



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIO QUÍMICO DE LA ESPECIE VEGETAL MEDICINAL *SEDUM OXYPETALUM* KUNTH
(CRASSULACEAE) Y SU CAPACIDAD PARA INDUCIR LA DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA EN
CÉLULAS DERIVADAS DEL LIGAMENTO PERIODONTAL.

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. GONZALO RODOLFO LARA ISSASI

TUTORA: DRA. MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS
FACULTAD DE QUÍMICA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., NOVIEMBRE DE 2018.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

- ✦ A la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado.
- ✦ A las Facultades de Química y Odontología e Institutos de Química y Física de la UNAM.
- ✦ A la Dra. María Isabel Aguilar Laurents, por la constante y valiosa asesoría recibida durante mis estudios de posgrado; pero más importante, por permitirme desarrollar un proyecto doctoral desde cero, con todas las dificultades que esto implicó, pero resultando también en mi mayor logro académico hasta la fecha.
- ✦ A los Dres. Andrés Navarrete Castro y Mariano Martínez Vázquez, quienes siendo miembros del comité tutor aportaron continuamente ideas para la oportuna conclusión de esta investigación.
- ✦ A las Dras. Rachel Mata Essayag y María Dolores Hernández Navarro y a los Dres. Andrés Navarrete Castro, Eduardo Guillermo Delgado Lamas y José Fausto Rivero Cruz, quienes siendo integrantes del sínodo aportaron valiosas observaciones al trabajo.
- ✦ Al Dr. Higinio Arzate y a la Dra. Lía Alioth Hoz Rodríguez por la colaboración para la realización de las pruebas celulares, a la Dra. Argelia Almaguer Flores por la colaboración para los ensayos de actividad antimicrobiana y al M. en C. Rodrigo Correa Prado por la colaboración en los ensayos de nucleación.
- ✦ Al Dr. José Luis Ruvalcaba Sil del Laboratorio Nacional de Ciencias para la Conservación del Patrimonio Cultural (LANCIC Instituto de Física), por su colaboración en estudios espectroscópicos.
- ✦ A la Q. Nitziné Esmeralda Ocampo Ávila y al M. en C. Alberto Cedillo Cruz, por realizar el refinamiento de las estructuras cristalinas a partir de difracción de rayos X de polvos y monocristal respectivamente.
- ✦ Al personal académico de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAII), en particular al Q. Rafael Iván Puente Lee, por su valiosa asesoría profesional.
- ✦ A la Q. Alejandrina Acosta Huerta, a los M. en C. Antonio Nieto Camacho y Omar Noel Medina Campos del Instituto y Facultad de Química respectivamente, por su apoyo en análisis farmacológicos *in vitro*.
- ✦ A Samuel Alfonso Arriaga García por su asesoría en materia legal y derechos de biodiversidad.
- ✦ A Roberto Díaz y Ramiro del Carmen por su asistencia técnica computacional.
- ✦ Al CONACyT por la beca otorgada para la realización de mis estudios de doctorado (Convenio 271106).
A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) proyectos IN 225017, IN 220416 e IT 200414 y al proyecto CONACyT LN279740 por el financiamiento para la realización de este trabajo multidisciplinario.

DEDICATORIA

Este trabajo ha sido mi mayor reto académico hasta el momento, desde la concepción del proyecto, durante su desarrollo y hasta su presentación final que es esta tesis. Es preciso decir que es un trabajo donde intervinieron muchas personas, las cuales contribuyeron no sólo con ideas sino también con apoyo en momentos difíciles, a todas ellas dedico esta tesis.

A mis padres Gonzalo Lara y Patricia Issasi por su incondicional cariño, pues si algo he hecho bien en mi vida es, en gran medida, gracias a su oportuna dirección. A mi hermana Jacqueline Lara por su constante presencia positiva y su apoyo. A mi abuelita Áurea Gabriela Castañeda por ser la persona más noble que haya conocido en mi vida y mostrarme la verdadera bondad y a mi abuelo Rodolfo Issasi, quien estoy seguro que dondequiera que esté, seguramente sigue pensando en darme buenos consejos.

A mi querida Nitziné Ocampo por estar conmigo tanto en las buenas como en las malas, por compartir tanto ideas y trabajo en el sentido académico como cariño y fuerzas para perseverar y recordarme constantemente porqué valía la pena seguir con este proyecto. A mi amigo Samuel Arriaga por ser no sólo mi amigo desde la infancia sino un hermano junto con mi primo Rodolfo Flores, entre los tres siempre hicimos equipo para ayudarnos mutuamente.

A mis amigos, que si tratara de mencionarlos a todos requeriría muchas hojas, pues afortunadamente son muchos, Denhí Rodríguez, Fidel Ángel Carbajal, David Jiménez, Cristian Alvarado, Nancy Lara, Marco García, Alberto Cedillo, Simone Barbonetti, Marco Vargas, Josué Varela y Héctor González. El tener tan buenas amistades es clave para la felicidad de cualquier persona, todos ustedes han traído alegría a mi vida y esta es mi manera de agradecerles.

Y una mención especial a los tiburones ballena.

*La madre naturaleza habla en un lenguaje que se entiende
dentro de la mente pacífica del observador sincero.*

Radhanath Swami

PUBLICACION CIENTÍFICA INDIZADA

El presente trabajo fue publicado en la revista internacional *Journal of Ethnopharmacology*, de la editorial Elsevier.

- ✦ Gonzalo R. Lara-Issasi, Nitzine E. Ocampo, Lia Hoz-Rodriguez, Rodrigo Correa-Prado, Alberto Cedillo-Cruz, Higinio Arzate, Maria I. Aguilar*. Aqueous extract of *Sedum oxypetalum* induces mineralization and osteogenic differentiation by human Periodontal Ligament-Derived cells. *Journal of Ethnopharmacology* **225** (2018) 159–168.
doi.org/10.1016/j.jep.2018.07.005

CONGRESOS Y SIMPOSIOS DONDE SE PRESENTÓ EL TRABAJO

El presente trabajo se presentó en el congreso internacional:

- ✦ “*American Society of Pharmacognosy Annual Meeting*” celebrado en la ciudad de Portland, Estados Unidos de América, el mes de julio de 2017 con el título “*Sedum oxypetalum*. Chemical characterization and osteogenic differentiation by Human Periodontal Ligament-Derived cells”.

En el simposio:

- ✦ Jornada de la Investigación de la Facultad de Química de la UNAM 2016 con el título “Estudio químico y evaluación de la actividad regenerativa en células periodontales de la especie vegetal medicinal *Sedum oxypetalum* Kunth (Crassulaceae)”, el cual fue premiado con el segundo lugar.

Y en el congreso nacional:

- ✦ 51° Congreso de la Sociedad Química de México, celebrado en la ciudad de Pachuca, Hidalgo, el mes de septiembre de 2016 con el título “Estudio Químico y evaluación de la actividad regenerativa en células periodontales de la especie vegetal medicinal *Sedum oxypetalum* Kunth (Crassulaceae)”.

SITIOS DONDE SE REALIZÓ EL TRABAJO

El presente trabajo se realizó en la Ciudad Universitaria de la Universidad Nacional Autónoma de México como se indica a continuación como se indica a continuación:

La obtención de los extractos, fraccionamiento y caracterización de las sustancias derivadas de los mismos se realizó en el laboratorio 111 del edificio de Farmacia de la Facultad de Química de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. María Isabel Aguilar Laurents.

Las pruebas celulares, ensayos de nucleación y pruebas microbiológicas se realizaron en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Odontología de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Higinio Arzate en los dos primeros casos y de la Dra. Argelia Almaguer Flores para el tercero.

Los análisis de Resonancia Magnética Nuclear fueron realizados en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII), así como en el Instituto de Química de la UNAM, con el apoyo del Dr. Raúl Guillermo Enríquez Habib y la Dra. Isabel Chávez Uribe.

Los estudios de inhibición de enzimas ciclooxigenasas se realizaron en el Instituto de Química de la UNAM con el apoyo del M. en C. Antonio Nieto Camacho.

Los análisis de espectroscopía Raman e infrarrojo se realizaron en el Instituto de Física de la UNAM con el apoyo del Dr. José Luis Ruvalcaba Sil.

Los análisis de microscopía electrónica de barrido y de transmisión fueron realizados en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII) de la UNAM con el apoyo del Q. Rafael Iván Puente Lee.



ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	I
GLOSARIO DE ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS	IV
ÍNDICE DE CUADROS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE ANEXOS	XI
ABSTRACT.....	1
KURZFASSUNG.....	2
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	7
Justificación	7
Hipótesis.....	7
Objetivos	8
Objetivo general.....	8
Objetivos particulares	8
ANTECEDENTES	9
1. Las enfermedades periodontales.....	9
1.1. Prevalencia general en la población.....	10
1.2. Causas de la gingivitis y de la periodontitis.....	12
1.3. Relación de la periodontitis con condiciones sistémicas	12
1.4. Enfoque multi objetivo en el tratamiento de la periodontitis	18
1.5. Uso de plantas como tratamiento tradicional contra la periodontitis	19
2. La familia Crassulaceae	20
3. El género <i>Sedum</i> L.	21
3.1. Distribución y hábitat del género <i>Sedum</i>	22
3.2. Composición química del género <i>Sedum</i>	22
4. <i>Sedum oxypetalum</i> Kunth (Crassulaceae).....	27
4.1. Nombres comunes	27
4.2. Clasificación taxonómica	27
4.3. Sinonimia.....	27
4.4. Descripción botánica de la especie y distribución geográfica.....	28
4.5. Usos reportados de la especie vegetal.....	28



PARTE EXPERIMENTAL	30
1. Material y equipos	30
1.1. Material cromatográfico	30
1.2. Medios de cultivo y reactivos.....	30
1.3. Obtención de las células humanas derivadas del ligamento periodontal (hPDLs)	30
1.4. Material vegetal	31
1.5. Equipos analíticos y programas para análisis.....	31
1.5.1. Rotavapor	31
1.5.2. Espectroscopía de Infrarrojo (IR), Raman y Fluorescencia de rayos X (XRF)	31
1.5.3. Resonancia Magnética Nuclear.....	32
1.5.4. Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (GC-MS)	32
1.5.5. Espectrometría de Emisión Atómica de Plasma inducido por Microondas (MP-AES).....	32
1.5.6. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y de transmisión de alta resolución (HR-TEM) ..	33
1.5.7. Difracción de Rayos X de monocristal.....	33
1.5.8. Difracción de Rayos X de polvos	33
2. Caracterización química	34
2.1. Obtención y fraccionamiento de extractos.....	34
2.2. Análisis general del suelo y de cenizas de las partes aéreas.....	37
2.3. Cálculo de la concentración de sólidos en el extracto acuoso.....	38
2.4. Cuantificación de cationes metálicos en el extracto acuoso	38
3. Pruebas farmacológicas	38
3.1. Pruebas de actividad antioxidante.....	38
3.1.1. Ensayos de Folin, DPPH y ABTS	38
3.1.2. Ensayos de atrapamiento de especies reactivas de oxígeno (ROS)	39
3.2. Actividad antiinflamatoria vía inhibición <i>in vitro</i> de ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2)	40
3.3. Actividad antimicrobiana ante bacterias periodontopatógenas	41
4. Pruebas celulares	42
4.1. Proliferación celular y citotoxicidad.....	43
4.2. Actividad de la fosfatasa alcalina (ALP).....	44
4.3. Detección y cuantificación de la mineralización	44
4.4. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR).....	45
5. Ensayos de nucleación	46



RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
1. Caracterización de los extractos	47
1.1. Análisis elemental de suelo y de cenizas de las partes aéreas	47
1.2. Cálculo de la concentración de sólidos totales en el extracto acuoso.....	48
1.3. Identificación de los componentes del extracto orgánico	48
1.4. Identificación de los componentes en el extracto acuoso.....	50
1.4.1. Identificación y resolución de los confórmers de la sedoheptulosa.....	51
1.4.2. Determinación de la proporción relativa entre los confórmers de la sedoheptulosa.....	55
1.4.3. Identificación de los componentes volátiles del extracto acuoso	56
1.4.4. Identificación y caracterización de los componentes minerales del extracto acuoso.....	56
1.4.5. Determinación de la composición elemental del extracto acuoso.....	63
2. Pruebas farmacológicas	64
2.1. Efectos biológicos <i>in vitro</i> del EA y de la sedoheptulos	64
2.1.1. Capacidad atrapadora de especies reactivas de oxígeno	65
2.1.2. Inhibición <i>in vitro</i> de enzimas ciclooxigenasas.....	66
2.1.3. Efecto antimicrobiano del EA contra especies bacterianas periodontopatógenas	66
3. Pruebas celulares	68
3.1. Citotoxicidad y proliferación celular.....	68
3.2. Actividad específica de la fosfatasa alcalina	69
3.3. Medición de los niveles de los marcadores de la mineralización mediante RT-PCR	71
3.4. Detección y cuantificación de la mineralización	72
4. Ensayos de nucleación	75
4.1. Análisis micro Raman	77
4.2. Análisis mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).....	78
4.3. Análisis mediante microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM).....	78
CONCLUSIONES	82
PERSPECTIVAS	83
REFERENCIAS.....	84
ANEXOS	92



GLOSARIO DE ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS

^1H RMN	Resonancia Magnética Nuclear de hidrógeno
^1H COSY	Espectroscopía bidimensional de correlación homonuclear de hidrógeno
^{13}C RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
%	Por ciento
°C	Grados Celsius
α	Alfa, nivel de confianza para análisis estadístico
Å	Angstrom
<i>A.a.</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin)-6 sulfónico
AChE	Acetil colinesterasa
AcOEt	Acetato de etilo
ALP	<i>Alkaline Phosphatase</i> Fosfatasa alcalina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> Clave tipo americana de la colección de cepas bacterianas
BHI	<i>Brain Heart Infusion Agar</i> Agar Infusión Cerebro Corazón
BSP	<i>Bone sialoprotein</i> , Sialoproteína ósea
CBFA1	<i>Core-binding Factor α-1</i> , Factor de unión al núcleo α -1
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCD	Cromatografía en capa delgada
CDCl_3	Cloroformo deuteriado
Cdt	<i>Cytolethal Distending Toxin</i> Toxina Distensora Citoletal
cm	Centímetro
CPC	<i>Cetylpyridinium chloride</i> Cloruro de cetilpiridinio
CPI	<i>Community Periodontal Index</i> Índice periodontal comunitario
COX-1 y 2	Ciclooxigenasas, isoformas 1 y 2
d	Doblete
dd	Doble de dobletes <i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DEPT	Espectroscopía de mejoramiento sin distorsión mediante transferencia de polarización.
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i> Medio Eagle modificado por Dulbecco



GLOSARIO DE ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS

DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
<i>et al</i>	<i>Et alli</i> (y otros)
etc	Etcétera
EA	Extracto acuoso de <i>Sedum oxypetalum</i>
EDS	<i>Energy-dispersive X-ray spectroscopy</i> Microanálisis de energía dispersiva por rayos X
EO	Extracto orgánico de <i>Sedum oxypetalum</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> , Suero fetal bovino
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
FHEUM	Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos
hPDLs	<i>Human Periodontal Ligament-Derived Cells</i> Células humanas derivadas del ligamento periodontal
g	Gramo
GC-MS	<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas
h	Hora
HAp	Hidroxiapatita
hPDLs	<i>Human Periodontal Ligament-Derived Cells</i> Células humanas derivadas del ligamento periodontal
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i> Espectroscopía bidimensional de correlación heteronuclear a múltiples ligaduras
HR-TEM	<i>High-resolution transmission electron microscopy</i> Microscopía Electrónica de Transmisión de alta resolución
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy</i> Espectroscopía bidimensional de correlación heteronuclear a una ligadura
IR	Espectroscopía de Infrarrojo
K	Kelvin
kg	Kilogramo
LPS	Lipopolisacáridos
m	Multiplete
MHz	Megahertz
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i> Concentración Mínima Inhibitoria
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MP-AES	<i>Microwave Plasma-Atomic Emission Spectrometry</i> Espectrometría de Emisión Atómica de Plasma inducido por Microondas



GLOSARIO DE ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS

mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i> , Ácido ribonucleico mensajero.
m.s.m.	Metros sobre el nivel del mar
MTT	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
nm	Nanómetro
	<i>Bidimensional Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
NOESY	Espectroscopía bidimensional homonuclear de interacciones por efecto nuclear Overhauser
OCN	<i>Osteocalcin</i> , Osteocalcina
OCP	<i>Octacalcium phosphate</i> , Fosfato octacálcico
OMS	Organización Mundial de la Salud
	<i>Osteoblast-specific transcription factor</i>
OSTERIX	Factor de transcripción específico de osteoblastos
	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>
ORAC	Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno
PG	Prostaglandina
PG-AChE	Trazador conjugado Prostaglandina con Acetilcolinesterasa
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
	<i>Ribonucleic Acid</i>
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> , Especies Reactivas de Oxígeno.
	<i>Selected Area Diffraction Pattern</i>
SADP	Patrón de Difracción de Área Seleccionada
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i> , Microscopía Electrónica de Barrido
	<i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i>
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real
t	Triplete
t.a.	Temperatura ambiente (25°C)
TMS	Tetrametilsilano
	<i>Total Correlation Spectroscopy (Monodimensional)</i>
TOCSY 1D	Espectroscopía monodimensional de correlación total
	<i>Total Correlation Spectroscopy (Bidimensional)</i>
TOCSY 2D	Espectroscopía bidimensional de correlación total
	<i>Trypticase Soy Agar</i>
TSA	Agar Trypticase de Soya
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
USAI	Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria



GLOSARIO DE ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS

UV	Ultravioleta
δ	Desplazamiento químico
XRD	<i>X-ray Diffraction</i> , Difracción de rayos X.
XRF	<i>X-ray Fluorescence</i> , Fluorescencia de Rayos X
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
ν_{max}	Frecuencia de máxima absorción



ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Clasificación de las enfermedades periodontales.	10
Cuadro 2.	Especies leñosas del género <i>Sedum</i> de México y Latinoamérica.	21
Cuadro 3.	Glicósidos de quenferol encontrados en <i>Sedum dendroideum</i> .	23
Cuadro 4.	Compuestos aislados de plantas del género <i>Sedum</i> .	25
Cuadro 5.	Colectas reportadas de <i>S. oxypetalum</i> .	29
Cuadro 6.	Secuencias de los cebadores empleados en RT-PCR.	45
Cuadro 7.	Composición elemental del suelo y de cenizas de las partes aéreas.	48
Cuadro 8.	Composición química de la fracción de <i>n</i> -hexano del extracto orgánico.	49
Cuadro 9.	Composición química de la fracción de CHCl ₃ del extracto orgánico.	50
Cuadro 10.	Asignación espectroscópica de los confórmeros de la sedoheptulosa en D ₂ O 500 MHz para ¹ H y 125 MHz para ¹³ C.	53
Cuadro 11.	Composición química de los componentes volátiles del EA.	57
Cuadro 12.	Información cristalográfica del CaCO ₃ ortorrómbico (aragonita).	57
Cuadro 13.	Información cristalográfica de la singenita.	61
Cuadro 14.	Composición elemental del EA mediante MP-AES y SEM-EDS.	64
Cuadro 15.	Efectos biológicos <i>in vitro</i> del EA y de la sedoheptulosa.	65
Cuadro 16.	Efecto antimicrobiano del EA de <i>S. oxypetalum</i> .	67



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Dibujo de la planta <i>texiyotl</i> del códice De la Cruz Badiano y Fotografía de <i>Sedum oxypetalum</i> Kunth.	5
Figura 2.	Índice CPI para la población mexicana de 15-19 años según la OMS	11
Figura 3.	Estructura química de la sedoheptulosa y del sedoheptulosán.	22
Figura 4.	Estructura química de la prodelfinidina.	24
Figura 5.	Distribución geográfica conocida de <i>Sedum oxypetalum</i> .	29
Figura 6.	Esquema de obtención y fraccionamiento de los extractos.	36
Figura 7.	Cromatografía en capa delgada para la purificación de la sedoheptulosa.	37
Figura 8.	Reacción de reducción enzimática del MTT.	43
Figura 9.	Análisis general de suelo y de cenizas de las partes aéreas.	47
Figura 10.	Estructuras cíclicas y asignación de las señales de los carbonos anoméricos de la sedoheptulosa en ^{13}C RMN.	51
Figura 11.	Espectros comparativos ^1H de la sedoheptulosa y TOCSY 1D pulsando en 4.33, 4.20 y 3.97 ppm para la β -furanosa, α -furanosa y la α -piranosa, respectivamente.	52
Figura 12.	Espectros: Sedoheptulosa, β -furanosa editado a partir del TOCSY 1D 4.33 ppm, α -furanosa editado a partir del TOCSY 4.20 ppm, α -piranosa editado a partir del TOCSY 3.97 ppm y señales que no aparecen en los espectros TOCSY 1D.	54
Figura 13.	Composición elemental de la singenita mediante XRF.	58
Figura 14.	Espectros IR y Raman de la singenita.	59
Figura 15.	Reporte del refinamiento Rietveld de la estructura cristalina de la singenita.	61
Figura 16.	Estructura de la celda cristalina de la singenita.	62
Figura 17.	Poliedros de cationes KO_8 , CaO_9 y grupos sulfato SO_4^{-2} .	62
Figura 18.	Actividad proliferativa del EA y de la sedoheptulosa en hPDLs.	69
Figura 19.	Reacción de hidrólisis catalizada por la fosfatasa alcalina.	69



Figura 20.	Actividad específica de la fosfatasa alcalina promovida por el EA o la sedoheptulosa.	70
Figura 21.	Medición de los marcadores de la mineralización mediante RT-PCR del EA.	71
Figura 22.	Medición de los marcadores de la mineralización mediante RT-PCR de la sedoheptulosa.	72
Figura 23.	Detección de la mineralización mediante la tinción de alizarina roja. Sedoheptulosa y extracto acuoso a los 5, 10 y 15 días de cultivo.	73
Figura 24.	Cuantificación de la deposición de calcio mediante el método de CPC.	75
Figura 25.	Fotografías del ensayo de nucleación donde se observan los cristales de fosfato de calcio en las metafases.	76
Figura 26.	Fotografías de los cristales de fosfato de calcio obtenidos a partir de la singenita.	76
Figura 27.	Espectros Raman de los cristales de fosfatos de calcio obtenidos en los ensayos de nucleación con insertos de las micrografías de los mismos.	77
Figura 28.	Micrografías SEM de los cristales de fosfato de calcio obtenidos en los ensayos de nucleación.	79
Figura 29.	Patrón de difracción experimental de área seleccionada (SADP) desde el eje de zona $[1 \bar{1} 0 0]$. Imagen procesada donde se muestra el patrón de difracción característico del grupo espacial P63/m (176).	80
Figura 30.	Micrografía con las distancias interplanares de la muestra. Transformada de Fourier vista desde el eje de zona $[1 4 \bar{5} \bar{3}]$ e imagen procesada donde se resalta el patrón de difracción hexagonal.	81



ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.	Espectro ^1H RMN del β -sitosterol.	92
Anexo 2.	Espectro ^{13}C RMN del β -sitosterol.	93
Anexo 3.	Espectro DEPT del β -sitosterol.	94
Anexo 4.	Espectro ^1H RMN 400 MHz del extracto acuoso de <i>S. oxypetalum</i> .	95
Anexo 5.	Espectro ^1H RMN 400 MHz de la sedoheptulosa.	96
Anexo 6.	Espectro ^{13}C RMN 100 MHz de la sedoheptulosa.	97
Anexo 7.	Espectro ^1H COSY de la sedoheptulosa.	98
Anexo 8.	Espectro HSQC de la sedoheptulosa.	99
Anexo 9.	Espectro HMBC de la sedoheptulosa.	100
Anexo 10.	Espectro NOESY de la sedoheptulosa.	101
Anexo 11.	Información cristalográfica, distancias interatómicas, ángulos de enlace y los desplazamientos isotrópicos del CaCO_3 ortorrómbico (aragonita).	102
Anexo 12.	Información cristalográfica, distancias interatómicas, ángulos de enlace y figuras del refinamiento de la estructura cristalina de la singenita.	105
Anexo 13.	Producción científica internacional indizada.	113



ABSTRACT

The medicinal plant *Sedum oxypetalum* Kunth (Crassulaceae) is used by some people of the Mexican Community of Tenango del Valle in treatment of periodontal disease. These people claim that it can tighten their teeth by chewing the branches of the plant, allowing the plant juice to exert the healing effects on the gingiva. The global effect of teeth tightening implies the sum of independent or correlated effects, leading to the final result of periodontal tissues regeneration.

The plant material was collected directly from the place described by the users, the aerial parts of the plant were analyzed; both their aqueous (AE) and organic extracts (OE) were chemically characterized and the AE was biologically tested through *in vitro* models. The main components of the aqueous extract were the monosaccharide sedoheptulose and syngenite [$K_2Ca(SO_4)_2 \cdot H_2O$], the latter was obtained as a dispersion.

The aqueous extract showed to have antimicrobial (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Actinomyces israelii*, *Fusobacterium nucleatum* subsp *nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotype b, ROS-scavenging, and anti-inflammatory (anti COX) effects. Additionally, AE and its component sedoheptulose were shown to promote the proliferation and/or the osteogenic differentiation of Human Periodontal Ligament-Derived Cells (hPDLs), and for the mineralization process Alizarin red stain, specific alkaline phosphatase and rtPCR detection of RNA markers. AE also promoted the nucleation of octacalcium phosphate and its component syngenite the nucleation of hydroxyapatite crystals *in vitro*. The relevance of the use of *S. oxypetalum* is clearly supported by the current findings and thus we confirmed that it could be used as an effective traditional treatment against the periodontal disease.

It was proved that the aqueous extract of *S. oxypetalum* has the ideal pharmacological and physicochemical properties to stop the progress of periodontal disease and even to induce the regeneration of the periodontal supporting tissues, both cellular and mineralized.





KURZFASSUNG

Die mexikanische Heilpflanze *Sedum oxypetalum* Kunth (Crassulaceae) wird von einigen Bewohnern in der Stadt Tenango del Valle in Mexiko als traditionelle Behandlung für Zahnbetterkrankungen benutzt. Laut den Einwohnern von Tenango del Valle können „Zähne festgezogen werden“, indem man die zarten Stiele der Pflanze kaut und auf diese Weise ihren Saft über das Zahnfleisch extrahiert. Der Gesamteffekt, den diese Personen umgangssprachlich „die Zähne festziehen“ nennen, bedeutet eine Reihe von unabhängigen oder multidirektionalen Einzelwirkungen im Zusammenhang mit der Förderung der Zahnhalteapparatregeneration als Endergebnis.

Pflanzenmaterial wurde an dem von den Einwohnern beschriebenen Ort gesammelt. Es wurde verarbeitet, um das wässrige Extrakt und den festen Rückstand zu erhalten. Das organische Extrakt wurde später von dem festen Rückstand durch Mazeration ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$) erhalten. Beide wurden konzentriert und chemisch charakterisiert und das wässrige Extrakt wurde durch *in vitro* Modelle pharmakologisch bewertet. Die Hauptkomponenten in dem wässrigen Extrakt bestanden aus dem Monosacharid Sedoheptulose und Syngenit [$\text{K}_2\text{Ca}(\text{SO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$], dieses Mineral wurde in Dispersionsform erhalten.

Das wässrige Extrakt zeigte moderate antimikrobielle Aktivität gegen parodontpathogene Bakterien (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Actinomyces israelii*, *Fusobacterium nucleatum* subsp *nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotype b) und antioxidative Kapazität gegen ROS. Sowohl das wässrige Extrakt als auch Sedoheptulose präsentierten entzündungshemmende Wirkungen gegen COX-1 und COX-2. Beide förderten die Proliferation und osteogene Differenzierung menschlicher Parodontalligament -abgeleiteter Zellen ohne ein bestimmtes osteogenes Medium zu benötigen. Schließlich wurden mithilfe des wässrigen Extrakts und Syngenits die Bildung von Kristallen aus Calciumphosphat durch eine Sol-Gel-Nukleation *in vitro* System gefördert. Das wässrige Extrakt förderte durch die Bildung von Octacalciumphosphat und Syngenit die Bildung von Hydroxyapatit.

Es wurde festgestellt, dass der wässrige Extrakt von *S. oxypetalum* ideale pharmakologische und physikochemische Eigenschaften besitzt, um das Fortschreiten der parodontalen Erkrankung zu stoppen und zelluläre und mineralisiert parodontale Geweberegeneration zu induzieren.





RESUMEN

La planta medicinal mexicana *Sedum oxypetalum* Kunth (Crassulaceae), es empleada por algunos pobladores del municipio de Tenango del Valle, Estado de México para el tratamiento tradicional de problemas de periodontitis. De acuerdo con los testimonios de los pobladores, se pueden “apretar los dientes” al masticar los tallos tiernos y extruir su jugo para que éste entre en contacto con las encías. El efecto global coloquialmente llamado “apretar los dientes” implica un conjunto de efectos individuales independientes o multidireccionales relacionados con el resultado final de la regeneración de tejidos de soporte periodontal.

El material vegetal se colectó directamente del sitio descrito por los usuarios, se procesó para obtener un extracto acuoso y un residuo sólido; a partir del segundo se obtuvo el extracto orgánico mediante maceración ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$). Ambos fueron concentrados, caracterizados químicamente y el extracto acuoso fue evaluado farmacológicamente con modelos *in vitro*. Los componentes principales en el extracto acuoso fueron el monosacárido sedoheptulosa y la singenita [$\text{K}_2\text{Ca}(\text{SO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$]; esta última obtenida en forma de dispersión.

El extracto acuoso presentó actividad antimicrobiana moderada contra bacterias periodontopatógenas (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Actinomyces israelii*, *Fusobacterium nucleatum ssp nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotipo b) y capacidad atrapadora de especies reactivas de oxígeno. Tanto el extracto acuoso como la sedoheptulosa presentaron efecto antiinflamatorio (contra COX-1 y COX-2), promovieron la proliferación y diferenciación osteogénica de células derivadas del ligamento periodontal sin la necesidad de un medio osteogénico específico. Finalmente, el extracto acuoso y la singenita promovieron la formación de cristales de fosfato de calcio por nucleación en un sistema sol gel *in vitro*, el extracto acuoso promovió la formación de fosfato octacálcico y la singenita la formación de hidroxapatita.

Se comprobó que el extracto acuoso de *S. oxypetalum* posee las propiedades farmacológicas y fisicoquímicas ideales para detener el progreso de determinadas enfermedades periodontales e incluso para inducir la regeneración de tejidos de soporte periodontal, tanto celular como mineralizado.





INTRODUCCIÓN

En la comunidad mexicana de Tenango de Arista, perteneciente al municipio de Tenango del Valle, Estado de México, en la zona de los suelos volcánicos desde el sitio arqueológico de Teotenango hasta la colonia la Pedrera del cerro Tetépetl, crece una planta conocida por los pobladores como “jiote”.

De acuerdo con los testimonios de los habitantes de la zona aledaña al cerro, dicha planta sirve para “apretar los dientes”, la interpretación del lenguaje coloquial implica que la especie vegetal es usada para dar sujeción a las piezas dentales flojas, médicamente hablando, como tratamiento tradicional contra la periodontitis.

La especie vegetal fue identificada botánicamente como *Sedum oxypetalum* Kunth (Crassulaceae), para la cual sólo existe un reporte actual relacionado con su uso en padecimientos periodontales (infecciones orales) [1]; sin embargo, debe haber sido conocida desde tiempos precolombinos ya que una planta descrita en el *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis* o Códice de la Cruz Badiano con el nombre de *texiyotl* (costra dura o costra de piedra) fue descrita por De la Cruz en el Capítulo Sexto con el uso “Para la boca hinchada” (F. 22 v. en el códice [2]).

La identificación botánica de la planta en el códice no es definitiva, en primera instancia, los trabajos de Blas P. Reko (1947) y Francisco Hernández (1959) la identifican como una planta del género *Sedum*; Hernández como *Sedum dendroideum* Moc. et Sessé y Reko como *Sedum bourgaei* Hemsl [3]. Sin embargo, la botánica Emily Walcott Emmart de la Universidad Johns Hopkins describió en 1940, que la figura seguramente se trataba de un *Sedum*, probablemente *Sedum oxypetalum* debido a sus hojas espatuladas y sus flores rojizas [3,4]. En la Figura 1 se muestra una imagen comparativa del *texiyotl* del códice y una fotografía de la planta en el sitio de colecta.





Son muy pocos los tratamientos tradicionales mexicanos reportados en la literatura científica para tratar problemas estomatológicos. En el código de la Cruz Badiano se mencionan diversas plantas y/o preparaciones destinadas a problemas dentales y orales. Entre ellas un dentífrico o limpiadientes hecho con ceniza y miel, una curación para las encías inflamadas y purulentas a base de ortigas y diversas plantas empleadas para determinados padecimientos tales como: dolor de dientes, calor de la garganta, angina, dolor de garganta, saliva seca, esputo de sangre, hipo, tos, aliento fétido, boca hinchada y sarna de la boca [3]. En el Apéndice VI de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM) segunda edición se mencionan sólo cuatro especies vegetales empleadas para problemas estomatológicos: *Piper sanctum* (Miq.) Schltl. ex C. para el dolor de dientes, *Salvia thymoides* (Benth) como digestivo y contra el mal aliento, *Croton gossypifolius* (Vahl) contra el algodoncillo, heridas, mal de boca y fogasos y *Sedum dendroideum* Moc. et Sessé para desinflamar las encías [5].



Figura 1. (Izquierda) Dibujo de la planta *texiyotl* del código De la Cruz Badiano [2]. (Derecha) Fotografía de *Sedum oxypetalum* en el sitio de colecta, acercamiento a las inflorescencias.



En 2011 se publicó un reporte [6] con la identificación de 49 plantas empleadas en México para tratar problemas estomatológicos, el listado incluye plantas de 29 familias botánicas, siendo las más comunes la Fabaceae, Asteraceae y Fagaceae. La gran mayoría son reportadas para mejorar la sujeción de los dientes y evitar el sangrado de encías; sin embargo, no se reporta a *Sedum oxypetalum* en la lista, de hecho, sólo aparece una especie de la familia Crassulaceae, *Sedum prealtum* A.D.C. ssp *parvifolium*.

El uso tradicional de *S. oxypetalum* es de hecho poco conocido; hasta el momento sólo se cuenta con un reporte de actividad del extracto metanólico contra *Aspergillus niger* y *Trychophyton rubrum* [1].

La especie vegetal es endémica de México y se distribuye a lo largo del eje neovolcánico, desde “La Sierra nevada Michoacana” hasta parte de Veracruz [4] e Hidalgo [7] y es una de las especies de matorrales xerófilos representativa de la reserva ecológica del Pedregal de San Ángel [8–11]. De manera adicional, se ha considerado a *S. oxypetalum* como una especie potencialmente útil para la recuperación del ecosistema de campo volcánico perturbado por la acción humana debido a su fácil adaptación [12].

Por otra parte, el hecho de que no exista ningún reporte científico previo acerca de las propiedades de *S. oxypetalum* como tratamiento contra la periodontitis, lo vuelve un candidato ideal para su estudio científico.





JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Justificación

Entre las enfermedades periodontales, la periodontitis es la segunda causa de pérdida de piezas dentales en la población en general y la primera en la población de edad avanzada, lo cual implica un deterioro de la calidad de vida; se trata además de una enfermedad de distribución global, lo que implica un problema para los sistemas de salud a nivel mundial.

La medicina tradicional mexicana es una de las más ricas del mundo; sin embargo, no se cuenta hasta el momento con ningún reporte de estudio científico sobre actividad de plantas endémicas de México dirigido específicamente a observar sus propiedades para aliviar problemas de destrucción de tejidos de soporte periodontal. Este hecho indica un gran hueco en este campo de conocimiento que justifica el estudio sistemático de plantas mexicanas que se emplean en tratamientos tradicionales contra periodontitis.

Una situación específica sobre este tema es el de la especie *Sedum oxypetalum* Kunth (Crassulaceae) la cual se menciona en el *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis* con el nombre de *texiyotl*, en el cual se indica su uso contra la inflamación de la boca; más aún, en el municipio de Tenango del Valle, Estado de México las partes aéreas del vegetal son empleadas con el objetivo de “apretar los dientes”, lo cual justifica un estudio sistemático químico y farmacológico de esta especie.

Hipótesis

Si la especie *Sedum oxypetalum* Kunth (Crassulaceae) ha sido empíricamente utilizada para tratar la inflamación de la cavidad bucal, entonces ésta podría poseer componentes químicos con propiedades medicinales para el tratamiento de la periodontitis.





Objetivos

Objetivo general

Realizar el análisis químico de la especie vegetal *Sedum oxypetalum* Kunth (Crassulaceae), los correspondientes estudios farmacológicos relacionados con la detener el progreso de la destrucción de tejidos de soporte periodontal y aquellos relacionados con la regeneración de los mencionados tejidos.

Objetivos particulares

- ✦ Determinar la composición química de los extractos orgánico y acuoso de la especie *Sedum oxypetalum*.
- ✦ Efectuar los estudios de actividad farmacológica, biológica y antioxidante del extracto acuoso y de los productos aislados relacionados con la desinflamación del periodonto con modelos *in vitro*: antiinflamatoria (anti COX-1 y COX-2), antimicrobiana (empleando cepas patógenas relacionadas con la periodontitis) y antioxidantes (especies reactivas de oxígeno).
- ✦ Determinar la capacidad del extracto acuoso y los productos aislados para inducir la diferenciación celular osteogénica en células derivadas del tejido periodontal (citotoxicidad y proliferación celular, cuantificación de marcadores de diferenciación y pruebas de mineralización).
- ✦ Analizar la capacidad del extracto acuoso y de los productos aislados para inducir la nucleación de fosfatos de calcio mediante un sistema *in vitro* sol-gel.



ANTECEDENTES

1. Las enfermedades periodontales

El periodonto es un órgano complejo que está comprendido por cuatro tejidos mesenquimales (hueso, cemento, encía y ligamento periodontal) que actúan como una unidad funcional, proveyendo a los dientes de un aparato capaz de resistir la fuerza de la masticación [13]. Las enfermedades periodontales son un grupo de enfermedades inflamatorias que afectan al aparato de soporte periodontal. Sus signos y síntomas incluyen enrojecimiento, hinchazón, dolor e incremento de la temperatura surcal local [14]. Existen dos manifestaciones clínicas: la gingivitis, que es un proceso inflamatorio inicial causado por bacterias en el surco gingival y la periodontitis, que es una forma avanzada de la inflamación caracterizada por la destrucción de los tejidos de soporte dental [15]. La periodontitis se divide en periodontitis agresiva y periodontitis crónica [16] y en general, las enfermedades periodontales se clasifican de acuerdo con su evolución y/o etiología en: enfermedades gingivales, periodontitis crónica, periodontitis agresiva, periodontitis como manifestación de una enfermedad sistémica, enfermedades periodontales necrotizantes, abscesos del periodonto, periodontitis asociada con lesiones endodónticas y, condiciones y deformidades adquiridas en el desarrollo [17,18] (Cuadro 1).

En general, el término periodontitis se refiere a un número de enfermedades que afectan al periodonto, es decir, al conjunto de tejidos que envuelven y dan soporte a los dientes y que de no ser tratado, puede llevar al aflojamiento y pérdida posterior de las piezas dentales [19]. Los daños más notorios se dan en los tejidos conectivos suaves, pérdida de hueso alveolar y de tejido conectivo del cemento [20].





Cuadro 1. Clasificación de las enfermedades periodontales [17,18].

I. Enfermedades gingivales	<ul style="list-style-type: none"> • Enfermedades gingivales inducidas por el <i>biofilm</i>. • Enfermedades gingivales no inducidas por el <i>biofilm</i>.
II. Periodontitis crónica	Leve (pérdida de inserción clínica 1-2 mm) Moderada (3-4 mm de pérdida de inserción clínica) Severa (≥ 5 mm de pérdida de inserción clínica) <ul style="list-style-type: none"> • Localizada (menos del 30% de los sitios afectados) • Generalizada (más del 30% de los sitios afectados)
III. Periodontitis agresiva	Leve (pérdida de la inserción clínica de 1-2 mm) Moderada (3-4 mm de pérdida de inserción clínica) Severa (≥ 5 mm de pérdida de inserción clínica) <ul style="list-style-type: none"> • Localizada (menos del 30% de los sitios afectados) • Generalizada (más del 30% de los sitios afectados)
IV. Periodontitis como manifestación de una enfermedad sistémica	<ul style="list-style-type: none"> • Asociada con enfermedades hematológicas. • Asociada con desórdenes genéticos. • Otras no especificadas.
V. Enfermedades periodontales necrotizantes	<ul style="list-style-type: none"> • Gingivitis ulceronecrotizante. • Periodontitis ulceronecrotizante.
VI. Abscesos del periodonto	<ul style="list-style-type: none"> • Absceso gingival. • Absceso periodontal. • Absceso coronal.
VII. Periodontitis asociada con lesiones endodónticas	
VIII. Condiciones y deformidades adquiridas o del desarrollo.	<ul style="list-style-type: none"> • Factores relacionados al diente que modifican o predisponen a gingivitis o periodontitis asociada a <i>biofilm</i>. • Deformidades y condiciones mucogingivales alrededor del diente. • Deformidades y condiciones mucogingivales en rebordes alveolares. • Trauma oclusal.

1.1. Prevalencia general en la población

A nivel global, las enfermedades periodontales tienen prevalencias variables de acuerdo con la región geográfica, el nivel de desarrollo de los países, el rango de edad y las condiciones socioeconómicas, siendo generalmente más afectados los adultos mayores y las personas con bajos recursos económicos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) introdujo el concepto y métrica llamado “Índice Periodontal Comunitario” o CPI por sus siglas en inglés (*Community Periodontal Index*), con la finalidad de que los países pudieran reportar de forma unificada la situación general de salud periodontal de su población; este índice considera tres grupos representativos de edad 15-19, 35-44 y 65-74 años, además de cinco puntuaciones (0, 1, 2, 3 y 4)





dependiendo de la severidad de la enfermedad, donde 0) significa condiciones periodontales sanas, 1) sangrado gingival, 2) sangrado gingival y cálculos, 3) bolsas gingivales de cuatro a cinco milímetros y 4) bolsas periodontales profundas de 6 milímetros o más [15]. La OMS reporta un valor de CPI para la población mexicana de 15-19 años de 0 = 49 %, 1 = 36 %, 2 = 14 %, 3 = 1 % y 4 = 0 % pero no reporta datos para personas de 35-44 ni de 65-74 años (Figura 2). En general la OMS estima que en los países desarrollados entre el 5 al 15 % de la población adulta padece periodontitis severa [21]. Sin embargo, no hay suficientes estudios estadísticos para confirmar dichos valores, además de que los mismos cambian frecuentemente [22] y no se cuenta con protocolos estandarizados para una adecuada medición. Estadísticamente, las poblaciones más afectadas parecen ser la africana, seguida de la hispánica y asiática [23].

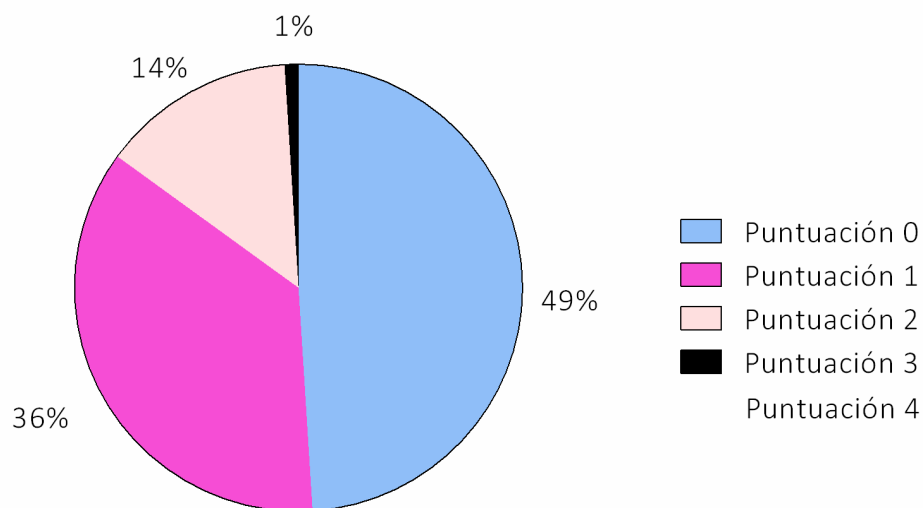


Figura 2. Índice CPI para la población mexicana de 15-19 años según la OMS en 2012 [15].

En un estudio realizado en 2011 en la Clínica de Admisión de la Facultad de Odontología de la UNAM, se encontró que el 67.2 % de los pacientes que ingresan presentan periodontitis, siendo la población más afectada la de 40 a 49 años [24], sin embargo, la Academia Mexicana de Periodoncia reporta hasta un 70 % de prevalencia de periodontitis en la población mexicana, siendo el grupo más afectado el de las personas de 65 años de edad en adelante [25].



1.2. Causas de la gingivitis y de la periodontitis

La gingivitis se caracteriza por el sangrado de las encías debido a un proceso inicial de inflamación en el surco gingival que es provocado a su vez por la placa dentobacteriana (biofilm) producida por microorganismos propios de la cavidad oral [26]. La falta de higiene bucal, así como un tratamiento inadecuado o de hecho inexistente, puede provocar que los pacientes con gingivitis desarrollen posteriormente un cuadro de periodontitis.

Si bien no todos los pacientes con gingivitis desarrollan periodontitis, el tratamiento temprano de la primera puede prevenir el desarrollo de la segunda, así como el tratamiento secundario de la gingivitis puede evitar el desarrollo de periodontitis recurrente [27]. Asimismo, la periodontitis es una de las principales causas clínicas de la pérdida de piezas dentales, lo que conlleva a una disminución de la calidad general de vida. Además de que, al ser una enfermedad de distribución global, representa un problema general para los servicios de salud.

A pesar de que la periodontitis tiene una patogénesis bacteriana, se requiere de un hospedero susceptible para que dichas bacterias puedan colonizar los epitelios, entre ellos una respuesta inmune inadecuada que lleva a la destrucción de los tejidos conectivos y finalmente a la manifestación clínica de la periodontitis. Diversos factores vuelven susceptible al hospedero, entre ellos genéticos, tabaquismo, VIH/SIDA, nutricionales, osteoporosis, diabetes y estrés [26].

1.3. Relación de la periodontitis con condiciones sistémicas

La periodontitis ha sido relacionada a menudo con enfermedades sistémicas, las relaciones entre ellas son multifactoriales y se han descrito frecuentemente bidireccionalmente, es decir, una condición puede ser factor de riesgo de la otra en ambos sentidos; o monodireccionales, siendo aquellas en las que sólo se ha descrito que una condición sea factor de riesgo para el desarrollo de la otra.





La periodontitis tiene un origen microbiano, la composición normal de la microflora oral es predominantemente de los géneros *Actinomyces* y *Streptococci*, pero cambia drásticamente en la periodontitis. Si bien la periodontitis tiene un origen bacteriano, se requiere de una respuesta inmunológica deficiente de parte del hospedero [28].

De entre los microorganismos periodontopatógenos, *Porphyromonas gingivalis* ha sido considerada como la piedra angular bacteriana en el desarrollo de la periodontitis, sin embargo, su presencia no significa necesariamente un cuadro de periodontitis ya que se puede detectar en individuos sanos. Adicionalmente, *P. gingivalis* requiere de la presencia de otros microorganismos como *Fusobacterium nucleatum*, que es parte de la flora comensal normal [28].

Otra especie bacteriana asociada con periodontitis es *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.a.*), anteriormente llamada *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *A.a.* está principalmente asociado con los casos de periodontitis agresiva juvenil [18,25,29,30]. Además, *A.a.* también produce leucotoxinas, factores inmunosupresores y proteasas capaces de descomponer la IgG [30]. El factor de virulencia más importante de *A.a.* es una proteína llamada Toxina Distensora Citoletal o Cdt por su acrónimo en inglés *Cytolethal Distending Toxin*, dicha proteína actúa sobre los epitelios orales donde induce una ruptura de los epitelios, esto debido a que produce un daño en el ADN que a su vez lleva a una interrupción del ciclo celular en la interfase G₂/M [31].

Para poder sobrevivir e infectar los tejidos del hospedero, las bacterias periodontopatógenas necesitan evadir la respuesta inmune, particularmente a los neutrófilos, que son las células más frecuentemente halladas en las bolsas periodontales. Sin embargo, dichas bacterias requieren de la respuesta inflamatoria del hospedero ya que requieren nutrientes derivados de la destrucción de tejidos [28] a consecuencia de la respuesta de los neutrófilos contra las infecciones.





Un posible mecanismo de *P. gingivalis* para sobrevivir al ataque de los neutrófilos es mediante la inhibición de la enzima óxido nítrico sintasa inducible, lo que le permite sobrevivir dentro de los neutrófilos, por ello es posible también detectarla en los ateromas y eso evidencia una relación con enfermedades cardiovasculares [28,32].

De manera adicional, los lipopolisacáridos, que son sustancias provenientes de las paredes bacterianas de las especies periodontopatógenas, generan una reacción inflamatoria en las células del epitelio periodontal. Dicha respuesta del hospedero es un mecanismo de defensa y supervivencia, generalmente se considera que sólo es mediada por linfocitos B y T, neutrófilos, monocitos y macrófagos, que desencadenan mediadores de la inflamación como citocinas, metabolitos del ácido araquidónico y enzimas proteolíticas que en conjunto tienen como efecto secundario indeseado a la degradación del tejido periodontal y resorción ósea [33].

Las citocinas, quimiocinas, metabolitos del ácido araquidónico y otros factores pro inflamatorios son producidos en la periodontitis como parte de la respuesta inflamatoria; sin embargo, dichas sustancias se diseminan sistémicamente mediante la circulación, lo que puede provocar o en algunos casos agravar algunas enfermedades sistémicas.

Si bien, las células de las líneas linfóide y mieloide son las que con mayor frecuencia se asocian a la producción de quimiocinas, citocinas y metabolitos del ácido araquidónico, la presencia continua de los LPS hace que los neutrófilos desarrollen resistencia y eventualmente dejen de producir dichos factores pro inflamatorios. Los fibroblastos gingivales por el contrario, no desarrollan dicha resistencia y pueden seguir produciendo citocinas y otros factores pro inflamatorios, lo que tiene como resultado un proceso inflamatorio crónico [34]. Los fibroblastos gingivales son capaces de producir IL-1 β [35], IL-6 [34–36], IL-8 [34,36] y factor de necrosis tumoral alfa TNF α [35].



Otra relación documentada de la periodontitis es con el embarazo, ya que puede provocar diversas dificultades y efectos, tales como bajo peso del recién nacido, nacimientos prematuros, abortos, muerte fetal [28,37] y pre eclampsia [37]. Una explicación factible para estos problemas es debida a la circulación de bacterias periodontopatógenas y su consecuente infección en la placenta y los tejidos del feto, en particular *P. gingivalis* y *F. nucleatum* han sido detectados en los casos de sepsis fetal [28]. Adicionalmente, un factor que puede contribuir negativamente es el cambio en la respuesta inmunológica durante el embarazo, debido a que el sistema inmunológico de la madre se suprime parcialmente para no dañar al feto y se tiene como consecuencia un progreso mayor de la periodontitis [37].

La relación entre las enfermedades periodontales con las enfermedades autoinmunes también ha sido documentada, en estas últimas, el sistema inmune funciona de manera incorrecta y ataca a componentes celulares y/o tejidos propios, esto ha sido comprobado al encontrarse anticuerpos contra colágeno o ADN, o incluso IgG agregada. Los mecanismos por los cuales se puede generar una respuesta autoinmune ocasionada por un cuadro de periodontitis son diversos y no siempre obvios. Una de las causas es, porque la infección bacteriana o viral provoca la destrucción de tejidos, lo cual expone los componentes celulares al contacto con las células del sistema inmune, pudiendo generar con ello una respuesta inmune no regulada contra los componentes propios. De manera adicional, las bacterias periodontopatógenas poseen una propiedad llamada superantigénica, es decir, que son capaces de activar directamente a los linfocitos B de manera independiente de linfocitos T, activando a su vez a los neutrófilos, estos últimos liberan citocinas, enzimas y especies reactivas de oxígeno o ROS por su acrónimo en inglés *Reactive Oxygen Species* capaces de destruir tejidos [38].

Un factor de riesgo para el desarrollo de una respuesta autoinmune es asociado directamente a *P. gingivalis*, ya que esta especie bacteriana tiene la capacidad de citrulinar ciertos componentes como el fibrinógeno humano y la α -enolasa, los cuales en sus formas citrulinadas son considerados como los dos auto antígenos más importantes implicados en el desarrollo de artritis reumatoide [28].





Como fue mencionado anteriormente, la periodontitis, en específico la variedad crónica, está fuertemente relacionada con el incremento continuo y mantenido de especies pro inflamatorias y de especies reactivas de oxígeno o ROS. Tanto las especies pro inflamatorias como el exceso de ROS tienen como efecto directo la degradación de los tejidos periodontales.

Si bien las ROS juegan un papel importante en el proceso inmunológico contra microorganismos infecciosos, especialmente anaerobios estrictos; la continua presencia de las mismas en los tejidos periodontales conlleva en un inicio a un estado pro inflamatorio donde se produce un daño indirecto y posteriormente a un estado de estrés oxidante, que conduce a un daño directo a los tejidos periodontales. Por lo anterior, la destrucción de tejidos a consecuencia de la producción de ROS por parte de los fagocitos es considerada como fuego cruzado [39]. Por el contrario, si se tiene una concentración mayor de especies antioxidantes, se induce un estado pro antiinflamatorio que protege a los tejidos o incluso a un estado antioxidante que puede ser favorable para la reparación de los mismos [40].

La respuesta inflamatoria e inmune del organismo a nivel del tejido periodontal depende de un equilibrio entre muchos factores, como son las enzimas proteolíticas (elastasa de neutrófilos) y sus inhibidores (α 1-antitripsina); así como las especies reactivas de oxígeno y los sistemas de defensa antioxidante que protegen y reparan tejido vital, células y componentes moleculares [40]. En estudios clínicos se observa un incremento significativo de las concentraciones séricas de lípidos peroxidados y óxido nítrico, aunado a una disminución de antioxidantes como la superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa en pacientes con periodontitis [41]. Las ROS han emergido como moléculas señaladoras de la regulación de varios procesos celulares, éstas se pueden originar en la cadena de transporte de electrones mitocondrial, o por activación de polimorfos nucleares (PMN) en procesos inflamatorios. Las ROS pueden inducir directamente apoptosis y necrosis celular; varios tipos de enfermedades periodontales son asociadas con PMN activados y la generación de ROS [42].



La relación de la periodontitis, específicamente la agresiva con las enfermedades sistémicas, está frecuentemente asociada con el incremento de las concentraciones plasmáticas de ROS, mismas que son factores de riesgo para el desarrollo de otras condiciones clínicas. Además, ha sido documentado que tres marcadores de estrés oxidante son claramente asociados en periodontitis en contraste con individuos sanos: la capacidad total antioxidante (TAOC) disminuida y la alta concentración ya sea de malondialdehído (MDA) o de óxido nítrico (NO) [43].

La diabetes mellitus es la condición médica más frecuentemente asociada con la periodontitis, se describe la diabetes mellitus como un grupo heterogéneo de desórdenes con diferentes causas, todas caracterizadas por hiperglucemia. Es ampliamente conocido que las personas con diabetes tienen un riesgo más alto de desarrollar enfermedades periodontales, la periodontitis es considerada la sexta complicación de la diabetes [15].

Los productos de glicación avanzada formados como resultado de la hiperglucemia y la hiperlipidemia pueden afectar el fenotipo de un número de células debido a la unión con receptores superficiales de alta afinidad, lo que vuelve a las células endoteliales hiperpermeables y provoca que los fibroblastos reduzcan la producción de colágeno [14]. También se tiene evidencia de que la enfermedad periodontal afecta negativamente el control glucémico en la diabetes. Existe una relación indirecta entre la resistencia a la insulina con las enfermedades inflamatorias de tejido conectivo y las infecciones agudas debido a la alta vascularización del periodonto, este tejido en un proceso inflamatorio se convierte en una fuente endocrina de TNF α , y otros mediadores de la inflamación [44]. De manera adicional, en un proceso de periodontitis aguda, puede haber inducción de resistencia a la insulina que puede durar hasta 3 meses después de detener la infección; debido a la continua presencia de bacterias periodontopatógenas, se mantiene la producción de IL-1, la cual es citotóxica selectiva hacia las células de los islotes de Langerhans [14]. Además, el TNF α es un antagonista directo de la insulina [44] y se cree que éste participa en este proceso como un potente mediador de resistencia a la misma [32].





Existe evidencia adicional de la relación de la periodontitis con la diabetes al comparar a aquellos pacientes que reciben tratamientos sólo mecánico-quirúrgicos con respecto a los que también reciben antibióticos sistémicos, en especial tetraciclina y doxiciclina, notándose en el primer caso sólo una diferencia favorable con respecto a la periodontitis sin mejorar el control glicémico, contra el segundo caso en el que los pacientes mejoran tanto en la salud periodontal como en el control glicémico; esto es debido a que la doxiciclina inhibe la glicación no enzimática de proteínas vía un mecanismo independiente a la anticólagenasa [32].

1.4. Enfoque multi objetivo en el tratamiento de la periodontitis

Tomando en consideración el contexto global de todas las implicaciones clínicas de la periodontitis, se puede prever que el tratamiento no debe estar dirigido únicamente a una de las tantas manifestaciones, sino con un enfoque multi objetivo: en principio, a detener el proceso infeccioso, después a aliviar la inflamación de los tejidos y a la par disminuir la concentración de especies reactivas de oxígeno y en el caso particular de los pacientes diabéticos, buscar mejorar el control glicémico y finalmente, dar a los tejidos las condiciones adecuadas para favorecer su regeneración ya que la periodontitis se caracteriza por la pérdida de tejidos conectivos dentro del periodonto y la destrucción del soporte del hueso alveolar [45].

Sin embargo, la regeneración de tejidos es un objetivo difícil de conseguir; la reconstrucción del periodonto basado en el control de infecciones es una solución clave para el tratamiento periodontal. No obstante, los estudios encaminados a la reconstrucción del periodonto no han sido exitosos por las dificultades intrínsecas a la regeneración del cemento [46]. Actualmente la atención se centra en dos aproximaciones para la regeneración periodontal, por un lado, la introducción de un material de relleno sobre el defecto periodontal con la esperanza de inducir la regeneración ósea y de manera alternativa, técnicas para guiar a ciertos componentes celulares especializados para participar en el proceso regenerativo [47]. Entre estos componentes, se encuentran la proteína formadora de cemento (CEMP-1) [48], así como los factores de transcripción asociados a diferenciación celular, como lo son la sialoproteína ósea, osteocalcina,





osteopontina, el gen asociado a CBFA1, también llamado factor de transcripción 2 relacionado con Runt (RUNX2) [48–50] y el factor de transcripción específico de osteoblastos OSTERIX [51,52], entre otros [53].

En general, ya que el periodonto consta de cuatro tejidos mesenquimales distintos, dos de ellos, el cemento y el hueso alveolar (con componentes minerales y celulares), el periodonto (que consta mayormente de agua y una matriz proteínica con menor presencia de células) y la encía (que tiene una constitución celular altamente vascularizada), resulta difícil que una sola sustancia favorezca la regeneración de todos los tejidos luego de un proceso de destrucción. Por lo tanto, los estudios actuales, usualmente sólo se dirigen a la regeneración de uno de los tejidos.

Los enfoques más comunes son: el uso de antibióticos para detener la infección, antiinflamatorios y antioxidantes, tratamientos quirúrgicos, uso de sustancias que promuevan la remineralización y el uso de materiales y biomateriales de relleno.

1.5. Uso de plantas como tratamiento tradicional contra la periodontitis

Como ya se ha establecido, el uso de plantas como tratamiento tradicional para problemas estomatológicos se ha conocido desde hace siglos, en el caso particular de México, el registro más antiguo se encuentra en el código De la Cruz Badiano. Lamentablemente, excluyendo el presente trabajo, no se tiene ningún otro reporte científico acerca de las propiedades de las plantas mexicanas como tratamiento dirigido a la regeneración de tejidos de soporte periodontal.

Existe un reporte bibliográfico [54] que contiene un meta análisis sobre del efecto de ciertas plantas o productos naturales en la diferenciación específica osteogénica. En dicha revisión, se llegó a la conclusión de que 8 publicaciones cumplían con los requisitos experimentales para soportar las conclusiones de los autores (Boonanantanasarn *et al.*, 2014 con *Morinda citrifolia*; Chantarawatit *et al.*, 2014 con *Aloe vera*; Gao *et al.*, 2013 con *Fructus cnidii*; Jittapiromsak *et al.*, 2007 con *Aloe vera*; Kim *et al.*, 2013 con la hesperetina; Kim *et al.*, 2015 con *Zanthaxylum*





schinifolium; Nowwarote *et al.*, 2013 con *Centella asiática* y, Pei *et al.*, 2013 con *Epimedium spp*) [55–62] . Sin embargo, la editorial del *Dental Materials Journal* se ha retractado del artículo de Boonanantanasarn *et al.* [55].

Las pruebas de actividad analizadas en dicha revisión son: proliferación celular, actividad específica de la fosfatasa alcalina, evaluación de genes y proteínas, deposición mineral y formación de hueso en modelo animal.

Es importante destacar que existen reportes adicionales en la literatura de productos naturales dirigidos a otras propiedades, como inhibir la osteoclastogénesis [63] o la capacidad del resveratrol para prevenir la resorción ósea en un modelo de periodontitis inducido por LPS [64].

Finalmente, existe otro enfoque, basado en la capacidad de ciertas sustancias para inducir la nucleación de fosfatos de calcio, específicamente fosfato octacálcico e hidroxapatita, mismos que son empleados directamente como biomateriales. Sin embargo, hasta el momento no se tiene reporte de algún producto proveniente de fuentes vegetales con esa capacidad.

2. La familia Crassulaceae

La familia Crassulaceae también es conocida como la familia de las siemprevivas o uvas de gato (*stonecrop* en inglés), la familia se distribuye globalmente, especialmente en el hemisferio norte y cuenta con aproximadamente 35 géneros y 1410 especies [65,66] y se divide en seis subfamilias: Crassuloideae, Kalanchoideae, Cotyledonoideae, Echeverioideae, Sedoideae y Sempervivoideae; el género *Sedum* L. pertenece a la subfamilia Sedoideae [67]. Las plantas de esta familia son dicotiledóneas y suculentas, esto último quiere decir que presentan resistencia al secado, por lo que pueden vivir en sitios áridos. Otra característica importante es que las plantas de la familia poseen un metabolismo fotosintético especial conocido como Metabolismo Ácido de las Crasuláceas o CAM por su acrónimo en inglés *Crassulacean Acid Metabolism* [66] como estrategia de adaptación para evitar la pérdida de agua durante la fase luminosa.





3. El género *Sedum* L.

El género *Sedum* consta de 600 especies, por lo que es el más numeroso de la familia, se encuentra principalmente en las regiones templadas del norte del globo, aunque algunas especies se han encontrado en Perú, África central y Madagascar. La rodiola (*Sedum rosea* o *Sedum rhodiola*), es frecuentemente clasificada como un género distinto (*Rhodiola*). Las especies de *Sedum* de México y Norteamérica son las más suculentas del género [67]. México es posiblemente el país más rico en flora xerofítica y suculenta y el tercero en abundancia de plantas del género *Sedum*, con alrededor de 100 especies [68].

La mayoría de las especies del género son rastreras; sin embargo, algunas también presentan aspecto leñoso. Las especies con esas características que se pueden encontrar en México y Latinoamérica se enlistan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Especies leñosas del género *Sedum* de México y Latinoamérica [68].

<i>Sedum alantoides</i> Rose	<i>Sedum obcordatum</i> Clausen
<i>Sedum bourgaei</i> Hemsley	<i>Sedum oxycoccoides</i> Rose
<i>Sedum burrito</i> Moran	<i>Sedum oxypetalum</i> Humboldt Bonpland y Kunth
<i>Sedum calcicola</i> Robinson y Greenman	<i>Sedum palmeri</i> S. Watson
<i>Sedum frutescens</i> Rose	<i>Sedum pulvinatum</i> Clausen
<i>Sedum furfuraceum</i> Moran	<i>Sedum quevae</i> Hamet
<i>Sedum griseum</i> Praeger	<i>Sedum retusum</i> Hemsley
<i>Sedum guadalajaranum</i> S. Watson	<i>Sedum stahliaii</i> Solms
<i>Sedum hernandezii</i> Méyran	<i>Sedum torulosum</i> Clausen
<i>Sedum morganianum</i> Walther	

De las especies leñosas que crecen en México, sólo tres tienen apariencia dendroidea, con tallo robusto y de hojas deciduas, *Sedum frutescens*, *Sedum torulosum* y *S. oxypetalum*. Pero sólo se suelen confundir a *S. frutescens* y *S. oxypetalum* al perder el follaje, la diferencia entre las especies es que la primera presenta flores blancas y las hojas lanceoladas y la segunda presenta flores rosas o rojas y las hojas espatuladas [68].





3.1. Distribución y hábitat del género *Sedum*

En general, el género *Sedum* se distribuye en el hemisferio norte, sus especies ocupan lugares que se drenan rápidamente y donde hay poca competencia con otras plantas, muchas especies son circumpolares, algunas crecen incluso a latitudes mayores al círculo ártico. En latitudes muy grandes, estas plantas tienden a estar asociadas a franjas costeras rocosas o arenosas, mientras que en los trópicos suelen encontrarse en regiones alpinas [68].

3.2. Composición química del género *Sedum*

Se han aislado numerosos compuestos de interés científico provenientes de plantas del género *Sedum spp* L., entre ellos se encuentran la sedoheptulosa y un producto de deshidratación de la misma, sedoheptulosán (**Figura 3**), que se han encontrado en general en numerosas especies de la familia Crassulaceae [69,70].

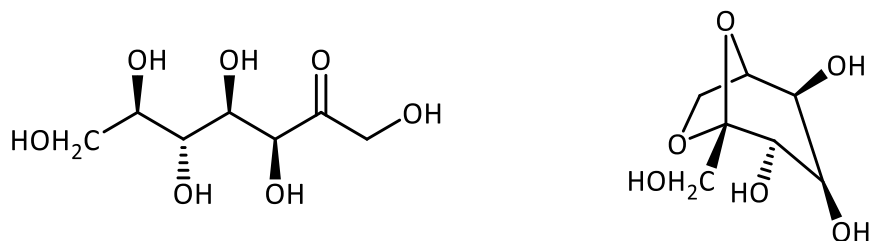


Figura 3. Estructura química de la sedoheptulosa (izq) y del sedoheptulosán (der).

Se han hallado glicósidos de quenferol en *Sedum dendroideum* (Cuadro 3) [71], también fueron detectados mediante UPLC/MS quercetina, crisina, rutina, naringenina, ácido cafeico (Cuadro 4), entre otros en *Sedum sediforme* [72] y la δ -amirona aislada de *Sedum lineare* (Cuadro 4) [73].



En *Sedum microcarpum* se detectaron quinonas, flavonoides, taninos y alcaloides [74]. *Rodhiola rosea* (Sin. *S. rhodiola*) contiene compuestos fenólicos, taninos, proteínas, alcoholes monoterpénicos, glicósidos cianogénicos, glicósidos de fenilpropanoides, proantocianidinas y algunos de sus derivados (Figura 4), entre otros [75].

Cuadro 3. Glicósidos de quenferol encontrados en *Sedum dendroideum* [71].

	Flavonoides	R ₁	R ₂
	1 (quenferitrina)	Rha	Rha
	2	Glu	Rha
	3	Rha (1→2) Glu	Rha
	4	Rha (1→2) Glu	Glu
	5 (α-ramnoisorobina)	H	Rha
	6 (afzelina)	Rha	H
	7 (quenferol)	H	H
Rha = Ramnosa; Glu = Glucosa			

Adicionalmente, se ha descrito la presencia de quenferol y quercetina (Cuadros 3 y 4) en *Sedum sarmentosum*, *S. lineare* y *S. emarginatum* [76]. También ha sido descrito que en numerosas especies del género se encuentra cadaverina, nicotina, sarmentosina, peletierina [6], sedamina [6,77] y el epóxido de sarmentosina en *Sedum cepaea* [78] (Cuadro 4). Finalmente, se ha reportado que en el aceite esencial de diversas especies del género se encuentran principalmente terpenoides, alcaloides, aldehídos, alcoholes y alcanos [74].



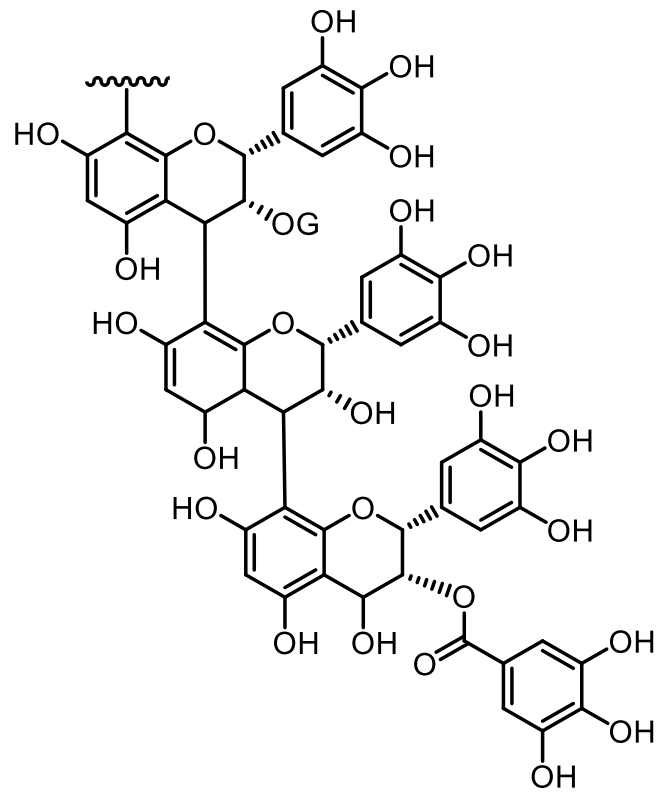
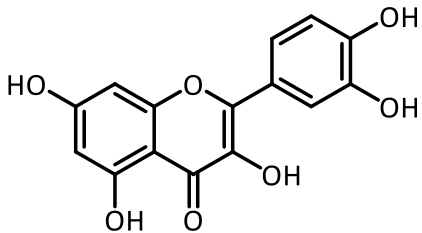
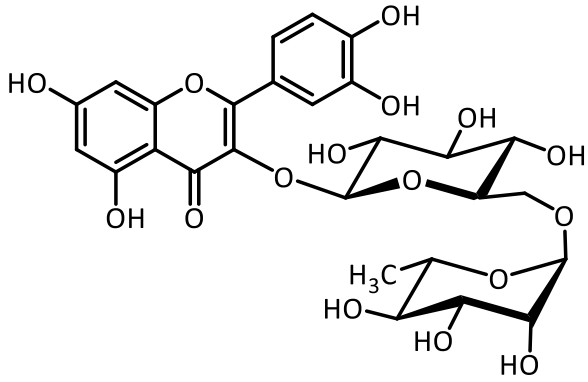
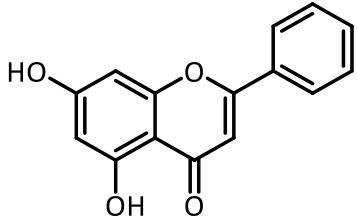
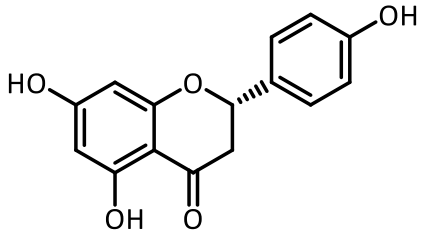
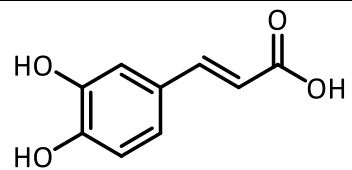
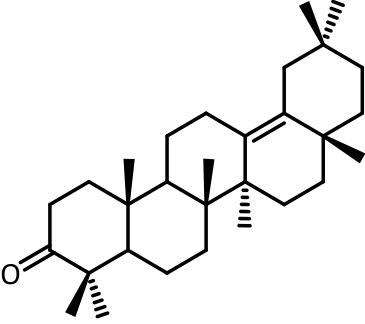
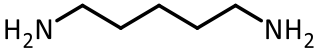
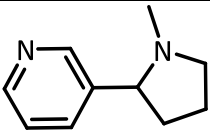
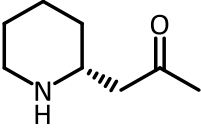
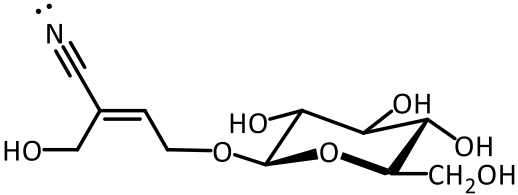
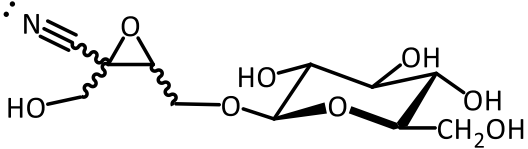
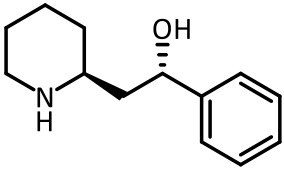


Figura 4. Estructura química de la prodelfinidina (proantocianidina encontrada en *Rhodiola rosea*) [75].

Cuadro 4. Compuestos aislados de plantas del género *Sedum*.

Estructura química	Nombre del producto químico	Especie donde fue aislado
	quercetina	<i>Sedum sediforme</i> [72]
	rutina	
	crisina	
	naringenina	
	ácido cafeico	



	δ -amirona	<i>Sedum lineare</i> [73]
	cadaverina	Diversas especies del género <i>Sedum</i> spp. [6]
	nicotina	
	peletierina	
	sarmenosina	
	epóxido de sarmenosina	<i>Sedum cepaea</i> [78]
	sedamina	<i>Sedum acre</i> [6,77]



4. *Sedum oxypetalum* Kunth (Crassulaceae)

4.1. Nombres comunes

Al igual que la mayoría de las plantas del género *Sedum*, *Sedum oxypetalum* Kunth es conocido con el nombre de “siempreviva” o “siempreviva del sureste”. En el municipio de Tenango del Valle, Estado de México, es conocido como “jiote”. En el código De la Cruz Badiano aparece con el nombre náhuatl de *texiyotl*, que significa “costra dura o costra de piedra” [2].

4.2. Clasificación taxonómica

Reino	Plantae
Subreino	Viridiplantae
Infrarreino	Streptophyta
Superdivisión	Embryophyta
División	Tracheophyta
Subdivisión	Spermatophytina
Clase	Magnoliopsida
Superorden	Saxifraganae
Orden	Saxifragales
Familia	Crassulaceae
Género	<i>Sedum</i> L. [79]
Especie	<i>Sedum oxypetalum</i> Kunth. [80]

4.3. Sinonimia

Sedum arborescens Moc. y Sessé, *Sedum peregrinum* Moc. y Sessé [4,80].





4.4. Descripción botánica de la especie y distribución geográfica

“*Sedum oxypetalum* (Crassulaceae) es un arbusto que habita en matorrales pedregosos del Eje Neovolcánico Transversal, donde es endémico. Esta especie mide entre 50 cm y 1 m de altura, su tronco principal es de porte erecto, suculento y exfoliante, que puede medir hasta 15 cm de diámetro. El tallo principal se ramifica en ramas delgadas y papilosas que se dividen dicotómicamente. Las hojas son papilosas, de oblanceoladas a obovadas con ápice redondeado, de 8 a 15 mm de largo por 5 a 10 mm de ancho, las cuales se pierden después de la época de floración; cuando esta especie pierde sus hojas, es fácil que se le confunda con *S. frutescens*, ya que la apariencia del tallo es similar en ambas especies. Las inflorescencias son en forma de cima terminal y cuenta con flores pentámeras, sépalos desiguales, pétalos lanceolados de color rojizo, filamentos rosas anteras rojas, nectarios amarillos y pistilos de verde amarillentos a café rojizos; a menudo las flores están ligeramente perfumadas. La floración en periodo de fructificación ocurre entre octubre y enero. El fruto es un folículo que posee numerosas semillas pequeñas y reticuladas de 0.6 x 0.8 mm, las cuales son dispersadas por el viento. Como en muchas especies del género *Sedum*, esta especie tiene gran capacidad de propagarse vegetativamente gracias a la producción de raíces adventicias a partir de sus ramas fragmentadas” [81].

Como se mencionó, *S. oxypetalum* es endémico del Eje Neovolcánico Transversal; se han documentado colectas de la especie en diversos puntos (Cuadro 5 y Figura 5).

4.5. Usos reportados de la especie vegetal

Hasta el momento, sólo se cuenta con reportes del uso de la especie para la recuperación de suelos volcánicos perturbados por la intervención humana [11,12], debido a su capacidad de adaptación, lo que facilitaría la recuperación de las comunidades de plantas [12] y por tener actividad moderada contra *Trychophyton rubrum* [1].





Cuadro 5. Colectas reportadas de *S. oxypetalum* [4].

Sitio	Entidad federativa	Sitio	Entidad federativa
Huixquilucan	Estado de México	La Angostura	Ciudad de México
Río Tiscaltengo		Campo de lava del Xitle	
Iztaccíhuatl		San Nicolás	
Temascaltepec		Tacubaya	
Cerca de Toluca		Volcán Ajusco	
Sierra de Chalchi		Pedregal de San Ángel	
Tres Marías	Morelos	Cerca de Taxco	Guerrero
Sierra de Tepoztlán		Pátzcuaro	Michoacán
Campo de lava al noroeste de Cuernavaca		Tequisquiapan	Querétaro
Cuatepec de Hinojosa	Hidalgo [7]		

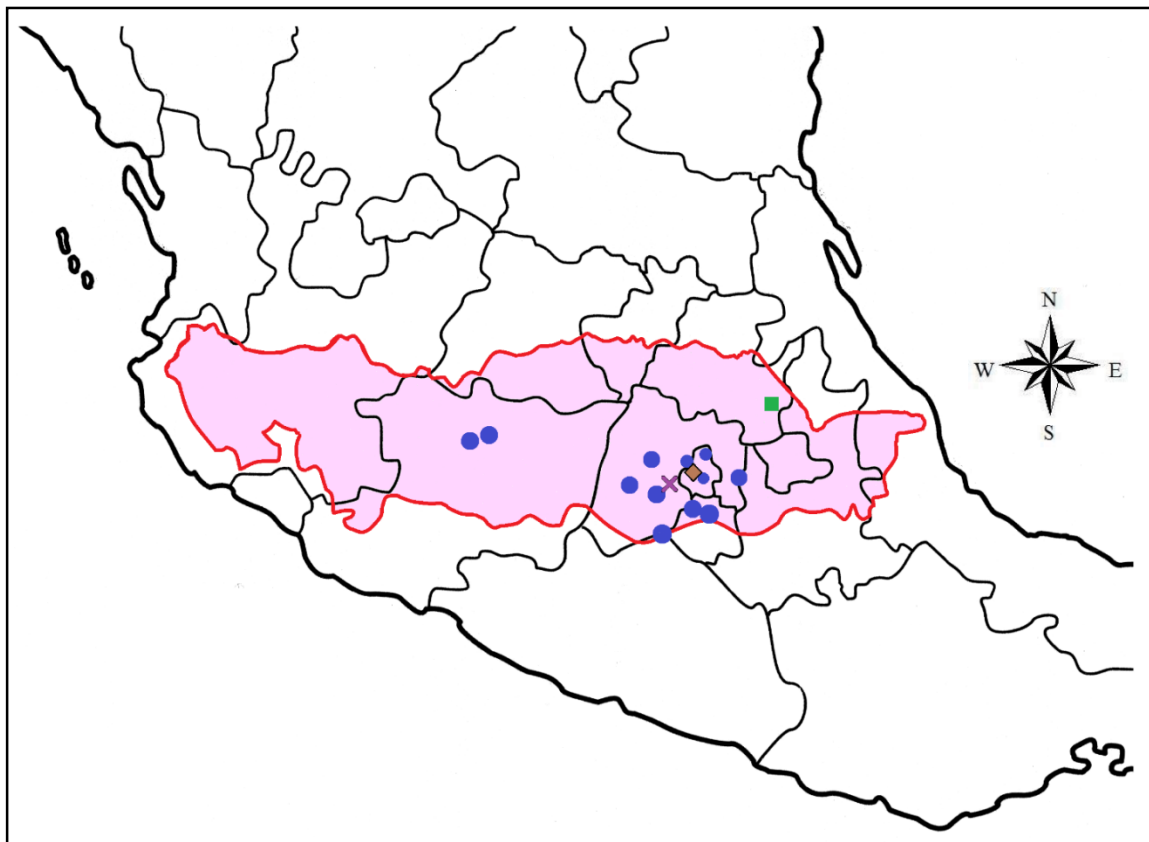


Figura 5. Distribución geográfica conocida de *S. oxypetalum*. La región rosa delimitada con rojo corresponde al Eje Neovolcánico Transversal, las marcas corresponden a diferentes zonas de colectas reportadas: ● [4], ■ [7], ◆ [9,10] y ✕ sitio de colecta del presente trabajo.





PARTE EXPERIMENTAL

1. Material y equipos

1.1. Material cromatográfico

Para la cromatografía en capa delgada (CCD) se emplearon cromatofolios de gel de sílice Macherey-Nagel Düren Alugram provistos de indicador UV, una cámara con lámpara UV para tres longitudes de onda, 254, 302 y 365 nm. Se utilizó una solución de sulfato cérico amoniacal $[(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}]$ 2N como agente revelador. Para la cromatografía en columna abierta (CCA) se utilizaron columnas de diversos tamaños, gel de sílice 60 G de la marca Merck (malla 0.063-0.200 mm) y diversos eluyentes previamente destilados.

1.2. Medios de cultivo y reactivos

Todos los reactivos, disolventes y medios de cultivo empleados fueron grado analítico, el kit para la medición *in vitro* de inhibición de ciclooxigenasas (COX) fue adquirido de Cayman Chemical Company [82] y se empleó agua Milli-Q bidestilada con columna tipo *Vigreux*.

1.3. Obtención de las células humanas derivadas del ligamento periodontal (hPDLs)

Las células humanas derivadas del ligamento periodontal fueron obtenidas de acuerdo con los protocolos aprobados por la junta interna del comité de la Facultad de Medicina de la UNAM, las células fueron derivadas a través de la técnica convencional de explante previamente descrita [50,83].



1.4. Material vegetal

El material vegetal fue colectado directamente en el sitio donde se describe el uso tradicional, el día 15 de enero de 2014 en el cerro *tetepetl*, localidad de Tenango de Arista, municipio de Tenango del Valle, Estado de México, con las coordenadas geográficas 19°05'56.09" N, 99°35'45.19" O, altitud de 2669 m.s.m. sobre el callejón "Privada de Francisco Javier Mina" y fue posteriormente identificado botánicamente en el Instituto de Biología de la UNAM, donde se conserva una muestra de referencia con código SO-1-2016.

La colecta del material vegetal y su uso para la presente investigación fueron llevados a cabo en estricto apego con los procedimientos previstos en Protocolo de Nagoya de la Organización de las Naciones Unidas (ONU) [84], mismo que fue firmado y ratificado por el Estado Mexicano el 12 de octubre de 2012, así como lo estipulado en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 [85] y el Código para la Biodiversidad del Estado de México [86]; por lo que, su uso sostenible quedará protegido por este marco legal para la participación justa y equitativa en los beneficios que se deriven del mismo.

1.5. Equipos analíticos y programas para análisis

1.5.1. Rotavapor

Se utilizó un rotavapor marca Ika modelo RV10, provisto de una bomba de alto vacío marca Büchi modelo V710 con controlador de vacío modelo V850 y un circulador enfriador marca PolyScience modelo LM6.

1.5.2. Espectroscopía de Infrarrojo (IR), Raman y Fluorescencia de rayos X (XRF)

Los espectros de infrarrojo se obtuvieron con un equipo Alpha Bruker con módulo de reflexión; los espectros Raman y la fluorescencia de rayos X se obtuvieron con un espectroscopio portátil BW-TEK con un láser de 1064 nm y con el equipo SANDRA provisto de un tubo de





Molibdeno y detector SDD equipado con un haz colimado de 1.5 mm de diámetro respectivamente, en las instalaciones del Laboratorio Nacional de Ciencias para la Conservación del Patrimonio Cultural LANCIC en el Instituto de Física de la UNAM. Los espectros Raman experimentales fueron procesados con el programa OriginPro versión 8.5.0 SR1, los espectros XRF con el programa PyMca versión 5.1.2 y todos los espectros e histogramas, fueron graficados con el programa GraphPad Prism versión 6.01, 2012.

1.5.3. Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear fueron obtenidos en espectroscopios marca Varian, modelos Unity Inova 300-S, 400-S y 500-S a las frecuencias de ^1H de 300, 400 y 500 MHz, empleando cloroformo deuteriado (CDCl_3) y óxido de deuterio (D_2O) como disolvente, en las instalaciones de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAII) de la Facultad de Química de la UNAM (300 y 400 MHz) y del Instituto de Química de la UNAM (500 MHz). Los datos experimentales fueron procesados con el programa MestReNova versión 6.0.2-5475, 2009.

1.5.4. Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (GC-MS)

Los análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS) se realizaron con un equipo LECO-Pegassus III, en las instalaciones de la USAII.

1.5.5. Espectrometría de Emisión Atómica de Plasma inducido por Microondas (MP-AES)

Las mediciones se realizaron en un equipo MP-AES 4200 marca Agilent modelo MDS 2000, para la calibración se emplearon estándares certificados marca High-Purity Standards.





1.5.6. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y de transmisión de alta resolución (HR-TEM)

Las micrografías SEM fueron obtenidas con un equipo JEOL modelo JSM-5900LV y el microanálisis EDS con un equipo Oxford Aztek. Las micrografías HR-TEM y el patrón de difracción de área seleccionada experimental (SADP) fueron obtenidas con un equipo JEOL modelo 2010-200kV en las instalaciones de la USAII. Los datos experimentales de la microscopía electrónica de transmisión fueron procesados con el programa Digital Micrograph de Gatan U.S.A.

1.5.7. Difracción de Rayos X de monocristal

La recolección de datos experimentales de difracción de rayos X de monocristal se realizó en un equipo Xcalibur Atlas Gemini provisto de una fuente de radiación de Mo K α con $\lambda = 0.71073$ nm a 130 K. El refinamiento de la estructura cristalina se realizó con 446 reflexiones y 28 parámetros.

1.5.8. Difracción de Rayos X de polvos

El difractograma experimental se obtuvo con un difractómetro marca Bruker modelo Advance D8, equipado con una fuente radioactiva de Cu K α con λ de 1.5406 Å y filtro de Ni en las instalaciones de la USAII. La comparación e identificación con bases de datos se realizó con el programa Match versión 1.11g 2013, el refinamiento mediante el método Rietveld de la estructura cristalina se realizó con el programa Topas Academic versión 4.1 2007 de Bruker y las figuras de las estructuras cristalinas se construyeron con el programa Diamond, versión 3.1i 2012.





2. Caracterización química

2.1. Obtención y fraccionamiento de extractos

5.5 kg del material vegetal, fueron enjuagados y posteriormente procesados con un extractor de jugos de potencia industrial con cuerpo de acero inoxidable marca International. Se obtuvieron 3.5 L de jugo, en lo subsecuente llamado extracto acuoso (EA) y 2 kg de bagazo húmedo, en lo subsecuente llamado residuo sólido. El EA fue clarificado mediante centrifugación, una muestra (500 mL) fue conservada como testigo a 4°C. Durante el procesamiento del EA un sólido precipitó espontáneamente, el cual fue aislado mediante filtración y se mantuvo en un frasco vial (8.3 g); este producto se analizó mediante fluorescencia de rayos X, espectroscopía de infrarrojo, espectroscopía Raman y difracción de rayos X de polvos, dicho producto fue identificado como singenita, cuya fórmula molecular es $[K_2Ca(SO_4)_2 \cdot H_2O]$.

El resto del EA fue concentrado a presión reducida en el rotavapor, hasta obtener un concentrado con una cantidad de humedad residual del 20% para evitar dificultades posteriores en su medición de masa y redisolución.

El residuo sólido fue secado durante 14 días, el producto pesó 550 g, el cálculo de la proporción total de humedad en las partes aéreas fue del 90 %. El residuo sólido seco fue dispuesto en un matraz con forma esférica y capacidad para 5 L, posteriormente se agregaron 3 L de una mezcla de $CHCl_3:CH_3OH::1:1$ y se sometió a maceración durante 7 días durante los cuales la mezcla de disolventes fue filtrada y concentrada a presión reducida colocando por separado el extracto orgánico y devolviendo la mezcla de disolventes al residuo sólido vegetal. Se obtuvieron un total de 75 g del extracto orgánico (EO) y se mantuvo a 4°C hasta su siguiente procesamiento.

El EO fue fraccionado mediante reparto con mezclas inmiscibles H_2O/n -hexano, $H_2O/CHCl_3$ y $H_2O/AcOEt$ para obtener cuatro fracciones: *n*-hexano (6.2 g), $CHCl_3$ (10.8 g), AcOEt (2.3 g) y H_2O (30 g).



Las fracciones de *n*-hexano, cloroformo y acetato de etilo se sometieron a un fraccionamiento secundario mediante cromatografía en columna abierta (CCA), empleando gel de sílice y mezclas de disolventes con polaridades crecientes. Se empleó *n*-hexano/AcOEt para la primera (21 fracciones) y CHCl₃/CH₃OH para las segunda y tercera (25 y 31 fracciones respectivamente). El proceso de obtención y fraccionamiento de los extractos se esquematiza en la Figura 6.

A partir del fraccionamiento en CCA de la fracción de *n*-hexano, se pudo obtener un producto cristalino considerablemente puro, soluble en cloroformo; dicha muestra se analizó mediante resonancia magnética nuclear; una segunda muestra proveniente de la fracción de *n*-hexano se analizó mediante GC-MS. De la misma manera, una muestra de la fracción de cloroformo se analizó mediante GC-MS. Finalmente, una muestra proveniente del fraccionamiento de la fracción de AcOEt se analizó mediante RMN.

El extracto acuoso (EA) fue sometido a fraccionamiento por tamaño de partícula en columna abierta empleando Sephadex LH-20 como fase estacionaria y metanol de modo isocrático como fase móvil de acuerdo con lo descrito en la literatura [87]. Se emplearon 50 g de fase estacionaria y cantidades de muestra de 2.5 g (equivalente másico al 5%); el fraccionamiento se repitió varias veces (2.5 g cada vez), colectando en cada ciclo 21 fracciones. Las fracciones se agruparon de acuerdo con su similitud cromatográfica bajo luz UV y al revelarse con sulfato cérico amoniacal en CCD.

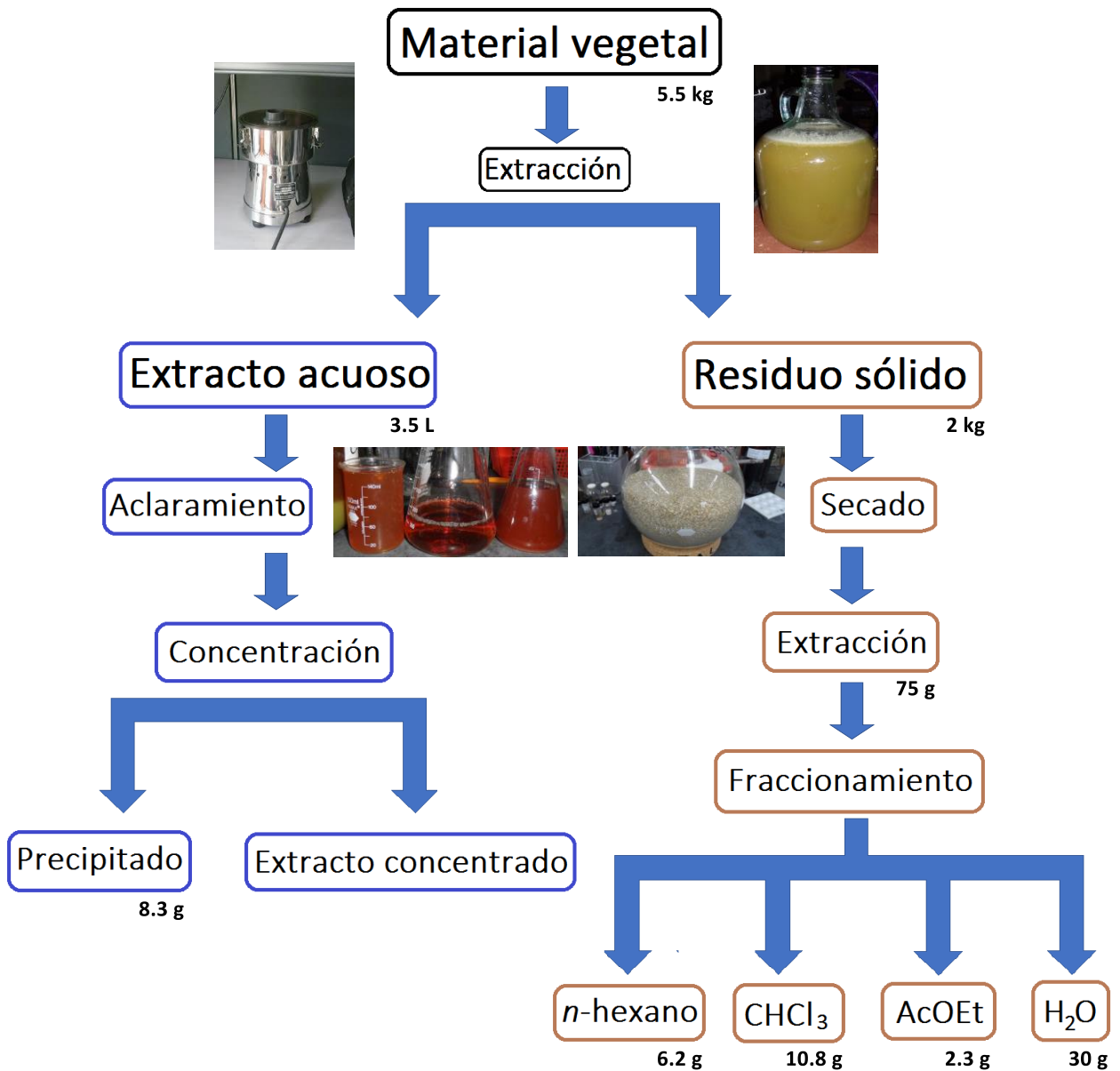


Figura 6. Esquema de obtención y fraccionamiento de los extractos.

Del fraccionamiento mediante CCA del EA se pudo obtener un producto sólido inorgánico cristalino (que fue analizado mediante difracción de rayos X de monocristal) y un producto orgánico mayoritario; éste último se purificó mediante CCA empleando gel de sílice como fase estacionaria y un sistema de elución ternario que consistió en mezclas de cloroformo, acetona y metanol, comenzando con cloroformo y posteriormente variando las proporciones de la siguiente manera: $\text{CHCl}_3:(\text{CH}_3)_2\text{CO}:\text{CH}_3\text{OH}::6:4:0$, $6:3:1$, $5:4:1$, $5:3:2$ repartido en 12 fracciones en las cuales



se observó que en la columna se retiene un compuesto con coloración ligeramente amarilla, el producto mayoritario se obtuvo a partir de la fracción 5 con la composición $\text{CHCl}_3:(\text{CH}_3)_2\text{CO}:\text{CH}_3\text{OH}::6:3:1$; dicho producto no presentó fluorescencia importante bajo la luz UV, pero reveló con sulfato cérico amoniacal (r_f de 0.38), la cromatografía en capa delgada del fraccionamiento se muestra en la Figura 7. La muestra purificada fue analizada mediante RMN e identificada como sedoheptulosa.

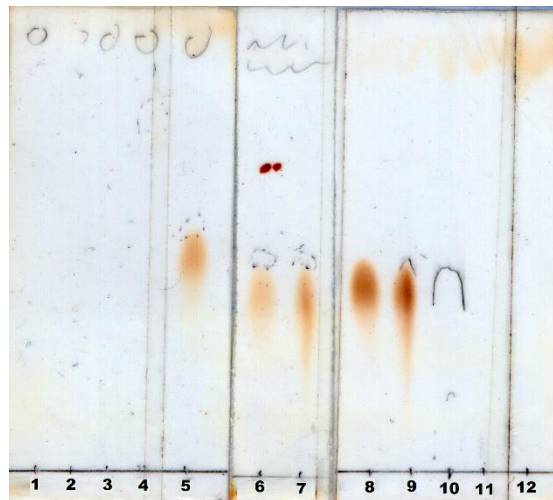


Figura 7. Cromatografía en capa delgada de la purificación de la sedoheptulosa.

Otra muestra del extracto acuoso fue sometida a fraccionamiento mediante reparto utilizando el EA concentrado reconstituido con H_2O (Milli Q bidestilada en vidrio) y cloroformo, la fracción orgánica se concentró a presión reducida y fue analizada mediante GC-MS para identificar los componentes volátiles del EA.

2.2. Análisis general del suelo y de cenizas de las partes aéreas

Con el propósito de descartar la presencia de elementos tóxicos en la especie vegetal, tales como cadmio, cromo, plomo, arsénico y mercurio, se analizó una muestra del suelo del sitio de colecta de la especie vegetal en cuanto a su composición elemental y el porcentaje de material orgánico. La muestra fue previamente deshidratada en una estufa a 120°C y posteriormente una



fracción de la misma se calcinó a 650°C durante 6 horas. Adicionalmente, una muestra de las partes aéreas de la especie vegetal se sometió a deshidratación y posterior calcinación con las mismas condiciones que el análisis de suelo. Las muestras fueron analizadas mediante SEM-EDS.

2.3. Cálculo de la concentración de sólidos en el extracto acuoso

La concentración de sólidos en el extracto acuoso se realizó mediante el procedimiento de pérdida por secado, se emplearon muestras del testigo del EA con tres diferentes volúmenes y con tres réplicas, las muestras fueron sometidas a calentamiento en una estufa a 120°C hasta sequedad total.

2.4. Cuantificación de cationes metálicos en el extracto acuoso

Una fracción del testigo del extracto acuoso fue analizada mediante espectrometría de emisión atómica de plasma inducido por microondas (MP-AES), empleando HNO₃ suprapuro. El propósito del análisis fue cuantificar los elementos: Mg, Na, Mn, Fe, Al, K y Ca en el EA.

3. Pruebas farmacológicas

3.1. Pruebas de actividad antioxidante

3.1.1. Ensayos de Folin, DPPH y ABTS

El extracto acuoso fue evaluado con diversos ensayos para determinar su capacidad antioxidante, la cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu y atrapamiento de las especies sintéticas radical DPPH• y el catión radical ABTS^{•+}.

La cuantificación de fenoles totales se realizó de acuerdo con una metodología previamente descrita en la literatura [88,89], considerando la fórmula descrita en la FHEUM [5]; el método se basa en lecturas colorimétricas a 760 nm y ácido gálico como control positivo. Los ensayos de atrapamiento de DPPH• y ABTS^{•+} se realizaron de acuerdo con metodologías previamente descritas con modificaciones menores [90,91], ambos ensayos se basan en reacciones colorimétricas; para





el ensayo de DPPH, las mediciones se realizaron a 515 nm y a 734 nm para el ABTS^{•+} respectivamente, en ambas mediciones se utilizó Trolox como control positivo. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

3.1.2. Ensayos de atrapamiento de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Se evaluó la capacidad del EA de *S. oxypetalum* para atrapar especies reactivas de oxígeno mediante siete ensayos *in vitro*, anión radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($\bullet OH$), ácido hipcloroso (HClO), peroxinitrito ($ONOO^-$), oxígeno singulete (1O_2) y ORAC. Todas las mediciones se realizaron basadas en metodologías previamente reportadas con menores modificaciones y fueron realizadas por triplicado.

El ensayo de superóxido se basa en un método colorimétrico [89,92], el EA se utilizó a concentraciones de 0.0625 a 1 mg/mL, las lecturas se realizaron a 560 nm y se empleó Tiron (sal disódica monohidratada del ácido 4,5-dihidroxi-1-3-bencendisulfónico) como estándar para la construcción de las curvas de calibración.

Para el ensayo de peróxido de hidrógeno se usó una metodología basada en una reacción de fluorescencia entre el reactivo Amplex Red y la peroxidasa de rábano rusticano (*Armoracia rusticana*) [89,92]. El EA se mezcló a diferentes concentraciones (0.5 to 5 mg/mL) con una solución de H_2O_2 , las lecturas se realizaron con longitudes de onda de emisión de 590 y de excitación de 530 nm y se utilizó piruvato de sodio como estándar.

La evaluación de la capacidad de atrapamiento del radical hidroxilo se realizó mediante una metodología basada en mediciones de fluorescencia [89,92], con longitudes de onda de emisión de 420 y de excitación de 320 nm, registrando las respuestas cada dos minutos durante 30 minutos. El EA se utilizó a concentraciones de 0.5 a 5 mg/mL y la N,N'-dimetiltiourea se utilizó como estándar.



El ensayo de ácido hipocloroso también se basa en fluorescencia [89,92], para lo cual se utilizaron concentraciones del EA desde 0.5 hasta 5 mg/mL en agua, una solución de HClO y otra de ácido *p*-aminobenzoico, las que se mezclaron en 150 μ L de *buffer* de fosfatos. Los datos se colectaron empleando longitudes de onda de emisión de 340 y de excitación de 280 nm y se empleó ácido ascórbico como estándar.

Para el ensayo de peroxinitrito se utilizó una metodología previamente descrita basada en fluorescencia [89,92], se emplearon concentraciones del EA desde 0.5 hasta 5 mg/mL. La fluorescencia se midió con longitudes de onda de emisión de 528 y de excitación de 485 nm cada 5 minutos durante 30 minutos. Se utilizó penicilamina como estándar.

Para el ensayo de oxígeno singulete se empleó una metodología previamente descrita [89,92], las concentraciones del EA fueron de 0.3125 a 5 mg/mL. Las placas se incubaron durante 10 minutos a 25°C en la obscuridad, después se agregaron 150 μ L de etanol y se midió la fluorescencia con las longitudes de onda de 455 (emisión) y de 410 nm (excitación). Las lecturas se registraron cada minuto por 10 minutos y se empleó ácido lipoico como estándar.

Finalmente, el ensayo ORAC se basa en mediciones de la persistencia de la fluorescencia en presencia de radicales peroxilo [89,92,93] y las muestras se probaron a concentraciones de 0.002 a 0.5 mg/mL. Las lecturas se obtuvieron con longitudes de onda de emisión de 565 y excitación de 540 nm; se empleó Trolox para construir la curva de calibración.

3.2. Actividad antiinflamatoria vía inhibición *in vitro* de ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2)

Se evaluó la actividad inhibitoria del extracto acuoso y de la sedoheptulosa contra enzimas ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2) mediante un modelo *in vitro* basado en una reacción de competencia tipo inmunoensayo enzimático colorimétrico; el experimento se realizó utilizando un kit *COX Inhibitor Screening Assay* No. 560131 provisto por Cayman Chemical y se efectuó de





acuerdo con las indicaciones del fabricante [82] en las instalaciones del Instituto de Química de la UNAM. El ensayo se basa en una reacción competitiva entre las prostaglandinas (PGs) producidas por las COX y un producto conjugado de PG con acetilcolinesterasa (AChE) llamado trazador, provisto en el kit por una cantidad limitada de antisuero contra las PGs. Debido a que la concentración del trazador se mantiene constante y la de PGs varía, la cantidad del trazador que se puede unir al antisuero será inversamente proporcional a la concentración de PG en los pozos. La reacción colorimétrica se produce entre la AChE del trazador (PG-AChE) y un reactivo revelador (Reactivo de Ellman provisto en el kit). La absorbencia se mide a 412 nm, las mediciones de inhibición de COX se realizaron por triplicado y a dos concentraciones (10 y 50 μM para la sedoheptulosa y 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el EA); se emplearon Indometacina (3.28 mg/mL) y Celecoxib (1.96 mg/mL) como controles positivos para COX-1 y COX-2 respectivamente [94,95] y agua tipo Milli-Q bidestilada en vidrio para las reacciones enzimáticas.

3.3. Actividad antimicrobiana ante bacterias periodontopatógenas

Se evaluó la actividad antimicrobiana del extracto acuoso contra seis cepas bacterianas (*American Type Culture Collection*), *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus oralis* ATCC 35037, *Actinomyces israelii* ATCC 12102, *Fusobacterium nucleatum*, subsp *nucleatum* ATCC 25586, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotipo b ATCC 43718. Todas las cepas fueron crecidas en medio BHI (*Brain Heart Infusion Agar*) suplementadas con Agar Soya Tripticasa (TSA), extracto de levadura, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de hemina, 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de menadiona y 5% de sangre desfibrinada de carnero bajo condiciones anaeróbicas (80% N_2 , 10% CO_2 and 10% H_2). Los medios BHI, TSA y el extracto de levadura fueron provistos por Becton-Dickinson, la hemina y menadiona por Sigma-Aldrich y la sangre desfibrinada de carnero por Microlab. Las cepas bacterianas se incubaron de cinco a siete días, se emplearon cultivos puros de cada cepa para todos los experimentos. Los experimentos se realizaron en las instalaciones del Laboratorio de Biología Periodontal de la Facultad de Odontología de la UNAM.



El crecimiento bacteriano de cada cepa fue colectado en tubos individuales que contenían caldo nutritivo (BHI suplementado con TSA, extracto de levadura, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de hemina y 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de menadiona). Se ajustó la densidad óptica a 600 nm hasta obtener una suspensión de 10^4 células/mL de cada cepa. Después, se transfirieron 100 μL de la suspensión ajustada de forma individual a cajas de 96 pozos y se agregaron 100 μL del EA a distintas concentraciones (2.5, 5, 10, 20, 40 y 80 mg/mL) para obtener un volumen final de 200 μL con concentraciones finales de 1.25, 2.5, 5, 10, 20 y 40 mg/mL. Se utilizó caldo nutritivo diluido en proporción 1:1 con H_2O bidestilada como control negativo y gluconato de clorhexidina al 2% como control positivo.

Las cepas bacterianas en presencia del EA fueron incubadas a 35°C en condiciones anaeróbicas usando un agitador orbital (160 rpm durante 48 h). Después de la incubación se realizaron dos diluciones seriadas de las suspensiones de cada pozo y se agregaron 100 μL de suspensión en cajas Petri con medio enriquecido y fueron incubadas en condiciones anaeróbicas durante siete días.

Después de la incubación, se contó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) en cada placa visualmente, se consideraron las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) como aquellas en las que no se observó crecimiento de colonias. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Las cepas se obtuvieron a partir de cultivos congelados crecidos en medio TSA enriquecido (0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de menadiona y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de hemina).

4. Pruebas celulares

Las células humanas derivadas del ligamento periodontal (hPDLs) se cultivaron en frascos de 75 cm^2 que contenían medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino al 10% y antibióticos (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ estreptomycin y 100 U/mL penicilina provistos por Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Se utilizaron las células entre el segundo y séptimo pasaje.



4.1. Proliferación celular y citotoxicidad.

Se evaluó el efecto del EA y de la sedoheptulosa en la proliferación de hPDLs mediante un ensayo colorimétrico basado en MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]. El ensayo del MTT depende de la reducción de la sal de tetrazolio por parte de la succinato:ubiquinona oxidoreductasa de las células viables para formar una sal de formazan azul como producto final (Figura 8).

Las hPDLs fueron colocadas en placas de 96 pozos con una densidad de 1×10^4 células por pozo en 100 μ L de volumen (Costar, Cambridge, MA, USA). Las células se trataron durante 96 h variando las concentraciones de EA y sedoheptulosa, reemplazando el medio por medio fresco adicionado con las muestras. Después de los ensayos preliminares se determinó que la concentración experimental óptima de trabajo es de 5 μ g/mL para ambas muestras.

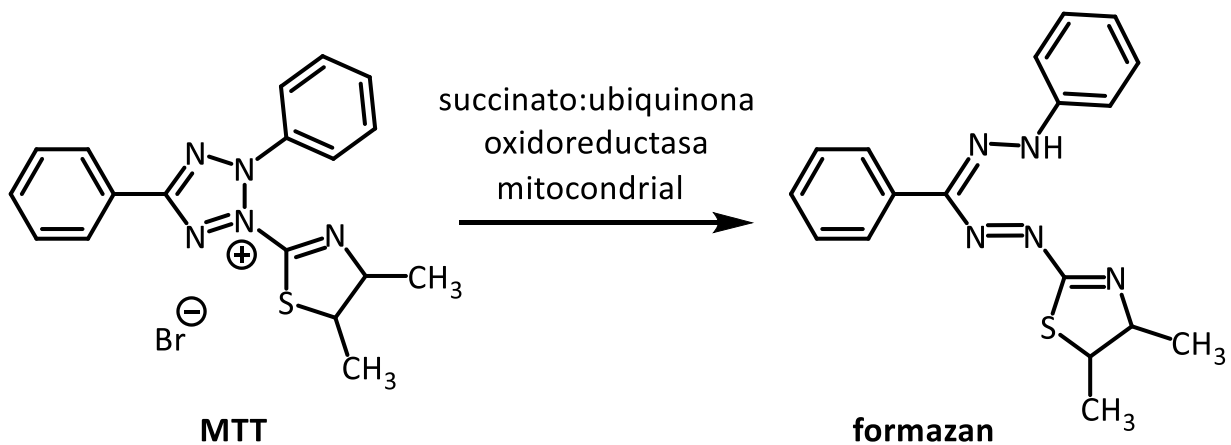


Figura 8. Reacción de reducción enzimática del MTT.

Los cultivos control fueron tratados con vehículo y 2 o 10% de suero fetal bovino (controles negativo y positivo respectivamente). Al final de los intervalos de tratamiento se agregaron 10 μ L de una solución de MTT con una concentración de 5 mg/mL (Boehringer, Mannheim. Indianapolis, IN, USA) en *buffer* salino de fosfatos y los pozos se incubaron a 37°C durante 4 h. Después de la incubación se agregaron 100 μ L de *buffer* lítico (dodecilsulfato de sodio al 20% y dimetilformamida al 50%, pH 4.7) y se incubó durante la noche a 37°C. Las lecturas de las soluciones resultantes se



registraron en un lector de microplacas a 570 nm. La absorbencia refleja el número de células vivas presentes en el cultivo. Los experimentos se desarrollaron por triplicado y con réplica.

4.2. Actividad de la fosfatasa alcalina (ALP)

Las hPDLs fueron agregadas a la concentración de 2×10^4 células por pozo en placas con formato de 24 pozos y se cultivaron durante 5, 10 y 15 días. Las células se trataron en un caso con el EA o en el otro con sedoheptulosa (derivada del EA) a la concentración $5 \mu\text{g/mL}$. La actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) se midió mediante el método descrito por Lowry *et al.*, [96]. La actividad se expresó en nanomol de *p*-nitrofenol por minuto por miligramo de proteína. El contenido de proteína se determinó empleando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar [96]. Los experimentos se realizaron por triplicado y se repitieron al menos dos veces.

4.3. Detección y cuantificación de la mineralización

Las células humanas derivadas del ligamento periodontal (5×10^4 células por pozo) se colocaron en placas de 6 pozos (Costar) y se incubaron de acuerdo con la siguiente composición: para el control negativo se empleó medio DMEM enriquecido con suero fetal bovino al 10%, como control positivo se utilizó medio mineralizante, el cual consistió de medio DMEM enriquecido con suero fetal bovino al 10% suplementado con ácido ascórbico $50 \mu\text{g/mL}$, dexametasona 10 nM y glicerolfosfato 10 mM . Las muestras experimentales se evaluaron adicionando $5 \mu\text{g/mL}$ de las mismas (EA o sedoheptulosa) al medio DMEM con 10% de suero fetal bovino, las muestras se incubaron hasta los 5, 10 o 15 días durante los cuales el medio de cultivo se reemplazó diariamente. Al término de los tiempos indicados las células se fijaron con etanol al 70% y se dejaron secar al aire. Se evaluó la precipitación de calcio mediante la tinción con alizarina roja S (Aldrich Chemical Company Inc, Milwaukee, WI, USA) durante 10 minutos. Para cuantificar la intensidad de los depósitos de calcio se usó el método del cloruro de cetilpiridinio (CPC), el cual es un surfactante catiónico que forma una fuerte interacción con la alizarina, ya que esta última es una sustancia aniónica. Después de fijar los cultivos y tomar las correspondientes fotografías se



agregan 2 mL de una solución acuosa al 10% m/v de CPC en cada pozo y se incubó durante 1 h a 37 °C. Después de la incubación, la solución transparente de CPC vira a púrpura y se diluye cinco veces con la misma solución de CPC al 10% para la lectura de absorbencia (100 µL por pozo) en placas de 96 pozos a 570 nm. Los experimentos se desarrollaron por triplicado y se repitieron al menos dos veces.

4.4. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR)

Este ensayo se realizó empleando una metodología previamente descrita [48] con modificaciones menores. El RNA total se aisló a partir de los sobrenadantes descritos en la sección 4.3 de la parte experimental. Las secuencias de los cebadores (*primers*) se enlistan en el Cuadro 6. Se analizaron las muestras del EA y la sedoheptulosa correspondientes a los 5 y 10 días. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los datos se analizaron con el programa ABI SDS, versión 2.4 (Applied Biosystems).

Cuadro 6. Secuencias de los cebadores empleados en RT-PCR.

Osteocalcina (OCN)	hacia adelante	5'-GTTGCAGGGTCAATCCATTT-3'
	reverso	3'-CCATCCTCATACTGCACCT-5'
Factor de unión al núcleo α-1 (CBFA1) o Factor de transcripción 2 relacionado con Runt (RUNX2)	hacia adelante	5'-ACCCAGAAGGCACAGACAGAAG-3'
	reverso	3'-AGGAATCGCCCCTAAATCACT-5'
Sialoproteína ósea (BSP)	hacia adelante	5'-AACGAAGAAAGCGAAGCAGAA-3'
	reverso	3'-TCTGCCTCTGTGCTGTTGGT-5'
Factor de transcripción específico de osteoblastos (OSTERIX)	hacia adelante	5'-GCCAGAAGCTGTGAAACCTC-3'
	reverso	3'-GCTGCAAGCTCTCCATAACC-5'



5. Ensayos de nucleación

Se desarrollaron ensayos de nucleación utilizando un método basado en una reacción química lenta entre fosfatos de calcio y iones Ca^{2+} , empleando un sistema sol-gel previamente descrito en la literatura [97]. Se colocaron muestras del EA, la sedoheptulosa y la singenita (0.5, 1 y 5 $\mu\text{g/L}$) sobre un sistema previamente gelificado. La morfología y la fase mineral se determinaron mediante análisis microscópicos (SEM-EDS y HR-TEM) [98,99] y espectroscopía Raman. Para el procesamiento de las micrografías se utilizó el programa Digital Micrograph (CM) de GATAN, USA.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Caracterización de los extractos

1.1. Análisis elemental de suelo y de cenizas de las partes aéreas

Después de obtener los extractos de la especie vegetal, se realizó un análisis general del suelo del sitio de colecta y las cenizas de las partes aéreas, los resultados se muestran en la Figura 9 y en el Cuadro 7. Se determinó que el porcentaje de materia orgánica en la muestra de suelo es de 19.12 %. Además, los resultados mostraron que los elementos principales en el suelo son: C, O, Al, Si, Ca y Fe, seguidos de F, Na, Mg, P, S, Cl, K, Ti, y Mn en cantidades traza. Adicionalmente, se observó que la especie vegetal tiene tendencia a absorber principalmente Ca y K, seguidos de Cl, S, P y Mg. Asimismo, se pudo descartar la presencia de elementos tóxicos tales como cadmio, cromo, plomo, arsénico y mercurio, tanto en el suelo como en las partes aéreas del vegetal.

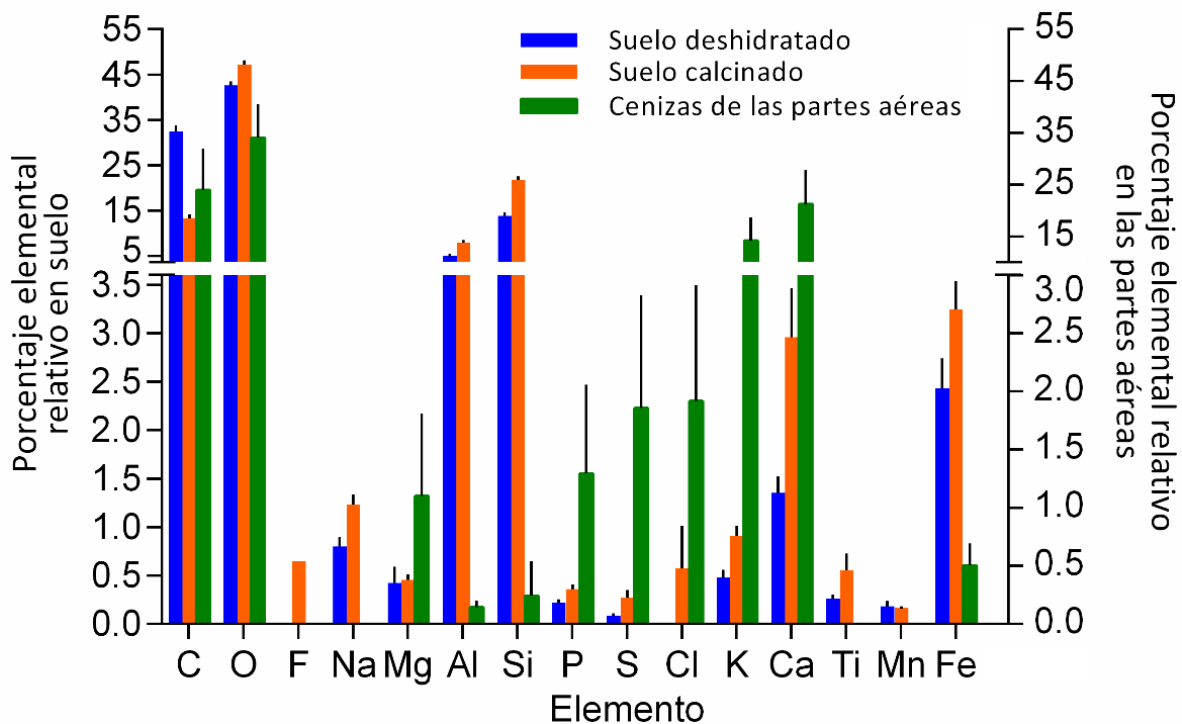


Figura 9. Análisis general de suelo y cenizas de las partes aéreas.



1.2. Cálculo de la concentración de sólidos totales en el extracto acuoso

Se calculó la concentración total de sólidos en el extracto acuoso (empleando una muestra testigo) mediante el método de pérdida por secado, con el propósito de tener un valor de referencia objetivo para los estudios posteriores. Diversas muestras con diversos volúmenes se sometieron a secado en una estufa a 80°C durante 3 horas. Los análisis se realizaron por triplicado. Se calculó que la concentración total de sólidos en el EA es de 51.84 ± 0.81 mg/mL.

Cuadro 7. Composición elemental de suelo y cenizas de las partes aéreas.

Elemento	Porcentaje relativo (%)		
	Suelo deshidratado	Suelo calcinado	Partes aéreas
C	32.49	13.37	23.90
O	42.64	47.21	33.74
F	-	0.65	-
Na	0.80	1.22	0.20
Mg	0.42	0.45	1.08
Al	4.97	7.88	0.15
Si	13.87	21.69	0.25
P	0.22	0.36	1.28
S	0.09	0.27	1.87
Cl	-	0.57	1.90
K	0.48	0.90	14.16
Ca	1.36	2.95	20.98
Ti	0.26	0.55	-
Mn	0.18	0.16	-
Fe	2.43	3.24	-

1.3. Identificación de los componentes del extracto orgánico

La fracción de *n*-hexano, proveniente del extracto orgánico (EO), se fraccionó mediante CCA empleando gel de sílice como fase estacionaria y mezclas *n*-hexano:AcOEt con polaridades crecientes como fase móvil. Se obtuvo un producto cristalino en una sola fracción, el cual fue identificado mediante RMN como β -sitosterol y a partir de otra fracción se pudieron identificar siete compuestos mediante GC-MS (Cuadro 8). De la misma manera, la fracción de CHCl_3 fue analizada mediante CG-MS. Se pudieron detectar seis componentes volátiles cuyas estructuras se muestran en el Cuadro 9, los espectros de RMN del β -sitosterol se encuentran en los Anexos 1 al 3.



Cuadro 8. Composición química de la fracción de *n*-hexano del extracto orgánico.

Producto	Cantidad relativa	Estructura química
Bulnesol	1.13	
10-metildodecanoato de metilo	1.35	
acetato de nonadecilo	71.79	
alofanato de fenilo	0.58	
<i>n</i> -octil fenil éter	0.16	
acetato de tetradec-13-en-1-ilo	21.05	
estigmast-4-en-3-ona	3.86	
β -sitosterol	Identificado mediante RMN	

Los resultados indican que la naturaleza química de los componentes del EO se compone principalmente de ésteres de ácidos grasos, seguido de otros compuestos alifáticos y aromáticos, entre ellos algunos de tipo terpenoide y finalmente un compuesto nitrogenado y otro clorado, lo cual indica que la especie posee un metabolismo de nitrógeno y cloro limitado.



Cuadro 9. Composición química de la fracción de CHCl₃ del extracto orgánico.

Producto	Cantidad relativa	Estructura química
ácido 3-hidroxi-4-metoximandélico	5.21	
7-hexileicosano	9.48	
acetato de octadecilo	71.16	
heptacosanol	6.87	
hexadecano	5.88	
1-cloroheptacosano	1.29	

1.4. Identificación de los componentes en el extracto acuoso

Los componentes del extracto acuoso (EA) fueron identificados de forma independiente y mediante seis técnicas analíticas diferentes: resonancia magnética nuclear (RMN), cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS), espectroscopía Raman y de infrarrojo, difracción de rayos X de monocristal y de polvos (XRD).

El EA concentrado se fraccionó mediante CCA empleando Sephadex LH-20 como fase estacionaria (cromatografía de exclusión por tamaño de partícula) y metanol como fase móvil. A partir de este fraccionamiento se obtuvo un producto mayoritario, dicho producto se purificó mediante CCA empleando un sistema de elución ternario y se identificó mediante RMN como sedoheptulosa (Figura 10). La sedoheptulosa es una cetoheptosa cuya presencia en forma libre es muy poco común en la naturaleza, sin embargo, la sedoheptulosa en sus formas fosforiladas (sedoheptulosa-7-fosfato y sedoheptulosa-1,7,-bisfosfato) son parte de diversos ciclos metabólicos, en particular de la ruta de las pentosas fosfato (PPP por su acrónimo en inglés *Pentose*



Phosphate Pathway) y se han reportado aplicaciones adicionales como suplemento alimenticio [100] y como molécula antiinflamatoria [101], la forma en la que la sedoheptulosa ejerce sus efectos parece estar ligada a la enzima sedoheptulosa cinasa, la cual facilita su utilización como fuente de carbono en la PPP [69,102–104].

1.4.1. Identificación y resolución de los conformeros de la sedoheptulosa

La sedoheptulosa presenta un comportamiento característico al estar en medio acuoso que consiste en la formación concomitante de tres formas cíclicas (α -furanosa, β -furanosa y α -piranosa), dicha propiedad fue descrita por primera vez por Ceusters *et al* en 2013 [105], siendo la más abundante la β -furanosa, seguido de la α -piranosa y la α -furanosa. En la Figura 10 se esquematizan las tres estructuras cíclicas con sus correspondientes señales en ^{13}C RMN de los átomos de carbono anoméricos. El desplazamiento químico del metanol residual se utilizó como referencia en el espectro ^{13}C [106].

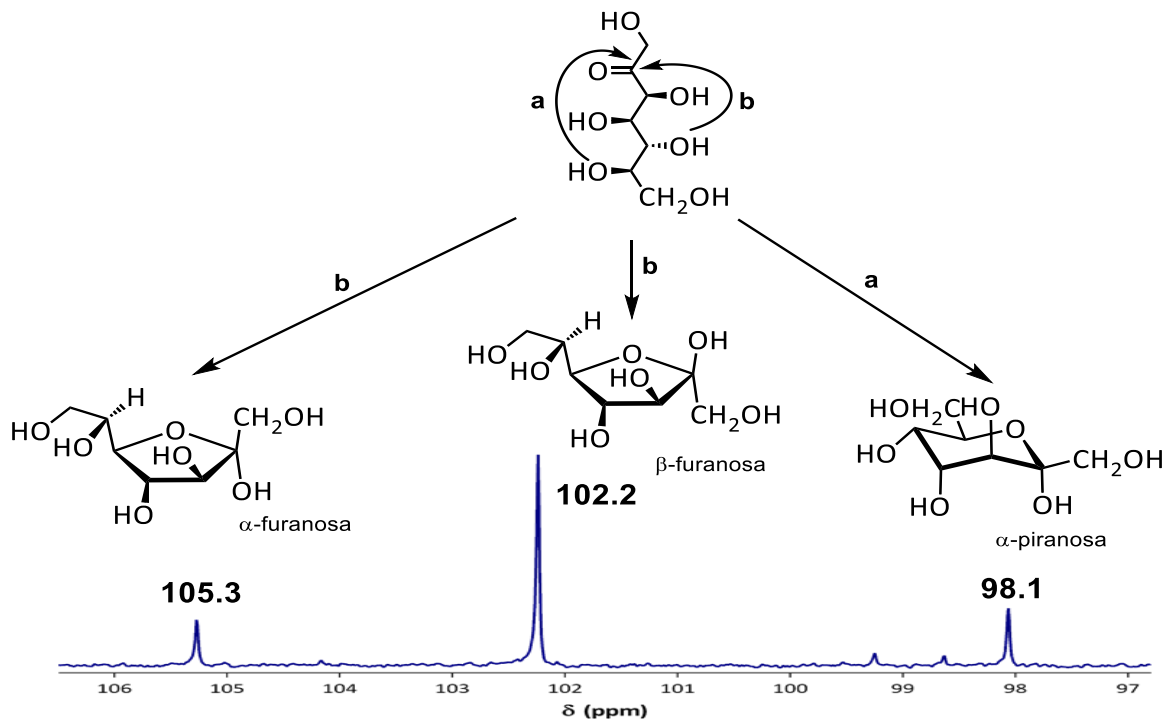


Figura 10. Estructuras cíclicas y asignación de las señales de los carbonos anoméricos de la sedoheptulosa en ^{13}C RMN.





Como se mencionó con anterioridad, los tres conformeros coexisten simultáneamente, lo que tiene como consecuencia que el espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno de la sedoheptulosa sea bastante complejo (Anexo 5) y a su vez conlleva a dificultades para su asignación; por ello, se realizaron experimentos adicionales para resolver la mezcla señales de sus conformeros.

Entre los experimentos realizados se encuentran los TOCSY 1D, los cuales se obtuvieron pulsando en las frecuencias correspondientes para las señales situadas en 4.33, 4.20 y 3.97 ppm, correspondientes a las señales de los H-4 de la β -furanosa y de la α -furanosa respectivamente, así como el H-3 de la α -piranosa. En la **Figura 11** se representan los espectros originales ^1H RMN y TOCSY 1D antes mencionados. Todos los espectros de ^1H fueron referenciados a partir del desplazamiento químico del HDO residual.

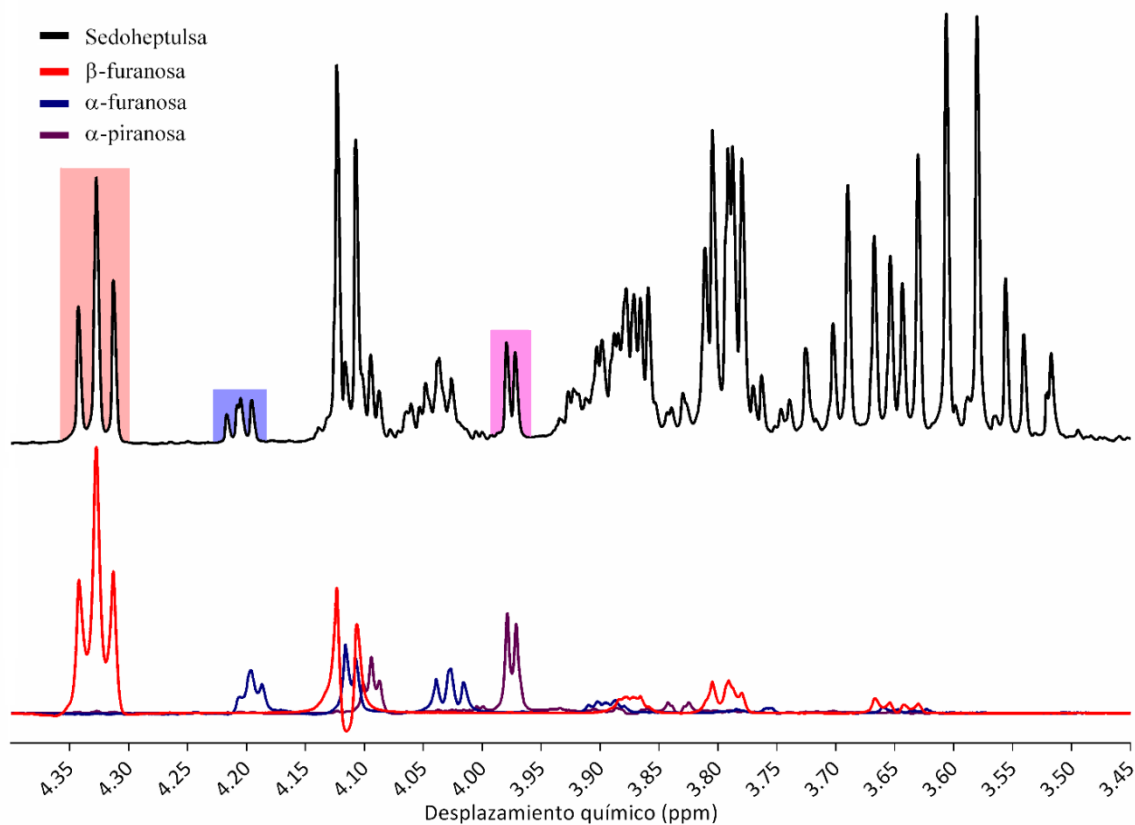


Figura 11. Espectros comparativos ^1H de la sedoheptulosa y TOCSY 1D pulsando en 4.33, 4.20 y 3.97 ppm para la β -furanosa, α -furanosa y la α -piranosa respectivamente, las señales que fueron pulsadas se encuentran resaltadas en el espectro de la sedoheptulosa.



Con el propósito de esquematizar y comparar los espectros de cada confórmero se realizó un ajuste matemático de las intensidades de cada señal, esto debido a que en la secuencia de pulsos TOCSY 1D se observan las distintas señales de hidrógeno acopladas a la señal que se pulsa, pero éstas van disminuyendo en intensidad conforme son más distantes a la anterior; adicionalmente, se tomaron directamente del espectro original de ^1H las señales correspondientes a los $-\text{CH}_2\text{OH}$ (C-1) de cada confórmero, ya que al no tener un acoplamiento escalar no aparecen en el espectro TOCSY 1D y las señales de los hidrógenos H-5, H-6 y H-7 de la α -piranosa que tampoco pudieron ser observados. En la **Figura 12** se muestran los espectros editados de los tres confórmeros descritos con anterioridad; para la edición de la figura se emplearon los programas MestReNova 6.0.2, Excel 2016 y GraphPad Prism 6. En el **Cuadro 10** se presenta la asignación espectroscópica de los tres confórmeros de la sedoheptulosa.

Cuadro 10. Asignación espectroscópica de los confórmeros de la sedoheptulosa en D_2O 500 MHz para ^1H y 125 MHz para ^{13}C .

	α -furanosa			β -furanosa			α -piranosa		
C1	63.4		CH_2	63.2		CH_2	64.7	CH_2	
C2	105.3		C	102.2		C	98.1	C	
C3	82.4		CH	76.4		CH	69.0	CH	
C4	77.0		CH	75.4		CH	71.6	CH	
C5	82.3		CH	80.8		CH	64.1	CH	
C6	72.2		CH	73.3		CH	69.4	CH	
C7	63.0		CH_2	62.9		CH_2	61.9	CH_2	
H_{1a}/H_{1b}	3.69	3.66	d, d	3.62	3.57	d, d	3.71	3.52	d, d
H3	4.10		d	4.11		d	3.97		d
H4	4.20		dd	4.33		dd	4.09		dd
H5	4.02		dd	3.78		dd	3.89		dd
H6	3.89		m	3.86		m	4.05		dd
H_{7a}/H_{7b}	3.78	3.64	dd, dd	3.78	3.64	dd, dd	3.91	3.79	dd, dd
$^3\text{J}_{3-4}$	4.5 Hz			7.75 Hz			3.5 Hz		
$^3\text{J}_{4-5}$	6 Hz			7 Hz			4.5 Hz		
$^3\text{J}_{5-6}$	5.5 Hz			6.5 Hz			9.5 Hz		

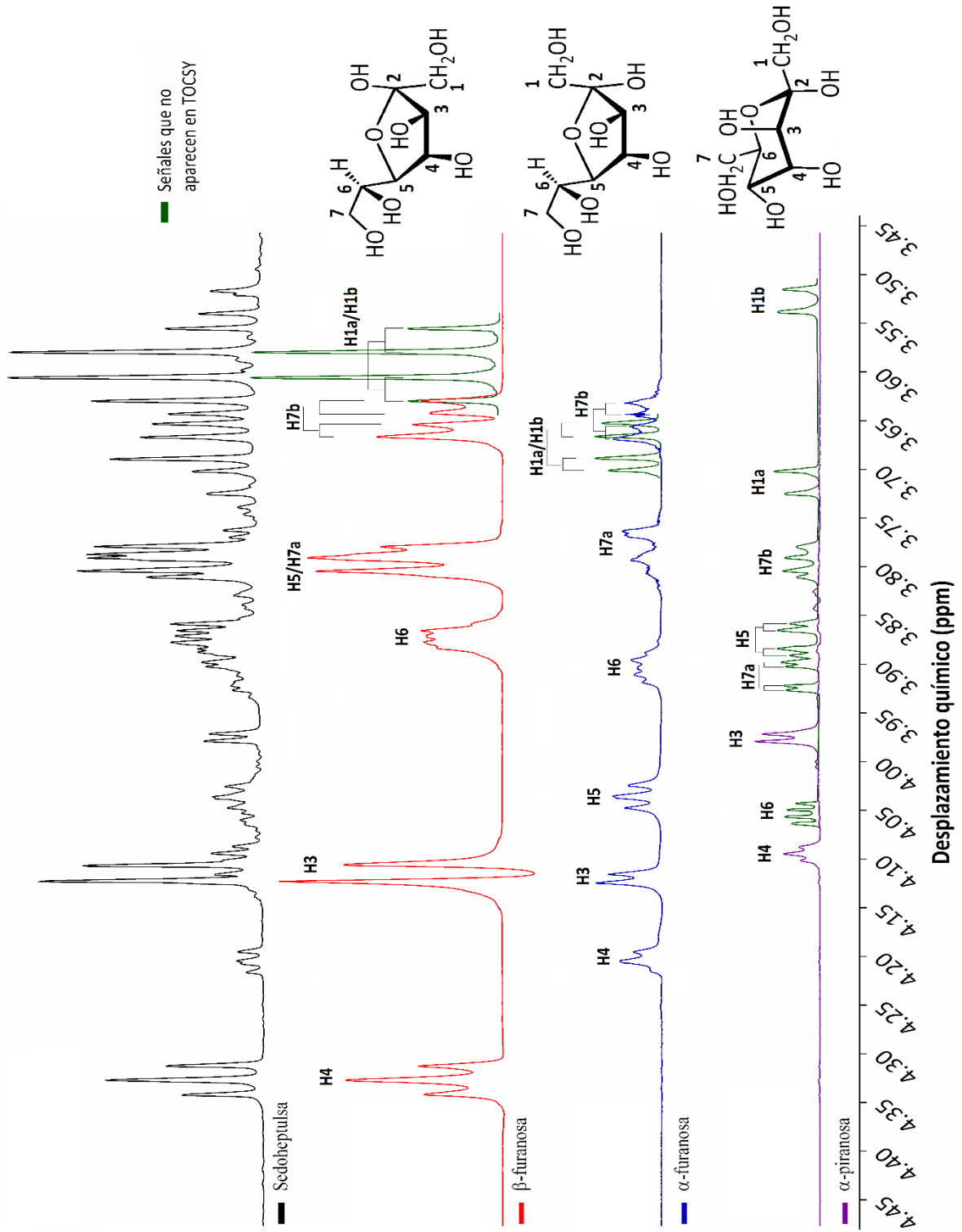


Figura 12. Espectros: Sedoheptulosa (negro), β -furanosa editado a partir del TOCSY 1D 4.33 ppm (rojo), α -furanosa editado a partir del TOCSY 4.20 ppm (azul), α -piranososa editado a partir del TOCSY 3.97 ppm (morado) y señales que no aparecen en los espectros TOCSY 1D (verde).



1.4.2. Determinación de la proporción relativa entre los confórmeros de la sedoheptulosa

La proporción relativa entre los tres confórmeros en solución fue reportada originalmente por Ceusters [105] mediante la integración de las señales aisladas de cada confórmero en el espectro ^1H RMN: 64% para la β -furanosa, 20% para la α -piranosa y de 16% para la α -furanosa. Sin embargo, la señal correspondiente para la α -piranosa que se encuentra más aislada del resto (H-3, 3.97 ppm) aún puede estar muy cercana a otras señales del compuesto o aquellas de otros carbohidratos que se suelen encontrar como impurezas dentro de la muestra. Con base en lo anterior se propuso la medición de las proporciones entre los confórmeros mediante la integración de las señales de los carbonos anoméricos en el espectro ^{13}C de RMN.

La intensidad de las señales en los espectros de ^{13}C depende de muchos factores, tales como los tiempos de relajación experimentales en la secuencia de pulsos y el Efecto Nuclear Overhauser (NOE, *Nuclear Overhauser Effect*), entre otros.

Por lo tanto, se realizó un experimento de resonancia magnética nuclear de ^{13}C suprimiendo el efecto NOE. A partir de los valores de las integrales se determinó que las proporciones relativas entre los confórmeros son: 60.58% para la β -furanosa, 20.13% para la α -piranosa y de 19.27% para la α -furanosa.

Si bien la presencia de la sedoheptulosa ya ha sido previamente descrita en varias especies del género *Sedum spp* [69,70], es importante aclarar que el EA de la especie *S. oxypetalum* contiene casi exclusivamente sedoheptulosa en comparación con otros carbohidratos, esto se puede apreciar debido a la ausencia práctica de otras señales correspondientes a átomos de hidrógeno y carbono, particularmente anoméricos, en los espectros de RMN del EA. (Anexo 4). Los espectros de RMN de la sedoheptulosa se encuentran en los Anexos 5 al 10.



1.4.3. Identificación de los componentes volátiles del extracto acuoso

El extracto acuoso fue sometido a un fraccionamiento mediante reparto empleando una mezcla de $\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}$ para separar la fracción orgánica que contenía los componentes volátiles del mismo. La fracción orgánica fue concentrada a presión reducida y se analizó mediante GC-MS. Se pudieron identificar 5 compuestos cuyas estructuras químicas se muestran en el Cuadro 11.

1.4.4. Identificación y caracterización de los componentes minerales del extracto acuoso

A partir del fraccionamiento del EA, se obtuvo un producto cristalino incoloro, el cual fue analizado mediante difracción de rayos X de monocristal. El análisis de los datos experimentales y el refinamiento de la estructura cristalina permitieron identificar al compuesto como carbonato de calcio ortorrómbico (aragonita). La información cristalográfica y la estructura molecular se muestran en el Cuadro 12. Las distancias interatómicas, ángulos de enlace y los desplazamientos isotrópicos se encuentran en el Anexo 11.

La presencia del carbonato de calcio en el EA indica dos evidencias principales, primero, la presencia de aniones carbonato debido al metabolismo ácido de las crasuláceas o CAM [107] y la presencia de iones calcio en el EA, los cuales son muy importantes para la regeneración de tejidos mineralizados similares al hueso. La presencia de depósitos de CaCO_3 ya ha sido descrita previamente en otras especies del género *Sedum spp* [108], una posible explicación para ello, es como una estrategia de adaptación de las plantas para protegerse en contra de la radiación solar.

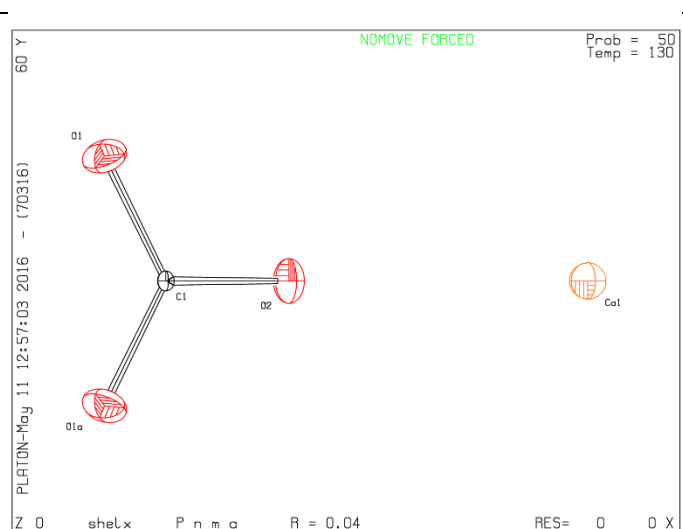


Cuadro 11. Composición química de los componentes volátiles del EA.

Producto	Cantidad relativa (%)	Estructura química
1,2,2,6,8-pentametil-7-oxabicyclo [4.3.1]dec-8-en-10-ona	15.68	
2-feniletanol	22.12	
2-(4-hidroxifenil)etanol	10.09	
4-(4-hidroxifenil)butan-2-ona (cetona de la frambuesa)	15.09	
(R)-4-(3-hidroxitil)fenol (rododeno)	37.00	

Cuadro 12. Información cristalográfica del CaCO₃ ortorrómbico (aragonita).

Nombre del compuesto	Carbonato de calcio
Fórmula molecular	CaCO ₃
Grupo espacial	Pnma
Longitud de onda y fuente de rayos X	Mo K α , $\lambda = 0.71073$ nm
Temperatura	130 K
Parámetros de red	
A	6.2870(7) Å
B	5.3890(5) Å
C	9.1232 Å
α	90°
Volumen	308.25 Å ³
Densidad	2.153 g/cm ³
Peso molecular	100.09 g/mol





Durante el proceso de obtención del EA, un producto cristalino precipitó espontáneamente, el cual (8.3 g) fue identificado mediante cuatro técnicas analíticas: fluorescencia de rayos X (XRF), espectroscopía Raman, espectroscopía de infrarrojo (IR) y difracción de rayos X de polvos (XRD) como singenita, cuya fórmula molecular es $[K_2Ca(SO_4)_2 \cdot H_2O]$; adicionalmente, a partir de los datos experimentales de XRD, se refinó la estructura cristalina de la misma utilizando el método Rietveld con el programa Topas Academic versión 4.1.

Mediante XRF se pudo determinar la composición elemental de la muestra, los resultados mostraron que los elementos mayoritarios son el Ca, seguido de K y S. En la Figura 13 se muestra el histograma de la composición elemental de la singenita con sus respectivos porcentajes elementales al tope de cada barra.

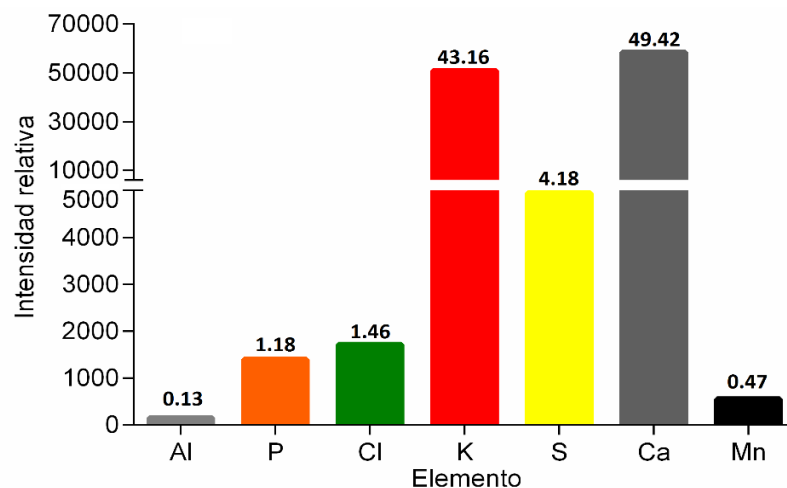


Figura 13. Composición elemental de la singenita mediante XRF.

Para la realización de los análisis de IR, se realizó la calcinación de una muestra de singenita con el propósito de eliminar los componentes orgánicos residuales y adicionalmente, se analizó una muestra de sedoheptulosa para comparar su espectro con aquellos de la singenita y la singenita calcinada. Para complementar la caracterización espectroscópica, una muestra de singenita se analizó mediante espectroscopía Raman. En la Figura 14 se presentan los espectros IR de la muestra original de singenita, de la muestra calcinada y de la sedoheptulosa en la parte superior y el espectro Raman de la muestra original en la parte inferior, así como una ampliación de la ventana espectral de 150 a 2000 cm^{-1} .



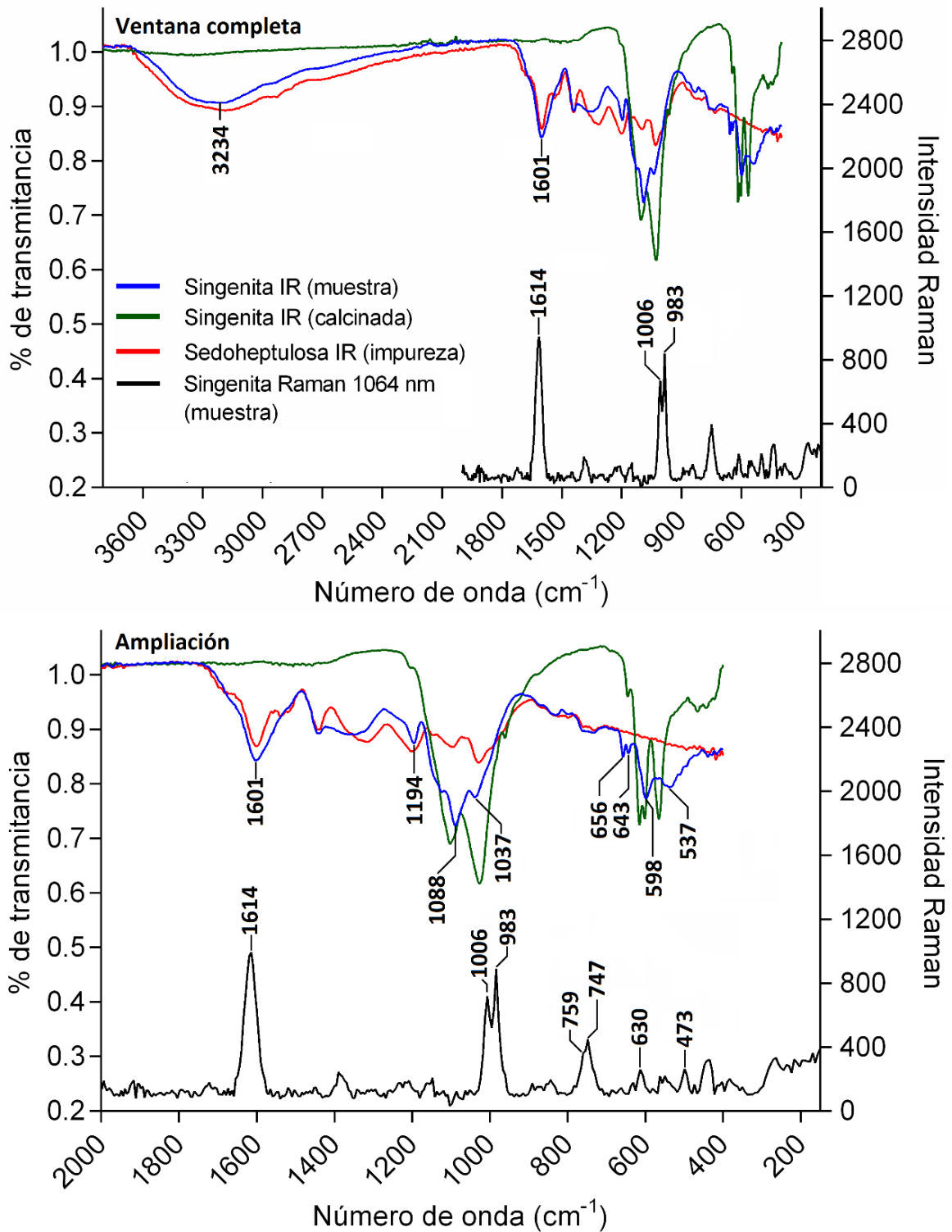


Figura 14. Espectros IR y Raman de la singenita, ventana completa (arriba) y ampliación en la ventana de 150 a 2000 cm^{-1} (abajo).



En los espectros se observaron las siguientes señales características para la singenita: en 537, 598, 643 y 656 cm^{-1} que corresponden al doblamiento asimétrico del grupo SO_4^{-2} ; en 1088, 1122 y 1196 cm^{-1} que corresponden al estrechamiento asimétrico de los enlaces S-O y en 3223 cm^{-1} que corresponde al estrechamiento del OH. Adicionalmente, el espectro Raman mostró las vibraciones posicionadas en: 473 cm^{-1} ; la cual corresponde al modo ν_2 ; 630 cm^{-1} que corresponde al modo ν_3 ; y 983 y 1006 cm^{-1} que corresponden al modo ν_1 del grupo SO_4^{-2} [109].

Las señales en 1601 cm^{-1} en IR y en 1614 y 747 cm^{-1} en Raman corresponden con carbohidratos residuales (sedoheptulosa). Las señales en 1601 cm^{-1} en IR y en 1614 cm^{-1} en Raman corresponden al grupo cetil y la señal en 747 cm^{-1} al estrechamiento del anillo de la sedoheptulosa. La pérdida de dichas señales en la muestra calcinada permitió confirmar que la sedoheptulosa se encuentra presente como compuesto residual en la muestra de singenita, además, en el espectro de singenita calcinada se pudo observar que las bandas correspondientes al grupo sulfato (S-O y SO_4^{-2}) aún se encuentran presentes, sin embargo, se encuentran desplazadas debido a la descomposición térmica.

La difracción de rayos X de polvos de la singenita se realizó operando con una geometría Bragg-Bretano. El patrón de difracción experimental se obtuvo en un modo 2θ en el rango de 3 a 80° 2θ . El refinamiento de la estructura cristalina se realizó mediante el método Rietveld empleando el programa Topas Academic 4.1. La forma de los picos se ajustó mediante una función pseudo-Voigt [110], el fondo se ajustó con un polinomio de Chevyshev de orden 19 del primer tipo. La información cristalográfica del refinamiento se muestra en el Cuadro 13. El patrón de difracción experimental, calculado y residuo (Reporte del refinamiento) se muestran en la Figura 15. La estructura de la celda cristalina se muestra en la Figura 16 y la representación de los poliedros catiónicos se muestra en la Figura 15. Las tablas de distancias interatómicas, ángulos de enlace y figuras del refinamiento se encuentran en el Anexo 12.





Cuadro 13. Información cristalográfica de la singenita.

Nombre de la fase	Singenita
Fórmula molecular	$K_2Ca(SO_4)_2 \cdot H_2O$
Grupo espacial	$P2_1/m$
Longitud de onda y fuente de rayos X	$CuK\alpha$, $\lambda=0.15406$ nm
Temperatura	298 K
a (Å)	9.8013 (2)
b (Å)	7.1102 (1)
c (Å)	6.2788 (1)
β	104.024 (1)°
V (Å ³)	424.5 (2)
Densidad (g/cm ³)	2.55347
Peso molecular	3.2842
Rpw	3.207

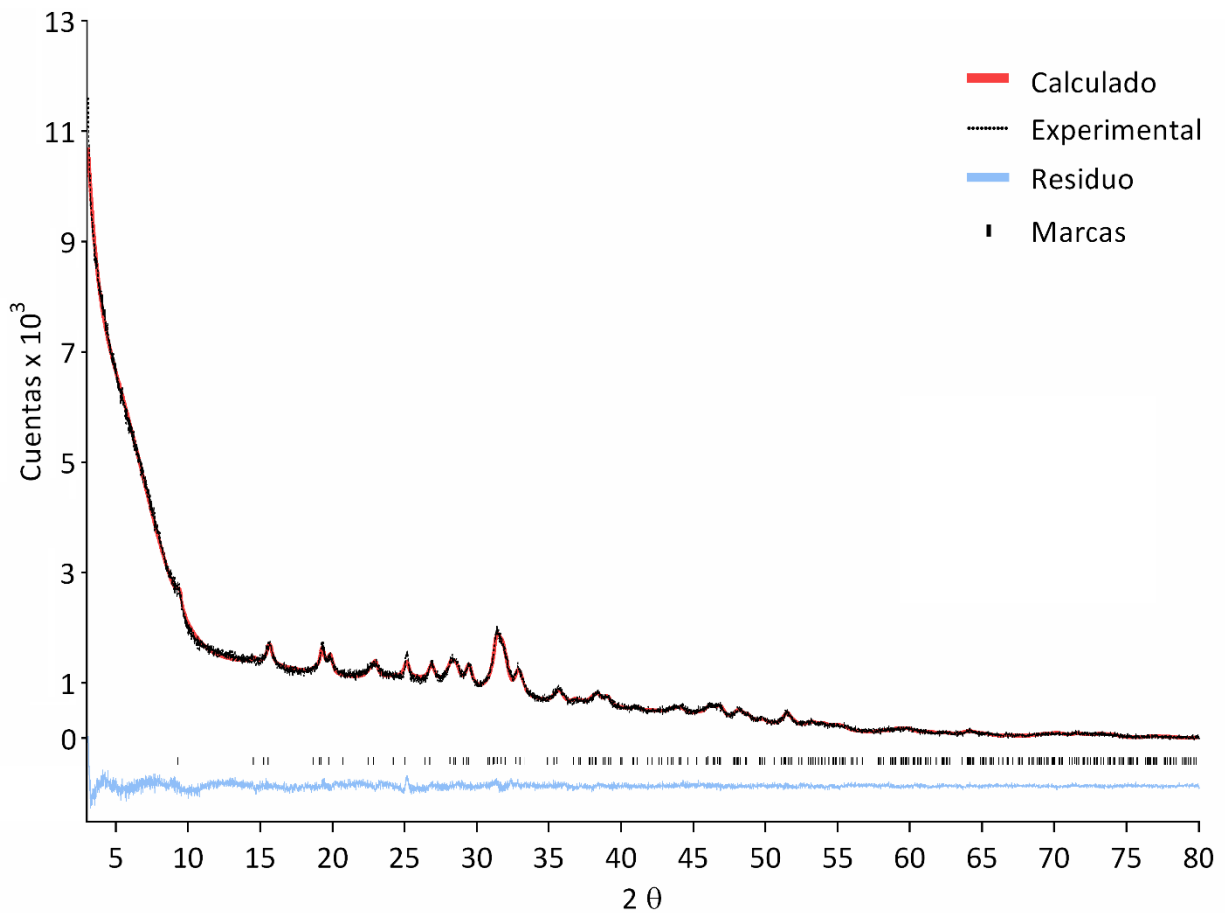


Figura 15. Reporte del refinamiento Rietveld de la estructura cristalina de la singenita.



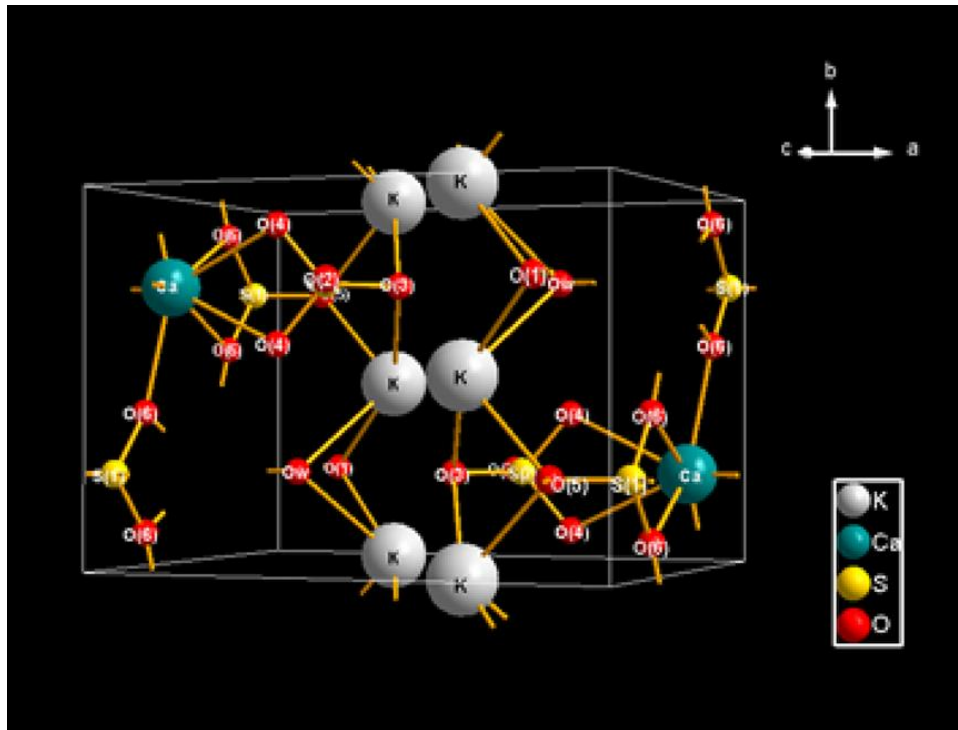


Figura 16. Estructura de la celda cristalina de la singenita.

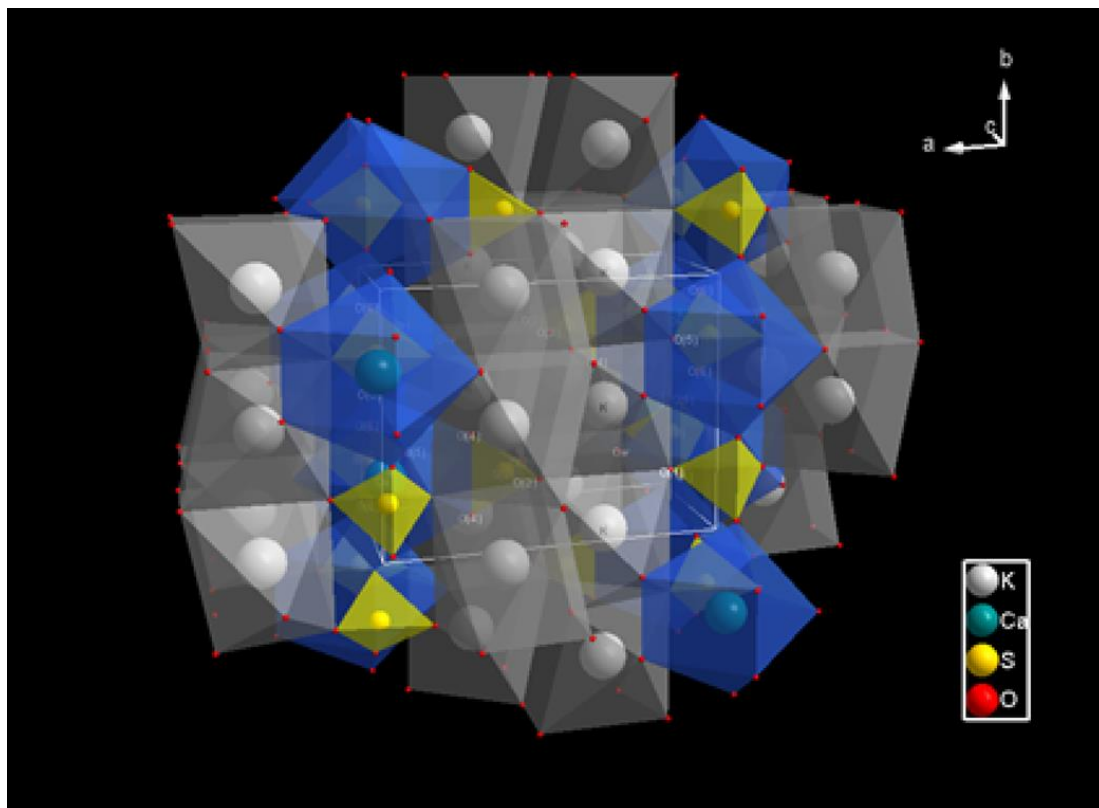


Figura 17. Poliedros de cationes KO_8 (gris), CaO_9 (azul) y grupos sulfato SO_4^{2-} (amarillo).



La singenita ya ha sido previamente descrita tanto mediante espectroscopía vibracional [109] como por el refinamiento de la estructura de difracción de rayos X [111]. Los resultados son consistentes con los descritos en dichos reportes previos, en los cuales se describe que la celda unitaria contiene aproximadamente dos moléculas de $K_2Ca(SO_4)_2 \cdot H_2O$, en las cuales los átomos de K se encuentran rodeados por ocho átomos de O y los átomos de Ca por nueve átomos de O, formando cadenas poliédricas de KO_8 y CaO_9 respectivamente (Figura 17), en los cuales las cadenas de poliedros de KO_8 se encuentran unidas a las cadenas de poliedros CaO_9 mediante los grupos sulfato. Adicionalmente, las cadenas de los poliedros de KO_8 se encuentran apiladas a lo largo del eje b formando columnas ininterrumpidas. Finalmente, los átomos de S se encuentran con formas de tetraedros relativamente regulares.

La presencia de singenita en las plantas no ha sido reportada previamente en la literatura científica. El hecho de que este mineral se obtuviera del EA es debido a las concentraciones y proporciones específicas de los elementos que la componen en el EA. Una explicación ampliamente aceptada sobre el origen de los minerales en las plantas es que provienen del suelo, por lo que se supuso que la presencia de los elementos S, K y Ca, son debidos al suelo volcánico sobre el que crece la planta, lo que se comprobó mediante el análisis de suelo y cenizas de las partes aéreas (Figura 9).

Debido a las características del metabolismo de la planta (CAM) y la composición del suelo, el mineral que tiene mayor probabilidad de cristalizar es la singenita. Esto fue evidente ya que la misma fue el único mineral que cristalizó directamente del EA.

1.4.5. Determinación de la composición elemental del extracto acuoso

Teniendo en consideración que se pudieron identificar dos minerales que contienen calcio en el EA (aragonita y singenita) y que el calcio en conjunto con el fósforo son elementos esenciales que conforman los tejidos mineralizados de soporte periodontal (cemento y hueso alveolar), se realizó una cuantificación del contenido de diversos cationes metálicos en la muestra testigo del





EA mediante espectroscopía de emisión atómica de plasma inducido por microondas (MP-AES) y el análisis elemental una muestra sólida del EA mediante microanálisis SEM-EDS; los resultados se muestran en el Cuadro 14.

Cuadro 14. Composición elemental del EA mediante MP-AES y SEM-EDS.

Elemento	Porcentaje relativo mediante SEM-EDS (% \pm E.E.M.)	Cuantificación mediante MP-AES ($\mu\text{g/mL}$)
C	58.07 \pm 0.51	-
O	30.54 \pm 0.5	-
Na	-	28.04
Mg	0.41 \pm 0.021	28.95
Al	0.22 \pm 0.049	0.54
P	0.29 \pm 0.019	-
S	0.22 \pm 0.015	-
Cl	3.24 \pm 0.18	-
K	6.87 \pm 0.47	79.88
Ca	-	45.68
Mn	-	0.54

Los resultados de la cuantificación mediante MP-AES mostraron que el Ca y el K tuvieron las concentraciones más altas, seguidos por el Mg y el Na y finalmente el Mn y Al. Asimismo, el microanálisis SEM-EDS demostró la presencia de P y S. Los resultados también descartaron la presencia de Fe y Ti en el EA, a pesar de haber sido detectados en el suelo. Por lo tanto, la especie vegetal no los absorbe del suelo.

2. Pruebas farmacológicas

2.1. Efectos biológicos *in vitro* del EA y de la sedoheptulos

Con el propósito de determinar si el EA o la sedoheptulosa aislada de éste presentan algún efecto farmacológico que se pudiera relacionar con detener el proceso de destrucción de tejidos de soporte periodontal, se realizaron análisis de capacidad antioxidante (con especies sintéticas y especies reactivas de oxígeno) y efecto antiinflamatorio vía inhibición de enzimas ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2). Los resultados se muestran en el Cuadro 15.





Cuadro 15. Efectos biológicos *in vitro* del EA y la sedoheptulosa.

Capacidad antioxidante <i>in vitro</i> del EA de <i>S. oxypetalum</i> ante especies sintéticas y especies reactivas de oxígeno.			
Ensayo	IC ₅₀ (µg/mL)	Ensayo	IC ₅₀ (µg/mL)
DPPH•	31.1 ± 0.24	HClO	654.6 ± 6.92
ABTS•+	85.6 ± 0.68	ONOO ⁻	157.0 ± 2.12
O ₂ • ⁻	72.5 ± 2.12	¹ O ₂	155.5 ± 0.98
H ₂ O ₂	229.6 ± 2.54	ORAC	8.3 ± 1.69
•OH	184.5 ± 3.19	Folin	8 mg GAE/g
Efecto antiinflamatorio vía inhibición de COX-1 y COX-2 del EA y la sedoheptulosa.			
Muestra	IC ₅₀ (µg/mL) COX-1	IC ₅₀ (µg/mL) COX-2	tasa COX-1/COX-2
Extracto acuoso	16.15 ± 1.49	195 ± 3.04	0.082
Sedoheptulosa	402 ± 9.77	360 ± 2.81	1.116
Celecoxib	-	0.75	375 [94]
Indometacina	1.17	-	0.018 [95]

2.1.1. Capacidad atrapadora de especies reactivas de oxígeno

Los resultados de los ensayos de capacidad antioxidante mostraron que el EA posee una alta capacidad protectora ante el estrés oxidante si se tiene en consideración que las concentraciones inhibitorias medias (IC₅₀) van desde 8.3 hasta 654.6 µg/mL y en contraste, la concentración total de sólidos del EA es de 51,840 µg/mL.

Una explicación para justificar la alta capacidad atrapadora de especies reactivas de oxígeno (ROS) del EA es debido a su contenido de compuestos fenólicos (Cuadro 11), los cuales son conocidos por tener una alta capacidad antioxidante.





2.1.2. Inhibición *in vitro* de enzimas ciclooxigenasas

Por otro lado, los resultados de los ensayos de inhibición de enzimas ciclooxigenasas mostraron que tanto el EA como la sedoheptulosa presentan valores de IC_{50} de moderadas a altas (16.15 a 402 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en comparación con las sustancias de referencia (0.75 y 1.17 $\mu\text{g}/\text{mL}$); sin embargo, dichas concentraciones medias inhibitorias son mucho menores a la concentración original del extracto acuoso (51.84 mg/mL); por lo tanto, considerando lo anterior, se puede afirmar que éste posee suficiente concentración para ejercer un efecto antiinflamatorio (vía inhibición de COX-2) para detener el progreso de la destrucción de tejidos de soporte periodontal.

Al analizar los datos se pudo observar que la sedoheptulosa también posee actividad inhibitoria de ambas isoformas de la enzima, sin presentar una selectividad importante por ninguna de ellas. Por el contrario, el EA presentó una selectividad por la COX-1 12.19 veces mayor que para la COX-2 (tasa COX-1/COX-2 = 0.082).

Si bien, de acuerdo con las funciones de cada isoforma, es deseable que la inhibición sea selectiva por la isoforma COX-2, a este respecto se debe considerar que el uso tradicional de la planta sólo involucra que el extracto acuoso ejerza contacto sobre las encías y no se trague, por lo tanto, los efectos colaterales indeseables de inhibir a la isoforma COX-1 (daño gástrico, desórdenes de coagulación entre otros) no se presentarían durante la administración del extracto. Adicionalmente, existe un reporte acerca de los efectos protectores del resveratrol, el cual es un inhibidor selectivo de COX-1 [112], contra el daño a tejidos periodontales inducido por lipopolisacáridos (LPS) de *P. gingivalis* en un modelo de periodontitis *in vivo* [64].

2.1.3. Efecto antimicrobiano del EA contra especies bacterianas periodontopatógenas

Se evaluó la actividad antimicrobiana del EA de *S. oxypetalum* contra seis cepas bacterianas relacionadas con problemas estomatológicos, las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC), así como las claves ATCC se muestran en el Cuadro 16. Los resultados mostraron que *F. nucleatum*, subsp *nucleatum*, patógeno Gram negativo que está relacionado con la colonización secuencial de



la placa dentobacteriana fue la cepa más sensible (MIC de 2.5 mg/mL). Por el contrario, *A. actinomycetemcomitans* serotipo b exhibió la MIC más grande entre las cepas (40 mg/mL). Esta bacteria Gram negativa es considerada el patógeno más importante relacionado con la periodontitis agresiva. Es importante mencionar que entre las dos especies analizadas de *Streptococcus*, (*S. mutans* y *S. oralis*) los resultados de las MIC son comparativamente muy diferentes (20 y 5 mg/mL respectivamente). Por último, *A. israelii*, una bacteria Gram positiva relacionada con un estado estomatológico sano y *P. gingivalis*, una bacteria Gram negativa considerada como un patógeno auténtico y piedra angular del desarrollo de periodontitis, mostraron valores de MIC iguales ante el EA (10 mg/mL). Se usó gluconato de clorhexidina al 2 % como control positivo.

Cuadro 16. Efecto antimicrobiano del EA de *S. oxypetalum*.

Cepa bacteriana	ATCC	MIC (mg/mL)
<i>Streptococcus mutans</i>	25175	20
<i>Streptococcus oralis</i>	35037	5
<i>Actinomyces israelii</i>	12102	10
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp <i>nucleatum</i>	25586	2.5
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277	10
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> serotipo b	43718	40

El análisis general de los efectos farmacológicos del EA sugiere que, si bien éste presenta efecto inhibitorio contra las seis cepas bacterianas, su acción asociada a detener el progreso de la enfermedad periodontal no está ligada únicamente a su efecto antimicrobiano, sino a la combinación entre éste y los efectos de inhibición de COX y de atrapamiento de ROS.

Como ha sido previamente estipulado, la periodontitis y la consecuente destrucción de tejidos de soporte periodontal son causadas por microflora patógena [64,113,114]. Por lo tanto, la evaluación de la actividad antimicrobiana del EA fue un punto clave. De las seis cepas bacterianas empleadas, tres son colonizadores primarios (*S. mutans*, *S. oralis* y *A. israelii*), uno es un colonizador intermedio o colonizador puente (*F. nucleatum* subsp. *nucleatum*) y dos son colonizadores tardíos





(*P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* serotipo b), ambos considerados los más patógenos. Si bien los resultados obtenidos muestran valores muy altos de MIC en comparación con otros de productos naturales y/o extractos de plantas previamente reportados en la literatura científica (de 2.5 a 40 mg/mL) [115], se debe tener en cuenta que la concentración de sólidos en el EA (51.84 mg/mL) es mayor. Por lo tanto, el EA podría detener efectivamente el progreso de la infección. La importancia de estos hallazgos es que *P. gingivalis* y especialmente *A. actinomycetemcomitans* son dos de las especies bacterianas más frecuentemente asociadas con la destrucción de tejidos periodontales [30,31,35,40,116–118] y su inhibición es muy necesaria.

3. Pruebas celulares

3.1. Citotoxicidad y proliferación celular

Se evaluó la capacidad del EA y de la sedoheptulosa para inducir la proliferación de células humanas derivadas de ligamento periodontal (hPDLs). El ensayo de proliferación es el primero de la serie de pruebas celulares, la importancia de este ensayo radica en que analizando los resultados se podría observar, en principio, si la muestra evaluada fuese citotóxica para las hPDLs, lo cual descartaría definitivamente su uso como una sustancia con potencial para promover la regeneración de tejidos. Se realizó el ensayo con el EA de *S. oxypetalum* debido a que, como se mencionó en párrafos anteriores, dicho extracto es el que entra en contacto con las encías al ser empleado como tratamiento tradicional y también se realizó con la sedoheptulosa debido a que se ha reportado que su papel en la ruta de las pentosas fosfato es el de aportar una fuente de carbono independiente de la glicólisis y, por lo tanto podría favorecer la proliferación celular.

Los resultados mostraron que tanto el EA como la sedoheptulosa promovieron la proliferación de hPDLs a la concentración de 5 µg/mL (Figura 18). Los resultados se comparan con los del medio de cultivo DMEM enriquecido con suero fetal bovino (FBS) al 2 y 10% como controles negativo y positivo durante 96 horas. Los resultados mostraron que tanto el EA como la sedoheptulosa incrementan significativamente ($\alpha=0.01$) la proliferación celular con respecto al FBS al 2%.

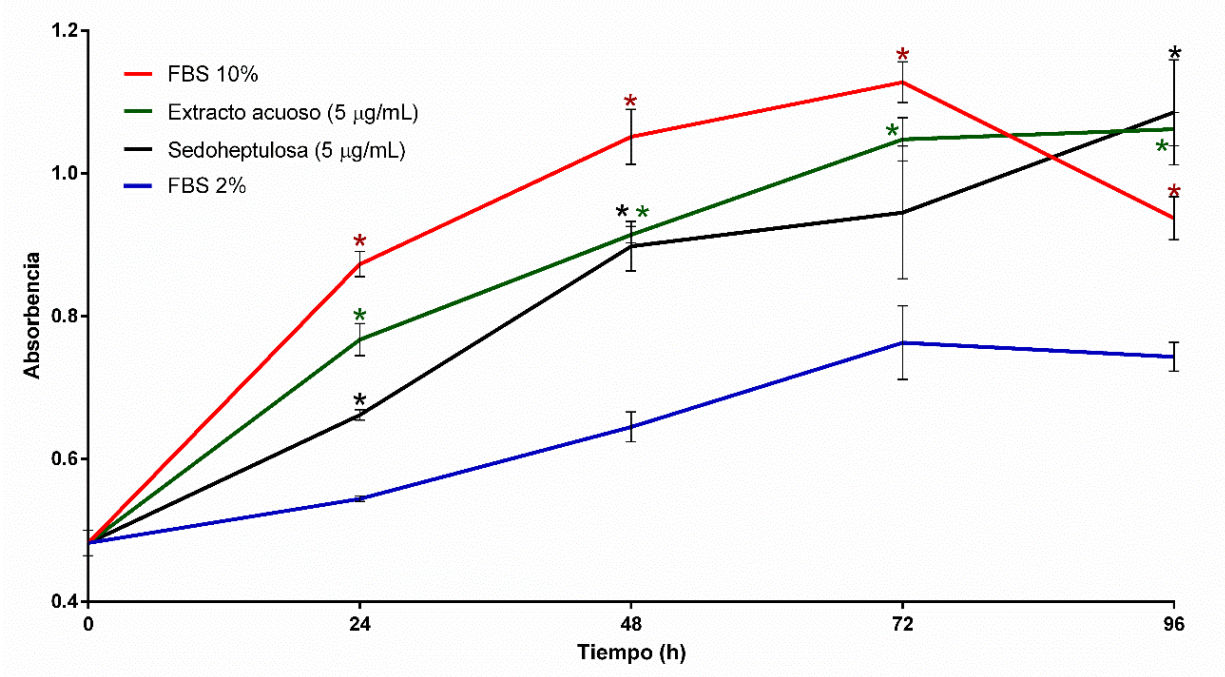


Figura 18. Actividad proliferativa del EA y la sedoheptulosa en hPDLs. Promedio más error estándar de la media.

3.2. Actividad específica de la fosfatasa alcalina

La enzima fosfatasa alcalina (ALP) cataliza la reacción de hidrólisis de ésteres de fosfato a un anión fosfato monoácido (HPO_4^{2-}) y el respectivo residuo hidroxilado en medio alcalino (Figura 19); los cambios en las concentraciones y actividad de la enzima están asociados con numerosos desórdenes metabólicos, sobre todo en hígado y huesos.

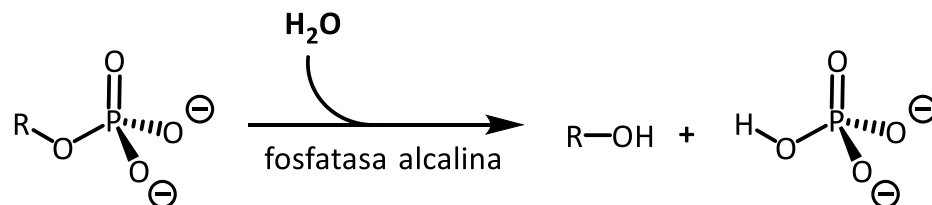


Figura 19. Reacción de hidrólisis catalizada por la fosfatasa alcalina.



Los pirofosfatos son componentes que se encuentran en el organismo e inhiben el proceso de mineralización, por lo tanto, la actividad hidrolítica de la ALP reduce la concentración de los anteriores, por lo tanto, la actividad de la ALP conduce de forma indirecta al proceso de mineralización.

Para medir la actividad específica de la fosfatasa alcalina se realizaron cultivos celulares de hPDLs, empleando en un caso el EA o en el otro a la sedoheptulosa (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) como muestras experimentales. Para medir la actividad enzimática de la ALP, se obtuvieron los sobrenadantes de los pozos de cultivo y se midió la actividad de la ALP a los 5, 10 y 15 días de cultivo (Figura 20).

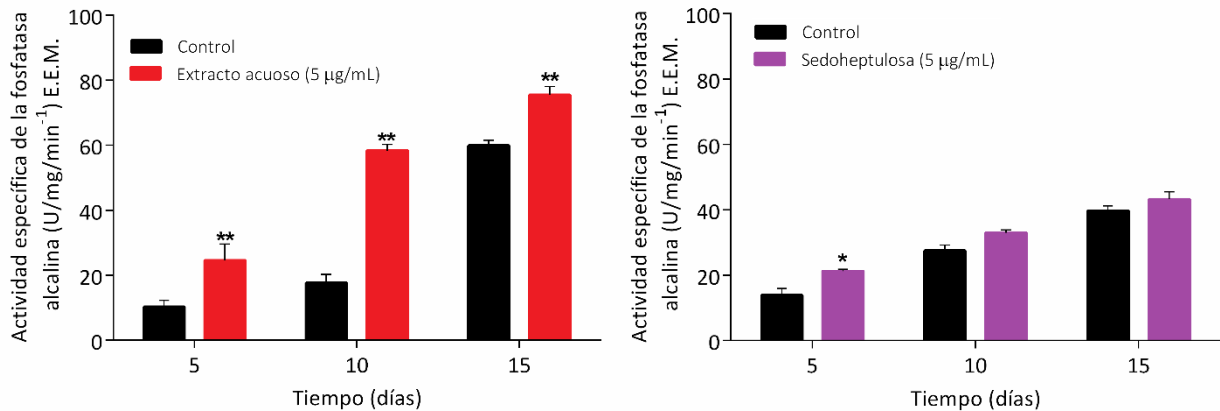


Figura 20. Actividad específica de la fosfatasa alcalina promovida por el EA (izquierda) o la sedoheptulosa (derecha).

La sedoheptulosa incrementó la actividad específica de la enzima en los hPDLs a los 5 días ($\alpha-0.05$) pero no a los 10 ni a los 15 días en comparación con el control (suero fetal bovino al 2%). Esto sugiere que la sedoheptulosa participa en el proceso de diferenciación osteogénica durante los primeros cinco días, pero no mantiene dicho efecto. Por el contrario, el EA incrementó significativamente la actividad durante todo el ensayo ($\alpha-0.01$), lo que sugiere que el EA promueve la diferenciación hacia un fenotipo mineralizante.





3.3. Medición de los niveles de los marcadores de la mineralización mediante RT-PCR

La inducción de la diferenciación osteogénica en los hPDLs se demostró mediante la detección de cuatro marcadores adicionales a nivel del mRNA [osteocalcina (OCN), sialoproteína ósea (BSP), factor de unión al núcleo α 1 (CBFA1) y el factor de transcripción específico de osteoblastos OSTERIX] durante 5 y 10 días. Los resultados para el EA se muestran en la Figura 21 y para la sedoheptulosa en la Figura 22. Se pudo observar que sólo la sedoheptulosa pudo incrementar los niveles de OCN significativamente a los 10 días, adicionalmente, ambas muestras incrementaron los niveles de CBFA1 y BSP a los 5 y 10 días respectivamente; finalmente, ninguna de las muestras incrementó los niveles de OSTERIX. Esto confirma que las hPDLs inician el proceso de diferenciación osteogénica sin cambiar su fenotipo a osteoblastos y que la sedoheptulosa tiene un papel muy importante en cuanto a la inducción de la mineralización a nivel de transcripción de los marcadores de la misma.

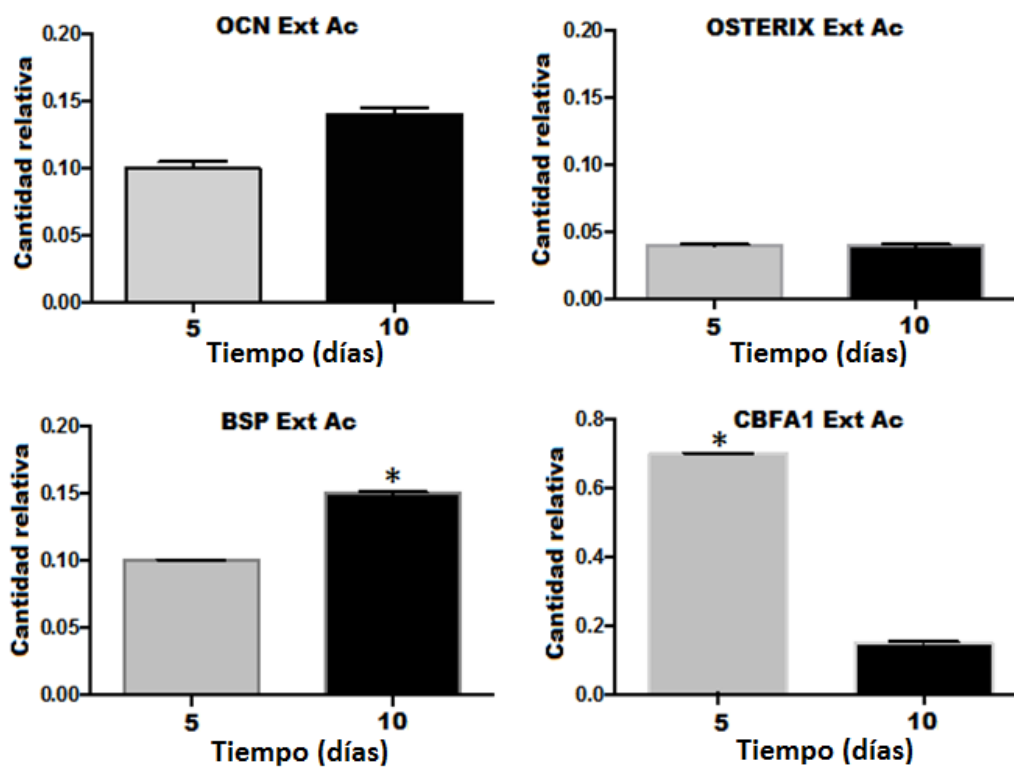


Figura 21. Medición de los marcadores de la mineralización mediante RT-PCR del EA.



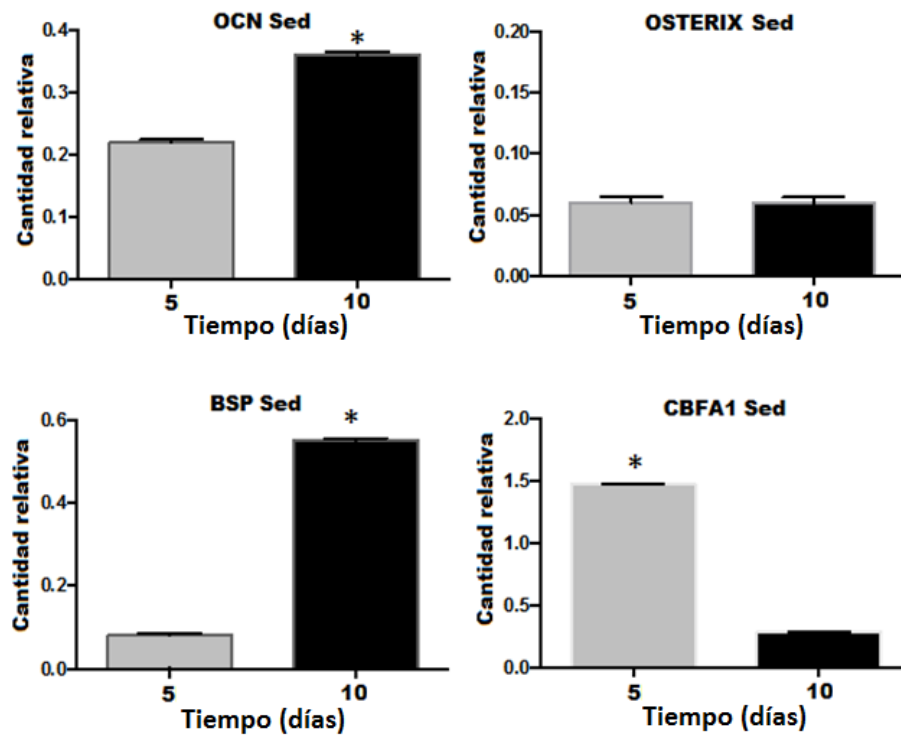


Figura 22. Medición de los marcadores de la mineralización mediante RT-PCR de la sedoheptulosa.

3.4. Detección y cuantificación de la mineralización

Al término de cada periodo de análisis en las pruebas de diferenciación celular (5, 10 y 15 días) se realizaron tinciones a los paquetes celulares de los pozos en las cajas de cultivo mediante el reactivo de Alizarina roja. La alizarina es un compuesto de naturaleza antraquinónica que presenta alta afinidad por los cúmulos de calcio, por lo tanto, su uso es frecuente para detectar la formación de nódulos de calcio en las cavidades celulares.

Típicamente, esta prueba se realiza comparando el comportamiento de las células en medio de cultivo, ya sea sólo con suero fetal bovino (control negativo) o el medio de cultivo enriquecido tanto con suero fetal bovino como con otros componentes como ácido ascórbico, glicerolfosfato y dexametasona (medios mineralizantes) como referencia o control positivo para observar la deposición de calcio; asimismo, las muestras usualmente se prueban en medios mineralizantes; sin embargo, las pruebas realizadas en este proyecto se realizaron empleando sólo el medio DMEM enriquecido con las muestras de sedoheptulosa o el extracto acuoso (Figura 23).



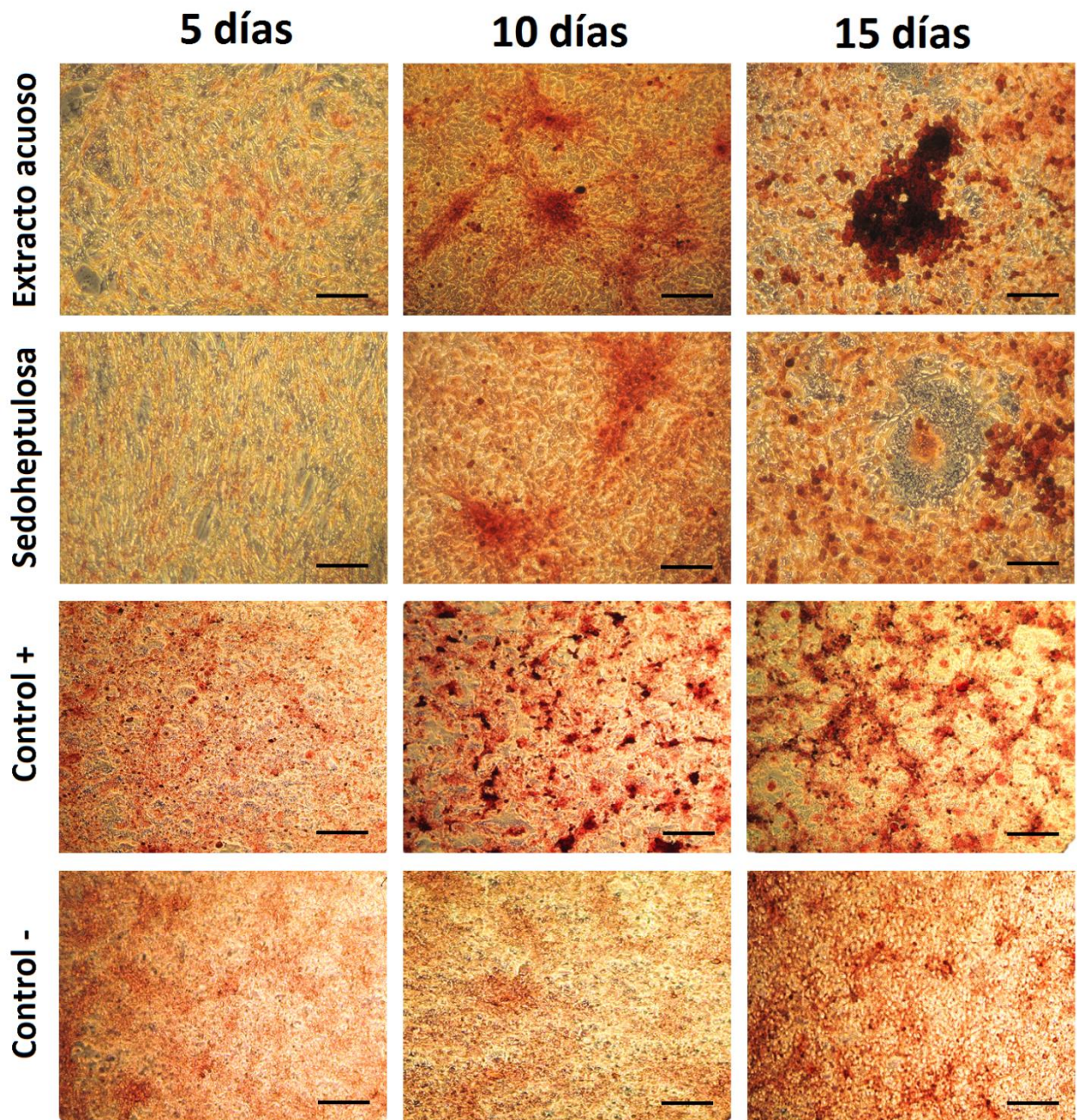


Figura 23. Detección de la mineralización mediante la tinción de alizarina roja. Sedoheptulosa, extracto acuoso con una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; controles positivo (medio mineralizante) y negativo a los 5, 10 y 15 días de cultivo.



Se observó la formación de nódulos de calcio fuertemente teñidos con la alizarina roja en los pozos de cultivo correspondientes al EA a los 15 días. En contraste, dicho comportamiento no fue tan evidente en los pozos correspondientes a la sedoheptulosa.

Esta propiedad no ha sido previamente descrita en la literatura científica para esta prueba, una explicación es debido a que el EA contiene diversos componentes que, en conjunto, contribuyen a la diferenciación osteoblástica, entre ellos componentes minerales (Ca = 45.68 $\mu\text{g}/\text{mL}$), componentes antioxidantes (mayormente fenólicos).

Los resultados de la cuantificación de la deposición de calcio mediante el método de CPC mostraron que no hay diferencia significativa en el proceso de mineralización entre el control positivo (medio mineralizante) y las condiciones experimentales (sedoheptulosa y EA), ya que a los 10 días de tratamiento aún no se observa dicha diferencia; sin embargo, a los 15 días de tratamiento, el ensayo con el EA mostró una diferencia significativa ($\alpha=0.05$) con el de la sedoheptulosa (Figura 24). No obstante, las condiciones con sedoheptulosa y con el EA mostraron un contenido mineral similar al control positivo.

Los valores del control negativo fueron estadísticamente diferentes al resto de las condiciones en todos los tiempos de medición; asimismo, el nivel de confianza se incrementó con el tiempo ($\alpha=0.01$, $\alpha=0.001$, $\alpha=0.0001$ respectivamente a los 5, 10 y 15 días).

Por todo lo anterior, se puede inferir que la sedoheptulosa participa en el proceso de proliferación celular, así como en el proceso inicial de diferenciación osteogénica, sin embargo, sólo el EA puede mantener el frente de mineralización debido a que, en principio, contiene sedoheptulosa y además otros componentes, entre ellos calcio y fósforo que permiten que ejerza ese efecto.

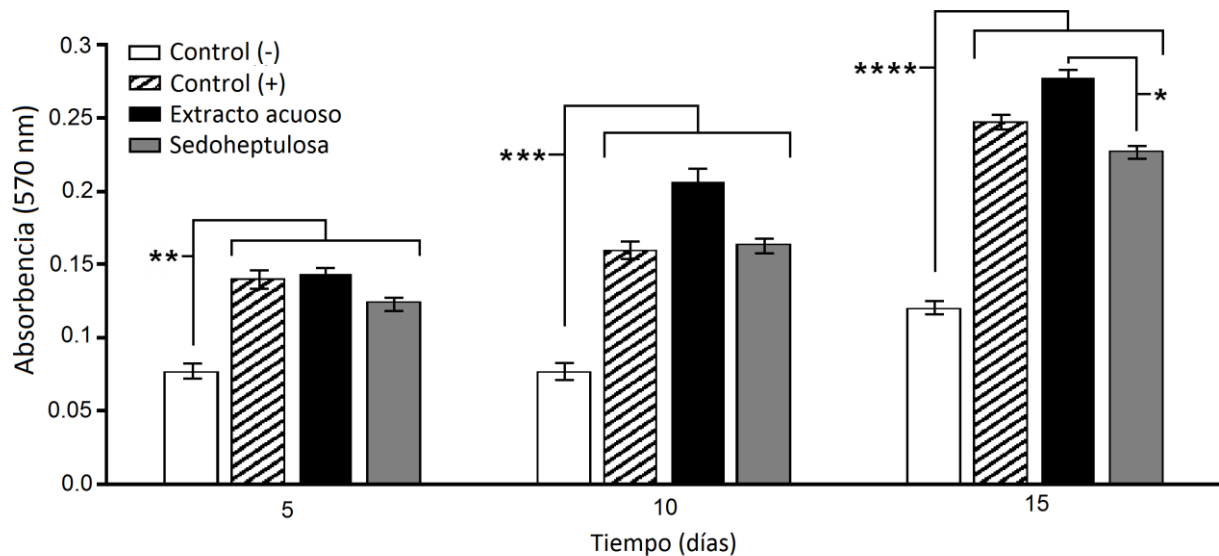


Figura 24. Cuantificación de la deposición de calcio mediante el método de CPC. Las diferencias significativas estadísticas se expresan como $*\alpha-0.05$, $**\alpha-0.01$, $***\alpha-0.001$, $****\alpha-0.0001$.

4. Ensayos de nucleación

Es conocido que ciertos cristales pueden funcionar como semilla para que sobre ellos crezcan otros cristales nuevos, mas no necesariamente de la misma sustancia. Por ello se decidió probar la capacidad de la singenita (aislada del EA) y del mismo EA, de promover la nucleación de fosfatos de calcio mediante un ensayo *in vitro* que consiste en un sistema bifásico. En el sistema, la fase inferior consiste en un gel de metasilicatos con una gravedad específica que permite observar la formación de cristales que se forman por nucleación en la metafase. La muestra se coloca sobre la fase de silicatos y sobre ella una solución de cloruro de calcio. Debido a que los cristales de fosfato de calcio son ligeramente más densos que el gel, éstos descienden y ello permite observarlos (Figura 25). Una vez formados los cristales de ambas pruebas, así como del control negativo (albúmina), éstos fueron aislados manualmente con ayuda de un microscopio estereoscópico para su posterior análisis, ver Figura 26.

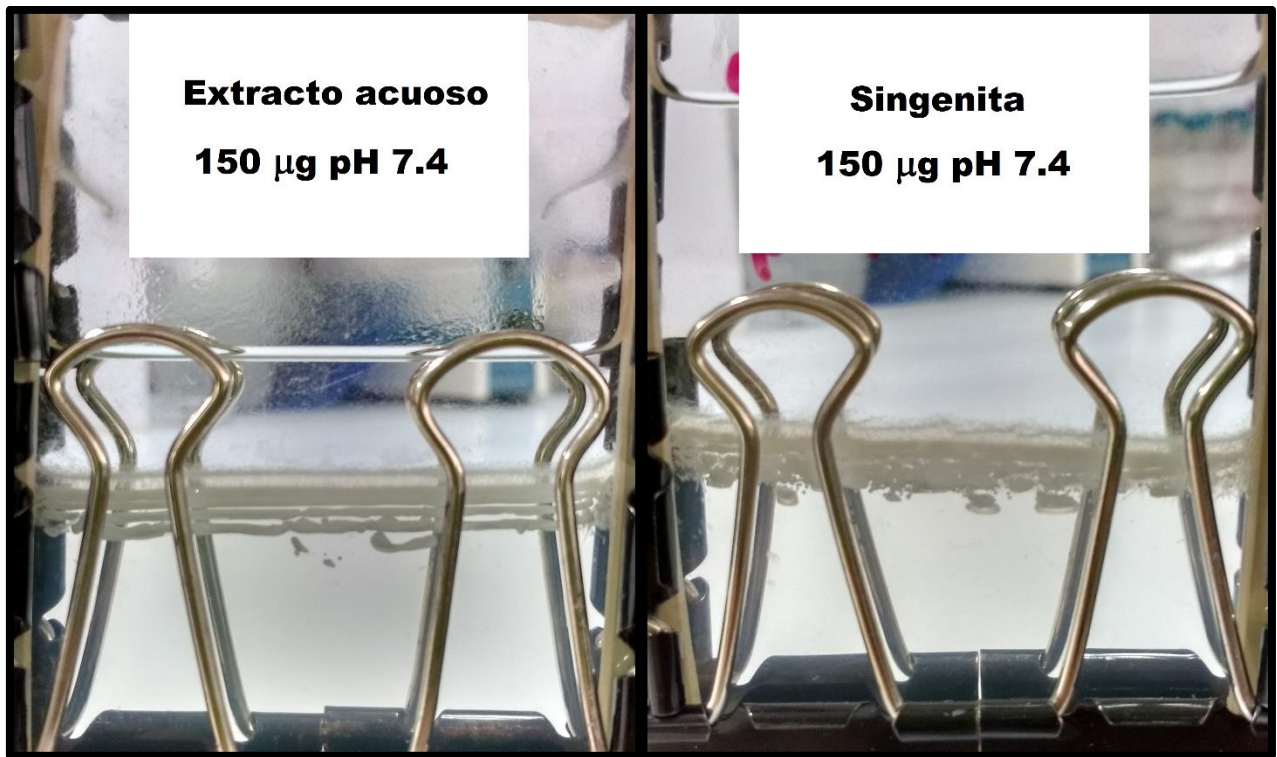


Figura 25. Fotografías del ensayo de nucleación donde se observan los cristales en las metafases.

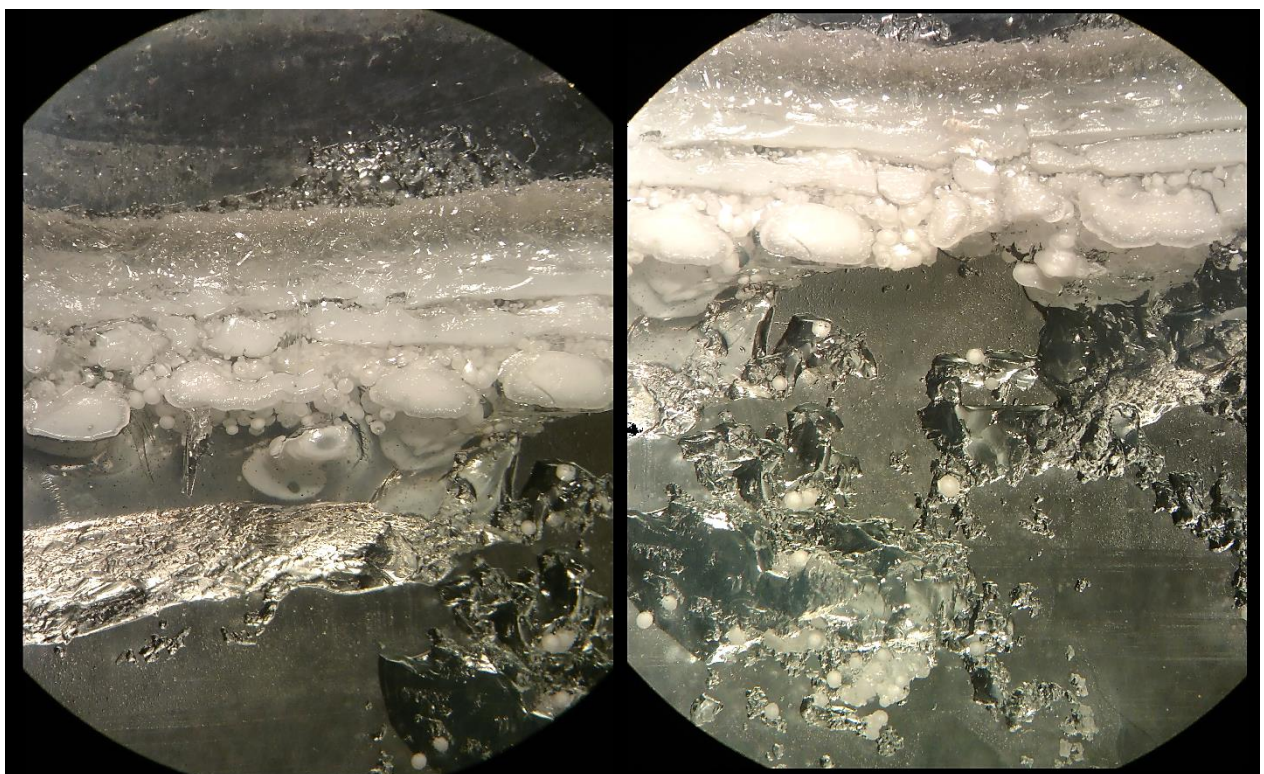


Figura 26. Fotografías de los cristales de fosfato de calcio obtenidos a partir de la singenita.



4.1. Análisis micro Raman

Los cristales provenientes tanto del EA como de la singenita y de la albúmina (mencionados en el apartado 4) se analizaron mediante un análisis micro Raman (Figura 27), los resultados mostraron que los modos vibracionales se encontraron en 960 cm^{-1} que corresponde con la vibración del grupo PO_4^{3-} referido como ν_1 y los modos en 1016 y 424 cm^{-1} (ν_2 y ν_3) que corresponden con el estrechamiento simétrico del grupo. Estos resultados son consistentes con los encontrados en la hidroxiapatita y otros fosfatos de calcio. Adicionalmente, las micrografías obtenidas en la cámara del espectroscopio mostraron que los cristales obtenidos a partir de la singenita presentan forma esférica, por el contrario, aquellos obtenidos del EA o de la albúmina no presentaron uniformidad; sin embargo, los cristales obtenidos a partir del EA mostraron tener composición diferente en el núcleo y en la zona externa. Finalmente, la intensidad Raman que se pudo observar es un indicativo del grado de cristalinidad de la muestra, siendo los cristales provenientes de la singenita los más cristalinos.

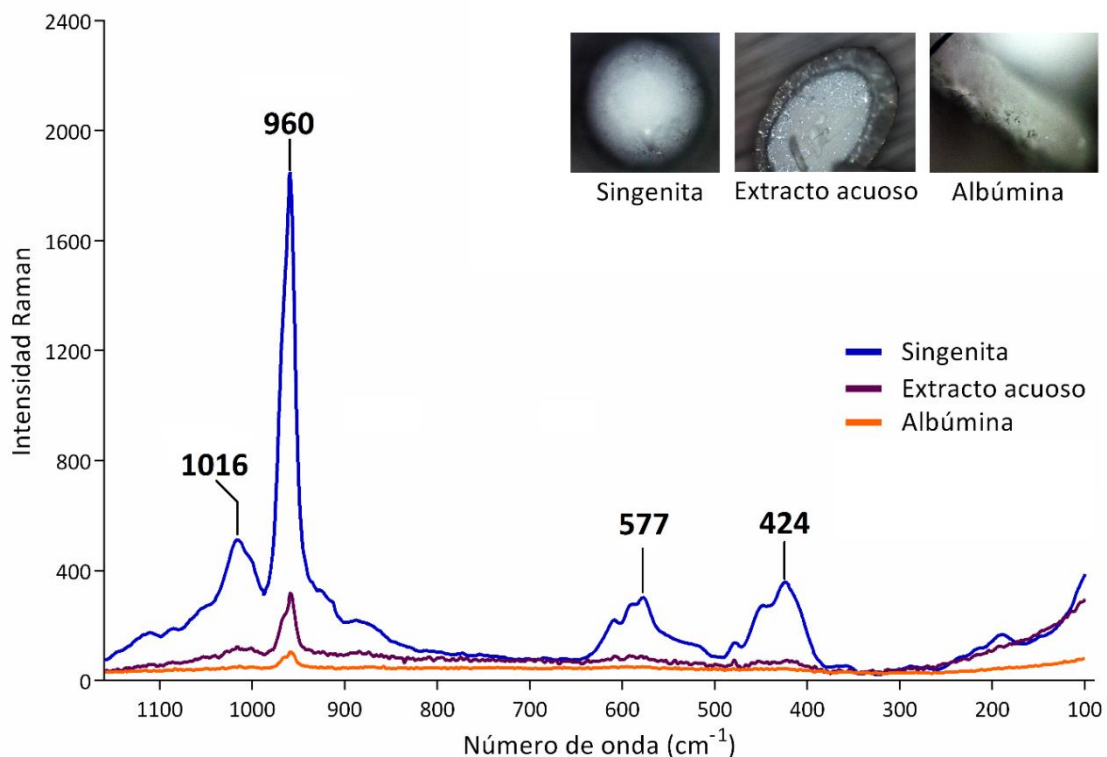


Figura 27. Espectros Raman de los cristales de fosfatos de calcio obtenidos en los ensayos de nucleación con insertos de las micrografías de los mismos en la esquina superior derecha.





4.2. Análisis mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

Los análisis mediante microscopía electrónica de barrido con microanálisis de energía dispersiva por rayos X (SEM-EDS) permitieron conocer la morfología de los cristales de fosfato de calcio (obtenidos de los ensayos en la sección 4) y la composición elemental de los mismos, en particular, la proporción de Ca y P, misma que es característica para cada fosfato de calcio [99].

Se observó la formación de esferas con tamaños entre 200 y 400 μm de diámetro cuyas estructuras están conformadas por cristales con forma de aguja, los cuales, al observar las micrografías, parecieran estar conformados y alineados con respecto a la dirección del crecimiento (Figura 28).

Los resultados mostraron que los cristales obtenidos a partir del EA produjeron cristales cuya morfología y composición son consistentes con los reportados para fosfato octacálcico (OCP), cuya fórmula molecular es $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y la proporción molar Ca/P es de 1.33 [99]; el valor experimental fue 1.35.

Los cristales obtenidos a partir de la singenita mostraron una morfología y composición comparable con la hidroxiapatita (HAp) cuya fórmula molecular es $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. El valor experimental de la proporción molar Ca/P fue 1.68, el cual coincide con el valor reportado de 1.67 [99]. Finalmente, la albúmina, como sustancia de referencia negativa, produjo una fase mineral inmadura con un valor de 0.72.

4.3. Análisis mediante microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM)

Se realizó un análisis mediante microscopía electrónica de transmisión de alta resolución a los cristales obtenidos a partir de la singenita para confirmar su identidad como hidroxiapatita. Los resultados se compararon con las tablas internacionales de cristalografía para la hidroxiapatita hexagonal (JCPDS 44-0778. 2001) [119].



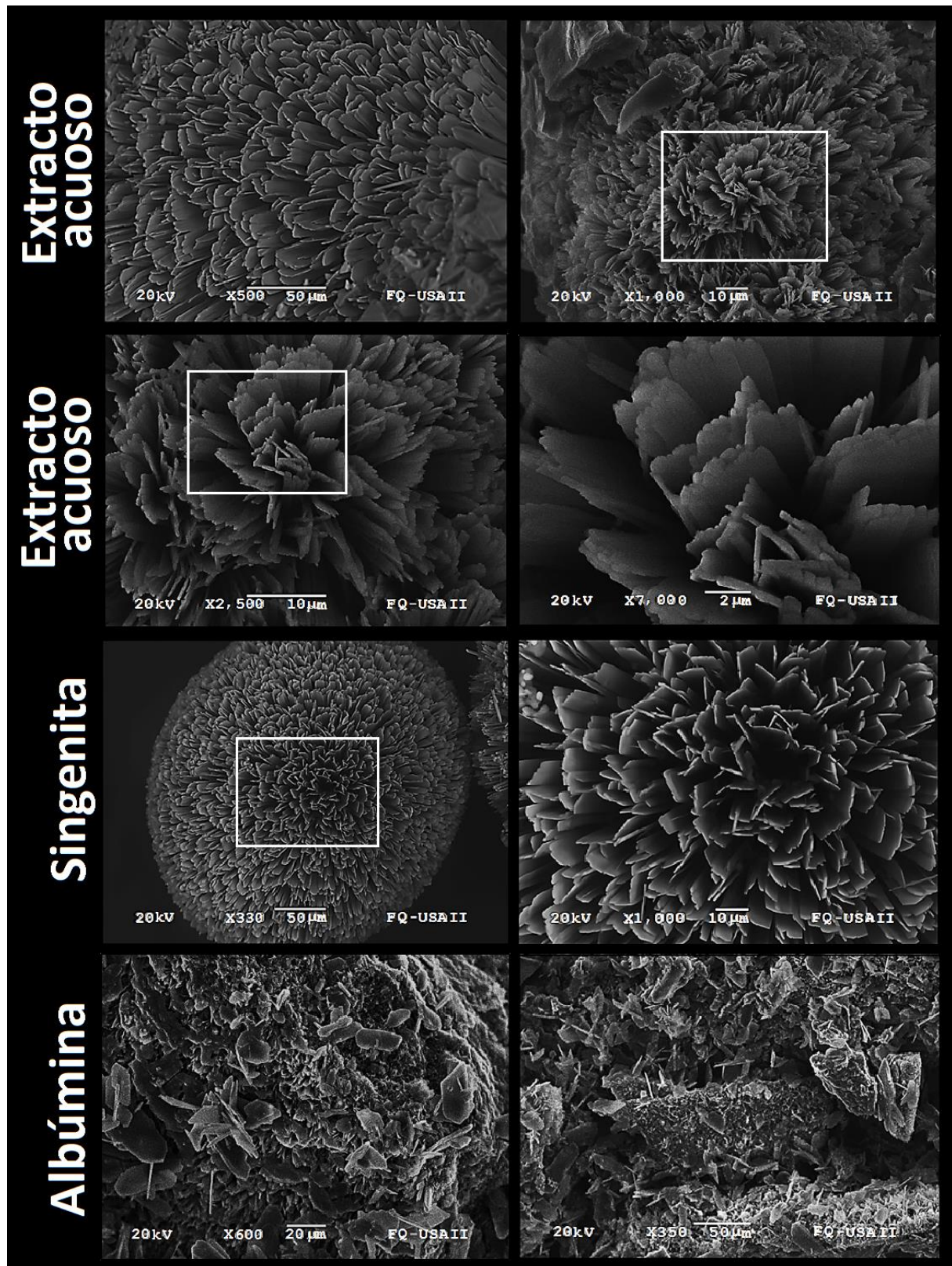


Figura 28. Micrografías SEM de los fosfatos de calcio obtenidos en los ensayos de nucleación.



Se pudieron obtener micrografías para medir las distancias interplanares en la muestra y el patrón de difracción de área seleccionada experimental (SADP). Los resultados del SADP mostraron un patrón de difracción característico del grupo P6₃/m (176) [120], desde el eje de zona $[1 \bar{1} 0 0]$ (Figura 29), lo cual es consistente con la hidroxiapatita hexagonal. Adicionalmente, la transformada de Fourier de las micrografías mostró un patrón de difracción consistente con la hidroxiapatita (HAp) desde el eje de zona $[1 4 \bar{5} \bar{3}]$, en el cual se pudieron observar dos planos $(2 1 \bar{3} 2)$ y un plano $(3 0 \bar{3} 1)$. En la Figura 30 se presenta la micrografía con los planos cristalinos indicados y la transformada de Fourier con una imagen procesada en la que se resalta el patrón de difracción hexagonal. Para el procesamiento de datos se utilizó el programa Digital Micrograph de Gatan USA.

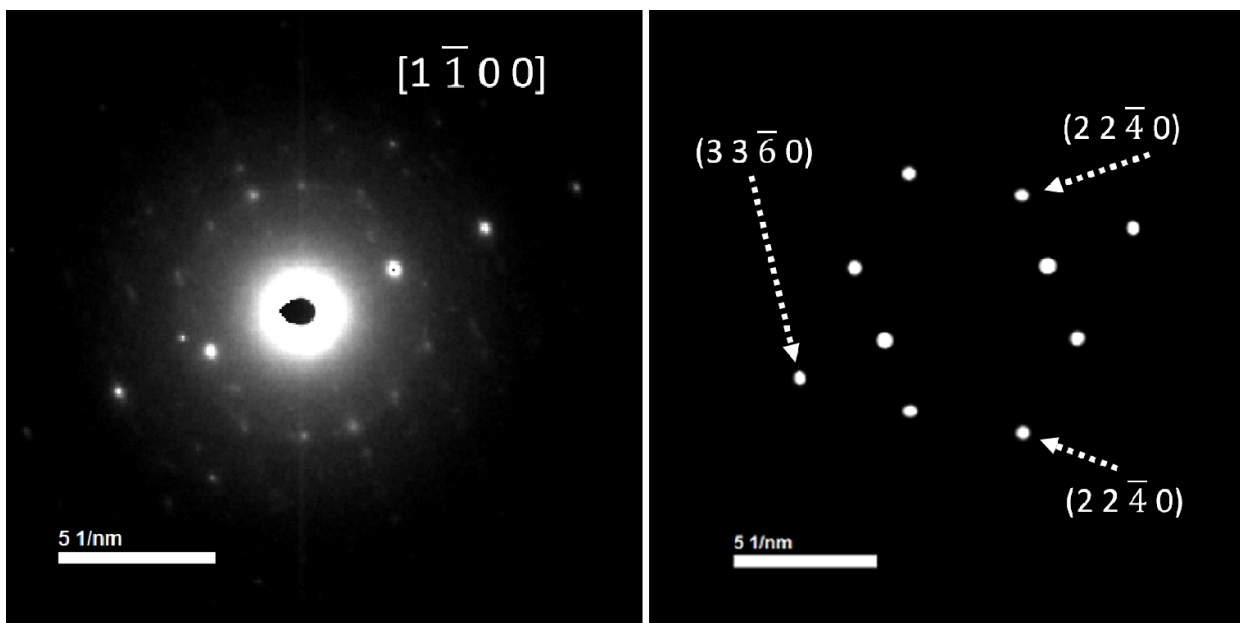


Figura 29. Patrón de difracción experimental de área seleccionada (SADP) desde el eje de zona $[1 \bar{1} 0 0]$ (izquierda). Imagen procesada donde se muestra el patrón de difracción característico del grupo espacial P6₃/m (176) [120] (derecha).

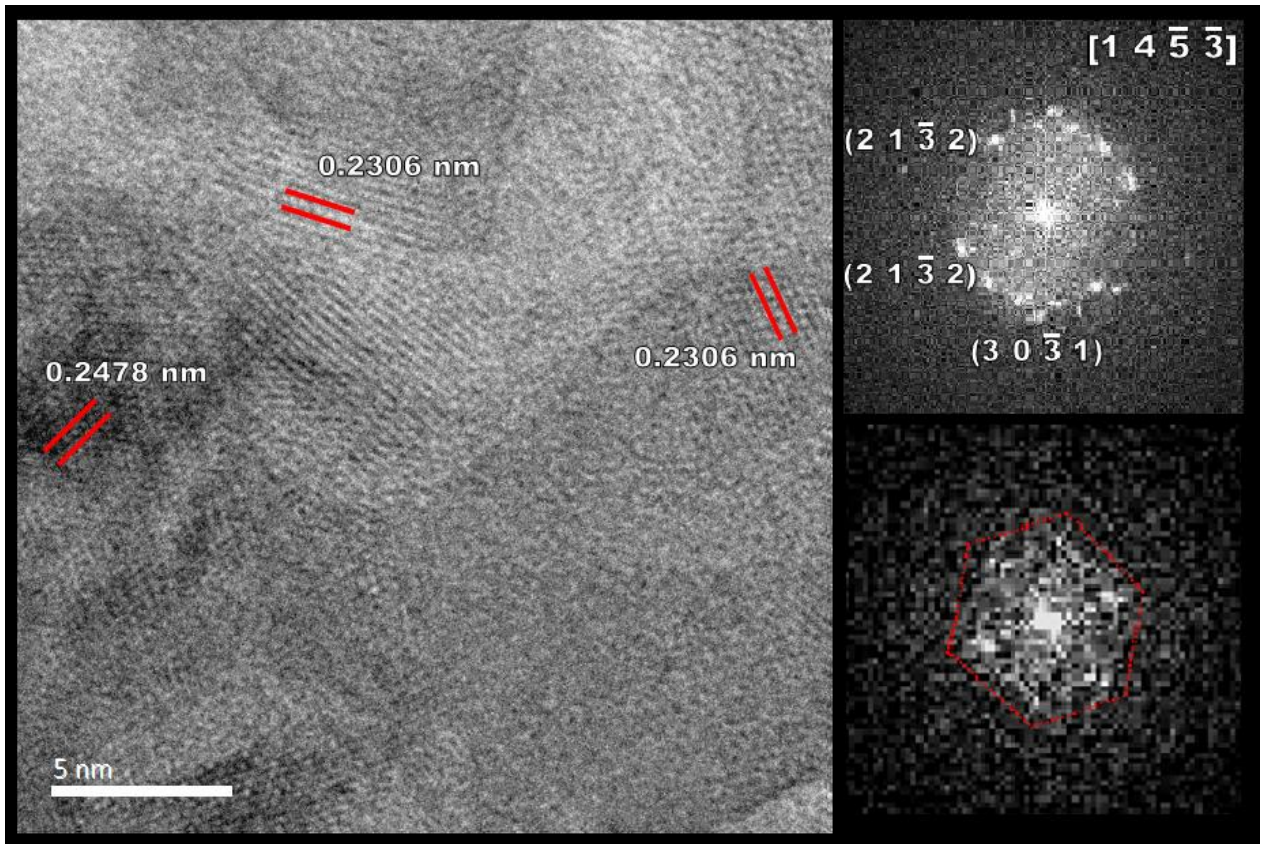


Figura 30. Micrografía con las distancias interplanares de la muestra (izquierda). Transformada de Fourier vista desde el eje de zona $[1\ 4\ \bar{5}\ \bar{3}]$ (superior derecha) e imagen procesada donde se resalta el patrón de difracción hexagonal.



CONCLUSIONES

Se identificó a la sedoheptulosa como el componente orgánico principal del extracto acuoso de *Sedum oxypetalum* y a la singenita como el principal componente inorgánico del mismo.

Se cuantificaron las propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias y antioxidantes del extracto acuoso de *S. oxypetalum*, lo que sustenta su uso para detener el progreso de la destrucción de tejidos de soporte periodontal.

Se comprobó que la sedoheptulosa puede promover la proliferación celular e iniciar el proceso de mineralización en pruebas con células humanas derivadas del ligamento periodontal y que el extracto acuoso de *S. oxypetalum* puede promover tanto la proliferación celular, como iniciar y mantener un fenotipo mineralizante en dichas células. Aunado a lo anterior, el extracto acuoso pudo ejercer dicho efecto sin la necesidad de un medio osteogénico específico, lo cual es debido a la compleja y a la vez muy conveniente composición del extracto (mineral y orgánico). Por lo tanto, se pudo determinar que el extracto acuoso es útil para promover la regeneración de tejidos, en particular, de tejidos mineralizados.

Se describió la capacidad de la singenita para inducir la formación de hidroxiapatita en un modelo *in vitro*. Esta propiedad no había sido previamente descrita y representa un hallazgo muy importante enfocado a la formación de minerales similares al hueso.

Finalmente, este es el primer estudio en el cual se aborda el estudio de un extracto de origen vegetal en el que se evalúan propiedades de un componente inorgánico; además de abordar el problema científico desde un enfoque multi objetivo, no sólo para detener el progreso de una condición patológica, sino para promover la regeneración de tejidos.





PERSPECTIVAS

La evaluación de la capacidad de extractos vegetales, así como productos naturales, sobre la diferenciación osteogénica de células dirigido a la regeneración de tejidos mineralizados es un área emergente en el campo de la farmacognosia. Sin embargo, éste es el primer reporte de este tipo en evaluar las propiedades de una planta endémica de México, país que cuenta con una riqueza globalmente conocida en cuanto a medicina tradicional. Por lo tanto, se espera que el presente trabajo promueva la investigación es esta nueva línea de investigación.

En el área de farmacognosia es común que el contenido mineral de los extractos a evaluar sea menospreciado, incluso ignorado. Con base en las experiencias adquiridas durante el desarrollo de este trabajo se pudo comprobar que eso podría implicar un grave error, pues se descubrió una propiedad biológica importante del mineral singenita. Se espera que con base en este trabajo se preste mayor atención a las potenciales aplicaciones de dichos componentes.

Finalmente, a manera de reconocimiento, el presente estudio no pudo haber sido concluido sin la colaboración profesional de académicos especialistas en las áreas de caracterización de materiales, biología molecular de células periodontales y microbiología estomatológica. Por lo tanto, el reconocimiento académico por los hallazgos es compartido. Se recomienda fervientemente acercarse a los profesionales de otras áreas, pues de esa manera se pueden efectuar descubrimientos más relevantes.





REFERENCIAS

- [1] V.M. Navarro-García, A. Gonzalez, M. Fuentes, M. Aviles, M.Y. Rios, G. Zepeda, M.G. Rojas, Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants, *J. Ethnopharmacol.* 87 (2003) 85–88. doi:10.1016/S0378-8741(03)00114-4.
- [2] M. De la Cruz, J. Badiano, *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis* (Reproducción facsimilar), 2nd ed., Fondo de Cultura Económica, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, 1996.
- [3] M. De la Cruz, J. Badiano, *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*. Versión española con estudios y comentarios por diversos autores., 2a ed., Fondo de Cultura Económica, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, 1996.
- [4] R.T. Clausen, *Sedum* of the Trans-Mexican Volcanic Belt. *Sedum oxypetalum*, www.crassulaceae.com. (1959) 7. http://www.crassulaceae.com/crassulaceae.com/botanik/pflanzen/botanzeige_scan_en.asp?gnr=1340&scan=182890-4&cat=5&name=Sedum (accessed April 17, 2017).
- [5] Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, 2a ed., Secretaría de Salud. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos., Ciudad de México, 2013.
- [6] J. Waizel-Bucay, I.M. Martínez-Rico, Algunas plantas usadas en México en padecimientos periodontales, *Rev.ADM.* 68 (2011) 73–88.
- [7] B. Carrasco-Herández, Estudio etnobotánico de los huertos familiares del Ejido Tezoncuapán, Municipio de Cuautepéc de Hinojosa, Hidalgo., 2011.
- [8] C.N. para el C. y U. de la B. CONABIO, S. del M.A. del D.F. SEDEMA, La biodiversidad en la Ciudad de México. Volumen 2., 1st ed., CONABIO/SEDEMA, Ciudad de México, 2016.
- [9] S. Castillo-Argüero, Y. Martínez-Orea, M.A. Romero-Romero, P. Guadarrama-Chávez, O. Núñez-Castillo, I. Sánchez-Gallén, J.A. Meave, La Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel: Aspectos Florísticos y Ecológicos, 1st ed., Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 2007.
- [10] A. Lot, P. Camarena, Biodiversidad del ecosistema del Pedregal de San Ángel, 1st ed., Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 2009. doi:10.1016/j.chembiol.2014.08.006.
- [11] J.A. Martínez-Villegas, A. Orozco-Segovia, M.E. Sánchez-Coronado, I. Pisanty, Germination of *Sedum oxypetalum* (Crassulaceae) in a primary lava-field shrubland, *Plant Ecol.* 213 (2012) 871–881. doi:10.1007/s11258-012-0049-x.
- [12] P.E. Mendoza-Hernández, A. Orozco-Segovia, J.A. Meave, T. Valverde, M. Martínez-Ramos, Vegetation recovery and plant facilitation in a human-disturbed lava field in a megacity: Searching tools for ecosystem restoration, *Plant Ecol.* 214 (2013) 153–167. doi:10.1007/s11258-012-0153-y.
- [13] N.-H. Lin, S. Gronthos, P. Bartold, Stem cells and periodontal regeneration, *Aust. Dent. J.* 53 (2008) 108–121. doi:10.1111/j.1834-7819.2008.00019.x.
- [14] W.A. Soskolne, A. Klingler, The Relationship Between Periodontal Diseases and Diabetes: An Overview, *Ann. Periodontol.* 6 (2001) 91–98.
- [15] P.E. Petersen, H. Ogawa, The global burden of periodontal disease: Towards integration with chronic disease prevention and control, *Periodontol.* 2000. 60 (2012) 15–39. doi:10.1111/j.1600-0757.2011.00425.x.
- [16] D.N. Geurs, D.P. chair; Drs. Vincent Iacono, Joe Krayner, Brian Mealey, and M.S. Bryan Pearson, Paul Rosen, Robert Sabatini, American Academy of Periodontology Task Force Report on the Update to the 1999 Classification of Periodontal Diseases and Conditions, *J. Periodontol.* 86 (2015) 835–838. doi:10.1902/jop.2015.157001.
- [17] G.C. Armitage, Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions, *Ann. Periodontol.* 4 (1999) 1–6. doi:10.1902/annals.1999.4.1.1.





- [18] M. Negroni, Microbiología Estomatológica Fundamentos y guía práctica, 2009.
- [19] R.E. Walchuck, ed., Periodontitis. Symptoms, Treatment and Prevention, 1st ed., Nova Science Publishers, Inc., New York, 2010.
- [20] W.J. Grzesik, a S. Narayanan, C. Hill, Cementum and Periodontal Wound Healing and Regeneration, Crit. Rev. Oral Biol. Med. 13 (2002) 474–484. doi:10.1177/154411130201300605.
- [21] P.E. Petersen, H. Ogawa, Strengthening the prevention of periodontal disease: the WHO approach., J. Periodontol. 76 (2005) 2187–2193. doi:10.1902/jop.2005.76.12.2187.
- [22] B.A. Dye, Global periodontal disease epidemiology, Periodontol. 2000. 58 (2012) 10–25. doi:10.1111/j.1600-0757.2011.00413.x.
- [23] S. Jacob, Global Prevalence of Periodontitis: A literature review, Int. Arab J. Dent. 3 (2012) 26–30.
- [24] N.R. Rojo-Botello, A. Flores-Espinosa, M. Arcos-Castro, Prevalencia, severidad y extensión de periodontitis crónica, Rev. Odontológica Mex. 15 (2011) 31–39.
- [25] A.M. Fernández-Presas, En México la enfermedad periodontal tiene una prevalencia de 70 por ciento, Ciudad de México, 2016. http://www.dgcs.unam.mx/bol_eti_n/bdbol_eti_n/2016_476.html.
- [26] B.L. Pihlstrom, B.S. Michalowicz, N.W. Johnson, Periodontal Diseases, Lancet. 366 (2005) 1809–1820. doi:S0140-6736(05)67728-8 [pii]r10.1016/S0140-6736(05)67728-8.
- [27] I.L.C. Chapple, F. Van Der Weijden, C. Doerfer, D. Herrera, L. Shapira, D. Polak, P. Madianos, A. Louropoulou, E. Machtei, N. Donos, H. Greenwell, A.J. Van Winkelhoff, B. Eren Kuru, N. Arweiler, W. Teughels, M. Aimetti, A. Molina, E. Montero, F. Graziani, Primary prevention of periodontitis: Managing gingivitis, J. Clin. Periodontol. 42 (2015) S71–S76. doi:10.1111/jcpe.12366.
- [28] G. Hajishengallis, Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation, Nat. Rev. Immunol. 15 (2014) 30–44. doi:10.1038/nri3785.
- [29] M. Costalonga, M.C. Herzberg, The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries, Immunol. Lett. 162 (2014) 22–38. doi:10.1016/j.imlet.2014.08.017.
- [30] M. Raja, F. Ummer, C.P. Dhivakar, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* - A Tooth Killer, J. Clin. Diagnostic Res. 8 (2014) 13–16. doi:10.7860/JCDR/2014/9845.4766.
- [31] J.M. DiRienzo, Breaking the Gingival Epithelial Barrier: Role of the *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Cytolethal Distending Toxin in Oral Infectious Disease., Cells. 3 (2014) 476–99. doi:10.3390/cells3020476.
- [32] L.C. Kuo, A.M. Polson, T. Kang, Associations between periodontal diseases and systemic diseases: A review of the inter-relationships and interactions with diabetes, respiratory diseases, cardiovascular diseases and osteoporosis, Public Health. 122 (2008) 417–433. doi:10.1016/j.puhe.2007.07.004.
- [33] T. Yucel-Lindberg, T. Båge, Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis, Expert Rev. Mol. Med. 15 (2013) e7. doi:10.1017/erm.2013.8.
- [34] T. Ara, K. Kurata, K. Hirai, T. Uchihashi, T. Uematsu, Y. Imamura, K. Furusawa, S. Kurihara, P.-L. Wang, Human gingival fibroblasts are critical in sustaining inflammation in periodontal disease, J. Periodontal Res. 44 (2009) 21–27. doi:10.1111/j.1600-0765.2007.01041.x.
- [35] T. Imatani, T. Kato, K. Okuda, Production of inflammatory cytokines by human gingival fibroblasts stimulated by cell-surface preparations of *Porphyromonas gingivalis*., Oral Microbiol. Immunol. 16 (2001) 65–72. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11240858>.





- [36] L.W. Kent, F. Rahemtulla, R.D. Hockett, R.C. Gilleland, S.M. Michalek, Effect of lipopolysaccharide and inflammatory cytokines on interleukin-6 production by healthy human gingival fibroblasts., *Infect. Immun.* 66 (1998) 608–614.
- [37] G.C. Armitage, Bi-directional relationship between pregnancy and periodontal disease, *Periodontol.* 2000. 61 (2013) 160–176. doi:10.1111/j.1600-0757.2011.00396.x.
- [38] S. Nair, M. Faizuddin, J. Dharmapalan, Role of autoimmune responses in periodontal disease., *Autoimmune Dis.* 2014 (2014) 1–7. doi:10.1155/2014/596824.
- [39] B. Halliwell, Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide?, *Trends Biochem. Sci.* 31 (2006) 509–515. doi:10.1016/j.tibs.2006.07.005.
- [40] I.L.C. Chapple, J.B. Matthews, The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction, *Periodontol.* 2000. 43 (2007) 160–232. doi:10.1111/j.1600-0757.2006.00178.x.
- [41] P.-S. Dhotre, A.N. Suryakar, R.B. Bhogade, Oxidative stress in periodontitis, *Eur. J. Gen. Med.* 9 (2012) 81–84. <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L366020064>.
- [42] C.F. Canakçi, Y. Çiçek, V. Canakçi, Reactive oxygen species and human inflammatory periodontal diseases., *Biochem. Biokimija.* 70 (2005) 619–28. doi:10.1007/s10541-005-0161-9.
- [43] Z. Liu, Y. Liu, Y. Song, X. Zhang, S. Wang, Z. Wang, Systemic Oxidative Stress Biomarkers in Chronic Periodontitis: A Meta-Analysis, *Dis. Markers.* 2014 (2014) 1–10. doi:10.1155/2014/931083.
- [44] G.W. Taylor, Bidirectional Interrelationships Between Diabetes and Periodontal Diseases : An Epidemiologic Perspective, *Ann. Periodontol.* 6 (2001) 99–112.
- [45] Y.-Y. Wu, E. Xiao, D.T. Graves, Diabetes mellitus related bone metabolism and periodontal disease, *Int. J. Oral Sci.* 7 (2015) 63–72. doi:10.1038/ijos.2015.2.
- [46] X. Chen, Y. Liu, J. Yang, W. Wu, L. Miao, Y. Yu, X. Yang, W. Sun, The synthesis of hydroxyapatite with different crystallinities by controlling the concentration of recombinant CEMP1 for biological application, *Mater. Sci. Eng. C.* 59 (2016) 384–389. doi:10.1016/j.msec.2015.10.029.
- [47] P.M. Bartold, C.A.G. McCulloch, A.S. Narayanan, S. Pitaru, Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology, *Periodontol.* 2000. 24 (2000) 253–269. doi:10.1034/j.1600-0757.2000.2240113.x.
- [48] S. Sowmya, K.P. Chennazhi, H. Arzate, P. Jayachandran, S. V. Nair, R. Jayakumar, Periodontal Specific Differentiation of Dental Follicle Stem Cells into Osteoblast, Fibroblast, and Cementoblast, *Tissue Engineering Part C.* 21 (2015) 1044–1058. doi:10.1089/ten.tec.2014.0603.
- [49] A. García-Hernández, H. Arzate, I. Gil-Chavarría, R. Rojo, L. Moreno-Fierros, High glucose concentrations alter the biomineralization process in human osteoblastic cells., *Bone.* 50 (2012) 276–88. doi:10.1016/j.bone.2011.10.032.
- [50] H. Arzate, M.A. Alvarez, A.S. Narayanan, Cyclosporin A promotes mineralization by human cementoblastoma-derived cells in culture, *J. Periodontal Res.* 40 (2005) 218–224. doi:10.1111/j.1600-0765.2005.00797.x.
- [51] K. Nakashima, X. Zhou, G. Kunkel, Z. Zhang, J.M. Deng, R.R. Behringer, B. De Crombrugge, The novel zinc finger-containing transcription factor Osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation, *Cell.* 108 (2002) 17–29. doi:10.1016/S0092-8674(01)00622-5.
- [52] W.-Y. Baek, M.-A. Lee, J.W. Jung, S.-Y. Kim, H. Akiyama, B. de Crombrugge, J.-E. Kim, Positive Regulation of Adult Bone Formation by Osteoblast-Specific Transcription Factor Osterix, *J. Bone Miner. Res.* 24 (2009) 1055–1065. doi:10.1359/jbmr.081248.





- [53] H. Arzate, M. Zeichner-David, G. Mercado-Celis, Cementum proteins : role in periodontium formation and regeneration, *Periodontol.* 2000. 67 (2015) 211–233. doi:10.1111/prd.12062.
- [54] C. Rodrigues-Rezende-Costa, B. Rabelo-Amorim, P. De-Magalhães, G. De-Luca-Canto, A.C. Acevedo, N.E. Silva-Guerra, Effects of Plants on Osteogenic Differentiation and Mineralization of Periodontal Ligament Cells : A Systematic Review, *Phyther. Res.* 30 (2016) 519–531. doi:10.1002/ptr.5568.
- [55] K. Boonanantanasarn, K. Janebodin, P. Suppakpatana, T. Arayapisit, J. Rodsutthi, P. Chunhabundit, S. Boonanuntanasarn, W. Sripairojthikoon, Retraction: Morinda citrifolia leaves enhance osteogenic differentiation and mineralization of human periodontal ligament cells, *Dent. Mater. J.* 33 (2014) 149–149. doi:10.4012/dmj.2012-053-e.
- [56] P. Chantarawatit, P. Sangvanich, W. Banlunara, K. Soontornvipart, P. Thunyakitpisal, Acemannan sponges stimulate alveolar bone, cementum and periodontal ligament regeneration in a canine class II furcation defect model, *J. Periodontal Res.* 49 (2014) 164–178. doi:10.1111/jre.12090.
- [57] L.N. Gao, Y. An, M. Lei, B. Li, H. Yang, H. Lu, F.M. Chen, Y. Jin, The effect of the coumarin-like derivative osthole on the osteogenic properties of human periodontal ligament and jaw bone marrow mesenchymal stem cell sheets, *Biomaterials.* 34 (2013) 9937–9951. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.09.017.
- [58] N. Jittapiromsak, D. Sahawat, W. Banlunara, P. Sangvanich, P. Thunyakitpisal, Acemannan, an extracted product from Aloe vera, stimulates dental pulp cell proliferation, differentiation, mineralization, and dentin formation., *Tissue Eng. Part A.* 16 (2010) 1997–2006. doi:10.1089/ten.TEA.2009.0593.
- [59] S.Y. Kim, J.Y. Lee, Y.D. Park, K.L. Kang, J.C. Lee, J.S. Heo, Hesperetin alleviates the inhibitory effects of high glucose on the osteoblastic differentiation of periodontal ligament stem cells, *PLoS One.* 8 (2013) e67504. doi:10.1371/journal.pone.0067504.
- [60] S.Y. Kim, S.Y. An, J.S. Lee, J.S. Heo, Zanthoxylum schinifolium enhances the osteogenic potential of periodontal ligament stem cells, *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim.* 51 (2015) 165–173. doi:10.1007/s11626-014-9824-4.
- [61] N. Nowwarote, T. Osathanon, P. Jitjaturunt, S. Manopattanasoontorn, P. Pavasant, Asiaticoside induces type I collagen synthesis and osteogenic differentiation in human periodontal ligament cells, *Phytother Res.* 27 (2013) 457–462. doi:10.1002/ptr.4742.
- [62] Z. Pei, F. Zhang, Z. Niu, S. Shi, Effect of icariin on cell proliferation and the expression of bone resorption/formation-related markers in human periodontal ligament cells, *Mol. Med. Rep.* 8 (2013) 1499–1504. doi:10.3892/mmr.2013.1696.
- [63] J. An, D. Hao, Q. Zhang, B. Chen, R. Zhang, Y. Wang, H. Yang, Natural products for treatment of bone erosive diseases: The effects and mechanisms on inhibiting osteoclastogenesis and bone resorption, *Int. Immunopharmacol.* 36 (2016) 118–131. doi:10.1016/j.intimp.2016.04.024.
- [64] G. Bhattarai, S.B. Poudel, S.-H. Kook, J.-C. Lee, Resveratrol prevents alveolar bone loss in an experimental rat model of periodontitis, *Acta Biomater.* (2015). doi:10.1016/j.actbio.2015.10.031.
- [65] M.J.M. Christenhusz, J.W. Byng, The number of known plants species in the world and its annual increase., *Phytotaxa.* 261 (2016) 201. doi:10.11646/phytotaxa.261.3.1.
- [66] K. Kubitzki, ed., *The families and genera of vascular plants. Vol IX: Flowering Plants Eudicots.*, Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, 2007.
- [67] G. Rowley, *The illustrated encyclopedia of Succulents. A guide to the natural history and cultivation of Cacti and cactus-like plants.*, Salamander Books Ltd., London, 1978.
- [68] R. Stephenson, *Sedum cultivated stonecrops*, Timber Press Inc., Portland, Oregon., 1999.





- [69] M. Schwaiger, Isolation, Purification and Quantification of Sedoheptulose from *Sedum maximum*, University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna, 2014.
- [70] J.W. Pratt, N.K. Richtmyer, C.S. Hudson, The Structure of Sedoheptulosan, *J. Am. Chem. Soc.* 73 (1951) 1876–1877. <http://dx.doi.org/10.1021/ja01148a540>.
- [71] G.O. De Melo, D.D.C. Malvar, F. a. Vanderlinde, F.F. Rocha, P.A. Pires, E. a. Costa, L.G. de Matos, C.R. Kaiser, S.S. Costa, Antinociceptive and anti-inflammatory kaempferol glycosides from *Sedum dendroideum*, *J. Ethnopharmacol.* 124 (2009) 228–232. doi:10.1016/j.jep.2009.04.024.
- [72] A. Ertaş, M. Boğa, M.A. Yılmaz, Y. Yeşil, N. Haşimi, M.Ş. Kaya, H. Temel, U. Kolak, Chemical compositions by using LC-MS/MS and GC-MS and biological activities of *Sedum sediforme* (Jacq.) Pau., *J. Agric. Food Chem.* 62 (2014) 4601–9. doi:10.1021/jf500067q.
- [73] X. Niu, H. Yao, W. Li, Q. Mu, H. Li, H. Hu, Y. Li, H. Huang, δ -Amyrone, a specific inhibitor of cyclooxygenase-2, exhibits anti-inflammatory effects in vitro and in vivo of mice, *Int. Immunopharmacol.* 21 (2014) 112–118. doi:10.1016/j.intimp.2014.04.019.
- [74] M.A. Al-Qudah, R. Muhaidat, A.A. Alomary, E.H. Malkawi, H.I. Al-Jaber, I.N. Trawenh, M.H. Abu Zarga, S.T. Abu Orabi, Investigating the chemical Composition and the antimicrobial activity of the essential oil and Crude Extracts of *Sedum Microcarpum* (Sm.) Schönl Growing Wild in Jordan, *Pharmacogn. J.* 4 (2012) 1–6. doi:10.5530/pj.2012.33.1.
- [75] A. Panossian, G. Wikman, J. Sarris, Rosenroot (*Rhodiola rosea*): Traditional use, chemical composition, pharmacology and clinical efficacy, *Phytomedicine.* 17 (2010) 481–493. doi:10.1016/j.phymed.2010.02.002.
- [76] L. Wang, Q. Mei, D. Wan, Simultaneous determination by HPLC of quercetin and kaempferol in three *Sedum* medicinal plants harvested in different seasons, *J. Chromatogr. Sci.* 52 (2014) 334–338. doi:10.1093/chromsci/bmt035.
- [77] P.M. Dewick, *Medicinal Natural Products*, 3rd ed., JOHN WILEY & SONS, INC., Sussex, United Kingdom, 2009.
- [78] A. Nahrstedt, A. Walther, V. Wray, Sarmenosin Epoxide, A new cyanogenic compound from *Sedum cepaea*, *Phytochemistry.* 21 (1982) 107–110.
- [79] ITIS Report. *Sedum L.*, *Integr. Taxon. Inf. Syst.* (2017). https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=24103&print_version=PRT&source=to_print#null (accessed May 7, 2017).
- [80] *Sedum oxypetalum* Kunth, *Plant List. A Work. List All Plant Species.* (2017). <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/tro-8900146> (accessed May 7, 2017).
- [81] J.A. Martínez-Villegas, *Sedum oxypetalum* Kunth, (2014). https://www.researchgate.net/publication/269173428_Sedum_oxypetalum_Kunth?_esc=publicationCoverPdf&el=1_x_2&enrichId=rgreq-3930852e9c0a07617c75cc4b43ca4486-XXX&enrichSource=Y292ZXJQYWdlOzI2OTE3MzQyODtBUzoxNzE2NDk0MjkxNTU4NDZAMTQxNzgzNTgyMTk0OQ%3D%3D
- [82] C. Chemical, COX (ovine/human) Inhibitor Screening Assay Kit, *Prod. Descr.* (2016). <https://www.caymanchem.com/product/560131>.
- [83] M.A. Alvarez-Perez, O. Alvarez-Fregoso, J. Ortiz-Lopez, H. Arzate, X-ray microanalysis of human cementum, *Microsc. Microanal.* 11 (2005) 313–318. doi:10.1017/s1431927605050221.
- [84] S. of the C. on B.D. United Nations, The Nagoya Protocol on Access to Genetic Resources and the Fair and Equitable Sharing of Benefits Arising from their Utilization to the Convention on Biological Diversity, 2011. <https://www.cbd.int/abs/doc/protocol/nagoya-protocol-en.pdf>.





- [85] SEMARNAT, Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental. Especies nativas de México de flora y fauna silvestres. Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio. Lista de especies en riesgo., (2010) 13.
- [86] LV-Legislatura, Código para la Biodiversidad del Estado de México, (2008) 284.
- [87] S.D. Sarker, L. Nahar, eds., Natural Products Isolation, 3rd ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2012. doi:10.1007/978-1-61779-624-1.
- [88] V.L. Singleton, R. Orthofer, R.M. Lamuela-Raventós, [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent, in: 1999: pp. 152–178. doi:10.1016/S0076-6879(99)99017-1.
- [89] C. Salgado, Análisis de la actividad antioxidante de Verbena carolina, National Autonomous University of Mexico, 2016.
- [90] Z. Cheng, J. Moore, L. (Lucy) Yu, High-Throughput Relative DPPH Radical Scavenging Capacity Assay, J. Agric. Food Chem. 54 (2006) 7429–7436. doi:10.1021/jf0611668.
- [91] L. Leong, G. Shui, An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets, Food Chem. 76 (2002) 69–75. doi:10.1016/S0308-8146(01)00251-5.
- [92] E. Coballase-Urrutia, J. Pedraza-Chaverri, R. Camacho-Carranza, N. Cárdenas-Rodríguez, B. Huerta-Gertrudis, O.N. Medina-Campos, M. Mendoza-Cruz, G. Delgado-Lamas, J.J. Espinosa-Aguirre, Antioxidant activity of Heterotheca inuloides extracts and of some of its metabolites, Toxicology. 276 (2010) 41–48. doi:10.1016/j.tox.2010.06.013.
- [93] G. Cao, H.M. Alessio, R.G. Cutler, Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants, Free Radic. Biol. Med. 14 (1993) 303–311. doi:10.1016/0891-5849(93)90027-R.
- [94] C.J. Smith, Y. Zhang, C.M. Koboldt, J. Muhammad, B.S. Zweifel, a Shaffer, J.J. Talley, J.L. Masferrer, K. Seibert, P.C. Isakson, Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95 (1998) 13313–13318. doi:10.1073/pnas.95.22.13313.
- [95] J. Kaur, A. Bhardwaj, Z. Huang, E.E. Knaus, N-1 and C-3 substituted indole Schiff bases as selective COX-2 inhibitors: Synthesis and biological evaluation, Bioorg. Med. Chem. Lett. 22 (2012) 2154–2159. doi:10.1016/j.bmcl.2012.01.130.
- [96] B. Carmona-Rodríguez, M.A. Álvarez-Pérez, A.S. Narayanan, M. Zeichner-David, J. Reyes-Gasga, J. Molina-Guarneros, A.L. García-Hernández, J.L. Suárez-Franco, I.G. Chavarría, E. Villarreal-Ramírez, H. Arzate, Human Cementum Protein 1 induces expression of bone and cementum proteins by human gingival fibroblasts, Biochem. Biophys. Res. Commun. 358 (2007) 763–769. doi:10.1016/j.bbrc.2007.04.204.
- [97] G. Montoya, J. Arenas, E. Romo, M. Zeichner-David, M. Alvarez, A.S. Narayanan, U. Velazquez, G. Mercado, H. Arzate, Human recombinant cementum attachment protein (hrPTPLa/CAP) promotes hydroxyapatite crystal formation in vitro and bone healing in vivo, Bone. 69 (2014) 154–164. doi:10.1016/j.bone.2014.09.014.
- [98] S. Gajjeraman, K. Narayanan, J. Hao, C. Qin, A. George, Matrix macromolecules in hard tissues control the nucleation and hierarchical assembly of hydroxyapatite, J. Biol. Chem. 282 (2007) 1193–1204. doi:10.1074/jbc.M604732200.
- [99] K. Lin, C. Wu, J. Chang, Advances in synthesis of calcium phosphate crystals with controlled size and shape, Acta Biomater. 10 (2014) 4071–4102. doi:10.1016/j.actbio.2014.06.017.
- [100] A. Haschemi, O. Wagner, C. Nagy, R. Marculescu, The use of sedoheptulose as a nutritional supplement, WO 2014/147213 A1, 2014.
- [101] A. Haschemi, O. Wagner, C. Nagy, R. Marculescu, Use of sedoheptulose for prevention or treatment of inflammation, WO 2014/147214 A1, 2014.





- [102] A. Haschemi, P. Kosma, L. Gille, C.R. Evans, C.F. Burant, P. Starkl, B. Knapp, R. Haas, J.A. Schmid, C. Jandl, S. Amir, G. Lubec, J. Park, H. Esterbauer, M. Bilban, L. Brizuela, J.A. Pospisilik, L.E. Otterbein, O. Wagner, The Sedoheptulose Kinase CARKL Directs Macrophage Polarization through Control of Glucose Metabolism, *Cell Metab.* 15 (2012) 813–826. doi:10.1016/j.cmet.2012.04.023.
- [103] C. Nagy, A. Haschemi, Sedoheptulose kinase regulates cellular carbohydrate metabolism by sedoheptulose 7-phosphate supply., *Biochem. Soc. Trans.* 41 (2013) 674–80. doi:10.1042/BST20120354.
- [104] C. Nagy, A. Haschemi, Time and Demand are Two Critical Dimensions of Immunometabolism: The Process of Macrophage Activation and the Pentose Phosphate Pathway, *Front. Immunol.* 6 (2015) 1–8. doi:10.3389/fimmu.2015.00164.
- [105] J. Ceusters, C. Godts, D. Peshev, R. Vergauwen, N. Dyubankova, E. Lescrinier, M.P. De Proft, W. Van den Ende, Sedoheptulose accumulation under CO₂ enrichment in leaves of *Kalanchoe pinnata*: a novel mechanism to enhance C and P homeostasis?, *J. Exp. Bot.* 64 (2013) 1497–1507. doi:10.1093/jxb/ert010.
- [106] H.E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities, *J. Org. Chem.* 62 (1997) 7512–7515. doi:10.1021/jo971176v.
- [107] M.A. Chernetsky, The Role Of Morpho-Anatomical Traits Of The Leaves In The Taxonomy Of Kalanchoideae Berg. Subfamily (Crassulaceae DC.), *Mod. Phytomorphology.* 1 (2012) 15–18. doi:10.5281/zenodo.162711.
- [108] M. Chernetsky, E. Weryszko-chmielewska, Structure of *Kalanchoë pumila* Bak. Leaves (Crassulaceae Dc .), 61 (2008) 11–24.
- [109] J.T. Kloprogge, R.D. Schuiling, Z. Ding, L. Hickey, D. Wharton, R.L. Frost, Vibrational spectroscopic study of syngenite formed during the treatment of liquid manure with sulphuric acid, *Vib. Spectrosc.* 28 (2002) 209–221. doi:10.1016/S0924-2031(01)00139-4.
- [110] L.W. Finger, D.E. Cox, A.P. Jephcoat, Correction for powder diffraction peak asymmetry due to axial divergence, *J. Appl. Crystallogr.* 27 (1994) 892–900. doi:10.1107/S0021889894004218.
- [111] P. Ballirano, G. Belardi, A. Maras, Refinement of the structure of synthetic syngenite K₂Ca(SO₄)₂(H₂O) from X-ray powder diffraction data, *Neues Jahrb. Fuer Mineral. Abhandlungen.* 182 (2005) 15–21. doi:10.1127/0077-7757/2005/0027.
- [112] L.M. Szewczuk, L. Forti, L.A. Stivala, T.M. Penning, Resveratrol is a peroxidase-mediated inactivator of COX-1 but not COX-2: A mechanistic approach to the design of COX-1 selective agents, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 22727–22737. doi:10.1074/jbc.M314302200.
- [113] A.D. Haffajee, S.S. Socransky, Microbiology of periodontal diseases: introduction, *Periodontol.* 2000. 38 (2005) 9–12.
- [114] P.E. Kolenbrander, R.N. Andersen, S. David, P.G. Eglund, J.S. Foster, J. Robert, P. Jr, D.S. Blehert, R.J.P. Jr, Communication Among Oral Bacteria, *Microbiol. Mol. Microbiol. Rev.* 66 (2002) 486–505. doi:10.1128/MMBR.66.3.486.
- [115] L. Iauk, A.M. Lo Bue, I. Milazzo, A. Rapisarda, G. Blandino, Antibacterial activity of medicinal plant extracts against periodontopathic bacteria, *Phyther. Res.* 17 (2003) 599–604. doi:10.1002/ptr.1188.
- [116] M. Padiál-Molina, S.L. Volk, J.C. Rodriguez, J.T. Marchesan, P. Galindo-Moreno, H.F. Rios, Tumor necrosis factor- α and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharides decrease periostin in human periodontal ligament fibroblasts., *J. Periodontol.* 84 (2013) 694–703. doi:10.1902/jop.2012.120078.
- [117] J. Potempa, a Banbula, J. Travis, Role of bacterial proteinases in matrix destruction and modulation of host responses., *Periodontol.* 2000. 24 (2000) 153–192.





REFERENCIAS

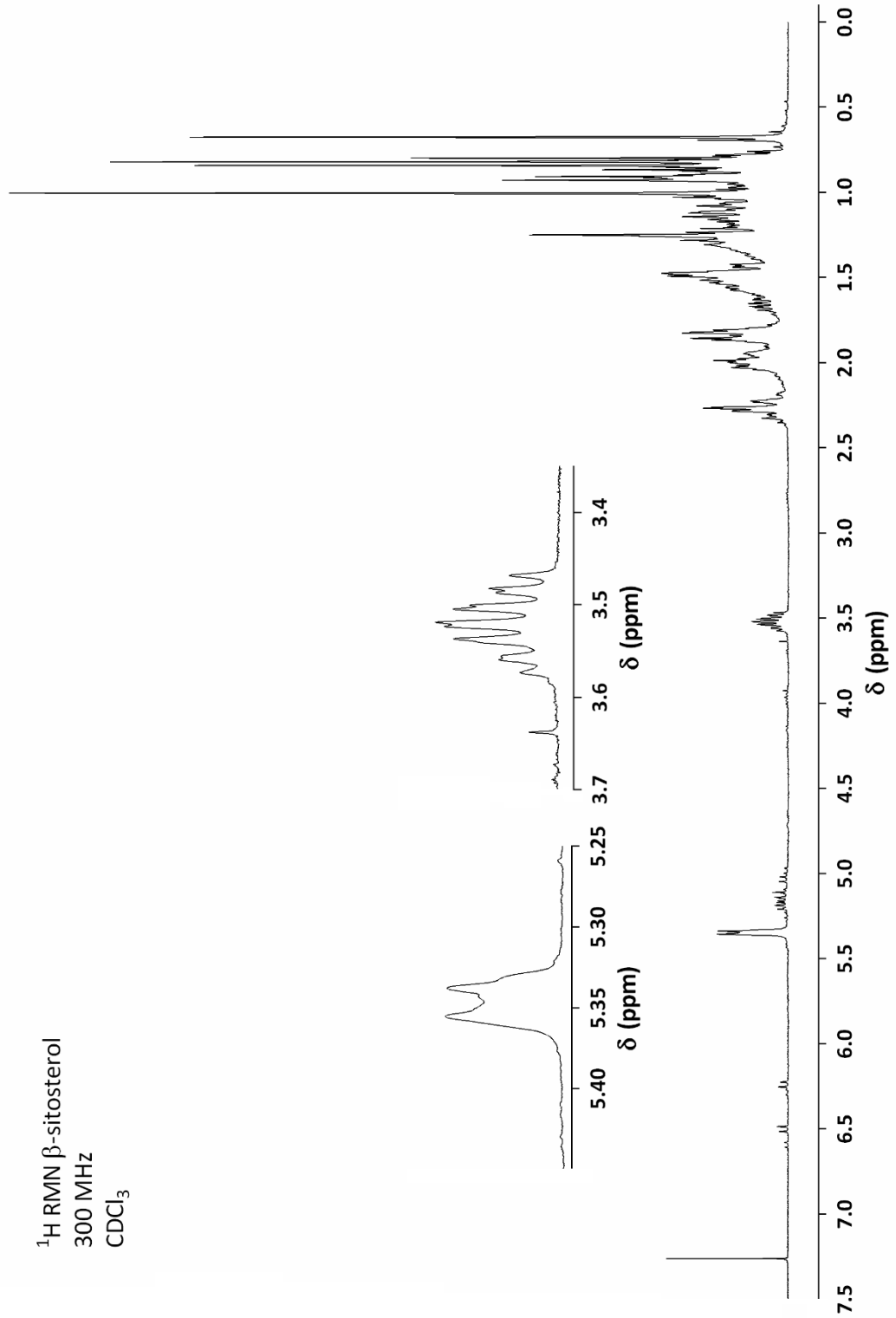
- [118] H. Okada, S. Murakami, Cytokine expression in periodontal health and disease, *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 9 (1998) 248–266. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0032468328&partnerID=40&md5=78d3a8d1696026726854c77ebc92373a>.
- [119] Joint Committee on Powder Diffraction Standards, No. 44-0775 file for calcium hydroxyapatite. CAS: 13-06-5, *Powder Diffr.* 16 (2001).
- [120] U. of L. Department of Crystallography, Birkbeck College, Space group P63/m No. 176, “A Hypertext B. Crystallogr. Sp. Gr. Diagrams Tables.” (1999). <http://img.chem.ucl.ac.uk/sgp/large/176az1.htm> (accessed May 2, 2017).





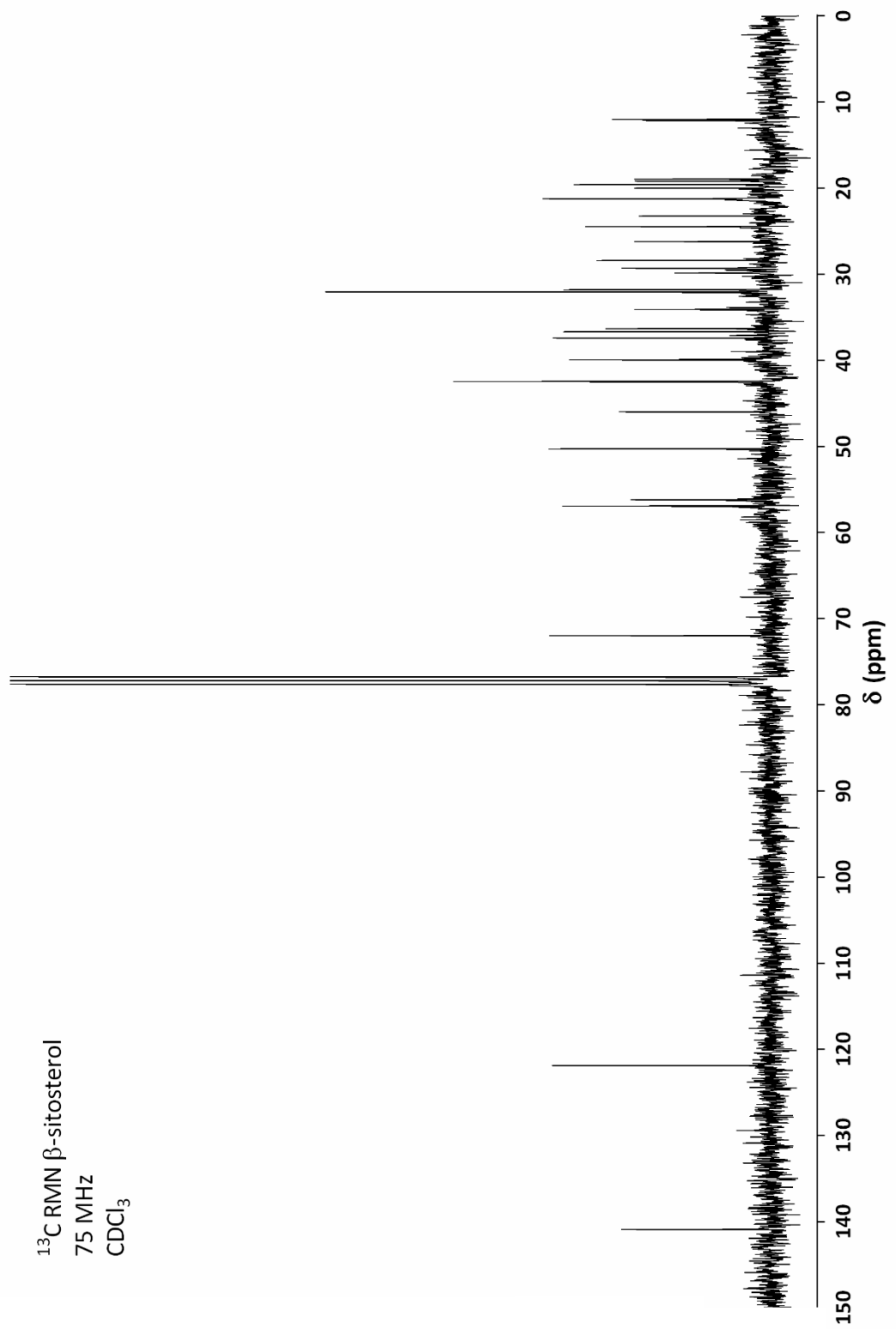
ANEXOS

Anexo 1. Espectro ^1H RMN 300 MHz del β -sitosterol.





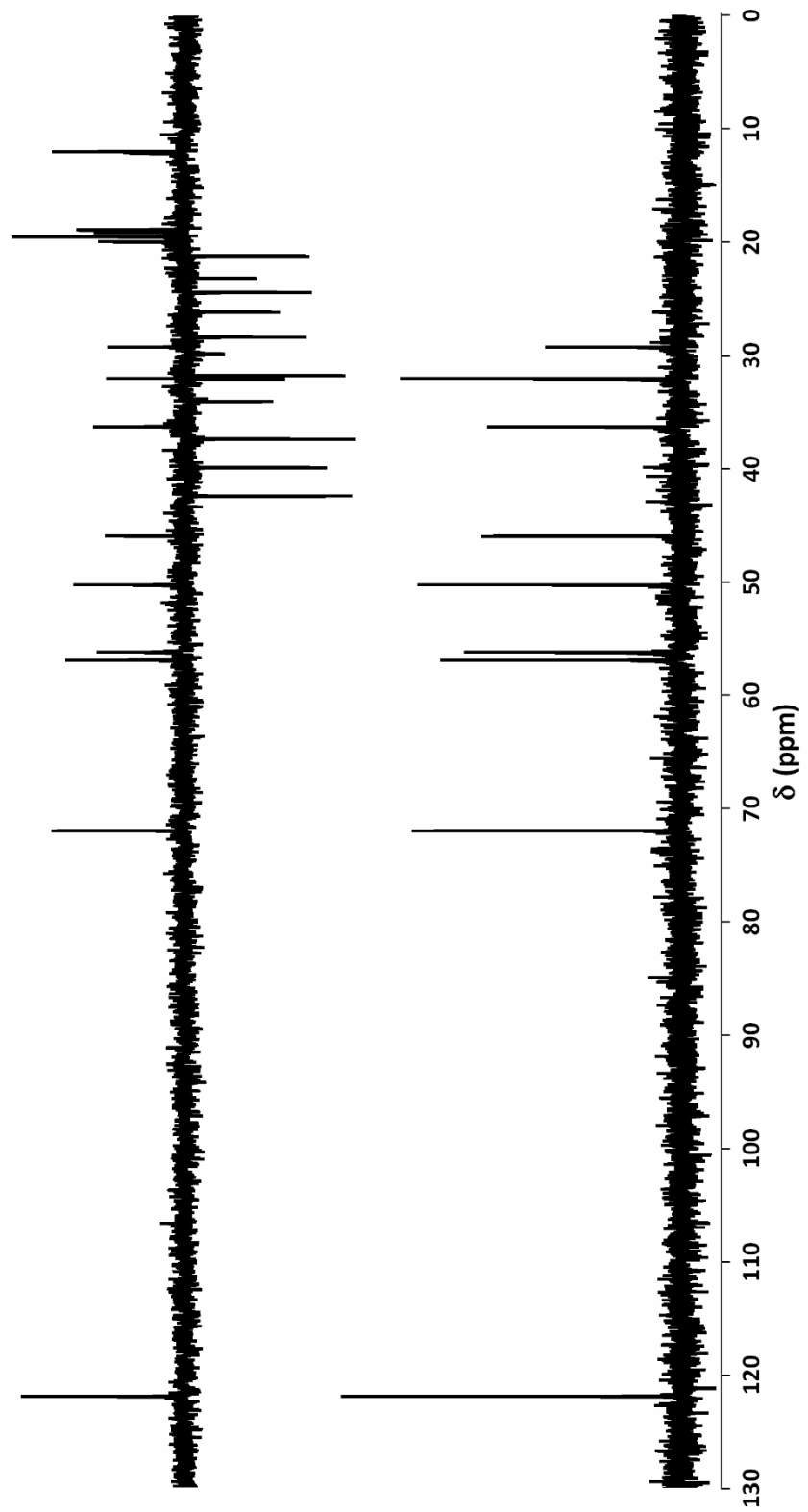
Anexo 2. Espectro ^{13}C RMN 100 MHz del β -sitosterol.





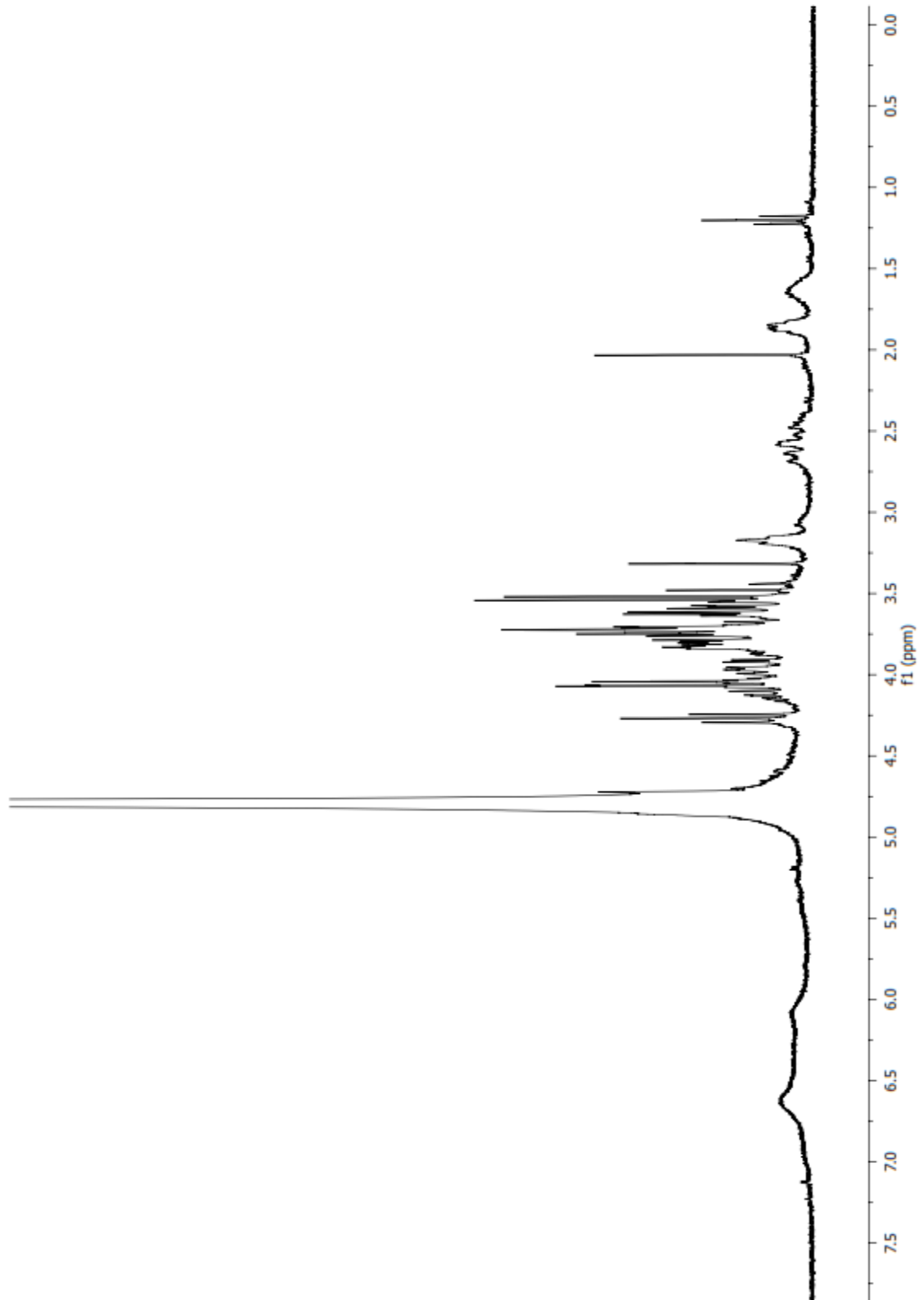
Anexo 3. Espectro DEPT del β -sitosterol.

RMN DEPT β -sitosterol
75 MHz
CDCl₃



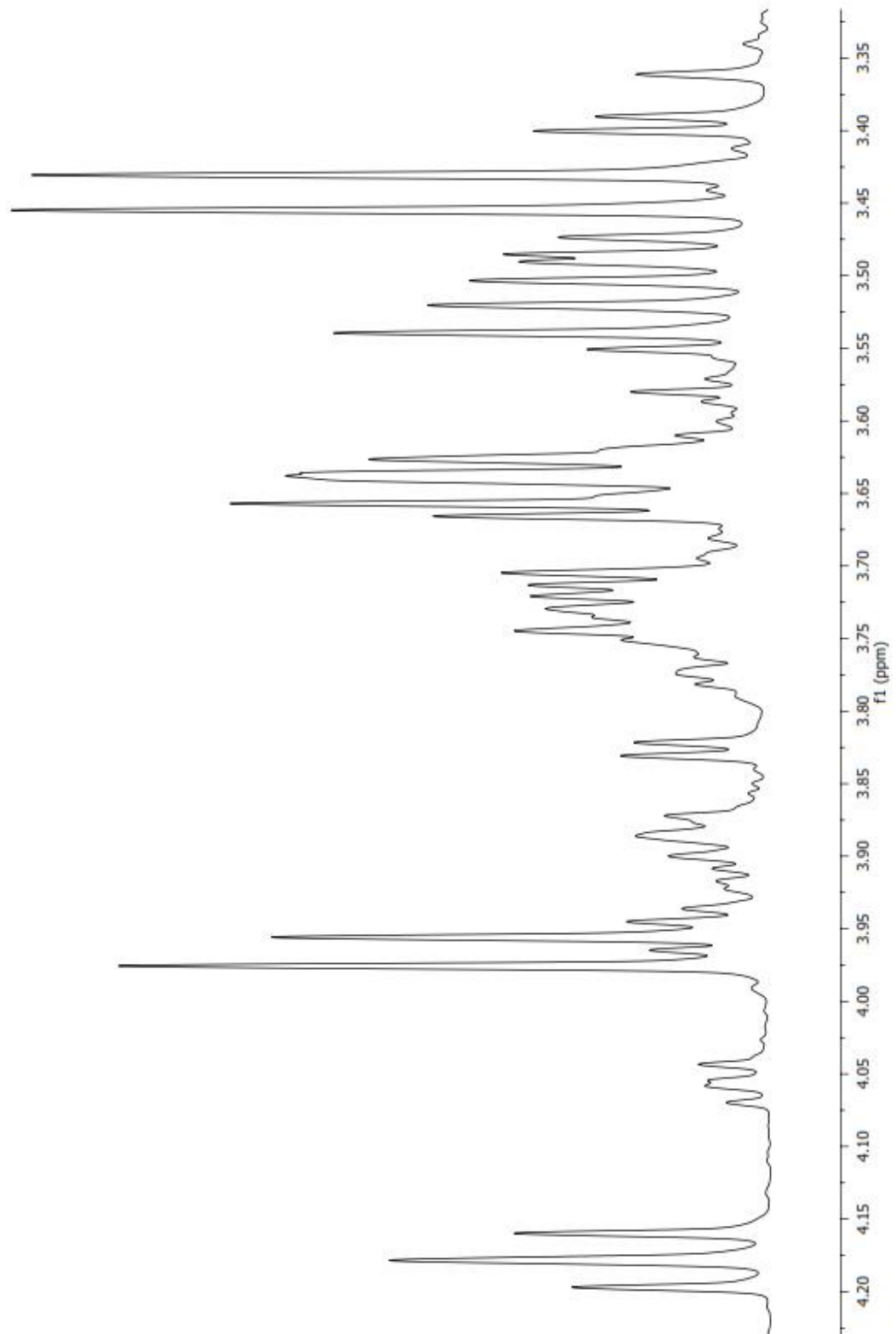


Anexo 4. Espectro ^1H RMN 400 MHz del extracto acuoso de *S. oxypetalum*.



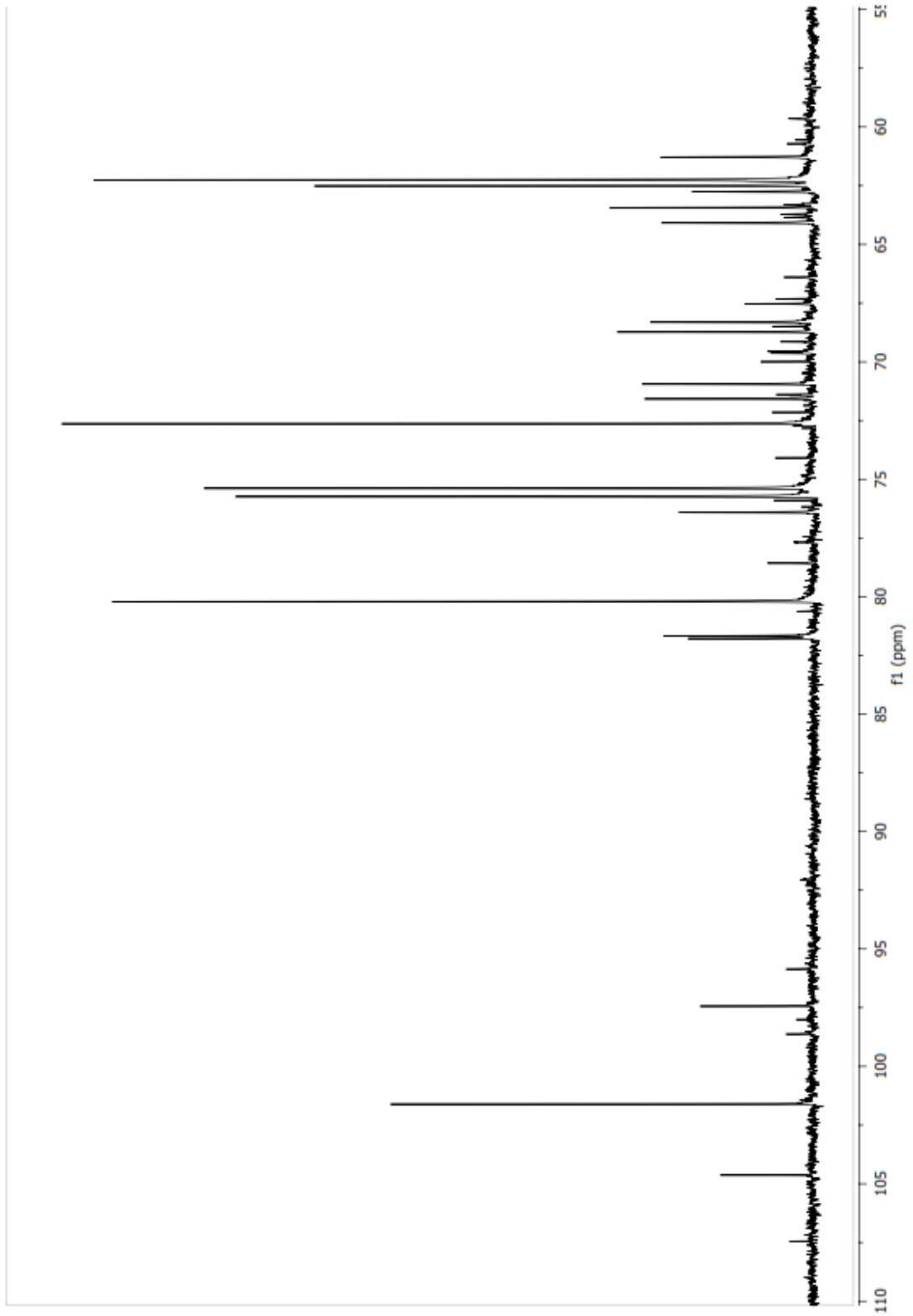


Anexo 5. Espectro ^1H RMN 400 MHz de la sedoheptulosa.



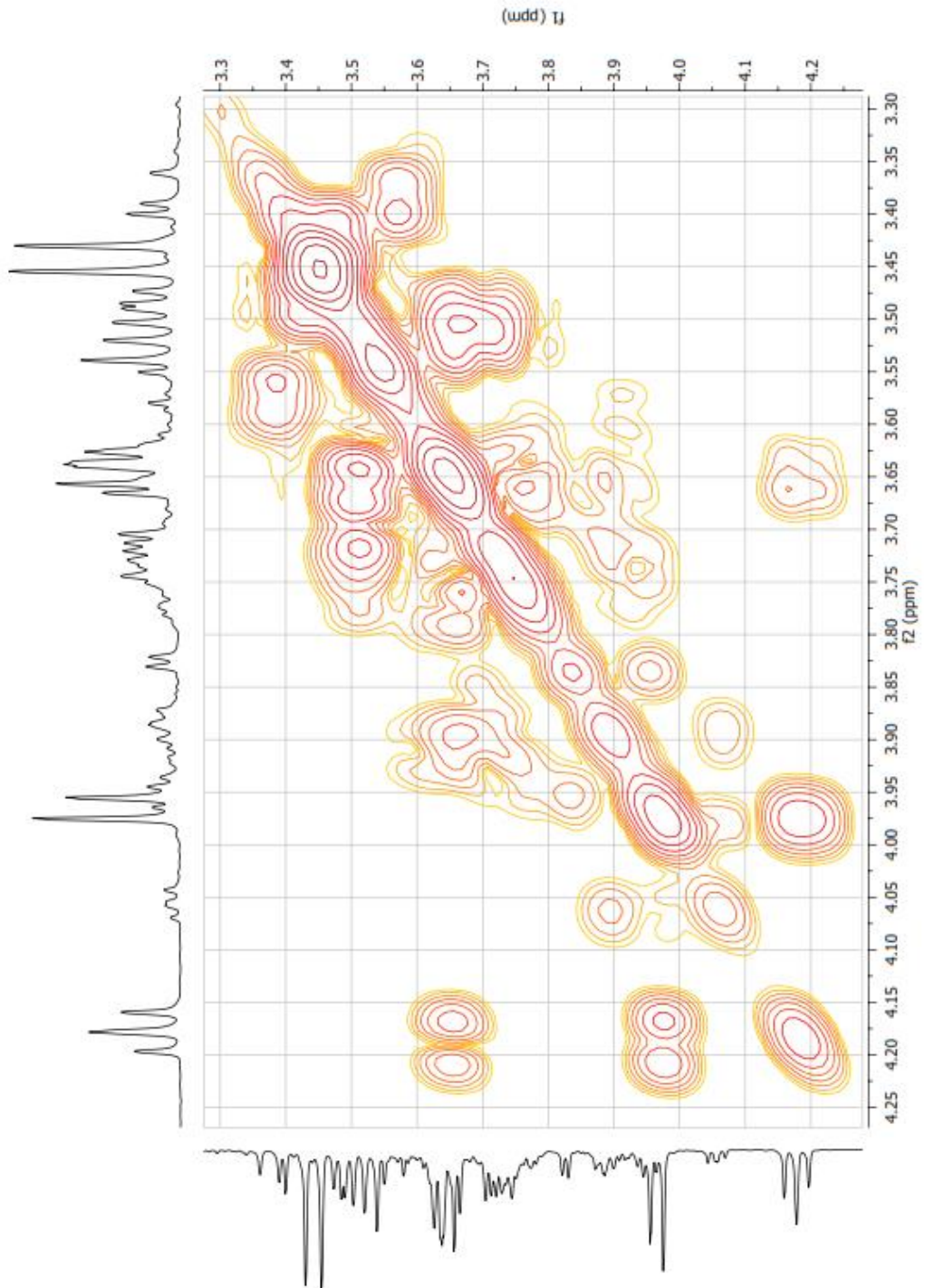


Anexo 6. Espectro ^{13}C RMN 100 MHz de la sedoheptulosa.



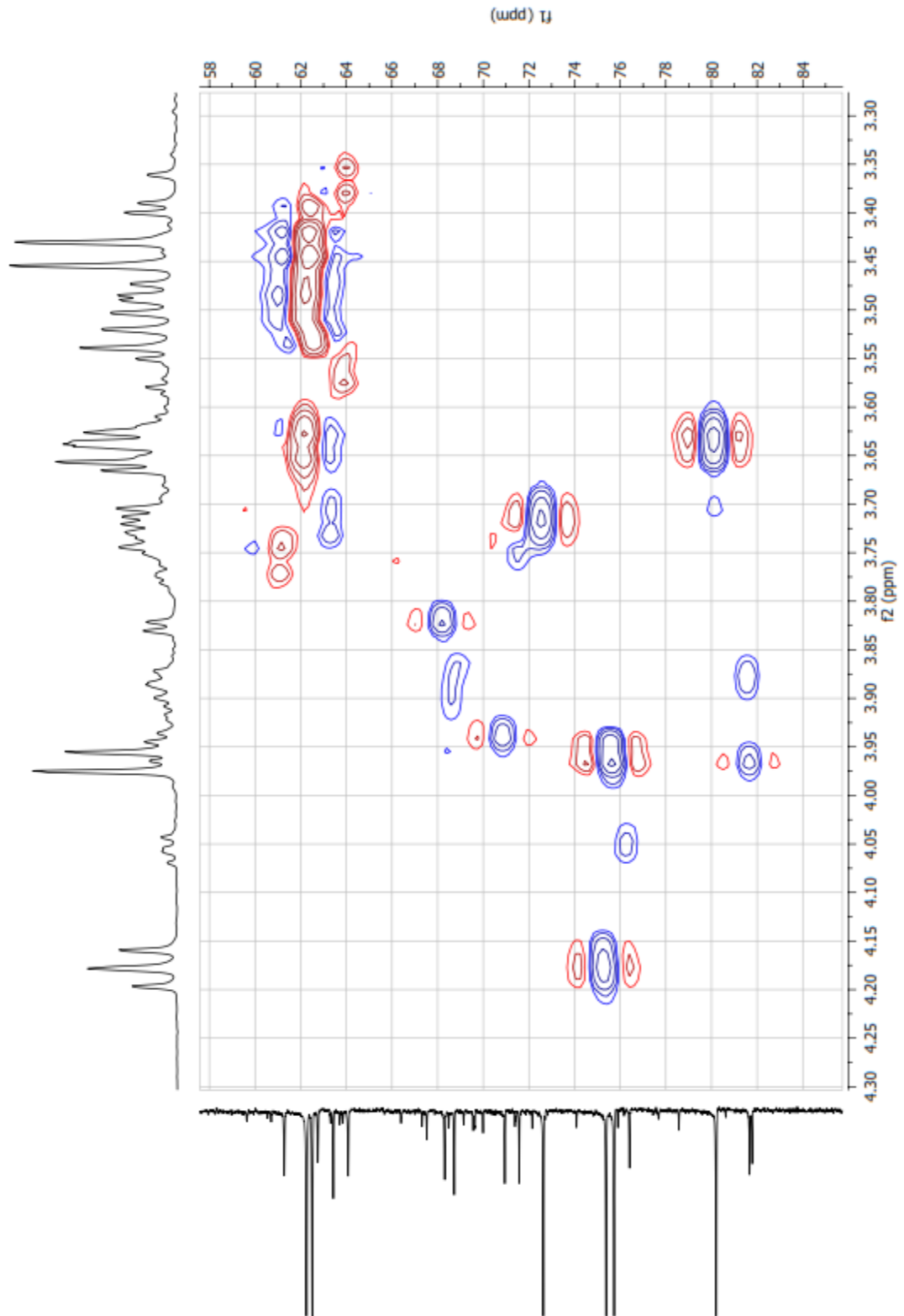


Anexo 7. Espectro ^1H COSY de la sedoheptulosa.



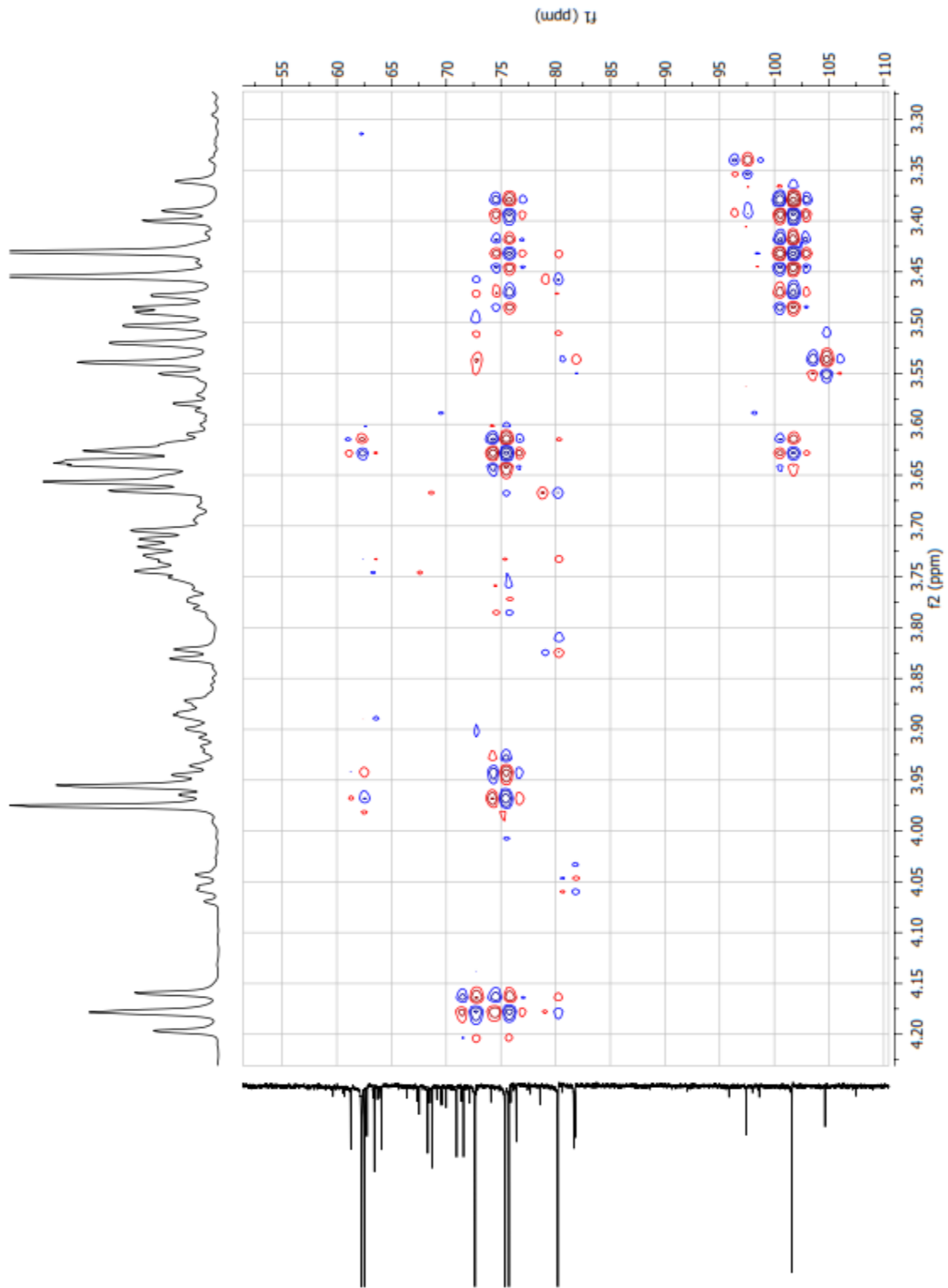


Anexo 8. Espectro HSQC de la sedoheptulosa.





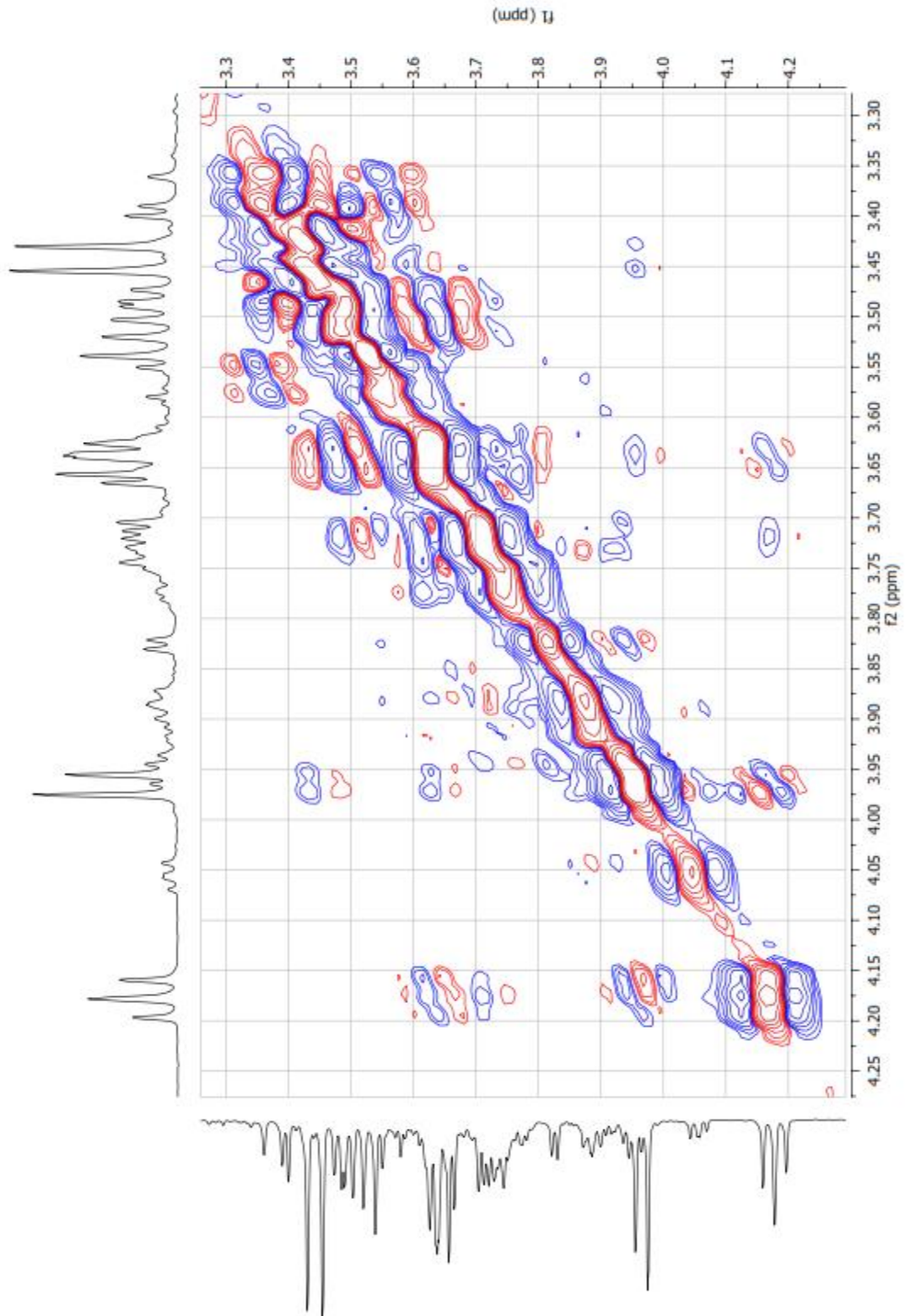
Anexo 9. Espectro HMBC de la sedoheptulosa.



Sedoheptulose



Anexo 10. Espectro NOESY de la sedoheptulosa.





Anexo 11. Información cristalográfica, distancias interatómicas, ángulos de enlace y los desplazamientos isotrópicos del CaCO₃ ortorrómbico (aragonita).

Fórmula química	CO ₃ ·Ca
Mr	99.11
Sistema cristalino	Ortorrómbico
Z	4
Tipo de radiación	Mo K α
m (mm ⁻¹)	1.50
Tamaño del cristal (mm)	0.58 × 0.23 × 0.23
Colección de datos	
Difractómetro	Xcalibur, Atlas, Gemini
Corrección de absorción	Analítico CrysAlis PRO, Agilent Technologies, Versión 1.171.35.19 (lanzamiento 27-10-2011 CrysAlis171 .NET) (colectado Oct 27 2011,15:02:11) Corrección analítica numérica de absorción usando un modelo de cristal multifacético basado en expresiones derivadas de R.C. Clark & J.S. Reid. (Clark, R. C. & Reid, J. S. (1995). Acta Cryst. A51, 887-897)
Tmin, Tmax	0.994, 0.997
Número de reflexiones independientes y observadas. [I > 2s(I)]	2762, 446, 405
Rint	0.021
(sin q/l)max (Å ⁻¹)	0.689
Refinamiento	
R[F ² > 2s(F ²)], wR(F ²), S	0.031, 0.106, 1.15
Número de reflexiones	446
Número de parámetros	28
Dp _{max} , Dp _{min} (e Å ⁻³)	0.89, -0.31

Coordenadas atómicas fraccionarias y parámetros de desplazamiento isotrópicos o equivalentes (shelx) (Å ²).				
	x	y	z	U _{iso} [*] /U _{eq}
Ca1	0.24512(9)	0.7500	0.58345(7)	0.0113(3)
C1	0.5898(4)	0.7500	0.2542(3)	0.0042(5)
O2	0.5898(2)	0.5480(3)	0.18587(16)	0.0156(4)
O1	0.5940(4)	0.7500	0.3923(2)	0.0153(5)





Parámetros de desplazamiento isotrópico (shelx) (Å ²).						
	U ¹¹	U ²²	U ³³	U ¹²	U ¹³	U ²³
Ca1	0.0129(4)	0.0106(4)	0.0103(4)	0.000	0.00045(19)	0.000
C1	0.0015(10)	0.0054(10)	0.0056(10)	0.000	0.0005(8)	0.000
O2	0.0193(8)	0.0114(7)	0.0161(8)	-0.0013(7)	-0.0015(6)	-0.0037(6)
O1	0.0179(11)	0.0181(11)	0.0098(10)	0.000	0.0019(8)	0.000
Parámetros geométricos (shelx) (Å, °).						
Ca1-O1	2.801(2)		C1-O2	1.254(2)		
Ca1-O2 ⁱ	2.8070(16)		C1-O2 ^{viii}	1.254(2)		
Ca1-O2 ⁱⁱ	2.8070(16)		C1-O1	1.260(3)		
Ca1-O2 ⁱⁱⁱ	2.8429(16)		C1-Ca1 ^{ix}	3.231(3)		
Ca1-O2 ^{iv}	2.8429(16)		C1-Ca1 ^{vii}	3.2449(15)		
Ca1-O2 ^v	2.8588(16)		C1-Ca1 ^{iv}	3.2449(15)		
Ca1-O2 ^{vi}	2.8588(16)		O2-Ca1 ^x	2.8070(16)		
Ca1-O1 ^{vii}	2.8862(9)		O2-Ca1 ^{iv}	2.8429(16)		
Ca1-O1 ^{iv}	2.8862(9)		O2-Ca1 ^{ix}	2.8588(16)		
Ca1-C1 ^v	3.231(3)		O1-Ca1 ^{vii}	2.8862(9)		
Ca1-C1 ^{vii}	3.2449(15)		O1-Ca1 ^{iv}	2.8862(9)		
Ca1-C1 ^{iv}	3.2449(15)					
O1-Ca1-O2 ⁱ	142.55(4)		O2 ⁱⁱ -Ca1-C1 ^{vi}	67.20(5)		
O1-Ca1-O2 ⁱⁱ	142.55(4)		O2 ⁱⁱⁱ -Ca1-C1 ^{vii}	22.56(5)		
O2 ⁱ -Ca1-O2 ⁱⁱ	69.79(7)		O2 ^{iv} -Ca1-C1 ^{vii}	90.84(5)		
O1-Ca1-O2 ⁱⁱⁱ	100.10(5)		O2 ^v -Ca1-C1 ^{vii}	144.84(5)		
O2 ⁱ -Ca1-O2 ⁱⁱⁱ	110.50(4)		O2 ^{vi} -Ca1-C1 ^{vii}	100.60(5)		
O2 ⁱⁱ -Ca1-O2 ⁱⁱⁱ	72.77(4)		O1 ^{vii} -Ca1-C1 ^{vii}	22.77(6)		
O1-Ca1-O2 ^{iv}	110.10(5)		O1 ^{iv} -Ca1-C1 ^{vii}	128.93(6)		
O2 ⁱ -Ca1-O2 ^{iv}	72.77(4)		C1 ^v -Ca1-C1 ^{vii}	122.12(5)		
O2 ⁱⁱ -Ca1-O2 ^{iv}	110.50(4)		O1-Ca1-C1 ^{vi}	91.95(5)		
O2 ⁱⁱⁱ -Ca1-O2 ^{iv}	68.79(7)		O2 ⁱ -Ca1-C1 ^{iv}	67.20(5)		
O1-Ca1-O2 ^v	74.46(5)		O2 ⁱⁱ -Ca1-C1 ^{iv}	124.24(6)		
O2 ⁱ -Ca1-O2 ^v	79.19(5)		O2 ⁱⁱⁱ -Ca1-C1 ^{iv}	90.84(5)		
O2 ⁱⁱ -Ca1-O2 ^v	104.36(4)		O2 ^{iv} -Ca1-C1 ^{iv}	22.56(5)		
O2 ⁱⁱⁱ -Ca1-O2 ^v	167.34(7)		O2 ^v -Ca1-C1 ^{iv}	100.67(5)		
O2 ^{iv} -Ca1-O2 ^v	123.057(16)		O2 ^{vi} -Ca1-C1 ^{iv}	144.84(5)		
O1-Ca1-O2 ^{vi}	74.46(5)		O1 ^{vii} -Ca1-C1 ^{iv}	128.93(6)		
O2 ⁱ -Ca1-O2 ^{vi}	104.36(4)		O1 ^{iv} -Ca1-C1 ^{iv}	22.67(6)		
O2 ⁱⁱ -Ca1-O2 ^{vi}	79.19(5)		C1 ^v -Ca1-C1 ^{iv}	122.12(5)		
O2 ⁱⁱⁱ -Ca1-O2 ^{vi}	123.057(15)		C1 ^{vii} -Ca1-C1 ^{iv}	112.28(8)		
O2 ^{iv} -Ca1-O2 ^{vi}	167.34(7)		O2-C1-O2 ^{viii}	120.4(3)		
O2 ^v -Ca1-O2 ^{vi}	44.77(7)		O2-C1-O1	119.78(13)		
O1-Ca1-O1 ^{vii}	76.92(5)		O2 ^{viii} -C1-O1	119.78(13)		





O2 ⁱ -Ca1-O1 ^{vii}	140.44(6)	O2-C1-Ca1 ^{ix}	61.73(13)
O2 ⁱⁱ -Ca1-O1 ^{vii}	72.71(5)	O2 ^{viii} -C1-Ca1 ^{ix}	61.73(13)
O2 ⁱⁱⁱ -Ca1-O1 ^{vii}	44.62(5)	O1-C1-Ca1 ^{ix}	161.22(19)
O2 ^{iv} -Ca1-O1 ^{vii}	110.06(6)	O2-C1-Ca1 ^{vii}	161.33(17)
O2 ^v -Ca1-O1 ^{vii}	122.74(6)	O2 ^{viii} -C1-Ca1 ^{vii}	60.40(10)
O2 ^{vii} -Ca1-O1 ^{vii}	80.20(5)	O1-C1-Ca1 ^{vii}	62.42(6)
O1-Ca1-O1 ^{iv}	76.92(5)	Ca1 ^{ix} -C1-Ca1 ^{vii}	109.79(5)
O2 ⁱ -Ca1-O1 ^{iv}	72.71(5)	O2-C1-Ca1 ^{iv}	60.40(10)
O2 ⁱⁱ -Ca1-O1 ^{iv}	140.44(6)	O2 ^{viii} -C1-Ca1 ^{iv}	161.34(17)
O2 ⁱⁱⁱ -Ca1-O1 ^{iv}	110.06(6)	O1-C1-Ca1 ^{iv}	62.42(6)
O2 ^{iv} -Ca1-O1 ^{iv}	44.62(5)	Ca1 ^{ix} -C1-Ca1 ^{iv}	109.79(5)
O2 ^v -Ca1-O1 ^{iv}	80.20(5)	Ca1 ^{vii} -C1-Ca1 ^{iv}	112.28(8)
O2 ^{vi} -Ca1-O1 ^{iv}	122.74(6)	C1-O2-Ca1 ^x	131.44(14)
O1 ^{vii} -Ca1-O1 ^{iv}	138.00(9)	C1-O2-Ca1 ^{iv}	97.04(13)
O1-Ca1-C1 ^v	69.07(7)	Ca1 ^x -O2-Ca1 ^{iv}	101.34(5)
O2 ⁱ -Ca1-C1 ^v	95.22(5)	C1-O2-Ca1 ^{ix}	95.54(13)
O2 ⁱⁱ -Ca1-C1 ^v	95.22(5)	Ca1 ^x -O2-Ca1 ^{ix}	100.81(5)
O2 ⁱⁱⁱ -Ca1-C1 ^v	144.67(3)	Ca1 ^{iv} -O2-Ca1 ^{ix}	136.62(6)
O2 ^{iv} -Ca1-C1 ^v	144.67(3)	C1-O1-Ca1	127.30(18)
O2 ^v -Ca1-C1 ^v	22.73(3)	C1-O1-Ca1 ^{vii}	94.82(7)
O2 ^{vi} -Ca1-C1 ^v	22.73(3)	Ca1-O1-Ca1 ^{vii}	103.08(5)
O1 ^{vii} -Ca1-C1 ^v	100.30(5)	C1-O1-Ca1 ^{iv}	94.82(7)
O1 ^{iv} -Ca1-C1 ^v	100.30(5)	Ca1-O1-Ca1 ^{iv}	103.08(5)
O1-Ca1-C1 ^{vii}	91.95(5)	Ca1 ^{vii} -O1-Ca1 ^{iv}	138.00(9)
O2 ⁱ -Ca1-C1 ^{vii}	124.24(6)		
Códigos de simetría: (i)-x+1/2, -y+1, z+1/2; (ii) -x+1/2, y+1/2, z+1/2; (iii) -x+1, y+1/2, -z+1; (iv) -x+1, -y+1, -z+1; (v) x-1/2, y, -z+1/2; (vi) x-1/2, -y+3/2, -z+1/2; (vii) -x+1, -y+2, -z+1; (viii) x, -y+3/2, z; (ix) x+1/2, y, -z+1/2; (x) -x+1/2, -y+1, z-1/2.			





Anexo 12. Información cristalográfica, posiciones y distancias interatómicas, ángulos de enlace y figuras del refinamiento de la estructura cristalina de la singenita.

Etiquetas de átomos	Sitos de Wyckoff	x	y	z
K	4f	0.3268(1)	0.0069(1)	0.1904(1)
Ca	2e	0.9693(1)	0.25	0.3415(1)
S(1)	2e	0.9970(2)	0.25	0.8528(2)
S(2)	2e	0.6235(1)	0.25	0.2755(2)
O(1)	2e	0.1437(3)	0.25	0.0199(5)
O(2)	2e	0.5407(2)	0.25	0.0541(4)
O(3)	2e	0.5456(3)	0.25	0.4706(4)
O(4)	4f	0.7219(2)	0.0924(2)	0.2756(3)
O(5)	2e	0.8683(3)	0.25	0.9170(5)
O(6)	4f	0.993(2)	0.0887(2)	0.6990(3)
Ow	2e	0.2313(3)	0.25	0.4912(4)

Distancias interatómicas y ángulos de enlace.

Átomo 1	Átomo 2	Distancia 1-2 (Å)	Átomo 3	Distancia 1-3 (Å)	Ángulo 2-1-3 (°)
K	O(1)	2.5344(2)	O(5)	2.6121(2)	88.208(2)
	O(1)	2.5344(2)	O(3)	2.8532(2)	152.776(3)
	O(1)	2.5344(2)	Ow	2.8788(2)	63.775(1)
	O(1)	2.5344(2)	O(2)	2.8890(2)	124.767(3)
	O(1)	2.5344(2)	O(4)	2.9344(2)	79.367(4)
	O(1)	2.5344(2)	O(3)	2.9755(2)	100.876(3)
	O(1)	2.5344(2)	O(2)	2.9975(2)	87.638(3)
	O(5)	2.6121(2)	O(3)	2.8532(2)	84.608(2)
	O(5)	2.6121(2)	Ow	2.8788(2)	104.783(2)
	O(5)	2.6121(2)	O(2)	2.8890(2)	79.392(2)
	O(5)	2.6121(2)	O(4)	2.9344(2)	69.041(4)
	O(5)	2.6121(2)	O(3)	2.9755(2)	159.477(3)
	O(5)	2.6121(2)	O(2)	2.9975(2)	148.044(3)
	O(3)	2.8532(2)	Ow	2.8788(2)	92.774(2)
	O(3)	2.8532(2)	O(2)	2.8890(2)	79.597(2)
	O(3)	2.8532(2)	O(4)	2.9344(2)	121.722(4)
	O(3)	2.8532(2)	O(3)	2.9755(2)	78.929(2)
	O(3)	2.8532(2)	O(2)	2.9975(2)	111.820(2)
	Ow	2.8788(2)	O(2)	2.8890(2)	171.020(3)
	Ow	2.8788(2)	O(4)	2.9344(2)	142.982(4)
	Ow	2.8788(2)	O(3)	2.9755(2)	64.255(2)
	Ow	2.8788(2)	O(2)	2.9975(2)	101.664(2)
	O(2)	2.8890(2)	O(4)	2.9344(2)	45.849(3)
	O(2)	2.8890(2)	O(3)	2.9755(2)	109.214(2)





	O(2)	2.8890(2)	O(2)	2.9975(2)	77.133(2)
	O(4)	2.9344(2)	O(3)	2.9755(2)	130.476(4)
	O(4)	2.9344(2)	O(2)	2.9975(2)	79.052(4)
	O(3)	2.9755(2)	O(2)	2.9975(2)	51.690(1)
Ca	O(6)	2.4589(1)	O(6)	2.4589(1)	156.691(5)
	O(6)	2.4589(1)	O(6)	2.4810(2)	124.252(5)
	O(6)	2.4589(1)	O(6)	2.4810(2)	69.962(5)
	O(6)	2.4589(1)	Ow	2.5116(2)	82.707(4)
	O(6)	2.4589(1)	O(5)	2.6087(3)	85.622(4)
	O(6)	2.4589(1)	O(4)	2.6116(2)	73.765(5)
	O(6)	2.4589(1)	O(4)	2.6116(2)	124.116(5)
	O(6)	2.4589(1)	O(1)	2.9448(4)	78.600(4)
	O(6)	2.4589(1)	O(6)	2.4810(2)	69.962(5)
	O(6)	2.4589(1)	O(6)	2.4810(2)	124.252(5)
	O(6)	2.4589(1)	Ow	2.5116(2)	82.707(4)
	O(6)	2.4589(1)	O(5)	2.6087(3)	85.622(4)
	O(6)	2.4589(1)	O(4)	2.6116(2)	124.116(5)
	O(6)	2.4589(1)	O(4)	2.6116(2)	73.765(5)
	O(6)	2.4589(1)	O(1)	2.9448(4)	78.600(4)
	O(6)	2.4810(2)	O(6)	2.4810(2)	55.068(6)
	O(6)	2.4810(2)	Ow	2.5116(2)	78.365(4)
	O(6)	2.4810(2)	O(5)	2.6087(3)	148.601(4)
	O(6)	2.4810(2)	O(4)	2.6116(2)	102.795(6)
	O(6)	2.4810(2)	O(4)	2.6116(2)	79.908(6)
	O(6)	2.4810(2)	O(1)	2.9448(4)	132.668(4)
	O(6)	2.4810(2)	Ow	2.5116(2)	78.365(4)
	O(6)	2.4810(2)	O(5)	2.6087(3)	148.601(4)
	O(6)	2.4810(2)	O(4)	2.6116(2)	79.908(6)
	O(6)	2.4810(2)	O(4)	2.6116(2)	102.795(6)
	O(6)	2.4810(2)	O(1)	2.9448(4)	132.668(4)
	Ow	2.5116(2)	O(5)	2.6087(3)	118.868(1)
	Ow	2.5116(2)	O(4)	2.6116(2)	152.271(4)
	Ow	2.5116(2)	O(4)	2.6116(2)	152.271(4)
	Ow	2.5116(2)	O(1)	2.9448(4)	62.992(1)
	O(5)	2.6087(3)	O(4)	2.6116(2)	74.350(4)
	O(5)	2.6087(3)	O(4)	2.6116(2)	74.350(4)
	O(5)	2.6087(3)	O(1)	2.9448(4)	55.876(9)
	O(4)	2.6116(2)	O(4)	2.6116(2)	50.817(7)
	O(4)	2.6116(2)	O(1)	2.9448(4)	124.215(4)
	O(4)	2.6116(2)	O(1)	2.9448(4)	124.215(4)
S(1)	O(5)	1.4143(4)	O(6)	1.4937(2)	107.385(7)
	O(5)	1.4143(4)	O(6)	1.4937(2)	107.385(7)



	O(5)	1.4143(4)	O(1)	1.5611(3)	123.251(2)
	O(6)	1.4937(2)	O(6)	1.4937(2)	100.318(9)
	O(6)	1.4937(2)	O(1)	1.5611(3)	108.066(7)
	O(6)	1.4937(2)	O(1)	1.5611(3)	108.066(7)
S(2)	O(2)	1.4298(2)	O(4)	1.4784(2)	102.529(7)
	O(2)	1.4298(2)	O(4)	1.4784(2)	102.529(7)
	O(2)	1.4298(2)	O(3)	1.5928(3)	118.871(1)
	O(4)	1.4784(2)	O(4)	1.4784(2)	98.573(9)
	O(4)	1.4784(2)	O(3)	1.5928(3)	115.718(8)
	O(4)	1.4784(2)	O(3)	1.5928(3)	115.718(8)
O(1)	S(1)	1.5611(3)	O(6)	2.4727(3)	35.049(4)
	S(1)	1.5611(3)	O(6)	2.4727(3)	35.049(4)
	S(1)	1.5611(3)	K	2.5344(2)	136.592(2)
	S(1)	1.5611(3)	K	2.5344(2)	136.592(2)
	S(1)	1.5611(3)	O(5)	2.6188(4)	26.848(1)
	S(1)	1.5611(3)	Ow	2.8745(4)	133.518(1)
	S(1)	1.5611(3)	Ca	2.9448(4)	82.398(1)
	O(6)	2.4727(3)	O(6)	2.4727(3)	55.267(6)
	O(6)	2.4727(3)	K	2.5344(2)	104.470(4)
	O(6)	2.4727(3)	K	2.5344(2)	151.948(4)
	O(6)	2.4727(3)	O(5)	2.6188(4)	54.726(4)
	O(6)	2.4727(3)	Ow	2.8745(4)	144.025(4)
	O(6)	2.4727(3)	Ca	2.9448(4)	103.142(4)
	O(6)	2.4727(3)	K	2.5344(2)	151.948(4)
	O(6)	2.4727(3)	K	2.5344(2)	104.470(4)
	O(6)	2.4727(3)	O(5)	2.6188(4)	54.726(4)
	O(6)	2.4727(3)	Ow	2.8745(4)	144.025(4)
	O(6)	2.4727(3)	Ca	2.9448(4)	103.142(4)
	K	2.5344(2)	K	2.5344(2)	86.001(2)
	K	2.5344(2)	O(5)	2.6188(4)	133.332(2)
	K	2.5344(2)	Ow	2.8745(4)	63.952(1)
	K	2.5344(2)	Ca	2.9448(4)	100.348(2)
	K	2.5344(2)	O(5)	2.6188(4)	133.332(2)
	K	2.5344(2)	Ow	2.8745(4)	63.952(1)
	K	2.5344(2)	Ca	2.9448(4)	100.348(2)
	O(5)	2.6188(4)	Ow	2.8745(4)	106.670(1)
	O(5)	2.6188(4)	Ca	2.9448(4)	55.550(9)
	Ow	2.8745(4)	Ca	2.9448(4)	51.120(8)
O(2)	S(2)	1.4298(2)	O(4)	2.2687(2)	39.503(5)
	S(2)	1.4298(2)	O(4)	2.2687(2)	39.503(5)
	S(2)	1.4298(2)	O(3)	2.6039(4)	32.389(1)
	S(2)	1.4298(2)	K	2.8890(2)	107.117(1)



	S(2)	1.4298(2)	K	2.8890(2)	107.117(1)
	S(2)	1.4298(2)	K	2.9975(2)	89.650(1)
	S(2)	1.4298(2)	K	2.9975(2)	89.650(1)
	O(4)	2.2687(2)	O(4)	2.2687(2)	59.198(7)
	O(4)	2.2687(2)	O(3)	2.6039(4)	64.097(5)
	O(4)	2.2687(2)	K	2.8890(2)	68.132(5)
	O(4)	2.2687(2)	K	2.8890(2)	104.603(4)
	O(4)	2.2687(2)	K	2.9975(2)	127.415(5)
	O(4)	2.2687(2)	K	2.9975(2)	92.175(5)
	O(4)	2.2687(2)	O(3)	2.6039(4)	64.097(5)
	O(4)	2.2687(2)	K	2.8890(2)	104.603(4)
	O(4)	2.2687(2)	K	2.8890(2)	68.132(5)
	O(4)	2.2687(2)	K	2.9975(2)	92.175(5)
	O(4)	2.2687(2)	K	2.9975(2)	127.415(5)
	O(3)	2.6039(4)	K	2.8890(2)	129.229(1)
	O(3)	2.6039(4)	K	2.8890(2)	129.229(1)
	O(3)	2.6039(4)	K	2.9975(2)	63.719(1)
	O(3)	2.6039(4)	K	2.9975(2)	63.719(1)
	K	2.8890(2)	K	2.8890(2)	78.436(2)
	K	2.8890(2)	K	2.9975(2)	162.155(2)
	K	2.8890(2)	K	2.9975(2)	102.867(2)
	K	2.8890(2)	K	2.9975(2)	102.867(2)
	K	2.8890(2)	K	2.9975(2)	162.155(2)
	K	2.9975(2)	K	2.9975(2)	70.430(2)
O(3)	S(2)	1.5928(3)	O(4)	2.6012(3)	30.80(4)
	S(2)	1.5928(3)	O(4)	2.6012(3)	30.80(4)
	S(2)	1.5928(3)	O(2)	2.6039(4)	28.741(9)
	S(2)	1.5928(3)	K	2.8532(2)	111.629(1)
	S(2)	1.5928(3)	K	2.8532(2)	111.629(1)
	S(2)	1.5928(3)	K	2.9755(2)	87.501(1)
	S(2)	1.5928(3)	K	2.9755(2)	87.501(1)
	O(4)	2.6012(3)	O(4)	2.6012(3)	51.036(6)
	O(4)	2.6012(3)	O(2)	2.6039(4)	51.680(4)
	O(4)	2.6012(3)	K	2.8532(2)	81.620(4)
	O(4)	2.6012(3)	K	2.8532(2)	113.944(4)
	O(4)	2.6012(3)	K	2.9755(2)	115.961(4)
	O(4)	2.6012(3)	K	2.9755(2)	86.402(4)
	O(4)	2.6012(3)	O(2)	2.6039(4)	51.680(4)
	O(4)	2.6012(3)	K	2.8532(2)	113.944(4)
	O(4)	2.6012(3)	K	2.8532(2)	81.620(4)
	O(4)	2.6012(3)	K	2.9755(2)	86.402(4)
	O(4)	2.6012(3)	K	2.9755(2)	115.961(4)



	O(2)	2.6039(4)	K	2.8532(2)	130.337(1)
	O(2)	2.6039(4)	K	2.8532(2)	130.337(1)
	O(2)	2.6039(4)	K	2.9755(2)	64.592(1)
	O(2)	2.6039(4)	K	2.9755(2)	64.592(1)
	K	2.8532(2)	K	2.8532(2)	79.611(2)
	K	2.8532(2)	K	2.9755(2)	159.359(2)
	K	2.8532(2)	K	2.9755(2)	101.070(2)
	K	2.8532(2)	K	2.9755(2)	101.070(2)
	K	2.8532(2)	K	2.9755(2)	159.359(2)
	K	2.9755(2)	K	2.9755(2)	71.030(2)
O(4)	S(2)	1.4784(2)	O(4)	2.2411(2)	40.713(6)
	S(2)	1.4784(2)	O(2)	2.2687(2)	37.968(4)
	S(2)	1.4784(2)	O(3)	2.6012(3)	33.482(4)
	S(2)	1.4784(2)	Ca	2.6116(2)	104.799(1)
	S(2)	1.4784(2)	Ow	2.8206(2)	132.724(9)
	S(2)	1.4784(2)	K	2.9344(2)	103.503(9)
	O(4)	2.2411(2)	O(2)	2.2687(2)	60.401(6)
	O(4)	2.2411(2)	O(3)	2.6012(3)	64.482(7)
	O(4)	2.2411(2)	Ca	2.6116(2)	64.591(7)
	O(4)	2.2411(2)	Ow	2.8206(2)	149.669(8)
	O(4)	2.2411(2)	K	2.9344(2)	103.923(8)
	O(2)	2.2687(2)	O(3)	2.6012(3)	64.222(5)
	O(2)	2.2687(2)	Ca	2.6116(2)	116.363(9)
	O(2)	2.2687(2)	Ow	2.8206(2)	138.523(7)
	O(2)	2.2687(2)	K	2.9344(2)	66.019(5)
	O(3)	2.6012(3)	Ca	2.6116(2)	115.963(8)
	O(3)	2.6012(3)	Ow	2.8206(2)	99.817(5)
	O(3)	2.6012(3)	K	2.9344(2)	127.366(7)
	Ca	2.6116(2)	Ow	2.8206(2)	105.079(5)
	Ca	2.6116(2)	K	2.9344(2)	100.466(6)
	Ow	2.8206(2)	K	2.9344(2)	106.060(7)
O(5)	S(1)	1.4143(4)	O(6)	2.3438(3)	37.457(4)
	S(1)	1.4143(4)	O(6)	2.3438(3)	37.457(4)
	S(1)	1.4143(4)	Ca	2.6087(3)	98.475(1)
	S(1)	1.4143(4)	K	2.6121(2)	125.040(2)
	S(1)	1.4143(4)	K	2.6121(2)	125.040(2)
	S(1)	1.4143(4)	O(1)	2.6188(4)	29.902(1)
	O(6)	2.3438(3)	O(6)	2.3438(3)	58.592(7)
	O(6)	2.3438(3)	Ca	2.6087(3)	118.307(5)
	O(6)	2.3438(3)	K	2.6121(2)	130.101(5)
	O(6)	2.3438(3)	K	2.6121(2)	87.695(4)
	O(6)	2.3438(3)	O(1)	2.6188(4)	59.463(4)



	O(6)	2.3438(3)	Ca	2.6087(3)	118.307(5)
	O(6)	2.3438(3)	K	2.6121(2)	87.695(4)
	O(6)	2.3438(3)	K	2.6121(2)	130.101(5)
	O(6)	2.3438(3)	O(1)	2.6188(4)	59.463(4)
	Ca	2.6087(3)	K	2.6121(2)	109.669(1)
	Ca	2.6087(3)	K	2.6121(2)	109.669(1)
	Ca	2.6087(3)	O(1)	2.6188(4)	68.573(1)
	K	2.6121(2)	K	2.6121(2)	88.741(2)
	K	2.6121(2)	O(1)	2.6188(4)	135.235(2)
	K	2.6121(2)	O(1)	2.6188(4)	135.235(2)
O(6)	S(1)	1.4937(2)	O(6)	2.2938(2)	39.841(6)
	S(1)	1.4937(2)	O(5)	2.3438(3)	35.158(4)
	S(1)	1.4937(2)	Ca	2.4589(1)	146.908(1)
	S(1)	1.4937(2)	O(1)	2.4727(3)	36.885(4)
	S(1)	1.4937(2)	Ca	2.4810(2)	102.241(1)
	S(1)	1.4937(2)	O(6)	2.8321(3)	155.943(1)
	O(6)	2.2938(2)	O(5)	2.3438(3)	60.704(6)
	O(6)	2.2938(2)	Ca	2.4589(1)	168.345(9)
	O(6)	2.2938(2)	O(1)	2.4727(3)	62.367(6)
	O(6)	2.2938(2)	Ca	2.4810(2)	62.466(6)
	O(6)	2.2938(2)	O(6)	2.8321(3)	116.447(9)
	O(5)	2.3438(3)	Ca	2.4589(1)	130.717(7)
	O(5)	2.3438(3)	O(1)	2.4727(3)	65.811(5)
	O(5)	2.3438(3)	Ca	2.4810(2)	110.759(8)
	O(5)	2.3438(3)	O(6)	2.8321(3)	151.265(9)
	Ca	2.4589(1)	O(1)	2.4727(3)	117.610(7)
	Ca	2.4589(1)	Ca	2.4810(2)	110.038(6)
	Ca	2.4589(1)	O(6)	2.8321(3)	55.384(5)
	O(1)	2.4727(3)	Ca	2.4810(2)	115.423(8)
	O(1)	2.4727(3)	O(6)	2.8321(3)	141.120(8)
	Ca	2.4810(2)	O(6)	2.8321(3)	54.654(5)
Ow	Ca	2.5116(2)	O(4)	2.8206(2)	102.544(4)
	Ca	2.5116(2)	O(4)	2.8206(2)	102.544(4)
	Ca	2.5116(2)	O(1)	2.8745(4)	65.889(1)
	Ca	2.5116(2)	K	2.8788(2)	102.708(2)
	Ca	2.5116(2)	K	2.8788(2)	102.708(2)
	O(4)	2.8206(2)	O(4)	2.8206(2)	119.339(4)
	O(4)	2.8206(2)	O(1)	2.8745(4)	120.321(3)
	O(4)	2.8206(2)	K	2.8788(2)	77.555(4)
	O(4)	2.8206(2)	K	2.8788(2)	145.182(3)
	O(4)	2.8206(2)	O(1)	2.8745(4)	120.321(3)
	O(4)	2.8206(2)	K	2.8788(2)	145.182(3)





	O(4)	2.8206(2)	K	2.8788(2)	77.555(4)
	O(1)	2.8745(4)	K	2.8788(2)	52.273(1)
	O(1)	2.8745(4)	K	2.8788(2)	52.273(1)
	K	2.8788(2)	K	2.8788(2)	73.799(2)

Figura de tamaño

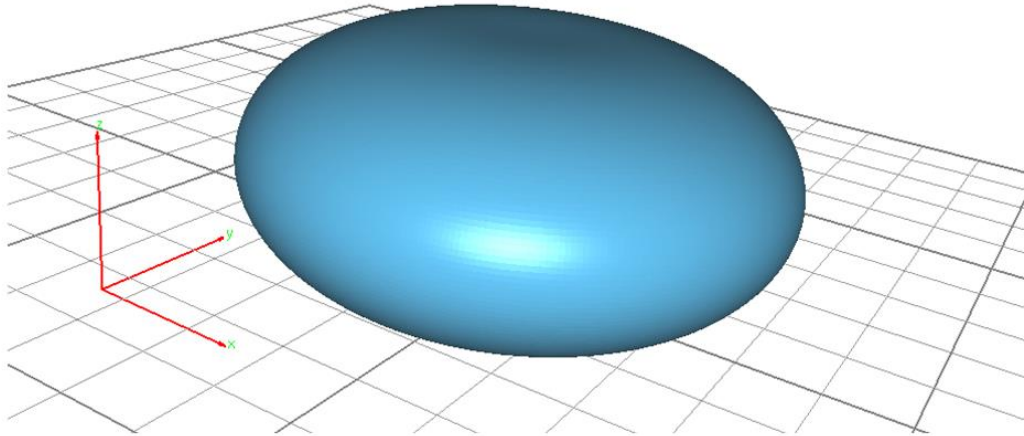


Figura de microdeformación

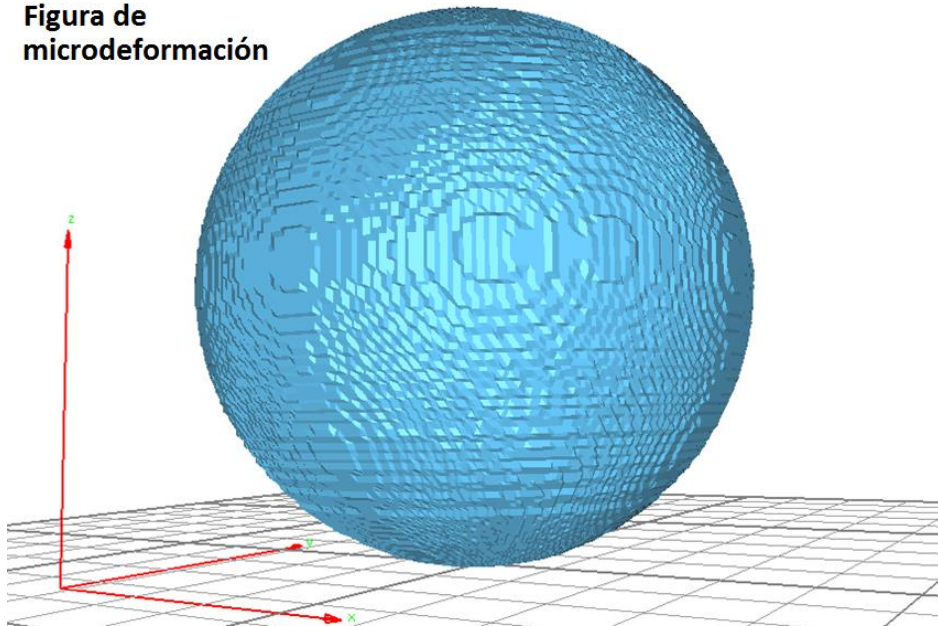
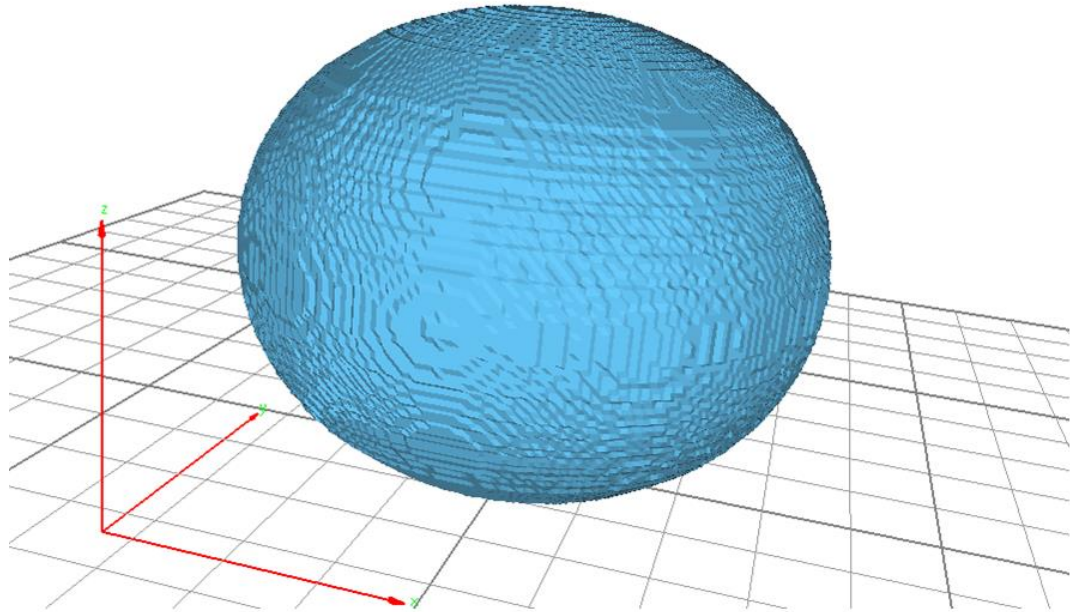




Figura de orientación preferencial





Anexo 13. Producción científica internacional indizada

El presente trabajo fue publicado en la revista internacional *Journal of Ethnopharmacology*, de la editorial Elsevier.

- ✦ Gonzalo R. Lara-Issasi, Nitzine E. Ocampo, Lia Hoz-Rodriguez, Rodrigo Correa-Prado, Alberto Cedillo-Cruz, Higinio Arzate, Maria I. Aguilar. Aqueous extract of *Sedum oxypetalum* induces mineralization and osteogenic differentiation by human Periodontal Ligament-Derived cells. *Journal of Ethnopharmacology* **225** (2018) 159–168.
doi.org/10.1016/j.jep.2018.07.005

El siguiente artículo está en producción.

- ✦ Analysis of the natural-occurring mixture of Sedoheptulose conformers by selective 1D-TOCSY and other NMR experiments.





Aqueous extract of *Sedum oxypetalum* induces mineralization and osteogenic differentiation by human Periodontal Ligament-Derived cells



Gonzalo R. Lara-Issasi^a, Nitzine E. Ocampo^b, Lia Hoz-Rodríguez^c, Rodrigo Correa-Prado^c, Alberto Cedillo-Cruz^a, Higinio Arzate^c, Maria I. Aguilar^{a,*}

^a Laboratorio 111, Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

^b Laboratorio Nacional de Ciencias para la Investigación y la Conservación del Patrimonio Cultural. Instituto de Física, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

^c Laboratorio de Biología Periodontal, Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Sedum oxypetalum
Mineralization
Differentiation
Sedoheptulose
Syngenite

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: The medicinal plant *Sedum oxypetalum* Kunth (Crassulaceae), locally known as *Jiote* or in general *Siempreviva* (always alive) has been traditionally used by people of the Mexican community of Tenango del Valle as a home remedy to treat periodontal diseases, inducing teeth strengthening. Consequently, the aim of this work was to investigate its capacity directed to mineralized tissues regeneration.

Materials and methods: The aerial parts of the plant were processed and its aqueous extract (AE) was chemically characterized. The AE and its components sedoheptulose and syngenite were tested for either osteogenic differentiation or mineral-nucleation induction respectively.

Results: The AE and one of its components (sedoheptulose) were shown to promote the proliferation and/or osteogenic differentiation by Human Periodontal Ligament-Derived Cells (hPDLs), while inducing the mineralization process. The AE also promoted the nucleation of octacalcium phosphate and its component syngenite, the hydroxyapatite crystals formation *in vitro*.

Conclusion: The findings reported herein support the traditional use of *S. oxypetalum* due to its potential capacity to promote the regeneration of mineralized tissues.

1. Introduction

Medicinal plants and its derived natural products have been used worldwide for drug discovery and as effective means for the treatment of human diseases (Newman and Cragg, 2016). For example, recent studies have shown that plant-derived bioactive compounds can be effective in treating diseases such as stomatitis and periodontal disease (Kala et al., 2015; Trivedi and Dixit, 2015). Periodontitis refers to a number of inflammatory diseases affecting the periodontium -that is the loosening and subsequent loss of teeth due to deterioration of the tissues that surround and support these structures (Walchuck, 2010). There are relatively few studies directed to analyze the specific osteogenic differentiation by periodontal ligament cells and mineralization induced by natural products or plant extracts (Rodrigues-Rezende-Costa et al., 2016). Moreover, the therapeutic alternatives for the treatment of periodontitis and the regeneration of the periodontal structures in a

predictable manner, remains a challenge. Additionally, the regeneration of the periodontium requires the recruitment of local progenitor cells capable of differentiating into periodontal ligament cells, cementoblasts, and osteoblasts (Pejcic et al., 2013). The Mexican traditional medicine is known to be one of the richest in the world, where a range of plants and commercially available preparations are traditionally used to treat oral complaints (Waizel-Bucay and Martínez-Rico, 2011). The medicinal plant *Sedum oxypetalum* Kunth (Crassulaceae), grows in lava fields in the Basin of Mexico (Martínez-Villegas et al., 2012). The species is used to treat mouth inflammation since pre-Columbian times, as it is displayed in the plate 38 of the *De la Cruz-Badianus* manuscript (De la Cruz and Badiano, 1996) with the indigenous name of *texiyotl*; such plate was then identified as *Sedum oxypetalum* by Emmart in 1940 due to its red inflorescences (Clausen, 1959). Recently, it has been reported that this plant is used to treat burns, skin infections, mouth infections, and eye problems (Navarro-García et al., 2003)

* Correspondence to: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, Departamento de Farmacia, Laboratorio 111, Coyoacán, Ciudad de México Código Postal. 04510, Mexico.

E-mail addresses: laraissasi@gmail.com (G.R. Lara-Issasi), nitocampo@gmail.com (N.E. Ocampo), lahry09@gmail.com (L. Hoz-Rodríguez), c.d.rodrigoocorrea@hotmail.com (R. Correa-Prado), albertocedillo_cruz@hotmail.com (A. Cedillo-Cruz), harzate@unam.mx (H. Arzate), laurents@unam.mx (M.I. Aguilar).

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.07.005>

Received 11 November 2017; Received in revised form 2 July 2018; Accepted 3 July 2018

Available online 07 July 2018

0378-8741/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

and particularly, it is used by people of the community of Tenango del Valle in Mexico to induce teeth strengthening by chewing its soft branches (thereabouts 5 g once a day) to extrude the juice on the gingiva. The aim of this work was to investigate the capacity of the aqueous extract toward mineralized tissues regeneration. Firstly, the aqueous extract of the plant was chemically characterized, then, the extract and its component sedoheptulose were tested and shown to promote the proliferation and the specific differentiation by Human Periodontal Ligament-Derived Cells (hPDLs) as well as the mineralization process in a specific osteogenic medium-independent manner (Alizarin red stain, specific alkaline phosphatase and rtPCR detection of RNA markers, OCN, BSP, CBFA1 and OSTERIX). AE also promoted the *in vitro* nucleation of octacalcium phosphate and its component syngenite induced the formation of hydroxyapatite crystals. The relevance of the traditional use of *S. oxypetalum* is supported by the present findings and its potential use for the regeneration of mineralized tissues.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

The aerial parts of *S. oxypetalum* Kunth, were collected in Cerro Tetepetl of Tenango del Valle, Mexico in the geographic coordinates 19°05'56.09" N, 99°35'45.19" W, with an altitude of 2669 m.a.s.l. The species were botanically classified in the Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México and a *voucher* specimen (SO-1–2016) was kept for future reference.

2.2. Biodiversity rights

This research was performed strictly based in the procedures provided by the UN Nagoya Protocol (United Nations, 2011), which was signed and ratified by the Mexican Government on October 12th, 2012, as well as the local Official Mexican laws NOM-059-SEMARNAT-(2010) (SEMARNAT, 2010) and the Código para la Biodiversidad del Estado de México (LV-Legislatura, 2008), so that, its sustainable use would be protected by this legal framework for the fair and equitable participation in the benefits that derive from it.

2.3. Chemicals and laboratory materials

All reagents, stationary phases, solvents and culture media used for this study were of analytic grade. Sedoheptulose was isolated from the aqueous extract, purified by conventional techniques and characterized by NMR. Syngenite was isolated from the aqueous extract and characterized by refinement of its crystalline structure through powder XRD. The deuterated solvents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA).

2.4. Chemical analysis

2.4.1. Obtaining of the plant extracts

5.5 kg of the aerial parts of *S. oxypetalum* were processed in a stainless-steel juice extractor to obtain 3.5 L of the natural juice of the plant, which was later clarified by centrifugation. 500 mL were kept as a control sample for future analysis. The rest of the juice was concentrated in a rotary evaporator until a final 20% of humidity remained. This aqueous extract (AE) was kept at 4 °C.

The total concentration of solids in the aqueous extract was determined by loss on drying method. Several samples of different volumes were dried in an oven until constant weight and the experiments were done by triplicate.

The solid residue of the processed aerial parts was air-dried in order to measure the total percent of water until 550 g remained. The total percent of water in the aerial parts was calculated as 90%.

2.4.2. Plant-ash general analysis

The aerial parts of *S. oxypetalum* (208 g) were dried on an electric oven until 56 g of dried matter remained. The dried matter was then pre-calcinated and later calcinated at 650 °C for 6 h. A sample of the ashes was analyzed by SEM-EDS microanalysis to discard the presence of toxic metals in the plant.

2.4.3. Fractionation and characterization of the AE

The aqueous extract (AE) was fractionated by particle size exclusion chromatography with Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) as stationary phase and isocratic methanol as mobile phase to yield one main component identified as sedoheptulose by NMR techniques (¹H, ¹³C, ¹H-COSY, HSQC, HMBC and NOESY). Another sample of the AE was submitted to partitioning with chloroform and such fraction was later concentrated at low pressure with a rotary evaporator in order to detect volatile components through GC-MS as a complementary chemical profile of the species extract for future reference. Analyses by GC-MS were carried out in an Agilent 6890 N series gas chromatograph (Agilent Technology, Palo Alto, CA, USA) coupled with a LECO time of flight mass spectrometer (MS-TOF, Leco Corporation, St. Joseph, MI, USA). NMR analyses were performed by using a Varian Unity Inova series 400-S spectrometer.

The concentrations of metallic cationic species in the AE were determined by Microwave Plasma-Atomic Emission Spectrometry in a MP-AES 4200 Agilent Spectrometer. A complementary study using Scanning Electron Microscopy (SEM) with EDS microanalysis was performed to identify non-metallic species of the AE.

Calcium carbonate single crystal X-ray diffraction data was collected on an Xcalibur Atlas Gemini diffractometer at 130 K, equipped with a Mo K α radiation type. The crystallographic information, molecular structure, isotropic displacements, bond lengths, and angles are shown in the [Supplementary Material section](#).

Powder X-ray diffraction data of syngenite was collected on a Bruker Advance D8 and operating in Bragg-Bretano geometry equipped with a D8 Linxeye detector. The diffraction pattern was obtained in 2 θ -scan mode in the 3–80° 2 θ angular range using CuK α radiation (40 kV and 30 mA). The crystallographic structure refinement of the AE-derived syngenite was performed by Rietveld Method applying Topas Academic 4.1 software. Peak shape was fitted using a pseudo-Voigt function (Finger et al., 1994), the background was shifted with a 19-term Chebyshev polynomial of the first kind. Miscellaneous data of the refinement, the experimental, calculated, and difference diffraction pattern; bond lengths and angles, and refinement figures are shown in the [Supplementary Material section](#).

2.5. Cell culture

Human Periodontal Ligament-Derived Cells (hPDLs) were obtained according to the protocols approved by the Internal Review Board of the Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México, the cells were derived through the conventional explant technique and were characterized as previously described (Alvarez-Perez et al., 2005; Arzate et al., 2005). The cells were cultured in 75-cm² cell culture flasks containing Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, and antibiotics (100 μ g/mL streptomycin and 100 U/mL penicillin, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). Cells between the second and seventh passages were used.

2.6. Cell proliferation and cytotoxicity

The effects of the aqueous extract (AE) and sedoheptulose (derived from the AE) on proliferation of hPDLs were evaluated by the colorimetric MTT (tetrazolium) [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA). The MTT analysis depends on the reduction of this tetrazolium salt by the mitochondrial succinate: ubiquinone oxidoreductase of

viable cells to form a blue formazan product. hPDLs were plated at 1×10^4 density in a 100- μ L volume in 96-well plates (Costar, Cambridge, MA, USA). Cells were treated for 96 h with increasing concentrations of the AE and sedoheptulose (0.05, 0.5 and 5 μ g/mL) and replacing the medium on daily basis. After these preliminary tests, the concentration of 5 μ g/mL resulted to be the optimal for the experiments in both samples as proliferation activity was observed. Control cultures were treated with vehicle (2 or 10% fetal bovine serum for negative and positive references respectively). At the end of the treatment intervals, 10 μ L of MTT solution (5 mg/mL) in phosphate-buffered saline were added to the wells and incubated at 37 °C for 4 h. After the MTT incubation, 100 μ L lysing buffer (20% sodium dodecyl sulfate, 50% dimethyl formamide pH 4.7) were added to each well and incubated overnight at 37 °C. The resultant solution was analyzed in a microplate reader (FilterMax F5, Molecular Devices, San Jose, CA, USA), at 570 nm. The optical density is proportional to the number of living cells present in the culture. Experiments were performed in triplicate and repeated at least twice.

2.7. Alkaline phosphatase specific activity

Human Periodontal Ligament-Derived cells were plated at 2×10^4 cells per well in 24-well culture plates and cultured for 5, 10 and 15 days. Cells were treated with either the aqueous extract (AE) or sedoheptulose (derived from the AE), at 5 μ g/mL concentration in 10% Fetal Bovine Serum (FBS). Alkaline phosphatase specific activity (ALP) was determined by using the Lowry method (Carmona-Rodríguez et al., 2007). The activity was expressed as nanomoles of *p*-nitrophenol per minute per milligram of protein. Protein content was determined using Bovine Serum Albumin (BSA) as standard (Carmona-Rodríguez et al., 2007). Experiments were performed by triplicate and repeated at least twice.

2.8. Detection and quantification of mineralization

Human Periodontal Ligament-Derived cells (5×10^4 cells) were plated in 6-well plates (Costar) and incubated with either 10% FBS in DMEM (negative control) or mineralization media (MM) [10% FBS in DMEM containing 10 nM dexamethasone (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA), 50 μ g/mL ascorbic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA) and 10 mM glycerophosphate Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA)] (positive control) or with 10% FBS in DMEM media plus 5 μ g/mL of either the AE or sedoheptulose (samples) for 5, 10 and 15 days. Culture media was replaced every other day and cells were fixed with 70% ethanol and air-dried at indicated times. Cultures were tested for calcium precipitation by staining with 2% Alizarin Red S (Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee, WI, USA) for 10 min. To quantify the calcium deposits staining intensity, the cetylpyridinium chloride (CPC) method was used. Briefly, after staining with Alizarin Red S, CPC (10%, w/v, in distilled water) was added to each dish (2 mL per dish) and incubated for 1 h at 37 °C. After incubation, the transparent CPC solution turned into purple and it was diluted by five times in CPC solution (10% w/v) and transferred to a 96-well plate (100 μ L/well) for absorbance reading (FilterMax F5, Molecular Devices, San Jose, CA, USA) at 570 nm. Experiments were performed in triplicate and repeated twice.

2.9. Real time Polymerase Chain Reaction (rt-PCR)

This assay was performed as previously described (Sowmya et al., 2015). Total RNA was isolated from Human Periodontal Ligament-Derived cells, plated at 5×10^4 in six/well plates, treated with AE and sedoheptulose and cultured for 5 and 10 days. The primer sequences were as follows: Osteocalcin (OCN) forward 5'-GTTGCAGGGTCAATC CATT-3' and reverse 3'-CCATCTCATACTGCACCT-5', Core-Binding Factor α 1 (CBFA1) forward 5'-ACCCAGAAGGCACAGACAAG-3' and reverse 3'-AGGAATCGCCCTAAATCACT-5', Bone Sialoprotein (BSP)

forward 5'-AACGAAGAAAGCGAAGCAGAA-3' and reverse 3'-TCTGCC TCTGTGCTGTTGGT-5' Osteoblast-Specific Transcription Factor (OSTERIX) forward 5'-GCCAGAAGCTGTGAAACCTC-3' and reverse 3'-GCTGCAAGCTCTCCATAACC-5'. A 25- μ L reaction was set up with the following PCR conditions: (cDNA synthesis) 50 °C for 3 min, denaturation at 95 °C for 5 min followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s, 60 °C for 30 s, and finally 40 °C, 1 min. Amplifications were performed in a Corbett Rotor-Gene 6000 (Qiagen, Valencia, CA, USA). All experiments were performed in triplicate and expression levels of the above-mentioned molecules were obtained using delta-delta ct method normalizing for GAPDH. All experiments were performed in triplicate. Data were analyzed using ABI SDS v2.4 software (Applied Biosystems).

2.10. In vitro nucleation assays

In vitro nucleation assays were developed using a slow and controlled chemical reaction between calcium and phosphate ions in a previously described metasilicate gel system (Montoya et al., 2014). In brief, different concentrations of the AE, sedoheptulose, and syngenite (0.5, 1 and 5 μ g/mL) were incorporated into previous gelation-state. Gels were maintained at 37 °C for 7 days. Bovine serum albumin was used as a negative control. The morphology and mineral phase were determined by microscopy analyses (Lin et al., 2014) and Raman Spectroscopy. SEM micrographs were obtained with a JEOL JSM-5900LV microscope. EDS microanalyses were performed at 20–25 kV acceleration voltage and at 20–25 Pa of pressure in the specimen chamber (Oxford Aztek). HR-TEM micrographs were acquired by using a JEOL 2010–200 kV High Resolution Transmission Electron Microscope with an accelerating voltage of 200 kV and resolution of 0.19 nm. For digital image processing, the Digital Micrograph (DM) software from GATAN (Gatan USA) was used. Raman spectra were recorded with a DXR Thermo Scientific MicroRaman in the range from 1400 to 200 cm^{-1} using 532 nm wavelength (excitation) laser 10 mV. All experiments were performed twice.

2.11. Statistical analysis

Results are expressed as the mean values S.E.M. (standard error of mean). Cell proliferation was evaluated with Two-way ANOVA using Newman-Keuls post-hoc test with time and experimental conditions as independent variables, $p < 0.05$ was considered statistically significant. For ALP specific activity and RT-qPCR, T Tests were done to compare experimental and control groups, $p < 0.05$ was considered statistically significant. For CPC assay the statistical evaluation was carried out by One-way ANOVA with Tukey post-hoc test with experimental condition as the independent variable. When comparing with control groups, values were considered significant as follows: $P^* < 0.05$, $P^{**} < 0.01$, $P^{***} < 0.001$ and $P^{****} < 0.0001$. Graphs were drawn and statistical analysis was carried out using Graphpad Prism version 6.1 for windows (GraphPad software. San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. Characterization of the plant extracts

The element analysis of the aerial parts of *S. oxypetalum* showed the presence of C, O, K and Ca as major components; Mg, P, S, and Cl as minor components and trace quantities of Na, Al, Si and Fe. Furthermore, the concentration of solids in the aqueous extract was determined by loss on drying as 51.84 ± 0.81 mg/mL. Considering the average dosage of the plant that is traditionally recommended (5 g per day), the approximate juice volume available on the gingiva was calculated as 4.5 mL from which 233.3 mg are solids. Detailed ash analysis is available in the [Supplementary Material section](#).

The AE submitted to partitioning with chloroform and analyzed by

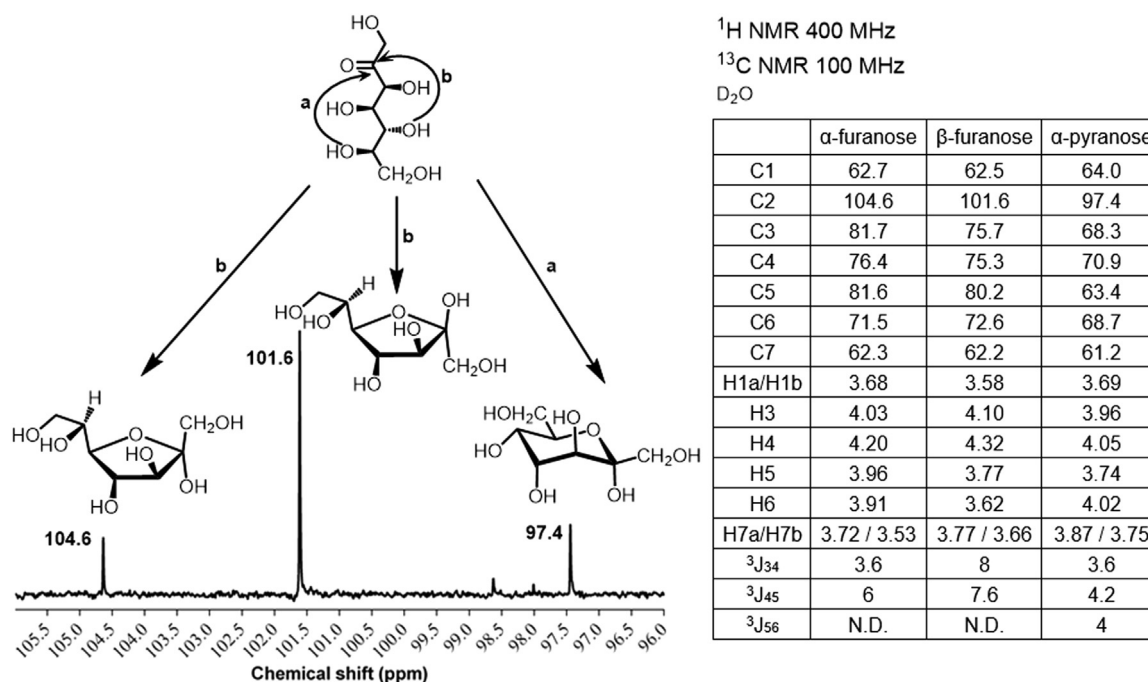


Fig. 1. Chemical structures and chemical shift assignments for the sedoheptulose in D₂O in NMR.

GC-MS showed five volatile components identified as: 1,2,2,6,8-pentamethyl-7-oxabicyclo[4.3.1]dec-8-en-10-one, 2-phenylethanol, 2-(4-hydroxyphenyl)ethanol, 4-(4-hydroxyphenyl)butan-2-one, (R)-4-(3-hydroxybutyl)phenol. The chemical structures and relative quantities are displayed in the [Supplementary Material section](#).

By means of chromatographic fractionation of the AE, it was possible to isolate and identify sedoheptulose, whose structure was confirmed by comparing it with previous literature reports (Ceusters et al., 2013). The chemical structures of the three conformers, the ¹³C NMR anomeric region, the chemical shifts and their assignments are represented in Fig. 1. All spectra are available in the [Supplementary Material section](#).

From another fraction, a crystalline product was isolated and identified as calcium carbonate (CaCO₃) with orthorhombic crystalline structure (Aragonite). The crystallographic refinement data is shown in the [Supplementary Material section](#).

From the AE, an inorganic product was precipitated impromptu along hours and it was identified through infrared and Raman spectroscopy, X-ray Fluorescence, and Powder X-ray Diffraction as syngenite K₂Ca(SO₄)₂·H₂O. The XRF analysis showed the presence of Ca, K, and S as major components (Fig. 2A). The infrared and Raman spectra (Fig. 2B) presented the characteristic signals for syngenite, in infrared at 537, 598, 643, and 656 cm⁻¹ whom corresponded to SO₄⁻² group asymmetric bending; 1088, 1122 and 1196 cm⁻¹ corresponded to S-O asymmetric stretching, and 3223 cm⁻¹ to OH stretching. Additionally, the Raman spectrum showed the characteristic signals at: 473 cm⁻¹ which corresponds to the ν₂ split; 630 cm⁻¹ for the ν₃ split; 983 and 1006 cm⁻¹ corresponded to the ν₁ split of the SO₄⁻² group (Klopprogge et al., 2002). The Raman spectrum was processed with the Origin 8.5 software for the baseline correction.

The IR signals at 1601 and Raman at 1614 and 747 cm⁻¹ were attributed to the residual carbohydrates; such impurity was later identified as sedoheptulose. IR signal at 1601 and Raman at 1614 cm⁻¹ were assigned to the ketal group, and Raman signal at 747 cm⁻¹ to the ring stretching. The sample of syngenite was submitted to calcination (650 °C 6 h) in order to eliminate sedoheptulose and confirm the presence of the sulfate group, the stacked spectra showed that many signals disappeared and others suffered displacements due to the syngenite thermal decomposition; nevertheless, the S-O stretching and SO₄⁻²

bending signals remained present in the IR spectrum.

The AE was analyzed with Microwave Plasma-Atomic Emission Spectrometry (MP-AES) for the quantification of metallic cations and a concentrated solid sample was submitted to SEM-EDS mapping micro-analysis for the semi-quantitative measurement of other elements. The SEM-EDS results showed that the main elements in the AE of *S. oxypetalum* are carbon and oxygen (58.07% and 30.54%), followed by potassium and chlorine (6.87% and 3.24%), and magnesium, phosphorus, sulfur and aluminum (0.41%, 0.29%, 0.22% and 0.22% respectively). Moreover, the concentration of metallic cations in the AE was measured through MP-AES analysis as follows: potassium 79.88, calcium 45.68, magnesium 28.95, sodium 28.04, manganese 0.54, and aluminum 0.15 μg/mL. The detailed results are displayed in the [Supplementary Material section](#).

3.2. The AE of *S. oxypetalum* induce cell proliferation, differentiation and mineralization

The effects of the aqueous extract (AE) and sedoheptulose (derived from the AE) on the proliferation of hPDLs were evaluated (Fig. 3A). Our results show that both the AE and sedoheptulose promote the proliferation of hPDLs at a concentration of 5 μg/mL. Importantly, both samples presented a higher activity than the fetal bovine serum at 2% during 96 h of culture. Moreover, sedoheptulose increased significantly the specific activity of the alkaline phosphatase in hPDLs at 5 days (p < 0.05) but failed to do so at 10 or 15 days (Fig. 3B). This could suggest the initial participation of sedoheptulose in the process of differentiation. Nevertheless, the AE significantly increased such activity at the three times of the measurements (p < 0.01), suggesting that the AE promotes and maintains the differentiation towards a mineralization phenotype (Fig. 3C). Additionally, the calcium deposits measurement revealed that at 5 days of treatment there is no difference in the mineralization process between positive control (MM) and the experimental conditions, at 10 days there is still no statistical differences between MM and experimental conditions (AE or sedoheptulose). However, at 15 days of treatment the AE showed significant difference with sedoheptulose (p < 0.05). Nevertheless, experimental AE and sedoheptulose showed similar mineral content to the positive control (MM). Negative control values were statistically different to the rest of

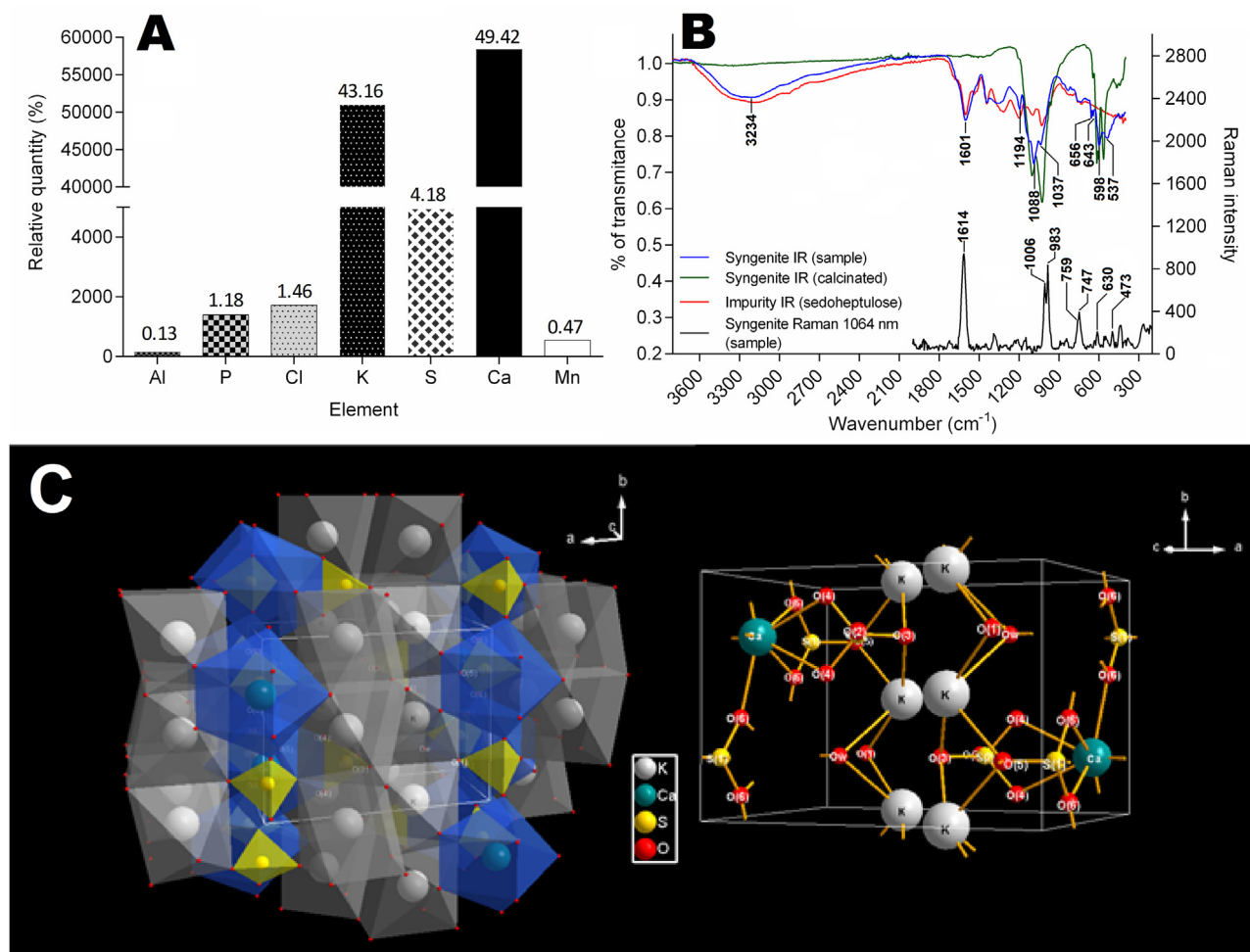


Fig. 2. Characterization of syngenite: X-ray fluorescence (A), Raman and IR spectra (B), and K_2O_8 (grey) and CaO_9 (blue) cation polyhedral and unit cell (C).

the experimental and positive control conditions and also increased with time ($p < 0.01$, $p < 0.001$, $p < 0.0001$; respectively at 5, 10 and 15 days of culture) as it is shown in Fig. 3D. This was further demonstrated in experiments showing that the AE also promoted the formation of calcium nodules without the necessity of Mineralization Media for the Cell-Differentiation (Fig. 4A to D). This is possibly due to the presence of calcium ($45.68 \mu\text{g}/\text{mL}$) and other components in the AE, such as sedoheptulose amongst others.

In agreement with the results above shown, both the AE and sedoheptulose significantly increased the Core-Binding Factor $\alpha 1$ (CBFA1) transcript levels at 5 days and Bone Sialoprotein (BSP) at 10 days. In contrast, only the sedoheptulose significantly increased the expression of Osteocalcin (OCN) at 10 days of culture. Nevertheless, neither the AE nor sedoheptulose significantly increased the expression of OSTERIX (Fig. 3C). This further confirms that the cells initiate the mineralization process without changing their phenotype to osteoblastic cells.

3.3. In vitro nucleation assays of the *Sedum oxypetalum* extracts and syngenite

The AE and syngenite induced the formation of micro-sphere-like structures, we measured their structure formation and microanalysis in order to determine the mineral phase by SEM-EDS (Lin et al., 2014). SEM images show the formation of spheres of $200 \pm 400 \mu\text{m}$ (Fig. 5A to H). These hierarchical structures were composed by needle-like crystals, uniformly aligned and arranged toward a direction of growth. EDS analysis revealed Ca/P ratios of 1.35 for the AE (Fig. 5A to D); 1.68 for the syngenite (Fig. 5E and F); and 0.72 for the BSA (Fig. 5G to H).

The Ca/P ratios from the spheres for syngenite are similar to the ratio found in bone hydroxyapatite (HAp). Through HR-TEM analysis, we could measure and compare the interplanar distances from both the experimental Selected Area Diffraction Pattern (SADP) and micrographs with standard hydroxyapatite (JCPDS 44–0778, 2001) (Joint Committee on Powder Diffraction Standards, 2001). The SADP shows a characteristic diffraction pattern of the $P6_3/m$ group (176) (Department of Crystallography, Birkbeck College, 1999) in the $[1 \bar{1} 0 0]$ zone axis (Reyes-Gasca et al., 2012) which is consisting with hexagonal hydroxyapatite (Fig. 5K). Moreover, the Fast Fourier Transform (FFT) obtained from the micrographs showed the characteristic hexagonal diffraction pattern of the HAp viewed from the zone axis $[1 \bar{1} 4 \bar{3}]$, from where two $(2 \bar{1} \bar{3} 2)$ and one $(3 \bar{0} \bar{3} 1)$ planes are visible (Fig. 5I and J). Furthermore, micro-Raman spectra of calcium phosphate crystals grown in the presence either of syngenite, AE or albumin at 7 days, showed a prominent feature in the spectra. All peaks are represented with the mode positioned at 960 cm^{-1} representing the vibration of PO_4^{3-} group referred to as ν_1 in addition to a mode of symmetric stretching at 1016 and 424 cm^{-1} which are ν_2 and ν_3 representative vibrations, both characteristic for HAp.

4. Discussion

4.1. Chemical characterization of the aqueous extract of *S. oxypetalum*

An important characteristic of *S. oxypetalum* aerial parts is their relative softness and the relatively easy obtaining of its aqueous extract by chewing the plant branches so the AE could be in direct contact with

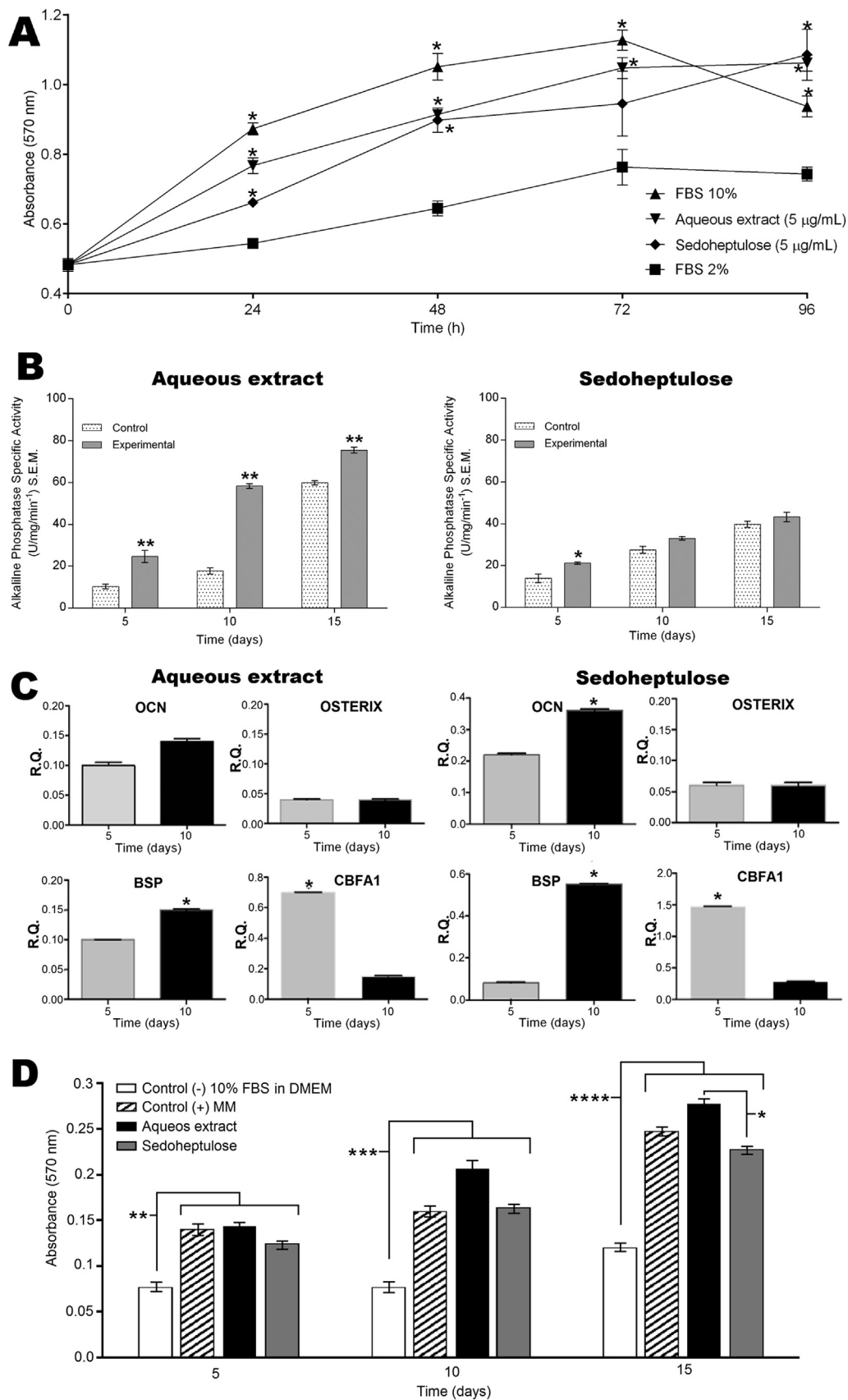


Fig. 3. Cell proliferation of hPDLs (A). Alkaline phosphatase specific activity at 5, 10, and 15 days (B). The gene expression of osteoblastic markers in hPDLs at 5 and 10 days of treatment (C). Calcium mineralized deposits measurement by CPC method at 5, 10 and 15 days (D). Two treatments were assayed (AE and sedoheptulose with concentrations of 5 µg/mL). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001. For further details see Section 3.2. and statistical analysis in Section 2.11.

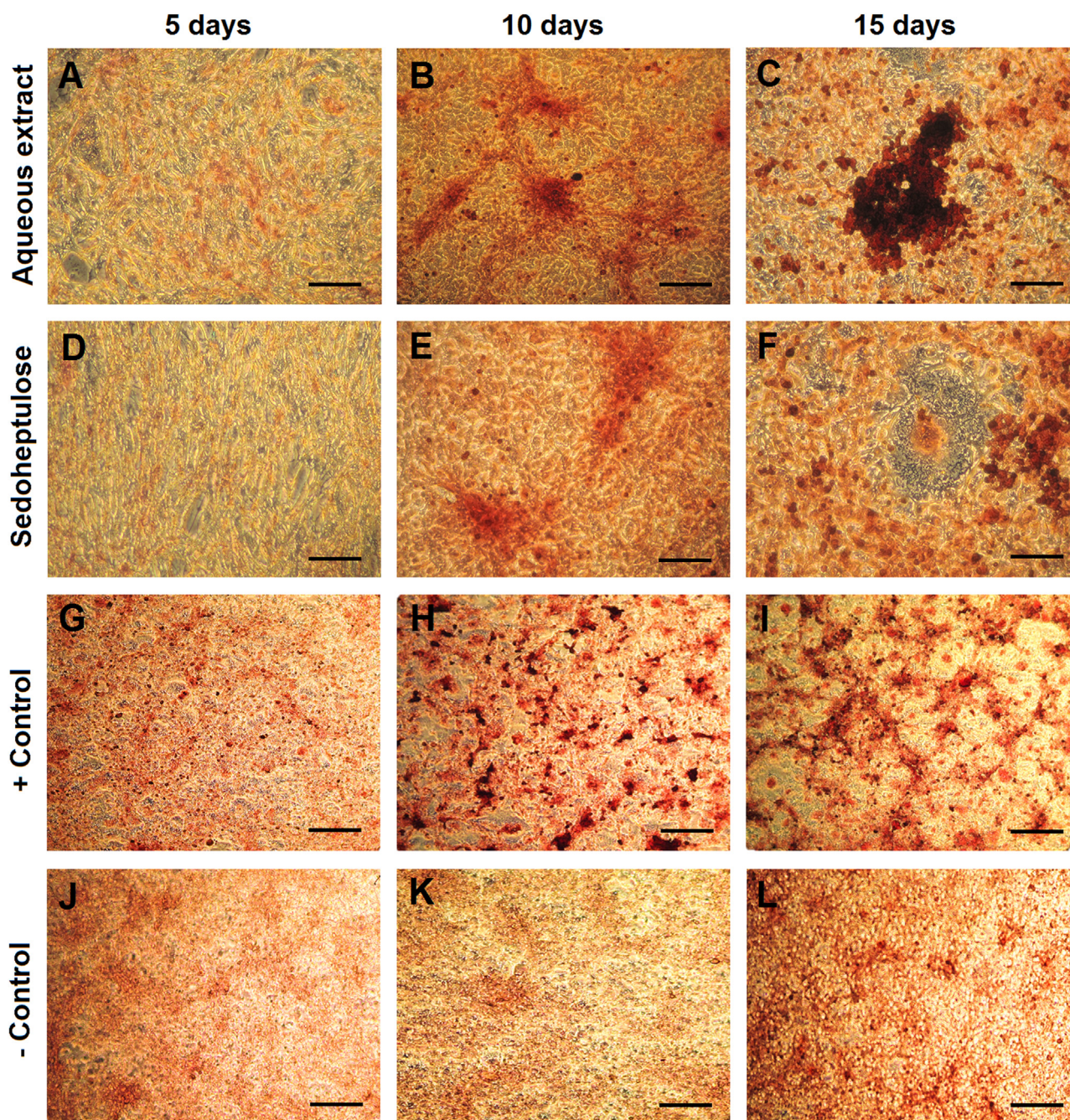


Fig. 4. Representative images of Alizarin Red S staining in hPDLs at 5, 10, and 15 days. Samples: Aqueous extract 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (A–C) and Sedoheptulose 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (D–F). Controls: Positive 10% FBS + 10 nM dexamethasone + 10 mM β -glycerophosphate + 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ascorbic acid (G–I) and Negative 10% FBS (J–L). For further details see Section 3.2.

the gingiva and then, it could exert its effects directly on the tissues without the necessity of a primary extraction process. This is an important advantage because we were able to determine the average volume of natural juice that goes on the gingiva (4.5 mL) and also, considering the exact proportion of solutes in the AE (51.84 mg/mL) we could estimate the quantity of solids in the AE that exert the effect on the tissues (233 mg). Therefore, we could perform comparisons between such quantities and the test concentrations of the AE on each assay (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). It is also important to emphasize that the users of this plant as a traditional remedy only keep the AE in their mouths, but never swallow it. This likely ensures the effect is exerted directly in the oral cavity and not in a systemic form.

There are previous reports of other Crassulaceae species that they

can absorb some metallic cations from the soil due to their nature as succulent plants (Ahmad, 2015). In addition, due to the presence of inorganic material isolated from the AE it was important to analyze its original mineral composition to exclude the possibility of the presence of toxic metallic elements (*i.e.* cadmium, chromium, lead, arsenic, and mercury) in the aerial parts of the plant (Tchounwou et al., 2012). The results from the general ashes analysis (Supplementary Material) showed no presence of such toxic metals. Furthermore, we could detect the presence of macronutrients such as Magnesium, Phosphorus, Sulfur, Potassium and Calcium (Tchounwou et al., 2012), as well as micronutrients such as Aluminum, Manganese, Iron, and Molybdenum in the aerial parts of the plant.

From the Single Crystal X-ray diffraction data, it was possible to

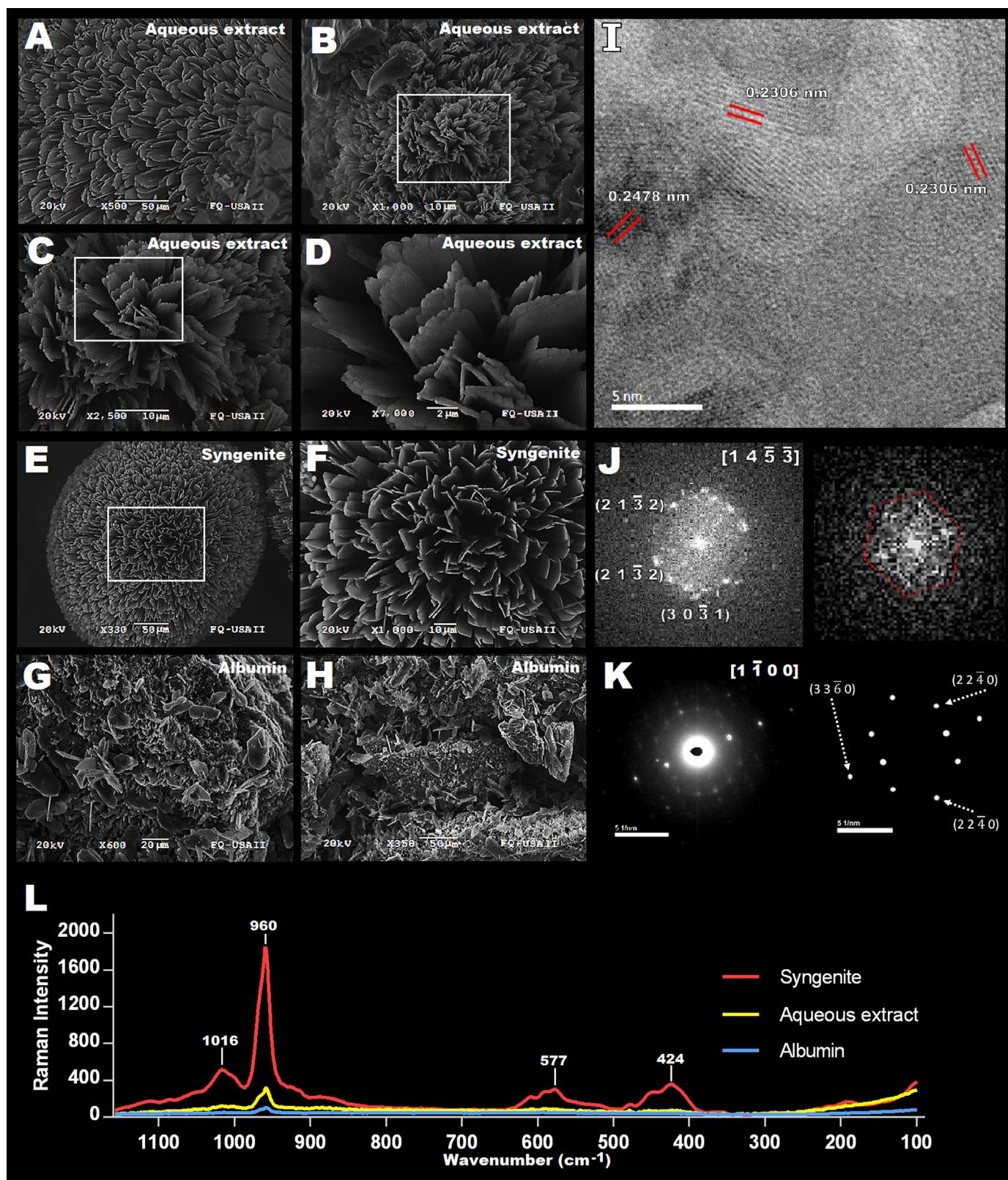


Fig. 5. SEM micrographs of the crystals obtained by nucleation from either the AE of *S. oxypetalum* or syngenite. Ca/P ratio AE-1.36, syngenite-1.69, albumin-0.72 (A-H). HR-TEM micrograph of the HAp crystals obtained by nucleation from the syngenite (I), FTI spectrum on the $[1\ 4\ \bar{5}\ \bar{3}]$ zone axis (J). Experimental SADP from the HAp crystals obtained from syngenite with processed image showing the characteristic diffraction pattern of the P63/m group in the $[1\ \bar{1}\ 0\ 0]$ zone axis (K). Raman spectrum of the calcium phosphate crystals obtained either with AE or syngenite (L) for further details see Section 3.3.

unambiguously identify calcium carbonate (Aragonite), such presence indicates two main clauses: the presence of carbonate anions due to the Crassulaceae acid metabolism (Chernetskyy, 2012) and the presence of calcium cations in the AE. The presence of CaCO_3 deposits has been previously described for another species of the genus *Sedum* (Chernetskyy and Weryszko-chmielewska, 2008) a likely explanation could be as an adaptation strategy of the species against infrared radiation. Calcium ions are most important for bone-like tissue regeneration. That being said, the calcium levels in the plant juice would not suffice for a direct effect on remineralization in patients (as the juice is not normally swallowed). However, such ions as well as other juice components (i.e. antioxidants and sugars) may still be beneficial for hPDLs viability (Ghasempour et al., 2015).

Another mineral component detected in the AE was syngenite [$\text{K}_2\text{Ca}(\text{SO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$], which was first identified by IR, Raman, XRF, and powder XRD. Syngenite has been previously described by both, vibrational spectroscopy (Kloprogge et al., 2002) and powder XRD refinement (Ballirano et al., 2005). In the present work, the crystal structure of syngenite was refined by using the Rietveld method with software Topas Academic 4.1. The polyhedral and the crystal structure of syngenite obtained of the refinement suggests that the unit cell of syngenite contained approximately two molecules of $\text{K}_2\text{Ca}(\text{SO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, in which the K atoms are surrounded by eight O atoms and the Ca by nine, forming polyhedral of KO_8 and CaO_9 respectively (Fig. 2C). The KO_8 polyhedra are linked by the chains of CaO_9 polyhedra and by sulfate groups; moreover, the KO_8 polyhedra are stacked along the b axis forming uninterrupted columns; finally, the sulfur atoms are present in two special positions with a relatively regular tetrahedral coordination. All results are consistent with the reported data (Ballirano et al., 2005; Kloprogge et al., 2002).

The presence of syngenite in plants has not been previously described in the literature. The fact that such mineral was obtained from the AE is due to the specific proportions of mineral elements in it. A widely-accepted explanation for the origin of the mineral compounds in plants, is that they come from the soil, in this case, due to the volcanic origin of the field from which the species was collected. Due to the characteristics of the plant metabolism, the most likely mineral to crystallize is syngenite. This was evidenced as syngenite was the only mineral component that crystallized directly from the juice.

Sedoheptulose is the principal organic component of the AE. It is one of the monosaccharides of the pentose phosphate pathway with additional applications such as a nutritional supplement (Haschemi et al., 2014a) or anti-inflammatory molecule (Haschemi et al., 2014b). The way through which this carbohydrate exerts its effects, appears to be through sedoheptulose kinase, which facilitates its utilization as a carbon source in the pentose phosphate pathway (Haschemi et al., 2012). The AE of *S. oxypetalum* contains almost exclusively sedoheptulose amongst other carbohydrates. This was visualized by the practical absence of anomeric hydrogen signals in the ^1H NMR of the AE (Supplementary Material). Finally, through GC-MS analysis, it was possible to identify one terpenoid and four phenylpropanoids as volatile components of the AE; even though they are minor components, it has been reported that such compounds, especially the phenolic ones, show high radical-scavenging (Ertaş et al., 2014) and other important properties (Koganov et al., 1999).

4.2. *In vitro* effects of the aqueous extract of *S. oxypetalum*

In this study, we also assessed the potential beneficial effects of *S. oxypetalum* extracts on cell proliferation, differentiation and mineralization. Indeed, the AE and sedoheptulose presented proliferative effects in the cells at 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Importantly, the AE promoted hPDLs cell proliferation in a similar way as the positive control (FBS 10%). The AE and sedoheptulose were efficient in inducing mineralization and differentiation of hPDLs while sedoheptulose was more effective since the effects were evident at 10 days post treatment. As shown in the Fig. 3,

the Human Periodontal Ligament-Derived cells start the proliferation process during the first 3 days after the treatment with either the AE or sedoheptulose. Then, at day 5 the cells begin the specific differentiation process into an osteoblastic phenotype by promoting the transcription of CBFA1/RUNX2. The mineralization front is typically confirmed with the OCN and BSP markers. Both OCN and BSP are key modulators and they promote the specific differentiation into an osteoblastic phenotype. Furthermore, the low expression of OSTERIX refers to the maintaining of such phenotype. Both the AE and sedoheptulose treatments showed the same behavior on mRNA levels. Moreover, the calcium precipitation measurement showed that both AE and sedoheptulose possess biological activity similar to the mineralization media (positive control), which suggests that both samples have the capacity to promote hPDLs differentiation towards osteoblasts-like cells, since the deposit of calcium salts were evidenced by the cetylpyridinium method; however, the alkaline phosphatase results showed that only the AE has the capacity to maintain the mineralizing phenotype.

This unique behavior of the AE on hPDLs is a most relevant discovery. Up to our knowledge, there are no literature reports of more natural products or extracts from medicinal plants that can promote the specific osteoblastic differentiation in an osteogenic medium-independent manner, but there is a systematic review in the literature where several individual effects for natural products are reported (Rodrigues-Rezende-Costa et al., 2016). The capacity of the AE to initiate and eventually maintain an osteoblastic phenotype on hPDLs is likely due to its composition. Firstly, the presence of sedoheptulose which can promote cell proliferation and initiate cell differentiation; secondly, the volatile organic components (mainly phenols) that can contribute to the cell-homeostasis; and finally, the presence of calcium in the AE. These results show that the AE components emulate the osteogenic media composition in the cell culture experiments, resulting in the mineralization effect and osteogenic differentiation *in vitro*.

4.3. Effects of the aqueous extracts of *S. oxypetalum* on periodontal structures

Part of the supporting tissues of the periodontium is of mineral nature (alveolar bone and cementum) and it is mainly composed by hydroxyapatite and other calcium phosphates; such tissues are difficult to regenerate. One strategy for mineral tissue recovery is by using HAP or octacalcium phosphate (OCP) crystals, such crystals may be obtained by several methods, for example, synthesis, calcination or nucleation. The nucleation process can be facilitated by using a seeding crystal, over which a new one can grow up. Considering this, we decided to evaluate the syngenite crystals capacity to induce the nucleation of calcium phosphate crystals in a sol-gel *in vitro* method.

In this study, we determined that the AE induced the formation of Octacalcium Phosphate (OCP), while syngenite promoted the nucleation of HAP crystals (Fig. 5). Syngenite was at first, a non-significant discovery as a plant component, except for the confirmation of calcium ions in the AE; nevertheless, the particles of syngenite were submitted to the sol-gel nucleation assays. Unexpectedly, this study did find a very significant effect of syngenite for the crystal-nucleation of HAP. It is important to state that the syngenite was not rather pure, but it contained sedoheptulose as impurity. Nevertheless, sedoheptulose did not induce nucleation *per se*. Therefore, the nucleation of HAP was confirmed to be induced by syngenite.

5. Conclusions

The beneficial effect of the AE is justified by its effects on hPDLs proliferation, gene expression, calcium-plaques stain, calcium deposits quantitation, alkaline phosphatase specific activity and other mineralization markers.

We described a unique property of the mineral syngenite obtained directly from the AE, which happens to be truly relevant for the

potential application in the formation of bone-like tissues.

To our knowledge, this is the first report in which an extract of a Mexican indigenous plant is tested for its capacity to induce the regeneration of mineralized tissues.

Acknowledgments

To Dr. J. L. Ruvalcaba-Sil for his support in obtaining XRF, IR and Raman spectra. To Q. A. Acosta-Huerta, M. S. Arriaga-García for the professional counseling. To Dr. M. Gutiérrez-Aguilar for the critical review for the work. To M.Sc. R. Torres-Colín of the Herbario Nacional de México (MEXU) for the botanical identification of the plant. To R. del-Carmen and R. Díaz for the technical assistance. To the technical staff of the USAII, in particular to Q. R. Puente-Lee.

Funding

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) [grant number 271106] and project LN279740 and the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-PAPIIT) projects [IN 225017 and IT 200717].

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi:10.1016/j.jep.2018.07.005](https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.07.005).

References

- Ahmad, P., 2015. *Plant Metal Interaction: Emerging Remediation Techniques*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands.
- Alvarez-Perez, M.A., Alvarez-Fregoso, O., Ortiz-Lopez, J., Arzate, H., 2005. X-ray microanalysis of human cementum. *Microsc. Microanal.* 11, 313–318. <https://doi.org/10.1017/s1431927605050221>.
- Arzate, H., Alvarez, M.A., Narayanan, A.S., 2005. Cyclosporin A promotes mineralization by human cementoblastoma-derived cells in culture. *J. Periodontol. Res.* 40, 218–224. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2005.00797.x>.
- Ballirano, P., Belardi, G., Maras, A., 2005. Refinement of the structure of synthetic syngenite $K_2Ca(SO_4)_2(H_2O)$ from X-ray powder diffraction data. *Neues Jahrb. fuer Miner. Abh.* 182, 15–21. <https://doi.org/10.1127/0077-7757/2005/0027>.
- Carmona-Rodríguez, B., Álvarez-Pérez, M.A., Narayanan, A.S., Zeichner-David, M., Reyes-Gasga, J., Molina-Guarneros, J., García-Hernández, A.L., Suárez-Franco, J.L., Chavarría, I.G., Villarreal-Ramírez, E., Arzate, H., 2007. Human Cementum Protein 1 induces expression of bone and cementum proteins by human gingival fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358, 763–769. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.04.204>.
- Ceusters, J., Godts, C., Peshev, D., Vergauwen, R., Dyubankova, N., Lescrinier, E., De Proft, M.P., Van den Ende, W., 2013. Sedoheptulose accumulation under CO₂ enrichment in leaves of *Kalanchoe pinnata*: a novel mechanism to enhance C and P homeostasis. *J. Exp. Bot.* 64, 1497–1507. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert010>.
- Chernetskyy, M.A., 2012. The role of Morpho-Anatomical traits of the leaves in the taxonomy of Kalanchoideae Berg. Subfamily (Crassulaceae DC.). *Mod. Phytomorphol.* 1, 15–18. <https://doi.org/10.5281/zenodo.162711>.
- Chernetskyy, M., Weryszko-chmielewska, E., 2008. Structure of *Kalanchoë pumila* Bak. leaves 61, 11–24 (Crassulaceae DC.).
- Clausen, R.T., 1959. Sedum of the Trans-Mexican volcanic belt. *Sedum oxypetalum* [WWW Document]. <www.crassulaceae.com/>. URL <http://www.crassulaceae.com/crassulaceae.com/botanik/pflanzen/botanize_scan_en.asp?Gnr=1340&scan=182890-4&cat=5&name=Sedum> (Accessed 17 April 2017).
- De la Cruz, M., Badiano, J., 1996. *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis (Reproducción facsimil)*. Fondo de Cultura Económica, 2nd ed. Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México.
- Department of Crystallography, Birkbeck College, U.of.L., 1999. Space group P63/m No. 176 [WWW Document]. A Hypertext B. Crystallogr. Sp. Gr. Diagrams Tables. URL <<http://img.chem.ucl.ac.uk/sqp/large/176az1.htm>> (Accessed 5 February 2017).
- Ertas, A., Boğa, M., Yilmaz, M.A., Yeşil, Y., Haşimi, N., Kaya, M.Ş., Temel, H., Kolak, U., 2014. Chemical compositions by using LC-MS/MS and GC-MS and biological activities of *Sedum sedifforme* (Jacq.) Pau. *J. Agric. Food Chem.* 62, 4601–4609. <https://doi.org/10.1021/jf500067q>.
- Finger, L.W., Cox, D.E., Jephcoat, A.P., 1994. Correction for powder diffraction peak asymmetry due to axial divergence. *J. Appl. Crystallogr.* 27, 892–900. <https://doi.org/10.1107/S0021889894004218>.
- Ghasempour, M., Moghadamnia, A.A., Abedian, Z., Amir, M.P., Feizi, F., Gharekhani, S., 2015. In vitro viability of human periodontal ligament cells in green tea extract. *J. Conserv. Dent.* 18, 47–50. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.148894>.
- Haschemi, A., Kosma, P., Gille, L., Evans, C.R., Burant, C.F., Starkl, P., Knapp, B., Haas, R., Schmid, J.A., Jandl, C., Amir, S., Lubec, G., Park, J., Esterbauer, H., Bilban, M.,

- Brizuela, L., Pospisilik, J.A., Otterbein, L.E., Wagner, O., 2012. The sedoheptulose kinase CARKL directs macrophage polarization through control of glucose metabolism. *Cell Metab.* 15, 813–826. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.04.023>.
- Haschemi, A., Wagner, O., Nagy, C., Marculescu, R., 2014a. The use of sedoheptulose as a nutritional supplement. *World Intellect. Prop. Organ* (WO 2014/147213 A1).
- Haschemi, A., Wagner, O., Nagy, C., Marculescu, R., 2014b. Use of sedoheptulose for prevention or treatment of inflammation. *World Intellect. Prop. Organ* (WO 2014/147214 A1).
- Joint Committee on Powder Diffraction Standards, 2001. No. 44-0775 file for calcium hydroxyapatite. CAS: 13-06-5. Powder Diff.
- Kala, B.S., Gunjan, C., Disha, N., Shobha, P., 2015. Treatment of periodontal disease - A herbal approach. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 33, 126–136.
- Klopogge, J.T., Schuiling, R.D., Ding, Z., Hickey, L., Wharton, D., Frost, R.L., 2002. Vibrational spectroscopic study of syngenite formed during the treatment of liquid manure with sulphuric acid. *Vib. Spectrosc.* 28, 209–221. [https://doi.org/10.1016/S0924-2031\(01\)00139-4](https://doi.org/10.1016/S0924-2031(01)00139-4).
- Koganov, M.M., Dueva, O.V., Tsonin, B.L., 1999. Activities of plant-derived phenols in a fibroblast cell culture model. *J. Nat. Prod.* 62, 481–483. <https://doi.org/10.1021/np9801559>.
- Lin, K., Wu, C., Chang, J., 2014. Advances in synthesis of calcium phosphate crystals with controlled size and shape. *Acta Biomater.* 10, 4071–4102. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.06.017>.
- LV-Legislatura, 2008. Código para la Biodiversidad del Estado de México.
- Martínez-Villegas, J.A., Orozco-Segovia, A., Sánchez-Coronado, M.E., Pisanty, I., 2012. Germination of *Sedum oxypetalum* (Crassulaceae) in a primary lava-field shrubland. *Plant Ecol.* 213, 871–881. <https://doi.org/10.1007/s11258-012-0049-x>.
- Montoya, G., Arenas, J., Romo, E., Zeichner-David, M., Alvarez, M., Narayanan, A.S., Velazquez, U., Mercado, G., Arzate, H., 2014. Human recombinant cementum attachment protein (hrPTPLA/CAP) promotes hydroxyapatite crystal formation in vitro and bone healing in vivo. *Bone* 69, 154–164. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.09.014>.
- Navarro-García, V.M., Gonzalez, A., Fuentes, M., Aviles, M., Rios, M.Y., Zepeda, G., Rojas, M.G., 2003. Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 87, 85–88. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00114-4](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00114-4).
- Newman, D.J., Cragg, G.M., 2016. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* 79, 629–661. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>.
- Pejčić, A., Kojović, D., Mirković, D., Minic, I., 2013. Stem cells for periodontal regeneration. *Balk. J. Med. Genet.* 16. <https://doi.org/10.2478/bjmg-2013-0012>.
- Reyes-Gasga, J., Martínez-Piñero, E.L., Brès, E.F., 2012. Crystallographic structure of human tooth enamel by electron microscopy and x-ray diffraction: hexagonal or monoclinic? *J. Microsc.* 248, 102–109. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2012.03653.x>.
- Rodrigues-Rezende-Costa, C., Rabelo-Amorim, B., De-Magalhães, P., De-Luca-Canto, G., Acededo, A.C., Silva-Guerra, N.E., 2016. Effects of plants on osteogenic differentiation and mineralization of periodontal ligament: a systematic review. *Phytother. Res.* 30, 519–531. <https://doi.org/10.1002/ptr.5568>.
- SEMARNAT, 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental. Especies nativas de México de flora y fauna silvestres. Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio. Lista de especies en riesgo.
- Sowmya, S., Chennazhi, K.P., Arzate, H., Jayachandran, P., Nair, S.V., Jayakumar, R., 2015. Periodontal specific differentiation of dental follicle stem cells into osteoblast, fibroblast, and cementoblast. *Tissue Engineering Part C* 21, 1044–1058. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2014.0603>.
- Tchounwou, P.B., Yedjou, C.G., Patlolla, A.K., Sutton, D.J., 2012. Heavy metal toxicity and the environment. In: *Nih*. pp. 133–164. doi:10.1007/978-3-7643-8340-4_6.
- Trivedi, S., Dixit, J., 2015. Clinical effects of irrigation with *Saussurea lappa* extract in the treatment of chronic periodontitis: A pilot randomized trial. doi:10.4103/0975-8844.169752.
- United Nations, S., 2011. of the C. on B.D. The Nagoya Protocol on access to genetic resources and the fair and equitable sharing of benefits arising from their utilization to the convention on biological diversity.
- Waizel-Bucay, J., Martínez-Rico, I.M., 2011. Algunas plantas usadas en México en padecimientos periodontales. *Rev. ADM* 68, 73–88.
- Walchuck, R.E., 2010. Periodontitis. Symptoms, treatment and prevention. In: *Nova Biomedical*, 1st ed. Nova Science Publishers, Inc, New York.

Glossary

- AE: Aqueous extract of *Sedum oxypetalum* Kunth (Crassulaceae).
- ALP: Alkaline Phosphatase
- BSA: Bovine Serum Albumin
- BSP: Bone Sialoprotein
- DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium
- CBFA1: Core-Binding Factor $\alpha 1$
- CPC: Cetylpyridinium chloride
- FBS: Fetal Bovine Serum
- HAP: Hydroxyapatite
- hPLDs: Human Periodontal Ligament-Derived cells.
- MM: Mineralization media
- MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide.
- OCN: Osteocalcin
- OCP: Octacalcium Phosphate
- OSTERIX: Osteoblast-Specific Transcription Factor