

Pasta terapéutica anti-A. Producto (1ra parte) avance

Luis H. Gálvez Calla^{1*}; Mirtha Roque Alcarraz²; Jorge Villavicencio Gastelú^{3*}

Pastures anti-A therapy. Product (1ra part) advance

Resumen

Los estudios «in vitro e in vivo» de la Pasta Experimental Anti-A, a base de Sangre de grado y fosfato tricálcico, han mostrado una excelente capacidad bactericida y reparativa del tejido conjuntivo. La actividad fibroblástica observada en la mayoría de los casos, generada probablemente por efectos del fosfato tricálcico, es la misma que en una anterior investigación mostró un comportamiento similar, induciendo el proceso reparativo de los defectos óseos. Sin embargo, la aplicación de la Pasta Experimental Anti-A en humanos en acto posexodónico, que mostró dilución con la saliva y falta de adhesión con los tejidos, creo la necesidad de continuar con la línea de investigación con la finalidad de mejorar sus propiedades originales, incorporando aditivos biocompatibles.

El estudio consistió en elaborar 8 pastas con diversas formulaciones a base de Sangre de grado, fosfato tricálcico, goma tragacanto, propilenglicol, vaselina, metil parabeno y agua destilada; evaluadas con pruebas de laboratorio a fin de reajustar y calibrar las proporcionalidades de los insumos en función a las propiedades preservantes, adhesivas, no absorbentes y de acción antibacteriana; lo que permitió descartar algunas formulaciones y continuar con aquellas que contienen reducida cantidades en gramos de goma tragacanto y vaselina en la formulación

Los resultados mostraron una adecuada difusión del principio activo y una buena actividad antibacteriana frente a los grampositivos y gramnegativos. La propiedad biodegradable y reparativa deberá ser evaluada en posteriores investigaciones antes de su aplicación en humanos.

¹ Instituto de Investigación Estomatológica, Departamento Académico de Ciencias Básicas
² Instituto de Investigación
³ Departamento Académico de Estomatología Médico Quirúrgico
* Facultad de Odontología, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú
E-mail: lgalvezc@unmsm.edu.pe

Palabras clave: microbiología oral, biomateriales, Sangre de grado, productos naturales

Abstract

«in vitro & in vivo» studies of the Anti-A Experimental Paste, with the help of Sangre de grado and tricalcic phosphate, they have shown an excellent capacity germicide and reparative of the conjunctive tissue. The fibroblastic activity observed in most of the cases, probably generated by effects of the tricalcic phosphate, is the same one that showed a similar behavior in a previous investigation, inducing the reparative process of the bony defects.

However, the application of the Anti-A Experimental Paste in human in posexodonic act that showed dilution with the saliva and lack of adhesion tissue, believe the necessity to continue with the investigation line with the purpose of improving their original properties, incorporating biocompatible additives.

The study consisted on elaborating 8 pastes with diverse formulations with the help of Sangre de grado, tricalcic phosphate, rubber tragacanto, propilenglycol, vaseline, metil parabeno and it dilutes distilled; not evaluated with laboratory tests in order to readjust and to gauge the proporcionalidades of the inputs in function to the properties preservantes, adhesive, absorbent and of antibacterian action; what allowed to discard some formulations and to continue with those that contain reduced quantities in grams rubber tragacanto and vaseline in the formulation

The results showed an appropriate diffusion of the active principle and a good antibacterian activity in front of the grampositives and gramnegatives. The biodegradable and reparative property will be evaluated in later investigations before its application in human.

Key words: oral Microbiology, biomaterials, Sangre de grado, natural products

Introducción

La curación de la herida es la respuesta natural de todo tejido lesionado, llevado a cabo principalmente por

síntesis de colágeno que contribuye al fortalecimiento de la herida¹.

La fase temprana de la curación de heridas se caracteriza por el depósi-

to de una matriz provisional a base de glucosaminoglucanos (GAG) y proteoglicanos, seguido de la forma-

ción del tejido de granulación y síntesis de colágeno y elastina².

La infección es probablemente el impedimento más común para la cicatrización normal de la herida, debido a que produce lesión adicional y retarda el proceso de reparación. La infección podría presentarse como consecuencia de la descomposición de tejidos necróticos o por invasión bacteriana; ambas situaciones pueden ocurrir simultáneamente.

La alveolitis seca es una complicación posoperatoria local que se presenta en aproximadamente 3% de las extracciones dentales³. Aunque fue descrita por primera vez en 1896⁴, su etiología y patogénesis aún se desconocen^{5,6}.

la medicina tradicional, desarrollada desde hace más de quince mil años por poblaciones indígenas que forman parte de la biodiversidad amazónica, tiene un bagaje excepcional de plantas con especial poder curativo, espiritual, nutritivo, etc., y que además, han sido transmitidos de generación en generación; entre ellas el *Croton* (Sangre de grado)

Estudios recientes⁷⁻¹⁰ han reportado la acción antiinflamatoria y cicatrizante en úlcera péptica, de varios productos vegetales que son usados por la población general como recursos terapéuticos por su fácil obtención y bajo costo, refiriéndose mínimas reacciones adversas. Sin embargo, en nuestro medio existen pocos trabajos experimentales que corroboran los supuestos beneficios de las citadas plantas, incluyendo el *Croton palanostigma* (Sangre de grado)¹¹.

En el Perú se conocen diversas variedades de *Croton*, tales como el *Croton Draconoides*, el *Croton Eritrochilus*, el *Croton Huitotorum* o *Croizat* y el *Croton lechleri*; a los cuales, los nativos del amazonas le atribuyen efectos antiinflamatorio, cicatrizante, antitumoral, antioxidante, antimicrobiano y antiviral¹¹⁻¹³.

Ensayos experimentales de Zapata (1987)¹², determinaron que la «Sangre de grado» tiene actividad antimicrobiana frente a los microorganismos grampositivos, entre ellos a: *S. Aureus* 6538 ATCC, *S. Epidermidis* 12228 ATCC, y a gramnegativos: *Klebsiella* 602 FDA, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Salmonella* y *Pseudomonas*.

Con el objetivo de comprobar la acción cicatrizante de la «Sangre de gra-

do», Milla (1985)¹³ investigó sobre su mecanismo de acción, y encontró que la *Taspina* sería su principio activo. Además observó inhibición de la proliferación celular y contracción de heridas, estimulando la migración de fibroblastos.

Chen et al (1994)¹⁴, cuestionaron que las propiedades antiinflamatorias y cicatrizantes de la «Sangre de Grado» sea atribuida a su componente *clorhidrato de taspina*, y propusieron mas bien como principio activo al *lignano de dihidrobenzofurano: 3',4'-O-dimetilcedrusina*. No recomiendan el uso del látex con alto contenido de *taspina* para consumo oral, debido a factores citotóxicos.

Pieters et al (1993)¹⁵, aislaron a la *taspina* de la «Sangre de grado» y lo identificaron por medios espectroscópicos, determinando su acción altamente citotóxica a concentraciones de 0.3 µg/ml. No estimuló a células endoteliales a concentraciones no tóxicas. Además afirmaron que ni la *taspina*, ni la *3',4'-O-dimetilcedrusina* tuvieron actividad antiviral, antibacteriano y antimicótico.

Los estudios experimentales biocompatibilidad de los cementos de obturación a base de «Sangre de grado» y «Bálsamo de Perú» implantados subcutáneamente en la región dorsal, realizada por Caro (1985)¹⁶; mostraron con respecto al «Bálsamo de Perú» una reacción inflamatoria mínima y un proceso de reparación óptima del tejido subcutáneo; mientras que el cemento a base de «Sangre de grado» mostró mediana reacción inflamatoria, constituyéndose en segunda opción preferencial en relación al Tubli Seal que si produjo una reacción inflamatoria hasta un periodo de 60 días y una tardía reparación.

La biocompatibilidad del cemento de obturación a base de «Sangre de grado» y óxido de zinc en el tejido conjuntivo, evaluado por Zaravia (1985)¹⁷, propició reacciones antiinflamatorias de reparación, evidenciado por una mayor respuesta de la actividad fibroblástica.

Morales (1985)¹⁸, aplicando tópicamente «Sangre de grado» en la alveolitis seca dolorosa, teniendo como testigo al eugenol, mejoró la sintomatología del cuadro clínico, eliminando el dolor y el mal olor reinante a los 4 días, promoviendo la formación de tejidos de granulación en los alvéolos secos.

El fosfato tricálcico (FT), componente inorgánico esencial de los tejidos mineralizados fue también ampliamente evaluado, por un lado, Heller et al, (1975)¹⁹ emplearon fosfato tricálcico biodegradable de alta pureza, como agente de cubierta pulpar directa en dientes de monos y demostraron que al cabo de 24 semanas las pulpas fueron viables sin inflamación, y opinaron que el éxito se debe a la oclusión de vasos sanguíneos por puentes de calcificación, agregando que el fosfato tricálcico es un material antiinflamatorio. Por otro lado, Himel (1985)²⁰ demostró que el fosfato tricálcico fue muy inerte y nunca se le encontró asociado con células inflamatorias y necrosis tisular, confirmando estudios experimentales anteriormente realizados, que afirman ser bien tolerado por los tejidos periodontales y que son fagocitados y reemplazados por hueso calcificado; enumerando usos potenciales como: 1. Relleno de grandes defectos óseos quirúrgicos, como la fisura palatina artificial; 2. Amplias fracturas y 3. Defectos periodontales.

Nuestras investigaciones^{21,22} publicadas en 1998²¹ y 1996²², con fosfato tricálcico en estomatología fueron muy favorables, en 1992²¹ estudiando su efecto en la reparación de los defectos óseos periapicales, preparados en un modelo experimental de ocho perros tratados endodóntica y quirúrgicamente, previo colgajo gingival; evaluados después de 15, 20, 30, 45, 75 y 90 días de evolución, y observados en cortes microscópicos coloreados con hematoxilina-eosina, se llegó a la conclusión que el cemento FT es un biomaterial inductor del proceso reparativo, actúa acelerando los mecanismos de proliferación celular, síntesis de colágena y de mineralización de la matriz proteica. A los 45 días el tejido conectivo fue de aspecto mucoide con menos infiltrado inflamatorio, con trabéculas óseas de aspecto celular colagenoso que van en aumento; 75 días después hay ausencia de células inflamatorias y luego de 90 días el defecto óseo periapical se encontró ampliamente reparado.

En 1994²² se aplicó fosfato tricálcico como recubrimiento pulpar directo en dientes humanos programados para tratamiento exodóntico y en otro grupo de dientes sanos programados para exodoncia por razones ortodóncicas, a quienes intencionalmente se prepararon cavidades con

compromiso pulpar, simulando una situación iatrogénica; concluyendo que:

1. Es un material inocuo y no está relacionado con los tejidos necróticos. Al cabo de 8 semanas el medio tisular está libre de células inflamatorias.
2. El FT actúa acelerando los mecanismos de proliferación, síntesis de colágena, y mineralización de la matriz proteica.
3. La proliferación celular en pulpas con compromiso iatrogénico se manifiesta más tempranamente que aquellas comprometidas por bacterias.

En investigaciones (2001-2003)^{23,24} que antecedieron a la presente, con la finalidad de evaluar por un lado, la *Capacidad bactericida de pastas experimentales anti-A (estudio in vitro)*²³ a base de Sangre de grado, Sábila y Uña de gato, puros y combinados. Para el efecto se aislaron ocho bacterias orales de mucosa gingival adyacentes a remanentes radiculares, tales como: *Propionibacterium*, *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius*, *Staphylococcus hemolyticus*, *Eikenella* y *Veillonella*.

Los resultados de la prueba de susceptibilidad, luego de 72 hs, mostraron halos de inhibición de crecimiento bacteriano, de tamaño variado; siendo el de mejor comportamiento la pasta a base de Sangre de grado, utilizado como extracto puro, logrando mayor susceptibilidad a *Eikenella* y *Lactobacillus*, con 32 y 30 mm de diámetro de inhibición. El *Streptococcus mitis* fue el menos sensible del grupo de bacterias aisladas. Los ensayos experimentales de Zapata (1987)¹², confirman esta condición.

La asociación de la pasta a base de Sangre de grado con extractos líquidos de Uña de gato y Sábila, formaron halos de inhibición de menor tamaño, indicando reducida acción antibacteriana. La triple asociación disminuye aun más el halo de inhibición

Por otro lado, con el objetivo de resolver de manera integral los defectos óseos posexodóncicos, se estudió en el año 2002, antes de la fase aplicativa, el *Efecto reparativo de las pastas experimentales anti-A (estudio in vivo)*²⁴ en un modelo experimental conformado por 08 cobayos sin discriminación de sexo, de 30 a 40 días de nacido, divididos en grupo de es-

tudio (07) y de control (01); a quienes se aplicaron las pastas experimentales previamente introducidas en un túbulo fenestrado donde fraguó en aproximadamente 8 minutos. Inmediatamente, luego de anestesia general y rasurado la zona dorso lateral derecha, se delimita el área quirúrgica, se infiltra xilocaina al 2%, como vaso constrictor periférico; se practica una incisión lineal en sentido vertical de aproximadamente 1 cm de longitud, se debrida y separa la piel del tejido celular subcutáneo con sonda acanalada, a manera de una bolsa, creando el lecho receptor de la pasta experimental respectiva. Posteriormente después de reposicionar los tejidos se procedió a suturar la piel, de modo simple, con hilo de seda trenzada 000 y aguja curva atraumática. Finalmente, los animales fueron ubicados en jaulas individuales, debidamente codificados, por 12 h posoperatorios, donde fueron alimentados de modo normal.

Luego de 5 días de evolución de las pastas experimentales, implantadas quirúrgicamente, los cortes histológicos de los tejidos biopsiados reflejan grados de actividad fibroblástica en áreas de difusión de la pasta, libre de signos inflamatorios; sin embargo se observan relativo infiltrado a plasmocitos, neutrófilos y macrófagos.

En general los extractos líquidos puros de cada uno de los productos naturales han mostrado un mejor comportamiento antiinflamatorio y cicatrizante que los asociados.

La formación de tejido conectivo denso a gruesos haces de colágeno en zonas de reparación y de difusión de pasta se ha visto vinculado con pastas experimentales asociados de Sangre de grado con Aloe vera. Los estudios de Chithra et al (1998)¹, reportaron la influencia del Aloe vera en el contenido de colágeno y sus características en la curación de la herida.

En el 2003²⁵, las pastas experimentales anti-A fueron aplicadas en humanos en acto posexodóncico, con fines preventivos, y en casos con alveolitis, con fines terapéuticos. En los casos de la primera situación clínica, a las 72 h no hubo signos hemorrágicos, mostrando más bien formación de coágulo, libre de tumefacción con persistencia de dolor leve; luego de 72 h se aprecian formaciones de tejido de granulación en el 89% de los

casos, siendo abundante la aparición de espículas óseas después de la segunda semana. En los casos de la segunda situación clínica, tratados con la citada pasta, a las 72 h se percibe leve tumefacción y escaso dolor, estando ausente el olor fétido característico en estos casos; se apreció además formaciones de tejido de granulación, incrementándose a los 7 días. Sin embargo, a pesar de los resultados favorables, se observó que la pasta se desprende del defecto óseo alveolar y se diluye en contacto con la saliva, consecuentemente la pérdida gradual de sus efectos bactericida y reparativa; las cuales deberán resolverse con aditivos biocompatibles que le proporcionen propiedades secundarias (adhesiva, cohesiva, biodegradable y no absorbente), sin que estas modifiquen y/o bloqueen la propiedad principal de la pasta, siendo necesaria continuar con la línea de investigación; considerando hipotéticamente que estas sustancias no modificará su propiedad principal antibacteriana y reparativa

Objetivos

1. Búsqueda de insumos biocompatibles con propiedades preservantes, adhesivas, biodegradables y no absorbentes.
2. Definir la incorporación de insumos que contribuyan al mejoramiento del producto original (Pasta Experimental Anti-A)
3. Probar «*In Vitro e In Vivo*» que los aditivos no hayan bloqueado y/o modificado las propiedades esenciales, bactericida y reparativa, de la pasta original (Pasta Experimental Anti-A)
4. Aplicación posexodóncica, en humanos, de la pasta terapéutica anti-A.

Material y métodos

Población y muestra:

Consiste en 08 tipos de pastas, con diversas formulaciones que representan la totalidad de la población

Materiales:

Sangre de grado (Croton Dracoide) en líquido y en polvo

Fosfato tricálcico

Goma tragacanto

- Propilenglicol
- Metil parabeno
- Agua destilada CSP
- Vaselina sólida blanca
- Medio TSA en placas petri
- Microorganismos de prueba:
- Staphylococcus aureus ATCC 6538
- Escherichia coli ATCC 25922
- Bacillus subtilis ATCC 6633
- Pseudomona aeruginosa ATCC 27853

Metodología

Aspectos preliminares:

Los productos en polvo, como: Sangre de grado, fosfato tricálcico, metil parabeno y goma tragacanto, fueron manipulados en pequeñas cantidades, mezclando con líquidos, como: agua destilada, propilenglicol y sangre de grado en estado líquido, con la finalidad de establecer comportamientos de afinidad

Preparación del medio TSA e inoculación bacteriana:

En las placas petri con medio Agar Tripticosa Soya, preparados convencionalmente, Se inocularon bacterias gram + y - por hisopado en tres direcciones para asegurar una completa distribución del inóculo

Formulación:

<p>Formula 1</p> <p>Fosfato tricálcico : 2.15 gr.</p> <p>Goma tragacanto : 5.0 gr.</p> <p>Agua destilada CSP : 40.0 ml</p> <p>Propilenglicol : 3.0 ml</p> <p>Sangre de grado (líquido) : 20.0 ml</p>	<p>Formula 01</p> <p>Fosfato tricálcico : 2.15 gr.</p> <p>Goma tragacanto : 5.0 gr.</p> <p>Agua destilada CSP : 40 ml</p> <p>Propilenglicol : 3.0 ml</p> <p>Sangre de grado (polvo) : 6.0 gr.</p>
<p>Formula 2</p> <p>Fosfato tricálcico : 2.15 gr.</p> <p>Vaselina : 30.0 gr.</p> <p>Sangre de grado (polvo) : 6.0 gr.</p>	<p>Formula 02</p> <p>Fosfato tricálcico : 2.15 gr.</p> <p>Vaselina : 30.0 gr.</p> <p>Sangre de grado (líquido) : 20.0 ml.</p>
<p>Formula 3</p> <p>Fosfato tricálcico : 30 gr.</p> <p>Goma tragacanto : 1.50 gr.</p> <p>Agua destilada CSP : 23 ml</p> <p>Metil parabeno : 0.75 gr.</p> <p>Sangre de grado (líquido) : 20.0 ml</p>	<p>Formula 03</p> <p>Fosfato tricálcico : 30 gr.</p> <p>Goma tragacanto : 1.50 gr.</p> <p>Agua destilada CSP : 23 ml</p> <p>Metil parabeno : 0.75 gr.</p> <p>Sangre de grado (polvo) : 6.0 gr.</p>
<p>Formula 4*</p> <p>Fosfato tricálcico : 30.0 gr.</p> <p>Goma tragacanto : 1.5 gr.</p> <p>Vaselina : 2.5 gr.</p> <p>Agua destilada CSP : 23.0 ml</p> <p>Metil parabeno : 0.75 gr.</p> <p>Sangre de grado (polvo) : 6.0 gr.</p>	<p>Formula 04*</p> <p>Fosfato tricálcico : 30.0 gr.</p> <p>Goma tragacanto : 1.5 gr.</p> <p>Vaselina : 2.5 gr.</p> <p>Agua destilada CSP : 23.0 ml</p> <p>Metil parabeno : 0.75 gr.</p> <p>Sangre de grado (líquido) : 20.0 ml.</p>

*Susceptible a reajuste debido a que continúan evaluándose

Procedimientos de mezcla según tipo de formulación:

Se pesó los componentes sólidos en papel aluminio y se calibró a 00 gr. la balanza digital, luego se dispensó los productos líquidos en ml.

Para el proceso de mezcla, según formulación, se utilizó un mortero mediano de porcelana, previamente esterilizado; en el cual se ha vertido el polvo de goma tragacanto, se mezcló agregando agua hasta conseguir una pasta homogénea, se añadió fosfato tricálcico y se continuó mezclando hasta desaparecer su estado granuloso y lograr una consistencia cremosa, se añadió sangre de grado, se batió y se dejó madurar refrigerado.

El componente alternativo en los tipos de pasta fueron el propilenglicol o la vaselina. El metil parabeno fue utilizado en pequeña cantidad como preservante, en las formulas 3, 03, 4 y 04.

Aplicación de las pastas en placas petri inoculadas:

En las placas petri inoculadas se realizaron 2 perforaciones con sacabocado estéril diseñado para producir orificios de 6 mm de diámetro y 4 mm de profundidad. Estas perforaciones fueron codificadas con números 1 y 2, luego rellenas con las pastas de estudio y de control, del siguiente modo:

a. En las cavidades N° 1 se aplicaron los diferentes tipos de pastas según formulación.

b. En las cavidades N° 2 se aplicaron los extractos puros de Sangre de grado en estado líquido y/o en polvo.

Las placas fueron incubadas a 37°C por espacio de 72 horas

Recolección de datos:

Se midieron con una regla milimetrada el diámetro externo de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano, incluyendo la pasta. En los casos con crecimiento bacteriano, sin halo de inhibición, se considero de valor 0 sin inclusión de la pasta.

Resultados

Aspecto de apariencia física:

Las diversas pastas según tipo de formulación, se mostraron de aspecto homogéneo, de color marrón claro y oscuro, según el estado líquido o en polvo del Croton empleado; sin cambios de volumen ni presencia aparente de contaminantes, de olor suigéneris propio de la materia prima (Sangre de grado)

El componente goma tragacanto en las formulas 1, 01, 3, 03, 4 y 04, le da mayor viscosidad a las pastas. La vaselina en la formula 2 y 02 muestra un comportamiento oleoso.

Aspectos de liberación y difusión del principio activo y capacidad antimicrobiana (contaminación):

Estos aspectos han sido evaluados en agar tripticosa soya e inoculación de bacterias, luego de 72 horas de incubación a 37°C

Formulas 1, 01

Se observó un adecuado halo de liberación y difusión del principio activo de Sangre de grado líquido que supera más de 40 mm de diámetro en los extractos puros (control), y de 25 mm de diámetro en las pastas formuladas (prueba), vistos de un color marrón oscuro en la parte interna del halo y amarillo en las partes periféricas.

Los halos de inhibición de crecimiento bacteriano van de 18 a 21 mm de diámetro frente a los extractos puros de estado líquido (control) y de 7 a 16 mm en las pastas formula-

das (prueba), mostrando una mayor actividad antimicrobiana frente a las bacterias grampositivos (*Staphylococcus aureus*, fig.1) y una menor actividad sobre los gramnegativos (*E.coli*, fig.2)

Al evaluar la influencia de los componentes sobre la liberación del principio activo, se observó que el propilenglycol reduce la liberación y difusión, haciéndola poco eficiente; por lo que fueron eliminados del proceso de investigación.

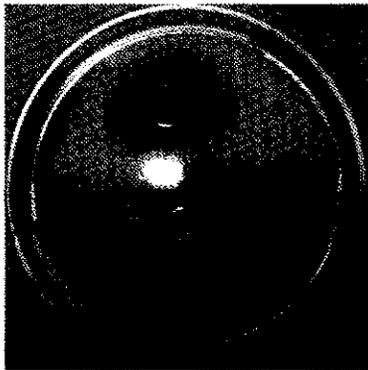


Fig.1: Halo de prueba (A), 25 mm de difusión y 16 mm de actividad antibacteriana. Halo de control (B), 40 mm de difusión y 21 mm de actividad antibacteriana. *Staphylococcus Auris*.

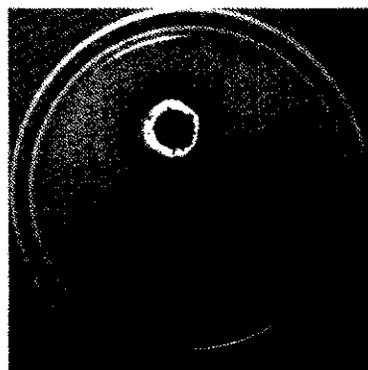


Fig. 2: Halo de prueba (A), 25 mm de difusión y 7 mm de actividad antibacteriana. Halo de control (B), 40 mm de difusión y 18 mm de actividad antibacteriana. *E.coli*.

Formulas 2, 02

Se observó falta de difusión del principio activo de la pasta formulada (prueba) y una inhibida actividad antibacteriana de grampositivos y gramnegativos frente a los extractos puros en polvo (control), cuyos halos van de 12 a 21 mm de diámetro, correspondiendo a *Pseudomona* y

Staphylococcus aureus respectivamente (figs 3 y 4).

Es probable que la vaselina haya impedido la liberación y difusión de Sangre de grado, resultando deficiente las pastas; por lo que fueron eliminados del proceso de la investigación



Fig. 3: Halo de prueba (A), falta de difusión e inactividad antibacteriana. Halo de control (B), 40 mm de difusión y 12 mm de actividad antibacteriana. *Pseudomona*.

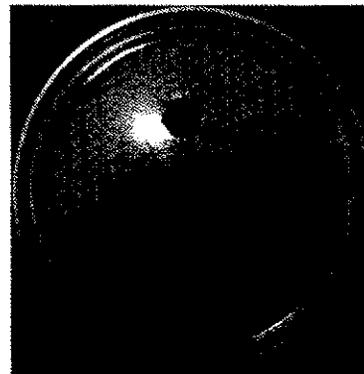


Fig. 4: Halo de prueba (A), falta de difusión e inactividad antibacteriana. Halo de control (B), 40 mm de difusión y 21 mm de actividad antibacteriana. *Staphylococcus Auris*.

Formulas 3, 03, 4, 04

Mostraron halos de liberación y difusión del principio activo de Sangre de grado que superan los 40 mm de diámetro en los extractos puros líquidos o en polvo (control), y de 30 a 35 mm de diámetro en las pastas 3 y 03 formuladas (prueba). Las pastas 4 y 04 mostraron halos de 28 mm de diámetro.

Los halos de inhibición de crecimiento bacteriano en las pastas 3 y 03 son 25 mm de diámetro frente a los extractos puros, líquidos y en polvo (control) y de 10 a 25 mm en las pastas formuladas (prueba), mostrando

una mayor actividad antimicrobiana frente a las bacterias grampositivos (*Staphylococcus aureus*) y una menor actividad sobre los gramnegativos (*E.coli*).

Los halos de inhibición en las pastas 4 y 04 fueron de 22 mm de diámetro frente al *Staphylococcus* y de 8 mm para el *E. Coli*.

En general estas formulaciones mostraron resultados mas consistentes debido a cantidades mas reducidas de goma tragacanto (1.5 gr.) y vaselina (2.5 gr.)

Discusión

Se prepararon 8 tipos de pastas con distintas formulaciones que fueron evaluados en su capacidad de difusión y condición antibacteriana frente al extracto puro de Sangre de grado en estado líquido y en polvo.

La capacidad de liberación y difusión del principio activo de las pastas formuladas a base de Sangre de grado luego de 72 horas de ser aplicadas en medio TSA fueron de resultados bastante consistentes, mostrando halos de difusión de 40 mm de diámetro, a excepción de aquellas que contienen 5.0 gr. de propilenglycol o 30 gr. de vaselina; determinándose su eliminación del proceso de investigación. Las pastas con formulaciones 3, 03, 4, 04 que contienen goma tragacanto son de mejores resultados por lo que son considerados en procesos de calibración reduciendo cantidades en gramos de goma tragacanto y vaselina en la formulación, hasta lograr que la liberación y difusión del principio activo llegue al 80% para su aplicación posterior en humanos.

La susceptibilidad de contaminación de las pastas según las formulaciones establecidas fueron nulas mostrándose consistentes en su actividad antibacteriana frente a grampo-sitivos y gramnegativos , en particular las pastas 3, 03, 4 y 04. los estudios de Zapata(1987)¹² Morales(1985)¹⁷ Nuestros resultados, de investigación anteriores²³, son confirmados por la presente.

Conclusiones

1. La goma tragacanto le confiere viscosidad a la Pasta formuladas
2. Es nula la susceptibilidad de contaminación inicial de las Pastas formuladas, sin embargo se

sugiere mantenerlas en refrigeración

3. Buena capacidad de liberación y difusión del principio activo y buena actividad antibacteriana de las pastas formuladas frente a grampositivos y gramnegativos.

Para evaluar la biodegradación y capacidad reparativa de las pastas formuladas se requiere continuar con la 2da etapa de la investigación

El propilenglicol y la vaselina en cantidades de 5.0 y 30 gr. respectivamente, dificultan la liberación del principio activo de la materia prima (Sangre de grado).

Referencias

1. Chithra P; Sajithlal GB; Chandrakasan G.: Influence of Aloe vera on collagen characteristics in healing dermal wounds in rats. India. J Mol Cell Biochem, 1998; 181:71-6, Apr.
2. Chithra P; Sajithlal GB; Chandrakasan G.: Influence of Aloe vera on the glycosaminoglycans in the matrix of healing dermal wounds in rats. India. J Ethnopharmacol, 1998; 59:179-86, Jan.
3. Klingenstrom P, Westermarck L.: Local tissue-oxygen tension after adrenaline and octapressin in local anesthesia. Act Anesth Scand; 1964; 8:261-266.
4. Waite, Daniel E.: Tratado de cirugía bucal práctica, Edit. Compañía Editorial Continental S.A. DE C.V. Mexico, 2da Edic., 1984; Pag. 236-239.
5. Tisirlis, Anastasios T., Iakovidis, Dimetrios P. y Parssis, Nikolaos A.: Alveolitis seca: frecuencia de presentación tras anestesia intraligamentosa. Quintessence (ed. esp.), 1994; Volumen 7. 5:305-307.
6. Birn H.: Etiology and pathogenesis of fibrinolytic alveolitis [«dry socket»], J.Int. J. Oral Surg., 1973; 2:211-267.
7. Arellano P.: El Libro Verde. Guía de Recursos Terapéuticos Vegetales. Ministerio de Salud. Lima - Perú. 1992, pp 33,46,53.
8. Aguilar C.A.: Plantas Tóxicas de México. Instituto Mexicano de Seguridad Social. México D.C., 1985
9. Barriga R.: Plantas útiles de la Amazonia peruana. CONCYTEC, Lima - Perú, 1994.
10. Ayala Salomón, Díaz David, Palomino Manuel, Armas Segundo, Paz Juan: Efecto Protector de Croton Palanostigma y Aloe vera frente a Injuria Aguda de Mucosa Gástrica inducida por Etanol en Ratas. Anales de la Facultad de Medicina. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 1999, Vol. 60, N°1.
11. Malaga E.: Efecto del clorhidrato de taspina sobre la curación de úlcera gástrica inducida en ratas. Tesis de bachiller en Biología. Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima Perú, 1991.
12. Zapata Cruz, Rosa Eivira: Actividad antimicrobiana in vitro de la droga comercializada como «Sangre de Grado». Tesis para optar el Título de Químico Farmacéutico. UNMSM. Lima-Perú, 1987.
13. Milla Comitre, Marcos Ernesto: Estudio sobre el mecanismo de acción del principio activo de la «Sangre de Grado». Tesis para optar el Grado de Bachiller en ciencias con mención en biología. UPCH. Perú, 1985.
14. Chen Z. P., Cai Y., Phillipson J. D.: Studies on the antitumor, antibacterial, and Wound-Healing properties of Dragon's Blood. Planta Médica, 1994, Vol 60(6):541-545.
15. Pieters L., De Bruyne T., Claeys M., Vlietinck A., Calomme M., vanden Berghe D.: Isolation of a Dihydrobenzofuran Lignan from South American Dragon's Blood (Croton spp) as an Inhibitor of Cell Proliferation. Journal of Natural Products, 1993, Vol 56(6):899-906.
16. Caro Medrano, V.: Reacción del tejido subcutáneo a los cementos de obturación a base de Bálsamo de Perú y Sangre de Grado en ratones Suizos. Tesis para optar el Grado de Bachiller. Facultad de Estomatología. Universidad Particular Cayetano Heredia (UPCH). Lima-Perú, 1985, Pp 53.
17. Zaravia Rojas, M. A.: Reacción anti-inflamatoria del tejido conjuntivo al cemento de obturación de conductos a base C. Lechleri («Sangre de Grado») en ratas de cepa Holtzman. Tesis para optar el Grado de Bachiller. Facultad de Estomatología. UPCH. Lima-Perú, 1985, Pp. 39
18. Morales Girbau, M. A.: Estudio clínico de los efectos de C. Draconoide M. Arg. («Sangre de Grado») en el tratamiento de alveolitis seca dolorosa. Tesis de Bachiller. Programa Académico de Estomatología. Universidad Particular Cayetano Heredia (UPCH). Lima-Perú, 1985, Pp 62.
19. Heller, A. I., Koenigs, J. K., Brilliant, J. D., Melfi, R. C., Driskell, T. D.: Direct pulp capping of permanent teeth in primates using a resorbable form of tricalcium phosphate ceramic. J. Endodon., 1975, 1:95-101.
20. Himel van T., Bardy, Jim, jr., Weir, Jim, jr.: Evaluation of pair of mechanical perforations of the pulp chamber floor using biodegradable tricalcium phosphate or calcium hydroxide. J. Endodon., 1985, 11:161-165, April.
21. Gálvez Luis H.: Efecto biológico del fosfato tricalcico balanceado en los defectos óseos periapicales. Odontología Sanmarquina 1998, 1(1):4-10
22. Gálvez, Luis H. y Fernández D. N.: Dentinogénesis en recubrimientos pulpaes con fosfato tricalcico. Estudio experimental en humanos. Rev. Theorema, UNMSM, 1996, 5(7): 7-12.
23. Gálvez Luis H.; Mendoza Rojas, Alejandro: Capacidad Bactericida de Pastas Experimentales Anti-A. Estudio In Vitro. Odontología Sanmarquina 2001, 1(7):7-16
24. Gálvez Luis H.; Sotomayor Tamayo, Justiniano; Villavicencio Gastelú, Jorge: Efecto reparativo de Pastas Experimentales Anti-A. Estudio In Vivo. Odontología Sanmarquina 2003, 6(11):11-17
25. Gálvez, Luis H. y Villavicencio Gastelú, Jorge: Fase aplicativa en humanos de las Pastas Experimentales Anti-A, IIE. FO. UNMSM. Arch. Personal, 2001-2003.