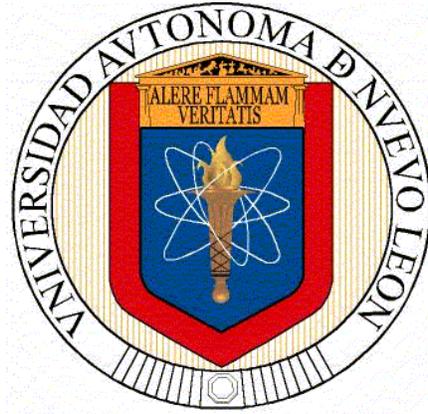


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**



TESIS

**“ELABORACIÓN DE UNA BIOPELÍCULA BIOADHESIVA
INCORPORANDO *Amphipteryngium adstringens* (Cuachalalate)
PARA SU USO EN MUCOSA ORAL”**

PRESENTA

MARTHA MARIELA ROCHA GÓMEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE MAestrÍA EN ODONTOLOGÍA AVANZADA**

MONTERREY, N.L. FEBRERO DE 2015

**“ELABORACIÓN DE UNA BIOPELÍCULA BIOADHESIVA
INCORPORANDO *Amphipteryngium adstringens* (Cuachalalate)
PARA SU USO EN MUCOSA ORAL”**

TESIS

**Presentada como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRÍA EN ODONTOLOGÍA AVANZADA**

Por

MARTHA MARIELA ROCHA GÓMEZ

Comité de Tesis

Dra. Osvelia Esmeralda Rodríguez Luis
Director de Tesis

Dr. Juan Gabriel Báez González
Codirector

Vocal

**“ELABORACIÓN DE UNA BIOPELÍCULA BIOADHESIVA
INCORPORANDO *Amphipteryngium adstringens* (Cuachalalate)
PARA SU USO EN MUCOSA ORAL”**

TESIS

**Presentada como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRÍA EN ODONTOLOGÍA AVANZADA**

Por

MARTHA MARIELA ROCHA GÓMEZ

Comité de Tesis

Dra. Osvelia Esmeralda Rodríguez Luis
Director de Tesis

Dr. Juan Gabriel Báez González
Director externo

Dr. Abelardo Chávez Montes
Asesor externo

AGRADECIMIENTOS

A DIOS por darme el gran regalo de la vida, por llenarme siempre de muchas bendiciones y felicidad, de paciencia y por permitirme conocer a personas muy especiales que se que quedarán en mi vida.

A la Dra. Osvelia E. Rodríguez por creer en mí para la realización de éste proyecto, por su apoyo y paciencia constante, por asesorarme y guiarme; por ocupar parte de su valioso tiempo para cada duda que surgía. La admiro y la respeto por ser una persona que lucha por lo que se propone, por brindarme su amistad y por inyectar en mi esa pasión por la investigación. Muchas gracias!

Al Dr. Ezequiel Viveros por su disposición, amabilidad y valiosa colaboración para la realización de este proyecto.

Al Dr. Juan G. Báez por su orientación constante, su paciencia, por estar siempre dispuesto a cualquier duda o inquietud, por su amabilidad, por su enseñanza.

Al Lic. Gustavo por su asesoría y contribución con la Estadística de este proyecto.

A la Dra. Sonia López Villarreal por su apoyo, consejos, cariño, por sus palabras de aliento. Gracias por su amistad.

A la Dra. Rosa Isela Sánchez por su apoyo y por brindarme la oportunidad de realizar la Maestría.

A Conchis y Ada por su apoyo constante en embriología, gracias por su amistad.

A mis hermanos por su apoyo y aliento a lo largo de mi vida, por estar ahí pase lo que pase. A mis sobrinas mis dos grandes amores.

A mis papás por quererme y apoyar cada locura, por sus consejos, por las veces en que los desvelaba, por las atenciones, por preocuparse, por estar siempre conmigo.

A mis compañeros de la maestría por todos los momentos de alegrías y tristezas que compartimos a lo largo de dos años.

A Mayrita Aguila y Nadia León por brindarme su sincera amistad, por su apoyo, por ⁱⁱⁱ
tiempo, sus consejos, su optimismo, por las pláticas interminables, por ofrecerme su ^{iv}
hombro, por formar parte de mi historia. Doy gracias a Dios el haberlas puesto en mi camino.

A mis amigos de siempre: Cielo, Fernando, Silvia, Edna, Diana, Yeya, Zehidy, Jenny, Alicia, Arlene, Nancy, Mayela, Eric, Bertha, Félix por siempre estar, por comprenderme cuando no podía ir a las reuniones y por apoyarme, por darme ánimos y ser parte de mi vida.

A la QBP Vilma por su enseñanza, su ayuda, su disponibilidad y apoyo en el Departamento de Microbiología y Biología Molecular

A Minerva, Vero, Ale, Mónica, Cynthia, Nohemí estudiantes de doctorado en la facultad de Ciencias Biológicas por su paciencia y enseñanza.

Al personal de Ciencias en Alimentos de la Facultad de Ciencias Biológicas por sus atenciones y amabilidad.

A todas las personas, familiares y amigos que a lo largo de éste proyecto han estado presentes y los he desatendido, mis más sinceras disculpas.

Mil Gracias

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero otorgado a través de la beca No. De registro.

A la Facultad de Ciencias Biológicas y muy en especial al departamento de Ciencias de Alimentos y Química Analítica por facilitar sus instalaciones y equipo para la realización de éste trabajo.

A la Facultad de Odontología, Dra. Rosa Isela Sánchez Nájera, por su apoyo brindado y facilitando las instalaciones del Laboratorio de Biología Molecular y Microbiología para dar continuidad al proyecto.

DEDICATORIA

A mis padres Antonio y Carmen...
No hay palabras para agradecer todo lo que han hecho por mí.

Los amo

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Conceptos establecidos por la OMS en 1978	8
Tabla 2 Clave Taxonómica de <i>Amphipteryngium adstringens</i> .	9
Tabla 3. Clasificación de principios activos de <i>A. adstringens</i> .	10
Tabla 4. Fibras alimentarias más conocidas y sus fuentes de obtención más comunes.	17
Tabla 5. Resultados de los compuestos fenólicos del cuachalalate	28
Tabla 6. Curva de calibración del contenido total de fenoles del cuachalalate	28
Tabla 7. Resultados de la evaluación antimicrobiana de los extractos.	29
Tabla 8. pH de las películas	30
Tabla 9. Espesor de las películas	30
Tabla 10. Crecimiento del halo de inhibición del <i>S. sobrinus</i> a 24 h	31
Tabla 11. Crecimiento del halo de inhibición del <i>E. fecalis</i> a 24 h	32
Tabla 12. Cuantificación de fenoles en las biopelículas	33
Tabla 13. Aw de las biopelículas	33

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Corteza de <i>Amphipteryngium adstringens</i>	21
Figura 2 Obtención del Extracto	22
Figura 3. Técnica de pozo en agar	23
Figura 4. Cajas después de 24 h para observar el crecimiento del halo de inhibición	23
Figura 5. Preparación de la película polimérica (a) incorporando los polímeros. (b)Mezclando en la propela los polímeros. (c)Incorporación del extracto. (d)Agitando en el homogenizador e) Medición del ph	24
Figura 6. Películas poliméricas en cajas de Petri listas para ser colocadas en la incubadora.	25
Figura 7. a) Biopelícula lista b) Perforación de biopelículas. c) Medición del grosor de las películas d) Almacenamiento de biopelículas en cajas de petri	26
Figura 8. Esterilización de las biopelículas	26
Figura 9. Técnica de sensibilidad por difusión de disco en agar	27
Figura 10. Medición de la actividad acuosa (aw)	27

ÍNDICE

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS	iv
AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES	vi
DEDICATORIA	vii
ÍNDICE DE TABLAS	viii
INDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
3. JUSTIFICACIÓN	3
4. HIPÓTESIS	4
5. OBJETIVOS	5
5.1 Objetivo General	
5.2 Objetivos específicos	
6. ANTECEDENTES	
6.1 Microorganismos	6
6.1.1 <i>Streptococcus sobrinus</i>	6
6.1.2 <i>Enterococcus faecalis</i>	7
6.2 Obtención de extractos vegetales	7
6.3 Fitoquímica y acción farmacológica de los compuestos químicos del cuachalalate.	10
6.4 <i>Amphipteryngium adstringens</i> (Cuachalalate)	10
6.5 Sistemas mucoadhesivos como alternativa de transporte de principios activos	14
6.6 Fibra alimentaria	15
6.6.1 Goma guar parcialmente hidrolizada	17

6.6.2 Pectina	18
6.7 Importancia de la formación de uniones adhesivas sobre la mucosa oral	19
6.8 Formas farmacéuticas	19
6.4.1 Preparaciones mucoadhesivas bucales	20
6.4.1.1 Películas bucales	20
7. MATERIALES Y MÉTODOS	21
7.1 Cepas bacterianas y condiciones del cultivo.	21
7.2 Obtención del extracto etanólico de la planta.	21
7.3 Contenido Fenólicos Totales.	22
7.4 Evaluación de la propiedad antimicrobiana del extracto etanólico de <i>Amphipteryngium adstringens</i> contra <i>S. sobrinus</i> y <i>E. faecalis</i>	22
7.5 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico de <i>Amphipteryngium adstringens</i> contra <i>S. sobrinus</i> y <i>E. faecalis</i>	23
7.6 Diseño de una biopelícula bioadhesiva incorporando extracto etanólico de <i>Amphipteryngium adstringens</i>	24
7.7 Evaluación de las propiedades antimicrobianas de las biopelículas adicionadas con el extracto y determinación de la CMI	26
7.8 Cuantificación de fenoles en las biopelículas	27
7.9 Determinación de la actividad acuosa (aw) de las biopelículas bioadhesivas	27
8 RESULTADOS	28
8.1 Obtención del extracto	28
8.2 Cuantificación de la concentración de fenoles en el extracto	28
8.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos	29
8.4 Concentración Mínima Inhibitoria contra el <i>S. sobrinus</i> y <i>E. faecalis</i>	29
8.5 Elaboración de las biopelículas bioadhesivas incorporando el extracto.	30
8.5.1 Espesor de los discos de las biopelículas	30

8.6 Evaluación de las propiedades antimicrobianas de las biopelículas adicionadas con el extracto	31
8.6.1 Actividad antimicrobiana de la biopelícula bioadhesiva sobre el <i>Streptococcus sobrinus</i>	31
8.6.2 Actividad antimicrobiana de la biopelícula bioadhesiva sobre el <i>Enterococcus Faecalis</i>	32
8.7 Concentración Mínima Inhibitoria del extracto mediante el uso de la biopelícula bioadhesiva	32
8.8 Cuantificación de fenoles en los discos bioadhesivos poliméricos.	32
8.9 Actividad acuosa de las biopelículas	33
9. DISCUSIÓN	34
10. LITERATURA CITADA	36

1. INTRODUCCIÓN

La cavidad oral se encuentra habitada por un sin número de microorganismos que juegan un papel muy importante para el desarrollo de enfermedades bucodentales, que se asocian con diversos factores y sustancias que se encuentran dentro de la misma.

El grupo de enfermedades bucales más comunes a nivel mundial lo forman la caries dental y la periodontitis. Para prevenir estas enfermedades se recomiendan estrategias de higiene, tales como el cepillado, el uso de la seda dental, así mismo el uso de enjuagatorios, agentes antimicrobianos, analgésicos que pueden alterar el estado sistémico del paciente.

Durante los procedimientos dentales se pueden presentar complicaciones tales como lesiones en tejidos blandos, nerviosos, de estructuras óseas, daño sobre la ATM, lesiones de dientes adyacentes, hemorragias, infecciones (alveolitis), trismus, hematomas y edema.

Después de China, México es el país donde la herbolaria tradicional es el recurso alternativo más utilizado para el tratamiento de padecimientos de distinta naturaleza. Las plantas contienen en alguno de sus órganos (hojas, semillas, flores, raíces, frutos, corteza) principios activos, los cuales si son administrados en dosis suficientes, producen efectos terapéuticos que ejercen una acción farmacológica. Entre éstos destacan los alcaloides, gomas, mucílagos, aceites esenciales, resinas, bálsamos, oleorresinas, taninos y fenoles. Se calcula que del total de las plantas que se conocen solo un 10% se consideran con aplicación terapéutica, entre estas podemos mencionar al *Amphipteris yngium adstringens* o *Juliania adstringens Schlechter* mejor conocida como “Cuachalalate” que se encuentra dentro de las especies de mayor tradición en la herbolaria mexicana. Estudios realizados sugieren que la corteza del cuachalalate tiene efecto astringente, antibacteriano, antifúngico, antiulceroso, anticanceroso.

El presente trabajo tiene como finalidad la obtención de extractos naturales con propiedades antimicrobianas incorporadas a una película bioadhesiva que permita su permanencia en cavidad oral

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La cavidad oral es un área altamente contaminada, en donde habitan microorganismos, entre éstos tenemos al *Streptococcus sobrinus* presente en el biofilm, así como el *Enterococcus faecalis* que se considera una bacteria altamente resistente a ciertas sustancias antimicrobianas.

Es por esto que el uso de la medicina alternativa incorporando el uso de plantas, que presenten principios activos con acción antimicrobiana, que incorporados a un vehículo aumente su sustentividad en la mucosa bucal.

Por ésta razón se plantea la siguiente pregunta:

¿Es posible diseñar una película que incorpore el extracto de *Amphipteryngium adstringens* “cuachalalate” como agente antimicrobiano que prolongue su actividad en el sitio de aplicación como una potencial herramienta de uso en mucosa oral?

3. JUSTIFICACIÓN

El vínculo existente entre las enfermedades bucales y la microbiota oral está bien establecido. Hay más de 750 especies de bacterias habitándola. Actualmente el empleo de agentes antimicrobianos por tiempo prolongado, ha incrementado la aparición de reacciones adversas y la resistencia bacteriana. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que más del 80% de la población mundial utiliza la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud y que gran parte de los tratamientos tradicionales implica el uso de extractos de plantas o sus principios activos. (Katewa, 2004) En muchos países desarrollados, del 70% al 80% de la población ha recurrido alguna vez a una u otra forma de medicina alternativa o complementaria. Las infecciones que afectan a dientes y tejidos periodontales son las más frecuentes.

Es por esto que hoy en día la sociedad busca el empleo de tratamientos a base de productos naturales y que al mismo tiempo puedan tener una mayor sustentividad en el área tratada. También se busca que los sistemas bioadhesivos permanezcan más tiempo en boca sin que éste sea barrido inmediatamente por la saliva.

Actualmente se describen un sin número de plantas que muestran propiedades para su potencial aplicación en el área odontológica donde el *Amphipterygium adstringens* conocido como cuachalalate, ha mostrado diversas aplicaciones como antimicrobiana (contra el *Streptococo mutans*, *Porphyromonas gingivalis*), antifúngica, antiinflamatoria, antiulcerosa, astringente, antioxidante, cicatrizante entre otras.

Con base a lo anterior se sugiere el uso de extractos naturales (*Amphipterygium adstringens*) que puedan ser incorporados en un vehículo tipo biopelícula bioadhesiva y que permita su permanencia en la mucosa oral.

Por lo que el presente proyecto implica diseñar un sistema bioadhesivo, incorporando extracto de la corteza de *Amphipterygium adstringens* para su uso en mucosa oral.

4. HIPÓTESIS

Hipótesis

La incorporación de *Amphipteryngium adstringens* a en una biopelícula bioadhesiva actuará como un sistema de liberación controlada de activos naturales y favorecerá su actividad antimicrobiana contra patógenos de cavidad oral.

DISEÑO

Estudio Comparativo, abierto, experimental, prospectivo y transversal.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Diseñar un sistema bioadhesivo con actividad antimicrobiana como biopelícula a base de polímeros naturales incorporando extracto de *Amphipteryngium adstringens* “Cuachalalate”, y que permita la liberación sostenida de activos que favorezca su sustentividad en mucosa oral.

5.2 Objetivos Específicos

1. Obtener el extracto etanólico de *Amphipteryngium adstringens*.
2. Cuantificar la concentraciones de fenoles presentes en el extracto de *Amphipteryngium adstringens*
3. Determinar la actividad antimicrobiana de *Amphipteryngium adstringens* contra *S. sobrinus* y *E. fecalis*
4. Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico de *Amphipteryngium adstringens* contra *S. sobrinus* y *E. fecalis*.
5. Diseñar una biopelícula bioadhesiva incorporando el extracto etanólico de *Amphipteryngium adstringens*
6. Determinar la actividad antimicrobiana de *Amphipteryngium adstringens* contra *S. sobrinus* y *E. fecalis* mediante el uso de las películas bioadhesivas.
7. Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico de *Amphipteryngium adstringens* contra *S. sobrinus* y *E. fecalis* mediante el uso de las películas bioadhesivas
8. Cuantificar la concentración de fenoles presente en la biopelícula para cada concentración evaluada.
9. Determinar la aw de las biopelículas para determinar la cantidad de agua disponible para reaccionar químicamente con otras sustancias y provocar el crecimiento microbiano.

6. ANTECEDENTES

6.1 Microorganismos

En 1683, Anthony van Leeuwenhoek decidió examinar la película formada en la cavidad oral utilizando su microscopio casero. Un nuevo mundo en miniatura se abrió a él. Posteriormente informó de sus hallazgos a la Real Sociedad, convirtiéndose en el primer científico en el registro para ver las bacterias. (Avila, M. et al 2009). La superficie de la mucosa oral esta colonizada por diversos microorganismos que normalmente mantienen un balance ecológico entre diferentes especies. Ciertos factores ambientales y biológicos pueden provocar la interrupción de éste equilibrio, dando lugar a enfermedades microbianas. Muchos de estos están asociados a la formación del biofilm, caries, enfermedad periodontal entre otras y son resistentes a la tensión mecánica o tratamiento con antibióticos. (Jenkinson, H. F., 2005) La mayoría son también especies comensales, pero pueden convertirse en patógenos de acuerdo a la respuesta que muestren a los cambios ambientales. Se han estimado más de 750 diferentes especies. Entre la microbiota oral se mencionan especies como *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Nisseria*, *Haemophilis*, *Eubacteria*, *Capnocytophaga*, *Enterococos*, *Peptostreptococcus*, *Staphylococcus* entre otros. (Wilson, M. (2005).

6.1.1 *Streptococcus sobrinus*

Es un microorganismo gram-positivo, anaerobio, no móvil. Está estrechamente relacionado con el *Streptococcus mutans*, son patógenas en seres humanos y favorece la formación de caries dental. El biofilm es una mezcla de azúcar y placa que crea un ambiente adecuado para el crecimiento del *S. sobrinus*. Asociado a la caries de la primera infancia, responsable de la mayoría de los abscesos dentales y dolor en los niños. (Wu H. et al 2003)

6.1.2 *Enterococcus faecalis*

Los enterococcus son bacterias comensales en el intestino de los seres humanos y los animales. (Hammerum AM, 2012) Son bacterias Gram-positivas, anaerobias facultativas que se caracterizan por su capacidad para crecer en concentraciones de 6,5% de NaCl a un pH alto. (Hollenbeck BL, 2012). Además, son cocos que a menudo se producen en pares (diplococos) o en cadenas cortas. (Balaei Gajan E, 2013) Investigaciones recientes han demostrado que el *E. faecalis* se detecta con frecuencia en la microbiota oral de pacientes con periodontitis lo que sugiere que la infección periodontal puede favorecer la colonización en la cavidad oral por parte de esta especie. (Souto R, 2008) Puede contribuir a la degradación periodontal en sitios subgingivales muy infectados, particularmente en los pacientes que responden pobremente a las formas mecánicas de la terapia periodontal. (Rams TE, 2012)

6.2 Obtención de extractos vegetales

Después de China, México es el país donde la herbolaria tradicional es el recurso alternativo más utilizado para el tratamiento de padecimientos de distinta naturaleza. Los Asirios, hace 4,500 años consultaban una farmacopea que incluía un grupo de 250 plantas. Hipócrates es considerado el padre de la medicina en los siglos IV Y V a.C. él estudió las propiedades de entre 300 y 400 plantas medicinales.

Se estima que hay aproximadamente entre 250,000 y 500,000 especies de plantas en el mundo (Borris, 1996). Por lo que justifica el investigar en el reino vegetal aquellas que tienen propiedades terapéuticas. Desde 1975, la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1978) ha reconocido la importancia de la medicina tradicional en el control de la salud y ha generado un programa orientado a la promoción de la misma en los países en desarrollo. La medicina tradicional es un elemento cultural con profundas raíces en todas las civilizaciones. Entre el 66 y el 85% de la población del planeta recurre a la herbolaria para calmar diversos padecimientos (OMS. 2004).

En 1978, la OMS establece las siguientes definiciones Tabla 1:

PLANTA MEDICINAL	Cualquier planta que en uno o más de sus órganos contienen sustancias que pueden ser utilizadas con finalidad terapéutica.
DROGA VEGETAL	La parte de la planta medicinal utilizada en terapéutica.
PRINCIPIOS ACTIVOS	Son las sustancias responsables de la acción farmacológica.
FITOFÁRMACOS	Preparados de productos vegetales, su obtención es el resultado de la investigación científica aprobada, su principio activo es de origen vegetal pero su efecto es el resultado de la sinergia de varias sustancias. Se pueden obtener muchos medicamentos usando diferentes solvente y métodos de extracción.

Tabla 1. Conceptos establecidos por la OMS en 1978

De 1978 a 1995 se reúnen en Alemania por mandato federal, un panel de 24 científicos de diferentes disciplinas con el objeto de determinar la eficacia y seguridad de 380 plantas para aprobarlas como medicamentos que no requieran prescripción médica, de las cuales, 254 fueron aprobadas como efectivas y seguras.

Las plantas con fines terapéuticos han formado parte importante de la historia y cultura de los indígenas quienes poseían un amplio conocimiento sobre éstas, así como también de la anatomía del cuerpo humano. Son empleadas ya que contienen en alguno de sus órganos (hojas, semillas, flores, raíces, frutos, corteza) principios activos, los cuales si son administrados en dosis suficientes, producen efectos terapéuticos que ejercen una acción farmacológica, entre éstos podemos mencionar a los alcaloides, lípidos, gomas, mucílagos, aceites esenciales, resinas, bálsamos, oleorresinas, taninos, fenoles. Se calcula que del total de las plantas que se conocen solo un 10 % se consideran con aplicación terapéutica, entre estas podemos mencionar al *Amphipteryngium adstringens* o *Juliania adstringens Schlechter* mejor conocida como “Cuachalalate” que se encuentra dentro de las especies de mayor tradición en la herbolaria mexicana. Es conocida en Michoacán como matixerán, macerán o pacueco, en Oaxaca como cuachinala y en Puebla como volador. Vegeta en la selva baja caducifolia de los estados

de Michoacán, Guerrero, Puebla y Oaxaca. En general, la especie existe en la tierra caliente, en los climas semitropicales y templados. La clave taxonómica se muestra en la tabla 2.

Reino	Vegetal
División	Embriophyta
Clase	Dicotiledóneas
Familia	Julianaceae

Tabla 2. Clave Taxonómica de *Amphipteryngium adstringens*. Martínez, M. 1979

Martínez (1944) menciona que el extracto resultante de la corteza del cuachalalate se emplea para el tratamiento de encías así como antipirético y antiséptico de heridas.

Méndez (1954), describe el uso de su corteza como astringente, debido a que en sus principios activos se encuentra una gran cantidad de taninos y fenoles Su extracto acuoso es un auxiliar en el tratamiento contra la malaria y el cáncer estomacal.

Niembro (1986), le atribuye propiedades antisépticas y en el tratamiento de encías.

Navarrete (1986) y Soriano *et al* (1987) describen compuestos presentes en el cuachalalate entre los que se encuentra un triterpeno denominado ácido masticadienónico, atribuyéndole propiedades anticolinérgicas, anticancerígenas y también para destruir cálculos biliares.

Mata *et al* (1991) demostró que la presencia de los compuestos fenólicos en el extracto hexánico del cuachalalate, tenía la capacidad de actuar como hipocolesterolémico.

Solares posteriormente aisló el ácido alfa-hidroximasticadienónico y demostró que éste compuesto presenta una eficiencia del 80% en el control de cáncer estomacal, a nivel de laboratorio comparado con el 30% que presentó el compuesto principal.

Watson (1987) menciona que un triterpeno de estructura no identificada, aislado de la planta y aplicado por vía oral, presentó una acción antiulcerígena en ratas.

En el Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, en 1994 se mencionó que el cocimiento de la corteza y un extracto de acetato de etilo, administrados en ratas por vía oral e intraperitoneal ejercieron un efecto antiulceroso gástrico al inhibir la producción del jugo gástrico y así contribuir a una rápida cicatrización del epitelio y la mucosa gástrica.

Al encontrar compuestos de naturaleza esteroidal en la corteza del cuachalalate, lo sitúa como un recurso potencial tanto en el campo farmacéutico como industrial.

6.3 Fitoquímica y acciones farmacológicas de los compuestos químicos del cuachalalate.

Las plantas se caracterizan por estar formadas de distintos órganos que cumplen funciones variadas y que al mismo tiempo se encuentran dotados de sustancias químicas o principios activos que le confieren cierta actividad farmacológica. En general están clasificados de la siguiente manera: heterósidos, polifenoles, terpenoides y alcaloides (Bruneton, J., 2001) (Pengelly, A., 1996) Tabla 3.

GRUPO	PRINCIPIOS ACTIVOS
HETERÓSIDOS	Antraquinónicos, Cardiotónicos, Cianogénicos, Cumarínicos, Fenólicos, Flavónicos, Ranunculósidos, Saponósidos, Sulfurados
POLIFENOLES	Ácidos fenólicos, Cumarinas, Flavonoides, Lignanos, Taninos, Quinonas
TERPENOIDES	Aceites esenciales, Iridoides, Lactonas, Diterpenos; Saponinas
ALCALOIDES	

Tabla 3. Clasificación de principios activos. Bruneton J. en 2001.

6.4 *Amphipterygium adstringens* (Cuachalalate)

Entre los compuestos que se identifican en el cuachalalate esta los siguientes triterpenos: ácidos masticadienoico, α -hidroximasticadienoico y mezclas de ácidos masticadienoico/isomasticadienoico.

En las hojas, se ha identificado el ácido cuachalálico el cual también es un triterpeno. (Olivera OA, 1999)

Uno de los compuestos aislados de la corteza del cuachalalate es el ácido masticadienoico que tiene una estructura parecida al cortisol, por lo que tiene posibilidades de desempeñar el mismo papel. Esto podría explicar los efectos antiinflamatorios del cuachalalate. (Boyer, 2001)

Otro de los componentes que se encuentran en la corteza del cuachalalate es el β -sitosterol que disminuye los niveles de colesterol.

Un tercer tipo de compuestos son los ácidos salicílicos que tienen base salicilato que son inhibidores reversibles de la ciclooxigenasa excepto el ácido acetilsalicílico. De ahí que los efectos del cuachalalate son de tipo analgésico y antiinflamatorio. (Mycek, 2004)

Otra sustancia que se encuentra en la corteza del cuachalalate son los taninos que tienen propiedades farmacológicas tales como: astringentes y vasoconstrictoras y estas dos propiedades favorecen en gran medida a la cicatrización. (Carretero Accame, 2000)

Los taninos son compuestos fenólicos secundarios de elevado peso molecular, presentes en árboles, leguminosas, frutas, sorgo y maíz. El tipo y el contenido de estos compuestos está influenciado por su genotipo (especie y variedad) por sus características ambientales como la luz solar y disponibilidad de agua, la velocidad de crecimiento, la madurez, la condición nutricional del suelo, la depredación y las enfermedades. (Romero L, 2000)

Los taninos condensados son polímeros de un flavonoide llamado antocianidina, frecuentemente se encuentran en la madera de los árboles leñosos.

Los taninos hidrolizables son polímeros heterogéneos formados por ácidos fenólicos como lo son el ácido gálico y azúcares simples. (Taiz, 2006) Son hidrolizados con más facilidad. Los fármacos que contienen taninos suelen ser útiles para proteger la cavidad bucal y garganta cuando se encuentran frente a un proceso inflamatorio. (Gutiérrez V E, 2003)

En la actualidad la medicina alternativa a base de plantas medicinales está adquiriendo cada vez más aceptación.

Hoy en día, debido al estudio meticuloso de las plantas desde el punto de vista científico, se han encontrado con gran precisión las virtudes en la terapéutica dental a base de

extractos de plantas. Cada vez pasa que hay mayor resistencia hacia los medicamentos alópatas debido a los altos costos que generan y a la gran cantidad de efectos adversos y reacciones secundarias.

Las plantas con fines terapéuticos son una buena opción, diversos estudios le añaden propiedades astringentes, cicatrizantes, antiulcerosas, anticancerosas y antiinflamatorias al ***Amphipterygium adstringens* conocido como cuachalalate.**

Los extractos son preparaciones obtenidas a partir de plantas medicinales que regularmente están en estado seco. Estos se clasifican según su consistencia en fluidos, blandos y secos. Los primeros son líquidos y corresponden a la droga seca en una proporción 1:1, los blandos son semisólidos, con un contenido de agua de aproximadamente un 60%, mientras que los extractos secos son sólidos, polvos o granulados. Los extractos secos y blandos pueden estar adicionados a ciertos coadyuvantes. La fabricación de un producto fitoterapéutico o bien el aislamiento de un componente químico a partir de la materia prima vegetal comprende las operaciones de molienda, extracción, concentración, purificación y secado. (Sharapin, 2004)

La molienda tiene como objetivo principal disminuir el tamaño de las partículas de la droga vegetal para adecuarla al proceso de extracción que antes de iniciar este proceso, se debe de definir la selectividad del solvente a ser usado en el proceso. Se puede obtener un extracto que contiene la mayor parte de los constituyentes químicos de la planta (etanol o metanol), o bien uno que contenga unos con una determinada característica (hexano). Los solventes más utilizados en las industrias de productos fitoterapéuticos son el agua, el alcohol etílico, la glicerina, el propilenglicol y mezclas de estos líquidos. Dos aspectos importantes en la elaboración de productos fitoterapéuticos son el solvente de extracción y la permanencia en la composición química de la materia vegetal. En cuanto al solvente es importante considerar la selectividad, la manipulación, el precio, la seguridad y sobre todo la toxicidad. (Sharapin, 2004)

El alcohol etílico o etanol y sus mezclas con agua es el solvente por excelencia para la obtención de extractos y tinturas, se recomienda utilizar en ocasiones una mezcla de alcohol:agua 7:3 u 8:2 para la extracción de partes leñosas de la planta, raíces y semillas.

Los procesos de extracción varían en función de la escala de producción, de la naturaleza y calidad de la materia prima y de la naturaleza del solvente. Los procesos de extracción se pueden dividir en dos grupos: aquellos que dan como resultados un equilibrio de la concentración entre el soluto y el residuo y los que agotan completamente la droga. Entre los primeros se encuentran la maceración y la maceración dinámica, y en el segundo la percolación, la repercolación y la extracción en contra corriente. (Raspall, 2002)

Para fines de este proyecto solo describiremos la maceración que consiste en poner en contacto la droga y el solvente durante varios días que dará como resultado un equilibrio de concentración entre la droga y el solvente, y depende de factores que están unidos a la droga como su naturaleza, el tamaño de la partícula, su contenido, humedad, la selectividad y la cantidad. El rendimiento del extracto disminuye cuando la relación droga/solvente aumenta. Para disminuir el tiempo de maceración, la droga y el solvente deben mantener un movimiento constante y pueden ser ejecutadas a temperatura ambiente o elevadas. Entre sus desventajas son la lentitud del proceso y el hecho de no alcanzar la extracción completa de la droga y para disminuir la pérdida del extracto en el residuo de la extracción, se puede repetir de dos a tres veces, después de haber escurrido el solvente de la extracción anterior. La etapa final de éste proceso es el prensado o la centrifugación del residuo para la recuperación de la parte del extracto retenido en él. (Raspall, 2002)

En los últimos años la industria farmacéutica ha mostrado particular interés de novedosos sistemas de administración que mejoren las propiedades de los principios activos y que al mismo tiempo sea de fácil aplicación para los pacientes y así satisfacer sus necesidades (Martín,2009).

Entre estos sistemas de administración se encuentran formas mucoadhesivas, que tienen su nacimiento por 1947 utilizando en aquel entonces, goma de tragacanto y polvos adhesivos dentales que incorporaban penicilina para uso odontológico. Posteriormente se desarrolló el Orobace con excipientes mucoadhesivos para la cavidad oral, es una mezcla de carboximetilcelulosa sódica, pectina y gelatina en una base de aceite

mineral/polietileno. En la década de los ochenta se lleva a cabo una amplia investigación acerca de estos sistemas, sobretodo de las limitaciones que imponen las variables fisiológicas de los diferentes lugares donde se aplicarán, así como también del estudio e incorporación de nuevos biopolímeros adhesivos responsables de su interacción con las mucosas tomándose en consideración que se requieren formas de liberación durante largos períodos en el sitio de la aplicación (Rodriguez et al., 2000)

Existen polímeros de origen natural que son biocompatibles, biodegradables, higroscópicos, sin embargo cuentan con la desventaja de presentar pobres propiedades mecánicas y la pérdida de propiedades biológicas durante su formulación. Por su parte los sintéticos tienen la gran ventaja de ser económicos, versátiles, con excelentes propiedades mecánicas y resistencia química, pero algunos no son biocompatibles ni biodegradables y su reciclado suele ser costoso. En los últimos años se ha trabajado en la obtención de diversos biocompuestos, que reunirían diferentes ventajas de ambos tipos de polímeros y al mismo tiempo disminuir algunas desventajas. (Agustina et al., 2008). Los sistemas biodegradables incluyen el uso del ácido poli (láctico-co-glicólico) que es hidrofóbico e incompatible con proteínas y fármacos nucleótidos solubles en agua. Entre los sistemas poliméricos hidrofílicos se encuentran, el polietilenglicol (PEG), la gelatina y el pullulan. (Gupta et al., 2004). Entre los no biodegradables se encuentra el Carbopol 974P NF. Otra opción es la fibra alimentaria que puede ser soluble en donde se incluye a aquellas que son solubles en disolución tampón con enzimas que emulen soluciones enzimáticas propias del sistema digestivo (pectinas, goma y mucílagos) Las insolubles están representadas por componentes de la pared celular vegetal como la celulosa, la lignina y la hemicelulosa, así como polímeros como el almidón resistente, la quitina y sus derivados.

6.5 Sistemas mucoadhesivos como alternativa de transporte de principios activos

Actualmente se estudian mecanismos que permitan la sustentividad de los principios activos en el sitio de la aplicación

Bioadhesión es el término que se ha utilizado en los últimos años para describir la capacidad que suelen tener ciertas macromoléculas ya sea de origen sintético o bien

biológico para poder adherirse a los tejidos del organismo. (Mathiowitz, 1999) Estos sistemas bioadhesivos se han aprovechado en el área de la salud, específicamente para ciertas aplicaciones odontológicas y ortopédicas, así mismo para su uso en el campo quirúrgico y oftalmológico. En cirugía se utiliza para la liberación controlada y localizada de principios activos sobre las mucosas, ya que cualquier material puede tener la capacidad de adherirse a tejidos naturales o biológicos. Para esto se presentan interrelaciones entre agrupaciones químicas (polímeros) y los tejidos naturales. (Rodríguez, 2000)

La vía por donde se administran los fármacos están revestidas de una capa de mucus. A las formas de administración que se incrustan a las mucosas se les llama mucoadhesivas, y su función principal es fijarse al lugar donde se realiza la liberación del fármaco. (Patel, 2012)

Con el sistema de bioadhesión se busca que el medicamento permanezca por más tiempo en el sitio de la aplicación para aumentar su efectividad y optimizar su absorción a través de la mucosa. Dichas sustancias se pueden formular como sistemas de liberación prolongada o bien de tipo controlada de la sustancia activa.

Entre las ventajas que tienen los mucoadhesivos es que se pueden aplicar en las cavidades gastrointestinales, rectal, bucal, nasal, respiratoria, oftálmicas y en la zona vaginal. De acuerdo a la necesidad terapéutica del paciente pueden estar en forma de comprimidos, multiparticulares (nanopartículas), pomadas, geles y películas o parches mucoadhesivos. (Duchêne, 1989)

6.6 Fibra alimentaria

“La fibra alimentaria se define como la parte remanente de las células vegetales resistente a la hidrólisis (digestión) por parte de las enzimas digestivas humanas” (Trowell, 1974). En éste concepto se engloban los componentes comestibles y se incluye un factor fisiológico importante: la indigestibilidad de la fibra en el intestino delgado. Los componentes son de origen vegetal y entre estos se encuentran la celulosa, hemicelulosas, lignina, así como ceras, cutina, y suberina. En 1976 se incluyen

polisacáridos indigeribles con algún efecto fisiológico, entre las que destacan las gomas, celulosas modificadas, oligosacáridos y pectinas. (Trowell, 1976).

En el 2001 la American Association of Cereal Chemist (AACCC) propone la siguiente definición:

“Fibra alimentaria es la parte comestible de plantas o carbohidratos análogos resistentes a la absorción del intestino delgado y con fermentación parcial o completa en el intestino grueso. Incluye polisacáridos, oligosacáridos, lignina, y sustancias vegetales asociadas. Promueve efectos fisiológicos beneficiosos como la laxación, y/o la atenuación de los niveles sanguíneos de colesterol y/o glucosa” (USA, American Association of Cereal Chemists, 2001)

En cuanto a su función en solubilidad en agua, la fibra alimentaria se divide en dos grandes grupos. Sin embargo el término de fibra soluble también incluye a aquellas que son solubles en disolución tampón con enzimas que emulen soluciones enzimáticas propias del sistema digestivo. En éste grupo se incluyen a un grupo de polisacáridos como las pectinas, goma y mucílagos presente en frutas, así como en avena, cebada y legumbres. Las insolubles están representadas por componentes de la pared celular vegetal como la celulosa, la lignina y la hemicelulosa, así como polímeros como el almidón resistente, la quitina y sus derivados.

En la Tabla 4 se resumen algunas de las fibras alimentarias más conocidas y sus fuentes de obtención más comunes.

Estructura		Monómeros	Fuente	
POLISACÁRIDA	SOLUBLE	Hemicelulosas solubles	Glucosa Ác. galacturónico Ácido glucurónico Xilosa	Plantas y partes comestibles
		Pectina	Arabinosa Fructosa, Galactosa Glucosa Ramnosa Xilosa Ác. galacturónico	Manzana Uva Limón Naranjas
		Maltodextrinas resistentes a la digestión	Glucosa	Patata procesada
		β -glucanos	Glucosa	Avena, Salvado, Centeno Pared de hongos y levaduras
		Gomas galactomanano	Manosa Galactosa	Pared células vegetales Gomas guar Algarrobo
		Gomas glucomanano	Manosa Glucosa	Pared células vegetales
		Psyllium	Arabinosa Galactosea Ác. galacturónico Xilosa	Semilla de Psyllium
		Inulina	Fructosa Glucosa	Alcachofa Cebada, Trigo Achicoria Cebolla
		Goma xantana	Glucosa Ramnosa Ác. glucurónico	Bacterias
		Agar	Galactose 3,6-anhydro-L-galactosa Sacáridos sulfonados Xilosa	Algas
NO POLISACÁRIDA	INSOLUBLE	Celulosa	Glucosa	Plantas y partes comestibles
		Hemicelulosa insoluble	Glucosa Ác. galacturónico Ácido glucurónico Xilosa	Plantas y partes comestibles
		Almidón resistente	Glucosa	Banana verde Patata y almidón procesado
		Quitina	Glucosamina	Invertebrados Hongos y levadura
		Lignina	Cinamil alcoholes Sacáridos	Pared de células vegetales
		Cutina	Ácidos grasos Ác. Grasos hidroxilados alifáticos	Pared de células vegetales
Suberina	Fenoles Hydroxiácidos polifuncionales Ác. dicarboxílicos Otros...	Células vegetales		

Tabla 4. Fibras alimentarias más conocidas y sus fuentes de obtención más comunes.

6.6.1 Goma guar parcialmente hidrolizada

La goma guar (GG) es una fibra soluble obtenida a partir de la planta leguminosa *Cyamopsis tetragonolobus L.* originaria de Estados Unidos, Sudáfrica, Australia, y sobre todo Asia, especialmente de la India y Pakistan (Kapoor & Juneja, 2009; Peter et al., 2001). En la industria alimentaria su uso es muy común y sirve como espesante,

gelificante y estabilizante en productos como zumos, salsas y productos lácteos, entre otros. Al poseer grandes efectos beneficiosos para la salud se le considera una de las fibras solubles más prometedoras.

Es un polímero de elevado peso molecular que estructuralmente está formado por galactomananos, consistentes en una esqueleto lineal de unidades Dmanopiranosilunidas mediante enlaces $\beta(1\rightarrow4)$, y unidades de α -D galactopiranosas unidas en posición O-6 aproximadamente cada dos manopiranosas del esqueleto principal.

La relación manosa:galactosa es aproximadamente 62:38 (McCleary & Prosky, 2001; Peter et al., 2001). En la industria alimentaria su uso es muy común y sirve como espesante, gelificante y estabilizante en productos como zumos, salsas y productos lácteos, entre otros. Al poseer grandes efectos beneficiosos para la salud se le considera una de las fibras solubles más prometedoras (Butt et al., 2007; Peter et al. 2001).

Sin embargo, al tener una elevada viscosidad puede dificultar su incorporación a los alimentos con finalidades nutraceuticas en concentraciones fisiológicamente activas.

La goma guar parcialmente hidrolizada (PHGG) se obtiene mediante la hidrólisis enzimática controlada de la misma. El proceso se realiza generalmente con enzimas endo- β -D-manasa procedentes de *Aspergillus niger*, lo que permite la obtención de compuestos con un grado de polimerización aproximadamente 10 veces inferior a la goma guar (Kapoor & Juneja, 2009). El producto final obtenido consiste en un polvo blanco que presenta una baja viscosidad en solución acuosa. Puede presentar una viscosidad de entre 2000-3000 mPa·s en solución acuosa al 1%, la viscosidad de la PHGG obtenida por métodos enzimáticos puede ser de aproximadamente 12 mPa·s (McCleary & Prosky, 2001). Un ejemplo de PHGG obtenidas mediante este proceso son los productos actualmente comercializados con los nombres de Benefiber® y Sunfiber®.

6.6.2 Pectina

La pectina se encuentra en un alto porcentaje en las frutas cítricas (limones, naranjas, uvas), en guayaba, manzana y en vegetales de color verde.

Es un polisacárido lineal que contiene de 300 a 1000 unidades de ácido D-galacturónico (por lo menos el 65%) unidas por enlaces glicosídicos α 1-4 además contiene L-ramnosa, D-galactosa y L-arabinosa.

Por su alta viscosidad, es el principal agente gelificante en la industria alimentaria y es utilizada en la producción de mermeladas, jaleas y jugos de fruta; también se emplea como estabilizante en bebidas lácteas acidificadas.

El consumo de fibra dietaria como pectina presenta beneficios para la salud, ya que posee propiedades anti-cancerígenas y contribuye a disminuir los niveles de glucosa y colesterol en sangre. Disminuyen la velocidad de absorción de los micronutrientes, incrementan la sensibilidad a la insulina, y aumentan la saciedad, lo que reduce el consumo total de energía.

6.7 Importancia de la formación de uniones adhesivas sobre la mucosa oral

La administración tópica siempre será más efectiva cuanto más tiempo permanezca el principio activo en contacto con la mucosa lesionada, sin embargo es complejo debido a la presencia de la saliva y a los movimientos generados con la lengua. Por tanto, es importante aumentar el tiempo de permanencia del fármaco en la boca, esto puede conseguirse mediante el incremento voluntario de la retención del mismo por parte del paciente, lo cual suele tornarse difícil debido a que los pacientes pueden no colaborar. Al diluirse el principio activo en la saliva y a la deglución involuntaria del paciente, existe riesgo de que se pierda la mayor parte de la sustancia activa. Sin embargo esto puede ser eficaz mediante el uso de diversos adhesivos que facilitarían la retención del sistema polimérico sobre la mucosa oral durante más tiempo sin la colaboración del paciente. (Beiro et al., 2003)

6.8 Formas farmacéuticas

Son muchos los investigadores que buscan desarrollar formas mucoadhesivas destinadas a que su administración sea sobre la mucosa bucal, gingival, rectal, nasal y ocular. (Singhal, 2010)

6.8.1 Preparaciones mucoadhesivas bucales

Este tipo de preparaciones no utilizan agua para su deglución, dosis exactas, rápido comienzo de acción, fácil de transportar, sabor agradable y cumplimiento por parte del paciente (Mishra y Amin, 2011). En éste rubro podemos mencionar los parches, comprimidos y geles. (Rodriguez et al, 2011)

Las preparaciones mucoadhesivas bucales se clasifican en tres tipos en función de su geometría: el Tipo I se trata de un dispositivo de una sola capa, en éste el fármaco se libera en forma multidireccional, lo que hace que se pierda una gran cantidad del fármaco debido a su ingesta. En el Tipo II consta de una capa de soporte impermeable que se superpone en la parte superior de la capa bioadhesiva cargada con el fármaco, previene la pérdida del fármaco de la superficie superior de la forma de dosificación en la cavidad oral. El Tipo III es unidireccional, la pérdida del fármaco es mínima, ya que solo se libera en un solo sentido desde el lado adyacente a la mucosa oral. Las formas de dosificación deben ser pequeñas y flexibles para ser aceptables para los pacientes sin causar irritación (Salamant-Miller et al., 2005)

Las preparaciones pueden ser en forma de tabletas, parches, películas y semisólidos como los geles y pomadas. Se describirán las películas bucales por ser de interés para este trabajo.

6.8.1.1 Películas bucales

Se consideran formas de dosificación que se han desarrollado recientemente. Son flexibles y cómodas si las comparamos con las tabletas. Poseen mayor duración en boca que los geles orales, los cuales son eliminados fácilmente por la saliva. Protegen la superficie de la herida, ayudando a reducir el dolor y tratar la enfermedad con mayor eficacia. Una biopelícula ideal debe ser flexible, suave, elástica aún en condiciones extremas para resistir roturas que podrían ser ocasionadas por los movimientos bucales, así como también suficiente fuerza mucoadhesiva para que permanezca en boca el tiempo que se considere necesario para que efectúe su acción. Si se llegara a producir el hinchamiento, no deberá ser demasiado extenso con el fin de evitar molestias. (Salamant-Miller et al., 2005)

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Cepas bacterianas y condiciones del cultivo

Los estudios experimentales *in vitro* se realizaron con cepas bacterianas ATCC de *Streptococcus sobrinus* 27607 y *Enterococcus faecalis* 11420 proporcionadas por el departamento de Microbiología oral de la Facultad de Odontología de la UANL. Fueron activadas en medio de cultivo Muller Hinton 9999. Para cada uno de los ensayos la preparación de inóculos bacterianos se realizó resiembra bacterianas en medio de cultivo Muller Hinton y después incubados a 37 °C durante 24 h.

7.2 Obtención del extracto etanólico de la planta

La planta utilizada fue la corteza de *Amphipterygium adstringens* (Cuachalalate) adquirida en la tienda naturista Pacalli Figura 1



Figura 1 Corteza de *Amphipterygium adstringens*

Para el estudio preliminar se adquirieron 50 g de corteza y se realizó la molienda en un molino tradicional, posteriormente se obtuvo el extracto con etanol al 100 %, 70 %, 50 % y 25 %, fueron colocados en agitación continua realizándose 3 extracciones cada 24 h (Figura 2). Los solventes se eliminaron mediante rotavapor a presión y temperatura reducida, los extractos obtenidos se almacenaron a 4°C para posteriormente ser sometidos a su análisis químico e identificar en cada concentración el contenido de fenoles totales.



Figura 2 Obtención del Extracto

Una vez realizados los ensayos preliminares y habiendo valorado la actividad antimicrobiana y la cuantificación de fenoles totales, se realizó el extracto con mejores resultados para la obtención de mayor rendimiento, por lo que se adquirieron 100 g de cuachalalate, después de su molido en el NutriBullet se obtuvieron 67.05 g con los que se procedió a realizar el extracto etanólico al 70 %, se colocó en un vaso de precipitado, y en agitación constante, se filtró con filtros de papel de Whatman Ltd y se colocó en el rotaevaporador para eliminar restos de solvente, se obtuvo el rendimiento de extracto y se almacenó en un frasco ámbar para posteriormente realizar los ensayos biológicos

7.3 Contenido Fenólicos Totales

Según la literatura el contenido fenólico determina la efectividad biológica de *A. adstringens*, por lo cual a los extractos obtenidos se les cuantificó su concentración de fenoles totales por el método descrito por Singleton y Rossi (1965) utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu, para lo cual a cada una de las muestras se les adicionó 250 uL de reactivo de Folin-Ciocalteu (1N), posteriormente se añadió Na_2CO_3 al 20% y después de reposar por 2hras. la observancia se midió a 760 nm. Los resultados se expresaron en mg de ácido gálico por g de extracto (mg/g extracto). El extracto que muestre el mayor contenido de fenólicos se procederá a incluir en el vehículo (película polimérica).

7.4 Evaluación de la propiedad antimicrobiana del extracto etanólico de *Amphipteryngium adstringens* contra *S. sobrinus* y *E. faecalis*

Para evaluar la actividad antimicrobiana del extracto, se realizó un ensayo preliminar en el que se empleó la técnica de pozo en agar. 100UL de *S. sobrinus* y *E. faecalis* se sembraron en agar de peptona de caseína ácida en estría cerrada, posteriormente se

hicieron pozos de 5 mm de diámetro, en cada uno de ellos fueron colocados 20 UI de cada concentración de extracto a evaluar así como el control positivo (clorhexidina al 0.12 %) y negativo (agua destilada estéril). (Figura 3) Se incubaron a 37°C y se dio lectura a las 24 h realizándose por triplicado. Se evaluó la presencia del halo de inhibición (Figura 4)



Figura 3. Técnica de pozo en agar



Figura 4. Cajas después de 24 h para observar el crecimiento del halo de inhibición

7.5 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico de *Amphipteryngium adstringens* contra *S. sobrinus* y *E. faecalis*

La Concentración Mínima Inhibitoria es la mínima concentración de un antibiótico que inhibe el desarrollo visible de un microorganismo. Se determinó la CMI por medio de la técnica de pozo en agar.

Evaluándose en concentraciones desde 70 a 3 mg/ml del extracto. 100UI de las cepas antes mencionadas se sembraron en agar Mullen Hinton, posteriormente se hicieron pozos de 5 mm de diámetro, en cada uno de ellos fueron colocados 20 UI de cada concentración de extracto a evaluar así como el control positivo (clorhexidina al 0.12 %)

y negativo (agua destilada estéril). Se incubaron a 37°C y se dio lectura a las 24 h realizándose por triplicado. Se evaluó la presencia del halo de inhibición.

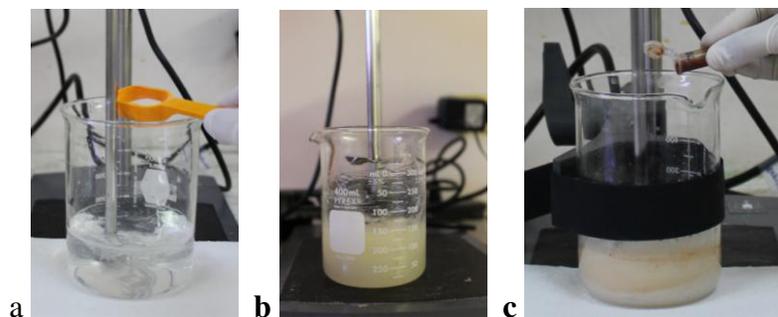
7.6 Diseño de una biopelícula bioadhesiva incorporando extracto etanólico de *Amphipteryngium adstringens*

Se empleó una combinación de pectina y goma guar utilizada comúnmente en la industria alimentaria. Estos fueron proporcionados por el Departamento de Ciencias en Alimentos de la Facultad de Ciencias Biológicas, Unidad B de la UANL.

Se diseñaron y evaluaron tres formulaciones poliméricas analizando diferentes factores como la relación de fase acuosa/orgánica, agitación, espesor entre otros, y seleccionar parámetros que permitieran el diseño de la película con propiedades ideales para el estudio.

Las concentraciones de goma guar valoradas oscilan entre 1 a 3 mg; la pectina entre 0.5 a 2 mg; otros compuestos incorporados fueron glicerina, agua y los extractos.

Fueron mezclados utilizando la propela IKA* EUROSTAR 60 digital a 350 rpm hasta lograr que la mezcla fuera homogénea. Después se pasó al homogenizador a 1500 rpm durante diferentes tiempos. Se determinó el pH de cada biopelícula con un potenciómetro Microprocessor pH Meter (Figura 5)



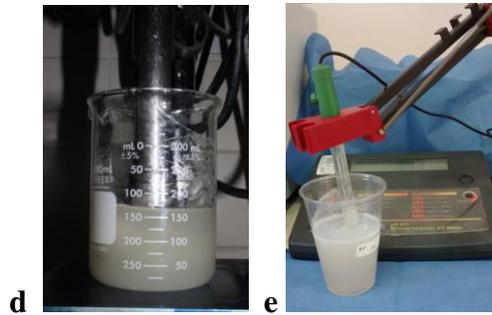


Figura 5. Preparación de la película polimérica (a) incorporando los polímeros. (b)Mezclando en la propela los polímeros. (c)Incorporación del extracto. (d)Agitando en el homogenizador e) Medición del ph

Una vez obtenida la mezcla se pesó y colocó en las cajas de Petri estériles. Se incubaron a 37°C por 24 h para su secado. (Fig. 6)

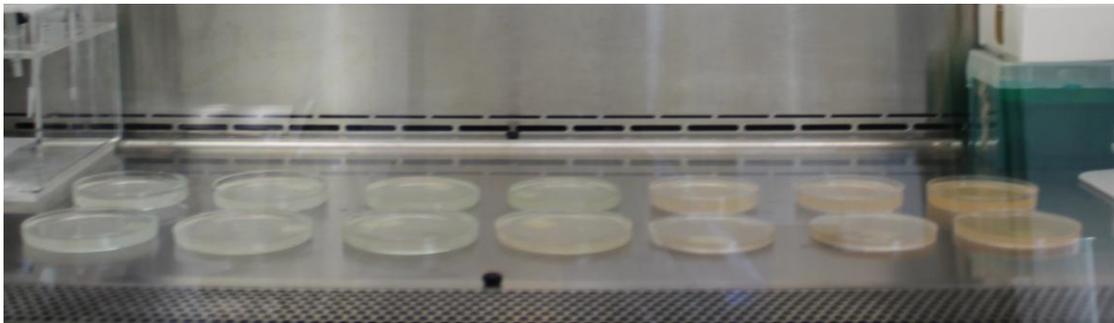


Figura 6. Películas poliméricas en cajas de Petri listas para ser colocadas en la incubadora.

La biopelícula se recuperó a las 36 h y posteriormente se obtuvieron discos de 6 mm de diámetro. Se procedió a medir el grosor de la misma con un micrómetro (Mitutuyo Digimatic) y posteriormente se almacenaron en cajas de Petri previamente identificadas. (Fig. 7)



Figura 7. a) Biopelícula lisa b) Perforación de biopelículas. c) Medición del grosor de las películas d) Almacenamiento de biopelículas en cajas de petri

7.7 Evaluación de las propiedades antimicrobianas de las biopelículas adicionadas con el extracto y determinación de la CMI

La evaluación antimicrobiana se realizó con las biopelículas obtenidas en disco por difusión en agar Mullen Hinton. Los discos fueron esterilizados antes de cada prueba en la cámara de luz ultravioleta (UV) durante 50 minutos como se muestra en la figura 8, para el ensayo 100UI de las cepas antes mencionadas se sembraron en agar y se colocaron las biopelículas bioadhesivas evaluándose la inhibición de cada concentración a estudio (Figura 9). Comparándose con la biopelícula de clorhexidina como control positivo al 0.2 % y la biopelícula como control negativo. Se incubaron a 37°C y se dio lectura a las 24, 48 y 72 h realizándose por triplicado, midiéndose el halo de inhibición e identificándose la CMI.

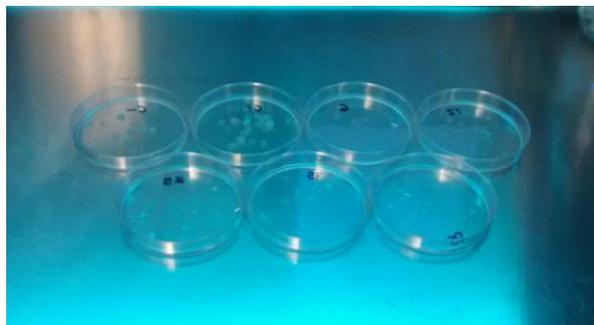


Figura 8. Esterilización de las biopelículas

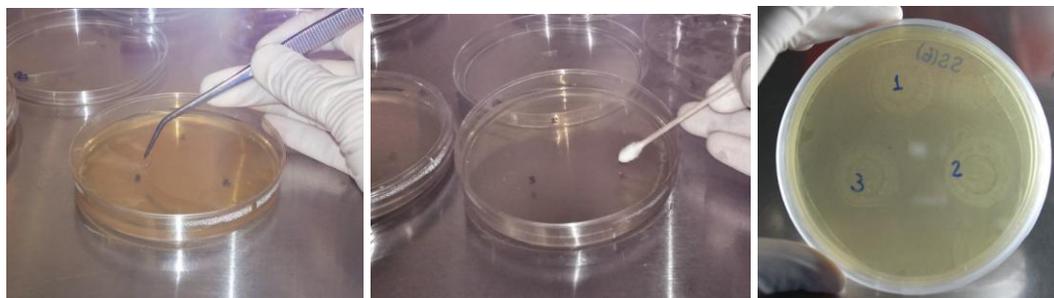


Figura 9. Técnica de sensibilidad por difusión de disco en agar

7.8 Cuantificación de fenoles en las biopelículas

Para cuantificar la cantidad de fenoles presente en cada disco, primero se determinó la cantidad de extracto presente en cada biopelícula de acuerdo a su peso inicial. Posteriormente se determina los gramos de extracto contenidos en cada disco de acuerdo a su peso. Aunado a esto se utilizó el contenido de fenoles totales equivalentes en mg de ácido gálico por gramos de extracto crudo para determinar la cantidad de fenoles en la biopelícula y con base en esto lo presente en cada disco. Figura (colocar fórmula)

7.9 Determinación de la actividad acuosa (aw) de las biopelículas bioadhesivas

La actividad acuosa o aw por sus siglas en inglés (activity water) es la cantidad de agua libre que hay en un alimento, es decir, la cantidad de agua disponible para reaccionar químicamente con otras sustancias y provocar el crecimiento microbiano.

Primeramente los discos de biopelículas fueron pesados y se colocaron para su análisis mediante el AQUA LAB Modelo 4TE, que determina la actividad acuosa presente en cada unidad de análisis (Figura 10).



Figura 10. Medición de la actividad acuosa (aw)

Posteriormente se desecaron en la estufa a 70°C por 24 h. Pasado éste tiempo se pesaron nuevamente para determinar el volumen de agua perdido.

8. RESULTADOS

8.1 Obtención del extracto

En relación a la obtención del extracto se obtuvo un rendimiento total de 26 %. Posteriormente se cuantificó la concentración de fenoles presentes en el mismo. A los extractos obtenidos se les cuantificó su concentración de fenoles totales. Los resultados se expresaron en mg de ácido gálico por g de extracto crudo (mg/g extracto). El extracto que mostro el mayor contenido fenólico fue el AA3 correspondiente al de una relación 70/30 etanol/H₂O, como se muestra en la Tabla 5 y 6

Extracto	Fenoles Totales (mg/g)
AA1	56.04 ± 12
AA2	32.27 ± 8
AA3	160.58 ± 22
AA4	157.65 ± 19

Tabla 5. Resultados de los compuestos fenólicos del cuachalalate

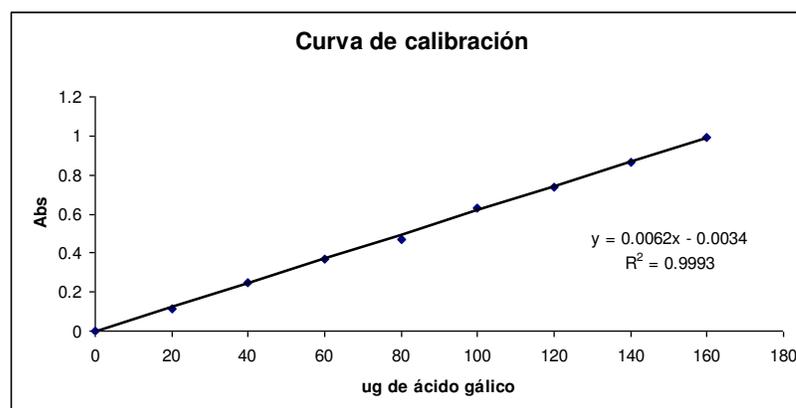


Tabla 6. Curva de calibración del contenido total de fenoles del cuachalalate

En lo que respecta a la evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto seleccionado se realizó un ensayo preliminar en donde se emplearon concentraciones de 70 a 3 mg/ml de extracto, siendo para ambas cepas evaluadas la mayor actividad a la concentración 70 mg/mL

Siendo el que mostró actividad antimicrobiana el que correspondió a la concentración de 6mg/ml ya que mostro un halo de inhibición de 3mm; la de 12mg/ml de 3.5mm; la de 4.5mm/ml de 4.5mm; la de 50mg/ml y 70mg/ml de 5.5 mm y 7.5 respectivamente contra el *S. sobrinus*

Para el *E. faecalis*, el halo de inhibición del extracto de 6mg/ml fue de 2mm; la de 12, 25, 50 y 70 mg/ml tuvo un crecimiento de 3, 5, 5.5 y 7 mm respectivamente.

El promedio del triplicado de controles positivos contra el *S. sobrinus* mostró un crecimiento del halo de inhibición de 13.33mm. Los negativos no mostraron crecimiento.

Contra el *E. faecalis* el halo del control positivo fue de 14mm. Los resultados se muestran en la tabla 7.

Extracto mg	HALOS DE INHIBICIÓN (HI)			CHI	3 <i>Ss</i>	Extracto mg	CHI
	1 <i>Ss</i>	2 <i>Ss</i>	PROMEDIO				
3	0	0	0	C -	0	6	2
4	0	0	0	C -	0	12	3
5	0	0	0	C+	13	25	5
6	3	3	3	C+	14	50	5.5
12	3	4	3.5	C+	13	70	7
25	5	4	4.5	PROMEDIO	13.33	C+	14
50	5	6	5.5			C-	0
70	8	7	7.5			C-	0
						C-	0

Tabla 7. Resultados de la evaluación antimicrobiana de los extractos.

8.4 Concentración Mínima Inhibitoria contra el *S. sobrinus* y *E. faecalis*

Se determinó la CMI por medio de la técnica de pozo en agar.

El extracto de *Amphipterygium adstringens* o cuachalalate exhibió una CMI de 5mg/ml contra ambas cepas estudiadas en éste ensayo: *Streptococcus sobrinus* 27607 y *Enterococcus faecalis* 11420.

8.5 Elaboración de las biopelículas bioadhesivas incorporando el extracto.

De las tres formulaciones poliméricas se optó por elegir la que mostraba mejores características físicas para este trabajo. Se mezcló en la propela a 350 rpm y después en el homogenizador a 1500 rpm a diferentes tiempos. Se midió el pH con un potenciómetro (Beckman). Se vaciaron en cajas y se pesó la mezcla. Se incubaron a 37°C y se recuperaron a las 36 h. Se perforaron para obtener discos de 6 mm de diámetro. El pH promedio de la formulación fue de 3.42. Tabla 8

Extracto mg	PH
6	3.3
12	3.41
25	3.48
50	3.52
70	3.6
C+	3.4
C-	3.29
PROMEDIO	3.42857143

Tabla 8. pH de las películas

8.5.1 Espesor de los discos de las biopelículas

Se midió el grosor de los discos poliméricos con un micrómetro digital. Presentaron un grosor promedio de .084 mm. (Tabla 9)

Extracto mg	GROSOR (mm)
6	0.095
12	0.095
25	0.095
50	0.094
70	0.08
C+	0.068
C-	0.065
PROMEDIO	0.08457143

Tabla 9. Grosor de las películas

8.6 Evaluación de las propiedades antimicrobianas de las biopelículas adicionadas con el extracto

La actividad antimicrobiana de los discos poliméricos se determinó por medio de la prueba de difusión en agar. Los discos fueron esterilizados con UV durante 50 minutos previos a cada prueba.

8.6.1 Actividad antimicrobiana de la biopelícula bioadhesiva sobre el *Streptococcus sobrinus*

La biopelícula adicionada con el extracto de *Amphipteryngium adstringens* a diferentes concentraciones presentaron inhibición de crecimiento. La biopelícula de 5mg/ml no mostró actividad a las 24 y 48 h. La adicionada con 6 mg/ml de extracto produjo un halo de 13mm, la de 12 y 70 mg de 14mm, la de 25 fue de 18 mm y la de 50 mg de 15mm. La adicionada con el control positivo de 17 mm. Todas éstas a 24 hrs. Se hicieron triplicados y el promedio de la 6 y 12 mg/ml fue de 12.66 mm; la de 25 mg/ml de 16.66 mm; la de 50 mg/ml de 14.66 mm; la de 70 mg/ml de 14.33 mm. El control positivo de 16.33 mm. (Tabla 10)

Halos de inhibición <i>Streptococcus sobrinus</i> 24 h				
Extracto mg	1	2	3	PROMEDIO
6	13	13	12	12.6666667
12	14	13	11	12.6666667
25	18	14	18	16.6666667
50	15	14	15	14.6666667
70	14	14	15	14.3333333
C+	17	16	16	16.3333333
C-	0	0	0	0

Tabla 10. Crecimiento del halo de inhibición del *S. sobrinus* a 24 h

8.6.2 Actividad antimicrobiana de la biopelícula bioadhesiva sobre el *Enterococcus Faecalis*

La biopelícula adicionada con 5 mg/ml no presentó crecimiento; la de 6 y 70mg/ml de extracto produjo un halo de 14mm, la de 12 mg/ml de 16mm, la de 25 y 50 mg/ml de 15mm. La adicionada con el control positivo de 16 mm. Todas éstas a 24 hrs. Se hicieron triplicados, el promedio de la de 6 mg/ fue de 14 mm; de la de 12 mg/ml de 15.33; la de 25mg/ml de 15.66; la de 50 y 70 mg/ml 14.66mm; el control positivo de 16.33 mm. (Tabla 11)

Halos de inhibición <i>Enterococcus faecalis</i> 24 h				
mg Aa	1	2	3	PROMEDIO
6	14	13	15	14
12	16	14	16	15.3333333
25	15	15	17	15.6666667
50	15	15	14	14.6666667
70	14	14	16	14.6666667
C+	16	16	17	16.3333333
C-	6	6	6	6
			PROMEDIO	14.8666667

Tabla 11. Crecimiento del halo de inhibición del *E. faecalis* a 24 h

8.7 Concentración Mínima Inhibitoria del extracto mediante el uso de la biopelícula bioadhesiva

Se utilizó la técnica de difusión en disco. Se colocaron discos adicionados en concentraciones de 70 a 3 mg/ml de extracto. La CMI fue de 5 mg/ml para ambas cepas.

8.8 Cuantificación de fenoles en los discos bioadhesivos poliméricos.

Se cuantificó el contenido de fenoles totales equivalentes en mg de ácido gálico por gramos de extracto crudo para determinar cuál concentración sería la que contenía mayor cantidad de fenoles, y sobre ésta realizar la incorporación del extracto a la biopelícula y así cuantificar la cantidad de fenoles presentes en cada disco de acuerdo a su peso. El de 6 mg/ml exhibió 0.07342 ug de fenoles; el de 12 mg/ml de 1.29ug; el de 25 mg/ml de 2.5 ug; el de 50 mg/ml de 5.55 ug y el de 70 mg/ml de 7.69 ug. (Tabla 12)

Fenoles mg/g	Película	mg ext disco	g ext disco	fenoles BP	fenoles/disco ug
161	6	0.000456025	4.5603E-07	7.342E-05	0.07342003
	12	0.0080553	8.0553E-06	0.0012969	1.2969033
	25	0.01555542	1.5555E-05	0.00250436	2.504355
	50	0.0331276	3.3128E-05	0.00533361	5.333608
	70	0.04782056	4.7821E-05	0.00769918	7.699181

Tabla 12. Cuantificación de fenoles en las biopelículas

8.9 Actividad acuosa de las biopelículas

La aw se determinó colocando los discos poliméricos en el AQUA LAB, se hicieron triplicados y el promedio de la biopelícula de 6 mg/ml fue de 0.6064; la de 12 mg/ml 0.6627; 25 mg/ml de 0.6132; la de 50mg/ml 0.5926; la de 70 mg/ml de 0.6364; el control positivo de 0.6216. (Tabla 13). Por tanto al tener un aw que se encuentra entre el rango de 0.5926-0.6627 se considera que su vida útil puede ser más larga ya que la posibilidad de crecimiento bacteriano será más tardado.

mg/ml	1	2	3	PROMEDIO
6	0.6059	0.6067	0.6067	0.60643333
12	0.6627	0.6628	0.6627	0.66273333
25	0.6126	0.6134	0.6136	0.6132
50	0.5913	0.5933	0.5934	0.59266667
70	0.6361	0.6368	0.6363	0.6364
C+	0.6213	0.6216	0.6221	0.62166667
C-	0.6665	0.6683	0.6686	0.6678

Tabla 13. Aw de las biopelículas

DISCUSIÓN

La cavidad bucal es una de las zonas que mayor colonización bacteriana posee. Entre las enfermedades más comunes en la cavidad bucal están la periodontitis y caries dental, sin un tratamiento temprano nos llevan a la pérdida gradual de dientes. Ante cualquier procedimiento quirúrgico, se busca sustancias terapéuticas que se liberen de forma local y tópica debido a que los efectos secundarios suelen ser mínimos comparados con la vía sistémica.

Actualmente México es considerado después de China, un país que usa la herbolaria tradicional alternativa para tratar padecimientos de distinta naturaleza, éstos contienen principios activos que al ser administrados en dosis suficientes, producen efectos terapéuticos ejerciendo una acción farmacológica. Entre estas plantas se encuentra una que en los últimos años ha sido causal de estudio por las propiedades que posee. La corteza del *Amphipterygium adstringens* o *Juliania adstringens* Schlechter mejor conocida como “Cuachalalate”.

En este trabajo el extracto de cuachalalate en concentraciones de 5 mg/ml presentó actividad inhibitoria frente al *Streptococcus sobrinus* y *Enterococcus faecalis*.

Sardi de Cássia en 2010 utilizó el extracto de cuachalalate a concentraciones que van de .005 a 4 mg/ml sobre el *Cándida albicans* sin embargo la concentración de 0.12 mg/ml fue la más efectiva comparada con los 6mg/ml que se necesitó para causar inhibición sobre el *S. sobrinus* y *E. fecalis*.

Rodriguez García (2010) trabajó sobre microorganismos periodontopatógenos utilizando diversas plantas para medir la actividad antibacteriana. El extracto de *Amphipterygium adstringens* exhibió una concentración mínima inhibitoria de 37mg/mL contra cepas de *Porphyromonas gingivalis* y *Agregatibacter actinomycetemcomitans*. Sobre *S. sobrinus* y *E. fecalis* fue de 6mg/ml, sin embargo la concentración de 25mg/ml fue la que más inhibió el crecimiento bacteriano de ambas cepas al cabo de 24 hrs.

Ruiz Bustos en el 2009 utilizó un extracto metanólico de *Amphytergium adstringens* para medir la actividad antibacterial de *S. flexneri*, *S. aureus* y *E. Coli*. La CMI que exhibió fue de 190-250 ug/ml y de 380-500ul/ml respectivamente.

Para producir un efecto inhibitorio bacterial se necesitaron cantidades más bajas contra *S. flexneri*, *S. aureus* y *E. Coli* que contra *S. sobrinus*, *E. fecalis*, *Porphyromonas gingivalis* y *Agregatibacter actinomycetemcomitans*, siendo estas dos últimas las que más concentración necesitaron para inhibirse.

Con la incorporación de éste extracto, con propiedades antibacterianas a una biopelícula bioadhesiva, se busca que sea liberado de manera sostenida y que se mantenga en contacto directo con la mucosa bucal pero que también se considere de fácil administración y a la vez sea cómodo para el paciente.

La goma guar y pectina se encuentran en un sin fin de alimentos, pero tiene la particularidad de tener características mucoadhesivas, biocompatibles y comestible, lo que lo hace una opción para la fabricación de biopelículas. incorporando extractos de plantas que albergan propiedades medicinales.

El cuachalalate o *A. adstringens* posee una gran variedad de sustancias que la hacen tener propiedad farmacológicas, entre las que destacan están los fenoles. A parte de ser un agente antibacterial también se le atribuye propiedades cicatrizante y antioxidante por lo que fue conveniente cuantificar la cantidad de fenoles presentes en los discos poliméricos

LITERATURA CITADA

- Agustina A., Martinelli M., Strumia M., Desarrollo de un sistema mucoadhesivo empleando quitosan como matriz. Su posible aplicación en lesiones de la mucosa oral. 2do Encuentro de Jóvenes Investigadores en Ciencia y Tecnología de Materiales, 2008.
- Beiro R., Vidal M.C., Vidal I., Orgeira J., Papel de los bioadhesivos en el tratamiento tópico de las enfermedades orales, Revista de la SEMG N° 50, Enero 2003, p. 486.
- Boyer, R. (2001). Conceptos de Bioquímica, Metabolismo del colesterol. México: Thomson.
- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales*. Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales: Acribia S. A.
- Butt, M. S., Shahzadi, N., Sharif, M. K., & Nasir, M. (2007). Guar gum: A miracle therapy for hypercholesterolemia, hyperglycemia and obesity. *Critical Reviews in Food Science Nutrition*, 47(4), 389.
- Carretero Accame, M. E. (2000). Compuestos fenólicos: Taninos, N° 235, Consejo General de Colegios Farmacéuticos. *Panorama actual Med*, p.633 y 634
- Chuang, S., Perrot, D., Susaria, S., Dodson, T. (2007). Age as a risk factors for third molar surgery complications. *J Oral Maxillofac Surg*, 65: 1685-1692.
- Duchêne, D. y. (1989). Bioadhesion: a new pharmacotechnical method for improving therapeutic efficiency. *S.T.P.Pharma.* , 5 (12): 830-838.
- Gupta M., Gupta A. K., In vitro cytotoxicity studies of hydrogel pullulan nanoparticles prepared by aot/n-hexane micellar system, *J Pharm Pharmaceut Sci* (www.ualberta.ca/~csps) 7(1), 2004, p. 38-46
- Gutiérrez V E, V. A. (2003). Contenido de compuestos fenolicos en arbustos y árboles forrajeros en San Lucas, Michoacán. *XIV Encuentro de Investigación Pecuaria y Producción Animal* , (págs. p182-186.). Morelia, Michoacán.
- Kapoor, M., & Juneja, L. (2009). Partially Hydrolyzed Guar Gum Dietary Fiber. In *Anonymous Fiber Ingredients*. CRC Press.

Martín A., “Diseño y formulación de películas poliméricas como sistema de transporte de clorhexidina”, tesis para optar al título de químico farmacéutico, Universidad Nacional de Colombia, 2009, p. 3

Martínez, M. (1979) *Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas*. Fondo de Cultura Económica, México.

Martínez, M. (1944). *Plantas medicinales de México*. México: Botas, Tercera edición.

Mata, R. C. (1991). Long Chain phenols from the bark of *Amphipterygium adstringens*. *Journal of Ethnopharmacology*, 34: 147-154 p.

Mathiowitz E., Chickering D., y Lehr C., “Bioadhesive Drug Delivery Systems Fundamentals, novel approaches and development”, Marcel Dekker Inc, New York, 1999, p. 3 - 65.

McCleary, B. V., & Prosky, L. (2001). *Advanced dietary fibre technology*. Ed. Blackwell Science.

Méndez, S.A. (1954) *Estudio químico de la corteza de Juliania adstringens Schiede L.(Cuachalalate)*. Tesis Profesional. Facultad de Química. ENCB-IPN, México, D.F.

Mishra R., Amin A., Formulation and Characterization of Rapidly Dissolving Films of Cetirizine hydrochloride using Pullulan as a Film Forming Agent, *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 45, 2011, p. 71.

Mycek, M. J. (2004). *Farmacología*. México: Mc Graw Hill, 2a edición.

Navarrete C.A., (1986) *Estudio químico de plantas mexicanas usadas en medicina tradicional: constituyentes de Chenopodium graveolens Willd., Chenopodium ambrosioides L., y Amphipterygium adstringens Schiede ex Schlecht*. Tesis de Maestría en Ciencias. Fac. de Ciencias, UNAM. México, D.F.

Niembro, R. (1986). *Arboles y arbustos útiles de México*. Depto de bosques UACH. Chapingo, México: Limusa.

Olivera OA, S. H. (1999). Phytochemical study of cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*, Schiede ex Schlechter. *J. Ethnopharmacol*, 68:109-113.

OMS. (1978). <http://www.OMS.com.mx>.

Patel, D. P. (2012). Buccal Mucosa as A Route for Systemic Drug Delivery: A Review. *Int. J. Drug Dev & Res*.

Pengelly, A. (1996). *The constituents of Medicinal Plants*. 2nd Ed. Cabi Publishing, Zaragoza.

Peter, R. E., Wang, Q., Rayment, P., Ren, Y., & Simon Ross-Murphy (2001). Guar Gum. In Anonymous Handbook of Dietary Fiber: CRC Press

Raspall, G. (2002). Madrid, España. En *Cirugía Oral: Exodoncia simple y complicada* (Segunda Edición ed., págs. 99-142). Panamericana.

Rekha M. R., Sharma C. P., Pullulan as a Promising Biomaterial for Biomedical Applications: A Perspective, *Trends Biomater. Artif. Organs*, Vol. 20 (2), 2007, p.1.

Rodríguez A., Elaboración de biopelículas a base de quitosan y pululano adicionadas con extractos de cinco diferentes plantas y su evaluación en cultivos de microorganismos periodontopatógenos, Requisito parcial para obtener el Grado de Doctor en ciencias con especialidad en biotecnología, Universidad Autónoma de Nuevo León, 2011, p. 6.

Rodríguez I., Cerezo A., Salem I., Sistemas de liberación Bioadhesivos, *ArsPharmaceutical*, 41, Vol 1, 2000, p. 124.

Romero L C E, P. G. (2000). Influencia del pastoreo en la concentración de fenoles y taninos condensados en *Gliricidia sepium* en el trópico seco. *Livestock Research for Rural Development*, 4(12):1-9.

Salamat-Miller N., Chittchang M., Johnston T. P., The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 2005, p. 1666 – 1691.

Sharapin, N. C. (2004). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Colombia: CITED.

Singhal, P. J. (2010). Formulation and evaluation of buccal patches of terbutaline sulphate. *Int. J. Res. Pharm*.

Soriano, G. T.-O. (1987). Structure and stereochemistry of methyl ester of 3-oxolanosta-7, 24-dien-26oic acid (masticadienonic acid). *Acta Crystallographyca*, 43: 990-992.

Sungsoo Cho S, Dreher, ML. Handbook of Dietary Fiber. Marcel Dekker Inc. New York, USA. 2001: capítulo 30.

Taiz, L. y. (2006). "Secondary Metabolites and Plant Defense". Plant Physiology. Fourth Edition. Sinauer Associates, Inc.

Theuwissen E, Mensink R. Water soluble dietary fiber and cardiovascular disease. *Physiology & Behavior*. 2008; 94:285-292.

Trowell, H. (1976). Definition of dietary fiber and hypotheses that it is a protective factor in certain diseases. *American Journal of Clinical Nutrition*, 29(4), 417-427.

Trowell, H. (1974). Editorial: Definitions of fibre. *Lancet*, 1(7856), 503.

U.S. Department of Agriculture (USDA) (2011). National Nutrient Database for Standard Reference, Release 24. Nutrient Data Laboratory Home Page.

Willats W, Knox P, Mikkelsen D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food & Technology*. 2006; 17:97-104.