

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**E.A.P. DE ODONTOLOGÍA**

**Determinación de la actividad antibacteriana "in vitro" del extracto etanólico de la hoja de *Erythroxylum novogranatense* var *truxillense* (coca) frente a bacterias orales cariogénicas**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista

**AUTOR:**

Patricia Minaya Flores

**ASESOR:**

Elba Martínez Cadillo

**Lima – Perú**

**2008**

***"If you can dream it, you can do it"***

**Walt Disney**

# ÍNDICE

	Pág.
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>I. MARCO TEÓRICO</b>	<b>2</b>
<b>1.1 ANTECEDENTES</b>	<b>2</b>
<b>1.2 BASES TEÓRICAS</b>	<b>6</b>
<b>1.2.1 FORMACIÓN Y DESARROLLO DE LA PLACA DENTAL</b>	<b>6</b>
<b>1.2.1.1 Película acelular adquirida</b>	<b>6</b>
<b>1.2.1.1.1 Composición</b>	<b>7</b>
<b>1.2.1.2 Capa formada por microorganismos y                     polímeros extracelulares (factor microbiano)</b>	<b>8</b>
<b>1.2.1.2.1 Colonización primaria</b>	<b>8</b>
<b>1.2.1.2.2 Colonización secundaria:                     agregación antibacteriana</b>	<b>9</b>
<b>1.2.1.2.3 Colonización secundaria: multiplicación</b>	<b>11</b>
<b>1.2.2 CARIES DENTAL</b>	<b>12</b>
<b>1.2.3 MICROORGANISMOS RELACIONADOS CON CARIES DENTAL</b>	<b>13</b>
<b>1.2.3.1 <i>Streptococcus</i></b>	<b>13</b>
<b>1.2.3.1.1 <i>Streptococcus</i> del grupo <i>mutans</i></b>	<b>14</b>
<b>1.2.3.1.2 <i>Streptococcus</i> del grupo <i>mitis</i></b>	<b>17</b>
<b>1.2.3.1.3 <i>Streptococcus</i> del grupo <i>milleri</i></b>	<b>19</b>
<b>1.2.3.1.4 <i>Streptococcus</i> del grupo <i>salivarius</i></b>	<b>20</b>
<b>1.2.3.1.5 <i>Streptococcus</i> del grupo <i>sanguis</i></b>	<b>21</b>
<b>1.2.3.2 <i>Lactobacillus</i></b>	<b>22</b>

1.2.4	INHIBICIÓN QUÍMICA DE LA PLACA CARIOGÉNICA	25
1.2.5	LA <i>Erythroxyllum novogranatense</i> var. <i>truxillense</i> (COCA)	26
1.2.5.1	Generalidades	26
1.2.5.2	Botánica	26
1.3	DEFINICIÓN DE TÉRMINOS	28
II.	PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	29
2.1	ÁREA PROBLEMA	29
2.2	DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA	30
2.3	FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	32
2.4	OBJETIVOS	32
2.4.1	OBJETIVO GENERAL	32
2.4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
2.5	JUSTIFICACIÓN	32
2.6	LIMITACIONES	33
III.	MATERIAL Y MÉTODOS	34
3.1	TIPO DE ESTUDIO	34
3.2	POBLACIÓN Y MUESTRA	34
3.3	VARIABLES	35
3.4	PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS	35
3.4.1	OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO	35
3.4.2	PRUEBA MICROBIOLÓGICA	36
3.4.3	RECOLECCIÓN DE DATOS	38
3.4.4	PROCESAMIENTO DE LOS DATOS	39
IV.	RESULTADOS	40
V.	DISCUSIÓN	49
VI.	CONCLUSIONES	51
VII.	RECOMENDACIONES	51

<b>RESUMEN</b>	<b>52</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>54</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>53</b>

## RESUMEN

El objetivo de la investigación fue determinar la actividad antimicrobiana del extracto de la hoja de *Erythroxylum novogranatense var. truxillense* frente a bacterias relacionadas directamente con caries dental, a saber *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus casei*. Mediante la técnica de maceración alcohólica, filtrado y evaporación a 40 °C de la solución alcohólica, se obtuvo los principios activos totales del *Erythroxylum novogranatense var. truxillense*. Se utilizó 20 µl de agua destilada y alcohol de 96°, como control negativo y positivo respectivamente.

Al realizar las pruebas de sensibilidad se obtuvieron los siguientes resultados: Los diámetros de los halos de inhibición para *S. mutans* tuvieron una media de 34.4mm±2.12mm, y para el caso de *L. casei*, 33.7mm±3.40mm. Y con respecto a la medida de los halos de inhibición del control negativo y positivo se obtuvo una medida de 00 mm en todos los cultivos para el agua destilada y de 11.4mm±2.12mm en el caso del alcohol a 96°. Encontrándose que éstos difieren en forma estadísticamente significativa al 95% de confianza.

Palabras claves: coca, efecto antimicrobiano, *Erythroxylum novogranatense var. truxillense*, extracto alcohólico, bacterias cariogénicas, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*.

## ABSTRACT

The aim of the investigation was to determine the antimicrobial activity of the *Erythroxylum novogranatense var. truxillense* extract against teeth caries bacteria related, which are *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus casei*. Through an alcoholic oxidation technique, filtered and vaped at 40 °C, it was obtained the main actives components of *Erythroxylum novogranatense var. truxillense*. Sterilized water was used as negative control, and 96° alcohol as the positive one.

The disk diffusion method was performed to test antimicrobial activity. The following results were obtained during the performance of the sensibility tests: For *S. mutans* there was an average inhibiting halo of 34.4mm±2.12mm, and 33.7mm±3.40mm for *L. casei*. For control inhibition halos (positive and negative) there was an 00 mm in distilled water and 11.4mm±2.12mm for 96° alcohol.

This research was made with a 95% of statistics confidence and significant differences were found.

Key words: Coca, antimicrobial effect, *Erythroxylum novogranatense var. truxillens*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*.

## INTRODUCCIÓN

Una meta básica en medicina y en odontología es prevenir el inicio de las enfermedades y su posterior desarrollo. Las enfermedades bucodentales son un problema de salud de alcance mundial que afecta tanto a los países industrializados como a los países en desarrollo, en especial en las comunidades más pobres. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que más de 5.000 millones de personas en el planeta han sufrido caries dental.<sup>1</sup>

Perú es uno de los países donde la incidencia de los problemas de salud dental está llegando a niveles alarmantes, según datos del Ministerio de Salud, un 98% de la población está afectada por caries.<sup>2</sup>

Las principales causas de la caries dental son la mala nutrición –alto consumo de azúcares y falta de calcio y micronutrientes– y el hábito de higiene deficiente o inexistente. El control de la placa bacteriana se puede realizar a través de medios físicos así como químicos. Ejemplo de esto son los colutorios que en estos tiempos se observan en el mercado mundial, que tienen por principal componente a la clorhexidina al 0.12%. Sin embargo en años recientes se ha incrementado el interés del uso de extractos naturales como alternativa para el control de microorganismos patógenos al hombre.

Uno de estos extractos naturales es el de la hoja de *Erythroxylum novogranatense var. truxillense* (coca), que es utilizada en el chacchado por los pobladores de los Andes desde hace muchos siglos atrás presentando un bajo índice de lesiones cariosas.<sup>3,6,7,8</sup>

En tal sentido, se ha determinado la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la hoja de coca frente a bacterias relacionadas directamente con el proceso de caries dental, a saber *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus casei*.



## **I. MARCO TEORICO**

### **1.1 ANTECEDENTES**

Goicochea (1954) “Estudio de la cavidad bucal en los sujetos habituados a la masticación de hojas de coca en la hacienda Collambay – Trujillo” realizó el estudio en 30 masticadores, y halló que el número de piezas ausentes y caries es bajo en esta población, sin embargo la presencia de abrasión dentaria es alta.<sup>3</sup>

Ayala (1963) “Acción de la coca y la llipta frente al ácido láctico y pH de la saliva y la dentadura del aborígen del altiplano” realizó el estudio con 40 aborígenes, 20 masticadores de coca y 20 personas de control. Halló menor cantidad de lesiones cariosas pero mayor índice de abrasión en masticadores que en el grupo control.<sup>4</sup>

Úngaro (1972) “Patología oral en masticadores de hojas de coca” Evaluó 500 “chacchadores”, halló una prevalencia de caries del 68% en el grupo de estudio y 60% en el grupo control, sin embargo la abrasión era de 44.2% versus 0%.<sup>5</sup>

Coronel (1988) “Estudio comparativo de la prevalencia de caries, enfermedad periodontal y abrasión entre un grupo de sujetos con el hábito de masticación de hoja de coca y un grupo control en la comunidad de Apaycauchilla, provincia de Tarma” Estudió personas con un hábito de

“chacchado” de tiempo mayor a 10 años, su población comprendía a “chacchadores” de 30 a 35 años. El grupo de “chacchadores” fue de 30, e igual número para el grupo control. La abrasión dental y la enfermedad periodontal fueron mayores en el grupo de “chacchadores”, mientras que su CPOD fue menor.<sup>6</sup>

Navarro A. (1988) “Prevalencia de caries dental por superficie en sujetos con el hábito de masticar hojas de coca en el distrito de Palcamayo, provincia de Tarma, departamento de Junín”. Realizó el estudio con 67 personas (35 “chacchadores” y 32 controles) con un hábito mayor a 10 años, el CPO fue de 2.68 para el grupo de “chacchadores” y de 17,03 para el grupo control, también halló una mayor abrasión en el grupo estudiado.<sup>7</sup>

Pando (1988) “Estudio comparativo de la prevalencia de caries, enfermedad periodontal y abrasión en un grupo de sujetos con el hábito de masticación de coca y un grupo control en la comunidad de Punsay, provincia de Tarma” Evaluó 60 personas (30 masticadores y 30 controles) de 30 a 50 años de edad, con un hábito de chacchado mayor de 10 años. El índice de abrasión y enfermedad periodontal fue mayor en el grupo de masticadores y el CPOD menor que en los casos controles.<sup>8</sup>

Li Sing (1994) “Propiedades inhibitorias del crecimiento de hongos oportunistas *in vitro* de *Erythroxyllum coca* y *Erythroxyllum novogranatense var. truxillense* (Mate de coca)” Evaluó la inhibición a las siguientes

especies de hongos: *Alternaria*, *Aspergillus niger*, *Mucor mucus*, *Penicillium notatum* con la hoja de coca en concentraciones de 2,28 µg/ml a 57 µg/ml. La *Alternaria* y *Aspergillus Níger* presentaron alteraciones fenotípicas y genotípicas a 57 µg/ml, mientras que *Mucor mucus* presentó colonias pequeñas con despigmentación a 57 µg/ml, sin embargo *Penicillium notatum* no tuvo ninguna alteración.<sup>9</sup>

Castro y Chávez (1995) “Acción inhibitoria *in vitro* de *Erythroxylum lam. var. coca* y *Erythroxylum novogranetense var. truxillense* “mate de coca” frente a uropatógenos Gram negativos multirresistentes” No encontró un patrón específico de comportamiento inhibitorio frente a Gram negativos.<sup>10</sup>

Cam O. y Villanueva (1996) “Acción inhibitoria *in vitro* del extracto acuoso y extracto metanólico de la hoja de *Erythroxylum novogranatense (Morris) var. truxillense (Rugby)* frente a bacterias Gram negativos y Gram positivos” El autor halló inhibición progresiva frente a concentraciones variables que iban desde 50 – 100- 150- 200- 250 – 300 – 350 – 400 – 450 hasta 500 µg/ml.<sup>11</sup>

Mertz, M. y Reyes E. (1996) “Propiedades inhibitorias del crecimiento *in vitro* de Enterobacterias, cocos y bacillus de *Erythroxylum coca lam.* y *Erythroxylum novogranetense (Morris) var. truxillense Rugby* (mate de coca)” Halló inhibición del crecimiento en algunas de las cepas estudiadas: cocos y bacilos.<sup>12</sup>

Borrovic F. (2006) "Efecto antibacteriano del extracto alcohólico de la hoja de *Erythroxylum novogranetense* var. *truxillense* (coca) sobre flora mixta salival" halló efecto antibacteriano que se incrementaba a mayor concentración del extracto alcohólico de la hoja de coca, sobre cultivos de flora mixta salival.<sup>13</sup>

## **1.2 BASES TEÓRICAS**

### **1.2.1 FORMACIÓN Y DESARROLLO DE LA PLACA DENTAL**

La biopelícula que baña las superficies dentarias reciben el nombre de placa bacteriana o biofilm de placa dental, según la definición de la Organización Mundial de la Salud corresponde a una entidad bacteriana proliferante con actividad enzimática que se adhiere firmemente a las superficies dentarias y que por su actividad bioquímica y metabólica ha sido propuesta como el agente etiológico principal en el desarrollo de la caries dental.<sup>15</sup>

Su composición varía según el tiempo de maduración y la región de la pieza dentaria colonizada.

Se ha descrito como una estructura formada por dos matrices principales, a saber.

- a. La capa salival o película acelular adquirida.
- b. La capa formada por microorganismos y polímeros extracelulares.

#### **1.2.1.1 Película acelular adquirida**

La película acelular adquirida se define como una biopelícula delgada, amorfa y electrodensa inmediatamente adyacente a la superficie del esmalte. El grosor varía según su ubicación, pero se ha estimado en 1 a 2  $\mu\text{m}$ .

#### **1.2.1.1.1 Composición**

Numerosos estudios muestran que la película adquirida del esmalte se forma en no más de dos horas en una superficie dental limpia. Esta se denomina película temprana, carece de bacterias y sus productos están formados por proteínas y glucoproteínas. Esta película temprana muestra un alto contenido de treonina, serina y alanina pero menos prolina que la saliva, lo que indica que se lleva a cabo una absorción selectiva de los componentes salivales en la superficie dentaria.

En las películas las fosfoproteínas de la saliva participan en el proceso de remineralización-desmineralización y así controlan la solubilidad de las superficies mineralizadas y previenen la formación de cálculo.

Algunas enzimas presentes en esta película, como las glucosiltransferasas, contribuyen a facilitar la adhesión de los microorganismos a la superficie dental.

Con el tiempo la película temprana sufre modificaciones y se transforma en una película tardía en la que se asocian componentes de la saliva, productos bacterianos y exudado gingival.

### **1.2.1.2 Capa formada por microorganismos y polímeros extracelulares (factor microbiano)**

Son varios los mecanismos que intervienen en la colonización inicial de las superficies dentarias por las bacterias y en su desarrollo y multiplicación posterior, dentro de la placa, a saber:

- a. Adherencia a la película adquirida (colonización primaria)
- b. Agregación interbacteriana (colonización secundaria)
- c. Multiplicación (colonización secundaria)

#### **1.2.1.2.1 Colonización primaria**

Una vez establecida la película adquirida y en ausencia de una higiene oral adecuada, comienzan a depositarse las primeras poblaciones bacterianas en forma específica.

En un primer momento la colonización se efectúa sobre la base de estreptococos, especialmente *S. sanguis*.

La existencia de cargas negativas sobre las bacterias y las glucoproteínas tienden a dificultar la unión entre ambas. Sin embargo, los iones calcio presentes en la saliva pueden neutralizar las cargas y actuar como puentes entre la película y las bacterias; se forman agregados de glucoproteínas-calcio-bacterias.

El papel del *S. mutans* en esta fase es variable dado que hay placas no cariogénicas en las que se los encuentra en bajo número o ausentes. Esta situación se asocia con la escasa presencia de sacarosa en el medio bucal.

Se sabe que los componentes salivales adsorbidos sirven como receptores para las proteínas de unión de *S. mutans*, mientras que las glucosiltransferasas (Gtf) y los glucanos adsorbidos refuerzan esta adherencia. Estas observaciones ilustran la notable especificidad de las interacciones bacterianas en la película adquirida.

Es interesante mencionar la participación de las defensas del huésped, al estar presentes en la película anticuerpos naturales contra especies específicas, que realizarían uniones selectivas, especialmente para receptores del *S. mutans*.

También se han descrito proteasas específicas producidas por *S. sanguis* que inhibirían la acción antiadherente de las IgA.



#### **1.2.1.2.2 Colonización secundaria: agregación antibacteriana**

El desarrollo de la población bacteriana en la placa en transformación es un proceso progresivo durante el cual la placa aumenta en grosor y complejidad.

En esta etapa la placa sufre modificaciones estructurales, el mecanismo depende exclusivamente de la sacarosa y de la síntesis extracelular de polímeros de glucosa a partir del desdoblamiento de la sacarosa en glucosa y fructosa.

En presencia de sacarosa las cepas de *S. mutans* comienzan a sintetizar polisacáridos extracelulares conocidos como glucanos insolubles (mutanos), los que actúan como verdaderos adhesivos extracelulares. Estas bacterias cubiertas con glucanos se adsorben mucho más rápidamente sobre el esmalte dentario que otros microorganismos. Así pues, los estreptococos sintetizan su propia sustancia adhesiva que servirá para unirlos entre sí y al diente.

A medida que la placa crece se observa un cambio en los tipos morfológicos de las bacterias presentes.

### 1.2.1.2.3 Colonización secundaria: multiplicación

Al principio la biopelícula está formada por cocos grampositivos pero posteriormente se desarrolla una población compleja de otros cocos, bacilos y filamentos grampositivos.

Por otra parte las condiciones acidogénicas creadas por los colonizadores primarios facilitan el desarrollo de especies diferentes, tales como *Veillonella* y *Lactobacillus*, que prefieren un medio ácido para su desarrollo.

Esta etapa de marcado aumento en el grosor con incorporación y proliferación de diversos gérmenes, junto con el continuo depósito de glucoproteínas salivales y la persistente producción de mutano, permite la maduración bacteriológica y estructural.

En estas condiciones la placa es un conglomerado bacteriano proliferante y enzimáticamente activo que está fuertemente adherido a la superficie dentaria. Como toda estructura viviente para persistir necesita energía, la que toma de los hidratos de carbono fermentables provenientes de la dieta.

Los hidratos de carbono son desdoblados por la vía glucolítica, a través de esta vía la bacteria

obtiene ATP; además se forma CO<sub>2</sub> y ácido láctico, y en menor proporción otros ácidos orgánicos como ácido burítico, ácido acético, etc. Estos ácidos van a producir la desmineralización de los cristales de hidroxiapatita y así se iniciará el proceso carioso.

### **1.2.2 CARIES DENTAL**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha definido la caries dental como un proceso localizado de origen multifactorial que se inicia después de la erupción dentaria, determinando el reblandecimiento del tejido duro del diente y evoluciona hasta la formación de una cavidad. Si no se atiende oportunamente, afecta la salud general y la calidad de vida de los individuos de todas las edades.<sup>1</sup>

Fue Paul Keyes en 1960 quien en forma teórica y experimental estableció que la etiopatogenia de la caries obedece a la interacción simultánea de tres elementos o factores principales: un factor “microorganismo” que en presencia de un factor “sustrato” logra afectar a un factor “diente” (también denominado hospedero).

Si estos condicionantes confluyeran sólo durante un periodo muy breve la enfermedad cariosa no se produciría; por lo tanto, posteriormente se agregó un factor más: el tiempo de interacción de los mismos, así como diversas variables e interrelaciones que inciden como modificaciones de este proceso.<sup>14</sup>

## 1.2.3 MICROORGANISMOS RELACIONADOS CON CARIES DENTAL

### 1.2.3.1 *Streptococcus*

Los estreptococos, que son cocos anaerobios facultativos grampositivos agrupados en pares o cadenas, no esporulados e inmóviles que presentan un metabolismo fermentativo y sin anaerobios facultativos con requerimientos nutricionales complejos, constituyen el grupo más numeroso en la cavidad bucal; en los cultivos representan del 20 al 30% del total de las bacterias. Los estreptococos, que también se encuentran en el tracto respiratorio superior de los hombres y los animales, clásicamente han sido separados en tres subgrupos mayores sobre la base de su desarrollo en agar sangre:<sup>14</sup>

- Alfa hemolíticos. Producen hemólisis parcial; dan un área verde alrededor de las colonias bacterianas en el medio de cultivo.

- Beta hemolíticos. Producen hemólisis total; originan una zona clara alrededor de las colonias de cultivo.

- Gamma hemolíticos. No producen hemólisis

La mayoría de los estreptococos de la cavidad oral son considerados alfa hemolíticos: *S. salivarius* y *Streptococcus* de los grupos *mutans*, *milleri*, *mitis* y *sanguis*.

### 1.2.3.1.1 *Streptococcus* del grupo *mutans*

Estas especies han sido descritas por Clarke en 1924, a partir de caries de dentina.

Su primer hábitat es la superficie dentaria del hombre, pero también puede ser identificado en fauces. Su presencia en la placa bacteriana se ve favorecida por el alto nivel de sacarosa en la dieta.

La incidencia de *Streptococcus mutans* en la etiología de la caries dental ha sido demostrada por la producción de lesiones cariosas después de su introducción en la cavidad bucal de animales libres de gérmenes.

Esto fue corroborado cuando se comprobó que ante la acción de sustancias antisépticas como la clorhexidina el nivel de *S. mutans* decrecía y se observaba una disminución del número de caries, en los pacientes tratados con dicho antiséptico en relación con otros pacientes no tratados.

Los estudios epidemiológicos han demostrado una relación directa entre el número de *S. mutans* y la presencia de caries dental. En la actualidad esta relación se usa para predecir caries dental a partir de *S. mutans* recuperados de saliva. Los recuentos bacterianos altos como  $1 \times 10^6$  UFC

por mililitro de saliva, indican un alto riesgo de caries dental.

Los estreptococos del grupo *mutans* son genéticamente heterogéneos y pueden ser subdivididos en distintos tipos. Esto ha sido posible por medio del estudio de estructuras antigénicas que permiten reconocer 8 serotipos, designados por letras desde la **a** hasta la **h**.

Esta subdivisión puede ser confirmada por otras investigaciones, tales como análisis de la pared celular, electroforesis en gel de poliacramida, o proteínas a partir de células complejas, examen de las bases del DNA (porcentaje de guanina – citosina) y estudios de hibridación del DNA.

En estos serotipos es posible detectar ciertas diferencias fisiológicas, como fermentación e hidrolización de azúcares. Esto permite suponer que algunos de estos serotipos pueden ser considerados en otras subespecies o especies.

*S. mutans* puede ser asimilado con los serotipos c, e y f, es la especie más prevalente en el mundo, se encuentran en un nivel del 90% en los portadores de *Streptococcus* del grupo *mutans*. Debido a la habilidad de *S. mutans* para producir caries dentales en animales libres de gérmenes

(gnotobióticos) se lo describe como *S. mutans cariogénico*, esto se relaciona con su capacidad de producir ácido láctico al metabolizar la sacarosa.

*S. mutans* puede sintetizar polímeros extracelulares solubles (dextranos, fructanos) e insolubles (mutanos) a partir de sacarosa. Los polímeros insolubles desempeñan un papel fundamental en la adhesión de *S. mutans* a la superficie dentaria. Por este motivo no se lo aísla de la cavidad bucal antes de la erupción de los dientes temporarios.

La especie *S. sobrinus* (serotipos d y g) aparece con menor frecuencia (entre 7 y 35%) en esta población. Algunos investigadores lo presentan como una especie separada, estos generan ácido a partir de la fermentación del manitol, la inulina y la lactosa pero son variables con respecto a la fermentación del sorbitol. Sus cepas elaboran glucanos solubles e insolubles y dextranasas. Este microorganismo posee proteínas superficiales fijadoras de glucanos y otras que se comportan como adhesinas. Varias especies han demostrado cariogenicidad en animales gnotobióticos.

Las otras especies que conforman el grupo *mutans*, *S. rattus* (serotipo b), *S. cricetus* (serotipo

a), y *S. ferus* (serotipo c) y *S. macacae* y *downei* (serotipo h), muy rara vez han sido aisladas en seres humanos.

Se sabe que estas distintas especies o serotipos varían en diferentes partes del mundo.

El serotipo c es común en Europa y América del Norte, mientras que el serotipo b es frecuente en África del Norte. La razón de estas variaciones se desconoce. Además no todos los serotipos son igualmente efectivos en la producción de caries dental en el laboratorio.

#### **1.2.3.1.2 *Streptococcus* del grupo *mitis***

Se trata de un grupo conformado por *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis* tipo 2, *Streptococcus mitior* y *Streptococcus oralis*.

Los *S. mitis* son cocos grampositivos esféricos o elipsoides que forman largas cadenas y producen ácido a partir de la fermentación de la glucosa, la maltosa, la sacarosa y a veces la lactosa, pero no del manitol, la inulina, el sorbitol, el glicerol y la xilosa. Se han descrito dos biotipos. El biotipo 1 coloniza la mucosa de la cavidad bucal y forma parte inicial de la placa cariogénica de



superficies libres. El biotipo 2 se encuentra en el dorso de la lengua. Cuando se lo cultiva en agar sangre en aerobiosis *S. mitis* produce una marcada reacción alfa hemolítica.

Los *S. oralis* son microorganismos que consisten básicamente en cocos grampositivos en cadenas cortas sin cápsulas, ni movilidad, y son no esporulados, anaerobios facultativos, fermentativos y catalasa – negativos. Cuando son cultivados en agar sangre producen reacciones alfa hemolíticas. Se los aísla de la cavidad bucal de los seres humanos. Se trata de una de las primeras especies que coloniza la superficie dentaria. Esta nueva especie comparte algunas características con *S. milleri*, *S. sanguis* y *S. mutans*. Tiene actividad neuraminidásica y de IgA proteasa.

*S. mitior* consiste en cocos esféricos u ovoides que pueden ser encontrados aislados en pares o en cadenas. La mayoría de las cepas son hemolíticas en agar sangre pero otras pueden producir zonas claras de beta hemólisis. Todas las cepas fermentan la glucosa, la sacarosa y la maltosa y producen una cantidad muy pequeña de polisacáridos extracelulares que probablemente utilicen para adherirse a las superficies no

queratinizadas de la cavidad bucal (lengua, labios y mejillas) y no a las superficies dentarias.

#### **1.2.3.1.3 *Streptococcus* del grupo *milleri***

Este grupo constituido por *S. anginosus*, *S. MG*, *S. constellatus*, *S. intermedius* y *S. milleri*. Es posible que el miembro más definido sea *S. milleri* y algunas tendencias sugieren que todos estos estreptococos pueden ser incluidos dentro de esta especie.

*S. milleri* consiste en células esféricas u ovoides ubicadas en pares o cadenas (cortas o largas). La hemólisis en agar sangre es variable (alfa – beta – gamma). Estos microorganismos producen ácido a partir de la glucosa, la sacarosa y la maltosa, entre otras, pero son incapaces de elaborar polímeros a partir de la glucosa.

*S. milleri* tiene su hábitat natural en la cavidad bucal; puede ser aislado de la placa dental, del surco gingival y de la garganta. Estos gérmenes demuestran su cariogenicidad al ser introducidos en animales gnobióticos. Asimismo, también han sido aislados de abscesos en varias partes del cuerpo, como la boca, el cerebro, el hígado y el apéndice.

#### 1.2.3.1.4 *Streptococcus* del grupo *salivarius*

Conformado por dos especies: *S. salivarius* y *S. vestibularis*. Ambas especies colonizan superficies vestibulares.

Estos microorganismos aparecen como células esféricas u ovoides con cadenas de tamaño variable y pueden ser cultivadas en distintos medios, en presencia de oxígeno. La mayoría de las cepas son anhemolíticas en agar sangre, pero hay algunas que son alfa hemolíticas y beta hemolíticas. En agar sacarosa producen un polisacárido de la fructuosa, el levano, que es soluble.

*S. salivarius* es uno de los primeros microorganismos que infectan la cavidad bucal del niño después del nacimiento y puede encontrárselo en las hendiduras del dorso de la lengua y en la saliva. Algunas especies han sido aisladas de la sangre en pacientes con endocarditis infecciosa. *S. salivarius* no ha sido relacionado con la caries dental, razón por la cual se lo considera un verdadero comensal. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que algunas cepas han demostrado ser cariogénicas en animales gnotobióticos.

#### 1.2.3.1.5 *Streptococcus* del grupo *sanguis*

Este grupo está conformado por *Streptococcus sanguis* tipo 1, *S. gordonii* y *S. parasanguis* (muy similar al primero).

El *Streptococcus sanguis* tipo 1 tiene como primer hábitat a la placa dental, donde representa cerca de la mitad del total del número de estreptococos. Coloniza la cavidad bucal de los bebés después de la erupción dentaria y los estudios han demostrado que es el primer microorganismo que se instala en superficies dentarias limpias. Estos microorganismos que pueden ser aislados a partir de la sangre y de válvulas cardíacas en los casos de bacteremias y endocarditis infecciosa, consisten en células esféricas u ovals, en cadenas medianas o largas; la mayoría de las cepas son alfa hemolíticas, aunque también se han detectado cepas beta hemolíticas y gamma hemolíticas. Estos microorganismos producen glucanos solubles a partir de la sacarosa, generan peróxido de hidrógeno y tienen actividad de IgA proteasa y así pueden inhibir el desarrollo y la adherencia de otros microorganismos. Los receptores polisacáridos superficiales de *S. sanguis* interactúan con péptidos

de las fimbrias de otras bacterias y así promueven la agregación bacteriana. Se unen a la película adquirida y a superficies epiteliales a través de ácidos lipoteicoicos. Tienen su hábitat primario en la cavidad bucal, la faringe, la piel y el intestino.

El *S. gordonii* forma parte de placas supragingivales maduras. Produce polisacáridos extracelulares solubles (glucanos) y es incapaz de formar polisacáridos intracelulares. Genera peróxido de hidrógeno.

#### **1.2.3.2 *Lactobacillus***

Actualmente se aceptan unas 43 especies dentro del género *Lactobacillus*, nueve de las cuales pueden ser aisladas de la cavidad bucal. Las células tienen forma de bacilos y suelen agruparse en cadenas. El tamaño de las cadenas y cantidad de curvaturas dependen del medio de cultivo utilizado, del tiempo de incubación y de ciertos factores bioquímicos.

Se trata de microorganismos no esporulados e inmóviles: son grampositivos pero pueden tornarse gramnegativos en cultivos envejecidos.

Cada especie necesita complejos nutricionales propios.

Los lactobacilos tienen dos propiedades, a saber, son acidogénicos y acidúricos. Sobreviven y se reproducen en condiciones de acidez.

Con respecto a su reacción frente a la glucosa se pueden denominar “homofermentativas” a las especies que sólo producen ácido láctico y “heterofermentativas” a las que además de ácido láctico elaboran otros productos, como ácido acético, etanol y dióxido de carbono.

En la cavidad bucal se hallan especies de ambos grupos pero las “homofermentativas” son las más importantes en relación con la caries dental. Se les asocia con la progresión de la caries dental cuando el pH ya descendió a 5,4 o menos. Asimismo, son proteolíticas.

Aunque estas características son cariogénicas, los lactobacilos presentan poca afinidad por las superficies dentarias y en consecuencia no se los implica en el comienzo de las caries de esmalte; no obstante, son los primeros implicados en el avance de la caries de dentina, por lo que se les considera invasores secundarios. Estos microorganismos aprovechan las condiciones ácidas y la retentividad existente en la lesión cariosa.

Dependen fundamentalmente de la acción anterior de los estreptococos del grupo *mutans*. En estas circunstancias la detección de una alta concentración de lactobacilos (mayor

a 100000/mL) funcionaría como un excelente indicador del “riesgo de progresión” de las caries iniciales existentes.

En la cavidad bucal existen dos especies: *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus salivarius*; ambas son homofermentadoras y metabolizan la glucosa por la vía glucolítica del ciclo de Embden – Meyerhof, con elevada producción de ácido láctico.

Otras dos especies, representadas por *L. fermentum* y *L. brevis*, son heterofermentadoras y degradan la glucosa, producen ácido láctico, etanol o ácido acético. Además hay dos especies, *L. casei* y *L. plantarum*, que utilizan ambas vías para degradar la glucosa y que se denominan heterofermentadoras facultativas. De las cuales según estudios se ha determinado que *L. casei* es la más numerosa y comparte con los estreptococos del grupo *mutans* la capacidad de los miembros de la microbiota de la placa para fermentar el sorbitol y el manitol.

Las restantes especies que han sido aisladas de la cavidad bucal incluyen *L. crispatus*, *L. glasseri* (homofermentativas) y *L. buchneri* (heterofermentativas), pero respecto a su patogenicidad no hay evidencias.

Se sabe que la restricción de carbohidratos en la dieta en general disminuye considerablemente la actividad cariosa y el número de lactobacilos presentes en saliva.

#### 1.2.4 INHIBICIÓN QUÍMICA DE LA PLACA CARIOGÉNICA

El control químico de la placa organizada resulta poco efectivo ante la resistencia que opone esta verdadera biopelícula a la acción de los antimicrobianos. Como contrapartida, una eliminación exagerada de la microbiota bucal puede determinar la colonización y la proliferación de microorganismos oportunistas tales como *Candida* y coliformes.<sup>15</sup>

El antimicrobiano ideal tendría las siguientes características:

- Debe eliminar rápidamente la placa organizada.
- Debe inhibir la formación de nueva placa
- No debe ser tóxico
- No debe de poseer efectos secundarios adversos
- Debe tener características organolépticas aceptables
- Debe poseer sustentividad
- No debe ser inactivado por productos de los microorganismos o el hospedero
- No debe originar resistencia bacteriana
- Debe alterar en forma mínima la microbiota asociada con la salud
- No debe ser carcinogénico



## 1.2.5 LA *Erythroxylum novogranatense* var. *truxillense* (COCA)

### 1.2.5.1 Generalidades

La hoja de coca es un elemento básico en las comunidades andinas, es tradicional y la más importante. Todos los actos y costumbres de las personas andinas están ligados íntimamente a la coca, esencial en la práctica de medicina, actos religiosos, sociales, económicos, políticos, familiares y cotidianos. Consumida por los aborígenes de los Andes, la coca viene a ser desde tiempos remotos, un elemento insustituible de sus vidas.<sup>18</sup>

El masticado o chacchado de las hojas de coca es muy habitual en los Andes, la cantidad y frecuencia del consumo de la coca está en relación directa con la clase de actividad desarrollada, que por lo regular es constante y diaria.<sup>18</sup>

### 1.2.5.2 Botánica<sup>19</sup>

Reino	:	Vegetal
División	:	Discifloras
Subdivisión	:	Displotemonas
Clase	:	Dicotiledóneas
Orden	:	Gerianales

Familia : Erythroxylaceae

Género : Erythroxylum

Especie : *Erythroxylum novogranatense* var.  
*truxillense*

La planta de la coca es un arbusto o arbolillo muy ramificado, con hojas alternas de formas entre oval, lanceolada y elíptica, rematadas en punta, sin un solo pelo y con una característica nerviación reticular que resalta mucho por el envés. Estas hojas, que miden de 6 a 10 cm de longitud por 2 a 4 de anchura, tiene el haz verde brillante, mientras que el envés se presenta un tanto grisáceo. Las flores son pequeñas. Crece en las montañas del Perú y Bolivia a 1000-1200 metros de altitud. Las hojas contienen alcaloides, taninos y flavonoides.<sup>17</sup> Las propiedades anestésicas y estupefacientes de las hojas se deben principalmente a la cocaína. La cocaína (benzoil-metilecgonina) tiene numerosas aplicaciones en farmacología y medicina, especialmente como anestésico.

### 1.3 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

**Extracto:** Sustancia que, en forma concentrada, se extrae de otra, de la cual conserva sus propiedades.

**Cariogénico:** Que es capaz de producir o inducir la producción de caries dental.

**Chacchar:** Masticar hojas de coca seca, haciendo un bolo que, de cuando en cuando se le añade toques de cal molida.

**Actividad antibacteriana:** Es la capacidad que presenta un compuesto para inhibir el aumento de una población bacteriana o para eliminarla.

**Medio de Cultivo:** Es el conjunto de nutrientes y sustratos que permiten el crecimiento la multiplicación y el aislamiento de las diferentes especies bacterianas para llegar a su identificación y otros estudios complementarios, tales como su comportamiento frente a los antimicrobianos.

## II. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

### 2.1 ÁREA PROBLEMA

La hoja de coca ha estado presente desde culturas prehispánicas en la vida de los pobladores de los Andes, y con ella todos sus efectos benéficos en la salud de estos. Se la relaciona con su vida cultural, religiosa, política, social y laboral, casi en todos los aspectos de su vida cotidiana.

Era considerada una planta sagrada, pero en nuestros días se ha visto mitificada como dañina y peligrosa, restando importancia a sus propiedades farmacéuticas.

Sin embargo, no es casual la relación que existe entre los pobladores andinos y su bajo índice de caries dental, ya ha sido comprobado mediante diversos estudios que las poblaciones consumidoras de coca bajo la modalidad del chacchado presentan menos lesiones cariosas que otras poblaciones.

La caries dental es y ha sido la enfermedad bucal más prevalente en el Perú y el mundo, se sabe que es una enfermedad multifactorial, y uno de esos factores es la presencia de microorganismos en saliva y placa dental que aprovechando la susceptibilidad del huésped inician su acción.

Hoy en día se prefieren usar productos naturales en la prevención de enfermedades, y estos han resultado poseer una importante acción como agentes antimicrobianos. En la Odontología Preventiva como ejemplos podemos citar los extractos de *Celastrus scandens*, *Chamaebatia foliolosa*, *Digitaria sanguinalis*, *Ginkgo biloba*, *Juniperous virginiana*,

*Anacardium occidentale* L. e *Ilex paraguayensis* St. Hil., o mate de té, quienes son probadamente efectivos contra *Streptococcus mutans*.

Mediante estudios experimentales microbiológicos se sabe que la coca posee un efecto antibacteriano sobre flora mixta salival, pero se desconoce los microorganismos específicos sobre los que actúa.

El reconocimiento de este efecto antibacteriano dará la posibilidad de que este sea usado como principio activo en cremas y enjuagatorios dentales donde siempre se encuentran compuestos con efecto antibacteriano sobre los microorganismos bucales, que frecuentemente contienen surfactantes, alcohol, fluoruros y agentes antimicrobianos.

De esta manera la hoja de coca sería utilizada para prevenir la caries dental por medio de la inhibición química de la placa bacteriana, ayudando a la eliminación mecánica realizada al adquirir un hábito de higiene oral adecuado, con el cepillo y la crema dentales y el hilo dental.

## **2.2 DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA**

Los agentes activos en muchas sustancias vegetales han sido aislados y utilizados como agentes antimicrobianos.

En el caso de la hoja de *Erythroxylum novagrenatense* var. *truxillense*, esta poseería propiedades antimicrobianas con las que evitaría la caries dental, pero esta afirmación aún no es sostenida científicamente.

La hoja de *Erythroxylum novagrenatense* var. *truxillense* podría actuar de diferentes maneras para poder inhibir la formación de la placa bacteriana cariogénica que origina la caries dental: inhibiendo la enzima glucosiltransferasa, interfiriendo sobre las moléculas involucradas en la

adhesión y la coagregación bacteriana o como agente antiséptico antibacteriano interfiriendo sobre el metabolismo bacteriano.

Las propiedades adhesivas de las bacterias cariogénicas son en muchos casos su principal arma de acción. Las moléculas involucradas son adhesinas, polisacáridos extracelulares y glucanos insolubles.

Debería a su vez presentar la capacidad de mantener su actividad antimicrobiana por varias horas, adhiriéndose a superficies bucales que actuarían como reservorios a partir de los cuales se liberaría lentamente y así prolongaría su efecto. Propiedad conocida como sustantividad.

Su modo de acción debería darse sobre las principales bacterias cariogénicas, a saber, *Streptococcus mutans*, quien gracias a sus propiedades adhesivas dan inicio a la placa bacteriana organizada; y *Lactobacillus casei* por su cualidad invasiva y retentividad en la lesión cariosa. Sin embargo su acción no debería alterar o al menos hacerlo en forma mínima la microbiota oral asociada con la salud y sin afectar al hospedero.

A través de la determinación de la actividad antimicrobiana de la hoja de *Erythroxylum novagrenatense var. truxillense* sobre estas especies bacterianas se puede determinar si esta sería útil para crear un producto que actúe como agente antiséptico.

## 2.3 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Cuál es la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la hoja *Erythroxylum novagrenatense* var. *truxillense* sobre las principales bacterias cariogénicas, a saber *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus casei*?

## 2.4 OBJETIVOS

### 2.4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la hoja *Erythroxylum novagrenatense* var. *truxillense* sobre las principales bacterias cariogénicas, a saber, *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus casei*.

### 2.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la hoja *Erythroxylum novagrenatense* var. *truxillense* sobre *Streptococcus mutans*.

Determinar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la hoja *Erythroxylum novagrenatense* var. *truxillense* sobre *Lactobacillus casei*.

## 2.5 JUSTIFICACIÓN

La hoja de coca posee un efecto antibacteriano que podría ser utilizado en cremas dentales y enjuagatorios bucales, si es que se llegara a conocer a qué microorganismos específicamente inhibe y si estos están implicados con el proceso de caries dental.

## **2.6 LIMITACIONES**

Debido al presupuesto del estudio, se abarcó únicamente a las dos bacterias orales con mayor implicancia en el proceso de caries dental.



### III. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 TIPO DE ESTUDIO

Esta investigación fue de tipo cuasi-experimental, transversal y prospectivo.

- **Cuasi-Experimental:** Porque casi alcanza el nivel experimental.
- **Transversal:** Porque los datos fueron registrados en un solo momento.
- **Prospectivo:** Porque los datos fueron registrados según ocurrieron los fenómenos.

#### 3.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

Se trabajó con cepas estándares de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Lactobacillus casei* ATCC 393 procedentes del American Type Culture Collection.

### 3.3 VARIABLES

Variables	Conceptualización	Indicador	Escala	Categorías
<b>Extracto etanólico de la hoja de <i>Erythroxylum novogranatense</i> var. <i>truxillense</i></b>	Es la totalidad de principios activos extraídos de la hoja de coca <i>Erythroxylum novogranatense</i> var. <i>truxillense</i> mediante un proceso de extracción.	Discos embebidos en el extracto etanólico de la hoja de <i>Erythroxylum novogranatense</i> var. <i>truxillense</i> .		Si / No
<b>Especie bacteriana</b>	Es el conjunto de microorganismos que pertenecen a la misma especie.	Cultivos bacterianos	Nominal	<i>S. mutans</i> <i>L. casei</i>
<b>Actividad antimicrobiana (Variable dependiente)</b>	Es la inhibición del desarrollo o crecimiento de las bacterias debido a la acción del extracto etanólico de la hoja de <i>Erythroxylum novogranatense</i> var. <i>truxillense</i> .	Diámetro (en mm) del halo de inhibición formado alrededor del disco embebido en el extracto etanólico de la hoja de <i>Erythroxylum novogranatense</i> var. <i>truxillense</i> .	Razón	

### 3.4 PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS

#### 3.4.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO

El extracto etanólico de la hoja de *Erythroxylum novogranatense* var. *truxillense* procedente del valle de La Convención (Cuzco) proporcionada por la Empresa Nacional de la Coca (ENACO), se obtuvo con el siguiente procedimiento.

La cantidad de 30g de material vegetal secado y molido, fue extraído con etanol mediante maceración a temperatura ambiente toda la noche en un ambiente oscuro. Luego estos extractos se

agitaron a 200 rpm durante 30 minutos sobre un baño María, a una temperatura de 60 ° C; se filtraron al vacío y se concentraron a presión reducida a una temperatura no mayor de 40 ° C. El residuo se llevó a un volumen de 10 ml con el solvente empleado, llamándose a este extracto concentrado y a partir del mismo se preparó una dilución de 9:10.<sup>20</sup>

### **3.4.2 PRUEBA MICROBIOLÓGICA**

Mediante el método de difusión en placa, usando las cepas patrón liofilizadas de *S. mutans* ATCC 25175 y *L. casei* ATCC 393; se les sometió a la acción antibacteriana del extracto etanólico de la hoja de *Erythroxylum novogranatense var. truxillense*. Para los efectos de contar con referentes, se usó el alcohol al 96%, solvente del extracto, como testigo positivo y al agua destilada como testigo negativo. (Ver FOTOS 1, 2, 3)

Para esta técnica se realizó en primer lugar la reconstitución de las cepas estándar procedentes de la American Type Culture Collection sembrándolas en Agar sangre en el caso del *S. mutans* y en Agar Rogosa – Mitchell – Wiseman para el *L. casei*. Se llevó a incubadora a 37 °C por el lapso de 48 horas.

Al cabo de este periodo se diluyó en suero fisiológico aproximadamente 20 colonias aisladas de *S. mutans* ajustando el inóculo al patrón de turbidez Mac Farland N° 0,5. Bajo condiciones estériles, con una micropipeta se sembró en la superficie de cada uno de los 10 Agares Mitis Salivarius 100µL del inóculo, esparciéndolos con un hisopo estéril. (Ver FOTOS 5, 6)

Para aislar *S. mutans* se utiliza Agar Mitis Salivarius enriquecido con sacarosa al que se le añade bacitracina (MSB), en condiciones de anaerobiosis la que facilita su crecimiento. El agar MSB contiene Agar Mitis Salivarius (5% de sacarosa y telurio potásico, azul tripán y cristal violeta) más 0.2 µg/mL de bacitracina y 15 % más de sacarosa.

En el caso del *L. casei*, se diluyó 10 colonias aisladas ajustando el inóculo al patrón de turbidez Mac Farland N° 3. Bajo condiciones estériles con una micropipeta se sembró en la superficie de cada uno de los 10 Agares Rogosa – Mitchell - Wiseman 100µL del inóculo, esparciéndolos con un hisopo estéril. (Ver FOTOS 7, 8, 9)

El medio adecuado para el desarrollo de *L. casei* es el agar y caldo Rogosa – Mitchell – Wisemann, cuyo pH es de 5.4, lo que facilita su carácter selectivo para lactobacilos.

El agar Rogosa – Mitchell – Wisemann contiene: peptona de caseína 10.0, extracto de levadura 5.0, D (+) glucosa 20.0, fosfato de dihidrógenos de potasio 6.0, citrato de amonio 2.0, Tween 80 1.0, acetato de sodio 15.0, sulfato de magnesio 0.575, iron (II) sulfato 0.034, sulfato de manganeso 0.12, agar – agar 15.0.

Con pinzas estériles se procedió a colocar en cada placa 3 discos de papel filtro embebidos en 20 µL de agua estéril, etanol al 96% y el extracto etanólico de la hoja de *Erythroxyllum novogranatense var. truxillense*, respectivamente. (Ver FOTO 11)

Posteriormente, los medios de cultivo inoculados se incubaron a 35°C durante 48 horas en condiciones anaerobias, en una atmósfera de 5% de dióxido de carbono. (Ver FOTOS 12, 13)

Finalizado el periodo de incubación se realizó la lectura de los diámetros de cada halo con una regla milimetrada.

### 3.4.3 RECOLECCIÓN DE DATOS

Los datos fueron vertidos en la siguiente tabla.

Muestra	<i>Streptococcus mutans</i>			<i>Lactobacillus casei</i>		
	Agua estéril	Alcohol 96%	Extracto etanólico	Agua estéril	Alcohol 96%	Extracto etanólico
<b>1</b>	0 mm	11 mm	32mm	0 mm	9mm	31mm
<b>2</b>	0 mm	12mm	33m	0 mm	10mm	36mm
<b>3</b>	0 mm	17mm	35mm	0 mm	12mm	37mm
<b>4</b>	0 mm	8mm	32mm	0 mm	16mm	40mm
<b>5</b>	0 mm	15mm	35mm	0 mm	12mm	34mm
<b>6</b>	0 mm	18mm	38mm	0 mm	12mm	29mm
<b>7</b>	0 mm	17mm	37mm	0 mm	13mm	33mm
<b>8</b>	0 mm	16mm	32mm	0 mm	9mm	35mm
<b>9</b>	0 mm	18mm	35mm	0 mm	11mm	32mm
<b>10</b>	0 mm	11mm	35mm	0 mm	10mm	30mm

#### 3.4.4 PROCESAMIENTO DE LOS DATOS

Para el procesamiento de los datos obtenidos se utilizaron métodos estadísticos con el programa SPSS 15.0. Primero se aplicó la prueba de Kolmogorov – Smirnov para evaluar si los datos obtenidos tenían una distribución normal.

Debido a que los datos resultaron tener una distribución normal, se aplicó la prueba T-STUDENT para evaluar si existía diferencia estadísticamente significativa entre los halos de inhibición del alcohol a 96% y los producidos por el extracto etanólico de la hoja de *Erythroxylum novogranatense var. truxillense*

#### IV. RESULTADOS

CUADRO 1. HALOS DE INHIBICIÓN DEL ALCOHOL AL 96° Y DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA HOJA DE *Erythroxyllum novogranatense var. Truxillense* EN LOS CULTIVOS DE *S. mutans* Y *L. casei*

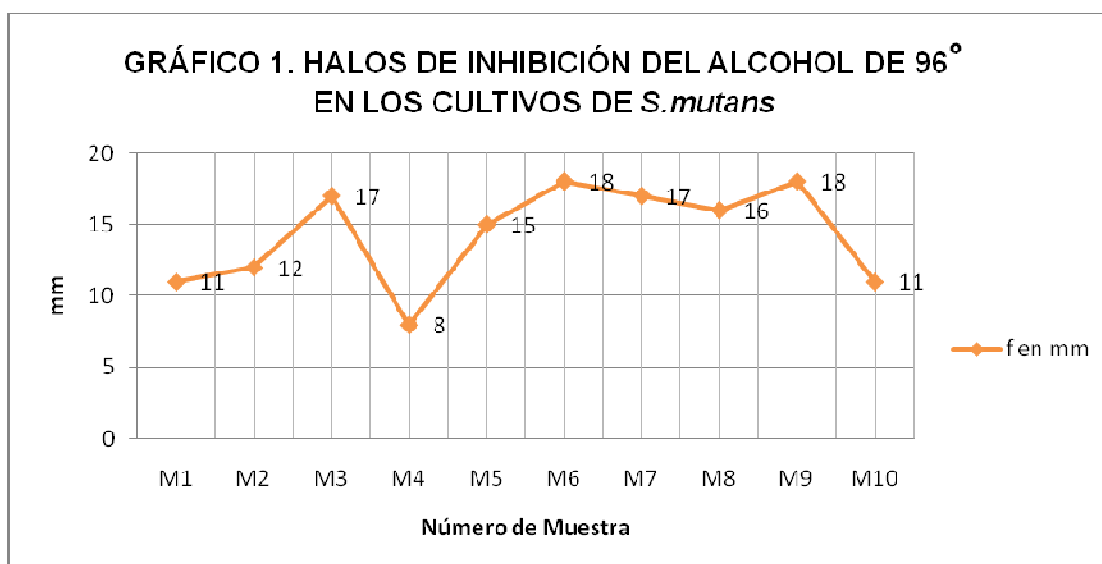
Valores estadísticos	<i>S. mutans</i>		<i>L. casei</i>	
	Alcohol 96°	Extracto Etanólico de Hoja de <i>Erythroxyllum novogranatense var. truxillense</i>	Alcohol 96°	Extracto Etanólico de Hoja de <i>Erythroxyllum novogranatense var. truxillense</i>
Media	14.3	34.4	11.4	33.7
Desviación Estándar	3.590391217	7.626508793	2.053821272	7.840454532
Mediana	15	35	11	33
Moda	11	35	12	
Varianza	12.45555556	4.488888889	4.488888889	11.56666667
Rango	0.074		0.222	
Mínimo	8	32	9	29
Máximo	18	38	16	40
Suma	143	344	114	337

En el Cuadro 1 se observan las medias de los halos de inhibición del alcohol en los cultivos de *S. mutans*, siendo de 14,3 mm, y en el caso de los cultivos de *L. casei* es de 11,4 mm. Los halos de inhibición del extracto etanólico de la hoja de *Erythroxyllum novogranatense var. truxillense* en los cultivos del *S. mutans* es de 34,4 mm y en los de *L. casei* es de 33.7 mm

Coincidentemente, la varianza de los halos de inhibición del extracto etanólico de la hoja de *Erythroxyllum novogranatense var. truxillense* en los cultivos de *S. mutans* es igual a la del alcohol de 96° en los cultivos de *L. casei*.

CUADRO 2. FRECUENCIA DE LOS DE INHIBICIÓN DEL ALCOHOL 96° EN  
LOS CULTIVOS DE *S. mutans*

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	8.00	1	10.0	10.0	10.0
	11.00	2	20.0	20.0	30.0
	12.00	1	10.0	10.0	40.0
	15.00	1	10.0	10.0	50.0
	16.00	1	10.0	10.0	60.0
	17.00	2	20.0	20.0	80.0
	18.00	2	20.0	20.0	100.0
	Total	10	100.0	100.0	

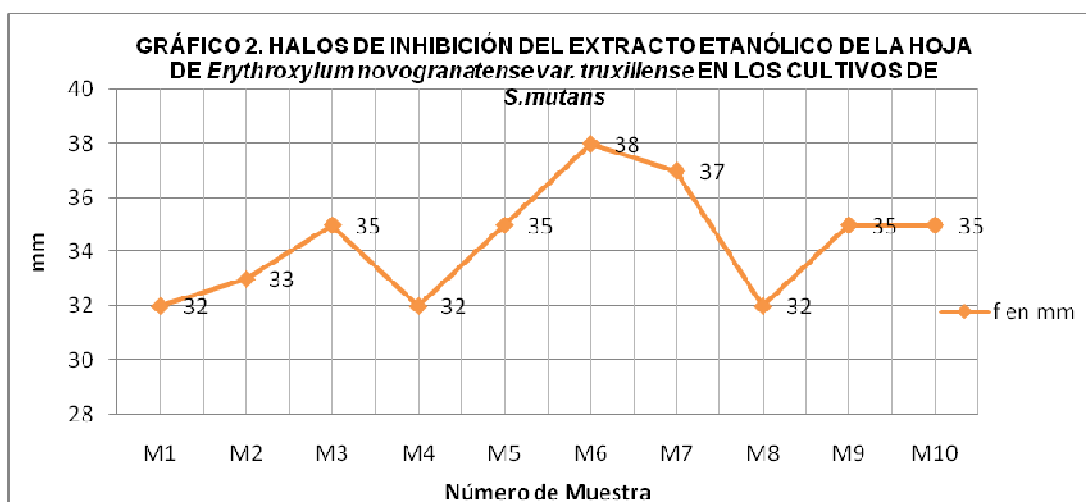


Se observa el valor mínimo de los halos de inhibición del alcohol de 96° es de 8mm y el mayor, de 18 mm en los cultivos de *S. mutans*.



CUADRO 3. FRECUENCIA DE LOS DE INHIBICIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA HOJA DE *Erythroxyllum novogranatense var. truxillense* EN LOS CULTIVOS DE *S. mutans*

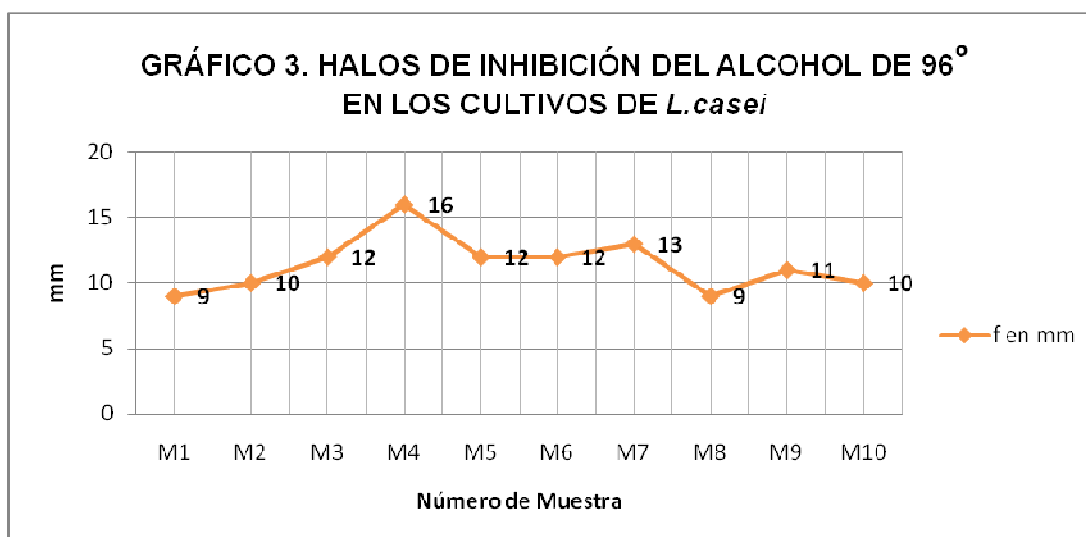
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	32.00	3	30.0	30.0	30.0
	33.00	1	10.0	10.0	40.0
	35.00	4	40.0	40.0	80.0
	37.00	1	10.0	10.0	90.0
	38.00	1	10.0	10.0	100.0
Total		10	100.0	100.0	



Se observa el valor mínimo de los halos de inhibición del extracto etanólico de la hoja de *Erythroxyllum novogranatense var. truxillense* es de 32mm y el mayor, de 38 mm en los cultivos de *S. mutans*.

CUADRO 4. FRECUENCIA DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DEL ALCOHOL 96°  
EN LOS CULTIVOS DE *L. casei*

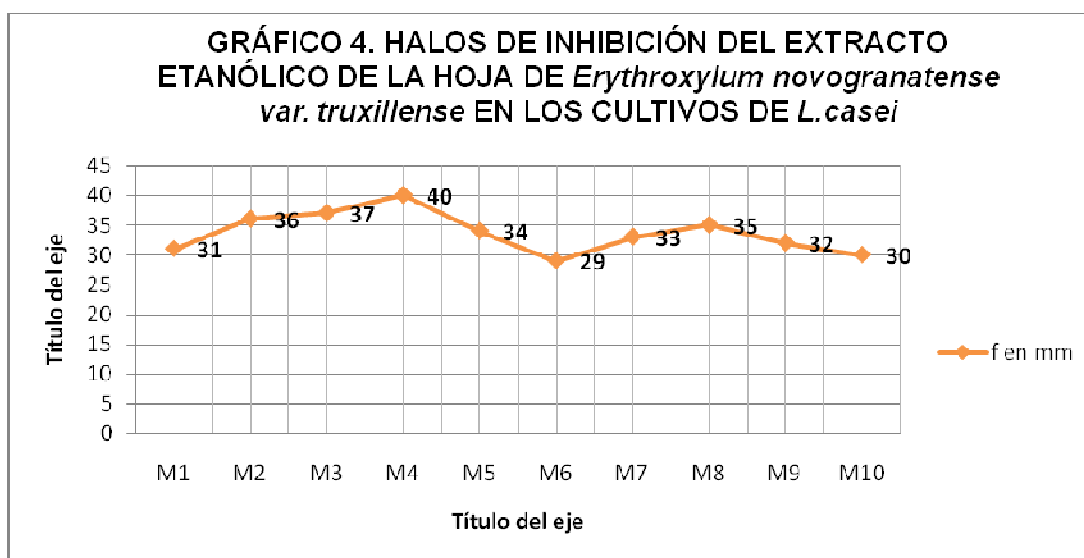
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	9.00	2	20.0	20.0	20.0
	10.00	2	20.0	20.0	40.0
	11.00	1	10.0	10.0	50.0
	12.00	3	30.0	30.0	80.0
	13.00	1	10.0	10.0	90.0
	16.00	1	10.0	10.0	100.0
Total		10	100.0	100.0	



Se observa el valor mínimo de los halos de inhibición del alcohol de 96° es de 9mm y el mayor, de 16 mm en los cultivos de *L. casei*.

CUADRO 5. FRECUENCIA DE LOS DE INHIBICIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA HOJA DE *Erythroxyllum novogranatense var. truxillense* EN LOS CULTIVOS DE *L. casei*

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	29.00	1	10.0	10.0	10.0
	30.00	1	10.0	10.0	20.0
	31.00	1	10.0	10.0	30.0
	32.00	1	10.0	10.0	40.0
	33.00	1	10.0	10.0	50.0
	34.00	1	10.0	10.0	60.0
	35.00	1	10.0	10.0	70.0
	36.00	1	10.0	10.0	80.0
	37.00	1	10.0	10.0	90.0
	40.00	1	10.0	10.0	100.0
	Total	10	100.0	100.0	



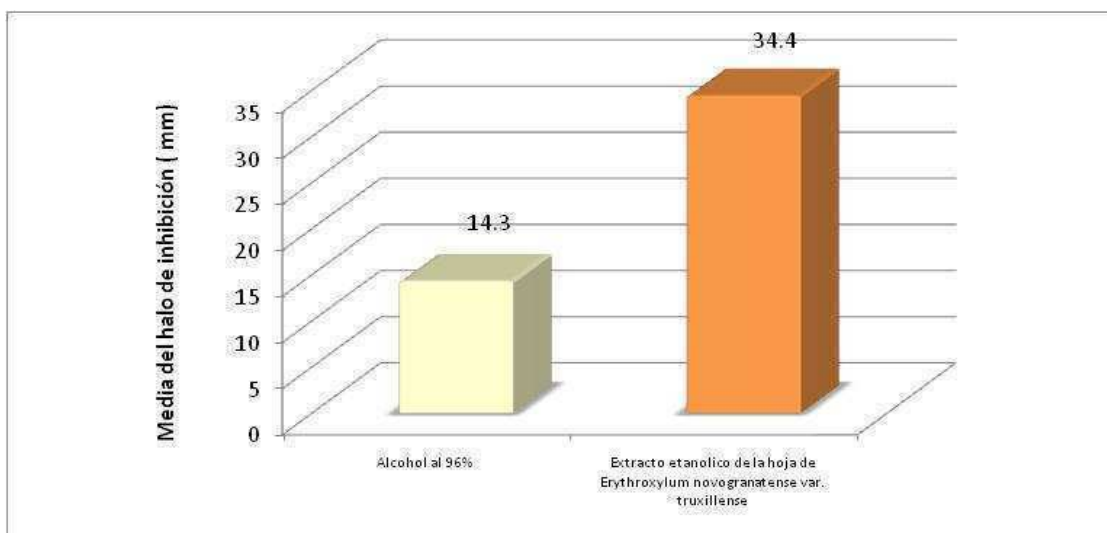
Se observa el valor mínimo de los halos de inhibición del extracto etanólico de la hoja de *Erythroxyllum novogranatense var. truxillense* es de 29mm y el mayor, de 40 mm en los cultivos de *L. casei*.

CUADRO 6. COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DEL ALCOHOL AL 96° Y DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA HOJA DE *Erythroxyllum novogranatense var. truxillense* EN LOS CULTIVOS DE *S. mutans*

Grupo	N	Media	Desviación estándar	T	P
Alcohol al 96%	10	14.3	3.53	15.44	0.000*
Extractor etanólico de la hoja de <i>Erythroxyllum novogranatense var. truxillense</i>	10	34.4	2.12		

\*P=0.0000<0.05 se encontró diferencias significativas

GRÁFICO 5. COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DEL ALCOHOL AL 96° Y DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA HOJA DE *Erythroxyllum novogranatense var. truxillense* EN LOS CULTIVOS DE *S. mutans*



Se observa que la media del halo de inhibición del alcohol al 96° es de 14.3mm±3.53mm y la media de los halos de inhibición del extracto etanólico de la hoja de *Erythroxyllum novogranatense var. truxillense* es de 34.4mm±2.12mm. Se observa que el extracto etanólico de la hoja de *Erythroxyllum novogranatense var. truxillense* tiene mayor efecto antimicrobiano existiendo diferencia significativa, con un valor de  $P < 0.05$  con relación al alcohol al 96°, en los cultivos de *S. mutans*.

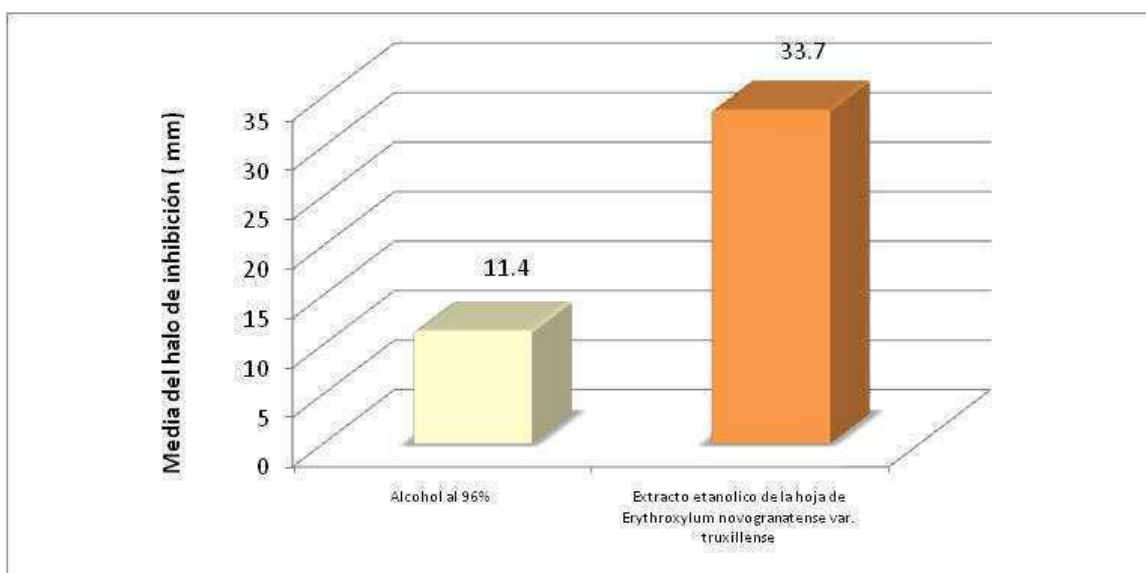
En el Gráfico 5 podemos observar las barras que representan a la media de los halos de inhibición. La barra que se encuentra a la derecha representa al extracto de la hoja de *Erythroxyllum novogranatense var. truxillense*.

CUADRO 7. COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DEL ALCOHOL AL 96° Y DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA HOJA DE *Erythroxyllum novogranatense var. truxillense* EN LOS CULTIVOS DE *L. casei*

Grupo	N	Media	Desviación estándar	T	P
Alcohol al 96%	10	11.4	2.12	17.59	0.000*
Extractor etanólico de la hoja de <i>Erythroxyllum novogranatense var. truxillense</i>	10	33.7	3.40		

\*P=0.0000<0.05 se encontró diferencias significativas

GRÁFICO 6 COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DEL ALCOHOL AL 96° Y DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA HOJA DE *Erythroxyllum novogranatense var. truxillense* EN LOS CULTIVOS DE *L. casei*



Se observa que la media del halo de inhibición del Alcohol al 96° es de  $11.4\text{mm}\pm 2.12\text{mm}$  y la media de los halos de inhibición del extracto etanólico de la hoja de *Erythroxyllum novogranatense var. truxillense* es de  $33.7\text{mm}\pm 3.40\text{mm}$ . Se observa que el extracto etanólico de la hoja de *Erythroxyllum novogranatense var. truxillense* tiene mayor efecto existiendo diferencia significativa, con un valor de  $P < 0.05$  con relación al alcohol al 96°, en los cultivos de *L. casei*.

En el Gráfico 6 podemos observar las barras que representan a la media de los halos de inhibición. La barra que se encuentra a la derecha representa al extracto de la hoja de *Erythroxyllum novogranatense var. truxillense*, se evidencia la marcada diferencia entre las medias de los halos de inhibición.

## V. DISCUSIÓN

La investigación tuvo por objetivo demostrar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la hoja de *Erythroxylum novogranatense var. truxillense*, sobre las bacterias estudiadas: *S. mutans* y *L. casei* lo que quedó comprobado por medio de los análisis estadísticos, ya que se encontró diferencias significativas para ambos microorganismos.

Los resultados sustentarían a los obtenidos en las investigaciones de Goicochea (1954), Ayala (1963), Coronel (1988), Navarro (1988) y Pando (1988) quienes encontraron una disminución en la prevalencia e incidencia de caries en sus grupos poblacionales que tenían el hábito de chacchado.<sup>3,4,6,7,8</sup>

Sin embargo, Coronel (1988) concluía que posiblemente sus hallazgos se debían a la abrasión dentaria marcada, el elevado número de piezas dentarias extraídas e indicadas para la extracción o a la acción neutralizadora de las sustancias alcalinas sobre los ácidos producidos por las bacterias, para la formación de lesiones cariosas.<sup>8</sup> Al igual que Navarro (1988), quien comentaba que sus resultados obtenidos, podrían deberse a la pérdida de anatomía oclusal de las piezas dentarias por la abrasión propia de los chacchadores de la hoja de coca.<sup>7</sup>

Ambos autores, no consideraron un posible efecto antimicrobiano de la hoja de *Erythroxylum novogranatense var. truxillense* que ha quedado demostrado en la presente investigación.

Así mismo, se han encontrado resultados positivos del efecto antimicrobiano de la planta *Erythroxylum novogranatense var. truxillense* en diferentes investigaciones, como por ejemplo, la realizada por Mertz, M y



Reyes, E (1996) quienes hallaron inhibición del crecimiento de cocos y bacilos.

12

Al igual que Cam, O y Villanueva (1996) quienes probaron la acción inhibitoria progresiva del extracto acuoso y extracto metanólico de la hoja de *Erythroxylum novogranatense var. truxillense* frente a bacterias Gram negativas y Gram positivas. En esta ocasión las concentraciones fueron veinte veces menor a la utilizada en la presente investigación.<sup>11</sup>

En el ámbito estomatológico, los resultados se asemejan a los obtenidos por Borrovic (2006) quien encontró actividad antimicrobiana por parte del extracto alcohólico de *Erythroxylum novogranatense var. truxillense* en flora mixta salival. La concentración usada en nuestro estudio es diez veces mayor por lo que los halos de inhibición frente a *S. mutans* y *L. casei* tienen una media de  $34.4\text{mm} \pm 2.12\text{mm}$  y  $33.7\text{mm} \pm 3.40\text{mm}$ , a diferencia de  $14.71\text{ mm} \pm 0.19$  mostrado en flora mixta salival.<sup>13</sup>

Cabe resaltar, que a diferencia de Borrovic (2006) quien utilizó como control negativo una dilución de alcohol con agua destilada en proporción 1:1, el control negativo de esta investigación fue agua destilada, y el positivo alcohol de 96° sin diluir.

Es importante recalcar que en los diversos estudios en que se encontró efecto antimicrobiano de la hoja de *Erythroxylum novogranatense var. truxillense*, este fue hallado a pesar de que el método de extracción fuese diferente: acuoso, metanólico o etanólico, como en este caso.

## VI. CONCLUSIONES

El extracto etanólico de la hoja de *Erythroxyllum novogranatense* var. *truxillense* tuvo una mayor actividad antibacteriana que el alcohol al 96% frente a *S. mutans*.

El extracto etanólico de la hoja de *Erythroxyllum novogranatense* var. *truxillense* tuvo una mayor actividad antibacteriana que el alcohol al 96% frente a *L. casei*.

## VII. RECOMENDACIONES

Realizar investigaciones con diferentes bacterias relacionadas con el proceso de caries dental.

Investigar el efecto antimicrobiano del extracto etanólico *Erythroxyllum novogranatense* var. *truxillense* en diferentes concentraciones.

Comparar la acción antimicrobiana del extracto de la hoja de *Erythroxyllum novogranatense* var. *truxillense* con otras soluciones existentes en el mercado, como por ejemplo, clorhexidina al 0.02%

Determinar cuál es el o los principios activos de la hoja de *Erythroxyllum novogranatense* var. *truxillense* que le brinda la actividad antibacteriana hallada, a través de análisis de cromatografía de gases con espectrofotometría de masas, o con métodos de aislamiento de sus componentes.

Comparar el posible efecto antimicrobiano de otras especies de *Erythroxyllum*.

Analizar los posibles efectos secundarios de la hoja de *Erythroxyllum novogranatense* var. *truxillense*, realizando investigaciones in vivo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization – WHO. Oral Health in All Societies, Integration of oral health and general health. Geneva, 2006.
2. Ministerio de Salud del Perú – Plan de Salud Bucal 2005  
<http://www.minsa.gob.pe/portal/campanas/SBucal/documentos.asp>
3. Goicochea A. Estudio de la cavidad bucal en los sujetos habituados a la masticación de hojas de coca en la hacienda Collambay – Trujillo [tesis de bachiller]. Lima: UNMSM; 1954.
4. Ayala C. Acción de la coca y la llipta frente al ácido láctico y pH de la saliva y la dentadura del aborigen del altiplano [tesis de bachiller]. Lima: UNMSM; 1963.
5. Úngaro. Patología oral en masticadores de hojas de coca [tesis doctoral] Lima: UPCH; 1972.
6. Coronel. Estudio comparativo de la prevalencia de caries, enfermedad periodontal y abrasión entre un grupo de sujetos con el hábito de masticación de hoja de coca y un grupo control en la comunidad de Apaycauchilla, provincia de Tarma [tesis de bachiller]. Lima: UPCH; 1988
7. Navarro M. Prevalencia de caries dental por superficie en sujetos con el hábito de masticar hojas de coca en el distrito de Palcamayo, provincia de Tarma, departamento de Junín [tesis de bachiller]. Lima: UPCH; 1988.
8. Pando R. Estudio comparativo de la prevalencia de caries, enfermedad periodontal y abrasión en un grupo de sujetos con el hábito de masticación de coca y un grupo control en la comunidad de Punsay, provincia de Tarma [tesis de bachiller]. Lima: UPCH; 1988.

9. Li Sing. Propiedades inhibitorias del crecimiento de hongos oportunistas in Vitro de *Erythroxylum coca* y *Erythroxylum novogranatense var. truxillense* (Mate de coca) [tesis de bachiller]. Lima: UNMSM; 1994.
10. Castro P, Chávez J. Acción inhibitoria in Vitro de *Erythroxylum lam. Var. Coca* y *Erythroxylum novogranatense var. truxillense* “mate de coca” frente a uropatógenos Gram negativos multiresistentes [tesis de bachiller]. Lima: UNMSM; 1995.
11. Cam O, Villanueva P. Acción inhibitoria in Vitro del extracto acuoso y extracto metanólico de la hoja de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) *var. truxillense* (Rugby) frente a bacterias Gram (-) y Gram (+) [tesis de bachiller]. Lima: UNMSM; 1996.
12. Mertz M, Reyes E. Propiedades inhibitorias del crecimiento in Vitro de Enterobacterias, cocos y bacillus de *Erythroxylum coca lam.* y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) *var. truxillense* Rugby (mate de coca) [tesis de bachiller]. Lima: UNMSM; 1996.
13. Borrovic F. 2006 “Efecto antibacteriano del extracto alcohólico de la hoja de *Erythroxylum novogranatense var. truxillense* (coca) sobre flora mixta salival” [tesis de bachiller]. Lima: UNMSM; 2006.
14. Liébana. “Microbiología Oral” Editorial Mc Graw Hill 2da Edición 2002.
15. Negroni. Microbiología Estomatológica. Editorial Medica Panamericana, 1era Edición 1999.
16. Escobar M. “La hoja de coca, alimento y medicina ancestral” Revista Comunidad Tawantinsuyu Nro 05 2005.
17. Soukup J. Vocabulario de los nombres vulgares de la flora peruana y catálogo de géneros 1970. Edit. Salesiano – Lima, Pág. 250-251.

18. Dávila L. Q'eros Herencia Inca 1994 Primera Edición, Pág. 101 – 114
19. Baudillo J Enciclopedia Ilustrada Flora Medicinal, Toxica, Aromática, Condimentada Editorial AEDOS 1ra Edición 1975 Pág. 169
20. García C, Correa E. Estudio fitoquímico preliminar y evaluación antimicrobiana de algunas plantas superiores colombianas. Rev. Colombiana de Ciencias Químico – Farmacéuticas 1995; (223): 42 – 48.

## **ANEXOS**

- 1. FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS**
- 2. FICHA DE IDENTIFICACIÓN *S. mutans***
- 3. FICHA DE IDENTIFICACIÓN *L. casei***
- 4. FOTOS**

## FICHA DE RECOLECCION DE DATOS

Muestra	<i>Streptococcus mutans</i>			<i>Lactobacillus casei</i>		
	Agua estéril	Alcohol 96%	Extracto etanólico	Agua estéril	Alcohol 96%	Extracto etanólico
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						

## FOTOS



FOTO 1. CEPA DE *S. mutans* PROCEDENTE DE LA AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION.

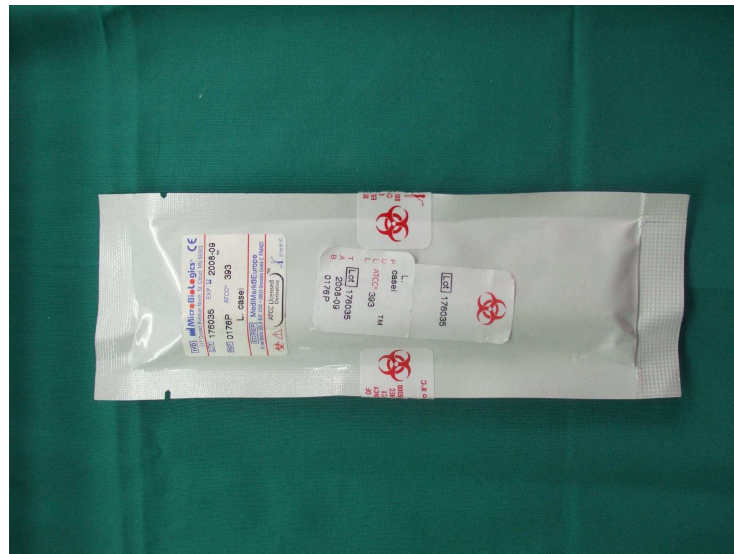


FOTO 2. CEPA DE *L. casei* PROCEDENTE DE LA AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION.



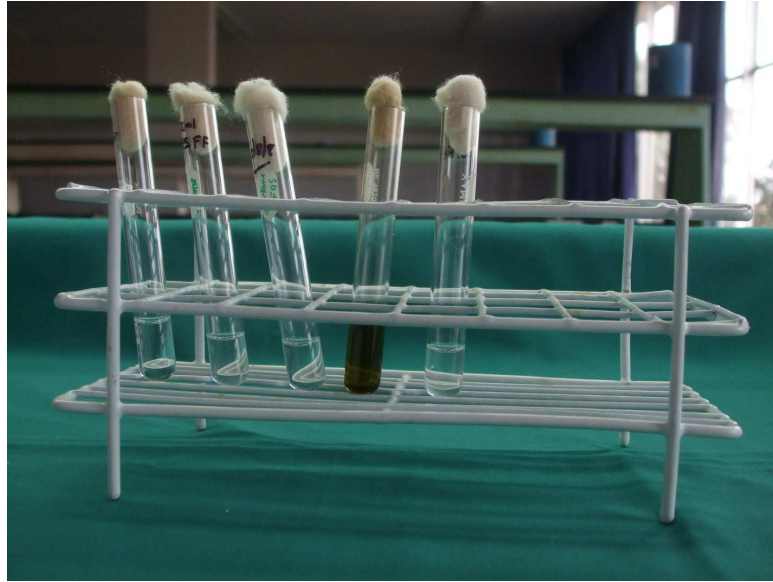


FOTO 3. TUBOS DE ENSAYO UTILIZADOS

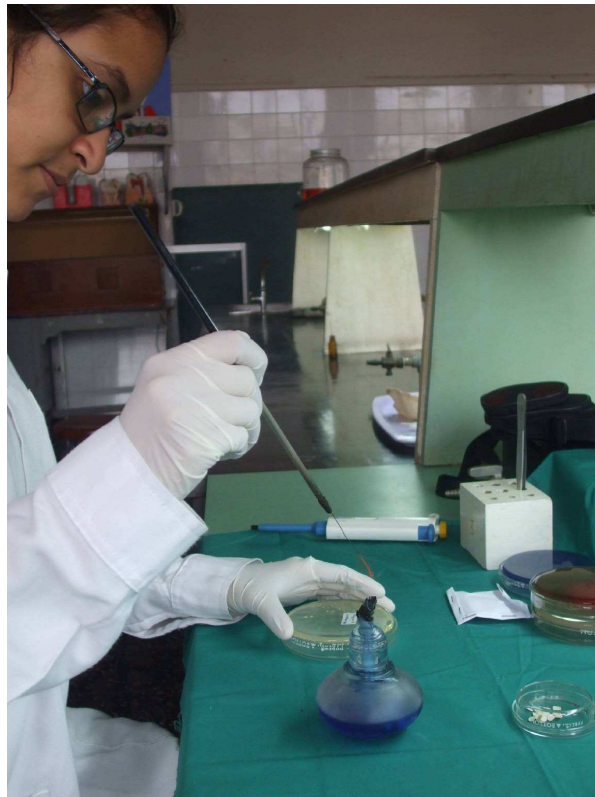


FOTO 4. ESTERILIZACIÓN DEL ASA



FOTO 5. SELECCION DE COLONIAS DEL CULTIVO AGAR SANGRE

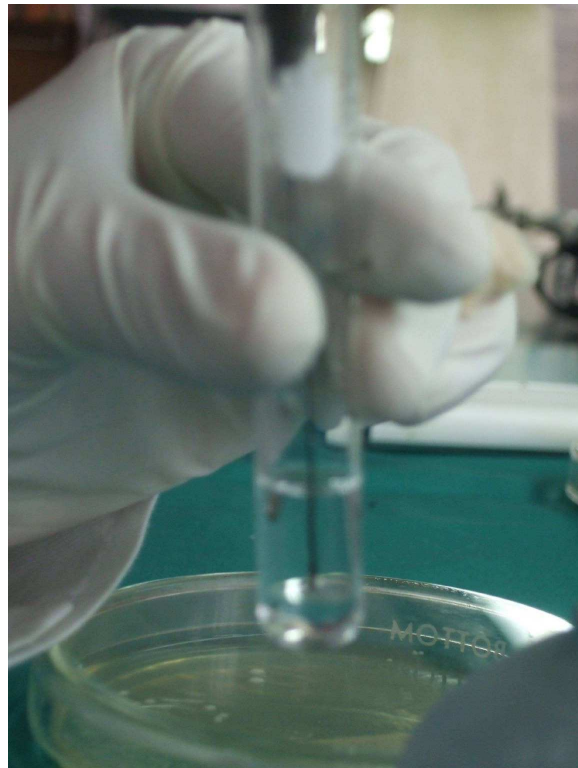


FOTO 6. DILUCION DE LAS COLONIAS EN SUERO FISIOLOGICO



FOTO 7. CON LA MICROPIPETA OBTENCION DE 100  $\mu$ L DE INÓCULO DE *L. casei*

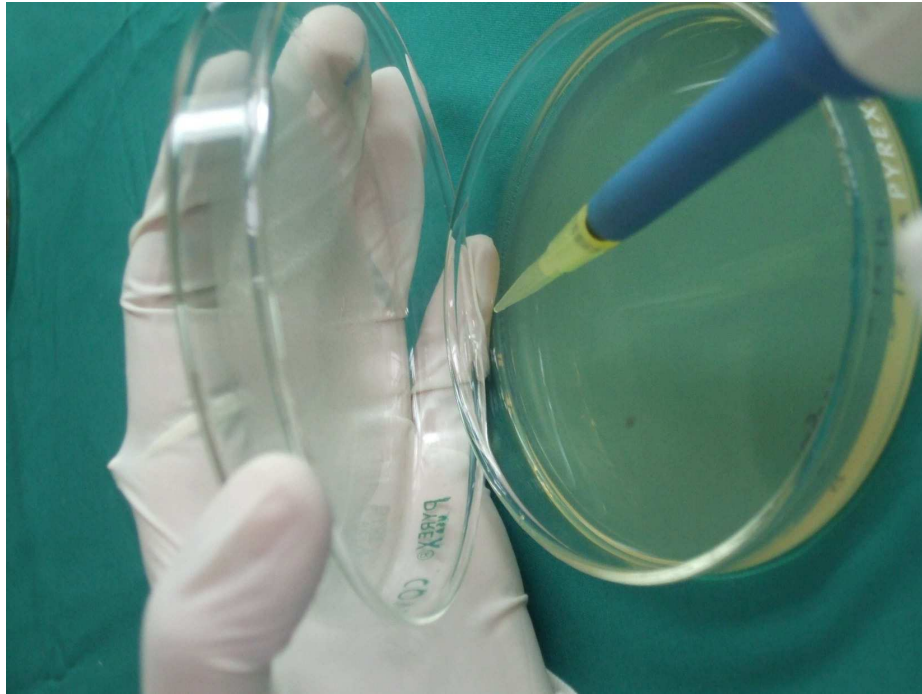


FOTO 8. SIEMBRA DEL INOCULO DE *L. casei* EN AGAR ROGOSA – MITCHELL – WISEMAN

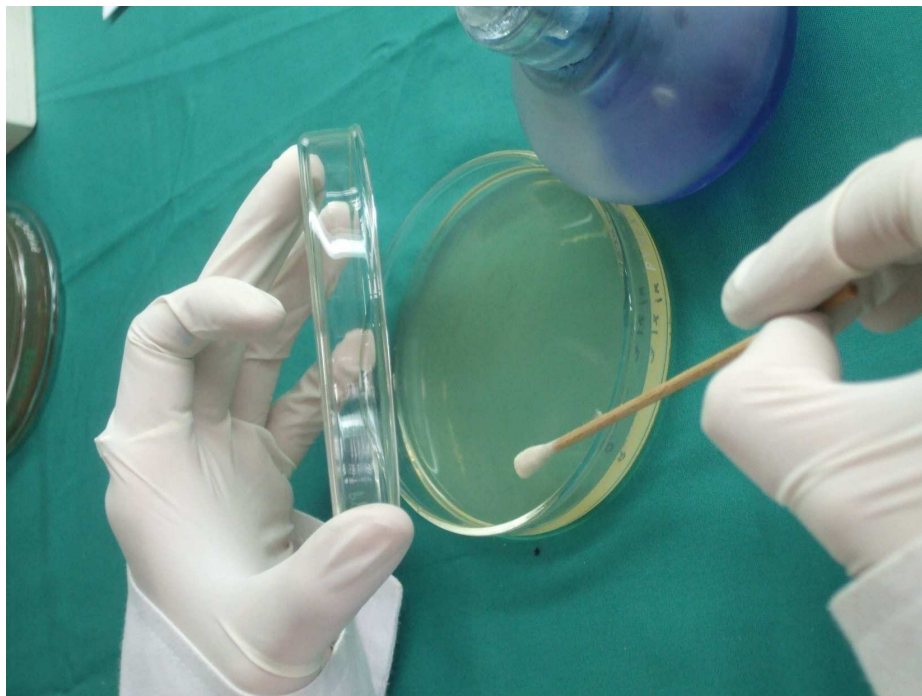


FOTO 9. ESPARCIMIENTO DEL INÓCULO CON HISOPO

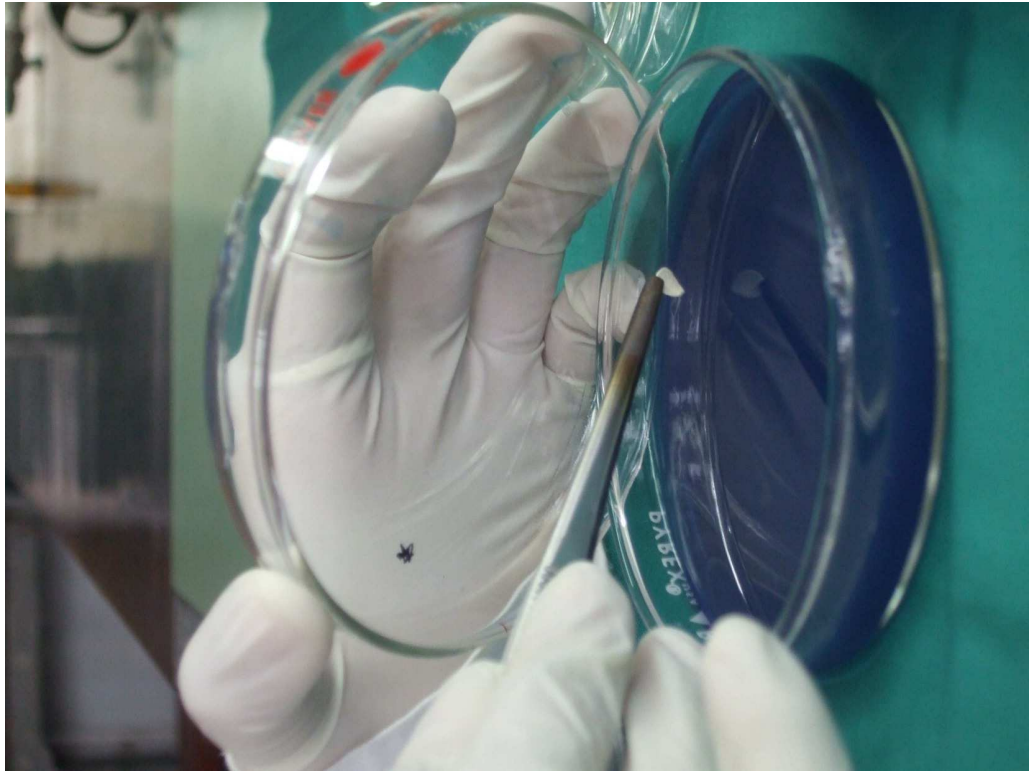


FOTO 10. COLOCACION DE LOS DISCOS



FOTO 11. POSICION DE LOS DISCOS

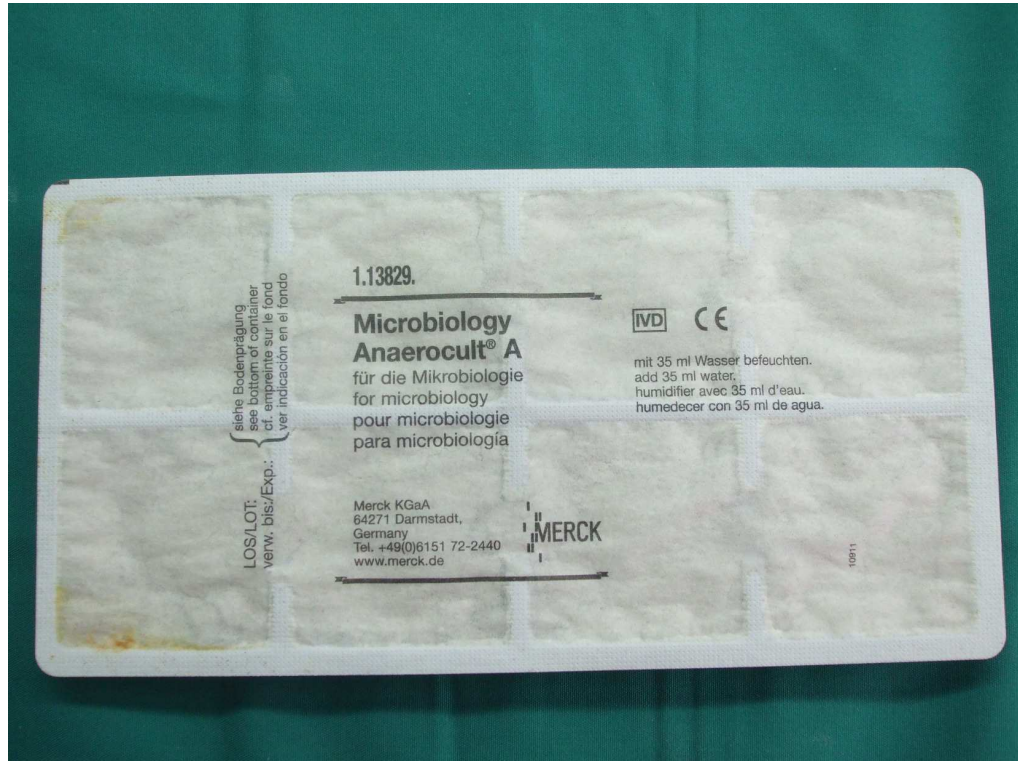


FOTO 12. GENERADOR DE ANAEROBIOSIS

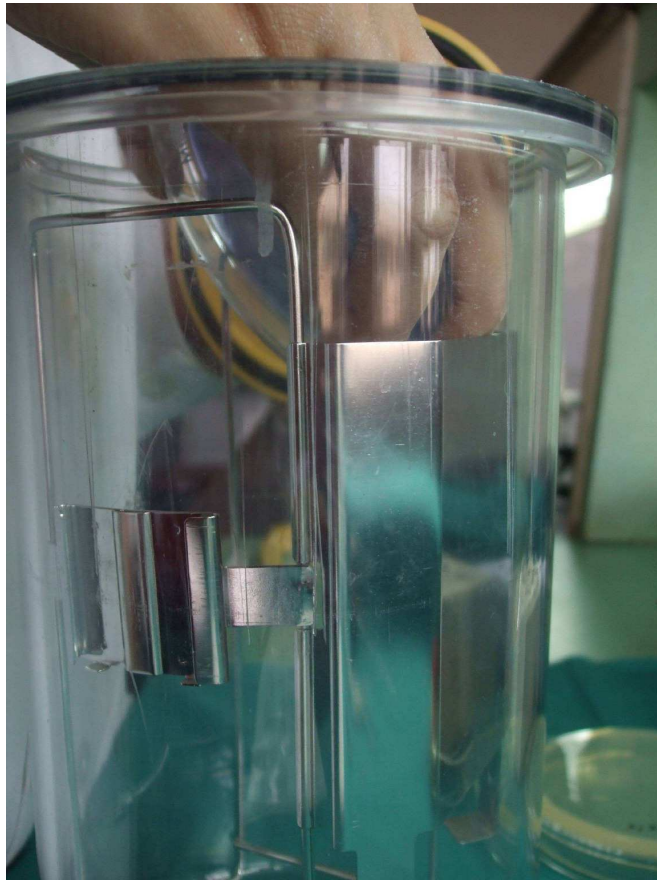


FOTO 13. COLOCACION DE PLACAS EN LA JARRA DE ANAEROBIOSIS



FOTO 14. HALOS DE INHIBICION EN CULTIVO DE *S. mutans*



FOTO 15. HALOS DE INHIBICION EN CULTIVO DE *S. mutans*



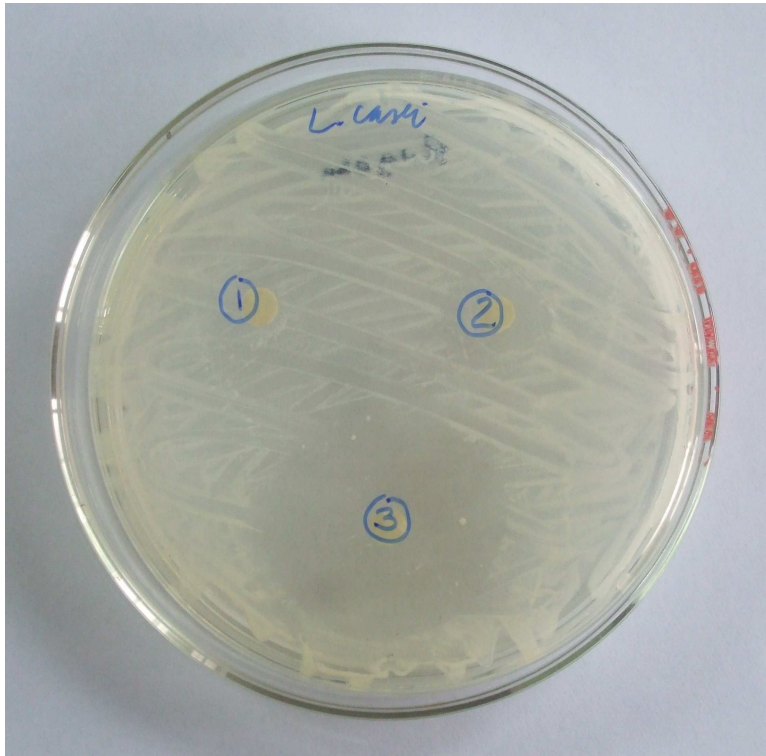


FOTO 16. HALOS DE INHIBICION EN CULTIVO DE *L. casei*



FOTO 17. HALOS DE INHIBICION EN CULTIVO DE *L. casei*