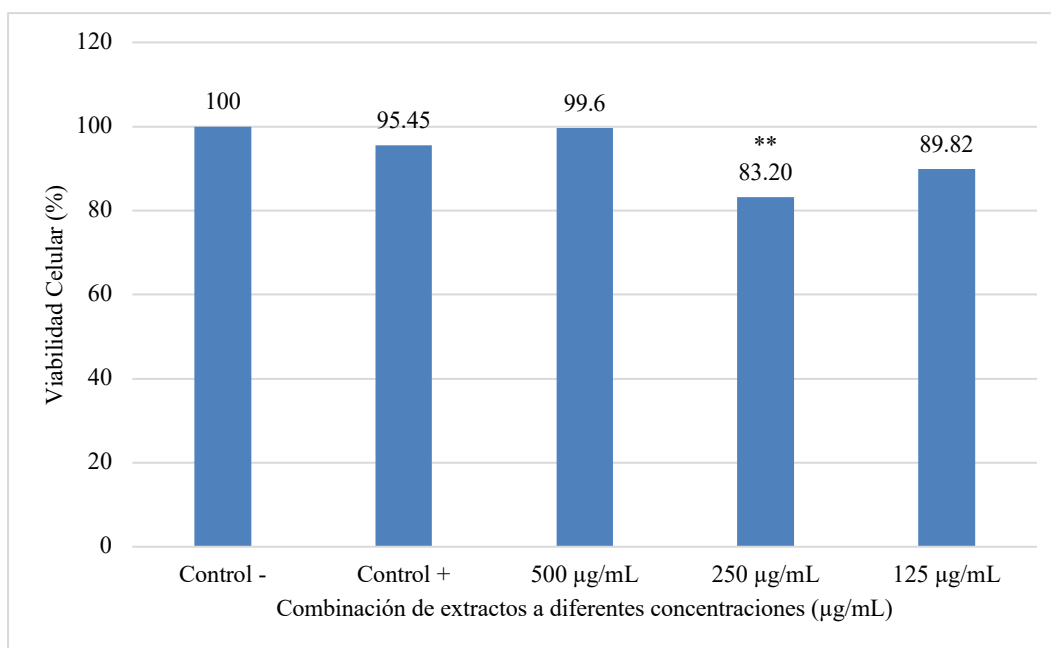
El gráfico 7.28 muestra el efecto de la base compuesta por *M. tenuiflora*, *E. arvense* y *A. vera* agregando *S. aromaticum* en la viabilidad celular sobre cepas de *S. sobrinus*. Observamos que existe una diferencia estadística significativa en la concentración 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p= 0.0006$) con respecto a la clorhexidina al 0.12%.

Gráfico 7.28. Evaluación in vitro de la viabilidad celular de los extractos de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *A. vera* y *S. aromaticum* contra *S. sobrinus*. La viabilidad celular se determinó mediante ensayo de MTT, donde la absorbancia a 570 nm es proporcional a la cantidad de células viables. Cada grupo de datos representa el promedio de tres réplicas. Los datos representan las medias de las células viables, tomando como control negativo las células sin tratar y como control positivo clorhexidina al 0.12%.



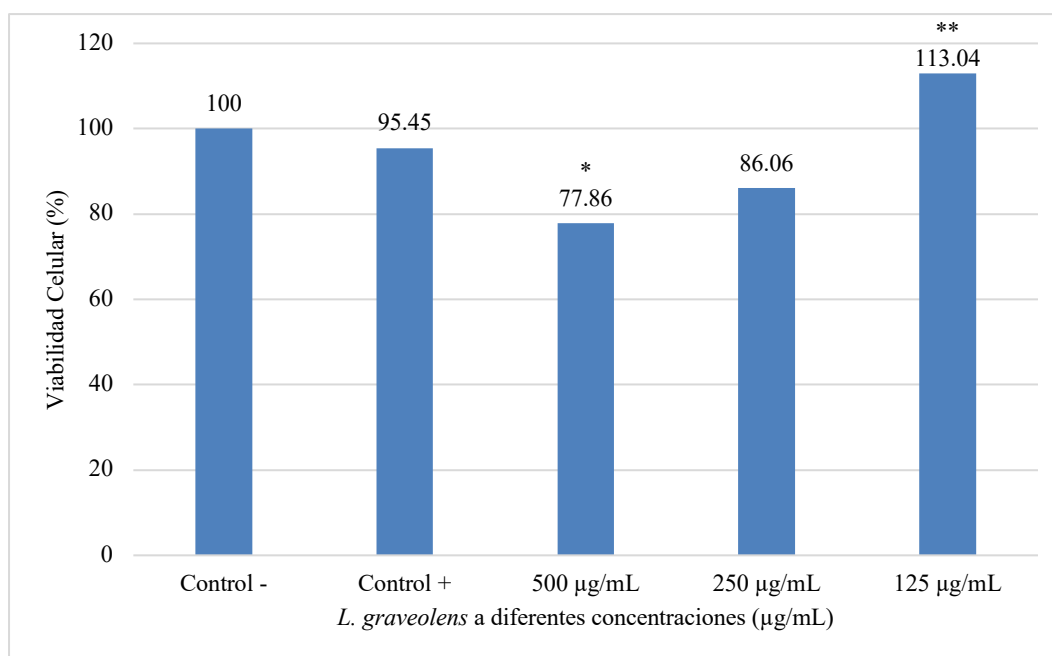
El gráfico 7.29 muestra el efecto de *M. tenuiflora*, *E. arvense* y *A. vera* (base) en la viabilidad celular sobre cepas de *S. sobrinus*. Observamos que existe una diferencia estadística significativa en la concentración 500 µg/mL ($p= 0.0183$) con respecto a la clorhexidina al 0.12%.

Gráfico 7.29. Evaluación in vitro de la viabilidad celular de los extractos de *M. tenuiflora*, *E. arvense* y *A. vera* contra *S. sobrinus*. La viabilidad celular se determinó mediante ensayo de MTT, donde la absorbancia a 570 nm es proporcional a la cantidad de células viables. Cada grupo de datos representa el promedio de tres réplicas. Los datos representan las medias de las células viables, tomando como control negativo las células sin tratar y como control positivo clorhexidina al 0.12%.



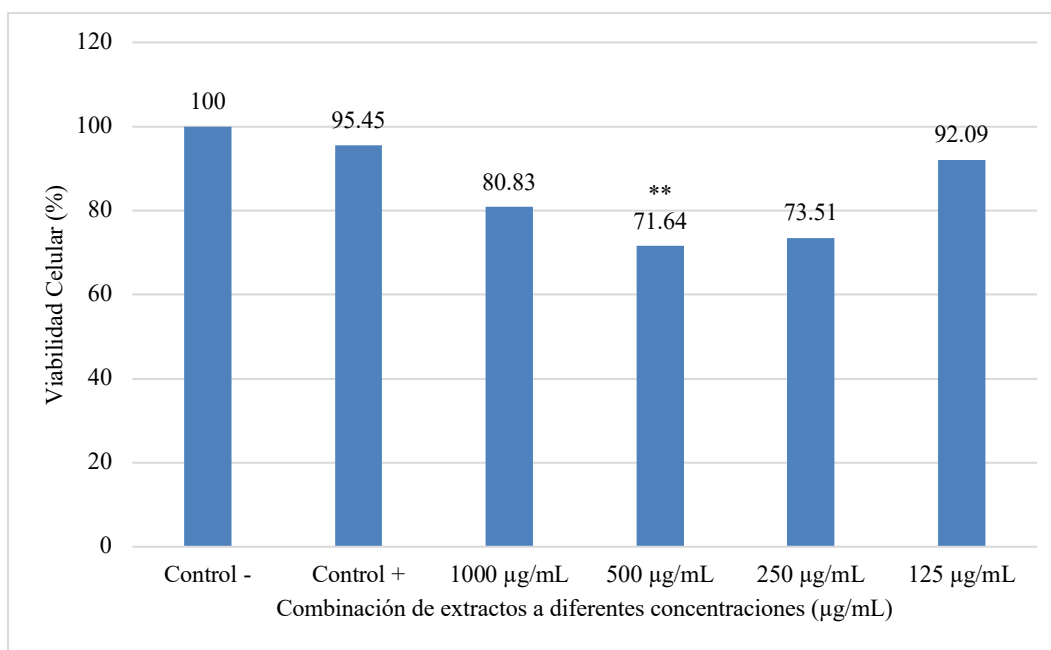
El gráfico 7.30 muestra el efecto de *L. graveolens* en la viabilidad celular sobre cepas de *S. sobrinus*. Observamos que existe una diferencia estadística significativa con un efecto antimicrobiano en la concentración 1000 µg/mL ($p= 0.0027$) con respecto a la clorhexidina al 0.12%.

Gráfico 7.30. Evaluación in vitro de la viabilidad celular del extracto de *L. graveolens* contra *S. sobrinus*. La viabilidad celular se determinó mediante ensayo de MTT, donde la absorbancia a 570 nm es proporcional a la cantidad de células viables. Cada grupo de datos representa el promedio de tres réplicas. Los datos representan las medias de las células viables, tomando como control negativo las células sin tratar y como control positivo clorhexidina al 0.12%.



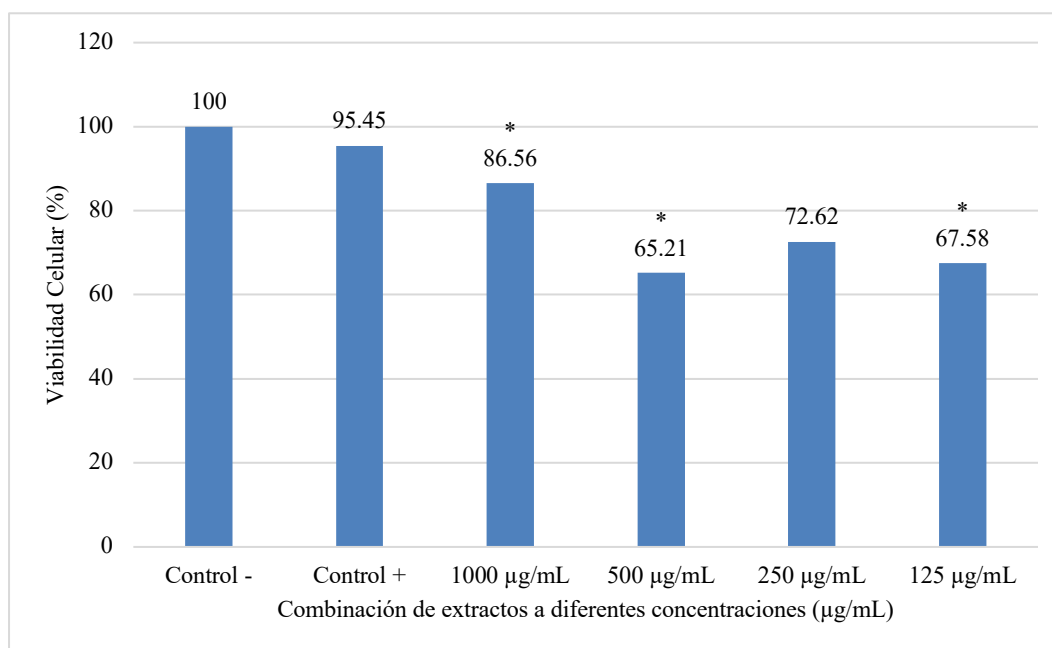
El gráfico 7.31 muestra el efecto de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *A. vera* (base) y *L. graveolens* en la viabilidad celular sobre cepas de *S. sobrinus*. Observamos que no existen diferencias estadísticas significativas en las concentraciones de 1000 µg/mL ($p= 0.2164$), 500 µg/mL ($p= 0.2115$) y 250 µg/mL ($p= 0.1115$) con un efecto similar a la clorhexidina al 0.12%.

Gráfico 7.31. Evaluación in vitro de la viabilidad celular de los extractos de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *A. vera* y *L. graveolens* contra *S. sobrinus*. La viabilidad celular se determinó mediante ensayo de MTT, donde la absorbancia a 570 nm es proporcional a la cantidad de células viables. Cada grupo de datos representa el promedio de tres réplicas. Los datos representan las medias de las células viables, tomando como control negativo las células sin tratar y como control positivo clorhexidina al 0.12%.



El gráfico 7.32 muestra el efecto de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *A. vera* (base) *S. aromaticum* y *L. graveolens* en la viabilidad celular sobre cepas de *S. sobrinus*. Observamos diferencia estadística significativa en las concentración de 500 µg/mL ($p= 0.0249$) con un efecto superior a la clorhexidina al 0.12%.

Gráfico 7.32. Evaluación in vitro de la viabilidad celular de los extractos de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *A. vera*, *S. aromaticum* y *L. graveolens* contra *S. sobrinus*. La viabilidad celular se determinó mediante ensayo de MTT, donde la absorbancia a 570 nm es proporcional a la cantidad de células viables. Cada grupo de datos representa el promedio de tres réplicas. Los datos representan las medias de las células viables, tomando como control negativo las células sin tratar y como control positivo clorhexidina al 0.12%.

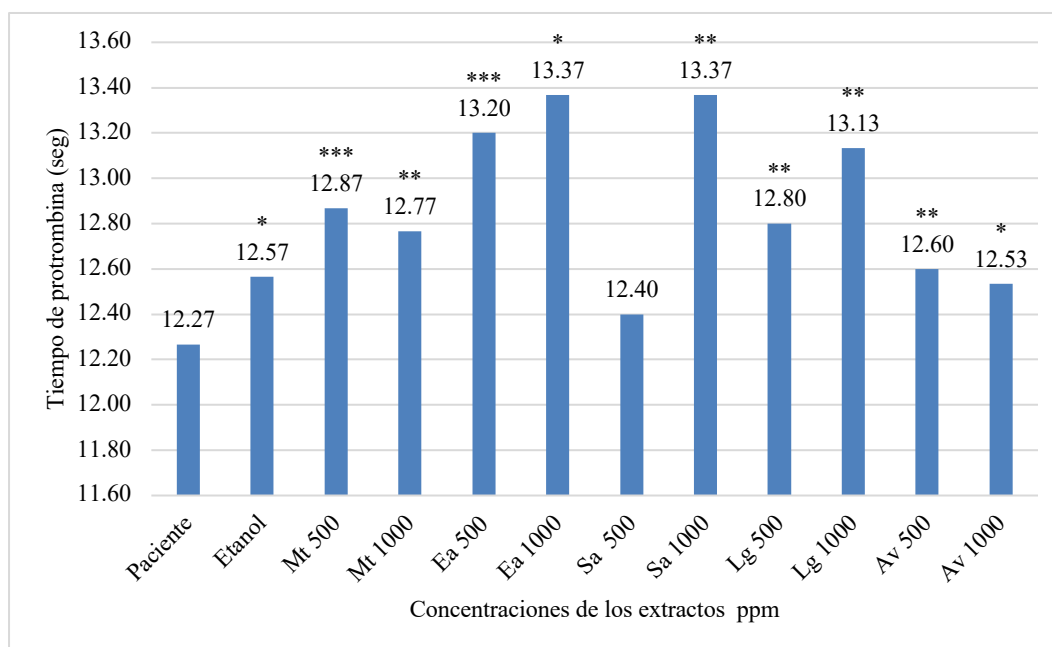


7.4. Pruebas de coagulación

Es importante que durante el tratamiento de pulpotomía no se interfiera o mejoren los tiempos de coagulación, por lo tanto, posterior a las pruebas antimicrobianas y para evaluar que los extractos de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *A. vera*, *S. aromaticum* y *L. graveolens* no interfieran con los tiempos de coagulación durante el tratamiento de terapia pulpar se realizaron pruebas de coagulación evaluando in vitro el tiempo de protrombina (TP) y el tiempo de tromboplastina parcial activada (TPPa) comparando con los tiempos de un paciente sano.

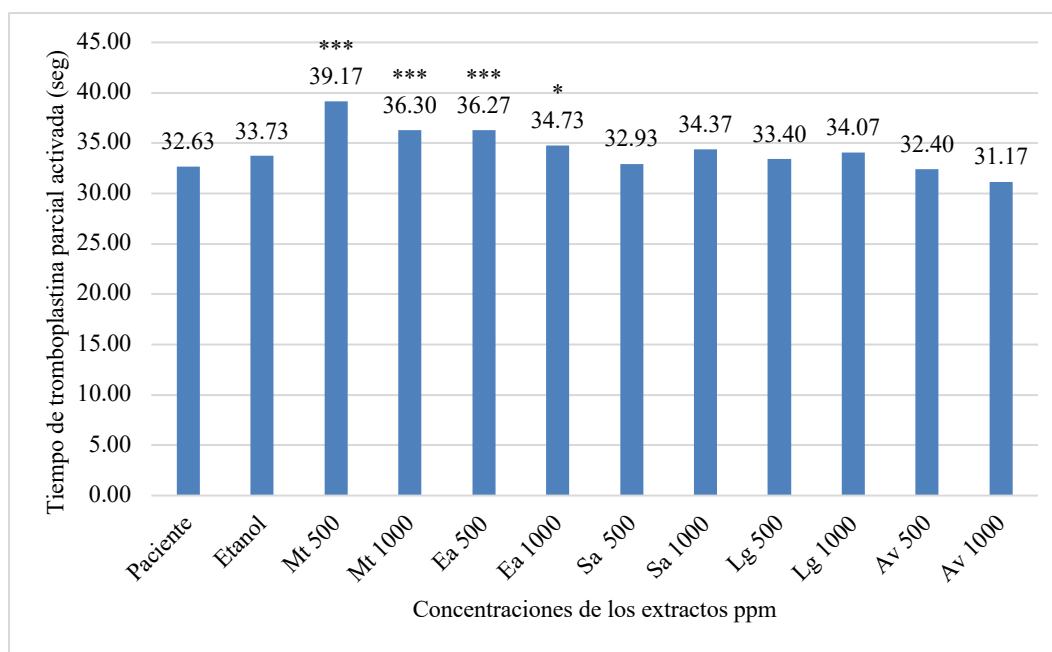
El gráfico 7.33 muestra la evaluación in vitro del tiempo de protrombina (TP) de los extractos de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *A. vera*, *S. aromaticum* y *L. graveolens*. Los datos representan las medias \pm DE en segundos tomando como control positivo los tiempos de un paciente sano. Observamos que el valor de TP del paciente es 12.27 segundos, todos los extractos se comportaron dentro de los rangos esperados puesto que no se observó diferencia estadística con un valor de ($p < 0.05$) sin embargo, *E. arvense* a 1000 ppm y *S. aromaticum* a 1000 ppm presentaron tiempos aumentados de 13.37 segundos.

Gráfico 7.33. Evaluación in vitro del tiempo de protrombina (TP) de los extractos de *M. tenuiflora* (Mt), *E. arvense* (Ea), *A. vera* (Av), *S. aromaticum* (Sa) y *L. graveolens* (Lg) a 500 y 1000 ppm. Los datos representan las medias en segundos tomando como control positivo los tiempos de un paciente sano.



El gráfico 7.34 muestra la evaluación in vitro del tiempo de tromboplastina parcial activada (TPPa) de los extractos de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *A. vera*, *S. aromaticum* y *L. graveolens*. Los datos representan las medias \pm DE en segundos tomando como control positivo los tiempos de un paciente sano. Observamos que el valor de TPPa del paciente es 32.63 seg y todos los extractos se comportaron dentro de los rangos esperados puesto que no se observó diferencia estadística con un valor de ($p < 0.05$) sin embargo, destaca *M. tenuiflora* a 500 ppm con un valor ($p < 0.05$) que presenta tiempos de 39.17 segundos.

Gráfico 7.34. Evaluación in vitro del tiempo de tromboplastina parcial activada (TPPa) de los extractos de *M. tenuiflora* (Mt), *E. arvense* (Ea), *A. vera* (Av), *S. aromaticum* (Sa) y *L. graveolens* (Lg) a 500 y 1000 ppm. Los datos representan las medias en segundos tomando como control positivo los tiempos de un paciente sano.

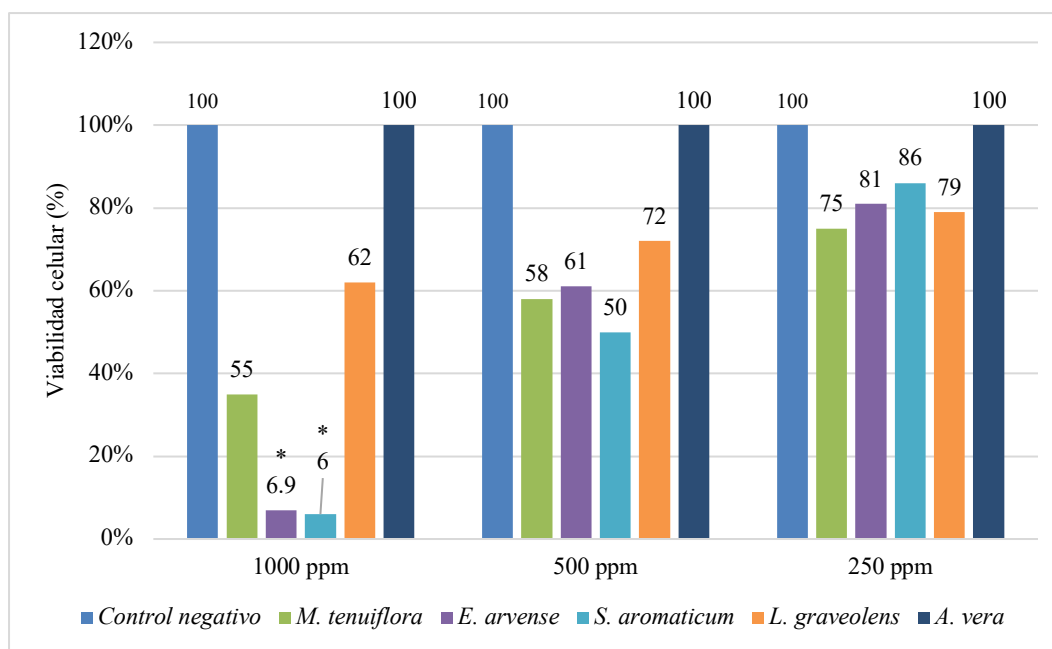


7.5. Pruebas de citotoxicidad

El gráfico 7.35 corresponde al ensayo fluorometric microculture cytotoxicity assay (FMCA) que muestra la viabilidad celular en porciento de los extractos de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *A. vera*, *S. aromaticum* y *L. graveolens* aplicados a la línea celular de fibroblastos gingivales humanos. Los datos representan las medias \pm DE del porcentaje de células viables, tomando como control (100%) de las células sin tratar.

Se observa que los cinco extractos a 250 ppm no presentan toxicidad, a 500 ppm todos se encuentran por arriba del 50% de viabilidad celular y a 1000 ppm observamos que *E. arvense* y *S. aromaticum* presentan una viabilidad celular menor a 24% a 1000 ppm, lo cual se considera citotóxico (Gráfico 7.35).

Gráfico 7.35. Ensayo Fluorometric microculture cytotoxicity assay (FMCA) que muestra la viabilidad celular en porciento de los extractos de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *A. vera*, *S. aromaticum* y *L. graveolens* aplicados a la línea celular de fibroblastos gingivales humanos. Los datos representan las medias del porcentaje de células viables, tomando como control (100%) de las células sin tratar.



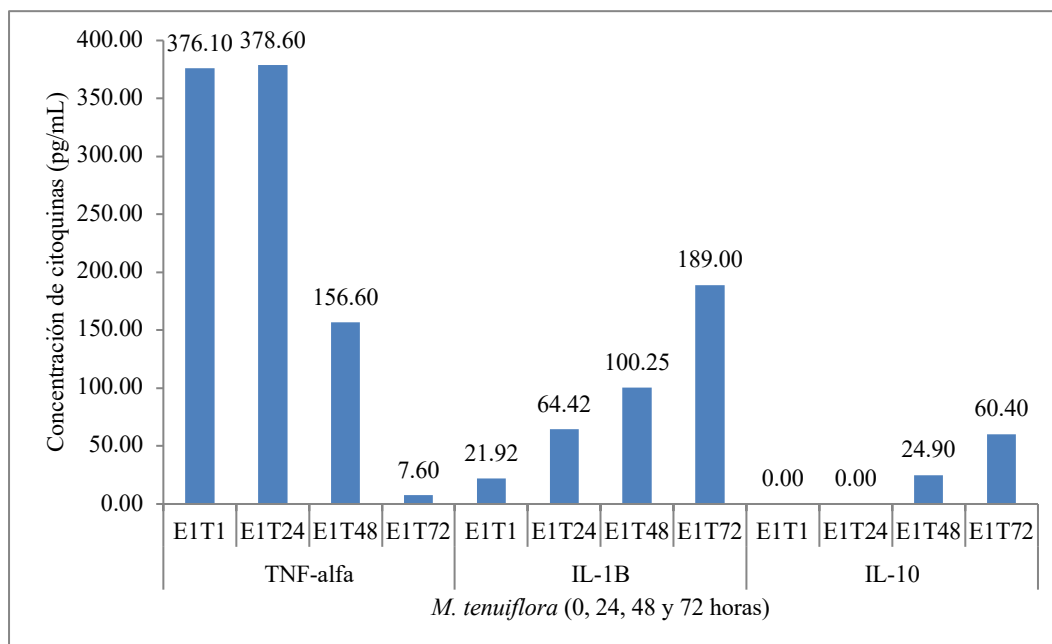
7.6. Pruebas de citocinas

Cuando se produce un daño tisular o una infección el TNF-alfa desarrolla una acción pro-inflamatoria tanto por sí mismo como a través de la regulación de otros mediadores inflamatorios. A nivel celular favorece el reclutamiento de linfocitos y neutrófilos y a nivel tisular produce la remodelación y recuperación de los tejidos. Los siguientes gráficos muestran los resultados de la concentración de citoquinas en fibroblastos gingivales humanos analizados mediante pruebas ELISA al aplicar los extractos estudiados en diferentes tiempos a 500ppm cada uno.

Los resultados muestran la concentración más elevada de TNF alfa en *M. tenuiflora* a las 24 horas y *S. aromaticum* a las 48 horas que nos habla de una respuesta favorable durante la inflamación aguda. En cuanto a la IL-1 β que es elaborada por los leucocitos y es importante durante procesos inflamatorios e infecciosos se observaron las concentraciones más elevadas para *E. arvense* y *L. graveolens*, ambos a las 48 horas y *A. vera* a las 72 horas siendo esto importante durante el proceso de la inflamación aguda en el tratamiento pulpar. Finalmente, la concentración de IL-10 la cual es una citocina antiinflamatoria podemos observar su pico de concentración a las 72 horas en presencia de los extractos *E. arvense* y *L. graveolens* lo cual es favorable para disminuir el proceso inflamatorio y la reparación de los tejidos en el caso del tratamiento pulpar.

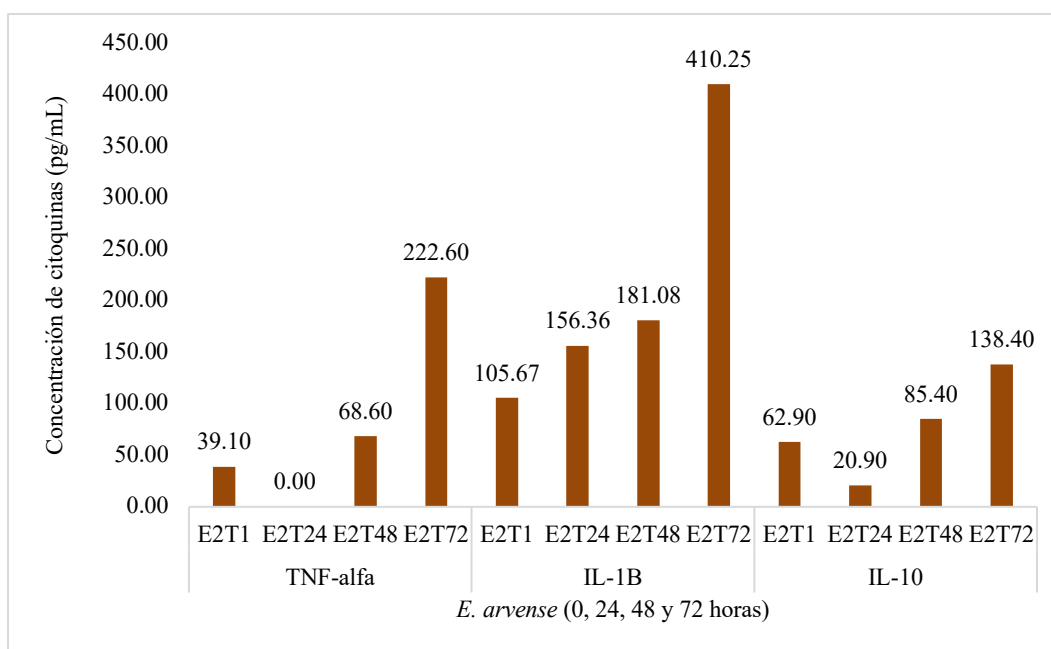
El gráfico 7.36. muestra la concentración de citoquinas TNF alfa, IL-1 β e IL-10 al tiempo inicial, 24, 48 y 72 horas en fibroblastos gingivales humanos, al aplicar el extracto de *M. Tenuiflora* podemos observar que TNF alfa que es una interleucina pro inflamatoria y que produce la remodelación y reparación de los tejidos se hace evidente con liberación estadísticamente significativa que se mantiene por 24 horas, posteriormente a las 48 horas empieza a disminuir. En cuanto a la interleucina IL-1 β que se considera un pro amplificador del sistema inmunológico y que se encuentra presente en inflamaciones crónicas observamos que se observa un incremento paulatino siendo un aumento estadísticamente significativo a las 72 horas. En cuanto a la interleucina IL-10 la cual es una citoquina que elaboran los macrófagos para reducir la inflamación, aparece su expresión hasta el tiempo 48 y aumenta a las 72 horas pero no es estadísticamente significativo.

Gráfico 7.36. Cuantificación de citocinas mediante ELISA en sobrenadantes de cultivos de fibroblastos gingivales humanos estimulados con el extracto de *M. tenuiflora*. Se probaron TNF alfa, IL-1 β IL-10 al tiempo inicial, 24, 48 y 72 horas. Los datos representan las medias de la concentración de citoquinas. Los extractos se expresan como E de la siguiente manera: E1 corresponde a *M. Tenuiflora*. Los tiempos se expresan como T, en donde T1 es tiempo inicial, T24 a las 24 horas T48 a las 48 horas y T72 a las 72 horas.



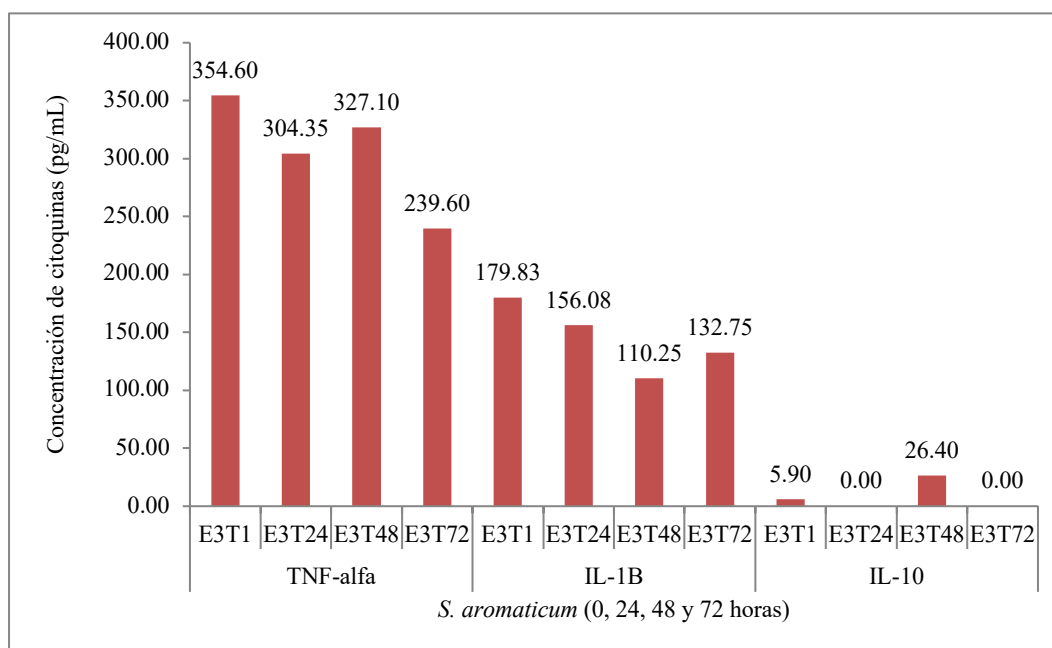
El gráfico 7.37 muestra la concentración de citoquinas TNF alfa, IL-1 β e IL-10 al tiempo inicial, 24, 48 y 72 horas. en fibroblastos gingivales humanos al aplicar el extracto de *E. arvense*. Podemos observar que en TNF alfa evidenciamos una mayor liberación a las 72 horas en comparación con la interleucina IL-1 β que alcanza un aumento estadísticamente significativo a las 72 horas y la interleucina IL-10 que se concentra en los tiempos 48 y 72 horas.

Gráfico 7.37. Cuantificación de citocinas mediante ELISA en sobrenadantes de cultivos de fibroblastos gingivales humanos estimulados con el extracto de *E. arvense*. Se probaron TNF alfa, IL-1 β IL-10.al tiempo inicial, 24, 48 y 72 horas. Los datos representan las medias \pm DE de la concentración de citoquinas. Los extractos se expresan como E de la siguiente manera: E2 corresponde a *E. arvense*. Los tiempos se expresan como T, en donde T1 es tiempo inicial, T24 a las 24 horas T48 a las 48 horas y T72 a las 72 horas.



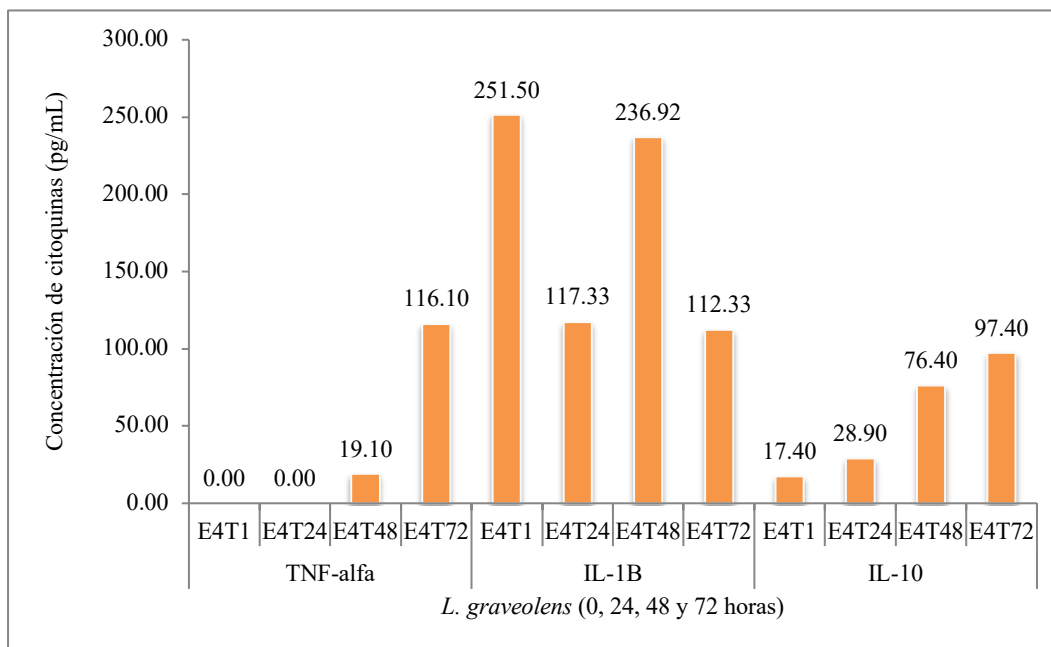
El gráfico 7.38 muestra la concentración de citoquinas TNF alfa, IL-1 β e IL-10 al tiempo inicial, 24, 48 y 72 horas. en fibroblastos gingivales humanos al aplicar el extracto de *S. aromaticum*. Podemos observar que en TNF alfa evidenciamos concentración en todos los tiempos siendo estadísticamente significativa y disminuye ligeramente a las 72 horas en comparación con la interleucina IL-1 β que al tiempo inicial se observa elevada y disminuye a las 48 horas, para posteriormente a las 72 horas volver a elevarse, en cuanto a la interleucina IL-10 solo se observa a las 48 horas.

Gráfico 7.38. Cuantificación de citocinas mediante ELISA en sobrenadantes de cultivos de fibroblastos gingivales humanos estimulados con el extracto de *S. aromaticum*.. Se probaron TNF alfa, IL-1 β IL-10.al tiempo inicial, 24, 48 y 72 horas. Los datos representan las medias de la concentración de citoquinas. Los extractos se expresan como E en donde E3 corresponde a *S. aromaticum*. Los tiempos se expresan como T, en donde T1 es tiempo inicial, T24 a las 24 horas T48 a las 48 horas y T72 a las 72 horas.



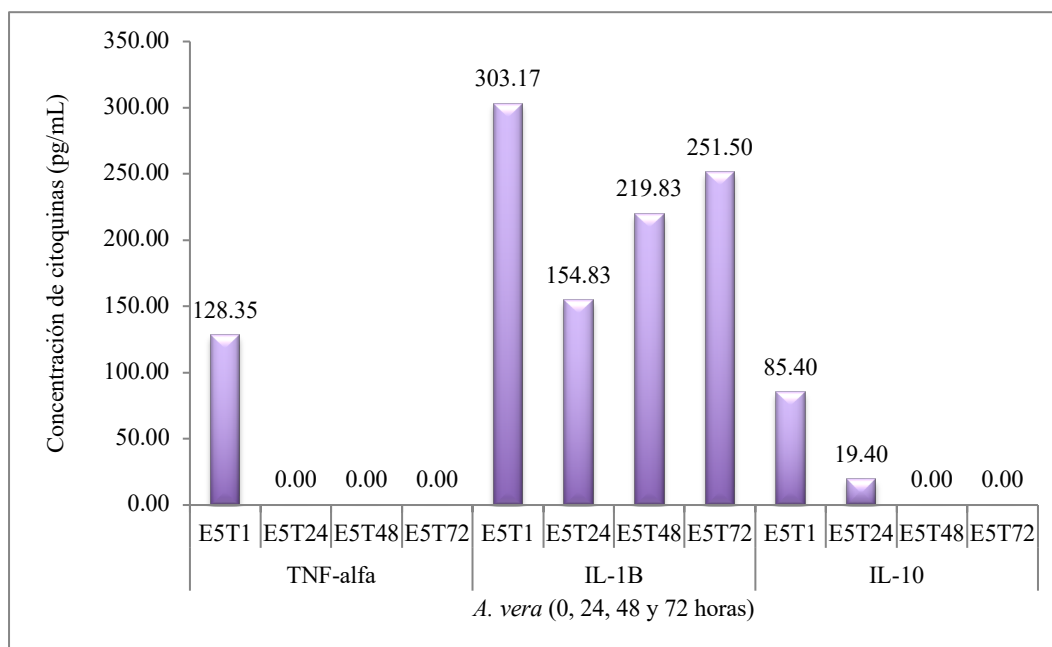
El gráfico 7.39 muestra la concentración de citoquinas TNF alfa, IL-1 β e IL-10 al tiempo inicial, 24, 48 y 72 horas. en fibroblastos gingivales humanos al aplicar el extracto de *L. graveolens*. Podemos observar que TNF- α se concentra a las 72 horas en comparación con la interleucina IL-1 β que al tiempo inicial se observa elevada y presenta una elevación estadísticamente significativa a las 48 horas. En cuanto a la IL-10 podemos encontrar concentraciones a las 48 y 72 horas.

Gráfico 7.39. Cuantificación de citocinas mediante ELISA en sobrenadantes de cultivos de fibroblastos gingivales humanos estimulados con el extracto de *L. graveolens*.. Se probaron TNF alfa, IL-1 β IL-10.al tiempo inicial, 24, 48 y 72 horas. Los datos representan las medias de la concentración de citoquinas. Los extractos se expresan como E en donde E4 corresponde a *L. graveolens*. Los tiempos se expresan como T, en donde T1 es tiempo inicial, T24 a las 24 horas T48 a las 48 horas y T72 a las 72 horas.



El gráfico 7.40 muestra la concentración de citoquinas TNF- α , IL-1 β e IL-10 al tiempo inicial, 24, 48 y 72 horas. en fibroblastos gingivales humanos al aplicar el extracto de *A. vera*. Podemos observar que en TNF- α se expresa en el tiempo inicial y posteriormente desaparece, en cuanto a la IL-1 β se expresa en el tiempo inicial y presenta un aumento estadísticamente significativo a las 72 horas. En cuanto a la IL-10 podemos observar su concentración en el tiempo inicial y posteriormente desaparece.

Gráfico 7.40. Cuantificación de citocinas mediante ELISA en sobrenadantes de cultivos de fibroblastos gingivales humanos estimulados con el extracto de *A. vera*. Se probaron TNF alfa, IL-1 β IL-10.al tiempo inicial, 24, 48 y 72 horas. Los datos representan las medias de la concentración de citoquinas. Los extractos se expresan como E en donde E5 corresponde a *A. vera*. Los tiempos se expresan como T, en donde T1 es tiempo inicial, T24 a las 24 horas T48 a las 48 horas y T72 a las 72 horas.

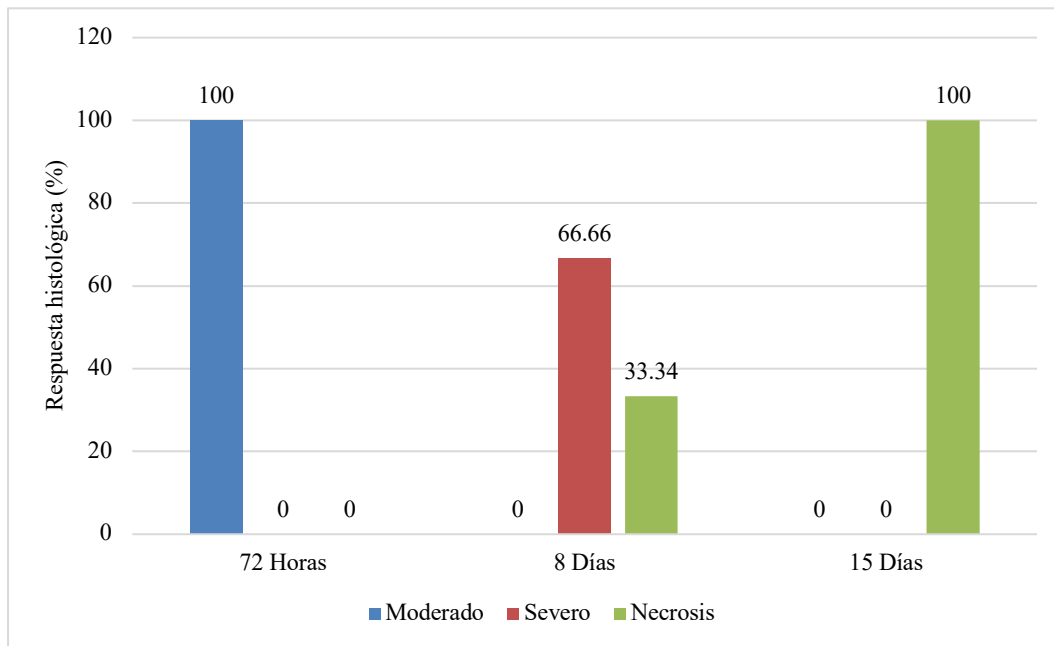


7.7. Resultados histológicos en el modelo animal

El ensayo de modelo animal es un referente del comportamiento de la formulación en la aplicación clínica. Se decidió la mezcla de los cinco extractos a 500ppm para utilizarla como sustancia o formulación en el ensayo en modelo animal. En el ensayo de modelo animal, es importante mencionar la fácil manipulación de la formulación que brinda cualidades clínicas superiores a lo que se encuentra actualmente, además un hallazgo clínico importante fue que durante el operatorio y la aplicación clínica, el formocresol produce de inmediato una reacción pulpar de momificación de los tejidos con un aspecto clínico pardo oscuro que sugiere algo de necrosis, sin embargo al aplicar la formulación de extractos la pulpa mantenía el color rojo característico y el sangrado era inmediatamente controlable. Posterior al tratamiento se obtuvieron resultados que muestran hallazgos de cambios histológicos de los dientes tratados con formocresol. Se encontraron cambios significativos con un alto grado de inflamación en las pulpas tratadas con el formocresol al comparar con los dientes tratados con la formulación y con los especímenes control. En los resultados del análisis histológico al microscopio óptico de los diferentes cortes de los dientes tratados y teñidos con HyE (hematoxilina y eosina) y observados a los diferentes aumentos del microscopio, panorámico, 10x y 40x podemos observar que los dientes de las ratas del grupo control muestran una pulpa sana con células de tipo fibroblastos, tejido pulpar sin inflamación y se observa la línea de los odontoblastos definida (Figura 7.1).

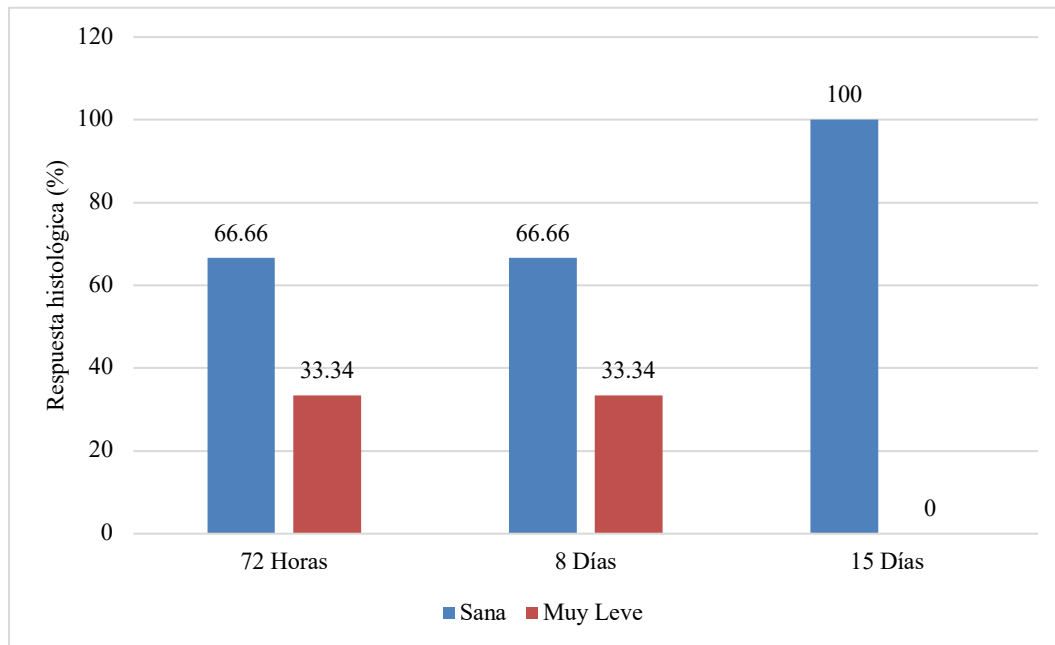
El gráfico 7.41 muestra la respuesta histológica de la pulpa de dientes tratados con formocresol a las 72 horas, 8 días y 15 días en donde se observa que el 100% de los dientes tratados mostraron respuesta inflamatoria moderada a las 72 horas, a los 8 días, el 66.6% de los dientes mostraron respuesta inflamatoria severa y el 33.3% mostraron necrosis, mientras que a los 15 días el 100% de los dientes tratados mostraron necrosis existiendo una diferencia significativa entre los dientes tratados con formocresol y los dientes control.

Gráfico 7.41. Respuesta histológica de la pulpa dental tratada con formocresol a las 72 horas, 8 días y 15 días. Los datos representan el porcentaje del análisis morfométrico y del grado de la lesión de los tejidos de la pulpa tomando como control (100%) el espécimen no tratado con una prueba t: 6.4, p=0.0428



El gráfico 7.42 muestra la respuesta histológica de la pulpa dental tratada con la formulación de los extractos a las 72 horas, 8 días y 15 días. Observamos que a las 72 horas el 66.6% de los dientes tratados mostraron pulpa sana y el 33.3% respuesta inflamatoria leve. A los 8 días se mantienen estos resultados, mientras que a los 15 días el 100% de los dientes tratados mostraron pulpa sana y podemos concluir que no existe diferencia significativa entre los dientes de los especímenes tratados con la formulación y el grupo control.

Gráfico 7.42. Respuesta histológica de la pulpa dental tratada con los extractos de la formulación a las 72 horas, 8 días y 15 días. Los datos representan el porcentaje del análisis morfométrico y del grado de la lesión de los tejidos de la pulpa tomando como control (100%) el espécimen no tratado con una prueba t: 1.28, $p=0.5257$



La Figura 7.1 muestra el espécimen control en donde se observa tejido pulpar sano.

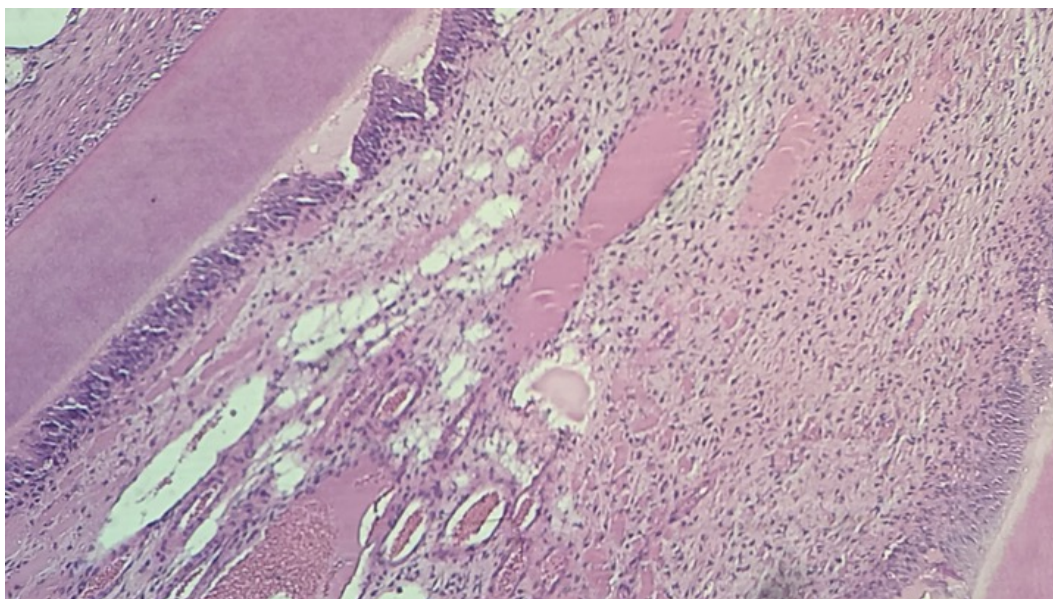


Figura 7.1. Especimen control en donde se observa tejido pulpar sano.

En la observación de las pulpas tratadas con formocresol a los 3 días (72 horas) observamos presencia de licuefacción de la pulpa y extravasación, edema, desorganización celular y hemorragia con vasodilatación. El 100% de los dientes presentaron pulpa con inflamación moderada. En cuanto a los dientes tratados con la formulación de los extractos, a los 3 días se encontró vasodilatación moderada, edema, congestión vascular, células plasmáticas, linfocitos, infiltrado inflamatorio, extravasación en un 30% que no muestra daño pulpar lo cual es favorable para la reparación de los tejidos. El 66% presentó pulpa sana y el 34% inflamación leve (Figuras 7.2 y 7.3).

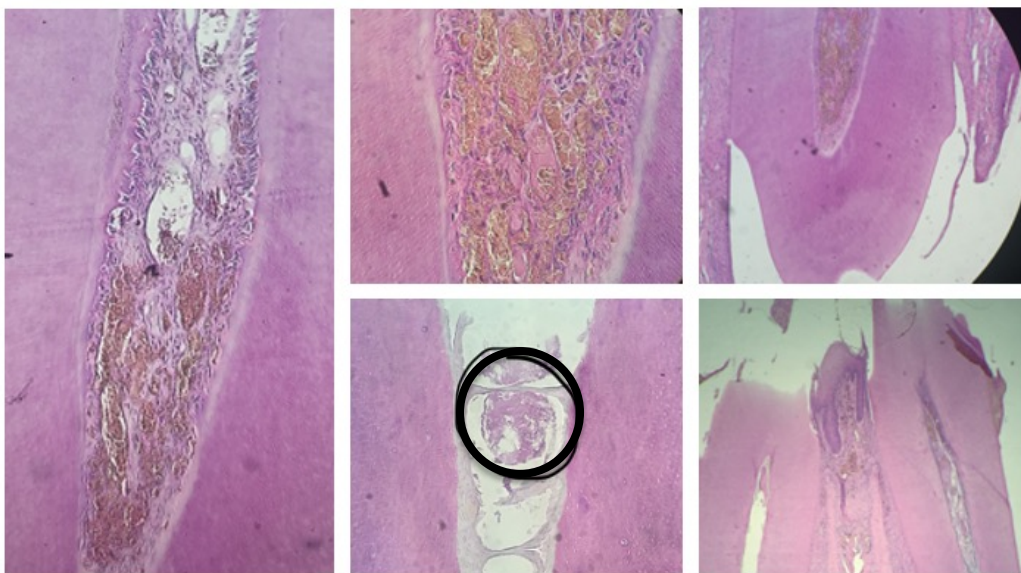


Figura 7.2. Ratas tratadas con formocresol para realizar observación a los 3 días (72 horas).

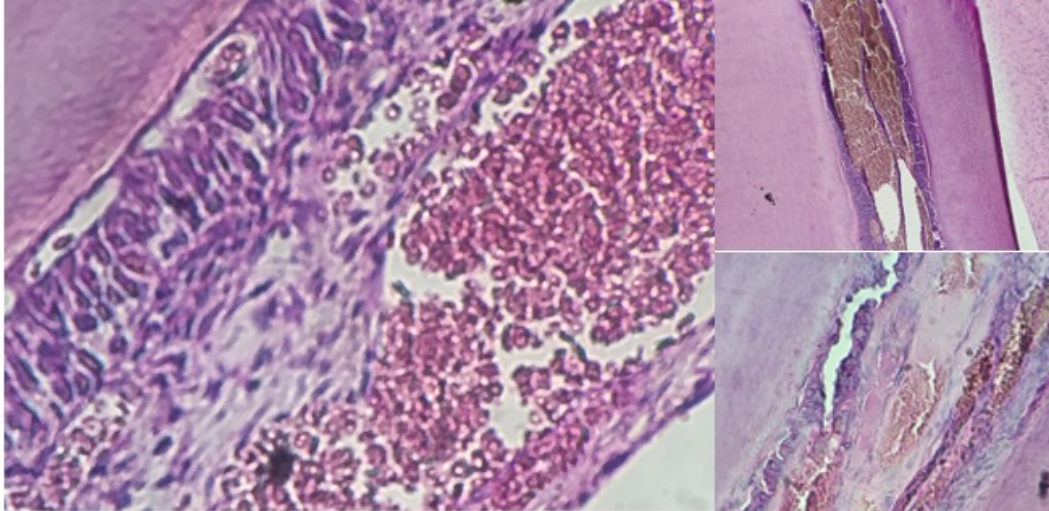


Figura 7.3. Ratas tratadas con la formulación de los extractos para realizar observación a los 3 días (72 horas).

Los cortes histológicos de los especímenes tratados con formocresol a los 8 días muestran zonas de necrosis, ausencia de pulpa, escasa fibrosis, sin presencia de células inflamatorias y no se observan vasos sanguíneos. El 66% de los dientes presentó inflamación severa y el 34% presentó necrosis pulpar mientras que las pulpas tratadas con los extractos muestran fibrosis, vasodilatación, reparación, pulpa sana (66%) e inflamación aguda (34%) (Figuras 7.4 y 7.5). La figura 7.6 muestra un espécimen tratado con la formulación de extractos a los 8 días en donde podemos observar la zona de los odontoblastos definida.

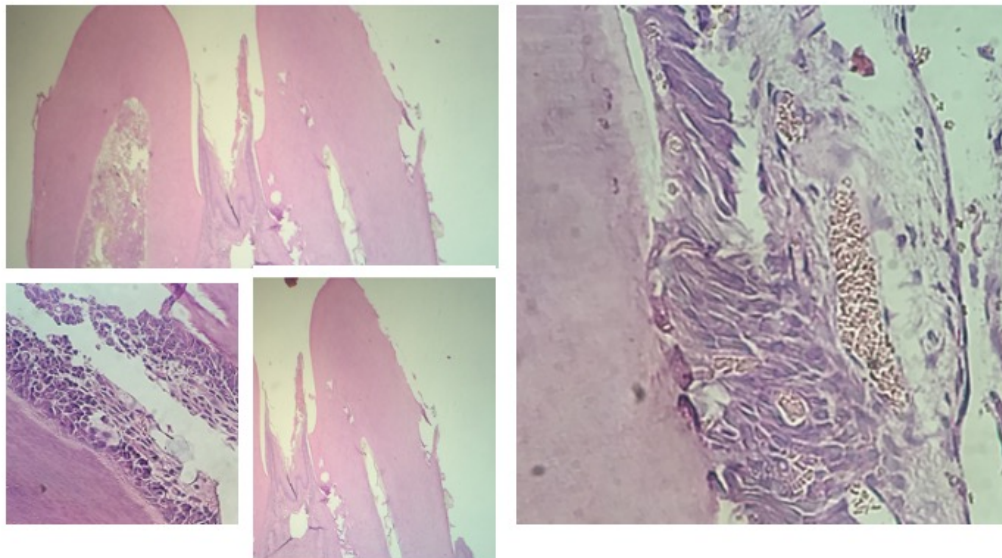


Figura 7.4. Ratas tratadas con formocresol para realizar observación a los 8 días.

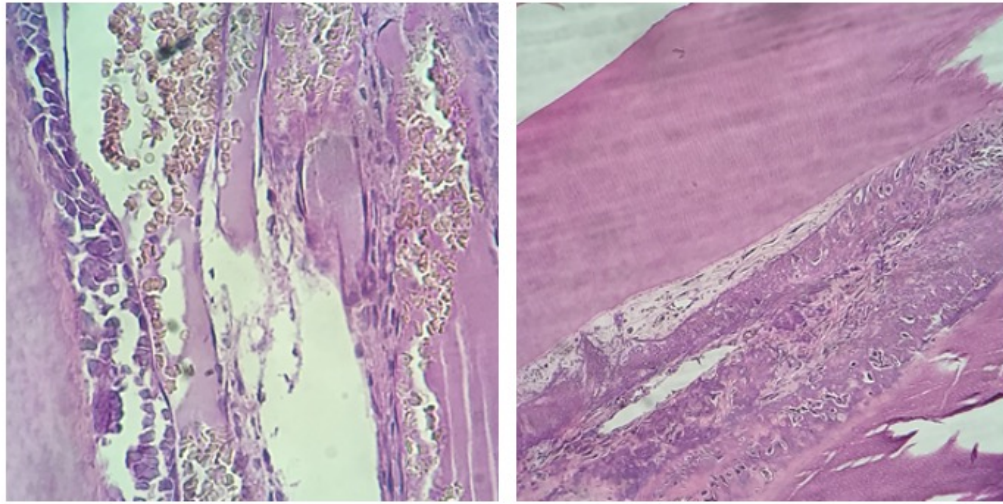


Figura 7.5. Ratas tratadas con extractos para realizar observación a los 8 días.

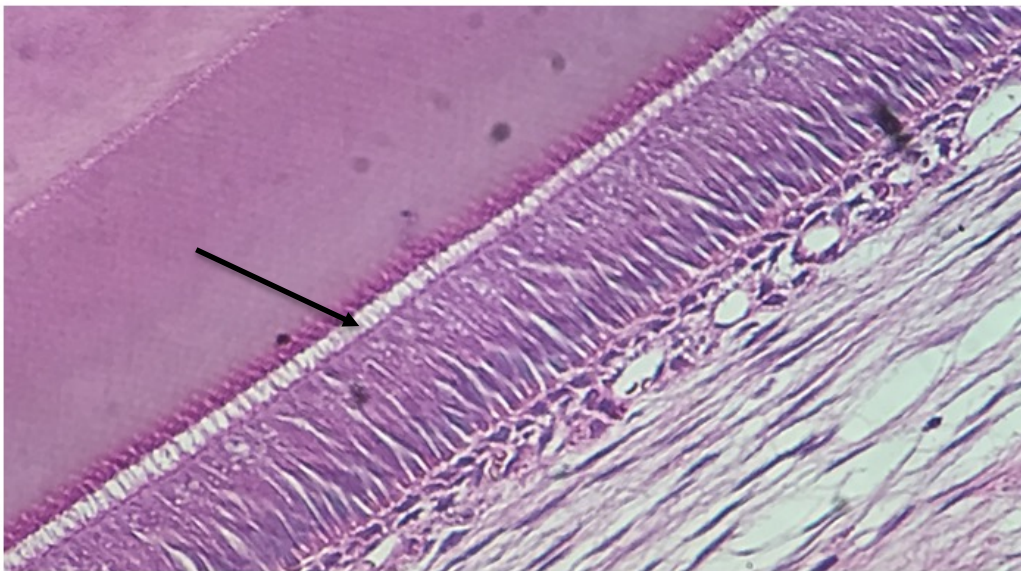


Figura 7.6. Espécimen tratado con extractos para realizar observación a los 8 días. Se observa la zona odontoblástica definida.

En cuanto a los cortes histológicos observados en los sacrificios a los 15 días encontramos en las pulpas tratadas con formocresol restos de tejido pulpar, ausencia de vasos sanguíneos, no se observan vascularidad y celularidad, no se encontró pulpa sana por lo tanto el 100% de

los dientes tratados presentó necrosis por coagulación. En cuanto a los dientes tratados con los extractos a los 15 días se observa vasodilatación de leve a moderada, pulpa sin infiltrado, pulpa sana, escasa fibrosis y otros especímenes sin fibrosis e incluso actividad en las células odontoblásticas que sugieren producción de dentina y reparación por lo tanto el 100% presentó pulpa sana (Figuras 7.7 y 7.8).

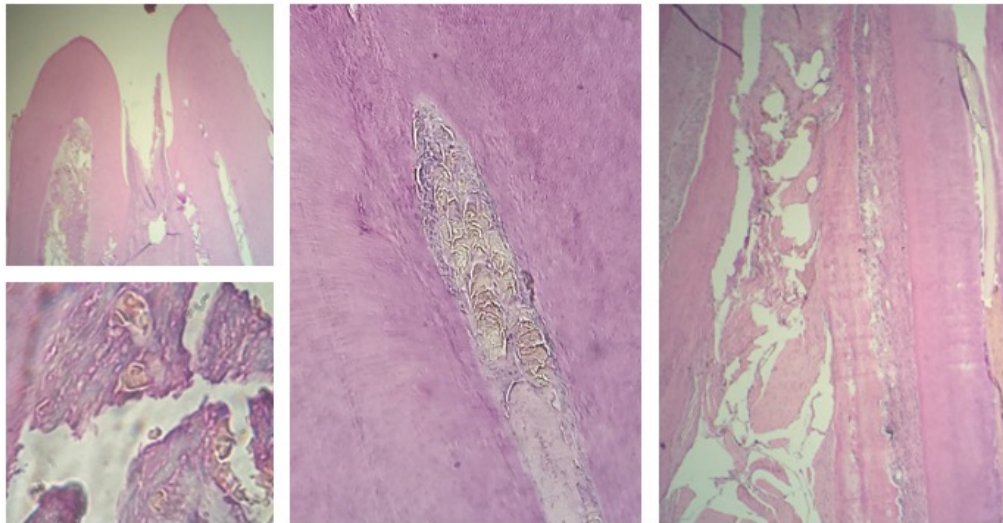


Figura 7.7. Ratas tratadas con formocresol para realizar observación a los 15 días.

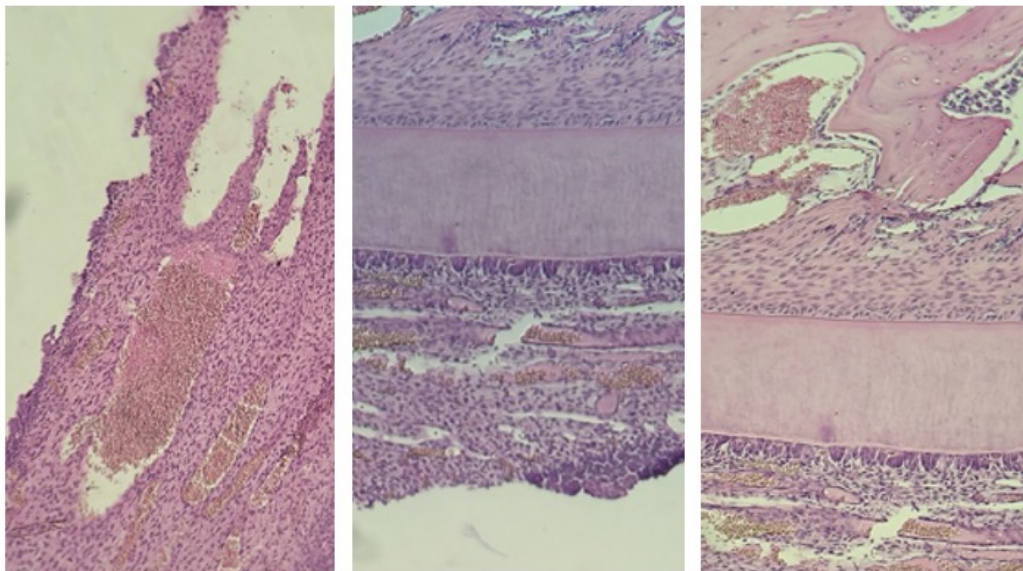


Figura 7.8. Ratas tratadas con extractos para realizar observación a los 15 días.

En las figuras 7.9, 7.10, 7.11 y 7.12 se puede observar un comparativo de los cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina observados al microscopio a 10x y 40x que muestran los dientes tratados con formocresol y con la formulación de extractos a las 72 horas (3 días), 8 días y 15 días.

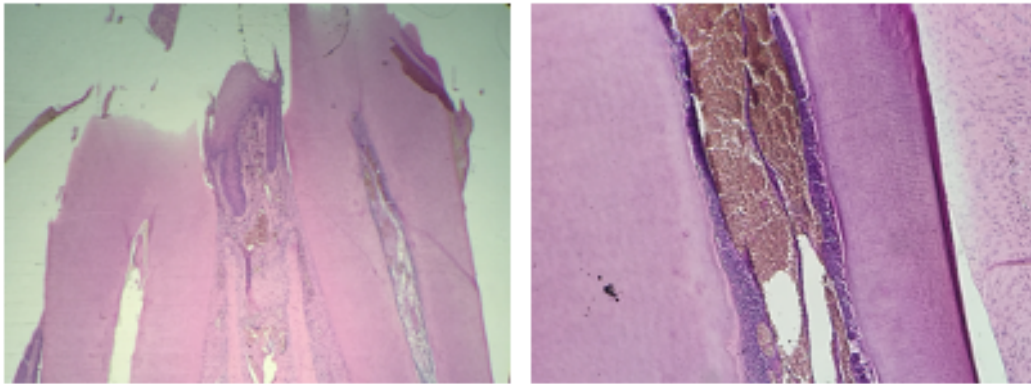


Figura 7.9. Corte histológico teñido con hematoxilina y eosina observado al microscopio a 10x y 40x que muestra los dientes tratados con formocresol y con la formulación de extractos a las 72 horas.

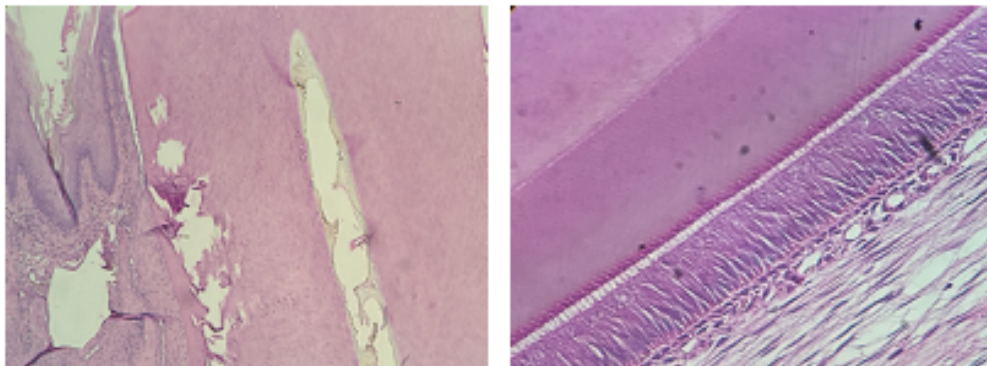


Figura 7.10. Corte histológico teñido con hematoxilina y eosina observado al microscopio a 40x que muestra los dientes tratados con formocresol y con la formulación a los 8 días.

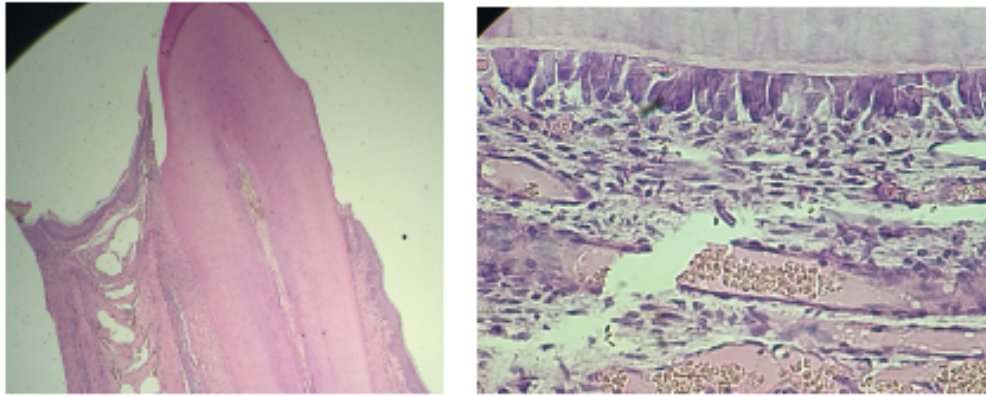


Figura 7.11. Corte histológico teñido con hematoxilina y eosina observado al microscopio a 10x y 40x que muestra los dientes tratados con formocresol y con la formulación a los 15 días.

La figura 7.12. muestra un comparativo de los cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina observados al microscopio óptico a 10x y 40x que muestran los dientes tratados con formocresol y con la formulación de los extractos a los 3, 8 días y 15 días. En la parte superior se muestran los dientes tratados con formocresol y en la parte inferior los dientes y la pulpa tratados con la formulación de los extractos.

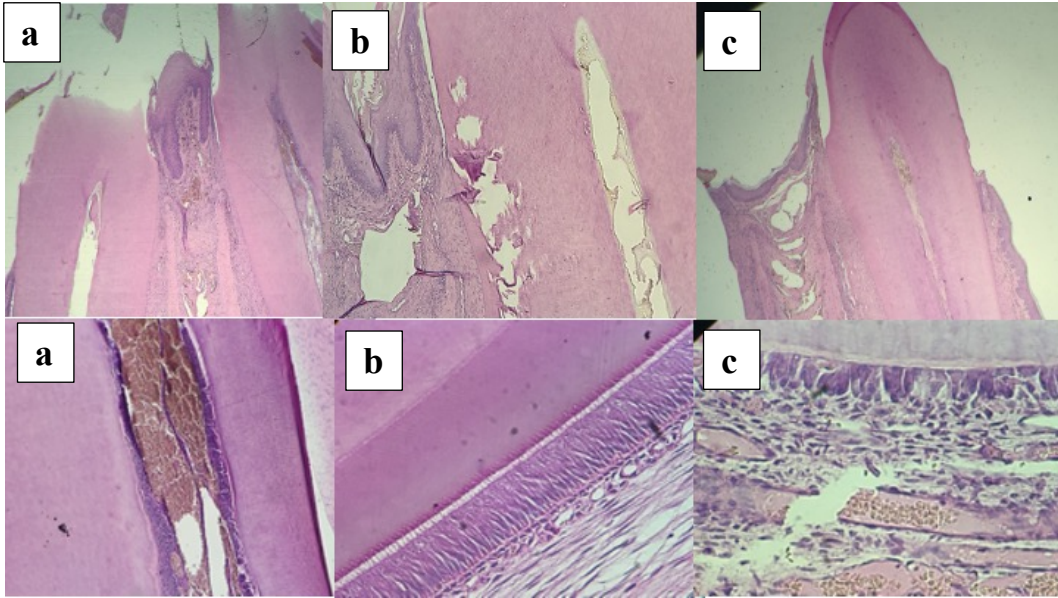


Figura 7.12. Corte histológico teñido con hematoxilina y eosina observado al microscopio a 10x y 40x que muestra los dientes tratados con formocresol y observados a los 3 (a), 8 (b) y 15 (c) días y con la formulación a los a los 3 (a), 8 (b) y 15 (c) días.

8. DISCUSIÓN

El área de la salud y en especial el campo de la odontología, requiere propuestas y alternativas de tratamiento a los medicamentos y/o formulaciones utilizadas en la actualidad y desde hace muchos años. La finalidad de este trabajo fue evaluar cinco extractos y sus propiedades como alternativa al tratamiento llamado pulpotomía, el cual es un tratamiento de la pulpa de los dientes primarios o permanentes jóvenes que consiste en realizar terapia pulpar eliminando la pulpa de la corona afectada por caries o exposición traumática y preservando el tejido pulpar radicular al colocar un medicamento con propiedades específicas que permita a la pulpa radicular mantenerse libre de bacterias, con un proceso de coagulación y cicatrización normal sin toxicidad y después de la colocación del medicamento colocar un cemento y una restauración que le permitan al diente permanecer en boca de manera normal y asintomática (sin dolor, infección e inflamación) hasta su exfoliación normal. Se evaluaron cinco plantas de las cuales se obtuvieron cinco extractos, se evaluaron también sus diferentes propiedades químicas y antimicrobianas en forma individual y en varias combinaciones para decidir finalmente la mezcla de los mejores extractos o formulación modelo que pudiera ser utilizada en el tratamiento de los dientes. El objetivo fue que la formulación aportara las mejores propiedades químicas, antimicrobianas, que no interfiriera con los tiempos de coagulación, sin toxicidad y promoviera la reparación tisular.

Cada prueba realizada en este proyecto aportó resultados que favorecieron la decisión de los extractos y sus concentraciones. En cuanto a las concentraciones, los análisis de los resultados demostraron que la combinación de los cinco extractos potencializan sus propiedades antimicrobianas a 500 ppm. En el ensayo de modelo animal, es importante mencionar la fácil manipulación de la formulación que brinda cualidades clínicas superiores a lo que se encuentra actualmente, además un hallazgo clínico importante es que durante el operatorio y la aplicación clínica, el formocresol produce de inmediato una reacción pulpar de momificación de los tejidos con un aspecto clínico pardo oscuro que sugiere algo de necrosis, sin embargo, la formulación de extractos mantiene el color rojo característico de la pulpa y el sangrado fué inmediatamente controlable.

Las pruebas fitoquímicas aportan como resultado que los compuestos químicos presentes en cada extracto nos proporcionan propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, de cicatrización y de regeneración celular. Otros autores encontraron resultados similares, Anton *et al.* (1993) señalan que la corteza de *M. tenuiflora* presenta abundancia de taninos y otros compuestos químicos importantes en el tratamiento contra quemaduras. En este trabajo encontramos que *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *S. aromaticum* y *L. graveolens* presentaron esteroides y triterpenos que son importantes componentes con propiedades o actividad antiinflamatoria, antimicrobiana, antitumoral y antiviral. Pascual y colaboradores en el 2001 reportaron flavonoides en el aceite de *L. graveolens*, por su parte Cortés Rojas (2014) menciona que el clavo *S. aromaticum* también es rico en compuestos polifenólicos principalmente ácidos fenólicos como ácido gálico, cafeico, ferúlico, elágico y en menor concentración flavonoides. Nosotros encontramos que los extractos de *M. tenuiflora*, *S. aromaticum* y *L. graveolens* presentaron sesquiterpenlactonas, taninos y flavonoides los cuales brindan propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias y antioxidantes, *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *S. aromaticum* y *L. graveolens* presentaron esteroides y triterpenos, importantes componentes con propiedades o actividad antiinflamatoria y antimicrobiana y *A. vera* es considerado un regenerador celular y mostró saponinas, importantes en actividad antioxidante y antiinflamatoria. Todas estas propiedades encontradas aportan gran beneficio a la terapéutica pulpar, por lo tanto, tepezcohuite, cola de caballo, clavo y orégano proporcionan efecto antimicrobiano y antiinflamatorio en la formulación, tepezcohuite brinda opción como cicatrizante y reparador de tejido conectivo y sábila con acción antioxidante y antiinflamatoria.

En la evaluación de la actividad antimicrobiana los resultados de las pruebas de los extractos individuales coinciden en que contra *S. mutans*, *S. aromaticum* presenta efecto antimicrobiano a 3000 ppm, *E. arvense*, y *L. graveolens* presentan mejor efecto inhibitorio en concentraciones de 3000, 2000, 1000 y 500 ppm, sin embargo, al disminuir la concentración a 500 y 250 ppm *E. arvense*, *S. aromaticum* disminuyen el efecto inhibitorio mientras que el efecto de *L. graveolens* se mantiene a 500 ppm ($p= 0.0000$) y a 250 ppm ($p= 0.0001$). En cuanto a la formulación compuesta por base (*M. tenuiflora*, *E. arvense* y *A. vera*) añadiendo clavo y orégano brinda el mejor resultado antimicrobiano contra los

microorganismos orales. Otros autores ya han mencionado estos resultados anteriormente con los extractos de *S. aromaticum* y *L. graveolens* Erazo, *et. al* (2017) mencionan que no encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) al probar los aceites de eugenol (obtenido del clavo) y timol (obtenido del orégano) a la misma concentración en comparación con clorhexidina al 0.12% tanto a la 24 como 48 h. Otros autores mencionan que el orégano posee efecto antibacteriano sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* en infusiones sobre el 20% de concentración (Schovelin, Muñoz, 2018). En este estudio obtuvimos efecto inhibitorio contra *S. mutans* y *S. sobrinus* a las 24 horas similar o superior al obtenido con clorhexidina al 0.12% (1200 ppm) con una diferencia estadística altamente significativa en las diferentes concentraciones. En cuanto a los resultados de la formulación sobre cepas de *S. mutans* muestran un efecto antimicrobiano muy similar a clorhexidina en la mezcla de los cinco extractos *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *A. vera*, *S. aromaticum* y *L. graveolens* ($p = 0.3217$) a 1000 ppm y ($p = 0.0621$) a 500 ppm y sobre cepas de *S. sobrinus* igualmente se comportan parecida la formulación de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *A. vera*, *S. aromaticum* y *L. graveolens* ($p = 0.2895$) y ($p = 0.0081$) a 500ppm con respecto a la sustancia control.

Por los resultados anteriores, consideramos que la formulación compuesta por los cinco extractos produce una sinergia que mejora la efectividad contra los microorganismos orales como *S. mutans* y *S. sobrinus*, bacterias presentes en la caries y que generalmente encontramos en caries profundas y penetrantes de los dientes en los que se realiza el tratamiento de pulpotomía, por lo tanto el efecto antimicrobiano de la formulación supone un mayor éxito en el tratamiento de pulpas infectadas con estos microorganismos.

En cuanto al ensayo de viabilidad celular mediante MTT los resultados confirmaron que la combinación de los extractos potencia el efecto antimicrobiano contra *S. mutans* y *S. sobrinus*. El extracto de clavo a 500 ppm presentó efectividad de 53.02% el orégano a 1000 ppm presentó efectividad de 72.94% mientras que la sustancia control (clorhexidina al 0.12%) presentó efectividad de 67.54%, por su parte la mezcla de la formulación base/clavo/orégano presentó efectividad de 49.55% a 1000 ppm y de 47.4% a 500 ppm. Contra *S. sobrinus* presentó efectividad superior a la sustancia control la mezcla base/clavo/orégano en todas sus concentraciones. Otros autores han investigado el efecto antimicrobiano de extractos vegetales contra estas bacterias mediante la misma técnica donde se han encontrado resultados similares, por ejemplo Ortega *et al.* en 2016 evaluaron extractos

de *L. alba* y *C. citratus* mediante ensayo MTT y reportaron actividad contra *S. mutans* con muy despreciable citotoxicidad. El extracto de *L. alba* presenta actividad desde concentraciones tan bajas como 0.1 ppm con efectividad de 95.8% y *C. citratus* mostró actividad de 95.4% en las concentraciones de 1 ppm.

Con respecto a la evaluación de la actividad coagulante/anticoagulante la prueba aportó resultados muy importantes ya que la formulación no debe prolongar los tiempos de coagulación y el sangrado normal de la pulpa durante la pulpotomía lo cual es ideal en el tratamiento. Otros autores han investigado la capacidad de extractos vegetales sobre la promoción de la cicatrización como por ejemplo Kose *et al.* (2012) estudiaron la combinación de cinco extractos de *Urtica dioica*, *Vitis vinifera*, *Glycyrrhiza glabra*, *Alpinia officinarum* y *Thymus vulgaris* verificando que los componentes del vegetal pueden auxiliar en la hemostasia y concluyeron que sin pretratamiento con heparina, la combinación de los extractos medicinales acortó el tiempo de hemostasia en 1.29 minutos y redujo la cantidad de sangrado en 0.63g y con pretratamiento con heparina, acortó el tiempo de hemostasia en 2.29 minutos y redujo la cantidad de sangrado en 0.70g. Nayal *et al.* (2015) estudiaron algunas plantas, entre ellas *Plantago lanceolata*, *Equisetum arvense*, *Potentilla erecta*, *Artemisia absinthium* y *Alchemilla vulgaris*, cinco especies de plantas medicinales utilizadas tradicionalmente para el tratamiento de hemorragias. Las pruebas hemostáticas realizadas in vitro con extractos hidroalcohólicos de estas plantas revelaron que *Plantago lanceolata*, *Equisetum arvense*, *Potentilla erecta* y *Artemisia absinthium* tenían un efecto astringente. El estudio mostró que *Plantago lanceolata* tenía las mejores propiedades coagulantes con una reducción porcentual del tiempo de recalcificación del plasma del 19% sin significación estadística. *Artemisia absinthium* redujo el tiempo de protrombina (TP), lo que sugiere una activación de la vía de coagulación extrínseca. Todas estas plantas redujeron la actividad de lisis de coágulos de la estreptoquinasa con diferentes porcentajes, pero *Potentilla erecta* tuvo la mayor significación. Los resultados de la determinación del TP muestran que *Alchemilla vulgaris*, *Equisetum arvense* y *Potentilla erecta* disminuyeron el TP en diferentes porcentajes pero sin significancia estadística $p > 0,05$. Los resultados de la determinación de TTPa mostraron que *Plantago lanceolata*, *Alchemilla vulgaris*, *Artemisia absinthium* y *Potentilla erecta* aumentaron el TTPa en comparación con el control sin significación estadística $p > 0,05$. Solo *Equisetum arvense* disminuyó el tiempo en comparación con el

control pero sin significancia estadística $p > 0.05$. Shafeie *et al.* (2015) y Preethi *et al.*, (2009) estudiaron la relación dosis efecto del extracto de caléndula en lesiones en ratas utilizando varios grupos de tratamiento con dosis crecientes. La duración del seguimiento varió de 6 a 21 días después de las escisiones de piel y los principales resultados medidos en histopatología fueron angiogénesis, composición de colágeno, presencia de células inflamatorias y reepitelización. En nuestro estudio, los resultados in vitro fueron muy favorables ya que al medir el tiempo de protrombina (TP) y el tiempo de tromboplastina parcial activada (TPPa) y comparando con los tiempos de un paciente sano se determinó que ninguno de los extractos prolongó de manera estadística significativa los tiempos de coagulación, excepto cola de caballo y clavo a 1000 ppm que aumentaron el tiempo por un segundo, lo cual no representa amenaza clínica. Observamos que en los cinco extractos evaluados a 500 y 1000 ppm no existe diferencia significativa con respecto al valor de TP del paciente que es 12.27 segundos, excepto en *E. arvense* a 1000 ppm ($P = 0.0415$) y *S. aromaticum* a 1000 ppm ($P = 0.048$) ($p < 0,05$), los cuales lo elevan por un segundo pues presentaron ambos tiempos de 13.37 seg. En cuanto al valor de TPPa del paciente que fue de 32.63 segundos observamos que en todos los extractos evaluados a 500 y 1000 ppm no existe diferencia significativa con respecto al valor del paciente excepto en *M. tenuiflora* a 500 ppm con un valor ($P = 0.0001$) ($p < 0,05$) que aumentó los tiempos a 39.17 segundos.

Con respecto a la determinación de la citotoxicidad de los extractos a través del ensayo FMCA (Fluorometric microculture cytotoxicity assay) en línea celular de cultivos de fibroblastos gingivales humanos, se identificó el nivel de toxicidad celular considerando la Norma ISO 10993 la cual menciona que un producto es no citotóxico con una viabilidad celular de 100 a 75%; ligeramente citotóxico con una viabilidad celular de 74 a 50%; moderadamente citotóxico con una viabilidad celular de entre 49 a 25% y extremadamente citotóxico con una viabilidad celular de entre 24 a 0%. En este estudio el principal hallazgo es que observamos que los cinco extractos a 250 ppm no presentan efecto citotóxico en los fibroblastos gingivales humanos, a 500 ppm todos se encuentran por arriba del 50% de viabilidad celular lo cual es aceptable y solamente *E. arvense* y *S. aromaticum* a 1000 ppm presentaron una viabilidad celular menor a 24%. En un estudio de Saadia *et al.* (2013) en el cual evaluaron la citotoxicidad de la nanopartícula de saponina BBE sobre células renales mediante ensayo FMCA (Fluorometric microculture cytotoxicity assay) en donde los

criterios de calidad para un ensayo exitoso incluyeron un coeficiente medio de variación de menos del 30% en el control y una señal de fluorescencia en los pocillos de control de más de cinco veces la del blanco, encontraron que la actividad de BBE en las líneas celulares de RCC (27%) y ACHN (39%) fue significativamente menor que en las células HRPTEpiC normales (74%) y PBMC (97%) ($p < 0,0001$). Por el contrario, no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los dos tipos de células normales en su respuesta a BBE. Otro estudio realizado por García, Rueda (2014) en el cual se muestra el porcentaje de viabilidad celular en fibroblastos gingivales humanos estimulados con Mercurius–Heel®S comparando dos tiempos, se observaron diferencias significativas $p = 0.009$.

En cuanto al ensayo de expresión de citoquinas varios autores mencionan que algunas plantas medicinales o sus componentes poseen actividad inmunomoduladora, es decir, son capaces de ejercer un efecto farmacológico sobre los factores celulares que actúan sobre la respuesta inmune. Otros autores han investigado la expresión de citoquinas, por ejemplo en un estudio realizado por Kubo *et al.* (2014), describen que el TNF α al igual que la IL1 α muestran efecto positivo en procesos de cicatrización principalmente en estadios tempranos (inflamación y proliferación). Moroguchi *et al.* (2004) mencionan en su estudio que en estadios tardíos como la maduración, la IL10 inhibe la proliferación celular favoreciendo el remodelamiento de la matriz extracelular. En otro estudio, de acuerdo a los hallazgos de Battergay *et al.* (1995) se sugiere que para favorecer la regeneración periodontal, es necesario el incremento de citocinas como la IL1 α y la IL10, ya que estas citocinas además de cumplir un papel importante en la respuesta inflamatoria, pueden regular otros procesos celulares como la proliferación. En un estudio realizado por García *et al.* (2014) en el cual midieron la producción de citocinas en fibroblastos gingivales humanos estimulados con Mercurius–Heel®S, observaron que con respecto a la IL-1 β se observa mayor producción en concentraciones intermedias del tratamiento (0.13 a 0.005 mg/mL). En referencia al TNF α , la mayor producción se observa tanto a los 15 minutos como a las 2 horas y se concluyó que se aumenta la concentración de IL-10 tanto a los 15 minutos como a las 2 horas a medida que disminuye la concentración de Mercurius–Heel®S. En este estudio, los niveles de citocinas pro-inflamatorias TNF α e IL-1 β producidas por fibroblastos tratados con los extractos muestran diferencias a través de los tiempos de exposición, TNF α se expresa con tepezcohuite a las 24 horas y con clavo a las 48 horas lo cual es un efecto positivo en procesos

de cicatrización principalmente en estadios tempranos (inflamación y proliferación), IL-1 β se expresa con cola de caballo y orégano a las 48 horas y con sábila a las 72 horas demostrando así todos los extractos liberación de citocinas. De igual manera, la citocina anti-inflamatoria IL-10 demostró aumentar en clavo y orégano a las 72 horas lo cual es favorable pues inhibe la proliferación celular favoreciendo el remodelamiento de la matriz. Normalmente ante el estímulo del agente patógeno (caries), o del tratamiento (pulpotomía), existe una activación en la respuesta inmune e inflamación y por lo tanto la producción de TNF α , sin embargo, luego de la eliminación del agente causal de la inflamación, es necesario la activación de respuesta anti-inflamatoria y aquí es importante la IL-10 que se expresa de manera importante a las 72 horas favoreciendo la remodelación, por lo tanto, sugerimos que este medicamento compuesto por una mezcla o formulación de cinco extractos puede regular la respuesta inmune y no causa efecto letal o dañino a las células del hospedero e incluso promueve proliferación celular, lo que indica su potencial uso en terapia pulpar. Por lo tanto, los resultados en este estudio de concentración de citoquinas en fibroblastos gingivales humanos analizados mediante pruebas ELISA al aplicar los extractos estudiados en diferentes tiempos a 500 ppm mostraron la presencia de las tres interleucinas evaluadas. En primer lugar, TNF-alfa la cual se produce cuando existe un daño tisular o una infección (por ejemplo en la pulpa dental y los fibroblastos) ya que el TNF-alfa desarrolla una acción pro-inflamatoria tanto por sí mismo como a través de la regulación de otros mediadores inflamatorios a nivel celular favorece el reclutamiento de linfocitos y neutrófilos y a nivel tisular produce la remodelación y recuperación de los tejidos. Encontramos de manera favorable la concentración más elevada de TNF alfa en *M. tenuiflora* a las 24 horas y *S. aromaticum* a las 48 horas que nos habla de una respuesta favorable durante la inflamación aguda. En cuanto a la IL-1 β que es elaborada por los leucocitos y es importante durante procesos inflamatorios e infecciosos se observaron las concentraciones más elevadas para *E. arvense* y *L. graveolens*, ambos a las 48 horas y *A. vera* a las 72 horas siendo esto importante durante el proceso de la inflamación aguda en el tratamiento pulpar. Finalmente, la concentración de IL-10 la cual es una citocina antiinflamatoria la podemos observar en su pico de concentración a las 72 horas en presencia de los extractos *E. arvense* y *L. graveolens* lo cual es favorable para disminuir el proceso e importante como mediador de la respuesta inflamatoria y la reparación de los tejidos en el caso del tratamiento pulpar. Guillemón en

2018 reportó que el timol (aceite esencial obtenido del orégano) y la curcumina inhiben la expresión de TNF alfa. En este estudio podemos destacar TNF alfa presenta una concentración estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en presencia de *M. tenuiflora* a las 24 horas y en presencia de *S. aromaticum* a las 48 horas. En cuanto a la expresión y concentración de IL-1 β presenta una concentración estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en presencia de *E. arvense* a las 72 horas y en presencia de *L. graveolens* a las 48 horas y la expresión de IL 10 presenta una concentración estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en presencia de *E. arvense* y *L. graveolens* a las 72 horas.

El ensayo de modelo animal, es un referente del comportamiento de la formulación en la aplicación clínica. Se decidió probar la combinación de los cinco extractos a 500ppm formulando una sustancia terapéutica o formulación para el tratamiento pulpar y pretender el mejor efecto antimicrobiano posible. Durante el ensayo de modelo animal, es importante mencionar que la sustancia compuesta por los cinco extractos fue de fácil manejo clínico, mejor que algunos medicamentos disponibles actualmente en el mercado, los cuales son de difícil manipulación clínica. Durante el procedimiento clínico, el formocresol produjo de inmediato una reacción pulpar en el tejido con un aspecto clínico pardo oscuro que sugiere momificación pulpar, sin embargo, al aplicar la formulación de extractos, la pulpa mantenía el color rojo característico y el sangrado era inmediatamente controlable. En los resultados de la evaluación de la respuesta pulpar en los dientes tratados en el modelo animal murino, observamos que el formocresol causó la necrosis en el 100% de los dientes tratados. En los resultados de la formulación de los extractos se observó edema y congestión vascular a las 72 horas en el 34% de las muestras, para el día 15 se observó pulpa sana y reparación celular en el 100% de las muestras. Ranly (2000) informó que el tratamiento con formocresol originaba como respuesta pulpar una inflamación crónica, susceptibilidad a la formación de abscesos y la reabsorción interna hasta llegar a una necrosis. Fuks *et al.* (2008) evidenciaron que un 29% de los dientes presentaron inflamación severa 4 semanas después de realizar pulpotomías con formocresol; los resultados del estudio a los 30 días fueron del 42.9%. Es muy importante que mediante los resultados de este ensayo *in vivo* podemos validar las pruebas *in vitro* y proponer que la mezcla de los cinco extractos en la formulación producen sinergia de las propiedades químicas, antimicrobianas y antiinflamatorias, que permiten el

tratamiento clínico pulpar sin alterar la coagulación y tiempos de sangrado normales, que no presenta efectos citotóxicos en fibroblastos gingivales humanos que son las células de la pulpa dental y que favorece la expresión de citocinas que ayudan en el proceso inflamatorio y de reparación celular de la pulpa de los dientes tratados con pulpotomía.

9. CONCLUSIONES

Después de observar los resultados podemos concluir en las diferentes pruebas lo siguiente: con respecto a las pruebas fitoquímicas sobre los extractos de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *S. aromaticum*, *L. graveolens* y *A. vera* se encontraron compuestos químicos importantes entre los que destacan taninos, flavonoides, sesquiterpenlactonas, esteroides y triterpenos con propiedades antimicrobianas y antiinflamatorias que favorecen la respuesta terapéutica pulpar. La formulación compuesta por los cinco extractos muestra el mejor efecto antimicrobiano en los resultados sobre cepas de *S. mutans* y *S. sobrinus* y no existe diferencia estadística significativa puesto que demuestran un efecto antimicrobiano muy similar a clorhexidina en las concentraciones de 250, 500 y 1000 ppm. En el ensayo de coagulación no existe una diferencia significativa entre las concentraciones de los diferentes extractos en las pruebas TP y TTPa al compararlos con el testigo paciente. En cuanto a la citotoxicidad, los extractos a 250 ppm no presentan toxicidad, a 500 ppm todos se encuentran por arriba del 50% de viabilidad celular. Todos los extractos presentan expresión antiinflamatoria y podemos destacar que se expresa TNF alfa en presencia de *M. tenuiflora* a las 24 horas y *S. aromaticum* a las 48 horas, la expresión de IL-1 β en presencia de *L. graveolens* a las 48 horas y *E. arvense* y *A. vera* a las 72 horas y la expresión de IL-10 se observa en presencia de *E. arvense* y *L. graveolens* a las 72 horas lo que representa efecto positivo en el proceso antiinflamatorio y de reparación tisular. En los tratamientos de las pulpas de los dientes en el modelo animal murino el uso del formocresol desarrolló necrosis en el 100% de los dientes tratados, sin embargo el 100% de los dientes tratados con la formulación de extractos experimentó inflamación pulpar y posteriormente reparación tisular y vitalidad. Podemos concluir que la combinación de los cinco extractos de *M. tenuiflora*, *E. arvense*, *S. aromaticum*, *L. graveolens* y *A. vera* a 500ppm produce sinergia de la respuesta antimicrobiana, permite la coagulación y tiempos de sangrado normales, los cuales fueron evaluados in vitro y clínicamente en los tratamientos del modelo animal, que no presenta efectos citotóxicos en fibroblastos gingivales humanos y que favorece la expresión de citocinas que ayudan en el proceso inflamatorio y de reparación celular de la pulpa de los dientes tratados con pulpotomía. Por lo tanto sugerimos que este medicamento puede ser una alternativa en terapia pulpar.

10. PERSPECTIVAS

Es muy importante que la investigación proponga materiales y medicamentos que sean efectivos en los tratamientos para los pacientes y que no representen riesgo para la salud. Se requieren investigaciones clínicas para evaluar la formulación propuesta en humanos. Se propone evaluar la formulación en gel para observar sus propiedades. El trabajo clínico requiere compromiso y la responsabilidad de ofrecer a los pacientes las mejores alternativas de tratamientos, materiales, conocimientos y habilidades.

11. BIBLIOGRAFÍA

Abuhamdah, S., Howes, M., Lees, G., Ballard C. y Holmes C. (2007). The essential oils from *Melissa officinalis* L. y *Lavula angustifolia* Mill. as potential treatment for agitation in people with severe dementia. *Int. J. Essent. Oil Ther.* 1, 143–152.

Aguilar, E.G., Aguilar K.V., Garay, B., Mamani, V., Quispe, M.M. (2018). Actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans* de aceites esenciales de cinco plantas alto andinas. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2018;35(1): 161-3.doi: 10.17843/rpmesp.351.3610.

Albuquerque, M.T.P., Valera, M.C., Nakashima, M., Nör, J.E., Bottino, M.C. (2014). Tissue-engineering-based Strategies for Regenerative Endodontics. *J Dent Res.*93(12):1222–31.

American Academy of Pediatric Dentistry. Reference Manual (2004). Guideline on pulp therapy for primary and young permanent teeth. *Pediatr Dent.* 26: 115-9.

American Academy of Pediatric Dentistry. Caries-risk assessment and management for infants, children, and adolescents. *The Reference Manual of Pediatric Dentistry.* Chicago, Ill.: American Academy of Pediatric Dentistry; 2021:252-7.

Andersen, M.L., Winter, L.M.F. (2019). Animal models in biological and biomedical research. experimental and ethical concerns. *An Acad Bras Cienc.* 91.

Arcila, C., Loarca, G., Lecona, S., González, E. (2004). El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes, en *ALAN.* 54 (I): roo-ii 1.

Bailey, M. (s.f). Ethics and animal use in research. (en línea). Canadá. <https://ccac.ca/en/training/modules/core-stream/ethics-in-animal-experimentation.html>

Barbería Leache, E. (1995). Terapéutica pulpar. Odontopediatría. 2ªed. Barcelona: Masson, pag 253-66.

Barbería Leache, E. (2001). Odontopediatría. Odontopediatría, 2ªed. Barcelona: Masson.

Battergay, E., Raines, E., Colbert, T., Ross, R. (1995). TNF- α stimulation of fibroblast proliferation. Dependence on platelet-derived growth factor (PDGF) secretion and alteration of PDGF receptor expression. *J Immunol.* 154:6040-7

Bezbradica, J., Medzhitov, R. (2009). Integration of cytokine and heterologous signaling pathways. *Nat Immunol.*10: 333-339.

Bianco, P., Robey, P.G., Simmons, P.J. (2008). Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. *Cell Stem Cell.* 10;2(4):313-9.

Blake, J. (2001). Moral and ethical considerations for the use of animals. (en línea).

Boj, J.R., Catalá, M., García Ballesta, C., Mendoza, A. (2007). Odontopediatría. 1ª Ed. España: Masson.

Bordoni, N., Escobar, A., Castillo, M.R. (2010). Odontología Pediátrica. La Salud Bucal Del Niño Y El Adolescente En El Mundo Actual. Médica Panamericana.

Boudreau, M., Beland, F. (2006). An evaluation of the biological and toxicological properties of *Aloe barbadensis* (Miller) *Aloe vera*. *Journal of Environmental Science and Health, Part C* 24, 103-154.

Boyce, J.M., Pittet, D. (2002). Guideline for hand hygiene in health care settings. Recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. *MMWR Recomm Rep.*51:1-45.

Bulla, M., Castrillon, W., Guzmán, A. (2012). Fitoquímica de cinco especies del género *Baccharis* endémicas del altiplano cundiboyacense. Bogotá: Editorial Universidad Distrital.

Cadena, P., Cruz, F.D., Ballinas, E. (2018). Tepezcohuite (*Mimosa tenuiflora* (L) Willd), the skin tree. *Agro Productividad*, 7(6). Recuperado a partir de <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/560>

Caicedo, J., Mayorga, F., Montaña, V., Salazar, M., Armas, A. (2018). Efecto antimicrobiano de extractos acuosos de la cáscara, pulpa y semilla de uva (*Vitis vinifera*) sobre *Streptococcus mutans*, estudio in vitro. *KIRU*. abr-jun; 15(2): 77- 80.

Canete, R. (2016). Animales utilizados en experimentación, necesidad de su protección. *Rev. Med. Electrón.* vol.38, n.4, pp.612-616.

Canalda, C.B. (2001). Endodoncia: técnicas clínicas y bases científicas. 2ªed. Barcelona: Masson.

Cameron, A., Widmer, R. (1998). Manual de Odontología pediátrica. 1ª Ed. España: Harcourt Brace.

Choi, S., Chung, M. (2003). A review on the relationship between *Aloe vera* components and their biologic effects. *Seminars in Integrative Medicine* 1, 53-62.

Cohen, S., Burns, R. (2004). Vías de la pulpa. Endodoncia pediátrica: tratamiento endodóntico en dentición temporal y permanente joven. Madrid, España.

Combrisson, H. (2017). Expérimentation animale, peut on s'en passer? [Animal experiment, can we replace?]. *Transfus Clin Biol.* Sep;24(3):93-95.

Cona, T. (2002). Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar. *Revista chilena de infectología.* 19,77-81.

Crossner, C.G., Claesson, R., Johansson, T. (1989). Presence of mutans streptococci and various types of lactobacilli in interdental spaces related to development of proximal carious lesions. *Scand J Dent Res.* Aug; 97(4): 307-15.

Csoka, K., Larsson, R., Tholander, B., Gerdin, E., De la Torre, M., Nygren, P. (1994). Cytotoxic drug sensitivity testing of tumor cells from patients with ovarian carcinoma using the fluorometric microculture cytotoxicity assay (FMCA). *Gynecol Oncol.* Aug;54(2):163-70. doi: 10.1006/gyno.1994.1187. PMID: 7520407.

Davis, R.H., Kabbani, J.M., Maro, N.P. (1987). *Aloe vera* and wound healing. *Journal of the American Podiatric Medical Association* 77, 165-169.

Dean, J.A., Avery, D.R., McDonald, R.E. (2014). *Odontología para el Niño y Adolescente de McDonald y Avery.*

Delabranche, X., Helms, J., Meziani, F. (2017). Immunohaemostasis: a new view on haemostasis during sepsis. *Ann Intensive Care.* 7: 117.

Dewhirst, F.E., Chen, T., Izard, J., Paster, B.J., Tanner, A.C., Yu, W.H., Lakshmanan, A., Wade, W.G. (2010). The human oral microbiome. *J Bacteriol.* Oct; 192(19): 5002-17.

Díaz, A.M., Pérez, L.F., Castro, A., Chein, S., Sánchez, J., Tenorio, J., Vilchez, E. (2007). Clotting effect of two coca leaf varieties on albino rat blood samples *Odontol. Sanmarquina;* 10(1): 7-9.

Di Mazzanti, M. (2015). Declaración de Helsinki, principios y valores bioéticos en juego en la investigación médica con seres humanos. *Rev Col Bioética.* 6:125-45.

Durán, C.B.E. (2008). Eficacia clínica del formocresol en pulpotomías de dientes primarios. *Revista ADM LXV* (3):117-120.

EFSA. (2012). Compendium of botanicals reported to contain naturally occurring substances of possible concern for human health when used in food y food supplements. Efsa J. 10(5):2663 (60 pp.). Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal. Elliott M,

García, D.A., Rueda, L.P. (2014). Medición de la citotoxicidad y producción de citocinas en fibroblastos gingivales humanos estimulados con Mercurius–Heel®S: Un estudio piloto. *Universitas Scientiarum* 19(3): 225-232 doi: 10.11144/Javeriana.SC19-3.mcpc

Guía de práctica clínica en salud oral. Infancia y adolescencia. Secretaria Distrital de Salud: Bogotá.

Erazo, M.J., Arroyo, F.A., Arroyo, D.A., Castro, M.R., Santacruz, S.G., Armas, A.C. (2017). Antimicrobial effect of cinnamaldehyde, thymol, eugenol and chitosan on *Streptococcus mutans* strains. *Revista Cubana de Estomatología*; 54 (4).

Escribano, M., Matesanz, B.A. (2005). Pasado, presente y futuro de la microbiología de la periodontitis. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*. 17(2):79-87.

Fayle, S.A. (1999). UK National Clinical Guidelines in Pediatric Dentistry. *International Journal of Paediatric Dentistry* (2) 311-314.

Fuks, A.B., Holan, G., Davis, J.M., Eidelman, E. (1997). Ferric sulfate versus dilute formocresol in pulpotomized primary molars: long-term follow up. *Pediatr. Dent.* 19:327-330.

Fuks, A.B. (2002). Current concepts in vital primary pulp therapy. *Eur. J. Paediatr. Dent.* 3:115-20.

Fuks, A.B., Papagiannoulis, L. (2006). Pulpotomy in primary teeth: review of the literature according to standardized criteria. *Eur. Arch. Paediatr. Dent.* 7:64-71.

Fuks, A.B. (2008). Vital pulp therapy with new materials for primary teeth: new directions and Treatment perspectives. *Pediatr. Dent.*, 30:211-9.

García, D.A., Rueda, L.P. (2014). Medición de la citotoxicidad y producción de citocinas en fibroblastos gingivales humanos estimulados con Mercurius–Heel®S: Un estudio piloto. *Universitas Scientiarum* 19(3): 225-232 doi: 10.11144/Javeriana.SC19-3.mcpc

Goldberg, A., Zurlo, J., Rudacille, D. (1996). The Three Rs and Biomedical Research. *Science*. 272: 1403.

Goldberg, M., Smith, A.J. (2004). Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med*. 15(1):13–27.

Gómez de Ferraris, M., Campos, A. (2009). Histology, embryology and oral tissue engineering. Ed. Médica Panamericana. 2a ed.

Guillamón, E. (2018). Effect of phytochemical compounds of the genus *Allium* on the immune system and the inflammatory response. *Ars Pharm*. 59(3): 185-196

Hamman, J.H., Viljoen, A.M. (2008). Use of *Aloe vera* for increasing the bioavailability of poorly absorbable drugs. SA patent application 2008/01542.

Holgerson, P.L., Vestman, N.R., Claesson, R., Ohman, C., Domellöf, M., Tanner, A.C. (2013). Oral microbial profile discriminates breast-fed from formula-fed infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*.56:127–36.

Huang, C., Narayanan, R., Warshawsky, N., Ravindran, S. (2018). Dual ECM Biomimetic Scaffolds for Dental Pulp Regenerative Applications. *Front Physiol*. 25;9:495.

Hung, W.C., Tsai, J.C., Hsueh, P.R., Chia, J.S., Teng, L.J. (2005). Species identification of mutans streptococci by gro ESL gene sequence. *Journal of medical microbiology*. Sep;54(Pt 9):857-62.

Huerta, C. (1997). Orégano mexicano: oro vegetal, en *Conabio. Biodiversitas*.15:8-13.

Instituto Nacional de Salud. Manual de Procedimientos de Laboratorio en Técnicas Básicas de Hematología. (2005). In Cabezas C, editor. Serie de Normas Técnicas. Lima.

Isaza, J. (2007). Taninos o polifenoles vegetales. *Scientia et Technica* Año XIII, No 33. UTP. ISSN 0122-1701

Ivanovski, S., Li, H., Haase, H.R., Bartold, P.M. (2001). Expression of bone associated macromolecules by gingival and periodontal ligament fibroblasts. *J Periodont Res*. 36: 131-41.

Jia, Y., Zhao, G., Jia, J. (2008). Preliminary evaluation: The effects of *Aloe ferox* Miller and *Aloe arborescens* Miller on wound healing. *Journal of Ethnopharmacology* 120, 181-189.

Jordon, M. (1934). Tratamiento odontológico de la infancia. Barcelona: Ed. Labor.

Kilian, M., Chapple, I.L., Hannig, M., Marsh, P.D., Meuric, V., Pedersen, A.M. (2016). The oral microbiome—An update for oral healthcare professionals. *Br Dent J*. 221:657–66.

Kose, R., Sogut, O., Demir, T., Koruk, I. (2012). Hemostatic efficacy of folkloric medicinal plant extract in a rat skin bleeding model. *Dermatol Surg*. May;38(5):760-6.

Kramnik, I., Beamer, G. (2016). Mouse models of human TB pathology: roles in the analysis of necrosis and the development of host-directed therapies. *Semin Immunopathol*. Mar;38(2):221-37. doi: 10.1007/s00281-015-0538-9. Epub 2015 Nov 5. PMID: 26542392; PMCID: PMC4779126.

Kubo, H., Hayashi, T., Ago, K., Ago, M., Kanekura, T., Ogata, M. (2014). Temporal expression of wound healing-related genes in skin burn injury. *Leg Med (Tokyo)* 16:8-13

Kuete, V. (2017). Medicinal spices and vegetables from Africa. Estados Unidos: Elsevier.

Lannitti, T., Morales Medina, J.C., Bellavite, P., Rottigni, V., Palmieri, B. (2016). Effectiveness y safety of Arnica montana in post-surgical setting, pain y inflammation. *Am J Ther.* 23(1): e184–97.

Lawrence, B.M. (1984).The botanical and chemical aspects of oregano", en *Perfum Flavorist.* 9(5)41-44, 49-51.

Leeson, T., Leeson, R., Paparo, A. (1990). Texto atlas de Histología. Trad. Carlos Hernández Zamora. México: McGraw-Hill Interamericana. Pp. 1-19,127-158.

Leung, A.Y., Foster, S. (1996). Encyclopedia of common natural ingredients used in foods, drugs, and cosmetics. 2a ed. New York: John Wiley & Sons.

Lewis, R. (1998). Formaldehyde in dentistry: a review for the millennium. *J Clin Pediatr Dent,* 22(2):167-77.

Lewis, D.I. (2019). Animal experimentation: implementation and application of the 3Rs. *Emerg Top Life Sci.* Nov 27;3(6):675-679.

Liébana, J. (2002). Microbiología oral. 2ª ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana.

Lif Holgerson, P., Harnevik, L., Hernell, O., Tanner, A.C., Johansson, I. (2011). Mode of birth delivery affects oral microbiota in infants. *J Dent Res.* 90:1183–8.

Lindhagen, E., Nygren, P., Larsson, R. (2008). The fluorometric microculture cytotoxicity assay. *Nat Protoc.* 3(8):1364-9. doi: 10.1038/nprot.2008.114. PMID: 18714304.

López, N., Miguel, M., Aleixandre, A. (2012). Beneficial health properties of iridoids terpenes. *Nutr. clín. diet. Hosp.* 32(3):81-91

López, N. Coagulation tests. (2016). *Acta Pediatr Mex.* jul;37(4):241-245.

López, S.M., Sánchez, R.I., Nakagoshi, A.A. (2014). Embriología, panorámica histológica, imágenes y descripciones. Editorial Manual Moderno.

Mamani, N.F. (2016). Efecto invitro de la pasta CTZ pura y modificada del formocresol sobre el fusobacterium nucleatum, el lactobacillus acidophyllus y la porphyromona gingivalis prevalentes en piezasdeciduas necróticas con absceso. En los laboratorios de microbiología de la UCSM, Arequipa.

Manual of histologic and special staining technique. (1960). 2 ed. USA: McGraw-Hill Book Company. Pp 1-32.

Martínez, S., González, J., Culebras J.M., Tuñón, M.J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* 17 (6) 271-278

Martínez, M.C., Rodríguez, A. (2009). Study of Mutans streptococci strains in mother and child pairs. *Rev Fac Odontol Univ Antioq.* 21(2): 177-185.

Maroto, M.B. (2004). Estudio clínico del agregado trióxido mineral en pulpotomías de molares temporales: estudio piloto a quince meses. *RCOE*, 9(1):23-30.

McDonald, R., Avery, D.R. (2004). *Dentistry for the child and the adolescent.* 8th ed. St. Louis, Mo: Mosby Inc.

McKellar, G.E., McCarey, D.W., Sattar, N., McInnes, I.B. (2009). Role for TNF in atherosclerosis? Lessons from autoimmune disease. *Nat Rev Cardiol.* 6:410-7.

Méndez Blanco, V.M. (1995). Pulpotomías en la dentición decidua: buscando alternativas. *Odontología Pediátrica*, 4(3):145-9.

Milicich, G. (2008). Caries : Una perspectiva de la enfermedad oral que nos esforzamos por manejar. *J Minim Interv Dent.*108(1):25–35.

Molnar, M., Mendešević, N., Šubarić, D., Banjari, I., Jokić, S. (2017). Comparison of various techniques for the extraction of umbelliferone and herniarin in *Matricaria chamomilla* processing fractions. *Chem Cent J.* 11(1):78.

Moroguchi, A., Ishimura, K., Okano, K., Wakabayashi, H., Maeba, T., Maeta, H. (2004). Interleukin-10 suppresses proliferation and remodeling of extracellular matrix of cultured human skin fibroblasts. *EurSurg Res* 36:39-44

Mostacedo, B., Fredericksen, T.S. (2000). *Manual de métodos básicos de muestreo y análisis en ecología vegetal*. Bolfor, Bolivia.

Moura, J., Sarmiento, F.Q., de Oliveira, F., Pereira, J., Nogueira, V., de Oliveira, E. (2012). Actividad antifúngica del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* sobre cepas de *Candida tropicalis* de aislados clínicos. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Especies Medicinales y Aromática*, 11(3): 208-217.

Mouton, C. (1995). Bacteriología bucodental [versión española de la obra original en lengua francesa]. Barcelona: Masson.

Muñoz, M. (2006). Extracción y caracterización de polisacáridos con actividad anticoagulante a partir de algas colectadas en Baja California Sur, México. Maestría en

Manejo de Recursos Marinos Thesis, Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, La Paz, B. C. S., México xiii, 64 h.

Nakano, K., Nomura, R., Nakagawa, I., Nakano, K., Nomura, R., Nakagawa, I. (2004). Demonstration of Streptococcus mutans with a Cell Wall Polysaccharide Specific to a New Serotype, k, in the Human Oral Cavity. J. Clin. Microbiol. 42(1):198–202.

Nayal, R., Abajy, M., Takla, Sandy. (2015). Investigating In Vitro the Hemostatic Effect of Some Medicinal Plants. Res. J of Aleppo univ. Medicine Sience Series.100(1):2-15.

Nash, D.L., Nee, M. (1984). Flora de Veracruz. Fascículo 4i: Verbenaceae. Xalapa: Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos.

Nassar, M., Gaara, A.H., El Ghorab, A.H., Farrag, A.H., Shen, H., Huq, E., Mabry, T.J. (2007). Chemical constituents of clove (*Syzygium aromaticum*, Fam. *Myrtaceae*) and their antioxidant activity. *Revista Latinoamericana de Química*, 35 (3): 47-57.

Negrón, M. (2009). Microbiología estomatológica. Ed. Médica Panamericana.

Nerio, L., Olivero, Verbel, J., Stashenko, E. (2010). Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technology*, 101, 372–378.

Nonsee, K., Supitchaya, C., Thawien, W. (2011). Antimicrobial activity and the properties of edible hydroxypropyl methylcellulose-based films incorporated with encapsulated clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb.) oil. *International Food Research Journal*, 18(4), 1531-1541.

Nunn, J.H. (1996). The development of formocresol as a medicament for primary molar pulpotomy procedures. *J Dent Child*, 63(1):51-3.

Núñez, C.E. (2008). Extracciones con Soxhlet, Buenos Aires, Argentina.

O'Brien, Ch. (2005). Physical and chemical characteristics of *Aloe* gels. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10210/245>. Accesado: 8 Septiembre de 2010.

Olhagaray, E., Serrato, R., Del Río, F., Casas, A. (2005). Cuantificación de orégano (*Lippia berlandieri*Schawer) en diez localidades del municipio de Nazas, Durango, México. 2.a Reunión Nacional sobre Orégano. Centro de Investigación para los Recursos Naturales, Salaces, Chihuahua, México, 25-26 de febrero de 2005.

Omidbeygi, M., Barzegar, M., Hamidi, Z., Naghdibadi, H. (2007). Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Control*, 18, 1518–1523.

OPS (Organización Panamericana de la Salud). (1974). Manual para técnicos en animales de laboratorio. Buenos Aires, Argentina: Oficina Sanitaria Panamericana. pp.101-110,166-175,215-235.

Ortega, M. Tofiño, A.P., Merini, L.J., Martínez, M.C. (2018). Actividad antimicrobiana de *Cymbopogon citratus* (Poaceae) sobre biofilm de *Streptococcus mutans* y sus efectos citotóxicos. *Revista de Biología Tropical* , 66 (4), 1519-1529.

Organización Mundial de la Salud. (25 de marzo 2020). Un reporte sobre salud bucodental. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/oral-health>.

Organización Mundial de la Salud. (2002). Estrategia de la OMS Sobre Medicina Tradicional 2002-2005. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; (Documento de referencia WHO/EDM/TRM 2002.1).

Orwa, C., Mutua, A., Kindt, R., Jamnadass, R., Anthony, S. (2009). *World Agroforestry Center* Consultada el 21 de Agosto de 2013, <http://www.worldagroforestry.org/treedb/AFTPDFS/Syzygium aromaticum.pdf>

Pascual, M.E., Slowing, K., Carretero, E., Sánchez Mata, D., Villar, A. (2001). Lippia: traditional uses, chemistry, and pharmacology: A review. *J. Ethnopharmacol.* 76, 201-214.

Peng, L., Ye, L., Tan, H., Zhou, X. (2006). Evaluation of the formocresol versus mineral trioxide aggregate primary molar pulpotomy: a meta-analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 102(6): e40-e44.

Peng, L., Ye, L., Guo, X., Tan, H., Zhou, X., Wang, C., Li, R. (2007). Evaluation of formocresol versus ferric sulphate primary molar pulpotomy: a systematic review and meta-analysis. *Int Endod J.* 40: 751–757.

Preethi, K., Kuttan, R. (2009). Wound healing activity of flower extract of *Calendula officinalis*. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 20: 73–9.

Pritam, A., Kale, P.G. (2007). Alteration in the antioxidant potential of *Aloe vera* due to fungal infection. *Plant Pathology Journal* 6, 169-173.

Pyevich, D., Bogenschutz, M.P. (2001). Herbal diuretics and lithium toxicity. *Am J Psychiatry.* 158:1329.

Quezada, F., Sánchez, G., Lara, M., Medina, T., Pérez, L.M. (2011). Parámetros ambientales y abundancia del orégano mexicano (*Lippia graveolens*) en el estado de Tamaulipas. *CienciaUAT*, 6(1), 24-31. Recuperado a partir de <https://revistaciencia.uat.edu.mx/index.php/CienciaUAT/article/view/75>

Ramachandra, C., Srinivasa, P. (2008). Processing of *Aloe vera* leaf gel: A review. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 3, 502- 510.

Ranly, D.M., García Godoy, F. (2000). Current and potential pulp therapies for primary and Young permanent teeth. *J Dent.* 28: 153-161.

Repetto, M., Repetto, G. (2009). Desarrollo y evolución histórica de la Toxicología. En: Repetto Jiménez M, Repetto Kuhn G. Toxicología fundamental. 4a. ed. Madrid: Ediciones Díaz Santos; p. 1-19.

Reynolds, T., Dweck, A.C. (1999). Aloe vera leaf gel: a review update. *Journal Ethnopharmacology* 68, 3-37.

Reynolds, T. (2004). *Aloes: The Genus Aloe. Medicinal and aromatic plants-industrial profiles* Editorial CPR Press LLC, Boca Raton, Florida.

Roberts, A. (1996). Treatment of vital and non-vital primary molar teeth by one-stage formocresol pulpotomy: clinical success and effect upon age of exfoliation. *Paediatr Dent*, 6:111-5.

Rodríguez, A., González, O.A. (2000). Fisiopatología de la caries dental. *Univ Odontol*. May; 20(supl. 1): 21-7.

Rodríguez, E. (2007). Ética de la investigación en modelos animales de enfermedades humanas. *Acta bioeth*. 13(1): 25-40.

Rojas, M., Venegas, F., Servely, J., Guillomot, M. (2004). Clonación, producción of chimeras and pluripotencial cells. *Int. J. Morphol.*, 22(4):343-350.

Romero, W., Batista, Z., De Lucca, M., Ruano, A., García Barceló, M., Rivera, M., García, J., Sánchez, S. (2016). El 1, 2, 3 de la experimentación con animales de laboratorio. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 33(2):288-99. doi: 10.17843/rpmesp.2016.332.2169.

Ruiz, E., Suarez, M. (2015). Lactonas sesquiterpénicas. Diversidad estructural y sus actividades biológicas *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, vol. 46, núm. 1, enero-abril, pp. 9-24

Sánchez, G., Quezada, F., Lara, M., Medina, T., Pérez, L. (2011). *CienciaUAT*. 6(1): 24-31.

Saadia, B., Joachim, G., Kefei, H., Saideh, B., Bror, M., Nygren, P. (2013). El BBE de quillaja saponina nanoparticulado es selectivamente activo frente al carcinoma de células renales. *Investigación contra el cáncer*. 33(1)143-151.

Sancilio, S., Gallorini, M., Di Nisio, C., Marsich, E., Di Pietro, R., Schweikl, H. (2018). Alginate/Hydroxyapatite Based Nanocomposite Scaffolds for Bone Tissue Engineering Improve Dental Pulp Biomineralization and Differentiation. *Stem Cells Int*. 2;9643721.

Schovelin, A., Muñoz, M. (2018). Antibacterial Effect of Oregano Infusion (*Origanum vulgare*) on in Vitro Growth of *Streptococcus mutans*. *Int. J. Odontostomat.*, 12(4):337-342.

Secretaría de Salud. (2015). Sistema de Vigilancia Epidemiología de Patologías Bucales. México.

Shafeie, N., Naini, A., Jahromi, H. (2015). Comparison of different concentrations of *Calendula officinalis* gel on cutaneous wound healing. *Biomed Pharmacol J*. 8: 979–92.

Sharapin, N. (2002). Materias primas vegetales para la industria de productos fitofarmacéuticos. *Revista de Fitoterapia* 1 (3): 23-28.

Singh, J., Baghotia, A., Goel, S.P. (2012). *Eugenia caryophylla*- ta Thunberg (Family *Myrtaceae*): A Review. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 3(4), 1469-1475.

Srivastava, A.K., Srivastava, S.K., Syamsundar, K.V. (2005). Composición de aceite esencial de yemas y hojas de *Syzygium aromaticum* de India y Madagascar. *Sabor Fragr. J.*, 20: 51-53.

Sohn, M., Song, J., Kim, K., Kim, E., Kim, K., Lee, J. (2007). Association of interleukin-10 gene promoter polymorphism in children with atopic dermatitis. *J Pediatr*. 150:106-8.

Subramanian, R., Subbramaniyan, P., Ameen, J.N., Raj, V. (2016). Double bypasses soxhlet apparatus for extraction of piperine from *Piper nigrum*. *Arab. J. Chem.* 9: S537-S540.

Suckow, M.A., Turner, P.V. (2019). Pain as a Clinical Factor and Experimental Variable in Research Rodents. *Comp Med.* Dec 1;69(6):441-442.

Surjushe, A., Vasani, R., Saple, D.G. (2008). *Aloe vera*: a short review. *Indian Journal Dermatology* 53, 163-166.

Sweet, C. (1937). Treatment for deciduous teeth with exposed pulps. *Mich St Dent J*, 19:13.

Taheri, J.B., Azimi, S., Rafieian, N., Zanjani, H.A. (2011). Herbs in dentistry. *Int Dent J.* 61(6):287-96.

Tsuda, M.C., Mahdi, S., Namchuk, A., Wu, T.J., Lucki, I. (2020). Vendor differences in anxiety-like behaviors in female and male Sprague Dawley rats. *Physiol Behav.* Dec 1;227:113131.

Turner, P.V., Barbee, R.W. (2019). Responsible Science and Research Animal Use. *ILAR J.* Dec 31;60(1):1-4.

Us, U., Millán, M.C., Arana, V.E., Segura, M.R. (2020). Actividad antioxidante y antiinflamatoria in vitro de extractos de chaya (*Cnidoscolus aconitifolius* (Mill.) I.M. Johnst). *Nutr Hosp.* 37(1):46-55

Usha C. Caries risk assessment: a critical look. *J Oper Dent Endod* 2018;3(1):22-2

Vega, A., Nevenka, C., Díaz, L., Lemus R. (2005). *Aloe vera* as a component of functional foods. *Revista chilena de nutrición*, 3(32):30-42.

Villar, A., Iglesias, I. (2006). Equiseto, farmacología y farmacoterapia. *Farmacia Profesional*, 20(2):74-77.

Waterhouse, P.J., Nunn, J.H., Whitworth, J.M., Soames, J.V. (2000). Primary molar pulp therapy histological evaluation of failure. *Paediatr Dent*, 10(4):313-21.

Yamada, K., Naemura, A., Yamashita, T., Arai, R. (2005). Testing various herbs for antithrombotic effect. *Nutrition*. 21(5):580-7.

Žemaitienė, M., Grigaluskienė, R., Vasiliauskienė, I., Saldūnaitė, K., Razmienė, J., Slabšinskienė, E. (2016). Prevalence and severity of dental caries among 18-year-old Lithuanian adolescents. *Medicina*. 52:54–60.

Zhang, H., Park, Y., Wu, J., Chen, Xp., Lee, S., Yang, J., Dellsperger, K.C., Zhang, C. (2009). Role of TNF-alpha in vascular dysfunction. *Clin Sci (Lond)*. Feb;116(3):219-30. doi: 10.1042/CS20080196. PMID: 19118493; PMCID: PMC2620341.

Zhang, J.M., An, J. (2007). Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin*. 45:27-37.

Zimring, J.C. (2009). Prothrombin time and activated partial thromboplastin time. *En Transfusion Medicine and hemostasis, Clinical and laboratory aspects*. Christopher D Hillyer, Beth H Shaz, James C Zimring, Thomas C AbshireEditors, Elsevier, New York USA. pp. 607-610.

ANEXOS

Anexo 1. Carta de aceptación del Comité de Bioética

SPSI – 010613
Folio: 00152

COMITÉ DE BIOÉTICA

Comisión de Revisión Bioética

Para: Dra. en C. Myriam Angélica de la Garza Ramos
Fecha de recepción: Noviembre del 2017
Título: Evaluación de extractos vegetales como potencial alternativa en el tratamiento terapéutico
pulpar aplicado a modelo animal
Para: Sonia Martha López Villareal

El presente es referencia para protocolo de investigación mencionado en la parte superior. En la deliberación de este comité, los procedimientos en dicha aplicación conformada por las reglas y el reglamento del DHHS y de la FDA en relación con los temas de uso humano. La aprobación se otorga durante un año.

Como condición para aprobar la investigación, el responsable de la investigación debe de haber leído, establecido y firmado el escrito adjunto de nuestro Documento Federal de Seguridad.


Además el responsable de la investigación acuerda lo siguiente:

1. A dar información mediante un reporte de revisión periódica, necesaria para la revisión de este protocolo por parte del comité, en intervalos apropiados para evitar el riesgo y asegurar que el protocolo está siendo guiado con las recomendaciones y la supervisión del comité, pero dichos intervalos no deben tener más de un año desde su inicio.
2. Proveer al comité la forma del reporte periódico de revisión, así como el reporte final cuando concluya su proyecto.
3. El uso como documento de consentimiento informado para este estudio, el reporte final aprobado por el comité IRB impreso definiendo su periodo de aprobación.
4. Reportar cualquier evento adverso relacionado con el estudio y que pudiera afectar la salud mental y física del paciente.
5. Este estudio está sujeto a registro durante este periodo de tiempo.


Los registros relacionados con las acciones del comité referentes a este protocolo están en el archivo en la oficina de División de Estudios de Posgrado y de Investigación de esta Facultad.

Fecha de aprobación: Noviembre del 2017
Periodo aprobado: Noviembre del 2017 a Noviembre del 2018
Responsable de la Investigación

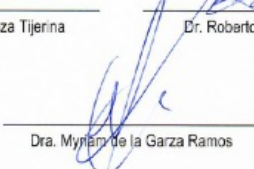
Comité Institucional Investigador



Dr. Jaime Adrián Mendoza Tijerina



Dr. Roberto Camillo González



Dra. Myriam de la Garza Ramos

La siguiente información describe las responsabilidades tomadas del Documento de archivo de Múltiple Seguridad, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Odontología, junto con la Ley Federal de Salud en Materia de Investigación para la Salud (SS, 1987) ANEXO I.

La aprobación del protocolo está sujeta a estas reglas:

- a) Los investigadores declaran y aceptan su responsabilidad para la protección de los derechos y el bienestar del humano así como garantizar su integridad.
- b) Los investigadores que intenten involucrar investigaciones con humanos no estarán exentos de la aplicación de nuestras leyes federales y universitarias.
- c) Los investigadores son responsables de otorgar una copia de la aprobación del IRB firmada, y el documento de consentimiento de cada periodo de tiempo a menos que el IRB elimine este requerimiento. Todos los documentos de consentimiento firmados sern guardados en la oficina administrativa de investigación.
- d) Los investigadores reportaran con rapidez los cambios propuestos en las actividades de investigación relacionados con humanos al IRB.
- e) Los investigadores son responsables para reportar el progreso de la investigación a la oficina administrativa de investigación, tan a menudo como se describe en las bases de riesgos del IRB, pero no menos de una vez al año.
- f) Los investigadores deberán reportar inmediatamente los daños y/o problemas que sean riesgo para los sujetos y para otros miembros de la comunidad.

- g) Ni el investigador, ni asociados interinstitucionales, no institucionales en acuerdos de investigación podrán buscar para su beneficio obtención de créditos, la utilización de la información de las intervenciones con el paciente que constituyan una violación a las garantías de su atención médica, sin la aprobación del IRB. Un médico deberá proveer seguridad ética/médica al paciente con la revisión y aprobación del IRB, exigido por la ley.
- h) Los investigadores deberán notificar al IRB, a la oficina de Investigación Administrativa y a las instituciones oficiales el intento para la admisión de material humano que vayan a ser utilizados en los protocolos de investigación.

Capítulo 1, capítulo 13. Prevalecerá el criterio de respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y bienestar, por lo cual se solicitará a los pacientes su aprobación voluntaria.

Artículo 14. Fracción V. Se contara con el consentimiento informado y por escrito del sujeto de investigación, en este caso se solicitará el consentimiento informado del paciente previo a la aplicación de los instrumentos.

Fracción VI. Todos los estudios serán realizados por profesionales de la salud con conocimiento y experiencia para cuidar la integridad del ser humano, bajo la responsabilidad de una institución de atención a la salud.

Fracción VII y VIII. Se contara con el dictamen favorable de la Comisión de Investigación y Bioética de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Nuevo León; la colecta de los datos se realizará solo cuando se cuente con dicha autorización.

Artículo 16. Se protegerá la privacidad del sujeto investigado, ya que no se solicitará identificación.

Artículo 17. Fracción I. Esta investigación (es) debe de considerarse como riesgo mínimo.

Artículo 18 y 21. Para considerar existente el consentimiento informado del sujeto de investigación recibirá una explicación clara y completa de lo siguiente:

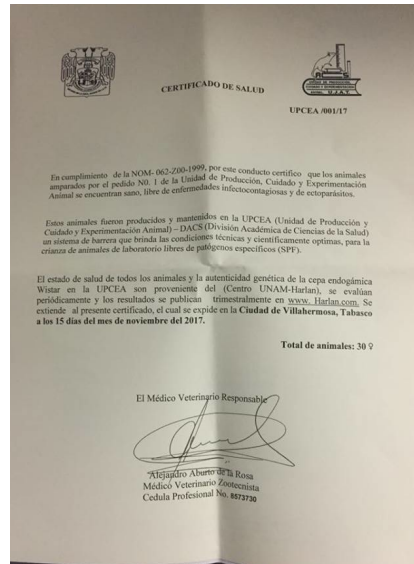
- 1) Justificación de los objetivos de investigación.

- 2) Los procedimientos que vayan a usarse y su propósito, incluyendo la identificación de los procedimientos que son experimentales.
- 3) Las molestias o riesgos esperados.
- 4) Los beneficios que pueda obtener.
- 5) Los procedimientos alternativos que pudieran ser verificados por el sujeto.
- 6) La garantía de recibir respuesta a cualquier pregunta y aclaración de los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con al investigación en el tratamiento del sujeto.
- 7) La libertad de retirar su consentimiento en cualquier momento y dejar de participar en el estudio, sin que por ello creen perjuicios para continuar su cuidado y tratamiento.
- 8) La seguridad de que no se identificara al sujeto y se mantendrá la confidencialidad de la información relacionada con su privacidad.

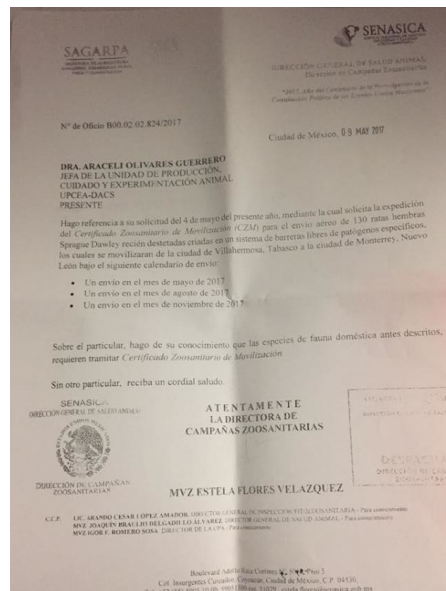
He leído y comprendido mis responsabilidades antes descritas.


Firma del Investigador Principal

Anexo 2. Certificado zoosanitario de los ratones emitido por el bioterio de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT).



Anexo 3. Certificado zoosanitario de los ratones emitido por SAGARPA (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural).



Anexo 4. Pruebas de laboratorio de los diferentes extractos para evaluar los valores de TP y TTPA realizadas por Laboratorio clínico Promedic.



Promedic Laboratorio
 Av. Sendero Divisorio #101, Local 15
 Matriz Escobedo, N.L.
 Tel: 01(81)83-07-45-51



Hoja: 1/1 Fecha: 03/02/2017 16:01:14

Paciente: DAVID ALEJANDRO 1 A	Id: 30217057
Registro: D01011987	Sexo: M
Medico: A QUIEN CORRESPONDA	Edad: 30 años
Origen: PUBLICO EN GENERAL	Fecha: 03/FEB./2017

Examen	Resultado	Unidades	Valores de Referencia
HEMATOLOGÍA			
TIEMPO DE PROTROMBINA	12.90	seg	TESTIGO - - 12.23"
TIEMPO DE PROTROMBINA	12.80	seg	TESTIGO - - 12.23"
TIEMPO DE PROTROMBINA	12.90	seg	TESTIGO - - 12.23"
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	38.40	seg	TESTIGO - - 31.3."
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	39.50	seg	TESTIGO - - 31.3."
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	39.60	seg	TESTIGO - - 31.3."

(*) valores fuera de rango

Firma de responsable
Q.B.P. Miguel A. García Cardona
 Ced. Prof. 4722422 SSA 3421



PROMEDIC
Laboratorio de Análisis Clínicos

Promedic Laboratorio

Av. Sendero Divisorio #101, Local 15

Matriz Escobedo, N.L.

Tel: 01(81)83-07-45-51



Hoja: 1/1

Fecha: 03/02/2017 16:03:20

Paciente: DAVID ALEJANDRO 1 B	Id: 30217058
Registro: D01011987-2	Sexo: M
Medico: A QUIEN CORRESPONDA	Edad: 30 años
Origen: PUBLICO EN GENERAL	Fecha: 03/FEB./2017

Examen	Resultado	Unidades	Valores de Referencia
HEMATOLOGÍA			
TIEMPO DE PROTROMBINA	12.90	seg	TESTIGO - - 12.23"
TIEMPO DE PROTROMBINA	12.80	seg	TESTIGO - - 12.23"
TIEMPO DE PROTROMBINA	12.60	seg	TESTIGO - - 12.23"
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	36.40	seg	TESTIGO - - 31.3."
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	36.40	seg	TESTIGO - - 31.3."
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	36.10	seg	TESTIGO - - 31.3."

(*) valores fuera de rango

Firma de responsable

Q.B.P. Miguel A. García Cardona

Ced. Prof. 4722422 SSA 3421



PROMEDIC
Laboratorio de Análisis Clínicos

Promedic Laboratorio

Av. Sendero Divisorio #101, Local 15

Matriz Escobedo, N.L.

Tel: 01(81)83-07-45-51



Hoja: 1/1

Fecha: 03/02/2017 15:47:53

Paciente: DAVID ALEJANDRO 2 A	Id: 30217061
Registro: D01011987-3	Sexo: M
Medico: A QUIEN CORRESPONDA	Edad: 30 años
Origen: PUBLICO EN GENERAL	Fecha: 03/FEB./2017

Examen	Resultado	Unidades	Valores de Referencia
HEMATOLOGÍA			
TIEMPO DE PROTROMBINA	13.20	seg	TESTIGO - - 12.23"
TIEMPO DE PROTROMBINA	13.30	seg	TESTIGO - - 12.23"
TIEMPO DE PROTROMBINA	13.20	seg	TESTIGO - - 12.23"
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	36.50	seg	TESTIGO - - 31.3."
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	36.30	seg	TESTIGO - - 31.3."
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	36.00	seg	TESTIGO - - 31.3."

(*) valores fuera de rango

Firma de responsable

Q.B.P. Miguel A. García Cardona

Ced. Prof. 4722422 SSA 3421



PROMEDIC
Laboratorio de Análisis Clínicos

Promedic Laboratorio

Av. Sendero Divisorio #101, Local 15

Matriz Escobedo, N.L.

Tel: 01(81)83-07-45-51



Hoja: 1/1

Fecha: 03/02/2017 15:49:45

Paciente: DAVID ALEJANDRO 2 B	Id: 30217063
Registro: D01011987-4	Sexo: M
Medico: A QUIEN CORRESPONDA	Edad: 30 años
Origen: PUBLICO EN GENERAL	Fecha: 03/FEB./2017

Examen	Resultado	Unidades	Valores de Referencia
HEMATOLOGÍA			
TIEMPO DE PROTROMBINA	13.00	seg	TESTIGO - - 12.23"
TIEMPO DE PROTROMBINA	12.80	seg	TESTIGO - - 12.23"
TIEMPO DE PROTROMBINA	14.30	seg	TESTIGO - - 12.23"
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	35.50	seg	TESTIGO - - 31.3."
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	35.60	seg	TESTIGO - - 31.3."
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	33.10	seg	TESTIGO - - 31.3."

(*) valores fuera de rango

Firma de responsable

Q.B.P. Miguel A. García Cardona

Ced. Prof. 4722422 SSA 3421



PROMEDIC
Laboratorio de Análisis Clínicos

Promedic Laboratorio

Av. Sendero Divisorio #101, Local 15

Matriz Escobedo, N.L.

Tel: 01(81)83-07-45-51



Hoja: 1/1

Fecha: 28/10/2016 13:36:11

Paciente: DAVID ALEJANDRO EXTRACTO 3 (500)	Id: 281016053
Registro: ES(5D01011987	Sexo: M
Medico: A QUIEN CORRESPONDA	Edad: 29 años
Origen: PUBLICO EN GENERAL	Fecha: 28/OCT./2016

Examen	Resultado	Unidades	Valores de Referencia
HEMATOLOGÍA			
TIEMPO DE PROTROMBINA	12.60	seg	TESTIGO - - 12.4"
TIEMPO DE PROTROMBINA	12.30	seg	TESTIGO - - 12.4"
TIEMPO DE PROTROMBINA	12.30	seg	TESTIGO - - 12.4"
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	33.90	seg	TESTIGO - - 32.6"
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	32.80	seg	TESTIGO - - 32.6"
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	32.10	seg	TESTIGO - - 32.6"

(*) valores fuera de rango

Firma de responsable

Q.B.P. Miguel A. García Cardona

Ced. Prof. 4722422 SSA 3421



PROMEDIC
Laboratorio de Análisis Clínicos

Promedic Laboratorio

Av. Sendero Divisorio #101, Local 15

Matriz Escobedo, N.L.

Tel: 01(81)83-07-45-51



Hoja: 1/1

Fecha: 28/10/2016 13:37:13

Paciente: DAVID ALEJANDRO EXTRACTO 3 (1000)	Id: 281016055
Registro: ES(1D01011987)	Sexo: M
Medico: A QUIEN CORRESPONDA	Edad: 29 años
Origen: PUBLICO EN GENERAL	Fecha: 28/OCT./2016

Examen	Resultado	Unidades	Valores de Referencia
HEMATOLOGÍA			
TIEMPO DE PROTROMBINA	13.80	seg	TESTIGO - - 12.4"
TIEMPO DE PROTROMBINA	13.20	seg	TESTIGO - - 12.4"
TIEMPO DE PROTROMBINA	13.10	seg	TESTIGO - - 12.4"
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	36.90	seg	TESTIGO - - 32.6"
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	33.80	seg	TESTIGO - - 32.6"
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	32.40	seg	TESTIGO - - 32.6"

(*) valores fuera de rango

Firma de responsable

Q.B.P. Miguel A. García Cardona

Ced. Prof. 4722422 SSA 3421



PROMEDIC
Laboratorio de Análisis Clínicos

Promedic Laboratorio

Av. Sendero Divisorio #101, Local 15

Matriz Escobedo, N.L.

Tel: 01(81)83-07-45-51



Hoja: 1/1

Fecha: 28/10/2016 13:38:32

Paciente: DAVID ALEJANDRO EXTRACTO 4 (500)	Id: 281016056
Registro: EX(5D01011987-3	Sexo: M
Medico: A QUIEN CORRESPONDA	Edad: 29 años
Origen: PUBLICO EN GENERAL	Fecha: 28/OCT./2016

Examen	Resultado	Unidades	Valores de Referencia
HEMATOLOGÍA			
TIEMPO DE PROTROMBINA	13.00	seg	TESTIGO - - 12.4"
TIEMPO DE PROTROMBINA	12.90	seg	TESTIGO - - 12.4"
TIEMPO DE PROTROMBINA	12.50	seg	TESTIGO - - 12.4"
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	32.90	seg	TESTIGO - - 32.6"
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	34.40	seg	TESTIGO - - 32.6"
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	32.90	seg	TESTIGO - - 32.6"

(*) valores fuera de rango

Firma de responsable

Q.B.P. Miguel A. García Cardona

Ced. Prof. 4722422 SSA 3421



PROMEDIC
Laboratorio de Análisis Clínicos

Promedic Laboratorio

Av. Sendero Divisorio #101, Local 15

Matriz Escobedo, N.L.

Tel: 01(81)83-07-45-51



Hoja: 1/1

Fecha: 28/10/2016 13:41:41

Paciente: DAVID ALERJANDRO EXTRACTO 4 (1000)	Id: 281016062
Registro: EX(1D01011987-4)	Sexo: M
Medico: A QUIEN CORRESPONDA	Edad: 29 años
Origen: PUBLICO EN GENERAL	Fecha: 28/OCT./2016

Examen	Resultado	Unidades	Valores de Referencia
HEMATOLOGÍA			
TIEMPO DE PROTROMBINA	13.20	seg	TESTIGO - - 12.4"
TIEMPO DE PROTROMBINA	12.90	seg	TESTIGO - - 12.4"
TIEMPO DE PROTROMBINA	13.30	seg	TESTIGO - - 12.4"
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	36.20	seg	TESTIGO - - 32.6"
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	32.90	seg	TESTIGO - - 32.6"
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	33.10	seg	TESTIGO - - 32.6"

(*) valores fuera de rango

Firma de responsable

Q.B.P. Miguel A. García Cardona

Ced. Prof. 4722422 SSA 3421



PROMEDIC
Laboratorio de Análisis Clínicos

Promedic Laboratorio

Av. Sendero Divisorio #101, Local 15

Matriz Escobedo, N.L.

Tel: 01(81)83-07-45-51



Hoja: 1/1

Fecha: 03/02/2017 15:57:37

Paciente: DAVID ALEJANDRO 4 A	Id: 30217065
Registro: D01011987-7	Sexo: M
Medico: A QUIEN CORRESPONDA	Edad: 30 años
Origen: PUBLICO EN GENERAL	Fecha: 03/FEB./2017

Examen	Resultado	Unidades	Valores de Referencia
HEMATOLOGÍA			
TIEMPO DE PROTROMBINA	12.60	seg	TESTIGO - - 12.23"
TIEMPO DE PROTROMBINA	12.70	seg	TESTIGO - - 12.23"
TIEMPO DE PROTROMBINA	12.50	seg	TESTIGO - - 12.23"
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	32.40	seg	TESTIGO - - 31.3."
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	32.10	seg	TESTIGO - - 31.3."
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	32.70	seg	TESTIGO - - 31.3."

(*) valores fuera de rango

Firma de responsable

Q.B.P. Miguel A. García Cardona

Ced. Prof. 4722422 SSA 3421



PROMEDIC
Laboratorio de Análisis Clínicos

Promedic Laboratorio

Av. Sendero Divisorio #101, Local 15

Matriz Escobedo, N.L.

Tel: 01(81)83-07-45-51



Hoja: 1/1

Fecha: 03/02/2017 15:59:16

Paciente: DAVID ALEJANDRO 4 B	Id: 30217066
Registro: D01011987-10	Sexo: M
Medico: A QUIEN CORRESPONDA	Edad: 30 años
Origen: PUBLICO EN GENERAL	Fecha: 03/FEB./2017

Examen	Resultado	Unidades	Valores de Referencia
HEMATOLOGÍA			
TIEMPO DE PROTROMBINA	12.70	seg	TESTIGO - - 12.23"
TIEMPO DE PROTROMBINA	12.50	seg	TESTIGO - - 12.23"
TIEMPO DE PROTROMBINA	12.40	seg	TESTIGO - - 12.23"
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	29.20	seg	TESTIGO - - 31.3."
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	30.30	seg	TESTIGO - - 31.3."
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	34.00	seg	TESTIGO - - 31.3."

(*) valores fuera de rango

Firma de responsable

Q.B.P. Miguel A. García Cardona

Ced. Prof. 4722422 SSA 3421



PROMEDIC
Laboratorio de Análisis Clínicos

Promedic Laboratorio

Av. Sendero Divisorio #101, Local 15

Matriz Escobedo, N.L.

Tel: 01(81)83-07-45-51



Hoja: 1/1

Fecha: 03/02/2017 15:26:36

Paciente: DAVID ALEJANDRO ETANOL	Id: 30217055
Registro: ETD01011987	Sexo: M
Medico: A QUIEN CORRESPONDA	Edad: 30 años
Origen: PUBLICO EN GENERAL	Fecha: 03/FEB./2017

Examen	Resultado	Unidades	Valores de Referencia
HEMATOLOGÍA			
TIEMPO DE PROTROMBINA	12.70	seg	TESTIGO - - 12.23"
TIEMPO DE PROTROMBINA	12.50	seg	TESTIGO - - 12.23"
TIEMPO DE PROTROMBINA	12.50	seg	TESTIGO - - 12.23"
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	33.80	seg	TESTIGO - - 31.3."
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	35.60	seg	TESTIGO - - 31.3."
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	31.80	seg	TESTIGO - - 31.3."

(*) valores fuera de rango

Firma de responsable

Q.B.P. Miguel A. García Cardona

Ced. Prof. 4722422 SSA 3421



PROMEDIC
Laboratorio de Análisis Clínicos

Promedic Laboratorio

Av. Sendero Divisorio #101, Local 15

Matriz Escobedo, N.L.

Tel: 01(81)83-07-45-51



Hoja: 1/1

Fecha: 03/02/2017 15:28:06

Paciente: DAVID ALEJANDRO MEDICAMENTO	Id: 30217056
Registro: MED01011987	Sexo: M
Medico: A QUIEN CORRESPONDA	Edad: 30 años
Origen: PUBLICO EN GENERAL	Fecha: 03/FEB./2017

Examen	Resultado	Unidades	Valores de Referencia
HEMATOLOGÍA			
TIEMPO DE PROTROMBINA	68.90	seg	TESTIGO - - 12.23"
TIEMPO DE PROTROMBINA	115.50	seg	TESTIGO - - 12.23"
TIEMPO DE PROTROMBINA	190.00	seg	TESTIGO - - 12.23"
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	133.90	seg	TESTIGO - - 31.3."
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	148.30	seg	TESTIGO - - 31.3."
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	171.70	seg	TESTIGO - - 31.3."

(*) valores fuera de rango

Firma de responsable

Q.B.P. Miguel A. García Cardona

Ced. Prof. 4722422 SSA 3421



PROMEDIC
Laboratorio de Análisis Clínicos

Promedic Laboratorio

Av. Sendero Divisorio #101, Local 15

Matriz Escobedo, N.L.

Tel: 01(81)83-07-45-51



Hoja: 1/1

Fecha: 28/10/2016 13:04:35

Paciente: DAVID ALEJANDRO HERNANDEZ MARIN	Id: 281016030
Registro: HEMAD01011987	Sexo: M
Medico: A QUIEN CORRESPONDA	Edad: 29 años
Origen: PUBLICO EN GENERAL	Fecha: 28/OCT./2016

Examen	Resultado	Unidades	Valores de Referencia
HEMATOLOGÍA			
TIEMPO DE PROTROMBINA	12.30	seg	TESTIGO - - 12.4"
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	33.20	seg	TESTIGO - - 32.6"
TIEMPO DE PROTROMBINA	12.40	seg	TESTIGO - - 12.4"
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	32.80	seg	TESTIGO - - 32.6"
TIEMPO DE PROTROMBINA	12.10	seg	TESTIGO - - 12.4"
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	31.90	seg	TESTIGO - - 32.6"
MUESTRAS TESTIGO			32.6"

(*) valores fuera de rango

Firma de responsable

Q.B.P. Miguel A. García Cardona

Ced. Prof. 4722422 SSA 3421



PROMEDIC
Laboratorio de Análisis Clínicos

Promedic Laboratorio

Av. Sendero Divisorio #101, Local 15

Matriz Escobedo, N.L.

Tel: 01(81)83-07-45-51



Hoja: 1/1

Fecha: 03/02/2017 15:28:06

Paciente: DAVID ALEJANDRO MEDICAMENTO	Id: 30217056
Registro: MED01011987	Sexo: M
Medico: A QUIEN CORRESPONDA	Edad: 30 años
Origen: PUBLICO EN GENERAL	Fecha: 03/FEB./2017

Examen	Resultado	Unidades	Valores de Referencia
HEMATOLOGÍA			
TIEMPO DE PROTROMBINA	68.90	seg	TESTIGO - - 12.23"
TIEMPO DE PROTROMBINA	115.50	seg	TESTIGO - - 12.23"
TIEMPO DE PROTROMBINA	190.00	seg	TESTIGO - - 12.23"
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	133.90	seg	TESTIGO - - 31.3."
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	148.30	seg	TESTIGO - - 31.3."
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	171.70	seg	TESTIGO - - 31.3."

12. RESUMEN BIOGRÁFICO

Sonia Martha López Villarreal

Candidato para el Grado de Doctor en Ciencias con Orientación
en Química de Productos Naturales.

Tesis: Evaluación y caracterización de extractos vegetales como potencial alternativa en el tratamiento terapéutico pulpar.

Campo de estudio: Ciencias de la salud.

Datos personales: Nacida en la ciudad de Monterrey el 24 de julio de 1969, hija de Jesús López López y Sonia Villarreal Martínez.

Educación: Cirujano Dentista egresada de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Nuevo León 1991, Posgrado Universidad Autónoma de Nuevo León, Maestría en Odontopediatría 1995, Universidad Tec Milenio Maestría en Educación 2013.

Experiencia Profesional: Profesora investigadora de tiempo completo en la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Nuevo León de 1992 a la fecha. En pregrado en los Departamentos de Embriología y de Odontología Infantil y en Posgrado en la Maestría en Ciencias en Odontopediatría de 1995 a la fecha, Maestría en Ortodoncia de 2009 a la fecha y Maestría en Odontología Avanzada de 2011 a la fecha.

PRODUCTOS DERIVADOS DE LA INVESTIGACION

Patente

- Otorgamiento de Patente presentada ante el IMPI Título de Modelo de Utilidad no. 4209. Dispositivo dispensador, instalador y colector de hojas de bisturí.

Premios obtenidos

- Primer lugar en investigación básica con el trabajo titulado: Evaluación antimicrobiana de productos naturales, alternativa contra microorganismos orales durante el IX Encuentro nacional de cuerpos académicos de odontología y VII Encuentro internacional de grupos de investigación. Universidad Autónoma de Tlaxcala. Marzo del 2017.
- Premio UANL a la invención. Reconocimiento a la Propiedad Industrial, edición 2020 por haber obtenido el Título de Modelo de Utilidad no. 4209. Dispositivo dispensador, instalador y colector de hojas de bisturí.
- Premio Nacional 2018 por el estado de Nuevo León otorgado por el Consejo Consultivo y la Junta Directiva del Colegio Nacional de Cirujanos Dentistas AC.

Publicaciones

- López, S.M., Chávez, A., Leos, C., Rodríguez, O.E., Castro, R., Pérez, R. (2022). Antibacterial and coagulating evaluation of extracts of five vegetables of dental interest. *Horizonte Sanitario*, 21(3), 168-176.
- López, S.M., Chávez, A., González, A., Castro, R., Rodríguez, O. Extractos vegetales. Obtención, caracterización y evaluación antimicrobiana contra microorganismos orales. *Rev Tamé* 2016; 5 (Suplemento 3): 31-35.
- López, S.M., Chávez, A., Viveros, E., Castro, R., Rodríguez, O. *Heliopsis longipes*. Obtención, caracterización y evaluación antimicrobiana como alternativa en odontología. *Rev Odontopediatría Actual* 2017; 3(26):9-19. ISBN 2007-509X.
- Cárdenas, G., Elizondo, J., Bazaldúa, A., Chávez, A., Pérez, R., Martínez, A., López, S., Rodríguez, J., Sánchez, R., Castillo, U., Rodríguez, O. (2021). Benefits of

Cardamom (*Elettaria cardamomum* (L.) Maton) and Turmeric (*Curcuma longa* L.) Extracts for Their Applications as Natural Anti-Inflammatory Adjuvants. *Plants*. 10,1908.

Capítulos de libro

- López Villarreal, S.M., Chávez Montes, A., Ramírez Mendoza, J., Castro Ríos, R., Viveros Valdés, E., Villarreal García, L.E., Rodríguez Luis, O.E. 2017. El auge del marketing en los productos naturales como alternativa en salud bucodental. Libro: Marketing en la promoción y profesionalización de la salud. Editorial Universidad Antonio Nariño. Colombia. pp. 253-259. ISBN: 978-958-8687-92-6.
- López Villarreal, S.M., Jiménez Sastré, A., Chávez Montes, A., Viveros Valdés, E., Nakagoshi Cepeda, A.A., Villarreal García, L.E., Rodríguez Luis, O.E., Sánchez Nájera, R.I. 2019. La importancia de la innovación, la invención y el marketing de dispositivos en salud. Libro: Mercadotecnia, innovación y tecnologías en salud. Editorial Universidad Antonio Nariño. Colombia. pp. 39-45. ISBN: 978-958-8687-94-0.
- López Villarreal, S.M., Rodríguez Luis, O.E., Villarreal García, L.E., Chávez Montes, A., Nakagoshi Cepeda, A.A., Solís Soto, J.M., Espinosa Rivera, M.C. 2020. Innovación, invención y mercadotecnia en salud. Libro: Mercadotecnia y empoderamiento social de la salud. Editorial Universidad Autónoma del Carmen. México. pp. 49-52. ISBN: 978-607-7826-54-5.

Ponencias en Congresos

- XV Convención Anual y Simposio Internacional de la Red Iberoamericana de Mercadotecnia en Salud (RIMS): Posicionando la Salud. Ponencia: El auge de la mercadotecnia en los productos naturales como alternativa en salud bucodental. Universidad de los Hemisferios. Quito Ecuador. Mayo 2017.
- 13a Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales. Ponencia: Obtención, caracterización y evaluación de extractos vegetales, una alternativa en enfermedades orales. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y

Asociación Mexicana de Investigación en Productos Naturales (AMIPRONAT). Morelia, México. Mayo 2017.

- V Congreso Internacional de Odontología Pediátrica. Ponencia: *Heliopsis longipes*. Obtención, caracterización y evaluación antimicrobiana como alternativa en odontología. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco. Septiembre 2017.
- XXV Congreso Internacional “Maestro Angel Kameta Takizawa”. Ponencia: Los extractos naturales como alternativa en odontopediatría. Universidad Nacional Autónoma de México UNAM. Acapulco, Guerrero. Marzo 2018.
- XVI Convención Anual y Simposio Internacional de la Red Iberoamericana de Mercadotecnia en Salud (RIMS): Mercadotecnia, tecnologías e innovación en servicios de salud. Ponencia: La importancia de la innovación, la invención y el marketing de dispositivos y productos naturales en salud. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. Abril 2018.
- III Convención Internacional de Salud Pública, Cuba Salud 2018. Ponencia: Los productos naturales en la salud pública. Universidad de La Habana. La Habana, Cuba. Abril 2018.
- Tercer Congreso Internacional de Investigación en Ciencias de la Salud. Ponencia: Desarrollo de patentes, una oportunidad de innovación en el área de la salud. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco. Septiembre 2018.
- Primer Simposium Odontológico de la Universidad de Coahuila. Ponencia: Desarrollo de patentes en el área de la salud. Universidad Autónoma de Coahuila. Febrero 2019.
- XVII Convención Anual y Simposio Internacional de la Red Iberoamericana de Mercadotecnia en Salud (RIMS). Ponencia: Innovación e invención en salud. Universidad Autónoma del Carmen. Ciudad del Carmen, Campeche, México. Mayo 2019.



SE
SECRETARÍA
DE ECONOMÍA



IMPI
INSTITUTO MEXICANO
DE LA PROPIEDAD
INDUSTRIAL

TÍTULO DE MODELO DE UTILIDAD No. 4209

Titular(es): UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN.
Domicilio: Av. Pedro de Alba S/N, Torre de Rectoría, Piso 4, Ciudad Universitaria, 66455, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, MÉXICO
Denominación: DISPOSITIVO DISPENSADOR, INSTALADOR Y COLECTOR DE HOJAS DE BISTURÍ.
Clasificación: CIP: A61B17/32
CPC: A61B17/3213
Inventor(es): SONIA MARTHA LÓPEZ VILLARREAL; ABELARDO CHÁVEZ MONTES; OSVELIA ESMERALDA RODRÍGUEZ LUIS; LAURA ELENA VILLARREAL GARCÍA

SOLICITUD

Número:	Fecha de Presentación:	Hora:
MX/u/2017/000160	6 de Abril de 2017	12:10

Vigencia: Diez años

Fecha de Vencimiento: 6 de abril de 2027

Fecha de Expedición: 13 de noviembre de 2019

El registro de referencia se otorga con fundamento en los artículos 1º, 2º fracción V, 6º fracción III, y 59 de la Ley de la Propiedad Industrial.

De conformidad con el artículo 29 de la Ley de la Propiedad Industrial, el presente registro tiene una vigencia de diez años improrrogables, contada a partir de la fecha de presentación de la solicitud y estará sujeta al pago de la tarifa para mantener vigentes los derechos.

Quien suscribe el presente título lo hace con fundamento en lo dispuesto por los artículos 6º fracción III, 7º BIS 2 y 59 de la Ley de la Propiedad Industrial; artículos 1º, 3º, 4º, 5º fracción V inciso a), sub inciso iii), 16 fracciones I y III y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; 1º, 3º y 5º inciso a) y antepenúltimo párrafo, del Acuerdo que delega facultades en los Directores Generales Adjuntos, Coordinador, Directores Divisionales, Titulares de las Oficinas Regionales, Subdirectores Divisionales, Coordinadores Departamentales y otros subalternos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

El presente oficio se signa con firma electrónica avanzada (FIEL), con fundamento en los artículos 7 BIS 2 de la Ley de la Propiedad Industrial; 3o de su Reglamento, y 1 fracción III, 2 fracción V, 26 BIS y 26 TER del Acuerdo por el que se establecen los lineamientos para el uso del Portal de Pagos y Servicios Electrónicos (PASE) del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, en los trámites que se indican.

SUBDIRECTOR DIVISIONAL DE EXAMEN DE FONDO DE PATENTES ÁREAS MECÁNICA, ELÉCTRICA Y DE DISEÑOS INDUSTRIALES Y MODELOS DE UTILIDAD

PEDRO DAVID FRAGOSO LÓPEZ



Cadena Original:
PEDRO DAVID FRAGOSO LOPEZ|00001000000405457619|Servicio de Administración
Tributaria|1052|MX/2019/101241|MX/u/2017/000160|Título de modelos de utilidad|1220|RRGO|Pág(s)
1|+4UbRk2ecwB67kZr6CFe7QYOZs=

Sello Digital:
PHENPY9x67nOmdQljdamsvhtVeymO6vtCk2yGgdqKkC5+b/RfLDI7aB41+NsZhlejsi1f+ZAhfClj/6cxq+60Mve
98geOF0slw+aOKZSsqNkZN+GY/TQplUptfSNerBSEsa8O5cXb/lZqINj5JZuVSmmuRfOIO4IfiBrgqjiQeLvdB1h
wJ2D1Qqp7gJyoYKAPdDFYq1xU7KspMUvaq2vxrvpT+3Dz0CsE2HL0HojUCJzzimxFRkBDpvnKuAMn0uJ0dhGOVHKVB
GAixquufh1jTF7GIMDoky0T90S25dcEDG1/2S5NArqA8HH2SbNSYthOIP5Rffnk8HKUJTJA==

Arenal 550, Santa María Tepepan, Xochimilco, C.P. 16020, CDMX.
www.gob.mx/imp

Creatividad para el Bienestar



MX/2019/101241



UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE TLAXCALA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Otorga el presente:

RECONOCIMIENTO



CONACAO

A:

Sonia López Villarreal; Abelardo Chávez Montes; Rocío Castro Ríos;
Azucena González Horta; José Ezequiel Viveros Valdés; Catalina Leos
Rivas; Osvellia Rodríguez Luis.

Por haber obtenido el **PRIMER LUGAR** en la categoría CARTEL INVESTIGACIÓN
BÁSICA con el tema:

**EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA DE PRODUCTOS NATURALES. ALTERNATIVA CONTRA
MICROORGANISMOS ORALES.**

Durante el IX ENCUENTRO NACIONAL DE CUERPOS ACADÉMICOS DE ODONTOLOGÍA, VII ENCUENTRO
INTERNACIONAL DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN ODONTOLÓGICA, II ENCUENTRO DE JOVENES
INVESTIGADORES EN ODONTOLOGÍA

"POR LA CULTURA A LA JUSTICIA SOCIAL"
Tlaxcala, Tlax., 10 de Marzo del 2017

C.D. NÉYDA ROMANO CARRO
DIRECTORA DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

DR. EDUARDO MEDRANO CORTÉS
PRESIDENTE DE CONACAO

DRA. EVA ORTÍZ ORTÍZ
PRESIDENTA DEL COMITÉ ORGANIZADOR



LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

otorga el

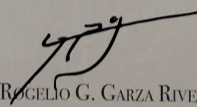
Premio UANL a la Invención
Reconocimiento a la Propiedad Industrial, edición 2020

a

Sonia Martha López Villarreal

Por haber obtenido el Título de Registro de Modelo de Utilidad No. 4209,
denominado: "Dispositivo dispensador, instalador y colector de hojas de bisturí".

"ALERE FLAMMAM VERITATIS"
Ciudad Universitaria. Agosto de 2020.


MTRO. ROGELIO G. GARZA RIVERA
Rector





EL CONSEJO CONSULTIVO Y LA JUNTA DIRECTIVA DEL
COLEGIO NACIONAL DE CIRUJANOS DENTISTAS, A.C.

otorgan el presente

RECONOCIMIENTO

a la

Mtra. Sonia Martha López Villarreal

**PREMIO NACIONAL 2018
POR EL ESTADO DE NUEVO LEÓN**

En base a su brillante trayectoria académica y profesional,
respondiendo así a las necesidades de salud, sociales y culturales,
cumpliendo de esta manera con la Filosofía, Misión y Visión del
Colegio Nacional de Cirujanos Dentistas.

"Por la Odontología Mexicana"

Acapulco, Gro. marzo 11 de 2018

Dr. Jacobo Efraín Pérez Inzunza
PRESIDENTE



Horizonte sanitario

Villahermosa, Tabasco, México a 7 de marzo de 2022

ASUNTO: Constancia de aceptación de artículo.

Sonia López-Villarreal
Abelardo Chávez-Montes
Catalina Leos-Rivas
Osvelia Rodríguez-Luis
Rocío Castro-Ríos
Raymundo Pérez-Hernández
PRESENTE

Me es muy grato informarles que el artículo original: "**Evaluación antibacteriana y coagulante de extractos de cinco vegetales de interés odontológico**", ha sido arbitrado favorablemente para su publicación en la Revista Horizonte Sanitario (<https://revistas.ujat.mx/index.php/horizonte>) en el Vol. 21 No.3 correspondiente a septiembre - diciembre 2022.

"**Horizonte Sanitario**" está clasificada por el Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (**CONACYT**) en el área Medicina y ciencias de la salud. Actualmente está indizada en Scientific Electronic Library Online (**SciELO Citation Index**), en el Sistema de Información Científica (**Redalyc**). Dentro del catálogo del Sistema Regional de Información en Línea para Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal (**Latindex**). Igualmente se encuentra en el sistema abierto de información de revistas publicadas en castellano (**Dialnet**), en la Red Iberoamericana de innovación y Conocimiento Científico (**REDIB**), en el Open Academic Journals Index (**OAJI**), en el Índice de Revistas Latinoamericanas en Ciencia de la Dirección General de Bibliotecas de la Universidad Nacional de México (**Periódica**), en Bibliografía Latinoamericana (**Biblat**), en el Índice Internacional (**Actualidad Iberoamericana**), en la Matriz de Información para el Análisis de Revistas (**MIAR**), en la Biblioteca Virtual de Salud (**bvs**), en Literatura Latinoamericana y del Caribe en Ciencias de la Salud (**LILACS**), y en Geneva Foundation for Medical Education and Research (**GFMER**). Recientemente se adhirió al **AURA**, que es el espacio desde el cual **AmeliCA** pretende reflejar el estado general de las revistas científicas respecto a las políticas de apertura y derechos de explotación de la publicación científica.

Atentamente


Dr. Heberto Romeo Priego Álvarez
Editor en Jefe

C.c.p. Archivo
Dr. HRP/accm



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO

División Académica de Ciencias de la Salud. Av. Gregorio Méndez 2838-A, col. Tamulté, C.P. 86100, Villahermosa, Tabasco, México.

Extractos vegetales. Obtención, caracterización y evaluación antimicrobiana contra microorganismos orales.

López-Villarreal Sonia,* Chávez-Montes Abelardo,** González-Horta Azucena,**
Castro-Ríos Rocío, *** Rodríguez-Luis Osvelia. ****

Resumen

Las plantas representan una alternativa muy valiosa en medicina y odontología debido a la gran cantidad de compuestos químicos presentes y su actividad que brinda una oportunidad de aplicar estas propiedades en el control de enfermedades bucodentales. Entre las propiedades que presentan las plantas se encuentra la actividad antimicrobiana que ha sido reportada con uso en la medicina tradicional. El presente estudio tiene como objetivo la obtención de cuatro extractos vegetales: *Heliopsis longipes*, *Equisetum arvense*, *Mimosa tenuiflora* y *Amphipterygium adstringens*, posteriormente caracterizar fitoquímicamente de forma preliminar los extractos obtenidos por identificación parcial de compuestos presentes mediante reacciones coloridas y por medio de separaciones cromatográficas y la determinación de los principales compuestos químicos presentes para posteriormente evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos a partir de las especies frente a microorganismos patógenos *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478 *Streptococcus mutans* ATCC 25175 utilizando la técnica de susceptibilidad microbiana para determinar cuál de los extractos presenta mayor actividad antimicrobiana frente a los microorganismos seleccionados. Los resultados indican que los extractos etanólicos de cada una de las plantas presentaron actividad antimicrobiana al menos en uno de los microorganismos evaluados.

Palabras clave: plantas medicinales, extractos, actividad antimicrobiana

Abstract

The plants represent a valuable alternative in medicine and dentistry because of the large number of chemical compounds and their activity that provides an opportunity to apply these properties to control oral diseases. Among the properties exhibited by plants it is the antimicrobial activity has been reported with use in traditional medicine. This study aims at obtaining four plant extracts: *Heliopsis longipes*, *Equisetum arvense*, *Mimosa tenuiflora*, *amphipterygium adstringens* later characterize phytochemically preliminarily extracts obtained by partial identification of compounds by colorful reactions and through chromatographic separations and the determination of the main chemical compounds to further evaluate the antimicrobial activity of extracts obtained from species against pathogenic microorganisms *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478 *Streptococcus mutans* ATCC 25175 using the technique of microbial susceptibility to determine which of the extracts shows increased activity antimicrobial against the selected microorganisms. The results indicate that the ethanolic extracts and of each of the plants exhibited antimicrobial activity at least one of the microorganisms tested.

Keywords: medicinal plants, extracts, antimicrobial activity

*Estudiante del Doctorado en Ciencias con acentuación en Química de Productos Naturales, Facultad de Ciencias Biológicas UANL. E-mail: solopezvi@gmail.com

**Profesor e investigador de la Facultad de Ciencias Biológicas UANL.

***Profesor e investigador de la Facultad de Medicina UANL.

****Profesor e investigador de la Facultad de Odontología UANI

Introducción

Desde la antigüedad, el hombre ha utilizado las plantas como fuente para la elaboración de medicamentos cuya finalidad fue y ha sido controlar la prevalencia de ciertas enfermedades infecciosas, vencer los problemas de resistencia de los microorganismos y disminuir los efectos colaterales que poseen los antimicrobianos de síntesis química.¹

Barquero (2007) menciona que la mayoría de las especies vegetales poseen propiedades bactericidas, insecticidas y fungicidas. Estas propiedades se explican por la presencia de sustancias activas capaces de combatir enfermedades que potencialmente ponen en riesgo a la salud de la sociedad actual.² Se estima que en el mundo se utilizan cerca de 10000 especies vegetales con fines medicinales, la mayor parte en sistemas de medicina tradicional.

A pesar de que los extractos vegetales están en el grupo de aditivos clasificados como sustancias aromáticas y

saborizantes, en el que se incluyen diversos productos naturales, pueden utilizarse como medicamentos alternativos en todas las especies animales sin restricción alguna de su edad pero sí en la dosis del producto.³

Por otro lado, un problema importante en el área de la salud es hacer frente al problema de la resistencia a los antibióticos, que ha llevado a los investigadores del área de alimentos, farmacéutica y agricultura a buscar nuevas fuentes, principalmente de origen vegetal, que contengan sustancias con actividad antimicrobiana que ayuden a combatir cierto tipo de enfermedades.^{3,4}

Los microorganismos patógenos causantes de enfermedades son una preocupación generalizada, que constituye un factor de riesgo para la salud pública, incluyendo los microorganismos patógenos que causan enfermedades orales como la caries, es por esto que se buscan fuentes naturales que inhiban el crecimiento

bacteriano; descubriendo en las plantas compuestos bioactivos para tal fin.

A través del tiempo, el hombre ha encontrado a través de los productos naturales la solución a diferentes problemáticas, empleando las plantas a nivel alimenticio, industrial y medicinal, convirtiéndose de esta manera, en materias primas de vital importancia para el avance de la humanidad. Por lo tanto, productos naturales han desempeñado un papel importante en el desarrollo de fármacos, los cuales han sido la base de las primeras medicinas permitiendo el descubrimiento de diferentes productos, entre ellos los antibacterianos.⁵ En los últimos años más de la mitad de los productos farmacéuticos usados son derivados de fuentes naturales.⁶

Un extracto vegetal es una mezcla compleja, con multitud de compuestos químicos, obtenible por procesos físicos, químicos y/o microbiológicos a partir de una fuente natural y utilizable en cualquier campo de la tecnología. El carácter especial de los extractos vegetales es que a partir de una misma planta se pueden obtener extractos diferentes con principios activos variados. También depende del solvente empleado para extraer una parte vegetal definida.

Existen muchos métodos de obtención de extractos vegetales, uno de ellos es la extracción sólido-líquido en el equipo Soxhlet, la cual es una operación que está presente prácticamente en todos los procesos tecnológicos relacionados con la industria química y agroquímica. La extracción Soxhlet consiste básicamente en el lavado sucesivo de una mezcla sólida con un determinado solvente (etanol) que va "lavando o extrayendo" de la mezcla, los componentes más solubles en él. Mediante el lavado sucesivo de una mezcla, se puede extraer de ella componentes cuya solubilidad en el solvente extractante es muy baja, debido al efecto acumulado de las múltiples extracciones.^{7,8,9}

Para determinar la composición química de las plantas medicinales y conocer sus constituyentes biológicamente activos pueden seguirse metodologías que van desde un análisis fitoquímico preliminar hasta estudios químicos sistemáticos bioguiados. Puesto que este último tipo de estudio requiere una inversión considerable de tiempo y recursos, lo ideal es iniciar con estudios fitoquímicos preliminares que permitan hacer una discriminación de las plantas a estudiar en términos de su composición química, con el fin de seleccionar únicamente aquellas más interesantes para posteriores estudios sistemáticos.

Amphipterygium adstringens es un árbol endémico de México que crece en la selva baja caducifolia donde es dominante, y generalmente se asocia con diversas especies de *Bursera* y *Pseudomodogium perniciosum*.¹⁰

A la planta se le conoce como palo de rosa, cuachalalá, cuachalalate, maxiterán y volador.¹¹ Solares (2012) menciona que la distribución del cuachalalate se restringe en la vertiente del Pacífico, en los Estados de Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Morelos, Guerrero, Oaxaca y Chiapas.¹²

Mimosa tenuiflora (tepescohuite) es un arbusto o árbol de hasta 8 m de altura con una amplia distribución en América, es conocido tradicionalmente como "árbol de la piel", es originario de México y se encuentra en el Estado Chiapas, en la depresión central del Valle de Cintalapa y en la zona Noroeste de la planicie costera del Pacífico. Además en una pequeña parte de la región Noroeste de Guatemala, Brasil, Venezuela, Colombia, Panamá, El Salvador y Honduras.¹³

Equisetum arvense (cola de caballo) es una planta primitiva, descendiente de los enormes árboles del paleozoico. El nombre del género, *Equisetum*, deriva del latín: *equus* (caballo) y *seta* (crin). Una de las propiedades que hacen única a esta planta es su alto contenido en sales de sílice, algunas de ellas hidrosolubles. Este mineral es indispensable en la formación de tejido conectivo, uñas y huesos. Además acelera la regeneración del tejido conectivo dañado.¹⁴

Heliopsis longipes, conocido con el nombre común de chilcuague es una hierba perenne endémica de la sierra de Álvarez y sierra Gorda, región donde coinciden parte de los territorios de San Luis Potosí, Guanajuato y Querétaro, y de donde se conoce que su raíz tiene usos tradicionales.¹⁵ En la actualidad, el gran desafío para los países ricos en biodiversidad es poder vincular y convertir el conocimiento proveniente de los recursos biológicos en compuestos, procesos, métodos, herramientas o productos útiles, como parte del aprovechamiento y la explotación sostenible de la diversidad biológica en beneficio de la sociedad.

Materiales y Métodos

El material vegetal se obtuvo de lugares reconocidos para su venta en la ciudad de Monterrey NL, una muestra se depositó en el herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL para su identificación taxonómica y la entrega de un certificado. Posteriormente se obtuvieron los extractos etanólicos mediante soxhlet con muestras de diferentes pesos de *Heliopsis longipes* (chilcuague o raíz azteca), *Equisetum arvense* (cola de caballo), *Mimosa tenuiflora* (tepescohuite) y *Amphipterygium adstringens* (cuachalalate). El material vegetal, seco y molido fue colocado en Soxhlet y se adicionaron 500 mL del solvente etanol durante 72 horas. Posteriormente se eliminó el solvente mediante un rotaevaporador a presión reducida y se filtró y llevó a sequedad para obtener los

rendimientos. Los extractos se colocaron en frascos de color ámbar para evitar cambios debido a la luz.

Una vez obtenido el rendimiento del extracto. Se realizó el análisis fitoquímico preliminar de los extractos para la identificación parcial de compuestos presentes mediante reacciones colorimétricas y cromatografía en capa fina empleando diversos sistemas eluentes para caracterizar el extracto mediante sus factores de retención.

Posteriormente se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos de *Heliopsis longipes* (chilcuague o raíz azteca), *Equisetum arvense* (cola de caballo), *Mimosa tenuiflora* (tepescohuite) y *Amphipterygium adstringens* (cuachalalate), contra cepas bacterianas de *Streptococcus sobrinus* y *Streptococcus mutans* (ATCC), procedentes del Departamento de Microbiología Oral de la Facultad de Odontología de la UANL, mediante difusión en disco de agar. Se preparó inicialmente una suspensión de microorganismos a 0.05 de la escala de Mc Farlan, lo cual representa 1×10^5 UFC y se evaluaron concentraciones desde 3000-187.5 µg/mL de cada extracto, 100 µL de cada cepa se inocularon y sembraron sobre medio de cultivo Muller Hinton. Se realizaron cinco pozos en el agar y se adicionaron 20 µL de cada extracto a evaluar, realizándose el ensayo por triplicado y colocándose posteriormente las cajas a 37°C durante 24 horas para evaluar la actividad antimicrobiana.

Resultados

Se obtuvieron los diferentes extractos etanólicos mediante la técnica de soxhlet y posteriormente tras eliminar el solvente mediante rotaevaporador, el extracto seco se colocó en frasco ámbar y se almacenó a 4°C hasta su utilización (Figura 1).

Se obtuvieron diferentes rendimientos en cada producto vegetal los cuales se muestran (Tabla 1).



Figura 1. Extracción etanólica mediante soxhlet.

Tabla 1. Rendimiento de los diferentes extractos etanólicos obtenidos por Soxhlet

PRODUCTO NATURAL	GRAMOS PLANTA	OBTENCIÓN	RENDIMIENTO % g obtenido/g muestra x100
<i>Amphipterygium adstringens</i>	400g	52g	13.00%
<i>Mimosa tenuiflora</i>	460g	82.1g	17.84%
<i>Equisetum arvense</i>	940g	48.9g	5.20%
<i>Heliopsis longipes</i>	121g	10g	8.26%

Al realizar las pruebas fitoquímicas, se observó la presencia de diferentes compuestos químicos destacándose la presencia de triterpenos en *Heliopsis longipes*, *Equisetum arvense*, *Mimosa tenuiflora* y *Amphipterygium adstringens*, así como la presencia de cumarinas en *Heliopsis longipes* y taninos en *Amphipterygium adstringens* y *Mimosa tenuiflora* (Tabla 2).

En cuanto a las pruebas microbiológicas se pudo observar que presentaron actividad antimicrobiana *Amphipterygium adstringens* (E1), *Mimosa tenuiflora* (E2), *Equisetum arvense* (E3), *Heliopsis longipes* (E4) y sobresale *Amphipterygium adstringens* y *Equisetum arvense* contra *S. Mutans* y *Mimosa tenuiflora* contra *S. Sobrinus* (Tabla 3, 4 y Figura 4).

Tabla 2. PRUEBAS FITOQUÍMICAS

PRUEBA	IDENTIFICACIÓN	RESULTADO			
		Aa	Mt	Ea	Hi
KMnO4 Permanganato de Potasio Para compuestos con insaturaciones	Dobles enlaces	+	+	+	+
2-4 DFNH dinitrofenilhidrazina Grupo carbonilo	Carbonilo	+	+	+	+
Prueba de Liebermann Burchard	Esteroles y triterpenos	+	+	+	+
Cumarinas (NaOH 10% H2O)	Cumarinas	-	-	+	+
Baljet	Sesquiterpenlactonas	+	+	-	+
Quinonas	Quinonas	+	++	-	+
Grupo carboxilo	Carboxilo	-	-	-	+
Prueba de Dragendorff	Alcaloides	-	+	-	+
Taninos FeCl3/EtOH 5%	Oxhidrilos fenólicos	+	+	-	-
Saponinas	Saponinas	-	-	-	-
Shinoda	Flavonoides	-	+	-	-
Antrona	Carbohidratos	Anillo café	Anillo morado	Anillo azul	Anillo café rojizo

Tabla 3. Tamaño halos de inhibición promedio (mm), diferentes concentraciones, *Amphipterygium adstringens* (E1), *Mimosa tenuiflora* (E2), *Equisetum arvense* (E3), *Heliopsis longipes* (E4) contra *S. mutans*. n=3.

Extractos	3000 µg/mL	1500 µg/mL	750 µg/mL	375 µg/mL	187.5 µg/mL
E1	18	20	13.6	14	14
E2	13	16.3	13	11.6	13
E3	29.3	22.3	13.3	12.6	15
E4	18	16.3	15.3	14	15.6

Discusión

Los productos naturales tienen gran demanda en la actualidad debido a sus extensas propiedades biológicas, determinando así una fuente constante de numerosos tipos de compuestos bioactivos efectivos para distintas y complejas patologías.¹⁶ El uso de productos naturales aplicados contra microorganismos orales es posible debido a su actividad antimicrobiana y a la presencia de compuestos farmacológicamente activos y contra enfermedades orales.¹⁷

Diversos estudios han demostrado que algunos extractos naturales poseen efecto bacteriostático sobre el crecimiento de la cepa pura de *Streptococcus mutans* cultivada *in vitro* utilizando un medio sólido. En los resultados obtenidos se aprecia que para el caso de los vegetales probados en extracción etanólica solo *Equisetum arvense* mostró una acción antimicrobiana relevante para este agente y dicha acción es dependiente de la concentración. Dicha acción inhibitoria se hace evidente mediante la presencia de halos de inhibición y la variación en sus diámetros bajo la influencia de distintas concentraciones. Incluso existen estudios en animales en donde se hace evidente la reducción de caries mediante el control de *S. mutans* en la saliva de los mismos mediante la administración de productos naturales.

Por otro lado, para el caso de los materiales vegetales probados como extractos etanólicos contra *S. sobrinus* se pudo apreciar que la actividad de cada uno de ellos es poco relevante y su acción no es dependiente de la concentración.

Figura 4. Pruebas microbiológicas.

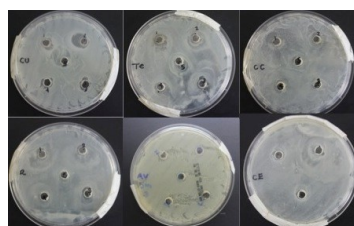


Tabla 4. Tamaño halos de inhibición promedio (mm), diferentes concentraciones, *Amphipterygium adstringens* (E1), *Mimosa tenuiflora* (E2), *Equisetum arvense* (E3), *Heliopsis longipes* (E4) contra *S. sobrinus*. n=3.

Extractos	3000 µg/mL	1500 µg/mL	750 µg/mL	375 µg/mL	187.5 µg/mL
E1	10.3	9.6	10	11.3	8
E2	12	11.6	9.6	9.6	9.3
E3	10.6	10.6	10	10.6	11
E4	11	10.3	9.6	9.6	9.3

Referencias

- Rangel D, García I, Velasco J, Buitrago D, Velasco E. Actividad antimicrobiana de los extractos etanólico, acetónico y acuoso de *Baccharis nitida* (Ruiz et Pavon) Pers. Rev Fac Farm. 2001; 42: 43 - 46.
- Barquero AA. Plantas sanadoras: pasado, presente y futuro. Rev Quím Viva. 2007; 6: 19 - 35.
- Collins JD, Wall PG. Food safety and animal production system: controlling zoonoses at farm level. Rev Sci Tech Off Int Epiz. 2004; 23: 685 - 700.
- Isla M, Arias M, Ordoñez A, Zampini I, Sajur S, Ferullo M, Alberto M, Nieva Moreno MI, Sayago JE, Negrillo L, Torres S, Cuello S, Rojo S, Yurquina RS, Ordoñez R. Especies vegetales de interés regional con potenciales aplicaciones en la industria farmacéutica, alimenticia y agricultura. Bol Latinoam Caibe Plant Med Aromat. 2007; 6: 411 - 412.
- Butler, M S. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. Natural Product Reports. 2005; 22: 162-195.
- Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. J Nat Prod. 2007;70:461-77.
- Cavanagh, H. M. A., and J. M. Wilkinson. Biological activities of lavender essential oil. Phytotherapy Res. 2002; 16(4):301-308.
- Li XJ, Li ZG, Wang X, Han JY, Zhang B, Fu YJ, Zhao CJ. Application of cavitation system to accelerate aqueous enzymatic extraction of seed oil from Cucurbita pepo L. and evaluation of hypoglycemic effect. Food Chem. 2016; 1;212:403-10.
- Redfern J, Kinninmonth M, Burdass D, Verran J. Journal of microbiology and biology education, May 2014; p. 45-46
- Pennington DT, Sarukhán J. 2005. Árboles tropicales de México. In: Manual para la Identificación de las Principales Especies. 3ra ed. Fondo de Cultura Económica, México. 523
- García GK. Principales usos y posibles acciones farmacológicas del cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schltedl). In FÁRMate, 2006; 7:1-7.
- Solares AF, Vázquez A, Gálvez C. Canales de comercialización de la corteza de cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht.) en México. Revista Mexicana de Ciencias Forestales. 2012; 3:29-42.
- Camargo Ricalde, S.L. Description, distribution, anatomy, chemical composition and uses of *Mimosa tenuiflora* (Fabaceae-Mimosoideae) in Mexico. Revista de Biología Tropical. 2008; Vol. 48, No. 4, pp. 939-954.

14. Dos Santos JG, Blanco MM, Do Monte FHM, Russi M, Lanziotti VM, Leal LK, Cunha GM. Sedative and anticonvulsant effects of hydroalcoholic extract of *Equisetum arvense*. *Fitoterapia*. 2005;76:508-13.
15. Martínez Loredo E, Izquierdo Vega JA, Cariño Cortes R, Cilia López VG, Madrigal Santillán EO, Zuñiga Pérez C, Valadez Vega C, Moreno E, Sánchez Gutiérrez M. Effects of *Heliopsis longipes* ethanolic extract on mouse spermatozoa in vitro. *Pharm Biol*. 2016 ;54(2):266-71.
16. Nalina T, Rahim Z. The crude aqueous extract of piper betle L. and its antibacterial effect towards streptococcus mutans. *American Journal of Biotechnology and Biochemistry*. 2007; 3 (1):10-5.
17. Jain I, Jain P, Bisht D, Sharma A, Srivastava B, Gupta N. Use of traditional Indian plants in the inhibition of caries-causing bacteria--*Streptococcus mutans*. *Braz Dent J*. 2015 Mar-Apr ;26(2):110-5.
18. Stankovic MS, Curcic MG, Zizic JB, Topuzovic MD, Solujic SR, Markovic SD. *Teucrium* plant species as natural sources of novel anticancer compounds: Antiproliferative, proapoptotic and antioxidant properties. *Int J Mol Sci*. 2011;12:4190-205
19. Aydemir EA, Simsek E, Imir N, Gökürk RS, Yesilada E, Fiskin K. Cytotoxic and apoptotic effects of *Ebenus boissieri* Barbey on human lung cancer cell line A549. *Pharmacogn Mag*. 2015;11(Suppl 1):S37-45.
20. Eshwarappa RS, Lakshmikantha RY, Subaramaihha SR, Subbaiah SG, Surendranath AR, Dhananjaya BL. Antioxidant activity of insect gall extracts of *Pistacia integerrima*. *Acta Sci Pol Technol Aliment*. 2015;14:367-74.
21. Manosroi A, Jantrawut P, Ogihara E, Yamamoto A, Fukatsu M, Yasukawa K, et al. Biological activities of phenolic compounds and triterpenoids from the galls of *Terminalia chebula*. *Chem Biodivers*. 2013;10:1448-63.
22. Ravi Shankara BE, Ramachandra YL, Sundara Rajan S, Richard SA, Dhananjaya BL. Evaluating the anthelmintic potential of leaf gall extracts of *Terminalia chebula* (Gaertn.) Retz (*Combretaceae*) *J Young Pharm*. 2014;6:1-4.

1.



Heliopsis longipes. Obtención, caracterización y evaluación antimicrobiana como alternativa en odontología

Sonia López Villarreal
Abelardo Chávez Montes
José Ezequiel Viveros Valdés
Rocio Castro Rios
Osvelia Rodríguez Luis
Universidad Autónoma de Nuevo León.

Introducción: Los medicamentos utilizados en odontología han demostrado tener efectos tóxicos mientras que la aplicación de productos naturales se considera como una alternativa interesante, debido a su menor impacto negativo. **Objetivo:** Obtener, caracterizar y realizar evaluación antimicrobiana de un extracto de *Heliopsis longipes in vitro* como alternativa para diferentes usos en odontología. **Materiales y Métodos:** El material vegetal se certificó en el herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL. Se obtuvo el extracto etanólico mediante Soxhlet. Se efectuó el análisis fitoquímico y la actividad antimicrobiana contra cepas bacterianas de *S. sobrinus* y *S. mutans* (ATCC), mediante difusión en disco de agar y contra *S. gordonii* (ATCC) mediante fluorescencia como control positivo clorhexidina al 0.12 % y como control negativo etanol. **Resultados:** Se obtiene un 8.26 % de rendimiento. En las pruebas fitoquímicas se destacó la presencia de triterpenos, cumarinas y sesquiterpenlactonas. Se evaluó la actividad antimicrobiana por la técnica de diluciones a 3000 ppm, 1500 ppm, 750 ppm, 375 ppm contra cepas bacterianas de *S. mutans* y *S. sobrinus* (ATCC), por difusión en placa de agar Mueller Hinton mediante pozos se destacó a 750 ppm y a 1000 ppm contra *S. gordonii* (ATCC). **Discusión:** El uso de productos naturales aplicados contra microorganismos orales es posible debido a su actividad antimicrobiana y a la presencia de compuestos farmacológicamente activos y contra enfermedades orales.

Palabras clave: *Heliopsis longipes*, Evaluación, Odontología, Actividad antimicrobiana.

Evaluation of the Essential Oil of *Citrus paradisi* as an Alternative Treatment against *Candida albicans*

Ameyalli J. Martinez Delgado¹, Uziel Castillo Velázquez², Juan G. Báez González³, Abelardo Chávez Montes³, Sonia M. López Villarreal¹, Laura Elena Villarreal García¹, Rosa María Sánchez Casas², Osvelia E. Rodríguez Luis^{1*}

¹Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Odontología, Monterrey, NL, México

²Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, General Escobedo, NL, México

³Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, San Nicolás de los Garza, NL, México

Email: *osvelia.rodriguezls@uanl.edu.mx

How to cite this paper: Delgado, A.J.M., Velázquez, U.C., González, J.G.B., Montes, A.C., Villarreal, S.M.L., García, L.E.V., Casas, R.M.S. and Luis, O.E.R. (2020) Evaluation of the Essential Oil of *Citrus paradisi* as an Alternative Treatment against *Candida albicans*. *Open Journal of Stomatology*, **10**, 258-270.
<https://doi.org/10.4236/ojst.2020.109025>

Received: August 13, 2020

Accepted: September 27, 2020

Published: September 30, 2020

Copyright © 2020 by author(s) and Scientific Research Publishing Inc. This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Abstract

Introduction: The World Health Organization establishes that 80% of the world's population uses traditional medicine for their primary care, because they contain compounds responsible for their properties. **Objective:** To evaluate the antifungal effect of the essential oil of *Citrus paradisi* against *C. albicans* and the cytotoxic effect in three cell lines *in vitro*. **Methods:** The phytochemical characterization of the oil was carried out by chemical methods and Gas chromatography (GC-MS) and the antifungal effect against *C. albicans* (ATCC 90029) was evaluated by the Kirby-Bauer method, which evaluated concentrations of 0.75 - 20 µg/mL and compared with nystatin 100,000 UI/mL as a positive control. The percentage of the relative inhibitory effect was calculated. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined at 24 hours. Moreover, the cytotoxic effect on *C. albicans* and cell lines was determined by the colorimetric MTT tetrazolium assay. Finally, the antifungal effect against *Candida* strains isolated from clinical samples was evaluated at a concentration of 20 µg/mL. **Results:** The essential oil showed an antifungal effect with a percentage of inhibition of 123%. The MIC was 2.5 µg/mL, and the cytotoxicity index was 5.44 µg/mL for *C. albicans*. The IC₅₀ values were 21.060, 9.482 and 4.176 µg/mL for Vero E6, J774A.1 and MDBK cells respectively. **Conclusion:** These results show the use of *C. paradisi* essential oil as an alternative treatment in oral antifungal therapy, it is beneficial due to its antifungal effect and its low toxicity on cell cultures.

Keywords

Citrus, *Candida*, Candidiasis, Essential Oil, Herbal Medicine

1. Introduction

Candida albicans was first described more than 150 years ago [1]. It is known as a commensal microorganism and the most common fungal pathogen in humans [2] and is a member of the healthy microbiota that colonizes the gastrointestinal tract, reproductive tract, oral cavity and skin [3]. The different types of cells of *C. albicans* are yeasts, which are cells of round to oval morphology with a size of 2 to 4 microns; the hyphae, which are thin cells with a tubular shape that measure between 3 to 5 microns; and finally, the pseudohyphae, which are ellipsoidal shape [2]. The primary fungal disease manifested in children is oral candidiasis caused by *C. albicans*. Some reports indicate the presence of the disease in up to 95% of immunosuppressed patients, such as terminal patients, HIV positive patients, patients with leukemia, anemia, and those who receive head and neck radiotherapy [1] [4]. Studies have shown that 65% of patients who use dentures or orthodontic appliances [5] [6] and between 46% to 65% in susceptible children such as premature babies have the disease due to the lack of hygiene in bottles and pacifiers. Other causes of *C. albicans* infection include drug therapy of antibiotics, corticosteroids and immunosuppressant's long-term, malnutrition [1] [7] [8], xerostomia, poor oral hygiene and mouth breathing [9]. The use of plants for medicinal purposes is known as phytotherapy, and worldwide, there are thousands of plants that synthesize active substances that act as defense mechanisms against microorganisms [10] [11]. For its part, *Citrus paradisi* (grapefruit) belongs to the family *Rutaceae* and is located in tropical regions such as Asia, China, the Philippines, and New Guinea [12] [13]. The fruit measures approximately 15 cm in diameter and is a pale yellow color protected by a tough outer covering called the cortex, which is formed by an epicarp corresponding to the epidermis and hypodermis and a mesocarp and an endocarp surrounded by a membrane (septa) containing the seeds.

The essential oil of *C. paradisi* is a lipophilic liquid volatile substance with aromatic properties extracted from the fruit's rind [13] [14]. It contains active substances, such as terpenes, hydrocarbons, sesquiterpenes, alcohols, aldehydes and esters [12] [14], and it acts as an antibacterial, antiviral, antifungal, insecticide, antioxidant, astringent, cell regenerator and detoxifier [13] [14]. The cytotoxic evaluation of natural products in cell cultures allows for the determination of cell viability, that is, changes in morphology, growth alteration, and death or cell disintegration [15]. Taking into account the biological properties described, the main objective of this study was to evaluate the antifungal and cytotoxic action of the essential oil of *C. paradisi* against *C. albicans* ATCC and cell cultures.

2. Materials and Methods

2.1. Essential Oil

The essential oil of *C. paradisi* was obtained from the grapefruit peel by cold pressing extraction method from the company Frutech International Corpora-

tion de México S.A. by C.V. The fresh air-dried *C. paradisi* peels were subjected to water-distillation boiling (>100°C) for 3 h by using a Clevenger apparatus. The obtained essential oil was dried over anhydrous sodium sulfate and after filtration stored at 4°C inside amber containers [16].

2.2. Basic Phytochemical Analysis

Phytochemical screening of the essential oil by conventional chemical tests was performed to determine the main chemical groups present in the essential oil using the following tests: Liebermann Burchard (sterols and triterpenes), Shinoda (flavonoids, flavanones and flavanonols), Baljet (sesquiterpene lactones), sulfuric acid (quinones), ferric chloride (tannins), Molisch (carbohydrates), sodium hydroxide (coumarins) and Dragendorff (alkaloids) [17] [18] [19]. Lastly, GC-MS chromatography was performed on a sample of the essential oil obtained. Gas chromatography (GC) was conducted in a HP-5 MS (30 m × 0.25 mm to 0.25 m) capillary column. The GC conditions were as follows: injection temperature, 250°C; and oven temperature controlled at 70°C for 1 min with a heating rate of 10°C/min, at 200°C for 2 min, with a heating rate of 10°C/min, and at 300°C for 5 min. The following parameters were used for the EM 5973N analysis: ion source, EI; electronic energy, 70 e; quadrupole temperature, 150°C; interface temperature, 230°C; and m/z, 30 - 400 amu [20].

2.3. *Candida albicans* ATCC

For the activation of the strain of *C. albicans* (ATCC 90029), 100 µL of *C. albicans* was inoculated in 1 mL of Sabouraud broth and incubated at 37°C for 24 hours. The morphological identification of the strains was performed using the Gram technique [21]. The number of colony forming units per milliliter (CFU) was carried out using the turbidity technique equivalent to 0.5 of the McFarland scale (1 × 10⁶ CFU/mL).

2.4. Antifungal Effect of *Citrus paradisi* and Minimum Inhibitory Concentration

Sowing of *C. albicans* on Sabouraud agar was performed by dissemination until confluent growth was obtained. Then, disc diffusion was performed (Kirby-Bauer method) using serial dilutions of the essential oil of *C. paradisi* at concentrations from 0.75 to 20 µg/mL, compared with nystatin 100,000 UI/mL as a positive control and distilled water as a negative control, and incubated at 37°C for 24 hours [13] [22] [23]. After incubation, the measurement of the inhibition zones was performed, and the mean and standard deviation were calculated, as well as the percentage of the relative inhibitory effect is interpreted as a high antifungal activity when its relative inhibition percentage is >70%, intermediate between 50% - 70% and low when it is <50% [24] [25], using Equation (1):

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\bar{x} \text{ halo diameter of oil}}{\bar{x} \text{ halo diameter of positive control}} \times 100 \quad (1)$$

2.5. Index of Cytotoxicity of *Citrus paradisi* against *Candida albicans*

One hundred microliters of *C. albicans* equivalent to 1×10^6 CFU/mL was placed in a sterile 96-well microplate with negative controls (Sabouraud medium), positive controls (nystatin 100,000 U/mL) and serial concentrations of the essential oil of *C. paradisi* from 0.75 to 20 $\mu\text{g/mL}$. The cells were incubated for 24 hours at 37°C. Subsequently, the spores were concentrated by centrifugation at 1700 rpm for three minutes. Then, the supernatant was removed, and 100 μL of the MTT reagent was added and incubated for 2 hours under the conditions described above. Finally, the supernatant was removed, and 100 μL of dimethylsulfoxide (DMSO) was added and incubated for 20 minutes. The absorbance was quantified in an Epoch spectrophotometer (BioTek) at 540 nm with the Gen5 program [26] [27]. All experiments were performed in triplicate with three independent repeats.

2.6. Index of Cytotoxicity of the Essential Oil on Cell Cultures

To evaluate the cytotoxic capacity of the essential oil of *C. paradisi*, three cell lines of the different lineages were used: phagocytic cells (mouse macrophages J774. A1) and kidney cells of monkeys and cows (Vero E6 and MDBK respectively). The cell strains were incubated in CRPMI culture medium with 10% fetal bovine serum at 37°C, with 5% CO₂ and a relative humidity and confluence of the cell monolayer of 80%. Subsequently, 5×10^4 cells/well from each of the cell lines were placed in 100 μL of CRPMI medium, and the different serial concentrations of the essential oil of *C. paradisi* were added, ranging from 5 to 50 $\mu\text{g/mL}$, and the medium was allowed to cool to a minimum temperature. The final volume of 200 μL was incubated for 24 hours. A positive control (nystatin 100,000 U/mL) and a negative control (cells without treatment) were also included. Then, the medium was removed, and 100 μL of the MTT reagent was added and incubated for 3 hours. Finally, the supernatant was removed, and 180 μL of DMSO + 20 μL of glycine buffer was added and incubated for 30 minutes, and the absorbances were quantified in an Epoch spectrophotometer (BioTek) at 540 nm with the Gen5 program [28] [29]. All experiments were performed in triplicate with three independent repeats. Percent cytotoxicity calculated according to Equation (2):

$$\% \text{ cytotoxicity} = 100 - \left[\left(\frac{\text{Abs of the sample}}{\text{Abs control}} \right) \right] \times 100 \quad (2)$$

In addition, the IC₅₀ is defined according to each of the cell lines and *C. albicans*, according to Equation (3):

$$Y = \text{Min} + \frac{\text{Max} - \text{Min}}{1 + \left(\frac{x}{\text{IC}_{50}} \right)^{\text{Hill Coefficient}}} \quad (3)$$

2.7. Antifungal Effect of *Citrus paradisi* against *Candida* Strains Isolated from Patients

The essential oil of *Citrus paradisi* was evaluated with *Candida* strains isolated from patients with oral candidiasis, it was provided by the Laboratorio de Microbiología, Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Nuevo León. The *Candida albicans* and *Candida krusei* strains were taken from the clinical isolates from *Candida*, seeding was carried out by dissemination on Sabouraud agar, then disk diffusion was performed (Kirby-Bauer method) using essential oil of *Citrus paradisi* for a concentration of 20 µg/ml, compared to the positive control of nystatin 100,000 U/ml, and distilled water as a negative control, then were incubated at 37°C for 24 hours. The procedure was performed in triplicate [13] [22] [23].

2.8. Statistical Analysis

All results are expressed as the mean ± standard deviation. To establish the differences between the essential oil of *C. paradisi* and the positive control (nystatin 100,000 U/ml), the data were analyzed in the IBM SPSS Statistics 24 program. The t-test was performed to evaluate the statistical significance, with a value of $p \leq 0.05$ considered significant with a confidence level of 95% [29].

3. Results and Discussion

The *Citrus paradisi* essential oil was positive for sterols, triterpenes, sesquiterpenes, quinones and coumarins (Table 1). The principally identified components were limonene (94.427%), myrcene (1.852%), α -pinene (0.544%), sabinene (0.340%), decanal (0.211%), citral (0.104%), linalool (0.085%), β -pinene (0.065%), γ -terpinene (0.049%), 1-terpinen-4-ol (0.012%) y nootkatone (0.009%), to which the antifungal activity of the *Citrus paradisi* essential oil were attributed (Table 2) (Figure 1). The presence of compounds in the essential oil of *Citrus paradisi* has been reported, identifying monoterpenic hydrocarbons as limonene (94.8%) was the most abundant, α -terpinene (1.8%), α -pinene (0.5%) and sabinene (0.4%), β -pinene, γ -terpinene and myrcene (<0.05%), sesquiterpenic hydrocarbons (0.3%), aliphatic aldehydes such as octanal (0.4%), decanal (0.3%), dodecanal (0.1%) and tetradecanal, alcohols such as linalol, (*E*)-p-menthadien-1-ol and α -terpineol (0.1%), esters (0.4%) and nootkatone (0.1%) [30]; the results of this study agree with the major compounds identified in the oil. Other authors have referred to the presence of flavonoids, amino acids, phenolic and vitamins, alkaloids, flavonoids, steroids, terpenoids, saponins, cardiac glycosides and sugars in *C. paradisi* oil [31] [32]. Terpenes, α -pinene, vinyl sesquiterpene [16], sabinene, ocimene, linalool, β -pinene, limonene, β -myrcene, and terpinen-4-ol have also been reported in the essential oil by gas chromatogram [20]. In this study, the presence of previously reported compounds was also identified in the essential oil of *Citrus paradisi* by chemical tests and GC/MS, highlighting limonene and myrcene; therefore, it could be suggested that these agents are responsible for its biological activity and their

application against *Candida albicans*.

The essential oil of *C. paradisi* presented the best antifungal activity at a concentration of 20 µg/mL with average inhibition halos of 25.6 mm, followed by the concentration of the essential oil at 10 µg/mL, which presented halos of average inhibition of 14.6 mm, compared with the positive control (nystatin), which showed average inhibition halos of 20.8 mm ($p \leq 0.05$). The percentage of relative inhibition of the essential oil was considered high at the concentrations of 20 µg/mL (123%) and 10 µg/mL (70.1%), intermediate at 5 µg/mL (51.9%) and low at 2.5 µg/mL (41.3%) (Table 3). In this study, the percentage of inhibition was dependent on the concentration of the essential oil, similar to those reported by other authors who indicated halos from 8 to 12.63 mm [32] [33], on the other hand, studies have reported the antifungal activity of *C. paradisi* essential oil to reduce the growth of *Penicillium chrysogenum* and *Penicillium verrucosum* [34], however, few studies have examined the antifungal activity of essential oils of citrus fruits.

Table 1. Partial phytochemical characterization of *Citrus paradisi*.

Chemical methods	Chemical groups	Result
Liebermann Burchard	Sterols, triterpenes	+
Shinoda	Flavonoids	-
Baljet	Sesquiterpenectones	+
Sulfuric acid	Quinones	+
Ferric chloride	Tannins	-
Molisch	Carbohydrates	-
Sodium hydroxide	Coumarins	+
Dragendorff	Alkaloids	-

–: negative; +: positive.

Table 2. Compounds obtained in the chromatogram obtained from the GC/MS analysis of the *Citrus paradisi* essential oil.

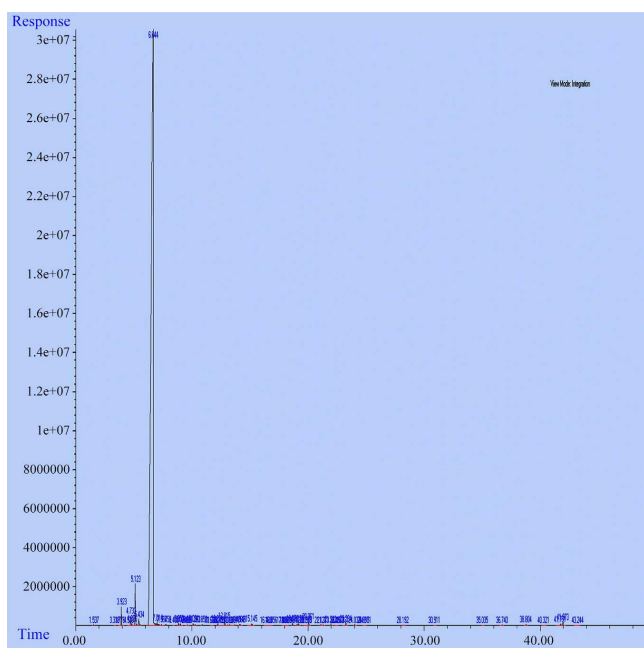
Compounds	RT	% ^a
Limonene	6.644	94.427
Myrcene	5.123	1.852
α -pinene	3.923	0.544
Sabinene	4.732	0.340
Decanal	12.815	0.211
Citral	15.145	0.104
Linalool	8.850	0.085
β -pinene	4.836	0.065
γ -terpinene	7.384	0.049
1-terpinen-4-ol	11.709	0.012
Nootkatone	30.911	0.009

Retention time (RT), percentage of area (% a).

Table 3. Antifungal activity of *C. paradisi* against *C. albicans* ATCC.

Inhibitor effect (mm)	Concentrations of essential oil (µg/mL)						C(+)	C(-)
	20	10	5	2.5	1.25	0.75		
R1	26	16	12	10	0	0	22	0
R2	27	14	12	8	0	0	20	0
R3	27	16	10	8	0	0	21	0
R4	24	14	10	9	0	0	20	0
R5	25	14	10	8	0	0	21	0
R6	25	14	11	9	0	0	21	0
$\bar{x} \pm s$	25.7 ± 1.21	14.7 ± 1.03	10.8 ± 0.98	8.7 ± 0.82	0	0	20.8 ± 0.75	0
%	123	70.1	51.9	41.3	0	0	-	-

R: repetitions; \bar{x} : mean of the sample; s: standard deviation; %: percentage of relative inhibitory effect; C(+): nystatine 100,000 UI/mL; C(-):distilled water; p < 0.05. F = 811.6, df = 6.

**Figure 1.** Chromatogram obtained from the GC/MS analysis of the *Citrus paradisi* essential oil.

Concerning the cytotoxic effect of the essential oil of *C. paradisi* on the viability of *C. albicans* evaluated by the MTT assay, a cytotoxicity index (IC₅₀) of 5.44 µg/mL was obtained as the concentration of the essential oil increased, without statistical differences between the concentrations, but with a statistical difference

of $p \leq 0.01$ with respect to the positive control and $p \leq 0.001$ with respect to the vehicle control (Figure 2). It is important to note that there are no studies that used a procedure similar to this study. However, some studies mention the use of XTT salts (2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide [26] and MTT to evaluate the mitochondrial metabolism of *C. albicans* using the same method in this study [35].

Regarding the cytotoxic effect of the essential oil of *C. paradisi* on different cell cultures by the MTT assay, a cytotoxicity index 50 (IC_{50}) of 21.060 $\mu\text{g/mL}$ was identified for Vero E6 cells, 9.482 $\mu\text{g/mL}$ for J774A.1 cells, and 4.176 $\mu\text{g/mL}$ for MDBK cells (Figure 3). This suggests its possible use as a tool in the control of yeast growth on body surfaces with therapeutic doses of 5.44 $\mu\text{g/mL}$ lower than the doses with cytotoxic effect in Vero E6 and J774A.1 cells, which makes it a natural alternative for the control of mycoses. Other studies reinforce these postulates, where they show that the essential oil of *C. paradisi* inhibits the proliferation of leukemia cells through apoptosis mechanisms at a concentration of 250 $\mu\text{g/mL}$ when employing the MTT assay [36]. With a concentration higher than that of this study, the use of the MTT assay has been reported to measure the antitumoral potential of citrus fruits such as *C. maxima*, *C. lemon* and *C. reticulata* against Dalton's lymphoma ascites cells [37]. It has also been used to measure the growth and viability of lung cancer cells using tangerine peel [38]; both studies support cell viability assays through the use of MTT. It should be mentioned that there are not enough studies about the cytotoxic effects of the essential oil on cell lines; the results from this study increase the knowledge of the therapeutic use of citrus fruits based on their cytotoxic effects, this was due to the fact that a positive viability-concentration relationship is observed in non-phagocytic MDBK and Vero E6 cell strains however, in J774A.1 cells, no differences associated with concentration were observed, which attributed cell viability to apoptotic processes.

The essential oil of *Citrus paradisi* also demonstrated antifungal activity against *Candida* strains isolated from patients with oral candidiasis, at the concentration of 20 $\mu\text{g/ml}$ it had an inhibitory effect against *Candida krusei* with average inhibition of 25.3 mm compared to the positive control which was 20.6 mm, against *Candida albicans* the inhibitory effect was 14.3 mm, unlike the positive control of 13.6 mm. The essential oil demonstrated a high relative inhibition percentage against both strains (Table 4), similar to that reported where the antifungal activity of the essential oil of *C. paradisi* was evaluated on *C. albicans* strains isolated from patients with subprosthetic stomatitis with an average inhibition of 12.6 mm [14], likewise, studies have evaluated the minimum fungicidal concentration of *C. paradisi* against *C. albicans* isolated from patients with prosthetic stomatitis, reporting a broad spectrum of fungicidal activity at concentrations of 0.1 - 16 $\mu\text{g/ml}$ [39], however, these results coincide with the studies where it is demonstrated that the essential oil presents an inhibitory effect against clinical isolates of *Candida*.

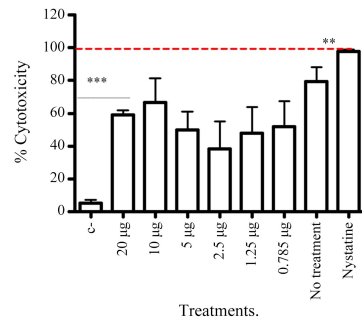


Figure 2. Cytotoxic effect of grapefruit essential oil on the viability *Candida albicans*.

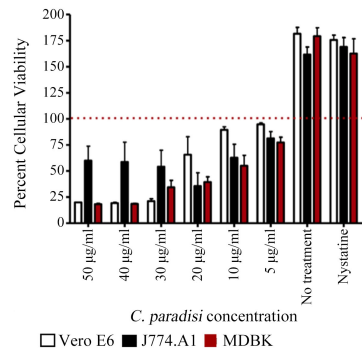


Figure 3. Effect of *C. paradisi* essential oil on cell viability.

Table 4. Antifungal activity of *C. paradisi* against *Candida* strains isolated from patients with oral candidiasis.

Inhibitor effect (mm)	<i>Candida albicans</i>		<i>Candida krusei</i>		α(-)
	<i>C. paradisi</i> 20 µg/mL	C(+)	<i>C. paradisi</i> 20 µg/mL	C(+)	
R1	13	13	24	21	0
R2	15	14	27	21	0
R3	15	14	25	20	0
$\bar{x} \pm s$	14.3 ± 1.15	13.6 ± 0.57	25.3 ± 1.52	20.6 ± 0.57	0
%	105	-	123	-	0
Student's t-test p value	0.183	-	0.034	-	-

R: repetitions; \bar{x} : mean of the sample; s: standard deviation; %: percentage of relative inhibitory effect; C(+): nystatine 100,000 UI/mL; C(-): distilled water; p ≤ 0.05.

4. Conclusion

The essential oil of *C. paradisi* showed an inhibitory effect against *C. albicans*

and samples from clinical isolates of oral candidiasis at different concentrations evaluated in the *in vitro* tests and was associated with the activity of its chemical groups identified as sterols, triterpenes, coumarins, quinones, and sesquiterpenectones, without toxic effect on Vero E6 cells and J774.A1 macrophages. The results of this study set a precedent for future research on this plant material and its possible applications in the dental field and related areas as an alternative antifungal treatment based on natural products.

Acknowledgements

This work was supported by the National Council of Science and Technology CONACYT for the support granted through grant No. 447385, the Support Program for Scientific and Technological Research (PAICYT-UANL 2018), CN 675-18, and the Program for Professional Development Teacher, for the Superior Type (PRODEP).

Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest regarding the publication of this paper.

References

- [1] Akpan, A. and Morgan, R. (2002) Oral Candidiasis. *Postgraduate Medical Journal*, **78**, 455-459. <https://doi.org/10.1136/pmj.78.922.455>
- [2] Noble, S.M., Gianetti, B.A. and Witchley, J.N. (2017) *Candida albicans* Cell-Type Switching and Functional Plasticity in the Mammalian Host. *Nature Reviews Microbiology*, **15**, 96-108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.157>
- [3] Nobile, C.J. and Johnson, A.D. (2015) *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. *Annual Review of Microbiology*, **69**, 71-92. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104330>
- [4] Pomarico, L., Cerqueira, D.F., de Araujo Soares, R.M., de Souza, I.P.R., de Araujo Castro, G.F.B., *et al.* (2009) Associations among the Use of Highly Active Antiretroviral Therapy, Oral Candidiasis, Oral *Candida* Species and Salivary Immunoglobulin A in HIV-Infected Children. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, **108**, 203-210. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2009.05.008>
- [5] Hernández-Solís, S.E., Rueda-Gordillo, F., Flota-Alcocer, A.D., Agullar-Ayala, F.J., Rodríguez-Fernández, M.D.S., *et al.* (2016) Influence of Orthodontic Appliances on the Occurrence of *Candida* spp. in the Oral Cavity. *Revista Chilena de Infectología*, **33**, 293-297. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182016000300007>
- [6] Shukla, C., Maurya, R., Singh, V. and Tijare, M. (2017) Evaluation of Role of Fixed Orthodontics in Changing Oral Ecological Flora of Opportunistic Microbes in Children and Adolescent. *Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, **35**, 34-40. <https://doi.org/10.4103/0970-4388.199226>
- [7] Kozinn, P.J., Taschdjian, C.L. and Wiener, H. (1958) Incidence and Pathogenesis of Neonatal Candidiasis. *Pediatrics*, **21**, 421-429.
- [8] Lyu, X., Zhao, C., Yan, Z.M. and Hua, H. (2016) Efficacy of Nystatin for the Treatment of Oral Candidiasis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Drug Design*,

- Development and Therapy*, **10**, 1161-1171. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S100795>
- [9] Jabra Rizk, M.A., Torres, S., Rambob, I., Meiller, T., Grossman, L., et al. (2007) Prevalence of Oral *Candida* Species in a North American Pediatric Population. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, **31**, 260-263. <https://doi.org/10.17796/jcpd.31.4.820968206675v577>
- [10] Woong Kim, S. (2012) Phytotherapy: Emerging Therapeutic Option in Urologic Disease. *Translational Andrology and Urology*, **1**, 181-191.
- [11] Hulla, J.E., Sahu, S.C. and Hayes, A.W. (2015) Nanotechnology History and Future. *Human & Experimental Toxicology*, **34**, 1318-1321. <https://doi.org/10.1177/0960327115603588>
- [12] Cristóbal-Luna, J.M., Álvarez-González, I., Madrigal-Bujaidar, E. and Chamorro-Cevallos, G. (2018) Grapefruit and Its Biomedical, Antigenotoxic and Chemopreventive Properties. *Food and Chemical Toxicology*, **112**, 224-234. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.12.038>
- [13] Torrenegra Alarcón, M.E., Pájaro, N.P. and Méndez, G.L. (2017) Antibacterial Activity *in Vitro* of Essential Oils from Different Species of the Genus *Citrus*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, **46**, 160-175. <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v46n2.67934>
- [14] Churata Oroya, D.E., Ramos Perfecto, D., Moromi Nakata, H., Martínez Cadillo, E., Castro Luna, A., et al. (2016) Antifungal Effect of *Citrus paradisi* "Grapefruit" on Strains of *Candida albicans* Isolated From Patients with Denture Stomatitis. *Revista Estomatológica Herediana*, **26**, 78-84. <https://doi.org/10.20453/reh.v26i2.2869>
- [15] Boncler, M., Różalski, M., Krajewska, U., Podsek, A. and Watala, C. (2014) Comparison of PrestoBlue and MTT Assays of Cellular Viability In The Assessment of Anti-Proliferative Effects of Plant Extracts on Human Endothelial Cells. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, **69**, 9-16. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2013.09.003>
- [16] Ou, M.C., Liu, Y.H., Sun, Y.W. and Chan, C.F. (2015) The Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities of Cold-Pressed and Distilled Essential Oils of *Citrus paradisi* and *Citrus grandis* (L.) Osbeck. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2015**, Article ID: 804091. <https://doi.org/10.1155/2015/804091>
- [17] Pérez Hernández, R.A., Leos Rivas, C., Oranday Cárdenas, A., Hernández Luna C.E., Sánchez García, E., et al. (2015) *In Vitro* Effect on the Inhibition of the Process of Nucleation in Renal Lithiasis, Ability to Capture Radical Free, Antimicrobial and Toxic of Methanol Extract of *Berberis trifoliata*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, **46**, 70-76.
- [18] Elizondo Luévano, J.H., Castro Ríos, R., Sánchez García, E., Hernández García, M.E., Vargas Villarreal, J., et al. (2018) *In Vitro* Study of Antiamoebic Activity of Methanol Extracts of *Argemone mexicana* on Trophozoites of *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, **2018**, Article ID: 7453787. <https://doi.org/10.1155/2018/7453787>
- [19] Alrasheid, A.A., Mohamed, A.A., Mohieldin, E.G., Eldein, K.I., et al. (2019) Phytochemical Investigation and Assessment of Antimicrobial, Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities of Sudanese *Citrus paradisi* Peel Extract. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, **11**, 1-8. <https://doi.org/10.5897/JPP2018.0531>
- [20] Paoli, M., de Rocca Serra, D., Tomi, F., Luro, F. and Bighelli, A. (2016) Chemical Composition of the Leaf Essential Oil of Grapefruits (*Citrus paradisi* Macf.) in Relation with the Genetic Origin. *Journal of Essential Oil Research*, **28**, 265-271.

- <https://doi.org/10.1080/10412905.2016.1140090>
- [21] Singh, A., Verma, R., Murari, A. and Agrawal, A. (2014) Oral Candidiasis: An Overview. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, **18**, 81-85. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.141325>
- [22] Bauer, A.W. (1966) Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disc Method. *American Journal of Clinical Pathology*, **45**, 149-158. https://doi.org/10.1093/ajcp/45.4_ts.493
- [23] Mohamadi, J. and Motaghi, M. (2014) Anti-Fungal Resistance in *Candida* Isolated from Oral and Diaper Rash Candidiasis in Neonates. *Bioinformation*, **10**, 667-70. <https://doi.org/10.6026/97320630010667>
- [24] Ramírez, L.S. and Diaz, H.E. (2007) Actividad antibacteriana de extractos y fracciones del ruibarbo (*Rumex conglomeratus*). *Scientia et Technica*, **1**, 397-400.
- [25] Cruz Carrillo, A., Rodríguez, N.N. and Rodríguez, C.E. (2010) Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de los extractos de *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* y *Silybum marianum*. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, **13**, 117-124. <https://doi.org/10.31910/rudca.v13.n2.2010.738>
- [26] Knight, S.A. and Dancis, A. (2006) Reduction of 2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-Sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide Inner Salt (XTT) Is Dependent on *Ca-FRE10* Ferric Reductase for *Candida albicans* Grown in Unbuffered Media. *Microbiology*, **152**, 2301-2308. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28843-0>
- [27] Jahn, B., Martin, E., Stueben, A. and Bhakdi, S. (1995) Susceptibility Testing of *Candida albicans* and *Aspergillus* Species by a Simple Microtiter Menadione-Augmented 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium Bromide Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, **33**, 661-667. <https://doi.org/10.1128/JCM.33.3.661-667.1995>
- [28] Zu, Y., Yu, H., Liang, L., Fu, Y., Efferth, T., et al. (2010) Activities of Ten Essential Oils towards *Propionibacterium acnes* and PC-3, A-549 and MCF-7 Cancer Cells. *Molecules*, **15**, 3200-3210. <https://doi.org/10.3390/molecules15053200>
- [29] Bardaweel, S.K., Tawaha, K.A. and Hudaib, M.M. (2014) Antioxidant, Antimicrobial and Antiproliferative Activities of *Anthemis palestina* essential oil. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **14**, Article No. 297. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-297>
- [30] Njoroge, S.M., Koaze, H., Karanja, P.N. and Sawamura, M. (2005) Volatile Constituents of Redblush Grapefruit (*Citrus paradisi*) and Pummelo (*Citrus grandis*) Peel Essential Oils from Kenya. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 9790-9794. <https://doi.org/10.1021/jf051373s>
- [31] Alcántara, Y.M., Tejada, A.E. and Ros, G.B. (2018) Effect of Different Concentrations of Pulverized Mesocarp of *Citrus paradisi* on the Bromatological Characteristics of Spray-Dried Lemon Juice Powder. *Food Science & Nutrition*, **6**, 1261-1268. <https://doi.org/10.1002/fsn3.679>
- [32] Oikeh, E.I., Omoregie, E.S., Oviasogie, F.E. and Oriakhi, K. (2016) Phytochemical, Antimicrobial, and Antioxidant Activities of Different Citrus Juice Concentrates. *Food Science & Nutrition*, **4**, 103-109. <https://doi.org/10.1002/fsn3.268>
- [33] Bona, E., Cantamessa, S., Pavan, M., Novello, G., Massa, N., et al. (2016) Sensitivity of *Candida albicans* to essential Oils: Are They an Alternative to Antifungal Agents? *Journal of Applied Microbiology*, **121**, 1530-1545. <https://doi.org/10.1111/jam.13282>
- [34] Viuda Martos, M., Ruiz Navajas, Y., Fernández López, J. and Pérez Álvarez, J. (2008) Antifungal Activity of Lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata*

- L.), Grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) Essential Oils. *Food Control*, **19**, 1130-1138. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.12.003>
- [35] Blanco Menéndez, N., del Fresno, C., Fernandes, S., Calvo, E., Conde Garrosa, R., *et al.* (2015) SHIP-1 Couples to the Dectin-1 hemITAM and Selectively Modulates Reactive Oxygen Species Production in Dendritic Cells in Response to *Candida albicans*. *The Journal of Immunology*, **195**, 4466-4478. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402874>
- [36] Dai, T.Y., Wang, B., Lin, S.Y., Jiang, J.P., Wu, L.Q., *et al.* (2017) Pure Total Flavonoids from *Citrus paradisi* Macfad Induce Leukemia Cell Apoptosis *in Vitro*. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, **23**, 370-375. <https://doi.org/10.1007/s11655-016-2593-z>
- [37] Nair, A., Kurup, S.R., R., Nair, A.S. and Baby, S. (2018) *Citrus* Peels Prevent Cancer. *Phytomedicine*, **50**, 231-237. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.08.011>
- [38] Li, Y.R., Li, S., Ho, C.T., Chang, Y.H., Tan, K.T., *et al.* (2016) Tangeretin Derivative, 5-Acetyloxy-6,7,8,4'-Tetramethoxyflavone Induces G2/M Arrest, Apoptosis and Autophagy in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells *in Vitro* and *in Vivo*. *Cancer Biology & Therapy*, **17**, 48-64. <https://doi.org/10.1080/15384047.2015.1108491>
- [39] Perić, M., Rajković, K., Lemić, A.M., Živković, R. and Arsenijević, V.A. (2019) Development and Validation of Mathematical Models for Testing Antifungal Activity of Different Essential Oils against *Candida* Species. *Archives of Oral Biology*, **98**, 258-264. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.11.029>

Article

Benefits of Cardamom (*Elettaria cardamomum* (L.) Maton) and Turmeric (*Curcuma longa* L.) Extracts for Their Applications as Natural Anti-Inflammatory Adjuvants

Gustavo R. Cárdenas Garza ¹, Joel H. Elizondo Luévano ², Aldo F. Bazaldúa Rodríguez ², Abelardo Chávez Montes ², Raymundo A. Pérez Hernández ¹, Ameyalli J. Martínez Delgado ¹, Sonia M. López Villarreal ¹, José Rodríguez Rodríguez ³, Rosa M. Sánchez Casas ⁴, Uziel Castillo Velázquez ^{4,*} and Osvelia E. Rodríguez Luis ^{1,*}



Citation: Cárdenas Garza, G.R.; Elizondo Luévano, J.H.; Bazaldúa Rodríguez, A.F.; Chávez Montes, A.; Pérez Hernández, R.A.; Martínez Delgado, A.J.; López Villarreal, S.M.; Rodríguez Rodríguez, J.; Sánchez Casas, R.M.; Castillo Velázquez, U.; et al. Benefits of Cardamom (*Elettaria cardamomum* (L.) Maton) and Turmeric (*Curcuma longa* L.) Extracts for Their Applications as Natural Anti-Inflammatory Adjuvants. *Plants* **2021**, *10*, 1908. <https://doi.org/10.3390/plants10091908>

Academic Editors: Seok-Geun Lee and In Jin Ha

Received: 20 July 2021
Accepted: 8 September 2021
Published: 14 September 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ Faculty of Dentistry, Autonomous University of Nuevo León, Monterrey 64460, Nuevo León, Mexico; gustavo.cardenasgrz@uanl.edu.mx (G.R.C.G.); raymundo.perezhrz@uanl.edu.mx (R.A.P.H.); ameyalli.martinezd@uanl.edu.mx (A.J.M.D.); sonia.lopezvl@uanl.edu.mx (S.M.L.V.)
 - ² Faculty of Biological Sciences, Autonomous University of Nuevo León, San Nicolás de los Garza 66455, Nuevo León, Mexico; joel.elizondolv@uanl.edu.mx (J.H.E.L.); aldo.bazalduarg@uanl.edu.mx (A.F.B.R.); abelardo.chavezmn@uanl.edu.mx (A.C.M.)
 - ³ Tecnológico de Monterrey, Monterrey 64849, Nuevo León, Mexico; jrr@tec.mx
 - ⁴ Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny, Autonomous University of Nuevo León, Monterrey 64460, Nuevo León, Mexico; rosa.sanchezcss@uanl.edu.mx
- * Correspondence: uziel.castillovl@uanl.edu.mx (U.C.V.); osvelia.rodriguezls@uanl.edu.mx (O.E.R.L.); Tel.: +52-8113404390 (U.C.V.); +52-8183294230 (ext. 3117) (O.E.R.L.)

Abstract: The genus *Zingiberaceae* has been widely used for phytotherapeutic purposes in traditional medicine throughout the world for its anti-inflammatory activity. Experimental studies have established that inflammation caused by chronic infections represents a risk factor for different forms of cancer. The objective of this study was focused on determining the anti-inflammatory capacity and cytotoxic activity of aqueous extracts of *Elettaria cardamomum* (cardamom) and *Curcuma Longa* (turmeric). The extracts were obtained by maceration and, through GC-MS/MS, a total of 11 different chemical components were determined in the aqueous extract of cardamom and 7 in the extract of turmeric. The main compounds found in cardamom and turmeric were α -terpinyl acetate (54.46%) and β -turmerone (33.45%), respectively. RT-qPCR results showed significantly lower gene expression levels of innate inflammatory cytokines (IL-6 and TNF- α) compared to the control (LPS). Also, it was observed that the extracts do not possess cytotoxic activity against different cell lines, where *E. cardamomum* showed EC₅₀ (μ g/mL) of 473.84 (HeLa cells), 237.36 (J774A.1 cells), 257.51 (Vero E6 cells), and 431.16 (Balb/C peritoneal cells) and *C. longa* showed EC₅₀ (μ g/mL) of 351.17 (HeLa cells), 430.96 (J774A.1 cells), 396.24 (Vero E6 cells), and 362.86 (Balb/C peritoneal cells). The results of this research suggest that natural extracts of *E. cardamomum* and *C. longa* possess anti-inflammatory effects and no cytotoxic activity against HeLa, J774A.1, Vero E6, and Balb/C peritoneal cell lines. Finally, it was observed that the extracts also decreased nitric oxide (NO) production in peritoneal macrophages.

Keywords: anti-inflammatory; *Curcuma longa*; cytokines; cytotoxic activity; *Elettaria cardamomum*; extracts; inflammation; medicinal plants; natural products; phytochemicals

1. Introduction

Nowadays, there is a tendency to incorporate phytotherapy as an efficient therapeutic option worldwide; the use of medicinal plants to treat various pathologies has been reported since they possess active principles with different biological actions [1,2]. The World Health Organization (WHO) encourages the use of plants with a scientific basis for the therapy of systemic diseases [3]. These diseases can lead to serious complications,

activating the inflammation process with infiltration of macrophages, neutrophils, lymphocytes, and plasma cells in the tissue, with the release of cytokines that contribute to the repair of tissue damage [4]. The inflammation process occurs as a response to aggression to repair and restore tissues [5]. During this period, cytokines, proteins that regulate the function of immune system cells produced by lymphocytes, macrophages, or monocytes and hematopoietic cells with pro-inflammatory or anti-inflammatory action, are released [6]. Among the proinflammatory cytokines are tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 α (IL-1 α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), interleukin-17 (IL-17), and, with antagonistic effects, interleukin-10 (IL-10) [7,8]. Current therapy involves anti-inflammatory agents that, in some cases, may reveal adverse effects such as the presence of a peptic ulcer, gastrointestinal toxicity, myocardial infarction, heart failure, stroke, or nephrotoxicity [9,10].

In traditional medicine, the antioxidant and pharmaceutical properties of some plants belonging to the *Zingiberaceae* family, such as *Elettaria cardamomum* and *Curcuma longa*, have been well studied, and have found applications in industries such as food, cosmetics, and pharmaceuticals, among others; these capabilities are related to their diverse composition of various phytochemical compounds, mainly phenolic compounds [11]. *E. cardamomum* (cardamom), also known as “green or true cardamom”, is a perennial herbaceous plant, which has been described as possessing compounds such as phenols, starch, tannins, terpenoids, flavonoids, proteins, sterols [12], anthocyanins, and alkaloids, and it also possesses various pharmacological properties, such as antioxidant, anti-inflammatory, anticancer, and antimicrobial activities [13]. *C. longa*, also called turmeric or curcuma, possesses different bioactive components such as curcuminoids (curcumin) and essential oils (monoterpenes) [14], and among its multiple therapeutic properties are anti-inflammatory, antihyperlipidemic, antimicrobial, and antiparasitic activity [15,16]. Its traditional use has been reported for the treatment of diseases such as rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, and psoriasis as it manages to modulate the signaling of proinflammatory cytokines [17].

The main objective of this research focused on the evaluation of the effects of crude aqueous extracts of *E. cardamomum* and *C. longa* on the inflammatory process through the expression of interleukins by stimulated macrophages and their possible applications as adjuvants in health improvement therapies.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals and Reagents

All chemicals and solvents were analytical grade. Antibiotic antimycotic solution (100 \times) stabilized, diethyl polycarbonate (DEPC), dimethyl sulfoxide (DMSO), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), glycine buffer solution, Griess reagent, guanidine thiocyanate, lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* O26:B6 smooth strain, n-hexane, nystatin, RNazol[®] RT, RPMI-1640 medium with L-glutamine, SYBR[®] Green Quantitative RT-qPCR kit, and thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) were purchased from Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). GoTaq[®] qPCR Master Mix kit and ImProm-II[™] Reverse Transcription System reverse transcription kit was purchased from Promega (Promega[®] Corporation, Madison, WI, USA).

2.2. Plant Material and Extraction

E. cardamomum seeds (SKU: 209740-01) and *C. longa* rhizome (SKU: 205400-54) were both purchased from Starwest Botanicals (Sacramento, CA, USA). Plant material was purchased in powdered form. The extraction was performed with distilled water. Aqueous extracts of both plants were obtained by the heat infusion method (100 °C/100 rpm) for 30 min. For this purpose, 10 g of plant material were placed in 100 mL of distilled water in a flat-bottomed ball flask. After the extraction time, the extracts were filtered, frozen

at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, and, finally, lyophilized. The following formula was used to calculate the extraction yield percentage [18]:

$$\% \text{ Yield} = \left(\frac{\text{Final weight}}{\text{Initial weight}} \right) \times 100 \quad (1)$$

2.3. Qualitative Phytochemical Tests

The following phytochemical tests were performed to identify the functional groups of each extract: Lieberman-Buchard (sterols, triterpenes), Shinoda (flavonoids), Baljet (sesquiterpene lactones), sulfuric acid (quinones), and ferric chloride (tannins) [19], then each extract was analyzed by gas chromatography coupled to GC/MS mass for identification of the main components of its chemical composition [11].

2.4. GC and GC-MS/MS Analysis of the Aqueous Extracts

For chemical identification and quantification, $1\ \mu\text{L}$ of diluted aqueous extract in n-hexane (1:20, *v:v*) was analyzed using a gas chromatograph Varian Saturn 2100T coupled to an MS/MS Saturn 2100 ion trap mass spectrometer (Agilent Technologies, Inc., Walnut Creek, CA, USA). The chromatographic separation was performed with the capillary column HP-5ms ($30\ \text{m} \times 0.25\ \text{mm} \times 0.25\ \mu\text{m}$). The split injection mode was used (split ratio 1:20), while helium-6 was used as the carrier gas with a flow rate of $1\ \text{mL min}^{-1}$. The injector temperature was set to $250\text{ }^{\circ}\text{C}$. The initial oven temperature was set to $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 min, then the temperature was raised to $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ at a rate of $5\text{ }^{\circ}\text{C per min}$ and held at this temperature for 5 min. In addition, the column was heated up to $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ at a rate of $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ and, finally, kept at $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 min. The total running time was 60 min. The mass spectra were recorded in the SCAN mode in a range from 30 to $400\ m/z$ using electron ionization energy at 70 eV and the detector temperature was set to $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ [11]. The GC-MS structure analysis was performed using the National Institute Standard and Technology (NIST) database; in addition, the results were compared with results from previous studies available in the literature [20,21].

2.5. Gene Expression of Anti-Inflammatory Cytokines on Peritoneal Macrophages Stimulated with Aqueous Extracts and Challenged with Lipopolysaccharide

To evaluate the anti-inflammatory effects of aqueous extracts of *E. cardamomum* and *C. longa*, murine macrophages were challenged with lipopolysaccharide (LPS; *Escherichia coli* serotype O26:B6 smooth strain) to induce a classical activation phenotype [22]. Relative quantification of proinflammatory cytokine gene sequences IL-4, IL-6, IL-10, and TNF- α induced by aqueous extracts of *E. cardamomum* and *C. longa*, as well as LPS, were measured by real-time quantitative PCR (RT-qPCR) using SYBR[®] Green reagent.

2.5.1. Obtaining Peritoneal Cells

Five female Balb/C mice were inoculated intraperitoneally (IP) with $1\ \text{mL}$ of DMEM, then sacrificed by cervical dislocation, and a gentle massage of the abdomen was performed. The culture medium with the cells in the peritoneal fluid was extracted and centrifuged at 2700 rpm ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) for ten minutes, eliminating the supernatant and conserving the cell pellet, which was homogenized with the aqueous extract individually (Table 1). Finally, it was incubated for 30 min at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\text{CO}_2\ 5\%$), centrifuged, and the supernatant was eliminated [23]. Two washes were performed with phosphate buffer (PBS, pH 7.4) and then homogenized with $500\ \mu\text{L}$ of RNazol[®]. As an inducer of inflammation in macrophages, $50\ \mu\text{g/mL}$ of LPS was used as a positive control [24]. The concentrations of the extracts were obtained from microbicidal assays in which these concentrations were used (data not shown).

Table 1. Concentrations of aqueous extracts evaluated.

Aqueous Extract	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)
<i>E. cardamomum</i>	100
<i>C. longa</i>	70

2.5.2. RNA Extraction

Extraction of total ribonucleic acid (RNA) from peritoneal macrophages was performed from samples suspended in the cell lysis reagent RNAzol[®], guanidine thiocyanate. Subsequently, total RNA extraction was performed according to the manufacturer's instructions. Once the total RNA pellet was obtained, it was suspended in 20 μL of nuclease-free water obtained by DEPC treatment. The total RNA pellet obtained was quantified in a NanoDrop[™] ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA) at optical densities (OD) of 260 and 280 nm; for this purpose, total RNA was suspended in 20 μL of nuclease-free water. The extraction purity and concentration showed a variation of 1.98 and 2.09 and a concentration ranging from 485.45 to 940.39 ng/ μL for each of the triplicates [24].

2.5.3. Complementary DNA (cDNA) Synthesis

From the previously obtained total RNA, complementary DNA (cDNA) synthesis was performed using the ImProm-II[™] Reverse Transcription System reverse transcription kit. For each reaction, 4 μL of ImProm-II[™] 5X reaction buffer, 1 μL of the dNTP's mixture (0.5 mM of each), 2.4 μL of MgCl_2 (25 mM), 1 μL of Oligo(dT)₁₅ primer, 1 μL of ImProm-II[™] transcriptase, 1500 ng of RNA quencher, and nuclease-free water were mixed to a final volume of 20 μL . The reactions were carried out in 200 μL capacity microtubes. The prepared samples were incubated in a thermal cycler (Veriti[®], Applied Biosystems[®], Waltham, MA, USA) to carry out cDNA synthesis, the reaction conditions used were as follows: 25 °C (5 min), 42 °C (60 min), 70 °C (15 min), and 4 °C (∞). Once the retrotranscription was completed, the concentration and purity of the cDNA obtained were determined using an EPOCH[™] microplate spectrophotometer (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) with the Gen5 software for microplate reading and data analysis. Finally, the products obtained were stored at -80 °C until further use.

2.5.4. Oligonucleotide Design

The design of oligonucleotides for the quantification of cytokines (IL-4, IL-6, IL-10, and TNF- α) and endogenous genes (β -actin and Gpd-1) was performed from the mRNA sequence of each gene, obtained from Genbank. (Table 2). The oligonucleotides for the amplification of the eight selected sequences were designed using the Primer Quest[™] Tool online program from IDT[™] (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA, USA), which was responsible for performing the synthesis of the oligonucleotides used in this project. The oligonucleotides were designed according to the following specifications: approximate size of 20 bp, melting temperature of 60 °C, and a guanine-cytosine content of 55%. The oligonucleotides obtained were analyzed using the PRIMER BLAST program to verify their specificity with the sequence of interest.

Table 2. Sequences of oligonucleotides used for RT-qPCR.

Gene	Genebank ID	Oligonucleotides
IL-4	NM_021283.2	F: 5' TTG AGA GAG ATC ATC GGC ATT T -3' R: 5' CTC ACT CTC TGT GGT GTT CTT C -3'
IL-6	NM_031168.2	F: 5' CTT CCA TCC AGT TGC CTT CT -3' R: 5' CTC CGA CTT GTG AAG TGG TAT AG -3'
IL-10	NM_010548.2	F: 5' TTG AAT TCC CTG GGT GAG AAG -3' R: 5' TCC ACT GCC TTG CTC TTA TTT -3'
Gpd1	NM_010271.3	F: 5' CCT ACT GCT GAC CTT TCT TCT C -3' R: 5' GCC CTG AGG ACG ATA AAC TAT AA -3'
TNF- α	NM_013693.3	F: 5' TTG TCT ACT CCC AGG TTC TCT -3' R: 5' GAG GTT GAC TTT CTC CTG GTA TG -3'
β -actin	NM_07393.5	F: 5' - GAG GTA TCC TGA CCC TGA AGT A -3' R: 5' - CAC ACG CAG CTC ATT GTA GA -3'

F: Forward; R: Reverse.

2.5.5. Real Time—qPCR (RT-qPCR)

Quantification of gene expression by RT-qPCR was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, which consisted of subtracting the threshold cycle (Ct) of the endogenous gene (Gpd1) from the Ct of the gene of interest, thus obtaining the ΔCt , then the average ΔCt of the control group was obtained and this was subtracted from the ΔCt of each of the biological samples, thus calculating the $\Delta\Delta Ct$, and, finally, the formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ was applied. The Ct was determined based on the default baseline assigned by the system [25]. The amplification reaction was performed using the GoTaq[®] qPCR Master Mix kit at a final volume of 20 μ L for each sample, including 10 μ L of the GoTaq qPCR Mix (2x), 1 μ L of the oligonucleotide pair of interest that (100 μ M), 1 μ L of the cDNA of interest (75 ng), and, finally, the reaction was completed with 8 μ L of nuclease-free water. The qPCR reactions were carried out in a 96-well PCR microplate (Axygen Scientific[®], Union City, CA, USA) coated with Platamax[®] UltraClear Sealing Film (Axygen Scientific[®], Union City, CA, USA). Each sample was placed in triplicate in the plate and, in addition, a control reaction was included, which consisted of adding all the reagents used to perform the amplification reaction except cDNA.

2.6. Index of Cytotoxicity of the Aqueous Extract of *E. cardamomum* and *C. longa* on Cell Cultures

For the evaluation of cytotoxicity of the aqueous extracts of *E. cardamomum* and *C. longa*, three cell lines were used, cervical cancer (HeLa, ATCC CCL-2), mouse macrophages (J774A.1, ATCC TIB-67), and African green monkey kidney (Vero E6, ATCC CRL-1586). All cells were maintained in RPMI-1640 medium, which contained L-glutamine, 10% FBS, and antibiotic/antifungal (penicillin, streptomycin, and amphotericin B), and were kept in incubation at 37 °C (5% CO₂) in Corning[®] 25 cm² cell culture flasks (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Medium changes were carried out every third day. Passages were made when the cells reached approximately 80% confluence. Next, 100 μ L of culture medium containing 5×10^4 cells/well of each cell line were placed in a 96-well microplate and the different serial concentrations of the aqueous extract of *E. cardamomum* and *C. longa* were added, ranging from 3.125 to 200 μ g/mL (200 μ L final volume), which were then incubated for 24 h. A positive control (nystatin 100,000 μ L/mL) and negative control (cells without treatment) were also included. Once the treatment time with the extracts was fulfilled, the MTT colorimetric test was carried out [23]. The culture medium was extracted and, subsequently, the plates were washed with PBS and 100 μ L of tetrazolium salt MTT was added in 0.25 mg/mL to the non-supplemented medium. The plates were incubated at 37 °C/4 h. After that time, the supernatant was removed and 100 μ L of DMSO + 20 μ L of glycine buffer was added and incubated for 30 min to allow the formazan crystals to dissolve [26]. Subsequently, the absorbance was read on an EPOCH[™] microplate reader at 570 nm and was analyzed with Gen5 software. Similarly, the same tests were performed on mouse (Balb/C) peritoneal macrophages to observe changes or differences that could

be found between commercial and ex vivo cells. Percentage of cytotoxicity was calculated according to Equation (2) and the IC₅₀ was determined [18].

$$\% \text{ Cytotoxicity} = \left(\frac{\text{Abs of the sample}}{\text{Abs control}} \right) \times 100 \quad (2)$$

2.7. Nitric Oxide Assay

To perform the nitric oxide (NO) assay, peritoneal cells were cultured for 22 h with 100 µg/mL of aqueous extract of *E. cardamomum* and 70 µg/mL of aqueous extract of *C. longa*. As an inflammation model, 50 ng/mL of LPS from *E. coli* O26:B6 smooth strain was used to induce a classical activation phenotype associated with an inflammatory process by NO production, determined by nitrite accumulation in the supernatant using Griess reagent [27].

2.8. Statistical Analysis

All results were expressed as mean value ± standard deviation. Each experiment was performed in triplicate independently in at least three replicates. The IBM-SPSS software (Ver. 22, IBM Corp., Armonk, NY, USA) was used for the statistical evaluation of the results obtained. For that purpose, a one-way analysis of variance (ANOVA) at a 95% confidence level and a Tukey post hoc test was applied. GraphPad Prism 6 was used to generate the graphs. The half-maximal effective concentration (EC₅₀) was determined by the Probit test.

3. Results

3.1. Phytochemical Tests

The aqueous extract of *E. cardamomum* was positive for sterols, triterpenes, flavonoids, sesquiterpene lactones, and tannins. The extract of *C. longa* was positive for sterols, triterpenes, flavonoids, and sesquiterpene lactones (Table 3). Both extracts were negative for quinones. The extraction yields were 5.64% and 9.83%, respectively.

Table 3. Phytochemical tests.

Test	Chemical Groups	<i>E. cardamomum</i>	<i>C. longa</i>
Lieberman Burchard	Sterols, triterpenes	+	+
Shinoda	Flavonoids	+	+
Baljet	Sesquiterpene lactones	+	+
Sulfuric acid	Quinones	–	–
Ferric chloride	Tannins	+	–
Yield %		5.64	9.83

+ Positive reaction; – negative reaction.

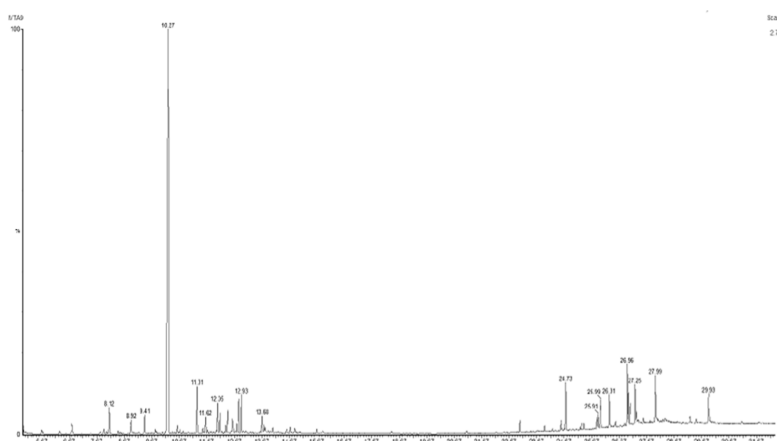
3.2. Compound Identification

To identify the compounds of interest, GC-MS/MS-based phytochemical analysis of the aqueous extracts was performed (Table 4); the analyses resulted in the identification of 11 major compounds in *E. cardamomum*, the α-terpinyl acetate, 2-((1R,4R)-4-hydroxy-4-methylcyclohex-2-enyl) propan-2-yl acetate, 9-hexacosene, heneicosane, 8-acetoxycarvotanacetone, geranyl oleate, γ-sitosterol, naphthalene, decahydro-4a-methyl-1-methylene-7-(1-methylethenyl)-, [4aR-(4αα,7α,8αα)], α-terpineol, (Z)-3,7-dimethylocta-2,6-dien-1-yl palmitate, and pentacosane (Figure 1a). In *C. longa*, β-turmerone, α-turmerone, Ar-turmerone, 16-kauren-19-yl acetate, α-atlantone, β-sesquiphellandrene, and benzene were identified (Figure 1b). The compounds identified in both aqueous extracts represent the bioactive compounds previously reported for both plants [11].

Table 4. Main chemical composition of aqueous extracts of two *Zingiberaceae* plants identified by GC-MS/MS.

Plant Extract	Chemical Compound	R.T.	P.A. %	M.W. (g/mol)
<i>E. cadamomum</i> (Cardamom)	α -terpinyl acetate	10.27	54.46	196.29
	2-((1R,4R)-4-hydroxy-4-methylcyclohex-2-enyl)propan-2-yl acetate	11.31	3.55	212.28
	9-hexacosene	26.96	3.52	364.69
	γ -sitososterol	29.93	3.38	414.71
	Heneicosane	24.73	3.04	296.57
	8-acetoxycarvotanacetone	12.93	2.57	210.27
	Geranyl oleate	27.24	2.28	418.70
	(Z)-3,7-dimethylocta-2,6-dien-1-yl palmitate	26.31	2.08	392.70
	Naphthalene, decahydro-4a-methyl-1-methylene-7-(1-methylethenyl)-, [4aR-(4a α ,7 α ,8a α)]-	12.05	2.03	204.35
	α -terpineol	8.12	1.95	154.25
	Pentacosane	25.99	1.85	352.68
<i>C. longa</i> (Turmeric)	β -turmerone	15.51	33.45	218.33
	α -turmerone	15.95	21.30	218.33
	Δ^8 -turmerone	15.57	19.85	216.32
	16-kauren-19-yl acetate	27.08	18.72	330.26
	α -atlantone	16.80	2.77	218.33
	β -sesquiphellandrene	13.84	1.98	204.35
	Benzene	13.31	1.93	78.11

R.T.: retention time; P.A. %: peak area percent; M.W.: molecular weight.



(a)

Figure 1. Cont.

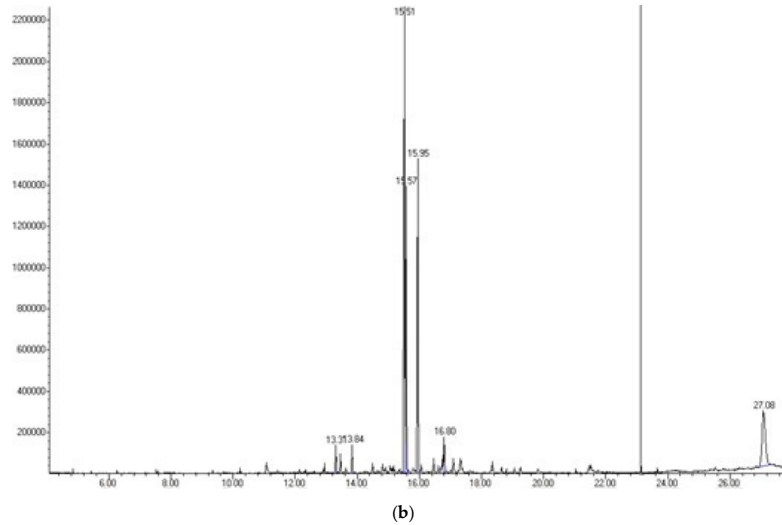


Figure 1. Chromatograms obtained from GC-MS screening of the aqueous extracts of *E. cardamomum* seeds (a), and *C. longa* roots (b).

3.3. Gene Expression of Anti-Inflammatory Cytokines

The gene expression levels of the anti-inflammatory cytokines, IL-4 ($p < 0.01$) and IL-10 ($p < 0.001$), were analyzed to evaluate whether the aqueous extracts have an immunomodulatory effect on the expression of cytokines that regulate or promote inflammatory processes in peritoneal macrophages by using LPS as inflammation control (Table 5).

Table 5. Cytokines gene expression.

Cytokine	<i>C. longa</i>	<i>E. cardamomum</i>	LPS
IL-4	5.07 ± 1.6	0.30 ± 0.185	0.00
IL-6	2.21 ± 0.04	1.05 ± 0.012	5.61 ± 0.284
IL-10	1.84 ± 0.87	2.02 ± 0.026	0.90 ± 0.073
TNF- α	1.46 ± 0.97	0.086 ± 0.070	4.59 ± 2.132

A significant increase in IL-10 gene expression level (Figure 2a) was observed with *C. longa* extract compared to *E. cardamomum* ($p \leq 0.05$), as well as the same degree of significance compared to LPS ($p \leq 0.01$); however, when IL-4 gene expression was analyzed, highly significant differences were observed between both aqueous extracts ($p < 0.01$) and highly significant differences ($p \leq 0.001$) were also observed between the LPS control and both extracts (Figure 2b). These results suggest that after induction with LPS, the extracts exhibited a decrease in the inflammatory process produced by bacterial endotoxins (LPS), therefore, we can consider those extracts as modulators in inflammatory processes in the presence of Gram-negative microorganisms.

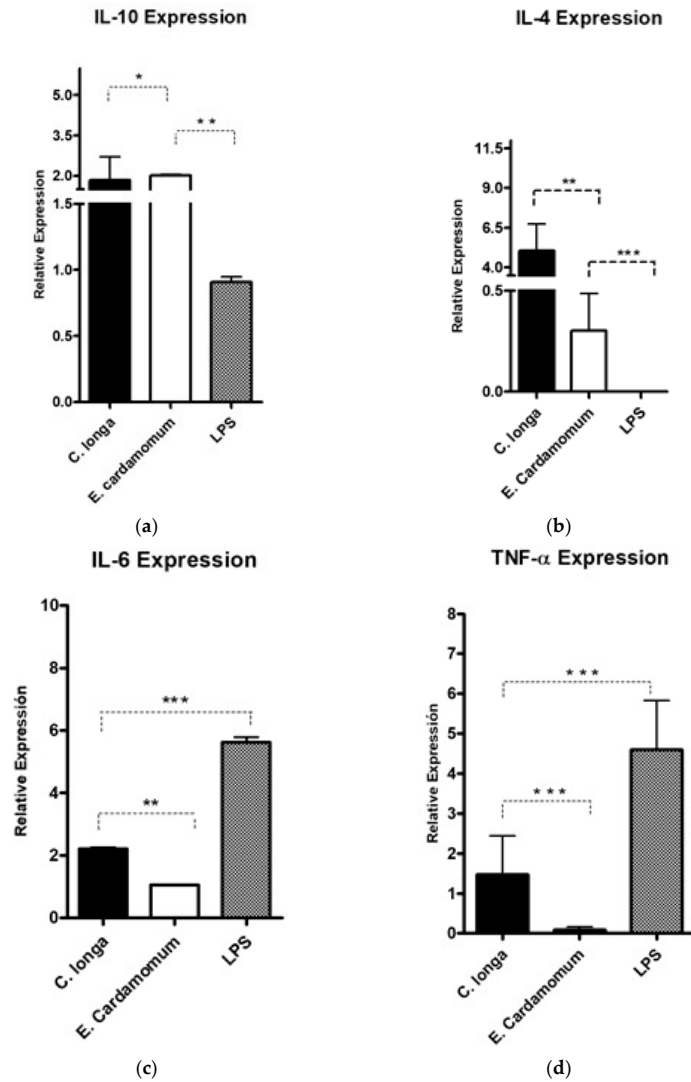


Figure 2. Gene expression of pro-inflammatory cytokines IL-10 (a), IL-4 (b) IL-6 (c), and TNF- α (d) in peritoneal macrophages stimulated by aqueous extracts of *E. cardamomum* and *C. longa*, challenged with LPS. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Highly significant ($p < 0.001$) decreases in the gene expression levels of proinflammatory cytokines IL-6 (Figure 2c) induced by aqueous extracts of both plants compared to LPS were observed (Table 5). Similar results were obtained for TNF- α (Figure 2d), which is a potent proinflammatory interleukin, observing highly significant decreases ($p \leq 0.001$) for the treatments of each of the extracts with respect to the LPS control. The results presented in Figure 2 and Table 5 reveal that the extracts evaluated decreased the gene expression of proinflammatory cytokines, showing differences in expression in relation to

that produced by LPS, which makes them potential natural active ingredients to reduce inflammatory processes.

3.4. Cytotoxic Activity of the Aqueous Extract

For the evaluation of the cytotoxicity of aqueous extracts of *E. cardamomum* and *C. longa*, three cell lines, HeLa, J774A.1, and Vero E6, and peritoneal cells of female Balb/C mice were used (Table 6). A dose–response relationship was observed, as cytotoxicity enhanced as the concentrations of the extracts increased. However, no high activity was observed against the cell lines or in peritoneal cells at the concentrations tested; *E. cardamomum* presented EC₅₀ higher than 321.20 µg/mL on the three cell lines tested, while the EC₅₀ of *C. longa* was higher than 190.79 µg/mL. *E. cardamomum* was the most active on J774A.1 (EC₅₀ 237.36 µg/mL) and Vero E6 (EC₅₀ 257.51 µg/mL), while *C. longa* was more effective on HeLa (EC₅₀ 351.17 µg/mL). No differences were observed between the activities of the aqueous extracts when evaluated in peritoneal macrophages.

Table 6. Cell cytotoxicity assay.

Concentration µg/mL	Cell Cytotoxicity Percent (%)							
	<i>Elettaria cardamomum</i>				<i>Curcuma longa</i>			
	HeLa	J774A.1	Vero E6	Balb/C Peritoneal Cells	HeLa	J774A.1	Vero E6	Balb/C Peritoneal Cells
3.125	8.26 ^a	4.11 ^a	4.14 ^a	11.73 ^a	2.18 ^a	11.74 ^a	8.34 ^a	2.18 ^a
6.25	10.17 ^a	10.28 ^b	4.57 ^a	14.07 ^a	8.23 ^b	14.06 ^a	10.18 ^a	8.23 ^b
12.5	13.03 ^a	13.73 ^b	8.39 ^b	14.33 ^a	9.59 ^b	14.35 ^a	19.03 ^b	9.59 ^b
25	13.51 ^a	22.26 ^c	12.71 ^b	16.23 ^a	13.85 ^b	16.24 ^a	21.76 ^b	13.85 ^b
50	19.47 ^b	31.31 ^c	13.04 ^b	17.60 ^a	14.63 ^b	17.62 ^{ab}	22.44 ^b	14.63 ^b
100	20.58 ^b	37.94 ^c	19.54 ^c	20.37 ^{ab}	22.16 ^c	20.39 ^{ab}	25.81 ^b	22.16 ^c
200	21.93 ^b	45.33 ^d	35.21 ^d	27.20 ^b	22.92 ^c	27.21 ^b	26.41 ^b	22.92 ^c
EC ₅₀ µg/mL	424.01	237.36	257.51	431.16	351.17	430.96	396.24	362.86
LL	372.09	190.79	191.02	287.35	321.20	381.60	349.78	269.66
UL	473.84	261.68	301.23	582.74	382.14	480.33	442.71	509.85
EC ₉₀ µg/mL	890.09	423.17	436.37	838.33	721.65	957.64	931.97	705.80
LL	811.96	412.91	402.75	690.10	705.80	934.98	905.02	596.56
UL	988.53	434.32	478.67	983.15	757.78	982.90	962.03	831.34

The table shows the mean EC₅₀ and EC₉₀. The lower (LL) and upper limits (UL) are shown. Different letters in each column represent significant differences between the groups analyzed via the Tukey post hoc test.

3.5. Nitric Oxide Depletion in Peritoneal Macrophages

NO production was measured as an indicator of inflammation in peritoneal macrophages. Nitric oxide production averaged 22.12, 18.64, 10.91, and 7.45 µM nitrite for macrophages stimulated with LPS, LPS plus *E. cardamomum* extract, *E. cardamomum* extract alone, and without stimulation, respectively, while for *C. longa*, the results were 22.27, 16.97, 8.03, and 6.73 µM nitrite under the same treatments, showing significant differences ($p < 0.001$) when macrophages were incubated with 50 ng/mL LPS to induce an activation state (Figure 3).

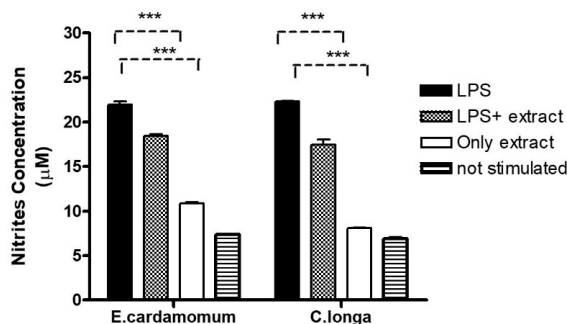


Figure 3. Nitric oxide production in peritoneal macrophages stimulated with 100 µg/mL of aqueous extracts of *E. cardamomum*, and 70 µg/mL of *C. longa*, challenged with 50 µg/mL of LPS. *** $p < 0.001$.

4. Discussion

The use and evaluation of the traditional folk plants *E. cardamomum* and *C. longa* in terms of their anti-inflammatory activities have been remarkable because of the positive results obtained in several studies where these plants have been used to reduce the symptoms of various chronic inflammatory diseases [28]. In the development of such research, numerous bioactive compounds present in its essential oils have been identified, which differ in proportions and presence depending on the region where the plant was collected, the time of collection, or the type of extraction [13]. In the chemical characterization of *E. cardamomum* and *C. longa*, a series of major compounds were identified in the crude extracts of both plants, which largely comprise the composition of their essential oils, showing their participation in the immune response by acting as mediators in the synthesis of key factors of the immune response [29].

In the present investigation, the compounds identified as major in *E. cardamomum* have been previously reported as components of its essential oils [30]. We determined the anti-inflammatory activity of the aqueous extract of this plant, which coincides with previous reports [13], and while this activity is justified by the compound 1,8-cineole, this was not one of the majority compounds of the crude extract obtained by us. Instead, the combined activity of the compounds 9-hexacosene, α -terpinol, and linalool represents an alternative option for bioactive compounds with anti-inflammatory activity derived from this plant. Previous reports demonstrated the activity of 9-hexacosene in reducing the size of edema in mouse ears, induced by dimethylbenzene [31]; on the other hand, the ability of α -terpinol to suppress pro-inflammatory mediators generating an inhibition of IL-6 has been identified [32]. Similarly, in previous works, it was reported that linalool generates a reduction of TNF- α in addition to an inhibition of neutrophil activation [33]. Regarding the compound α -terpenyl acetate, the major compound in our *E. cardamomum* extract, it has not been previously associated with anti-inflammatory activity. Although this compound has been previously reported in plants with anti-inflammatory activity [13,34–36], including the plant under study, there is a lack of evaluations demonstrating such activity, which represents an opportunity to consider for future research because, in *E. cardamomum*, this is a majority compound of its essential oils.

The compounds identified as major in the aqueous extract of *C. longa* have been previously reported [37]. Meanwhile, the anti-inflammatory activity exhibited by this plant has been generally associated with curcuminoids, specifically curcumin [38]. However, curcuminoids were not identified in our aqueous extract of *C. longa*; instead, turmerones (AR, α , and β) were identified as major compounds, which have not received extensive investigation in regards to their anti-inflammatory activity. In this regard, there have been some reports of the anti-inflammatory properties of turmeric essential oils [29], where Ar-turmerone and β -sesquiphellandrene have been reported as the main components

considered responsible for such activity [39], specifically the ability of Ar-turmerone to inhibit the production of INF- γ and IL-2 [40]. Thus, it is possible to demonstrate the ability to induce the expression of anti-inflammatory interleukins and inhibition of pro-inflammatory interleukins, justifying the use of extracts from *C. longa* or *E. cardamomum* as a treatment for inflammatory conditions.

Different research demonstrated the close relationship between food and health, highlighting the benefits of vitamins, minerals, fatty acids, probiotics, prebiotics, or phytochemicals in fighting various diseases [41]. Among them, the role of substances of plant origin, such as carotenoids, phenolic compounds, alkaloids, nitrogen, and organosulfur compounds, should be marked for their demonstrated influence on the immune system [42].

Some of the immune processes that take place when infections occur are mainly the excessive production of proinflammatory cytokines, including IL-6, IFN- γ , IL-1b, and TNF- α . Such expression has been closely related to apoptosis-inducing inflammatory processes in animal models [25]. Neutrophil infiltration can lead to damage stimulated by oxidative stress, which increases inflammation and activation of nuclear factor-kappa beta (NF- κ B)-dependent pathways. NF- κ B induces the production of cyclooxygenase 2 (COX-2), which promotes the production of prostaglandins and other inflammatory agents of the metabolic pathway involved in inflammatory diseases [43]. The presence of the enzyme inducible nitric oxide synthase (iNOS) and COX-2 induces damage associated with excessive production of reactive oxygen species (ROS) and suppression of the antioxidative and defense system [44]. The regulation of iNOS for nitric oxide production will determine whether this will be associated with damage or repair [24]. Some reports have indicated that, in the case of inflammatory processes, chronic inflammation is largely due to uncontrolled production of nitric oxide (NO) by mucosal cells—in this situation nitric oxide may not be properly regulated by iNOS [45]. The arginine pathway plays an important role in tissue repair as L-arginine is converted to an amino acid after tissue injury. Some studies have indicated that arginine increases collagen deposition and tear strength (effects that contribute to epithelial repair and arginase repair functions associated with inflammatory processes); this enzyme inhibits nitric oxide synthesis, resulting in limited intracellular L-arginine supply to produce reactive nitrogen species (RNS) [46], decreasing mucosal damage, such as oral.

In a study conducted in hamsters in which an inflammatory process was induced through local lacerations and a potent inflammatory agent such as 5-fluorouracil, it was observed that daily topical treatment with extracts of *Calendula officinalis* on days 12 to 17 after the inflammatory induction reduced the clinical severity of the disease in a concentration-dependent manner, compared to animals treated only with the vehicle—this is another example of how natural extracts are a good option in the management of lesions [47]. Another study demonstrated the anti-inflammatory effect of chamomile extracts by inhibiting the expression of IL-1 β and TNF- α cytokines in an animal model, with data like those observed in our research; however, they could also prove it at the histopathological level, supporting the idea of the use of plant extracts as possible natural candidates in the management of inflammatory processes [48]. In another study, the anti-inflammatory effect of cardamom extracts was demonstrated by inhibiting the action of macrophages producing proinflammatory cytokines such as IL-1 β , TNF- α , and IL-8 through the effect of LPS from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* [13]. On the other hand, using a mouse peritoneal macrophage model, the ability of an aqueous extract of cardamom to attenuate IL-6 and TNF- α secretion was demonstrated [49]. It has been suggested that the anti-inflammatory activity of cardamom extracts reported by other authors is related to the presence of phytochemical agents in high amounts, in this case to 1,8-cineole (eucalyptol), since this compound has also been shown to attenuate LPS-induced inflammatory signaling pathways in the lung by alveolar macrophages [50].

The present investigation found a positive response of almost 6 relative units of expression for IL-6. The technique was proved valid by positive controls in alpaca enterocytes, which indicated its scarce participation as an inducer of the acute phase of inflammation

where leukocytes participate—IL-6 has anti-inflammatory as well as pro-inflammatory effects by regulating the expression of other pro-inflammatory cytokines and, in addition, it induces the synthesis of glucocorticoids [51]. Quantification of cytokine and receptor mRNA was performed by RT-qPCR, from which the results showed positive responses, specifically of *C. longa* concerning IL-10, which is the interleukin responsible for regulating and decreasing the inflammatory response produced by dendritic cells and macrophages, and also for reducing the adaptive responses of CD4 T cells and IL-4, which is a cytokine that acts as an anti-inflammatory by blocking the synthesis of IL-1, TNF- α , IL-6, and macrophage inflammatory protein [52]. The proinflammatory activity of INF- γ , which is produced in T cells and activated NK cells, was also observed. It potentiates the effects of type I interferons released by Th1, which regulates leukocytes at the site of infection, giving rise to inflammation [53]. As for IL-6, the results dictate a positive response since this interleukin shows anti-inflammatory as well as pro-inflammatory activity [54]. In addition, the extract also influenced the proinflammatory cytokine TNF- α , which also leads to the recruitment of inflammatory cells.

Several in vitro studies in human cell lines have demonstrated the cytotoxic capacity of several natural extracts [55,56] such as curcuminoids [16]. Different components of *Zingiberaceae* plants can suppress the activity of some common mutagens and carcinogens in various cell types in both in vitro and in vivo studies. The cytotoxic effects of methanol extracts and their fractions (hexane, ethyl acetate, and water) of *Alpinia mutica* rhizomes against six human carcinoma cell lines (KB, MCF7, A549, Caski, HCT116, HT29) and the non-human fibroblast cell line (MRC 5) are currently known as a result of an in vitro cytotoxicity assay [57]. In two studies on colon and prostate cancer, curcumin from *C. longa* inhibited cell proliferation and tumor growth [58]. In addition, curcumin is a nonmutagenic and nongenotoxic agent [15]. Although the cytotoxic activity of curcuminoids is known, in this research, promising results were observed in terms of anti-inflammatory activity, but no cytotoxic activity was observed in HeLa, J774A.1, Vero E6, and peritoneal cell lines, as the EC₅₀ values found were higher than 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and EC₉₀ values were higher than 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively, for all assays evaluated (Table 6).

Currently, there is a growing interest in both industry and scientific research on spices and aromatic herbs due to their strong antioxidant powers and antimicrobial properties—both natural and synthetic antioxidants are currently being used. In some of these studies, microbicidal activity against *Streptococcus mutans* was observed with an increase of nitric oxide in RAW 264.7 macrophages stimulated with extracts of *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris*, and *C. longa* [59]. Another study showed that curcumin at a dose of 0.5 ppm induced polarization to an M2 phenotype or alternating activation with anti-inflammatory characteristics in peritoneal macrophages, although at higher doses this phenotype was lost and they observed increased expression at the level of Arg-1 transcripts, which is a competitor of L-Arginine against iNOS enzymes [60]. When we stimulated macrophages with LPS in the presence of the extracts, nitrite production decreased, in addition to the fact that the extract alone induced little nitrite production without stimulation in both aqueous extracts. These data suggest the anti-inflammatory effect of the extracts alone or in combination with LPS (Figure 3). At the moment, the modulatory effects of turmeronole A and B (plant components of the *C. longa*) on RAW 264.7 cells in inflammatory processes are known—they significantly inhibited LPS-induced prostaglandin E (PgE) and NO production, as well as the expression of iNOS and the gene encoding PgE. In addition, turmeronols significantly inhibited the overexpression of transcripts encoding IL-1 β , IL-6, and TNF- α at the mRNA and protein level induced by LPS [61].

In addition, several investigations carried out with the main components in plants of this family have demonstrated their antioxidant capacity against the DPPH radical in comparison with Trolox and ascorbic acid—among the most important ones are α -turmerone, β -turmerone, and Ar-turmerone [62]. In an investigation to evaluate the hepatoprotective effect of an extract of *Amomum cardamomum* on carbon-tetrachloride-induced liver damage through antioxidant activity in rats, it was found to possess significant hepatoprotective

activity on acute liver injury, which could be derived from its antioxidant properties and the decrease of liver cytochrome P450 [63]. In general, it can be stated that the pharmaceutical properties of plants of the *Zingiberaceae* family are related to their chemical composition; this is mainly due to the presence of phenolic compounds and other biologically active constituents [11]. In addition to anticancer, antioxidant, and free radical scavenging effects, these plants possess the capacity to indirectly increase glutathione levels, thus aiding in the hepatic detoxification of mutagens and carcinogens and inhibiting the formation of nitrosamines [58].

We think that the results presented in this manuscript may be sufficient to infer the anti-inflammatory effects of the extracts in question, given that several investigations have provided evidence such as those presented in this document—in the case of *E. cardamomum*, some authors have mentioned the anti-inflammatory properties [13,49] and for *C. longa*, some authors described these same effects through the suppression of NO and COX [64,65].

5. Conclusions

Under the experimental conditions analyzed and based on the results obtained in the tests performed in this research, the anti-inflammatory effects of *E. cardamomum* and *C. longa* were evidenced. The aqueous extracts of cardamom and turmeric showed elevated expression of interleukins, suggesting their possible anti-inflammatory or immunomodulatory action. As for the cytotoxic action, a dose–response relationship was observed, since as the concentration increased, the cytotoxic activity increased. The concentrations evaluated (from 3.125 to 200 µg/mL) showed no activity against HeLa, J774A.1 and Vero E6 cell lines. In future research, we expect to continue with more studies to identify the molecular mechanisms of action that favors the use of these plants as complementary alternatives in inflammatory processes in order to develop alternative or adjuvant therapies, as well as safe applications of cardamom and turmeric, which could bring several benefits, such as cost reduction compared to existing products, in addition to contributing to the ethno-pharmacological development for the safe use of folk traditional plants.

Author Contributions: Conceptualization, O.E.R.L. and R.A.P.H.; correspondence, U.C.V. and O.E.R.L.; methodology, S.M.L.V. and A.F.B.R.; software, J.R.R. and R.A.P.H.; validation, R.M.S.C., A.C.M., and A.F.B.R.; formal analysis, G.R.C.G. and A.C.M.; investigation, A.J.M.D.; resources, S.M.L.V.; data curation, J.H.E.L. and U.C.V.; writing—original draft preparation, G.R.C.G. and O.E.R.L.; writing—review and editing, O.E.R.L. and J.H.E.L.; visualization, S.M.L.V.; supervision, J.R.R.; project administration and funding acquisition, O.E.R.L. and R.A.P.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the National Council of Science and Technology (CONACYT, Mexico), grant number 958507, as well as the Support Program for Scientific and Technological Research (PAICYT-UANL 2021), and the Professional Development Program for Higher Education (PRODEP). This publication was also supported by the Institutional Open Access Program (IOAP) of the Tecnológico de Monterrey.

Institutional Review Board Statement: The laboratory animal study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Ethics Committee of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny, Autonomous University of Nuevo León protocol code 02/21-2021 (July of 2021).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this research are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: We thank the personnel of the Laboratory of Analytical Chemistry (Faculty of Biological Sciences, Autonomous University of Nuevo León) and the Laboratory of Microbiology (Faculty of Dentistry, Autonomous University of Nuevo León) for their valuable technical assistance during the present investigation.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Sánchez-Ramos, M.; Alvarez, L.; Romero-Estrada, A.; Bernabé-Antonio, A.; Marquina-Bahena, S.; Cruz-Sosa, F. Establishment of a cell suspension culture of *ageratina pichinchensis* (Kunth) for the improved production of anti-inflammatory compounds. *Plants* **2020**, *9*, 1398. [CrossRef] [PubMed]
- Elizondo-Luévano, J.H.; Castro-Ríos, R.; Sánchez-García, E.; Hernández-García, M.E.; Vargas-Villarreal, J.; Rodríguez-Luis, O.E.; Chávez-Montes, A. In vitro study of antiameobic activity of methanol extracts of *argemone mexicana* on trophozoites of *entamoeba histolytica* HM1-IMSS. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* **2018**, *2018*, 7453787. [CrossRef] [PubMed]
- Frencken, J.E.; Sharma, P.; Stenhouse, L.; Green, D.; Laverty, D.; Dietrich, T. Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis—A comprehensive review. *J. Clin. Periodontol.* **2017**, *44*, S94–S105. [CrossRef]
- Soehnlein, O.; Steffens, S.; Hidalgo, A.; Weber, C. Neutrophils as protagonists and targets in chronic inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **2017**, *17*, 248–261. [CrossRef]
- Konkel, J.E.; O’Boyle, C.; Krishnan, S. Distal consequences of oral inflammation. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1403. [CrossRef]
- Scannapieco, F.A.; Cantos, A. Oral inflammation and infection, and chronic medical diseases: Implications for the elderly. *Periodontology* **2016**, *72*, 153–175. [CrossRef] [PubMed]
- Rider, P.; Carmi, Y.; Cohen, I. Biologics for targeting inflammatory cytokines, clinical uses, and limitations. *Int. J. Cell Biol.* **2016**, *2016*, 9259646. [CrossRef] [PubMed]
- Cardoso, E.M.; Reis, C.; Manzanares-Céspedes, M.C. Chronic periodontitis, inflammatory cytokines, and interrelationship with other chronic diseases. *Postgrad. Med.* **2018**, *130*, 98–104. [CrossRef]
- Dini, M. Peptic ulcer disease and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Aust. Prescr.* **2017**, *40*, 91–93.
- Little, P. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and covid-19. *BMJ* **2020**, *368*, m1185. [CrossRef] [PubMed]
- Ivanović, M.; Makoter, K.; Razboršek, M.I. Comparative study of chemical composition and antioxidant activity of essential oils and crude extracts of four characteristic zingiberaceae herbs. *Plants* **2021**, *10*, 501. [CrossRef]
- Rajan, A.; Rajan, A.R.; Philip, D. *Elettaria cardamomum* seed mediated rapid synthesis of gold nanoparticles and its biological activities. *Open Nano* **2017**, *2*, 1–8. [CrossRef]
- Souissi, M.; Azelmat, J.; Chaieb, K.; Grenier, D. Antibacterial and anti-inflammatory activities of cardamom (*Elettaria cardamomum*) extracts: Potential therapeutic benefits for periodontal infections. *Anaerobe* **2020**, *61*, 102089. [CrossRef]
- Tanvir, E.M.; Hossen, M.S.; Hossain, M.F.; Afroz, R.; Gan, S.H.; Khalil, M.I.; Karim, N. Antioxidant properties of popular turmeric (*Curcuma longa*) varieties from Bangladesh. *J. Food Qual.* **2017**, *2017*, 8471785. [CrossRef]
- Soleimani, V.; Sahebkar, A.; Hosseinzadeh, H. Turmeric (*Curcuma longa*) and its major constituent (*curcumin*) as nontoxic and safe substances: Review. *Phyther. Res.* **2018**, *32*, 985–995. [CrossRef] [PubMed]
- Elizondo-Luévano, J.H.; Hernández-García, M.E.; Pérez-Narváez, O.A.; Castro-Ríos, R.; Chávez-Montes, A. Berberina, curcumina y quercetina como potenciales agentes con capacidad antiparasitaria. *Rev. Biol. Trop.* **2020**, *68*, 1241–1249. [CrossRef]
- White, C.M.; Pasupuleti, V.; Roman, Y.M.; Li, Y.; Hernandez, A.V. Oral turmeric/curcumin effects on inflammatory markers in chronic inflammatory diseases: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Pharmacol. Res.* **2019**, *146*, 104280. [CrossRef]
- Elizondo-Luevano, J.H.; Verde-Star, J.; González-Horta, A.; Castro-Ríos, R.; Hernández-García, M.E.; Chávez-Montes, A. In Vitro Effect of Methanolic Extract of *Argemone mexicana* against *Trichomonas vaginalis*. *Korean J. Parasitol.* **2020**, *58*, 135–145. [CrossRef]
- Parekh, J.; Chanda, S.V. In vitro antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plants. *Turkish J. Biol.* **2007**, *31*, 53–58.
- Bekinbo, M.; Tariah FS, A.; Dapper, D. Comparative GC-MS determination of bioactive constituents of the methanolic extracts of *Curcuma longa* rhizome and *Spondias mombin* leaves Bekinbo MT, Amah-Tariah FS and Dapper DV. *J. Med. Plants Stud.* **2020**, *8*, 1–6.
- Masoumi-Ardakani, Y.; Mandegary, A.; Esmailpour, K.; Najafipour, H.; Sharififar, F.; Pakravanan, M.; Ghazvini, H. Chemical composition, anticonvulsant activity, and toxicity of essential oil and methanolic extract of *Elettaria cardamomum*. *Planta Med.* **2016**, *82*, 1482–1486. [CrossRef]
- Salvesen, Ø.; Reiten, M.R.; Espenes, A.; Bakkebo, M.K.; Tranulis, M.A.; Ersdal, C. LPS-induced systemic inflammation reveals an immunomodulatory role for the prion protein at the blood-brain interface. *J. Neuroinflamm.* **2017**, *14*, 106. [CrossRef]
- Humberto, C.H.-M.; Ricardo, G.-F.; Patricia, T.-G.; Ramiro, Q.-L.; Mario, A.S.E.; Enriqueta, M.-C.; Reyes, T.-G.; Cristina, R.-P. Antitumor activity of *Pachycereus marginatus* (DC.) Britton Rose extracts against murine lymphoma L5178Y-R and skin melanoma B16F10 cells. *J. Med. Plants Res.* **2016**, *10*, 635–639. [CrossRef]
- Castillo-Velázquez, U.; Aranday-Cortés, E.; Gutiérrez-Pabello, J.A. Alternative activation modifies macrophage resistance to *Mycobacterium bovis*. *Vet. Microbiol.* **2011**, *151*, 51–59. [CrossRef] [PubMed]
- Nevárez-Garza, A.M.; Castillo-Velázquez, U.; Soto-Domínguez, A.; Montes-de-Oca-Luna, R.; Zamora-Ávila, D.E.; Wong-González, A.; Rodríguez-Tovar, L.E. Quantitative analysis of TNF- α IL-4, and IL-10 expression, nitric oxide response, and apoptosis in *Encephalitozoon cuniculi*-infected rabbits. *Dev. Comp. Immunol.* **2018**, *81*, 235–243. [CrossRef] [PubMed]
- Delgado, A.J.M.; Velázquez, U.C.; González, J.G.B.; Montes, A.C.; Villarreal, S.M.L.; García, L.E.V.; Casas, R.M.S.; Luis, O.E.R. Evaluation of the Essential Oil of *Citrus paradisi* as an Alternative Treatment against *Candida albicans*. *Open J. Stomatol.* **2020**, *10*, 258–270. [CrossRef]

27. Adler, B.; Adler, H.; Jungi, T.W.; Peterhans, E. Interferon- α primes macrophages for lipopolysaccharide-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *215*, 921–927. [[CrossRef](#)]
28. Chandran, B.; Goel, A. A randomized, pilot study to assess the efficacy and safety of curcumin in patients with active rheumatoid arthritis. *Phyther. Res.* **2012**, *26*, 1719–1725. [[CrossRef](#)]
29. Sandner, G.; Heckmann, M.; Weghuber, J. Immunomodulatory activities of selected essential oils. *Biomolecules* **2020**, *10*, 1139. [[CrossRef](#)]
30. Noumi, E.; Snoussi, M.; Alreshidi, M.M.; Rekha, P.D.; Saptami, K.; Caputo, L.; De Martino, L.; Souza, L.F.; Msaada, K.; Mancini, E.; et al. Chemical and biological evaluation of essential oils from cardamom species. *Molecules* **2018**, *23*, 2818. [[CrossRef](#)]
31. Githinji, C.G.; Mbugua, P.M.; Kanui, T.I.; Kariuki, D.K. Analgesic and anti-inflammatory activities of 9-Hexacosene and Stigmasterol isolated from *Mondia whytei*. *Phytopharmacology* **2012**, *2*, 212–223.
32. Nogueira, M.N.M.; Aquino, S.G.; Rossa, C.; Spolidorio, D.M.P. Terpinen-4-ol and alpha-terpineol (tea tree oil components) inhibit the production of IL-1 β , IL-6 and IL-10 on human macrophages. *Inflamm. Res.* **2014**, *63*, 769–778. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Abe, S.; Maruyama, N.; Hayama, K.; Ishibashi, H.; Inoue, S.; Oshima, H.; Yamaguchi, H. Suppression of tumor necrosis factor-alpha-induced neutrophil adherence responses by essential oils. *Mediat. Inflamm.* **2003**, *12*, 323–328. [[CrossRef](#)]
34. Hamdan, D.I.; Abdulla, R.H.; Mohamed, M.E.; El-Shazly, A.M. Chemical composition and biological activity of essential oils of cleopatra mandarin (citrus reshni) cultivated in Egypt. *J. Pharmacogn. Phyther.* **2013**, *5*, 83–90. [[CrossRef](#)]
35. Djouahri, A.; Boualem, S.; Boudarene, L.; Baaliouamer, A. Geographic's variation impact on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils from wood and leaves of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. *Ind. Crops Prod.* **2015**, *63*, 138–146. [[CrossRef](#)]
36. Valente, J.; Resende, R.; Zuzarte, M.; Gonçalves, M.J.; Lopes, M.C.; Cavaleiro, C.; Pereira, C.; Salgueiro, L.; Cruz, M.T. Bioactivity and safety profile of *Daucus carota* subsp. *maximus* essential oil. *Ind. Crops Prod.* **2015**, *77*, 218–224. [[CrossRef](#)]
37. Angel, G.R.; Menon, N.; Vimala, B.; Nambisan, B. Essential oil composition of eight starchy *Curcuma* species. *Ind. Crop. Prod.* **2014**, *60*, 233–238. [[CrossRef](#)]
38. Niranjana, A.; Prakash, D. Chemical constituents and biological activities of turmeric (*Curcuma longa* L.)—A review. *J. Food Sci. Technol.* **2008**, *45*, 109–116.
39. Liju, V.; Jeena, K.; Kuttan, R. An evaluation of antioxidant, anti-inflammatory, and antinociceptive activities of essential oil from *Curcuma longa* L. *Indian J. Pharmacol.* **2011**, *43*, 526–531. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Oh, S.; Han, A.R.; Park, H.R.; Jang, E.J.; Kim, H.K.; Jeong, M.G.; Song, H.; Park, G.H.; Seo, E.K.; Hwang, E.S. Suppression of inflammatory cytokine production by ar-turmerone isolated from *Curcuma phaeocaulis*. *Chem. Biodivers.* **2014**, *11*, 1034–1041. [[CrossRef](#)]
41. Guillamón, E. Effect of phytochemical compounds of the genus *Allium* on the immune system and the inflammatory response. *Ars Pharm.* **2018**, *59*, 185–196. [[CrossRef](#)]
42. Freire-González, R.A.; Vistel-Vigo, M. Caracterización fitoquímica de la curcuma. *Rev. Cuba. Quim.* **2015**, *27*, 9–18.
43. Dávila-Martínez, C.; Castillo-Velázquez, U.; Soto-Domínguez, A.; Nevárez-Garza, A.M.; Arce-Mendoza, A.Y.; Hernández-Vidal, G.; Zamora-Avila, D.E.; Rodríguez-Tovar, L.E. Immunohistochemical localization of TNF- α and IL-4 in granulomas of immunocompetent and immunosuppressed New Zealand white rabbits infected with *Encephalitozoon cuniculi*. *Cytokine* **2020**, *130*, 155055. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Koppula, S.; Kumar, H.; Kim, I.S.; Choi, D.K. Reactive oxygen species and inhibitors of inflammatory enzymes, NADPH oxidase, and iNOS in experimental models of parkinsons disease. *Mediat. Inflamm.* **2012**, 823902. [[CrossRef](#)]
45. Baranipour, S.; Kadijani, A.A.; Qujeq, D.; Shahrokh, S.; Haghazali, M.; Mirzaei, A.; Asadzadeh-Aghdaei, H. Inducible nitric oxide synthase as a potential blood-based biomarker in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterol. Hepatol. Bed Bench* **2018**, *11*, S124–S128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Witte, M.B.; Barbul, A. Arginine physiology and its implication for wound healing. *Wound Repair Regen.* **2003**, *11*, 419–423. [[CrossRef](#)]
47. Yoshino, F.; Yoshida, A.; Nakajima, A.; Wada-Takahashi, S.; Takahashi, S.; Lee, M.C. II Alteration of the redox state with reactive oxygen species for 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters. *PLoS ONE* **2013**, *8*, 10–15. [[CrossRef](#)]
48. Curra, M.; Martins, M.A.T.; Lauxen, I.S.; Pellicoli, A.C.A.; Sant'Ana Filho, M.; Pavesi, V.C.S.; Carrard, V.C.; Martins, M.D. Effect of topical chamomile on immunohistochemical levels of IL-1 β and TNF- α in 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2013**, *71*, 293–299. [[CrossRef](#)]
49. Majdalawieh, A.F.; Carr, R.I. In vitro investigation of the potential immunomodulatory and anti-cancer activities of black pepper (*Piper nigrum*) and cardamom (*Elettaria cardamomum*). *J. Med. Food* **2010**, *13*, 371–381. [[CrossRef](#)]
50. Yadav, N.; Chandra, H. Suppression of inflammatory and infection responses in lung macrophages by eucalyptus oil and its constituent 1,8-cineole: Role of pattern recognition receptors TREM-1 and NLRP3, the MAP kinase regulator MKP-1, and NF κ B. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0188232. [[CrossRef](#)]
51. Adcock, I.M.; Mumby, S. Glucocorticoids. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2017**, *237*, 171–196. [[CrossRef](#)]
52. Conlon, K.C.; Miljkovic, M.D.; Waldmann, T.A. Cytokines in the treatment of cancer. *J. Interferon Cytokine Res. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* **2019**, *39*, 6–21. [[CrossRef](#)]
53. Billiau, A. Anti-inflammatory properties of Type I interferons. *Antivir. Res.* **2006**, *71*, 108–116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

54. Holdsworth, S.R.; Can, P.Y. Cytokines: Names and numbers you should care about. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2015**, *10*, 2243–2254. [[CrossRef](#)]
55. Elizondo-Luévano, J.H.; Castro-Ríos, R.; Vicente, B.; Fernández-Soto, P.; López-Abán, J.; Muro, A.; Chávez-Montes, A. In vitro antischistosomal activity of the argemone mexicana methanolic extract and its main component berberine. *Iran. J. Parasitol.* **2021**, *16*, 91–100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Elizondo-Luévano, J.H.; Castro-Ríos, R.; López-Abán, J.; Gorgojo-Galindo, O.; Fernández-Soto, P.; Vicente, B.; Muro, A.; Chávez-Montes, A. Berberine: A nematocidal alkaloid from *Argemone mexicana* against *Strongyloides venezuelensis*. *Exp. Parasitol.* **2021**, *220*, 108043. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Malek, S.N.A.; Phang, C.W.; Ibrahim, H.; Wahab, N.A.; Sim, K.S. Phytochemical and cytotoxic investigations of *Alpinia mutica* rhizomes. *Molecules* **2011**, *16*, 583–589. [[CrossRef](#)]
58. Akram, M.; Ahmed, A.; Usmanghani, K.; Hannan, A.; Mohiuddin, E.; Asif, M. Curcuma longa and curcumin: A review article. *Rom. J. Biol.* **2010**, *55*, 65–70.
59. Berbudi, A.; Rahmi, N.; Atik, N.; Wikayani, T.; Qomarilla, N.; Rahayu, N.S.; Putri, A.C. The administration of low-dose curcuma longa extract induces m2 polarization in peritoneal macrophage culture. *Res. J. Pharm. Technol.* **2021**, *14*, 1079–1084. [[CrossRef](#)]
60. Figueira, L.W.; de Oliveira, J.R.; Camargo, S.E.A.; de Oliveira, L.D. Curcuma longa L. (turmeric), Rosmarinus officinalis L. (rosemary), and Thymus vulgaris L. (thyme) extracts aid murine macrophages (RAW 264.7) to fight Streptococcus mutans during in vitro infection. *Arch. Microbiol.* **2020**, *202*, 2269–2277. [[CrossRef](#)]
61. Okuda-Hanafusa, C.; Uchio, R.; Fuwa, A.; Kawasaki, K.; Muroyama, K.; Yamamoto, Y.; Murosaki, S. Turmeronol A and turmeronol B from Curcuma longa prevent inflammatory mediator production by lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages, partially via reduced NF- κ B signaling. *Food Funct.* **2019**, *10*, 5779–5788. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Ibáñez, M.D.; Blázquez, M.A. Curcuma longa l. Rhizome essential oil from extraction to its agri-food applications. A review. *Plants* **2021**, *10*, 44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Lim, D.W.; Kim, H.; Park, J.Y.; Kim, J.E.; Moon, J.Y.; Park, S.D.; Park, W.H. Amomum cardamomum L. ethyl acetate fraction protects against carbon tetrachloride-induced liver injury via an antioxidant mechanism in rats. *BMC Complement. Altern. Med.* **2016**, *16*, 155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Lee, S.Y.; Cho, S.S.; Li, Y.C.; Bae, C.S.; Park, K.M.; Park, D.H. Anti-inflammatory Effect of Curcuma longa and Allium hookeri Co-treatment via NF- κ B and COX-2 Pathways. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 5718. [[CrossRef](#)]
65. Lee, T.K.; Trinh, T.A.; Lee, S.R.; Kim, S.; So, H.M.; Moon, E.; Hwang, G.S.; Kang, K.S.; Kim, J.H.; Yamabe, N.; et al. Bioactivity-based analysis and chemical characterization of anti-inflammatory compounds from Curcuma zedoaria rhizomes using LPS-stimulated RAW264.7 cells. *Bioorg. Chem.* **2019**, *82*, 26–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Marketing en la promoción y la profesionalización de la salud

Coordinadores
Nery Suárez Lugo
Heberto Romeo Priego Álvarez
Juan Antonio Córdova Hernández



UAN
UNIVERSIDAD
ANTONIO NARIÑO

UNIVERSIDAD
DE LOS HEMISFERIOS



SABER Y SABER HACER



Nery Suárez Lugo
Mercadotecnia, Innovación y tecnologías en Salud / Nery Suárez Lugo, Heberto
Romeo Priego Álvarez, Juan Antonio Córdova Hernández, Coordinadores: Univer-
sidad Antonio Nariño, Fondo Editorial, 2019.
280 p: ilustraciones; 24 cms
ISBN 978-958-8687-92-6
Incluye referencias bibliográficas.
Sistema Nacional de Bibliotecas, Universidad Antonio Nariño - UAN

Marketing en la promoción y la profesionalización de la salud

© Universidad Antonio Nariño,

Red Iberoamericana de Mercadotecnia en Salud y Universidad de los Hemisferios

Coordinadores: Nery Suárez Lugo, Heberto Romeo Priego Álvarez, Juan Antonio
Córdova Hernández

ISBN impreso: 978-958-8687-92-6

ISBN online: 978-958-8687-93-3

Primera edición. Diciembre 2019

Bogotá, D.C. – Colombia

Directora Fondo Editorial: Lorena Ruiz Serna

Corrección de Estilo: Carlos Andrés Almeyda

Diseño y Diagramación: Héctor Suárez Castro

Impresión: Xpress Estudio Gráfico y Digital S.A.S.

Impreso en Colombia

Printed in Colombia

Hecho el depósito Legal según lo establecido por la ley.

Esta obra fue dictaminada mediante el sistema de pares ciegos, por un Comité Científico Inter-
nacional que contó con el apoyo de evaluadores de diferentes Instituciones y dependencias
públicas, así como por el Consejo Editorial de las Universidades participantes. Las denomina-
ciones empleadas y la forma en que aparecen presentados los datos que contiene no implican, de
parte de las universidades participantes, juicio alguno sobre la delimitación de fronteras o límites
y la mención de empresas o productos de fabricantes en particular, estén o no patentados, no
implica que las universidades participantes los apruebe o recomiende de preferencia a otros de
naturaleza similar que no se mencionan. Aunque las universidades fomentan la reproducción y
difusión parcial o total del material contenido, queda prohibida su reproducción total sin contar
previamente con la autorización expresa y por escrito del titular, en términos de la Ley Federal
de Derechos de Autor. Su uso para fines no comerciales se autorizará de forma gratuita previa
solicitud. La reproducción para la reventa u otros fines comerciales, incluidos fines educativos,
podría estar sujeta a pago de derechos o tarifas.

El auge del marketing en los productos naturales como alternativa en salud bucodental

Sonia López Villarreal; Abelardo Chávez Montes;
Jeannette Ramírez Mendoza; Rocío Castro Ríos; José Viveros Valdés;
Laura Villarreal García; Osvelia Rodríguez Luis.

Resumen

Introducción: Las enfermedades bucodentales más frecuentes son la caries y la enfermedad periodontal. En términos mundiales, entre el 60% y el 90% de los niños y cerca del 100% de los adultos presentan caries y dolor. Los medicamentos alternativa contra microorganismos bucales han demostrado por años tener efectos tóxicos y la aplicación de productos naturales se considera como una posibilidad interesante debido a su menor impacto negativo (Chandra, 2015). En odontología, es común el empleo de sustancias naturales en la prevención de enfermedades bucales y el mantenimiento de la salud bucal.

Objetivo: Evaluar los productos naturales: *Syzygium aromaticum*, *Lippia graveolens* y *Chamaemelumnobile* como alternativa para desarrollar formulaciones contra microorganismos orales.

Método: En este trabajo se obtuvieron y evaluaron extractos vegetales, entre ellos *Syzygium aromaticum* y *Lippia graveolens*, realizándose pruebas de actividad antibacteriana in vitro además pruebas en sangre y evaluación citotóxica. Se obtuvo el material vegetal en lugares reconocidos para su venta y el certificado de autenticidad en el herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, se prepararon los extractos etanólicos y/o metanólicos de cada uno mediante Soxhelt

* Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

y/o maceración. Se realizó el análisis fitoquímico para la identificación parcial de compuestos presentes mediante reacciones colorimétricas y cromatografía en capa fina. Se evaluó la actividad antimicrobiana de cada extracto mediante técnica de diluciones en concentraciones de 3000-50 µg/µL contra cepas bacterianas de *S. Gordonii* y *S. Mutans* (ATCC) y toxicidad mediante fluorescencia.

Resultados: Muestran actividad inhibitoria a través de medición de halos en todos los extractos y baja toxicidad en algunas concentraciones.

Conclusiones: El uso de productos fabricados con plantas y aplicados a tratamientos orales es posible debido a su actividad antimicrobiana y a la presencia de compuestos farmacológicamente activos y diferentes propiedades las cuales resultan muy importantes en el abordaje y tratamiento de patologías orales.

Palabras clave: Productos naturales, Alternativa, Salud bucodental.

Introducción

Las enfermedades bucodentales más frecuentes son la caries y la enfermedad periodontal. En términos mundiales, entre el 60% y el 90% de los niños y cerca del 100% de los adultos presentan caries y dolor. Los medicamentos alternativos contra microorganismos bucales han demostrado por años tener efectos tóxicos y la aplicación de productos naturales se considera como una posibilidad interesante debido a su menor impacto negativo (Chandra, 2015). En odontología, es común el empleo de sustancias naturales en la prevención de enfermedades bucales y el mantenimiento de la salud bucal.

La caries dental, enfermedad periodontal, la pérdida de dientes y algunas lesiones mucosas afectan las funciones esenciales de la vida diaria, como lo es comer, masticar y deglutir. Así mismo interfieren con las importantes funciones sociales de la sonrisa y de la comunicación, lo que afecta la calidad de vida (Giacaman et al., 2015).

La caries dental está definida como una enfermedad infecciosa multifactorial causada por bacterias de la placa dental. Cuando entra alimento a la boca, las bacterias metabolizan los carbohidratos fermentables, produciendo ácido que se difunden en el tejido dental duro que va a desmineralizar el esmalte del diente (Al- Darwish et al., 2014).

La caries dental ocurre con la disolución del esmalte por bacterias acidógenas como lo es *Streptococcusobrinus* *Streptococcusmutans* y *Lactobacillus*. La estructura del biofilm hace a las enfermedades dentales más difíciles de controlar y de erradicar y es así como se convierte en una enfermedad pública a nivel mundial (Fabbri et al., 2015).

Cabe señalar que la caries dental es una de las enfermedades más prevalentes en niños. En estudios recientes se ha demostrado que en niños americanos entre 5 a 17 años es 5 veces más común que presente caries que asma (Weusmann et al., 2015).

Otra patología importante es la llamada caries temprana de la infancia (CTI) conocida anteriormente como caries de biberón, que es una de las enfermedades crónicas más prevalentes entre los niños. La caries de la primera infancia ha sido definida como la presencia de una o más cavidades cariosas, además de localizarse en superficies lisas poco susceptibles a la caries.

Este tipo de caries ha sido atribuido a un uso inapropiado y prolongado del biberón o de seno materno. El uso de biberón, especialmente en la noche, está altamente asociado al desarrollo de caries (Jain et al., 2015).

El plan de tratamiento para pacientes afectados con caries de la primera infancia siempre ha sido un reto para los profesionistas. Hoy en día el uso de coronas de acero y coronas estéticas es el tratamiento de opción en estos casos pero es importante dar un enfoque multidisciplinario al tratamiento de CTI (Med et al. 2014). El uso de plantas naturales como tratamiento de diversas enfermedades ha aumentado a nivel mundial, el uso terapéutico de las hierbas medicinales ha servido como importante fuente de nuevos medicamentos y se cree que alrededor del 25 % de los fármacos prescritos se obtienen a partir de plantas. Las plantas medicinales juegan un importante rol en el proceso de descubrimiento y desarrollo de fármacos, que son ampliamente reconocidos como fuentes de ser antimicrobianos y antioxidantes (Wintola et al., 2015).

Los extractos de plantas que contienen antioxidantes naturales a menudo son más eficaces que los antioxidantes sintéticos o compuestos puros incluso aislados debido a las interacciones sinérgicas que mejoran la biodisponibilidad de los agentes antioxidantes individuales (Ewelina, 2015).

255

Múltiples plantas con efectos antibacteriales son comúnmente utilizadas en medicina, los aceites esenciales de clavo (*Syzygium aromaticum*) y orégano (*Lippia graveolens*), así como el extracto de manzanilla (*Chamaemelum nobile*), presentan propiedades anti inflamatorias, antimicrobiales y antisépticas. Durante mucho tiempo se ha utilizado para el tratamiento de múltiples condiciones como por ejemplo malaria, úlceras pépticas, cicatrización de heridas, para la prevención de gangrena, entre otros (Kazemian et al., 2015).

Las plantas nos proporcionan compuestos químicos como los terpenos, alcaloides, carbohidratos y taninos y se les da una considerable atención en los últimos años debido a diversas propiedades farmacológicas (Naveed et al., 2015).

El orégano y clavo tienen efectos antioxidantes, pero es el clavo especia de origen asiático, el mejor antioxidante de los estudiados, por su alto contenido en compuestos fenólicos.

La manzanilla es una hierba perenne de la familia de las asteráceas, es uno de los ingredientes para té más conocido a nivel mundial. También conocida como planta medicinal que ha sido utilizada por siglos, particularmente por sus efectos antiinflamatorios, antimicrobianos, antiespasmódicos, y efectos sedativos. Los componentes químicos principales de la manzanilla incluyen severos componentes fenólicos. Los principales componentes del aceite esencial extraído de las flores son los terpenoides alfa-bisabolol y sus óxidos y azuleno, incluyendo camazuleno (Esteves et al., 2011).

La planta de orégano forma un pequeño arbusto (grueso y bajito) de unos 45 cm de alto. Los tallos a menudo adquieren una tonalidad rojiza, se ramifican en la parte superior y tienden a deshojarse en las partes más inferiores. Toda la planta posee unas pequeñas glándulas donde está contenida la esencia aromática, de color amarillo limón, compuesta por un esteropteno y dos tipos de fenoles principalmente carvacrol y en menor proporción timol.

256

El árbol del clavo o clavero (*Syzygium aromaticum*) es un árbol de la familia *Myrtaceae* nativo de Indonesia. Sus botones (flores que aún no abren) secos se denominan clavos de olor o giroflés y se usan como especia en las cocinas de todo el mundo (Ozcan, 2011).

Marketing en la promoción y la profesionalización de la salud

Como una respuesta a la inquietud de varios países del mundo y al espacio que hoy en día se viene dando a los productos farmacéuticos de origen vegetal, la OMS publicó en 1991 *Pautas para la evaluación de Medicamentos Herbarios*, como base para la investigación y producción de fitofármacos. En algunos países, se tiene la idea de que consumir productos naturales es costumbre de los niveles socioeconómicos altos (Jurado, 2009). Sin embargo, esta percepción ha cambiado, pues ya no son una categoría exclusiva, sino que la mayoría de los ciudadanos acceden a estos productos. Actualmente, sumado a esto, los consumidores se muestran cada vez más predispuestos a informarse sobre los lugares de venta (Ipsos Apoyo, 2008).

Es importante desarrollar la identidad corporativa del negocio ya sea desarrollando productos propios, colocando un distintivo en los productos que comercializa la tienda o mediante el desarrollo de actividades complementarias al negocio, con el fin de dar a conocer la marca de la tienda, posicionarse y diferenciarse de la competencia. Aspecto crucial para ganarse la preferencia del consumidor y/o atacar a un nicho de mercado, con necesidades específicas no atendidas a la fecha.

Objetivo

Evaluar los productos naturales: *Syzygium aromaticum*, *Lippia graveolens* y *Chamaemelumnobile* como alternativa para desarrollar formulaciones contra microorganismos orales.

Método

El material vegetal se obtuvo de lugares reconocidos para su venta, una muestra fue depositada en el herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL para obtener el certificado de autenticidad. Se obtuvieron los extractos etanólicos y/o metanólicos de cada uno mediante Soxhlet y/o maceración. Se procedió a la eliminación parcial del solvente a presión reducida, posteriormente se procedió a la eliminación completa del solvente y se guardaron en frasco ámbar a 4°C. Se procedió a evaluar el rendimiento. Se efectuó el análisis fitoquímico de los extractos para la identificación parcial de compuestos presentes mediante reacciones colorimétricas y cromatografía en capa fina, finalmente se evaluó la

257

actividad antimicrobiana de cada extracto mediante técnica de diluciones en concentraciones de 3000-50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ contra cepas bacterianas de *S. Sobrinus* y *S. mutans* (ATCC), mediante difusión en disco de agar y *S. Gordonii* mediante fluorescencia y toxicidad mediante fluorescencia.

Resultados

En las pruebas fitoquímicas se destacó la presencia de triterpenos, taninos y flavonoides. Se evaluó la actividad antimicrobiana de cada extracto por la técnica de diluciones a 3000 ppm, 1500 ppm, 750 ppm, 375ppm contra cepas bacterianas de *S. mutans* y *S. Sobrinus* (ATCC), por difusión en placa de agar MuellerHinton mediante pozos destacándose *Syzygium aromaticum* *Chamaemelumnobiley* *Lippia graveolens* 1500 ppm y 750 ppm (Figura 1). Los resultados muestran actividad inhibitoria a través de medición de halos en todos los extractos y baja toxicidad en algunas de las concentraciones. Al realizar las pruebas de fluorescencia y medir las unidades utilizando como control la clorhexidina destacan a 1000 ppm *Syzygium aromaticum* y *Lippia graveolens* (Figura2).

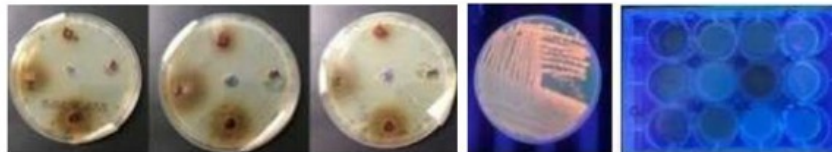


Figura 1

Figura 2

Conclusiones

El uso de productos fabricados con plantas y aplicados a tratamientos orales es posible debido a su actividad antimicrobiana y a la presencia de compuestos farmacológicamente activos y diferentes propiedades las cuales resultan muy importantes en el abordaje y tratamiento de patologías orales. Uno de los mayores retos que debe enfrentar el desarrollo de la fitoterapia es la fabricación de elementos y extractos que tengan alguna forma de estandarización en cuanto a fabricación y dosificación para la elaboración de productos que puedan utilizarse como alternativa natural en el manejo de la caries dental.

258

Marketing en la promoción y la profesionalización de la salud

Referencias

- ChandraShekar, B. R., Nagarajappa, R., Suma, S. & Thakur, R. (2015). Herbal extracts in oral healthcare . A review of thecurrentscenario and itsfutu-reneeds. *PharmacognRev.* Jul-dec; 9(18), pp. 87-92.
- Giacaman, R., Bustos, I., Bravo-Leon, V. & Mariño, R. (2015). Impact of rurality on the oral health status of 6 year old children from central chile: the Epi Maule study. *The international Electronic Journal of rural and remote health research*, vol 15 pp. 31-35.
- Al-Darwish, M., El Ansari, W. & Bener, A. (2014). Prevalence of dental caries among 12-14 year old children in Qatar. *Saudi Dent J.*; vol 26, pp. 115-125.
- Fabbi, S., Johnston, D. A., Rmaile, A., Gottenbos, B., De Jager, M., Aspiras, M., Starke, M. E., Ward, M. T. & Stoodley, P. (2015). Streptococcus mutans biofilm transient viscoelastic fluid behaviour during high-velocity microsprays. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials.* Vol. 59, pp. 197-206.
- Weusmann, J., Mahmoodi, B., Azaripour, A., Kordsmeyer, K., Walter, C. & Willershausen, B. (2015). Epidemiological investigation of caries prevalence in first grade school children in Rhineland-Palatinate, *Germany.* *Head FaceMed.* 2015 vol 2. pp. 11-33.

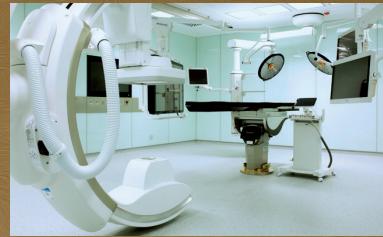
Mercadotecnia, innovación y tecnologías en salud

Coordinadores

Heberto Priego Álvarez

Nery Suárez Lugo

Juan Antonio Córdova Hernández



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA



UAN
UNIVERSIDAD
ANTONIO NARIÑO

Heberto Priego Álvarez
Mercadotecnia, Innovación y tecnologías en Salud / Heberto Priego Álvarez, Nery Suárez Lugo, Juan Antonio Córdova Hernández, Coordinadores: Universidad Antonio Nariño, Fondo Editorial, 2019.
206 p: ilustraciones; 24 cms
ISBN 978-958-8687-94-0
Incluye referencias bibliográficas.
Sistema Nacional de Bibliotecas, Universidad Antonio Nariño - UAN

Mercadotecnia, Innovación y tecnologías en Salud

Coordinadores:

Heberto Priego Álvarez, Nery Suárez Lugo, Juan Antonio Córdova Hernández

ISBN impreso 978-958-8687-94-0

ISBN online 978-958-8687-95-7

Primera edición. Mayo 2017

Bogotá, D.C. – Colombia

Directora Fondo Editorial: Lorena Ruiz Serna

Diseño y Diagramación: Héctor Suárez Castro

Corrección de Estilo: Carlos Andrés Almeyda

Impresión: Imagen Editorial

Impreso en Colombia

Printed in Colombia

Queda prohibida su reproducción total sin contar previamente con la autorización expresa y por escrito del titular, en términos de la Ley Federal de Derechos de Autor. Se autoriza su reproducción parcial siempre y cuando se cite a la fuente.

Nota:

Esta obra fue dictaminada mediante el sistema de pares ciegos, por un Comité Científico Internacional que contó con el apoyo de evaluadores de diferentes universidades y dependencias públicas.

Las opiniones vertidas en cada uno de los capítulos, así como la redacción de los mismos, es completa responsabilidad de sus autores.

La importancia de la innovación, la invención y el marketing de dispositivos en salud y seguridad ocupacional

Sonia López Villarreal, Alejandro Jiménez Sastré, Abelardo Chávez
Montes, Ezequiel Viveros Valdés, Akemi Nakagoshi Cepeda,
Laura Villarreal García, Osvelia Rodríguez Luis,
Rosa Isela Sánchez Nájera.

Resumen

Introducción. En el área de salud y seguridad ocupacional el reto es que un dispositivo prevenga un problema que se traduce en ahorro por parte de los países que invierten grandes cantidades en rehabilitación. En la actualidad no existe un dispositivo que permita al odontólogo manipular la jeringa tipo Carpule y su aguja con una mano para eliminar el riesgo laboral de un accidente punzocortante y el contagio de enfermedades durante el proceso de anestesia.

Objetivo. Diseñar, proteger, elaborar y evaluar un dispositivo para el manejo de jeringas tipo Carpule.

Método. Se diseñó un dispositivo auxiliar para el manejo de jeringas tipo Carpule caracterizado por un diseño ergonómico. Se procedió a registrar y proteger la invención a través del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI). Se elaboró el prototipo en el Centro de Aeronáutica de la UANL. Se realizó la evaluación precomercial mediante test de prueba piloto definiendo el mercadeo eficiente.

Resultados. La patente resultó exitosa en diseño a través del test de prueba en el 100% de los casos. El proceso de registro de acuerdo a las leyes

* Universidad Autónoma de Nuevo León, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

mexicanas fue de cuatro años y el resultado obtenido fue el otorgamiento del título de patente No. 351710 titulado como: Dispositivo auxiliar para el manejo de jeringas tipo Carpule durante el procedimiento de anestesia odontológica.

El prototipo fue elaborado con los materiales aprobados por expertos. Los resultados de la evaluación precomercial fueron 100% aceptables para cada punto evaluado.

Conclusiones. Como investigadores y profesionales de la salud requerimos estar atentos a generar propuestas de innovación que permitan mejorar las condiciones de salud y por tanto de calidad de vida de la población.

Palabras clave: Patente; innovación; jeringa; salud pública.

Introducción

La evaluación de las necesidades de dispositivos médicos y su clasificación en función del grado de prioridad representa un reto constante para las autoridades de salud. El desarrollo de materiales y dispositivos que resuelvan los problemas de salud representan un reto constante entre los profesionales de la salud. En el área de salud pública el reto representa que un dispositivo que previene un problema de salud pública o seguridad ocupacional se traduce en ahorro por parte de los países que invierten grandes cantidades en intervención clínica.

El término “dispositivo médico” hace referencia a cualquier dispositivo, instrumento, aparato, implemento, máquina, implante, reactivo, sustancia para uso in vitro, o en paciente, software, material u otro artículo similar o relacionado¹.

Los dispositivos médicos son esenciales para que la prevención, el diagnóstico, el tratamiento y la rehabilitación de enfermedades sea segura y eficaz. El logro de los objetivos de desarrollo relacionados con la salud, incluidos los objetivos de desarrollo sostenible, depende de que se fabriquen, regulen, planifiquen, evalúen, adquieran, gestionen y utilicen dispositivos médicos de buena calidad, seguros y compatibles con los entornos en que se emplean.

Como se señala en la resolución WHA60.29 de la Asamblea Mundial de la Salud, la misión del personal dedicado a dispositivos médicos del

40

Mercadotecnia, innovación y tecnología en Salud

departamento de medicamentos esenciales y productos para la salud es garantizar un acceso, calidad y uso mejores de dispositivos médicos seguros y adecuados, de conformidad con lo previsto en la reforma de la atención primaria de salud ².

El equipo médico básico se refiere a tecnologías que comúnmente se consideran importantes o necesarias para procedimientos específicos de prevención, diagnóstico, tratamiento o rehabilitación llevados a cabo en la mayoría de los centros de salud. La OMS trabaja desde hace años, junto con expertos, centros colaboradores y Estados Miembros, para desarrollar varias herramientas para una mejor asignación de recursos, selección, incorporación y uso seguro.

De 145 países el 34% tienen una política nacional de tecnología de la salud que forma parte del programa nacional de salud y la evaluación de tecnologías de la Salud (ETS) se refiere a la evaluación sistemática que se realiza de las propiedades, efectos y / o impactos de la tecnología sanitaria. Este es un proceso que se efectúa en forma multidisciplinaria y consiste en evaluar los aspectos sociales, económicos, organizacionales y éticos de una intervención sanitaria o tecnología sanitaria incluyendo su impacto social. El propósito principal de realizar una evaluación es informar una política de toma de decisiones y establecer en todo momento que las tecnologías médicas se utilizarán en un paciente enfermo o grupos de pacientes que merece atención y respeto y nuestro mejor esfuerzo para su salud. Se considera la definición de tecnología sanitaria, como: la aplicación de conocimientos y habilidades organizados en forma de medicamentos, dispositivos médicos, vacunas, procedimientos y sistemas desarrollados para resolver un problema de salud y mejorar la calidad de vida. Los resultados de investigaciones requieren transitar de la invención a la aplicación de estos dispositivos y ser viables para su aplicación en la comunidad, mejorando las condiciones y la calidad de vida de la población³.

En la actualidad no existe un dispositivo o instrumento que le permita al odontólogo manipular la jeringa tipo Carpule y su aguja correspondiente con una sola mano para eliminar el riesgo laboral de un accidente con la misma durante el procedimiento de anestesia en sus pacientes. Las lesiones laborales por causa de accidentes con la aguja de un paciente siguen siendo una causa importante y constante de exposición a enfermedades graves y mortales en los trabajadores sanitarios por contagio

de patógenos contenidos en la sangre tales como el virus de la hepatitis B, hepatitis C o el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) 4. Otras enfermedades transmisibles por pinchazos de aguja incluyen sífilis, malaria y herpes. Durante el procedimiento de anestesia odontológica, los accidentes son muy comunes, sobre todo después de anestesiar al paciente y recolocar el tapón en la aguja, pero también se pueden presentar antes del procedimiento al manipular la jeringa, durante el procedimiento y al término del mismo para su desecho. Las lesiones punzocortantes son una causa frecuente de transmisión de infecciones. El 50% de los trabajadores involucrados con el uso de agujas en pacientes, recuerda al menos una lesión de este tipo en el año previo. Las picaduras ocurren principalmente por la manipulación incorrecta de dichos objetos después de utilizarlos como al reencapuchar las agujas. Esto es un suceso muy peligroso y considerado un riesgo laboral muy alto ya que se pueden contagiar graves infecciones.

Objetivos

1. Diseñar y crear un dispositivo para el manejo de jeringas tipo Carpule durante el proceso de anestesia odontológica.
2. Registrar y proteger la invención a través del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI).
3. Elaborar el prototipo del dispositivo.
4. Realizar la evaluación precomercial definiendo el mercadeo eficiente.

Método

- Se diseñó un dispositivo auxiliar para el manejo de jeringas tipo Carpule durante el procedimiento de anestesia odontológica caracterizado por un diseño ergonómico que le permite al profesional utilizar solo una mano disminuyendo el riesgo de accidente laboral, al mantener alejada la parte activa de la misma, que por lo tanto brinda seguridad ocupacional. Su diseño presenta un mecanismo instalador que permite instalar la aguja en la jeringa de forma segura, retirar el tapón de la aguja en forma segura, colocar el anestésico en el paciente, recolocar el tapón para volver a anestesiar al paciente cuantas veces sea necesario siempre usando una sola mano y haciendo el procedimiento

seguro. También un mecanismo de retiro que permite que al final del procedimiento, se retire la jeringa sin complicaciones y un mecanismo recolector que permite desechar la aguja a un contenedor de forma segura. Su diseño también facilita que pueda ser estéril para cada paciente. Permite un control absoluto por parte del odontólogo, la eliminación del estrés durante el procedimiento debido a que se elimina el factor de riesgo laboral y la mejora en los tiempos de tratamiento, así como el manejo de control de infecciones y el desecho correcto como RPBI (Residuo Peligroso Biológico Infeccioso).

- Se procedió a registrar y proteger la invención a través del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI) mediante una búsqueda y revisión detallada, estableciendo el diseño, previamente habiendo realizado las figuras y sus descripciones correspondientes.
- Se procedió a elaborar el prototipo del dispositivo en el Centro de Aeronáutica de la Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Se realizó la evaluación precomercial definiendo el mercadeo eficiente.

Resultados

Los resultados del proceso de patente del dispositivo auxiliar para el manejo de jeringas tipo Carpule durante el procedimiento de anestesia odontológica en cuanto al diseño resultó exitoso a través de la evaluación precomercial en el 100% de los casos.

Se efectuó el proceso de registro de acuerdo a las leyes mexicanas del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI), llevando un proceso total de cuatro años, en los cuales se pasó por varias etapas que resultaron en la consolidación del proyecto.

El resultado obtenido fue el otorgamiento del título de patente No. 351710 titulado como: Dispositivo auxiliar para el manejo de jeringas tipo Carpule durante el procedimiento de anestesia odontológica.

El prototipo del dispositivo fue elaborado en el Centro de Aeronáutica de la Universidad Autónoma de Nuevo León y se elaboró en los materiales aprobados por los expertos del centro.

Los resultados de la evaluación precomercial fueron:

Mercadotecnia, tecnologías e innovación en salud

- Precisión y seguridad total al colocar y reencapuchar la aguja en la jeringa durante el procedimiento de anestesia.
- Retiro seguro de la jeringa evitando en todo momento el contacto con la aguja.
- Desecho de la aguja en forma segura y conforme a los protocolos de bioseguridad.
- Permite el trabajo eficiente por parte del profesional de la salud al mantener el control absoluto, el uso de una mano, la reducción del estrés, el manejo seguro en control de infecciones y de RPBI.

Conclusiones

Como investigadores y profesionales de la salud requerimos estar atentos a generar propuestas de innovación que permitan mejorar las condiciones de salud y por tanto de calidad de vida de la población.

La protección de ideas que culminan en diseños, instrumentos o dispositivos debe ser monitoreado y evaluar si a través de su aplicación pueden generar un impacto social.

El dispositivo diseñado es para la utilización durante el proceso de anestesia odontológica y/o similares con jeringa tipo Carpule durante el tratamiento de pacientes, para retirar y recolocar de forma segura el tapón en la aguja sin el riesgo a sufrir un accidente laboral y el contagio de enfermedades como hepatitis B, C o VIH por parte del profesional de la salud o el paciente. Permite instalar la aguja en la jeringa de forma segura, retirar el tapón de la aguja en forma segura, colocar el anestésico en el paciente, recolocar el tapón para volver a anestesiarse al paciente cuantas veces sea necesario siempre usando una sola mano y haciendo el procedimiento seguro. Al final del procedimiento, permite retirar la jeringa sin complicaciones y desechar la aguja a un contenedor de forma segura. Su diseño también facilita que pueda ser estéril para cada paciente. Permite un control absoluto por parte del odontólogo, la eliminación del estrés durante el procedimiento debido a que se elimina el factor de riesgo laboral y la mejora en los tiempos de tratamiento. Por lo tanto innovar en salud e inventar dispositivos que permitan procedimientos en salud más seguros y que a la vez aborde una solución a un problema de seguridad ocupacional es una oportunidad de ofrecer servicios de salud seguros tanto para el paciente como para el profesional

de la salud. Considerando la gravedad de un contagio de hepatitis B y/o virus de VIH por accidente punzocortante y sus consecuencias, la patente se vuelve un dispositivo muy valioso en el trabajo diario por lo tanto la innovación del proyecto aunado a la invención y un marketing correcto enfocado hacia la seguridad ocupacional constituye una oportunidad de crecimiento y la oportunidad de formar parte de un programa nacional de salud en beneficio y progreso de los mismos.

Bibliografía

1. Dispositivos médicos por procedimiento clínico (en preparación). Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 2012.
2. Modelos y guías de equipamiento médico. México, D. F., Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud (CENETEC).
3. Sábada I. (2007). Sociología de la Propiedad Intelectual en la era global: de las controversias científico-técnicas a los conflictos sociales (Tesis Doctoral). Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid
4. López SM, Villarreal LE, Rodríguez OE. (2017). Título de Patente No. 351710. México.IMPI. (2005). Presentación del Formulario de Patentes y Modelos de Utilidad, (180). Retrieved from: http://www.inpi.gov.ar/templates/patentes_presentacionf.asp



UNACAR[®]
Universidad Autónoma del Carmen
"Por la Grandeza de México"

Mercadotecnia y empoderamiento social de la salud



Nery Suárez Lugo - Heberto Romeo Prlego Álvarez - Juan Antonio Córdova Hernández
Coordinadores

Primera edición 2020

**Mercadotecnia y empoderamiento
social de la salud**

Nery Suárez Lugo
Heberto Romeo Priego Álvarez
Juan Antonio Córdova Hernández

© D.R. Universidad Autónoma del Carmen
Av. Concordia, Calle 56 N°4, C.P. 24180
Ciudad del Carmen, Campeche, México
Teléfono: 01 (938) 38 110 18

ISBN: 978-607-7826-54-5

El contenido de la presente obra es responsabilidad exclusiva de los autores. Queda prohibida su reproducción total sin contar previamente con la autorización expresa y por escrito del titular, en términos de la Ley Federal de Derechos de Autor. Se autoriza su reproducción parcial siempre y cuando se cite a la fuente.

Esta obra se realizó en colaboración con la Red iberoamericana de Mercadotecnia en Salud y la Universidad Antonio Nariño (Colombia), siendo dictaminada mediante el sistema de pares ciegos, por un Comité Científico Internacional que contó con el apoyo de evaluadores de diferentes Instituciones y dependencias públicas, así como por el Consejo Editorial de las Universidades participantes. Las denominaciones empleadas y la forma en que aparecen presentados los datos que contiene no implican, de parte de las universidades participantes, juicio alguno sobre la delimitación de fronteras o límites y la mención de empresas o productos de fabricantes en particular, estén o no patentados, no implica que las universidades participantes los apruebe o recomiende de preferencia a otros de naturaleza similar que no se mencionan. Aunque las universidades fomentan la reproducción y difusión parcial o total del material contenido, queda prohibida su reproducción total sin contar previamente con la autorización expresa y por escrito del titular, en términos de la Ley Federal de Derechos de Autor. Su uso para fines no comerciales se autorizará de forma gratuita previa solicitud. La reproducción para la reventa u otros fines comerciales, incluidos fines educativos, podría estar sujeta a pago de derechos o tarifas.

Coordinación editorial
Ana Isabel Polkey Gomez
Diseño y diagramación
Cecilia Martínez Macías
Corrección y revisión de estilo
Juan Rodríguez Bastarmérito
Ilustración en portada
Juan A. Córdova Hernández

Hecho en México

Capítulo 10: Innovación, Invención y Mercadotecnia en Salud

Sonia López Villarreal¹, Osvelia Rodríguez Luis¹
Laura Villarreal García¹, Abelardo Chávez Montes¹
Akemi Nakagoshi Cepeda¹, Juan Solís Soto¹ y Concepción Espinosa Rivera¹

Introducción

La mercadotecnia o marketing consiste en un conjunto de principios y prácticas que se llevan a cabo con el objetivo de aumentar el comercio de un servicio o un producto, en especial la demanda de éste. A través de los años, se ha vuelto una prioridad para los investigadores y los países la invención e innovación de dispositivos en el área de la salud y la mercadotecnia juega un papel muy importante en el posicionamiento de un invento o patente en el mercado ya que fortalece y empodera al investigador y al país al ofrecer una solución a una demanda de salud o un problema de salud pública.

La propiedad intelectual en México, comprende tres categorías: los derechos de autor y derechos conexos, los derechos de obtentor y los derechos de propiedad industrial. Los derechos de autor y derechos conexos, se reconocen respecto de la creación de las obras literarias y artísticas, competencia del Instituto Nacional de Derechos de Autor (INDAUTOR); los derechos de obtentor se reconocen respecto de mejoras a variedades vegetales, a través del Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS), mientras que a través de los derechos de propiedad industrial se protegen dos grandes rubros de creaciones: los Signos Distintivos y las invenciones a través del Instituto Mexicano de la Propiedad Intelectual (IMPI).

La inversión en el sistema de salud implica, de manera casi invariable, la introducción de innovaciones tecnológicas en ese campo y pone de manifiesto la necesidad de sustituir paulatinamente el enfoque reactivo, es decir, curativo utilizado tradicionalmente, por una visión preventiva de la salud. Cabe señalar que en materia de innovación, México se encuentra entre los últimos lugares, considerando los factores que se toman en cuenta para la elaboración del Índice de Competitividad Global.¹

Michèle Lambert en 1995 describe a la invención como la creación de nuevos dispositivos, objetos, ideas o procedimientos para conseguir un objetivo humano. Es cualquier cosa producida por una persona que tenga la característica de ser relativamente nueva y única.

En el área de la salud, los dispositivos médicos, a diferencia de los medicamentos, están presentes en todos los procesos de atención a la salud, es decir, prevención, diagnóstico, tratamiento y rehabilitación del paciente. Se vuelve, por lo tanto, un reto, no solo el desarrollo, sino especialmente la evaluación de dichos dispositivos. México es el quinto exportador global de dispositivos médicos, en parte porque los costos de fabricación son, en el país, cerca de 23% más bajos que en Estados Unidos.

En términos de innovación se encuentra, en primer lugar, el dispositivo en sí mismo, que tiende a la miniaturización, al funcionamiento inteligente y a que su control esté cada vez más, en manos del propio paciente. En segundo lugar cabe citar la innovación de las aplicaciones, un ejemplo de las cuales es la evolución en las funciones del marcapasos cardiaco, que originalmente estaba diseñado, solo para enviar pulsos al corazón y actualmente desempeña una cantidad de tareas mucho mayor. Por otro lado, la corriente innovadora alcanzó, a los sistemas de comunicación entre diferentes dispositivos, permitiéndoles retroalimentarse de manera recíproca, para optimizar su funcionamiento, así como formar sistemas locales que facilitan la organización general de los sistemas de salud.²

¹ Universidad Autónoma de Nuevo León. México

En cuanto a los dispositivos en el área de prevención, éstos son de gran importancia pues previenen un accidente de tipo laboral o un contagio. Como un ejemplo de esto sabemos que, en el mundo, cada año, 35 millones de trabajadores de la salud tiene riesgo de sufrir HOP (Heridas por Objetos Punzocortantes). Las lesiones laborales por accidentes con la aguja de un paciente son causa importante de exposición a enfermedades mortales por contagio de patógenos contenidos en la sangre como el virus de la hepatitis B, C o VIH. Por estos motivos, es indispensable el uso e invención de dispositivos que permitan al profesional de la salud manipular los objetos punzocortantes de forma segura eliminando o previniendo el riesgo laboral de un accidente.

Un invento debe protegerse a través de una patente, la cual constituye el título certificado o documento oficial que emite el estado a través de la oficina de patentes, siempre y cuando la invención para la que se solicita cumpla con los requisitos establecidos en la legislación por un plazo de veinte años contados a partir de la solicitud.

Las diferentes etapas de la invención son las siguientes:

1. Necesidad. Ésta puede ser propia o de un grupo. Si es propia, su satisfacción es considerada una ociosidad, ya que realmente sólo llega a cubrir un requerimiento personal. Si es de una colectividad, tiene la posibilidad de que su solución se convierta en una innovación. Las necesidades están presentes en todo momento y generan un proceso de conocimiento menos objetivo.
2. Realización de una investigación. Aquí se lleva a cabo el proceso descrito en el tema anterior.
3. Generación de una idea. Posible solución que cubra la necesidad previa.
4. Factibilidad de la idea. Se realiza una inspección de la idea para determinar si ésta se puede llevar realmente a la práctica o tan sólo se queda como algo imaginario, si es así, entonces se tiene que generar otra posible idea. Esta etapa se comporta como una barrera que, si se supera, permitirá seguir adelante en el proceso.
5. Prototipo. Se maneja una primera versión de objeto real, para de manera práctica evaluar los pros y los contras, y pasar a la siguiente etapa con el menor número posible de errores de diseño.
6. Difusión de la invención. Es muy importante dar a conocer a la sociedad la invención generada. Si cumple como la respuesta de una problemática común tiene la posibilidad de convertirse en una innovación, si no, queda como una invención.

Entonces, para que algo sea innovador, es necesario que sea de utilidad para un grupo y lo más importante es que cubra por completo toda una necesidad, o sea, no puede haber una solución parcial, esto es lo que hace a la innovación un proceso de constante renovación.

Objetivo

Analizar y describir la experiencia en el proceso de invención, registro de patente y estudio de marketing de dispositivos en el área de la salud, que impacten en la solución de un problema de salud pública y permitan el empoderamiento del profesional y su país.

Método

Para este proyecto de divulgación se comentará la experiencia de protección y registro de una patente, la cual parte de la identificación de algunas áreas de oportunidad en clínica de odontología. Primeramente, se identificó la necesidad en la clínica al observar que no existe un dispositivo para la colocación de anestesia con jeringa tipo Carpule en forma segura por parte del odontólogo o el profesional de la salud correspondiente, lo cual lleva al riesgo de sufrir un accidente punzocortante a través de la aguja y por lo tanto el contagio de enfermedades. Se realizó la investigación y búsqueda previa y generación de idea, así como, un estudio de mercado para evaluar la factibilidad. Se diseñó un dispositivo para el manejo de jeringas tipo Carpule caracterizado por un diseño ergonómico para evitar un accidente pun-

zocortante ya que garantiza que las manos del profesional no están en contacto o en proximidad con la aguja en ninguna de las etapas del procedimiento de anestesia:

- 1) Al colocar la jeringa tipo Carpule.
- 2) Al retirar el tapón para anestesiarse al paciente.
- 3) Al colocar la tapa después de anestesiarse al paciente.
- 4) En caso de requerir reforzar el procedimiento de anestesia en el paciente al retirar y/o recolocar el tapón en la aguja.
- 5) Al concluir el procedimiento de anestesia y colocar por última vez el tapón.
- 6) Al desechar la aguja en el contenedor y en el recipiente de desechos contaminados.

Se procedió a registrar y proteger la invención y diseño a través del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI). Se elaboró el prototipo en el Centro de Aeronáutica de la Universidad Autónoma de Nuevo León para finalmente efectuar la evaluación pre-comercial, mediante test de prueba piloto definiendo el marketing eficiente, para la difusión y posicionamiento de la invención.

Resultados

Se llevó a cabo el proceso de registro de acuerdo a las leyes mexicanas del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI), con un tiempo de proceso total de cuatro años, en los cuales se pasó por varias etapas que resultaron en la consolidación del proyecto y otorgamiento de título de la patente con el No. 351710 Dispositivo auxiliar para el manejo de jeringas tipo Carpule durante el procedimiento de anestesia odontológica. La patente resultó exitosa en diseño a través del test de prueba en el 100% de los casos.

Conclusiones

La innovación, la invención y la mercadotecnia en salud, comprende todas aquellas etapas científicas, técnicas, comerciales y financieras, necesarias para el desarrollo y comercialización con éxito de dispositivos, productos nuevos, o con mejores características, la utilización comercial de nuevos, o mejores procesos y equipos, o la introducción de un nuevo servicio.

Como investigadores y profesionales de la salud requerimos estar atentos a generar propuestas de innovación que permitan mejorar y resolver problemas de salud pública, el ahorro en recursos y mejoren las condiciones de salud, disminuyendo el riesgo laboral.

Sin embargo, los retos en este campo consisten en evaluar a tiempo la calidad, eficacia y costo de los nuevos dispositivos, debido a la rapidez de los cambios; en vigilar el funcionamiento que muestran en el tiempo para prevenir eventuales fallas; y en implementar estrategias de mercadeo, para transitar de la invención, registro y/o la innovación, a la implementación y distribución de las patentes contribuyendo al empoderamiento del área de la salud, de los inventores y de los países.

Diseñar, transferir e implementar innovaciones en los sectores públicos y privados para la generación de actividades de valor, a través de la intervención de agentes de cambio, para el empoderamiento y desarrollo emprendedor.

Bibliografía

1. Modelos y guías de equipamiento médico. México, D. F., Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud (CENETEC).
2. Sábada I. 2007. Sociología de la Propiedad Intelectual en la era global: de las controversias científico-técnicas a los conflictos sociales (Tesis Doctoral). Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid

3. López SM, Villarreal LE, Rodríguez OE. (2017). Título de Patente No. 351710. México. IMPI. (2005).
Presentación del Formulario de Patentes y Modelos de Utilidad, (180).
Retrieved from http://www.inpi.gov.ar/templates/patentes_presentacionf.asp
4. Nieto R, Juárez C, Cabello A. Overview of sharps injuries among health-care workers. *Rev. Med. Inst. Mex. Seguro Soc.* 2015;53(3):356-61
5. Vieira M, Itayra M, Dal Castel R. Análise dos acidentes com material biológico em trabalhadores da saúde. *Rev. Latino-Am. Enfermagem* mar-abr. 2011;19(2).



UNIVERSIDAD
DE LOS HEMISFERIOS
DILE AL MUNDO DE DÓNDE VIENES



RED IBEROAMERICANA DE
MERCADOTECNIA EN SALUD
MERCADOTECNIA AL SERVICIO DE LA SALUD

XV Convención Anual y Simposio Internacional: *Posicionando la Salud*

Otorga el presente diploma a:

**Sonia López Villarreal, Abelardo Chávez Montes, Azucena González Horta
Catalina Leos Rivas, Rocío Castro Ríos, José Viveros Valdés
Laura Villarreal García, Osvelia Rodríguez Luis**

Por haber impartido la Ponencia

*El auge de la mercadotecnia en los productos naturales como
alternativa en salud bucodental*

Quito, Ecuador del 18 al 20 de mayo de 2017

Dr. Heberto R. Priego Álvarez
Presidente de la RIMS

Dr. Galo Beltrán Citelly
Vocal de ética de la RIMS

Msc. Margarita Freire Acosta
Representante RIMS-ECUADOR



LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

Y LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE INVESTIGACIÓN EN PRODUCTOS NATURALES

extiende la presente

CONSTANCIA

A: Sonia López Villarreal, Abelardo Chávez Montes, Azucena González Horta, José E. Viveros Valdés, Catalina Leos Rivas, Osvelia Rodríguez Luis, Rocío Castro Ríos

Por su valiosa asistencia y presentación de la ponencia en **Modalidad Cartel**

Obtención, caracterización y evaluación de extractos vegetales, una alternativa en enfermedades orales

En la 13a Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales celebrada del 17 al 20 de mayo de 2017 en Morelia, Michoacán, México.



Dra. Rosa Eiva Norma del Río Torres
Presidente del Comité Organizador

Dr. Sergio Rubén-Peraza Sánchez
Presidente de AMIPRONAT



Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales
Dr. Juan Diego Hernández Hernández
Morelia, Michoacán del 17 al 20 de mayo de 2017



Otorgan la presente

Constancia


A: LÓPEZ VILLARREAL SONIA, CHÁVEZ MONTES ABELARDO
VIVEROS VALDÉS JOSÉ EZEQUIEL, CASTRO RÍOS ROCÍO
RODRÍGUEZ LUIS OSVELIA


Por su participación con la ponencia en la **modalidad cartel** con el tema


"HELIOPSIS LONGIPES. OBTENCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA COMO ALTERNATIVA EN ODONTOLOGÍA"

en el V Congreso Internacional de Odontología Pediátrica y
V Foro Nacional de Investigación en Odontopediatría
y Ciencias Afines realizado en Villahermosa Tabasco,
del 06 al 09 de septiembre de 2017.

Villahermosa Tabasco, septiembre de 2017.


M. en C. Alejandro Jiménez Sastré
Director


M. en C. Crystell Guadalupe Guzmán Priego
Coordinación de Investigación y Posgrado


M. en C. Flor del Pilar González Javier
Jefa del Área de Estudios de Posgrado



COLEGIO NACIONAL DE CIRUJANOS DENTISTAS, A.C.
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA UNAM



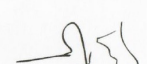
OTORGA LA PRESENTE

CONSTANCIA

A

Sonia López Villareal

POR SU PARTICIPACIÓN ACADÉMICA EN LA
"MODALIDAD DE CARTEL"
TENIENDO COMO MARCO EL XXV CONGRESO INTERNACIONAL
"MTRO. ANGEL KAMETA TAKIZAWA"
REALIZADO DEL 11 AL 14 DE MARZO DE 2018
"POR LA ODONTOLOGÍA MEXICANA"


DR. JACOBO EFRAÍN PÉREZ INZUNZA
PRESIDENTE

MTRO. JOSÉ ARTURO FERNÁNDEZ PEDRERO
DIRECTOR



TS Escuela de
Tecnologías en Salud



UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
ESCUELA DE TECNOLOGÍA EN SALUD
RED IBEROAMERICANA DE MERCADOTECNIA EN SALUD

Otorga la presente constancia a:

Sonia Martha López Villarreal, Alejandro Jiménez Sastré, Abelardo Chávez Montes, Ezequiel Viveros Valdés, Akemi Nakagoshi Cepeda
Laura Villarreal García, Osvelia Rodríguez Luis
Rosa Isela Sánchez Nájera.

Por haber participado como Ponente en la XVI Convención Anual y Simposio Internacional de la Red Iberoamericana de Mercadotecnia en Salud (RIMS), bajo el lema "Mercadotecnia, Tecnologías e Innovación en Servicios de Salud" con el trabajo titulado **La importancia de la innovación, la invención y el marketing de dispositivos en salud y seguridad ocupacional.**

Desarrollado del 18 al 20 de abril del 2018

San José, Costa Rica, 20 de abril de 2018.


Dr. Horacio Chamizo García
Director de la Escuela de Tecnologías en Salud


M. Sc. Xinia Alvarado Zeledón
Secretaria Ejecutiva y Comité Organizador de la RIMS

ID: 3062


Cuba Salud 2018
III CONVENCION INTERNACIONAL DE SALUD PÚBLICA

CERTIFICADO
Propuestas de estudios de educación odontológica

A: **Sonia López Villarreal**

POR SU PARTICIPACIÓN EN EL ENCUENTRO INTERNACIONAL EDUCACIÓN MÉDICA SIGLO XXI COMO:

<input checked="" type="checkbox"/> PONENTE	<input type="checkbox"/> EXPOSICIÓN EN POSTER	<input type="checkbox"/> PRESIDENTE DE SALA
<input type="checkbox"/> EXPOSICIÓN ORAL	<input type="checkbox"/> EXPOSICIÓN EN POSTER DIGITAL	<input type="checkbox"/> SECRETARIO DE SALA

Dado en La Habana, Cuba, a los 27 días del mes de abril de 2018

M. Sc. Dra. Ileana Morales Suárez
Directora de Ciencia e Innovación
Tecnológica

Dr. Cs. Pastor Castell-Florit Serrate
Presidente del Consejo de Sociedades
Científicas de la Salud

Dictamen No. 030/18 Créditos académicos 3 otorgados y Firma autorizada _____

MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA

