Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Odontología
Escuela Profesional de Odontología

Efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Erythroxylum novogranatense var*. truxillense "coca de Trujillo" sobre *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: estudio in vitro

TESIS

Para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista

AUTOR

Diego Alonso VALDERRAMA ALPACA

ASESOR

Elba Estefanía MARTÍNEZ CADILLO

Lima, Perú

2026



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Valderrama D. Efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Erythroxylum novogranatense var. truxillense* "coca de Trujillo" sobre *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: estudio in vitro [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Odontología, Escuela Profesional de Odontología; 2026.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Diego Alonso Valderrama Alpaca
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	73704483
URL de ORCID	https://orcid.org/0009-0009-8190-4514
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Elba Estefanía Martínez Cadillo
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	08621492
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-9601-7509
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Donald Ramos Perfecto
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	10712181
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Silvia Celestina Luz Montero
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	06088893
Datos de investigación	
Línea de investigación	B.3.3.3 Productos naturales de uso en odontología
Grupo de investigación	No aplica
Agencia de financiamiento	Sin Financiamiento

Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Facultad de Odontología – Universidad Nacional Mayor de San Marcos País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Cercado de Lima Latitud: -12.054569 Longitud: -77.08593
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2026
URL de disciplinas OCDE	Odontología, Cirugía Oral, Medicina Oral https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.02.14

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú. Decana de América
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
ESCUELA PROFESIONAL

A C T A DE SUSTENTACIÓN PRESENCIAL N.º 034/FO-EPO/2026

Los Docentes que suscriben, reunidos el 17 de julio de 2026 en la ciudad de Lima, siendo las 14:30 horas, por encargo de la Señora Decana de la Facultad, con el objeto de constituir el Jurado de Sustentación para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista del Bachiller:

DIEGO ALONSO VALDERRAMA ALPACA

CERTIFICAN:

Que, luego de la Sustentación de la Tesis **«EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *ERYTHROXYLUM NOVOGRANATENSE VAR. TRUXILLENSE* "COCA DE TRUJILLO" SOBRE *AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETEMCOMITANS*. ESTUDIO *IN VITRO*»** y habiendo absuelto las preguntas formuladas, demostró un grado de aprovechamiento:

SOBRESALIENTE
(escala)

Siendo calificado con un promedio de: DIECIOCHO (en letras) 18 (en números)

En tal virtud, firmamos en la Ciudad Universitaria, a los diecisiete días del mes de julio del año dos mil veintiséis.

PRESIDENTE DEL JURADO

Dr. Donald Ramos Perfecto

MIEMBRO SECRETARIA

Dra. Silvia Celestina Luza Montero

MIEMBRO VOCAL (ASESORA)

Blga. Elba Estefanía Martínez Cadillo

Escala de calificación: Grado de Aprovechamiento:
Sobresaliente (18-20). Bueno (15-17), Regular (12-14), Desaprobado (11 o menos)
Criterios: Originalidad, Exposición. Dominio del Tema, Respuestas.

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE
SAN MARCOS
Universidad del Perú, Decana de América

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, Elba Estefanía Martinez Cadillo en mi condición de asesora acreditada con el Dictamen del DICTAMEN Nº000009-2026-EPO-FO/UNMSM de la tesis, cuyo título es "**Efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Erythroxylum novogranatense var. truxillense* "Coca de Trujillo" sobre *Aggregatibacter actinomycetemcomitans:* estudio *in vitro***", presentado por el bachiller Diego Alonso Valderrama Alpaca para optar al Título Profesional de Cirujano Dentista, CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante la plataforma PIDS, el documento evaluado cuenta con el 6% de similitud, nivel PERMITIDO para continuar con los trámites correspondientes y para su publicación en el repositorio institucional. Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del título profesional de Cirujano Dentista.

Lima, 03 de Julio de 2026



Blga. Elba Estefanía Martinez Cadillo
DNI: 08256304

* Según corresponda: bachiller, magíster, doctor; título profesional o título de segunda especialidad.

La vigencia del presente certificado corresponde a un período de noventa (90) días desde la fecha de su emisión; siempre que no haya observaciones en el texto durante el proceso de revisión por el jurado informante o surja alguna contingencia.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, doy gracias a Dios por haberme guiado a lo largo de este camino, por concederme la salud, la fuerza y la claridad mental necesarias para culminar esta tesis.

Mi más profundo agradecimiento a mis padres, Pedro y Maribel, por su amor incondicional, su apoyo inagotable y los sacrificios que hicieron para permitirme llegar hasta aquí. Sus consejos, comprensión y motivación fueron fundamentales en cada etapa de mi formación.

De manera muy especial, agradezco a mi asesora, Blga. Elba Martínez Cadillo, por su dedicación, exigencia académica y valiosa orientación durante todo el proceso de investigación. Su experiencia y paciencia fueron clave para la culminación exitosa de este trabajo.

A mi querida Shirley, gracias por tu cariño, paciencia y apoyo constante. Tus palabras de aliento y tu compañía en los momentos más difíciles hicieron más llevadera esta etapa.

Asimismo, extiendo mi gratitud a todos los docentes de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, quienes con su enseñanza y ejemplo contribuyeron a mi formación profesional y científica. Su compromiso con la excelencia académica ha sido un pilar importante en mi desarrollo.

Finalmente, agradezco a la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por brindarme las instalaciones y recursos que hicieron posible la realización de este estudio.

Este logro es compartido con todos ustedes.

RESUMEN

Introducción: La periodontitis es una patología inflamatoria crónica de elevada prevalencia que genera la destrucción progresiva de los tejidos de soporte dental. En el Perú, representa un problema crítico de salud pública con una prevalencia promedio del 80%. Entre los agentes etiológicos implicados, la bacteria Gram-negativa *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* destaca por su estrecha asociación con formas agresivas de la enfermedad. Frente al incremento global de la resistencia bacteriana, surge la necesidad de explorar fitofármacos alternativos. La hoja de coca (*Erythroxylum novogranatense* var. *truxillense* o "coca de Trujillo") destaca por su riqueza en metabolitos secundarios, principalmente flavonoides (como quercetina y kaempferol) con potencial bactericida demostrado. **Objetivo:** Determinar y comparar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de *Erythroxylum novogranatense* var. *truxillense* sobre *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522 a concentraciones del 25%, 50%, 75% y 100%, contrastándolo con el control positivo (Clorhexidina al 0.12%) y el control negativo (Dimetilsulfóxido - DMSO). **Metodología:** Estudio de tipo experimental, *in vitro*, transversal, comparativo y analítico. Las hojas de coca fueron obtenidas mediante ENACO S.A. y sometidas a maceración etanólica al 96% durante 14 días, filtradas al vacío, concentradas en rotavapor y desengrasadas por Soxhlet. La muestra constó de 12 placas de Agar Schaedler enriquecidas con sangre de ovino desfibrinada, inoculadas con la cepa bacteriana y evaluadas mediante el ensayo de difusión en pozos de agar. Los pozos se cargaron con 20 microlitros de las soluciones y se incubaron en jarras de anaerobiosis a 37 °C por 72 horas. Se midieron los diámetros de los halos de inhibición en milímetros con vernier digital y se interpretaron cualitativamente según la escala de Duraffourd. El análisis estadístico incluyó las pruebas de Shapiro-Wilk, Kruskal-Wallis, U de Mann-Whitney (con corrección de Bonferroni) y la correlación de Spearman mediante el software SPSS v.27. **Resultados:** Se evaluaron 72 observaciones en total. Se evidenció un aumento progresivo en los diámetros de inhibición conforme aumentó la concentración del extracto vegetal: la mediana para el grupo de 25% fue 9.58 mm (media 9.44 ± 0.76 mm); 50% fue 10.33 mm (media 10.11 ± 0.60 mm); 75% fue 11.09 mm

(media 10.95 ± 0.95 mm); y 100% fue 11.85 mm (media 11.67 ± 0.82 mm). El control positivo de Clorhexidina al 0.12% obtuvo la mayor inhibición con una mediana de 14.99 mm (media 15.11 ± 0.93 mm), mientras que el DMSO no produjo ningún halo (0.00 mm). La prueba de Shapiro-Wilk rechazó la normalidad en la mayoría de los grupos experimentales ($p < 0.05$). Kruskal-Wallis demostró diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p < 0.001$). Las comparaciones post hoc de Mann-Whitney confirmaron diferencias significativas en la inhibición entre pares de concentraciones adyacentes ($p < 0.05$) y entre todas las concentraciones frente a ambos controles ($p < 0.001$). La correlación de Spearman arrojó una relación positiva fuerte y altamente significativa ($rho = 0.771$, $p < 0.001$) entre la concentración del extracto y el tamaño del halo. Según la escala de Duraffourd, las concentraciones del extracto se catalogaron principalmente en el nivel "Sensible", mientras que el control de Clorhexidina se clasificó mayormente como "Muy sensible". **Conclusiones:** El extracto etanólico de *E. novogranatense* var. *truxillense* posee un efecto antibacteriano dosis-dependiente y estadísticamente significativo contra *A. actinomycetemcomitans in vitro*. Aunque su potencia inhibitoria es significativamente menor a la de la Clorhexidina al 0.12%, el extracto representa una alternativa biológica y adyuvante viable para complementar el tratamiento periodontal convencional.

Palabras clave: *Erythroxylum novogranatense* var. *truxillense*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, Efecto antibacteriano, Difusión en pozos de agar, Periodontitis.

ABSTRACT

Introduction: Periodontitis is a highly prevalent chronic inflammatory pathology that causes progressive destruction of tooth-supporting tissues. In Peru, it represents a critical public health problem with an average prevalence of 80%. Among the implicated etiological agents, the Gram-negative bacterium *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* stands out for its close association with aggressive forms of the disease. Faced with the global rise in bacterial resistance, exploring alternative phytopharmaceuticals is crucial. Coca leaf (*Erythroxylum novogranatense* var. *truxillense* or "Trujillo coca") is noted for its richness in secondary metabolites, mainly flavonoids (such as quercetin and kaempferol) with demonstrated bactericidal potential. **Objective:** To determine and compare the *in vitro* antibacterial effect of the ethanolic extract of *Erythroxylum novogranatense* var. *truxillense* against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522 at concentrations of 25%, 50%, 75%, and 100%, contrasting it with a positive control (0.12% Chlorhexidine) and a negative control (Dimethyl sulfoxide - DMSO). **Methodology:** An experimental, *in vitro*, cross-sectional, comparative, and analytical study. Coca leaves were sourced through ENACO S.A. and subjected to ethanolic maceration at 96% for 14 days, vacuum-filtered, concentrated in a rotary evaporator, and defatted by Soxhlet. The sample consisted of 12 Agar Schaedler plates enriched with defibrinated sheep blood, inoculated with the bacterial strain, and evaluated using the agar well diffusion assay. Wells were loaded with 20 microliters of the solutions and incubated in anaerobiosis jars at 37 °C for 72 hours. Inhibition zone diameters were measured in millimeters using a digital vernier caliper and qualitatively interpreted according to the Duraffourd scale. Statistical analysis included Shapiro-Wilk, Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U tests (with Bonferroni correction), and Spearman's correlation using SPSS v.27 software. **Results:** A total of 72 observations were evaluated. A progressive increase in inhibition diameters was observed as the plant extract concentration increased: the median for the 25% group was 9.58 mm (mean 9.44 ± 0.76 mm); 50% was 10.33 mm (mean 10.11 ± 0.60 mm); 75% was 11.09 mm (mean 10.95 ± 0.95 mm); and 100% was 11.85 mm (mean 11.67 ± 0.82 mm). The positive control of 0.12% Chlorhexidine yielded the highest inhibition with a median of 14.99 mm (mean 15.11 ± 0.93

mm), while DMSO did not produce any zone (0.00 mm). The Shapiro-Wilk test rejected normality in most experimental groups ($p < 0.05$). Kruskal-Wallis demonstrated statistically significant differences between groups ($p < 0.001$). Mann-Whitney post hoc comparisons confirmed significant differences in inhibition between adjacent concentration pairs ($p < 0.05$) and between all concentrations against both controls ($p < 0.001$). Spearman's correlation showed a strong and highly significant positive relationship ($rho = 0.771$, $p < 0.001$) between extract concentration and halo size. According to the Duraffourd scale, the extract concentrations were classified mainly in the "Sensitive" level, while the Chlorhexidine control was mostly classified as "Very sensitive". **Conclusions:** The ethanolic extract of *E. novogranatense* var. *truxillense* has a dose-dependent and statistically significant antibacterial effect against *A. actinomycetemcomitans in vitro*. Although its inhibitory potency is significantly lower than that of 0.12% Chlorhexidine, the extract represents a viable biological and adjuvant alternative to complement conventional periodontal treatment.

Keywords: *Erythroxylum novogranatense* var. *truxillense*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, Antibacterial effect, Agar well diffusion, Periodontitis.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN 9
II. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN 11
2.1. Área del problema 11
2.2. Delimitación del problema 13
2.3. Formulación del problema 14
2.4. Objetivos 14
2.4.1. Objetivo general 14
2.4.2. Objetivos específicos 15
2.5. Justificación del problema 16
2.6. Limitaciones 16
III. MARCO TEÓRICO 18
3.1. Antecedentes 18
3.2. Bases teóricas 23
3.2.1. Periodontitis 23
3.2.2. Hoja de Coca 29
3.2.3. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 35
3.2.4. Efecto antibacteriano de la hoja de Coca frente a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 49
3.3. Definición de términos 51
3.4. Hipótesis 52
3.5. Operacionalización de las variables 54
IV. METODOLOGÍA 55
4.1. Tipo de investigación 55
4.2. Población y muestra 55
4.2.1. Población 55
4.2.2. Muestra 55
4.3. Técnica, procedimiento e instrumento de recolección de datos 56
4.3.1. Técnica de recolección de datos 56
4.3.2. Procedimiento experimental 57
4.3.3. Instrumento de recolección de datos 59
4.4. Procesamiento y análisis de resultados 59
V. RESULTADOS 62
5.1. Estadísticos Descriptivos 62
5.2. Pruebas de normalidad 64
5.3. Análisis Comparativo 64
5.4. Análisis de Correlación 65
5.5. Clasificación según la escala de Duraffourd 67
VI. DISCUSIÓN 68

VII. CONCLUSIONES 74
VIII. RECOMENDACIONES 75
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 77
X. ANEXOS 83

I. INTRODUCCIÓN

La periodontitis representa una de las enfermedades infecciosas crónicas más prevalentes a nivel global, afectando los tejidos de soporte dental y conduciendo a la pérdida de piezas dentales si no se trata adecuadamente. Según estimaciones recientes, su prevalencia en adultos dentados alcanza el 62%, con un 23.6% de casos severos entre 2011 y 2020, reflejando un incremento significativo en comparación con décadas previas [1]. En el Perú, esta patología constituye un problema de salud pública grave, con una prevalencia promedio del 80%, atribuida principalmente a deficiencias en la higiene oral, hábitos no saludables y limitado acceso a servicios odontológicos [2]. La etiología de la periodontitis involucra un desequilibrio en la microbiota oral, donde patógenos como *A. actinomycetemcomitans* juegan un rol clave en formas agresivas, especialmente en adolescentes, al inducir respuestas inflamatorias destructivas [3,4].

Frente a la creciente resistencia bacteriana a antibióticos convencionales, surge la necesidad de explorar alternativas naturales sostenibles. Los extractos vegetales, ricos en compuestos bioactivos como flavonoides y alcaloides, han demostrado actividad antimicrobiana prometedora[5]. En este contexto, la hoja de coca (*Erythroxylum novogranatense var. truxillense*, conocida como "coca de Trujillo") emerge como un recurso ancestral peruano con potencial terapéutico. Utilizada tradicionalmente en la región andina por sus propiedades estimulantes y medicinales [6], sus extractos han mostrado efectos inhibitorios contra patógenos orales como *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis* en estudios previos [7,8]. Sin embargo, la evidencia sobre su acción contra *A. actinomycetemcomitans* es limitada, lo que motiva esta investigación.

El estudio desarrollado tuvo como objetivo determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de *E. novogranatense var. truxillense* sobre *A. actinomycetemcomitans*, evaluando concentraciones del 25, 50, 75 y 100% mediante el método de difusión en pozos de agar. Esta aproximación no solo contribuye al conocimiento teórico sobre compuestos naturales en odontología, sino que también tiene relevancia social al

valorar un recurso cultural peruano en el contexto de la salud bucal. Los resultados podrían sentar bases para terapias complementarias, reduciendo la dependencia de antibióticos y promoviendo enfoques sostenibles.

II. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

2.1. Área del problema

El uso de extractos naturales y aceites esenciales es ampliamente estudiado por su potencial antimicrobiano, ofreciendo una alternativa prometedora frente a la creciente resistencia a los antibióticos. Se ha demostrado que los extractos de plantas son ricos en compuestos bioactivos, como flavonoides y alcaloides, que presentan significativa actividad antimicrobiana [5]. Los aceites esenciales de *Origanum vulgare* (Orégano) y *Lavandula officinalis* (Lavanda), han mostrado efectos bactericidas contra cepas de *Staphylococcus aureus* [9], mientras que el extracto etanólico de plantas como la *Cyperus articulatus* (pripiroca), utilizada tradicionalmente en la medicina amazónica, muestra significativo efecto inhibitorio sobre *Streptococcus mutans* [10], patógeno relacionado con caries dental. Estos hallazgos demuestran la importancia de la investigación sobre extractos naturales y sus aplicaciones en la medicina antimicrobiana, lo cual podría proporcionar soluciones efectivas y sostenibles frente a infecciones de origen bacteriano.

La cavidad oral alberga diversas especies bacterianas que conviven de forma sana, sin embargo al existir condiciones que permitan su proliferación desmedida, se puede llegar a producir la destrucción del hueso alveolar y el ligamento periodontal por acción de las mismas, enfermedad que se conoce como periodontitis[3]. Esta patología presenta una alta prevalencia en el Perú, alcanzando un 80% en promedio, debido principalmente a una falta de cultura en salud bucal y práctica de

conductas no saludables [2]. Ante este desfavorable panorama, se hace necesaria la investigación y difusión de nuevas alternativas terapéuticas, situación que motivó el desarrollo de este trabajo.

La hoja de coca (*E. coca, E. novogranatense*), se usa en el territorio sudamericano desde tiempos ancestrales. Según cronistas españoles de la época de la conquista, era consumida durante ceremonias religiosas por la aristocracia incaica, pero su uso posiblemente haya iniciado antes de la formación del Imperio Inca [6]. Durante el virreinato se masificó su uso, especialmente en poblaciones nativas sometidas a trabajos forzosos en minas y a falta de alimentos, debido al efecto energético que se le atribuye [6].

El arbusto de coca fue nombrado *Erythroxylum* en 1756 por Browne, y se cuentan más de 200 especies de la planta alrededor de Sudamérica, El Caribe, Asia y Oceanía [11], siendo *E. coca* y *E. novogranatense* las especies más cultivadas en Sudamérica, con variaciones específicas según la topografía, clima y condiciones del suelo que se encuentran en las diferentes variaciones del ecosistema andino [12]. Se trata de una planta cuyas hojas generalmente poseen hasta 15 alcaloides en diferentes concentraciones, tales como higrina, cuscohigrina, cis y trans-cinamoilocaina, metilecgonina, tropococaina, tropinona, benzoilecgonina, y cocaína [13], siendo esta última aislada y comercializada como una droga ilegal en muchos países, situación que ha creado un rechazo intrínseco al consumo de la hoja en estado natural durante muchos años (en especial en países fuera de Sudamérica), debido principalmente al

desconocimiento de sus demás aplicaciones [12].

Dado el contexto histórico y cultural de la hoja de coca en el Perú, su potencial como complemento en la salud bucal representa una oportunidad para integrar prácticas tradicionales con enfoques modernos en odontología. Estudios preliminares [8,9,14] sugieren que sus compuestos bioactivos podrían servir como adyuvantes en el manejo de infecciones orales, como la periodontitis, al ofrecer efectos antimicrobianos naturales que podrían potenciar terapias convencionales, reduciendo la dependencia de antibióticos y promoviendo opciones sostenibles y accesibles en regiones donde la planta es endémica, siempre bajo un marco regulado y científico que disipe estigmas asociados a su uso.

2.2. Delimitación del problema

La anatomía propia de la cavidad oral permite el desarrollo de nichos ecológicos excepcionales en el cuerpo humano, los cuales responden a diversos factores; así, por ejemplo, son hábitats diferentes las zonas supragingival y subgingival, debido a diferencias en pH, potencial redox, y disponibilidad de oxígeno y nutrientes[15]. Es así como la cavidad oral alberga alrededor de 700 especies bacterianas que conforman la microbiota oral [3], la cual, al verse desbalanceada permite la proliferación de ciertas especies patógenas que en suma a otros factores permiten el desarrollo de la periodontitis.

A. actinomycetemcomitans ha sido identificado como un patógeno con hábitat natural en placa dental y en bolsas periodontales [16], al igual que

otras bacterias tales como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, y *Treponema denticola* [17]. De igual manera, se ha relacionado a la presencia de cepas de *A. actinomycetemcomitans* con un mayor riesgo de sufrir periodontitis agresiva en adolescentes.[4]

El efecto antimicrobiano de la hoja de coca ha sido estudiado escasamente, pero ha demostrado un efecto positivo del extracto etanólico e hidroalcohólico de sus hojas frente a diferentes patógenos cuyo hábitat es la cavidad oral [7,18–20], identificándose acción frente a *Streptococcus mutans* [7,19,20] y *Lactobacillus casei* [7].

Con respecto a la flora prevalente en enfermedad periodontal, se ha identificado un efecto antimicrobiano significativo del extracto de *Erythroxylum coca* frente a cepas de *Porphyoromonas gingivalis* [8,21]. Sin embargo, es escasa la bibliografía relevante sobre la actividad de *Erythroxylum novogranatense* frente a *A. actinomycetemcomitans,* patógeno preponderante en la variante agresiva de periodontitis [4,16], situación que motiva la realización de esta investigación.

2.3. Formulación del problema

¿Cuál será el efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Erythroxylum novogranatense var Truxillense* (coca de Trujillo), sobre *Aggregatibacter actinomycetemcomitans, in vitro*?

2.4. Objetivos

2.4.1. Objetivo general

- Determinar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Erythroxylum novogranatense var. truxillense*, sobre *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *in vitro*.

2.4.2. Objetivos específicos

- Determinar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Erythroxylum novogranatense var. truxillense* sobre *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* a concentraciones del 25%, 50%, 75% Y 100%
- Comparar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Erythroxylum novogranatense var. truxillense* sobre *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* entre las diferentes concentraciones.
- Comparar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Erythroxylum novogranatense var. truxillense* sobre *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* frente al efecto de la Clorhexidina al 0.12%
- Comparar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Erythroxylum novogranatense var. truxillense* sobre *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* frente al efecto del DMSO (Dimetilsulfóxido) al 99.5%.
- Determinar la relación dosis–respuesta del efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Erythroxylum novogranatense var. truxillense* sobre *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

2.5. Justificación del problema

La presente investigación tiene relevancia teórica pues permitirá conocer el potencial antibacteriano del extracto de la hoja de coca, frente a un patógeno frecuente en enfermedad periodontal como lo es *A. actinomycetemcomitans.*

También presenta relevancia social al estudiar un producto natural y ampliamente difundido en la población peruana como lo es la hoja de coca.

De igual manera, dado el incremento de la resistencia bacteriana a los antibióticos convencionales, la investigación de compuestos naturales con potenciales efectos antimicrobianos representa una alternativa prometedora al tratamiento clásico de la enfermedad periodontal.

2.6. Limitaciones

El estudio se realiza completamente en condiciones de laboratorio controladas, lo que limita su aplicabilidad a escenarios clínicos reales. No considera factores *in vivo* como la interacción con saliva, pH oral variable, presencia de biofilm polimicrobiano o respuestas inmunitarias del huésped, que podrían alterar la efectividad del extracto (mencionado en la discusión y bases teóricas sobre la microbiota oral).

Se empleó una cepa certificada ATCC de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, pero no cepas clínicas aisladas de pacientes locales, esto ignora la variabilidad genética y de virulencia local, lo que podría subestimar o sobrestimar el efecto en poblaciones reales.

No se realizaron pruebas de citotoxicidad en líneas celulares orales (p. ej., epiteliales gingivales) ni estudios de biodisponibilidad, lo que deja sin evaluar posibles efectos adversos como irritación o toxicidad en tejidos humanos, limitando su potencial traducción a aplicaciones clínicas (destacado en las recomendaciones).

III. MARCO TEÓRICO

3.1. Antecedentes

CERVANTES-ALAGÓN SL *et al.* (2023) evaluaron la actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de *Curcuma longa L.* y *Erythroxylum coca var. coca* en concentraciones de 100%, 75%, 50%, 25% y 12.5% *contra Streptococcus mutans*. Usando maceración etanólica, dilución McFarland y el método Kirby Bauer, se midieron halos de inhibición a 24 y 48 horas. *Curcuma longa L*. a 100% destacó con 16.05 mm (93.04% efectividad) a 48 horas, mientras que *Erythroxylum coca var. coca* a 12.5% registró 10.73 mm (62.20% efectividad) a 24 horas. Ambos inhiben *S. mutans*, pero *Curcuma longa L.* es más efectivo, especialmente a 48 horas [19].

SALCEDO CALDERÓN MDR *et al.* (2022) compararon *in vitro* el efecto antibacteriano de extractos etanólicos de *Erythroxylum coca var. coca y Erythroxylum novogranatense var. truxillense* frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Usando difusión por discos con concentraciones de 100%, 50%, 25% y 12.5%, y controles de clorhexidina 0.12% y alcohol 96°, los cultivos en Agar Tripticasa Soya se incubaron a 37 °C por 48 horas. *E. coca var. coca* al 100% y 50% mostró mayores halos de inhibición (18.65 ± 2.434 mm; 17.10 ± 2.654 mm) que *E. novogranatense var. truxillense* (15.30 ± 1.895 mm; 14.05 ± 1.932 mm), indicando mayor efecto antibacteriano [22].

LOYOLA D *et al.* (2020) compararon *in vitro* la actividad

antibacteriana de extractos etanólicos de *Erythroxylum coca* (EEE) y *Schinus molle* (EES) al 50% y 75% frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175, usando clorhexidina 0.12% como control. Los extractos se obtuvieron por filtración al vacío y se evaluaron mediante cultivo en Agar Mitis Salivarius y difusión en disco Kirby-Bauer. A 24 y 48 horas, EEE y EES al 75% mostraron mayor efecto (11.2 ± 0.7 mm; 11.6 ± 0.5 mm y 11.3 ± 0.7 mm; 11.8 ± 0.5 mm, respectivamente) que al 50%, pero fueron menos efectivos que la clorhexidina. Ambos extractos tienen actividad antibacteriana, aunque inferior al control [20].

ENCISO DEZA C *et al.* (2017) evaluaron la actividad antibacteriana del extracto de *Erythroxylum coca* sobre bacilos negro pigmentados (BNP) mediante Test de Difusión en Agar y Dilución en medio líquido. En difusión, el extracto al 100% mostró sensibilidad límite (+), mientras que concentraciones menores fueron nulas (-). La prueba de dilución determinó una CMI del 6.25%. Concluyeron que el extracto presenta actividad antibacteriana contra BNP, con efecto notable a altas concentraciones, sugiriendo potencial en el tratamiento de enfermedades periodontales, aunque requiere mayor investigación[14].

RAMOS CLEMENTE A (2012) evaluó la actividad antibacteriana del extracto de *Erythroxylum coca* frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC. Mediante test de difusión en Agar y prueba de dilución en medio líquido, se analizó el efecto inhibitorio del extracto. En el test de difusión, se observó sensibilidad límite (+) al 100%, mientras que en la prueba de dilución se determinó una concentración mínima inhibitoria (CMI) del

6.25%. Estos resultados indican que el extracto de hoja de coca posee un potencial antibacteriano contra patógenos periodontales [8].

ALVARADO V *et al.* (2010) compararon la actividad antibacteriana *in vitro* de extractos hidroalcohólicos de *Plantago major L.*, *Erythroxylum novogranatense var. truxillense* y *Camellia sinensis* a 25 y 50 µg/mL frente a *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Actinomyces viscosus*, *Prevotella melaninogenica* y *Fusobacterium nucleatum*. Usando difusión en agar, *C. sinensis* a 50 µg/mL mostró el mayor efecto (20 mm sobre *S. mutans*), mientras *P. major* tuvo el menor (7.4 mm sobre *A. viscosus*). Todos superaron el control negativo y fueron inferiores al control positivo, excepto *C. sinensis* a 50 µg/mL sobre *P. melaninogenica*, que igualó al control positivo. Los resultados sugieren potencial antibacteriano, especialmente de *C. sinensis* [23].

VENTURA G *et al*. (2009) evaluaron la composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Erythroxylum coca var. coca* de Quillabamba, Cusco. Mediante hidrodestilación, se obtuvo un rendimiento de 0.08% v/p. El aceite, con densidad 0.007 y índice de refracción 1.49, mostró miscibilidad en solventes orgánicos. Por CG/EM, se identificaron compuestos como Guaia-1(5) (11)-diene y ácido hexadecanoico. La actividad antibacteriana, evaluada por excavación en placa a 10% y 50%, fue mayor contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (21-25 mm) que contra *Echerichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa*, destacando su potencial antimicrobiano [24].

HAUBEK D *et al.* (2008) evaluaron el papel del clon JP2 de *A. actinomycetemcomitans* en la iniciación de periodontitis agresiva en adolescentes marroquíes. En un estudio longitudinal de 682 individuos sanos (edad media 12.5 años), se detectó *A. actinomycetemcomitans* mediante PCR y se midió la pérdida de inserción periodontal a los 2 años. Los portadores del clon JP2 mostraron un riesgo relativo de 18.0 (IC 95% 7.8-41.2, p<0.0001), mientras que los de clones no JP2 tuvieron un riesgo de 3.0 (IC 95% 1.3-7.1, p=0.012). El clon JP2 es un factor etiológico clave [4].

MINAYA FLORES P (2008) evaluó *in vitro* la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Erythroxylum novogranatense var. truxillense* frentea *Streptococcusmutans* y *Lactoba cillus casei*, bacterias asociadas a caries dental. Mediante maceración alcohólica y evaporación a 40°C, se obtuvieron los principios activos, los cuales mostraron halos de inhibición significativos (*S. mutans*: 34.4 mm ± 2.12; *L. casei*: 33.7 mm ± 3.40), superiores al control negativo (agua destilada: 0 mm) y estadísticamente diferentes al control positivo (alcohol 96°: 11.4 mm ± 2.12) con un 95% de confianza ($p < 0.05$). Estos resultados sugieren un potencial efecto inhibitorio del extracto sobre patógenos cariogénicos [7].

BORROVIC RAMOS F (2006) evaluó la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Erythroxylum novogranatense var. truxillense* frente a flora mixta salival. Mediante maceración alcohólica y evaporación a 40°C, se obtuvieron los principios

activos, los cuales mostraron un efecto inhibitorio dependiente de la concentración: 10.95 mm (±0.26) a 250 µg/20µl, 12.28 mm (±0.22) a 500 µg/20µl, 13.46 mm (±0.19) a 1000 µg/20µl y 14.71 mm (±0.19) a 1500 µg/20µl, superando significativamente ($p < 0.05$) al control negativo (0 mm). Estos resultados demuestran una correlación positiva entre la concentración del extracto y su efecto antimicrobiano [18].

NOVÁK M *et al.* (1984) revisaron la actividad biológica de alcaloides en *Erythroxylum coca* y *E. novogranatense*, excluyendo cocaína y nicotina, mediante una revisión bibliográfica exhaustiva (1967-1983). Identificaron 18 alcaloides en variedades cultivadas, destacando la cocaína como principal, y discutió la actividad de cinnamoylcocaina, benzoylecgonina, methylecgonina, pseudotropina, benzoyltropina, tropacocaina, α- y β-truxillina, hygrina, cuscohygrina y nicotina, aunque señalaron escasa información sobre muchos de ellos. Concluyerpn que alcaloides menores podrían influir en los efectos de masticar hoja de coca o fumar pasta de cocaína, recomendando más estudios sobre su composición y farmacología [25].

3.2. Bases teóricas

3.2.1. Periodontitis

3.2.1.1. Definición

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica que afecta los tejidos de soporte dental, incluyendo la encía, el ligamento periodontal y el hueso alveolar. Se caracteriza por una inflamación persistente que conduce a la destrucción progresiva de estas estructuras, lo que puede resultar en la pérdida de piezas dentales si no se trata adecuadamente [26]. Como condición crónica, la periodontitis implica procesos inflamatorios continuos que no solo afectan la salud oral, sino que también pueden tener implicaciones sistémicas, potencialmente contribuyendo a la progresión de otras afecciones crónicas [27].

3.2.1.2. Patogenia

La periodontitis es una inflamación crónica desencadenada por un desequilibrio entre la microbiota oral y la respuesta inmunitaria del huésped, lo que resulta en la destrucción progresiva de los tejidos de soporte dental, incluyendo la encía, el ligamento periodontal y el hueso alveolar. La acumulación de placa bacteriana, compuesta por microorganismos como *A. actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, entre otras,

estimula la liberación de citoquinas proinflamatorias, como IL-1β, IL-6 y TNF-α, por parte de células inmunitarias, lo que amplifica la inflamación y contribuye al daño tisular [28]. Estas bacterias producen factores de virulencia que activan macrófagos y neutrófilos, induciendo la liberación de enzimas proteolíticas, como metaloproteinasas de matriz (MMPs), que degradan el colágeno y el tejido conectivo periodontal [29]. Además, la inflamación persistente promueve la expresión de RANKL, una molécula que estimula la diferenciación de osteoclastos, lo que lleva a la resorción ósea característica de la periodontitis[27]. La interacción entre la microbiota disbiótica y el sistema inmunitario perpetúa un ciclo de inflamación crónica, que compromete la integridad estructural de los tejidos periodontales y puede resultar en la pérdida dental si no se controla [28].

3.2.1.3. Epidemiología

Según una revisión sistemática y metaanálisis realizado por Trindade et al. en 2023, la prevalencia global de periodontitis en adultos dentados entre 2011 y 2020 se estimó en 62%, con un 23.6% de casos de periodontitis severa [1]. Este estudio, que incluyó 55 investigaciones de 17 países, destacó un aumento significativo en la prevalencia en comparación con estimaciones previas de 1990 a 2010, lo que sugiere una creciente carga de la enfermedad.

Por su parte, Nazir (2017) reportó que las enfermedades periodontales, incluyendo gingivitis y periodontitis, afectan aproximadamente al 20-50% de la población mundial, con variaciones según la edad, el estatus socioeconómico y el acceso a servicios de salud oral [30].

En el Perú, la enfermedad periodontal, que incluye tanto gingivitis como periodontitis, es un problema de salud pública significativo, con tasas de prevalencia elevadas que reflejan desafíos en el acceso a la atención dental y la educación en salud oral. Según Lazo Meneses (2015), la prevalencia promedio de enfermedad periodontal en el Perú es del 80%, atribuida principalmente a la falta de una cultura de salud oral y prácticas poco saludables, como una higiene oral deficiente [2]. Por otro lado, el perfil de salud oral de la Organización Mundial de la Salud para el Perú (2022) reporta una prevalencia más específica del 19% para periodontitis severa en personas de 15 años o más, definida como una profundidad de sondaje gingival igual o superior a 6 mm o una pérdida de inserción clínica mayor a 6 mm [31].

3.2.1.4. Clasificación clínica

La clasificación de enfermedades periodontales ha evolucionado para reflejar avances científicos. La clasificación de 1999, propuesta por Armitage, organizaba las enfermedades en ocho categorías, pero presentaba

ciertas limitaciones como la superposición entre periodontitis crónica y agresiva [32]. En 2017, un taller conjunto entre la American Academy of Periodontology (AAP) y la European Federation of Periodontology (EFP) dio lugar a una clasificación actualizada, publicada en 2018, con tres categorías principales y una sección para enfermedades periimplantarias [33].

- **Clasificación de 1999 [32]:**
    - **Enfermedades Gingivales**: Inducidas y no inducidas por placa.
    - **Periodontitis Crónica:** Progresión lenta, clasificada por extensión y severidad.
    - **Periodontitis Agresiva:** Progresión rápida, común en jóvenes.
    - **Periodontitis como Manifestación de Enfermedades Sistémicas**.
    - **Enfermedades Periodontales Necrotizantes:** Necrosis tisular.
    - **Abscesos del Periodonto.**
    - **Periodontitis Asociada con Lesiones Endodónticas.**
    - **Deformidades y Condiciones Desarrolladas o Adquiridas.**
- **Clasificación de 2017 [33]:**

- **Salud Periodontal, Enfermedades y Condiciones Gingivales:**
  - Salud periodontal y gingival.
  - Gingivitis inducida por biofilm, clasificada por extensión y severidad.
  - Enfermedades gingivales no inducidas por biofilm.
- **Periodontitis:**
  - Enfermedades necrotizantes.
  - Periodontitis: categoría unificada con estadificación (I-IV) y gradación (A-C) para evaluar severidad y progresión [34]
  - Periodontitis sistémica.
  - Abscesos y lesiones endodonto-periodontales.
- **Otras Condiciones:**
  - Enfermedades sistémicas que afectan el periodonto.
  - Deformidades mucogingivales.
  - Fuerzas oclusales traumáticas.
  - Factores dentales y protésicos.

Los cambios clave entre las clasificaciones de 1999 y 2017 incluyen la unificación de la periodontitis, que combina las formas crónica y agresiva, diferenciándolas mediante un

sistema de estadificación y gradación [35]. Este sistema introduce estadios (I-IV) para evaluar la severidad de la enfermedad y grados (A-C) para determinar la progresión y los factores de riesgo [34]. Además, se incorpora una nueva sección dedicada a las enfermedades periimplantarias, enfatizando la relevancia de los implantes dentales [33]. La salud periodontal se define con criterios más claros, destacando el sangrado al sondaje como un parámetro clave [33]. Finalmente, la estructura de la clasificación se simplifica con categorías reorganizadas para ofrecer mayor claridad. Estos cambios mejoran la precisión diagnóstica y facilitan la planificación del tratamiento [33,35]

3.2.1.5. Diagnóstico

El diagnóstico preciso de la enfermedad periodontal es fundamental para su manejo efectivo y la prevención de la pérdida dental. Clínicamente, se emplean parámetros como el sangrado al sondaje y profundidad al sondaje, que reflejan inflamación y pérdida de inserción, respectivamente. Según Fidyawati et al. (2024), estos parámetros son esenciales, aunque su precisión puede variar debido a diferencias interobservador [36]. Para complementar el examen clínico, las evaluaciones radiográficas son cruciales, ya que permiten visualizar la pérdida ósea alveolar y los cambios en el ligamento periodontal. Fidyawati et al. destacan que

las radiografías periapicales son particularmente útiles para medir la distancia entre la unión cementoesmalte y la cresta alveolar, así como para detectar irregularidades en la cresta ósea y ensanchamiento del ligamento periodontal, aunque los cambios sutiles en etapas iniciales pueden ser difíciles de identificar [36]. Por su parte, Jacobs et al. (2024) subrayan que las radiografías periapicales, al alinear el haz de rayos X perpendicularmente a los dientes y el hueso circundante, ofrecen una representación precisa de los niveles óseos, pero señalan que técnicas avanzadas como la tomografía computarizada de haz cónico (CBCT) proporcionan una visualización tridimensional detallada, mejorando la detección de defectos óseos, aunque su uso debe equilibrarse con la dosis de radiación y el costo [37]. La integración de ambos enfoques, clínico y radiográfico, es indispensable para un diagnóstico completo, ya que las discrepancias entre hallazgos clínicos y radiográficos pueden surgir por variaciones anatómicas o progresión de la enfermedad, optimizando así la planificación del tratamiento y el seguimiento del paciente.

3.2.2. Hoja de Coca

3.2.2.1. Definición

La hoja de coca, proveniente de las especies *Erythroxylum coca var. coca* (comúnmente conocida en el Perú como coca de

Huánuco) y *Erythroxylum novogranatense var. truxillense* (conocida como coca de Trujillo), es un recurso natural de gran relevancia en la región andina, utilizado tradicionalmente por sus propiedades estimulantes, analgésicas y medicinales durante miles de años [38].

Ambas especies, pertenecientes a la familia *Erythroxylaceae*, comparten una amplia variedad de compuestos bioactivos, como alcaloides (p. ej., cocaína, higrina, cuscohigrina), flavonoides, taninos y aceites esenciales, que les confieren potencial terapéutico [12,39]. Sin embargo, *E. novogranatense var. truxillense*, cultivada principalmente en regiones áridas como la costa de Trujillo, Perú, se distingue por una mayor concentración de aceites esenciales y ciertos alcaloides, como metilecgonina y cinamoilcocaína, en comparación con *E. coca var. coca*, que predomina en zonas más húmedas como Huánuco [12,25,40]. Estas diferencias químicas pueden influir en su actividad antimicrobiana, lo que hace a la variante *truxillense* particularmente relevante para el presente estudio.

Investigaciones previas han destacado el potencial antimicrobiano de los extractos de ambas especies contra bacterias orales, como *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*, sugiriendo que los compuestos bioactivos de la hoja de coca, especialmente en *E. novogranatense var. truxillense*, podrían inhibir el crecimiento bacteriano mediante mecanismos como la disrupción de membranas celulares o la inhibición de procesos metabólicos

bacterianos [7,8,14,18–20]

.

3.2.2.2. Taxonomía

Tabla 01. Clasificación Taxonómica de *Erythroxylum novogranatense var. truxillense* [11].	
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliospida
Orden	Malphigiales
Familia	Erythroxylaceae
Género	Erythroxylum
Especie	novogranatense
Variedad	truxillense

3.2.2.3. Morfología

Erythroxylum novogranatense var. truxillense, es un arbusto de 2-3 m de altura con ramas curvas y hojas delgadas, opacas, de forma oblongo-obovada, más anchas cerca del ápice, de color verde brillante en la cara superior y sin líneas paralelas marcadas junto a la vena central, a diferencia de otras variedades [11,38]. Sus flores son pequeñas, de color blanco-amarillento, dispuestas en racimos, con cinco pétalos y anteras en forma de corazón [41] Los frutos son bayas rojas. Esta variedad se adapta a climas áridos del noroeste de Perú, requiriendo irrigación, y su morfología distintiva la hace ideal para estudios fitoquímicos [11].



Fig 1. Espécimen de *E. novogranatense*. Se aprecia la distribución de de sus hojas en el tallo y sus frutos como bayas rojas (30)



Fig 2. Espécimen disecado de *E. novogranatense var. truxillense* [42]

3.2.2.4. Distribución Geográfica

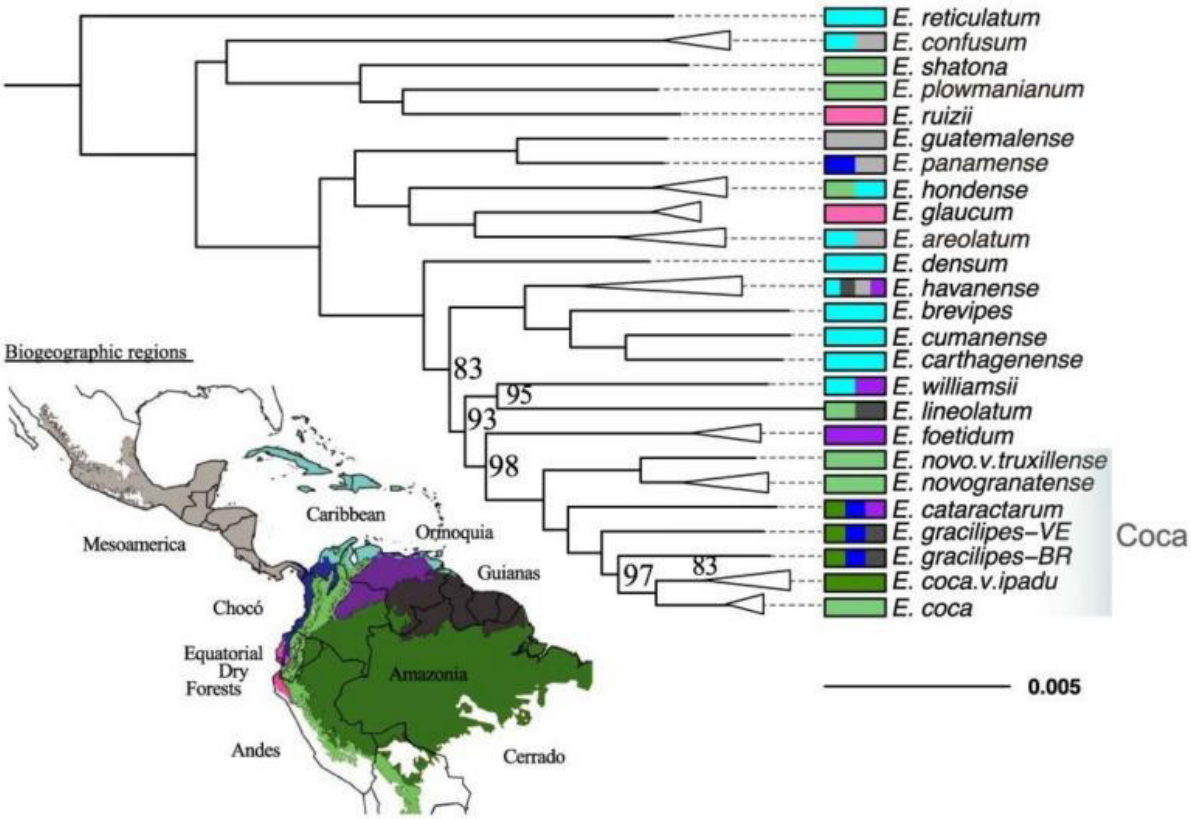


Fig 3. Filogenia del género *Erythroxylum* y distribución geográfica en Sudamérica [43]. En verde claro se puede apreciar la distribución de *Erythroxylum novogranatense var.novogranatense y var. truxillense* a través de Perú, Ecuador, Colombia, Venezuela.

3.2.2.5. Características

E. novogranatense var. truxillense, E. novogranatense var. novogranatense y *E. coca var. coca* son reconocidas por su contenido de alcaloides, particularmente la cocaína, que es el alcaloide predominante en estas especies; sin embargo, presentan diferencias notables en su composición química. Generalmente, las variedades de *E. novogranatense* exhiben un mayor contenido de cocaína en comparación con las de *E. coca*. Por ejemplo, *E. novogranatense var. novogranatense* contiene aproximadamente 0.77% de cocaína en peso seco, *E. novogranatense var. truxillense* aproximadamente un

0.72%, mientras que *E. coca var. coca* tiene 0.63% [43]. Además, estudios indican que *E. novogranatense* tiene niveles más altos de cinnamoilcocaína y metilecgonina, mientras que *E. coca* puede tener mayor contenido de cocaína bajo ciertas condiciones ambientales [44]. Más allá de los alcaloides, las dos especies difieren significativamente en sus perfiles de flavonoides, que sirven como marcadores quimiotaxonómicos. Las variedades de *E. coca* contienen principalmente conjugados de eriodictiol y taxifolina, que son flavanonas y dihidroflavonoles, respectivamente [45]. En contraste, las variedades de *E. novogranatense* contienen conjugados de luteolina, quercetina kaempferol y fisetina, que son flavonas y flavonoles, reconocidos por su potencial antimicrobiano [45,46]. Estas diferencias en metabolitos secundarios reflejan los distintos caminos evolutivos y adaptaciones de estas especies a sus respectivos nichos ecológicos.

3.2.2.6. Uso tradicional

El género *Erythroxylum* ha sido valorado por sus propiedades medicinales durante siglos. En la medicina tradicional andina, sus hojas se mastican con cal para aliviar dolores orales, trastornos digestivos, hambre, mal de altura, dolores musculares, tristeza y disfunción sexual [43]. Estos efectos se atribuyen a sus alcaloides tropánicos, como la cocaína, que actúa como estimulante y anestésico local, junto con otros compuestos bioactivos. Además, contiene alcaloides menores como cinnamoylcocaína y benzoylecgonina, cuya actividad biológica podría contribuir a sus beneficios terapéuticos,

aunque está poco estudiada [25].

3.2.2.7. Propiedades medicinales

Investigaciones modernas sugieren su potencial en el manejo de úlceras gástricas, mejora de la salud dental, tratamiento de infecciones orales y trastornos mentales como depresión y TDAH [43]. También se explora su uso para mejorar el rendimiento físico y prevenir accidentes cerebrovasculares mediante efectos en el metabolismo de glucosa y la circulación [43]. El uso tradicional de la hoja entera es seguro, con bajo contenido de cocaína (0.77% en coca colombiana) y absorción gradual, según el Proyecto Cocaína de la OMS/UNICRI de 1995 [43]. Se requiere más investigación para validar su potencial farmacológico.

3.2.3. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

3.2.3.1. Definición

Aggregatibacter actinomycetemcomitans es una bacteria gram negativa, anaerobia facultativa, que reside en la cavidad oral humana como parte de la microbiota normal [47]. Sin embargo, se comporta como patógeno bajo ciertas condiciones, capaz de causar principalmente periodontitis agresiva

(según la clasificación de 1999) localizada, que provoca una rápida destrucción de los tejidos periodontales y pérdida de piezas dentales, particularmente en adolescentes [4]. También ha sido asociada con infecciones sistémicas, como la endocarditis infecciosa, siendo parte del grupo HACEK de bacterias (especies gram negativas de

crecimiento lento que pueden causar infecciones oportunistas, como la endocarditis bacteriana) [48]. Su capacidad para formar biopelículas y producir factores de virulencia, como la leucotoxina A, contribuyen a su potencial patogénico [48], sin embargo, su papel en la enfermedad periodontal es complejo, involucrando además, interacciones con otros microorganismos orales y la respuesta inmune del huésped [47]. Debido a su importancia en enfermedades periodontales, *A. actinomycetemcomitans* es ampliamente estudiada en periodoncia, su presencia se utiliza como marcador de progresión de la enfermedad y es un objetivo clave para terapias antimicrobianas destinadas a controlar infecciones periodontales [4]. La investigación sobre esta bacteria es crucial para desarrollar estrategias efectivas de prevención y tratamiento de las enfermedades orales y sistémicas en las que está involucrada [47,48].

3.2.3.2. Taxonomía

Tabla 02. Clasificación taxonómica de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* [11].

Reino	Bacteria
Filo	*Proteobacteria*
Clase	*Gammaproteobacteria*
Orden	*Pasteurellales*
Familia	*Pasteurellaceae*
Género	*Aggregatibacter*
Especie	*Actinomycetemcomitans*

3.2.3.3. Morfología

A. actinomycetemcomitans se presenta como un cocobacilo gramnegativo, es decir, una bacteria de forma intermedia entre cocos (esféricos) y bacilos (bastoncillos), con un tamaño típico de 0.4 × 1 µm [49]. Es no móvil, es decir, que no posee flagelos para desplazarse, y puede aparecer a menudo en pares o pequeños grupos [49]. Una característica estructural clave son las fimbrias, pequeños apéndices filamentosos dispuestos en un arreglo peritrico (alrededor de toda la superficie de la bacteria), que facilitan la adhesión a superficies epiteliales y dentales [49]. Además, produce numerosas vesículas de membrana que contienen lipopolisacáridos, con propiedades adhesivas y un papel en la entrega de materiales tóxicos, contribuyendo a su patogenicidad [49].

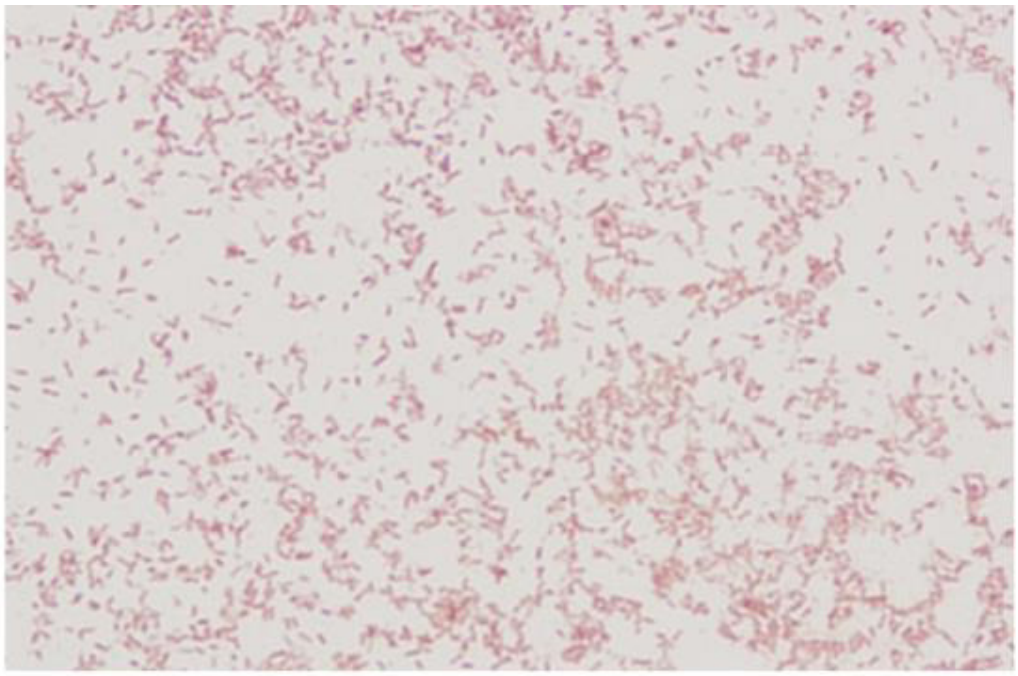


Fig 4. Células de *A. actinomycetemcomitans* (Tinción Gram)[50]

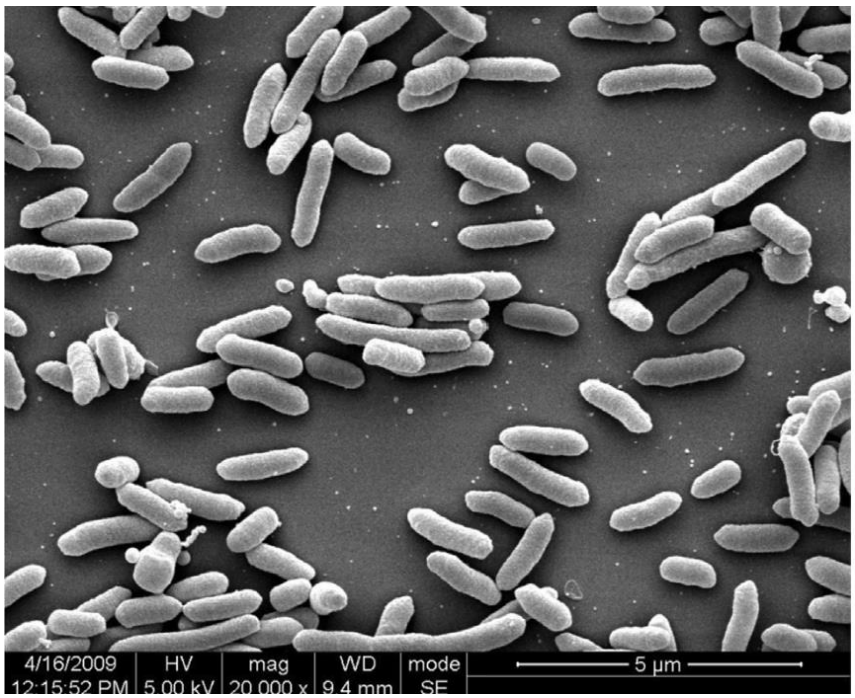


Fig 5. Células de *A. actinomycetemcomitans* (SEM). Las células de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* miden entre 0.5–0.8 µm de ancho y 0.6–1.4 µm de largo. Pueden tener forma esférica o de bastón, siendo esta última la más frecuente en cultivos en agar. Se presentan individualmente, en pares o agrupadas. No forman esporas, no son móviles y carecen de cápsula [50].

3.2.3.4. Cultivo

Aggregatibacter actinomycetemcomitans es una bacteria Gram-negativa, capnófila y anaerobia facultativa que requiere condiciones específicas para su cultivo. Su aislamiento a partir de muestras orales, como las del periodonto, se realiza comúnmente en el medio selectivo TSBV (Tripticase Soya Suero Bacitracina - Vancomicina), que inhibe el crecimiento de otras especies [47]. Para su cultivo desde cepas aisladas, suele sembrarse en agar chocolate, donde *A. actinomycetemcomitans* forma colonias pequeñas (≤0.5 mm tras 24 horas), rugosas y adherentes, que pueden alcanzar 1-2 mm después de 48 horas [47,48]. También suele sembrarse en agar sangre, si bien no como principal medio de cultivo, con la intención de observar a mayor detalle las características de las colonias. El crecimiento óptimo ocurre a 35-37°C en una atmósfera de 5% CO_2, reflejando su naturaleza capnófila y microaerófila, lo que le permite adaptarse a ambientes con bajo oxígeno, como la cavidad oral [47,48]. En TSBV, las colonias exhiben una estructura interna en forma de estrella, visible bajo microscopio, facilitando su identificación preliminar [47]. Esta se confirma mediante pruebas bioquímicas, como una reacción positiva a la catalasa y negativa a la β-galactosidasa [47].

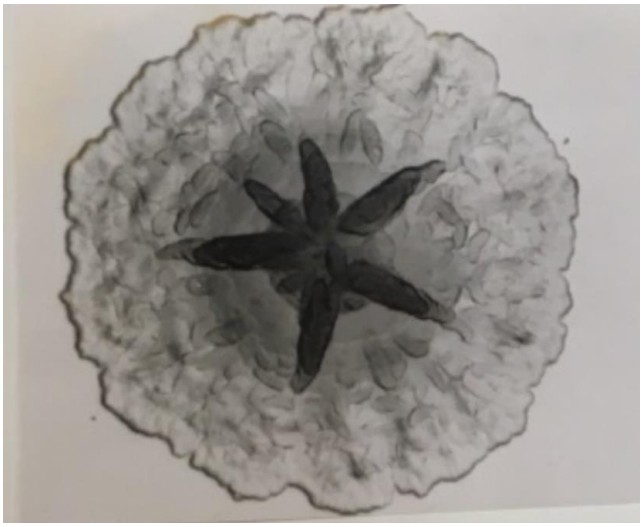


Fig.6 Colonia de *A. actinomycetemcomitans* en agar TSBV vista en microscopio estereoscópico. Se aprecia el patrón estrellado típico de *Aa* en este tipo de agar.[47]

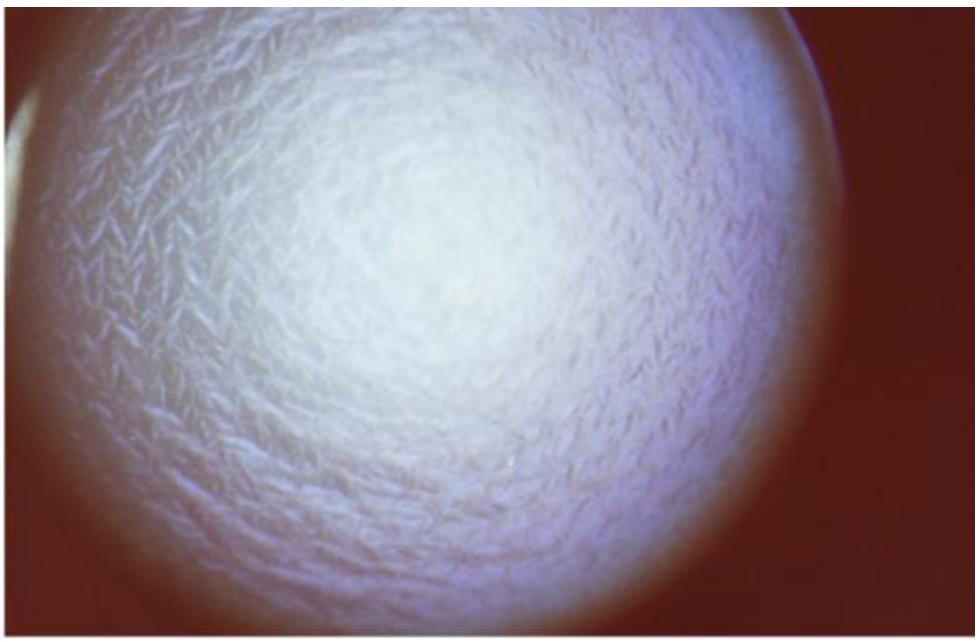


Fig. 7 Detalle de una colonia de *A. actinomycetemcomitans* en agar sangre. (Estereoscopio)[50]

3.2.3.5. Factores de Virulencia

La tabla 3 resume los factores de virulencia hallados en la literatura, atribuidos a *A. actinomycetemcomitans*, en relación a la enfermedad periodontal:

Tabla 03. Factores de Virulencia de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Factor de Virulencia	Descripción	Referencia
Adhesinas	Componentes de superficie bacteriana, incluyendo fimbrias, material amorfo extracelular y vesículas extracelulares, que median la adherencia a sustratos como saliva, superficies dentales, proteínas de matriz extracelular y células epiteliales.	[51,52]
Resistencia a antibióticos	Mecanismos que permiten resistencia a antibióticos como tetraciclinas, con determinantes como tetB que pueden transferirse por conjugación.	[51]
Bacteriocinas	Factores involucrados en promover la colonización compitiendo con otras bacterias.	[51,52]
Receptor bacteriano de interleucina I (BilRI)	Una lipoproteína de membrana externa específica de Pasteurellaceae que une citocinas proinflamatorias como IL-1β, y también IL-8, TNF-α, INF-γ e IL-10;	[52,53]

	caracterizada como una proteína intrínsecamente desordenada capaz de interactuar con múltiples ligandos.	
Agentes de resorción ósea	Componentes como LPS, factores sensibles a proteólisis en microvesículas y materiales asociados a la superficie que inhiben la proliferación de osteoblastos, activan la resorción ósea e inducen la proliferación de osteoclastos.	[51]
Inhibidores quimiotácticos	Factores que interfieren con las defensas del huésped inhibiendo la quimiotaxis.	[51]
Colagenasa	Endopeptidasas de zinc o enzimas proteolíticas extracelulares que digieren fibras de colágeno, lo que lleva a una reducción en la densidad de colágeno en la enfermedad periodontal.	[51]
Factores de unión a citocinas	Proteínas como la subunidad β de ATP sintasa, proteína de unión a ADN tipo histona HU, canal de secretina HofQ y Omp100 que interactúan con citocinas humanas como IL-1β, IL-8 e IL-6, lo que lleva a su internalización y cambios en las propiedades del biofilm.	[53]

Citotoxinas	Toxinas termolábiles en material asociado a la superficie que inhiben la proliferación de fibroblastos humanos, incluyendo una proteína de 50 kDa que inhibe la síntesis de ADN y una proteína de 8 kDa llamada Gapstein, potencialmente reduciendo la síntesis de colágeno.	[51]
Toxina distensora citoletal (CDT)	Una exotoxina proteica que causa daño en el ADN de las células huésped, lo que lleva a detención del ciclo celular y apoptosis; altera la función de los macrófagos inhibiendo la fagocitosis y afectando la producción de interleucinas; inhibe la proliferación de células del ligamento periodontal y fibroblastos gingivales, estimulando la producción de RANKL para resorción ósea.	[51,52]
Proteínas de unión a Fc	Proteínas asociadas a la superficie celular bacteriana y liberadas en forma soluble que se unen a la región Fc de IgG, inhibiendo la opsonización y fagocitosis, y potencialmente afectando la activación del complemento.	[51]

Fimbrias	Estructuras proteicas poliméricas filamentosas largas que proyectan desde la superficie bacteriana, portando adhesinas que se adhieren a sustratos, resisten fuerzas de cizallamiento y ayudan en la adquisición de nutrientes; compuestas de proteína Flp.	[51,53]
H-NS	Una proteína estructuradora de nucleoides tipo histona que actúa como silenciador global de genes, reprimiendo factores de virulencia como leucotoxina A y D (LtxA y LtxD); su deleción afecta la formación de biofilm y la expresión de proteínas en biofilms multi-especies.	[52]
Proteínas de choque térmico (HSPs)	Proteínas como GroEL-like (HSP60) y DnaK-like (HSP70) que actúan como chaperonas moleculares; HSP GroEL-like promueve la proliferación de células epiteliales a bajas concentraciones pero es tóxica a altas concentraciones, y es osteolítica.	[51]
Proteínas inmunosupresoras	Factores como una proteína de 60 kDa que inhibe la síntesis de IgG e IgM activando células B supresoras, downregulando respuestas de células B	[51]

	y T a mitógenos; la leucotoxina también altera respuestas linfocíticas inhibiendo la síntesis de ADN, ARN, proteínas, IgG e IgM.	
Invasinas	Factores que promueven la colonización y persistencia permitiendo la invasión de tejidos huésped.	[51,53]
Leucotoxina (LtxA)	Una proteína de 116 kDa de la familia RTX que forma poros en membranas de células blanco; activa la desgranulación de neutrófilos, liberando enzimas lisosomales, estructuras tipo red y MMPs; induce apoptosis en linfocitos; activa el inflamasoma en monocitos/macrófagos, lo que lleva a secreción de IL-1β e IL-18; altamente específica para células hematopoyéticas de humanos y algunos primates, uniéndose vía receptor LFA-1.	[51,53]
Lipopolisacáridos (LPS)	Moléculas consistentes en antígeno O, oligosacárido central y lípido A; el antígeno O proporciona variación antigénica y media adherencia; el núcleo permite adherencia y protección contra anticuerpos y complemento; el lípido A	[51–53]

	promueve respuestas inmunes; en general, inhibe la actividad de osteoblastos, activa la resorción ósea y une moléculas huésped como hemoglobina e IL-8.	
Vesículas de membrana externa (OMVs)	Vesículas naturalmente liberadas que entregan factores de virulencia biológicamente activos como CDT, OmpA, leucotoxina, Pal y GroEL a células huésped; el proteoma incluye BilRI, Omp100, TdeA y proteína tipo ferritina, con funciones en direccionamiento de fármacos, adquisición de hierro y evasión inmune.	[52,53]
Cápsula polisacárida	Una capa adicional en muchas condiciones que sirve como barrera protectora.	[53]

De la amplia gama de factores de virulencia descritos en la tabla 03, hay cuatro factores que representan los mecanismos más destacados en la patogénesis de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* según la literatura revisada, debido a su rol en la destrucción tisular periodontal, la evasión inmune y la inflamación crónica, siendo estos:

- **Leucotoxina A (LtxA):**

  Toxina de alta selectividad que afecta exclusivamente a células de

origen hematopoyético en humanos y ciertos primates.[51] Afecta a varios tipos de leucocitos a través de distintos procesos de muerte celular.

En neutrófilos, esta toxina provoca la liberación de enzimas lisosomales, estructuras en forma de red y metaloproteinasas de matriz (MMPs) al inducir la degranulación, mientras que en los linfocitos desencadena apoptosis.[51] Por otro lado, en monocitos y macrófagos, LtxA activa el inflamasoma, un complejo que involucra a la caspasa-1 (una enzima tipo cisteína proteinasa), lo que resulta en la producción y liberación de las citoquinas inflamatorias IL-1β e IL-18 [51]. Estos mecanismos celulares y moleculares, que han sido descritos en estudios previos, son claves en la periodontitis de progresión rápida, asociada al serotipo b de *Aa* [54].

- **Toxina Citolítica Distensora (CDT):**

  La toxina CDT (Cytolethal Distending Toxin) es una genotoxina producida por bacterias gram negativas, como *A. actinomycetemcomitans,* siendo esta la única bacteria conocida entre las especies orales que genera CDT, y se estima que entre el 66% y el 86% de sus cepas poseen esta capacidad. [51]

  Estructuralmente, la CDT está compuesta por tres subunidades: CdtA, CdtB y CdtC. Las subunidades CdtA y CdtC actúan como facilitadoras, permitiendo que CdtB, la subunidad activa, ingrese a las células huésped. Una vez en el núcleo, CdtB daña el ADN, lo que interrumpe el ciclo celular e induce apoptosis. Este efecto afecta a diversas células, incluyendo fibroblastos gingivales, células epiteliales

gingivales y componentes del sistema inmunitario como células T, B y monocitos, comprometiendo tanto la integridad estructural como la respuesta inmune local.[51]

Además, la CDT estimula la producción de citoquinas proinflamatorias, como IL-1β e IL-6, y RANKL, un factor que promueve la resorción ósea, lo que intensifica la inflamación y contribuye a la pérdida ósea característica de la periodontitis, agravando el daño tisular y la progresión de la enfermedad.[51]

- **Lipopolisacárido (LPS) de *A.actinomycetemcomitans***

  La superficie de *Aa* está recubierta de Lipopolisacáridos (LPS), al igual que otras especies gram negativas. [51] El LPS constituye un factor de virulencia fundamental en la patogénesis de periodontitis, y está caracterizado por una estructura molecular diversa que define la serotipificación de *Aa* (en letras a-f)[51,54]. El LPS desencadena respuestas inflamatorias en células humanas, promoviendo la expresión de IL-15 en epitelio de unión, IL-6 e IL-8 en fibroblastos gingivales, y óxido nítrico en osteoblastos, lo que contribuye a la inflamación y resorción ósea características de la periodontitis [51,55]

- **Vesículas de membrana externa (OMVs)**

  Las vesículas de membrana externa (OMVs por sus siglas en inglés) de *A. actinomycetemcomitans*, son estructuras lipídicas que funcionan como un medio de transporte de sustancias del patógeno hacia la célula huésped, liberando factores de virulencia como CDT y LtxA, además de proteínas como OmpA que facilitan la colonización y la

interacción con el sistema inmunitario.[51] Asimismo, las OMVs contienen peptidoglicano activo para los receptores NOD1 y NOD2, lo que desencadena respuestas inmunitarias innatas en células no fagocíticas como los fibroblastos gingivales, y pequeñas moléculas de ARN (msRNAs) que podrían actuar como moléculas señalizadoras para modular la respuesta inmune del huésped.[51] La internalización de las OMVs en células huésped ocurre principalmente por endocitosis dependiente de clatrina, aunque también pueden fusionarse con membranas celulares en un proceso dependiente de colesterol, sin requerir la presencia de toxinas específicas como CDT o LtxA, lo que amplifica la capacidad de *A. actinomycetemcomitans* para comprometer la integridad de los tejidos gingivales y debilitar la inmunidad local, contribuyendo significativamente a la progresión de la enfermedad periodontal[51]

3.2.4. Efecto antibacteriano de la hoja de Coca frente a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

3.2.4.1. Mecanismos de acción

La cocaína es el alcaloide más significativo y reconocido de todas las variedades del género *Erythroxylum*, sin embargo, si bien Mullin et. al(1997) demostró un leve efecto antibacteriano de este alcaloide frente a *Pseudomonas aureginosa* en una concentración del 4% [56], el potencial antibacteriano de la planta parece centrarse en su

composición de flavonoides.

Los flavonoides, ampliamente reconocidos por su capacidad antibacteriana, se perfilan como una alternativa terapéutica prometedora para el manejo de enfermedades infecciosas, como la periodontitis [57]. *Erythroxylum novogranatense var. truxillense* presenta en su composición química una amplia diversidad de flavonoides, entre los cuales resaltan la quercetina y el kaempferol, por su potencial antibacteriano. [46]

La quercetina compromete la integridad de las paredes y membranas celulares de las bacterias, aumentando su permeabilidad y desencadenando la lisis celular.[58] Un estudio llevado a cabo por Gutiérrez-Venegas et al. (2019), demostró que la quercetina, a una concentración de 1 mg/ml, exhibe una actividad bacteriostática estadísticamente significativa contra cultivos ATCC de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans,* en agar sangre [59]. Por otro lado, el kaempferol, un flavonoide extensamente investigado, manifiesta efectos antibacterianos tanto frente a bacterias Gram-positivas como Gram-negativas [60]. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos mediante el bloqueo de la topoisomerasa IV, lo que impide la replicación del ADN bacteriano, asimismo, provoca daños en la membrana celular, facilitando la fuga de componentes intracelulares y

conduciendo a la lisis bacteriana [60]. Adicionalmente, el kaempferol inactiva enzimas esenciales, alterando procesos metabólicos críticos para la supervivencia de las bacterias y también potencia la eficacia de antibióticos convencionales gracias a un efecto sinérgico, lo que lo hace particularmente valioso frente a cepas resistentes [60]. Estas propiedades posicionan a *E. novogranatense var. truxillense* como un candidato destacado para el desarrollo de nuevas estrategias antimicrobianas.

3.3. Definición de términos

- **Extracto etanólico**: Preparación obtenida al disolver componentes solubles de un material vegetal (como hojas) en etanol, concentrando principios activos como alcaloides o flavonoides para evaluar sus propiedades biológicas, comúnmente usado en estudios in vitro por su capacidad para extraer compuestos polares y no polares[5].
- **Efecto antibacteriano**: Capacidad de un agente (como un extracto) para inhibir el crecimiento o eliminar bacterias, medida a través de indicadores como halos de inhibición o concentraciones mínimas, a menudo vinculada a mecanismos como la disrupción de membranas celulares o interferencia en procesos metabólicos [9]
- ***In vitro***: Método experimental realizado fuera de un organismo vivo, en un entorno controlado como placas de cultivo, para simular interacciones biológicas y evaluar efectos como la inhibición bacteriana, permitiendo precisión pero limitando extrapolaciones a

condiciones reales [3].

- **Halo de inhibición**: Zona clara alrededor de un disco o pozo en un medio de cultivo que indica la sensibilidad de un microorganismo a un agente antimicrobiano; su diámetro se mide para cuantificar la potencia inhibitoria [61] .
- **Alcaloides**: Compuestos orgánicos nitrogenados derivados de plantas, como higrina o cuscohigrina en la coca, con propiedades bioactivas que pueden incluir efectos estimulantes o antimicrobianos, aunque su concentración varía por especie y condiciones de cultivo [25].
- **Flavonoides**: Grupo de metabolitos secundarios vegetales, como quercetina y kaempferol, con actividades antioxidantes y antimicrobianas al interferir en membranas bacterianas o enzimas, comunes en extractos como el de coca para estudios de inhibición patógena [57].

3.4. Hipótesis

- **Hipótesis General**
    - **H_0:** El extracto etanólico de *Erythroxylum novogranatense var. truxillense* no tiene actividad antibacteriana sobre *Aggregatibacter actinomycetemcomitans, in vitro*.
    - **H_1:** El extracto etanólico de *Erythroxylum novogranatense var. truxillense* sí tiene actividad antibacteriana sobre *Aggregatibacter actinomycetemcomitans, in vitro*.
    -

- **Hipótesis Específicas**

    - **H_1:** Existen diferencias significativas y el diámetro de los halos de inhibición aumenta progresivamente con la concentración del extracto (efecto dosis-dependiente).
    - **H_0:** No existen diferencias significativas en el diámetro de los halos de inhibición entre las concentraciones 25 %, 50 %, 75 % y 100 % del extracto.
    - **H_1:** Existen diferencias significativas entre el efecto antibacteriano del extracto etanólico y la clorhexidina al 0.12%.
    - **H_0:** No existen diferencias significativas entre el efecto antibacteriano del extracto etanólico y la clorhexidina al 0.12%.
    - **H_1:** El extracto etanólico presenta un diámetro de inhibición significativamente mayor que el DMSO
    - **H_0:** No existen diferencias significativas entre el extracto etanólico y el DMSO en el diámetro de los halos de inhibición.
    - **H_1:** Existe una correlación significativa entre la concentración del extracto y el diámetro de los halos de inhibición.
    - **H_0:** No existe correlación entre la concentración del extracto y el diámetro de los halos de inhibición.

3.5. Operacionalización de las variables

Tabla 04. Operacionalización de las variables

VARIABLE	DEFINICIÓN	TIPO DE VARIABLE	INDICADORES	DATO O VALOR	ESCALA
Concentración del extracto etanólico de *E. novogranatense var. truxillense.*	Proporción del extracto etanólico de *E.novogranatense var. truxillense* presente en la solución aplicada a los discos de difusión, expresada como porcentaje.	Independiente / Cualitativa nominal	Concentración del extracto etanólico, expresado en porcentajes.	Valores numéricos: 25, 50, 75, 100.	**Nominal**
Efecto antibacteriano del extracto etanólico de *E. novogranatense var. truxillense*	Capacidad del extracto para inhibir el crecimiento de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, medida por el diámetro del halo de inhibición en el ensayo de difusión en pozos en agar.	Dependiente / Cuantitativa continua	Diámetro del halo de inhibición expresado en milímetros.	Valores numéricos en milímetros	**Razón**

IV. METODOLOGÍA

4.1. Tipo de investigación

El presente trabajo de investigación corresponde a un estudio de tipo:

- Experimental: El investigador sometió los cultivos a diferentes concentraciones del extracto para descubrir qué efecto produce este sobre la proliferación bacteriana de la muestra.
- *In vitro*: El ensayo experimental se realizó en condiciones controladas de laboratorio.
- Transversal: Se realizaron las mediciones en un mismo momento.
- Comparativo: Se comparó el extracto frente a los controles positivo y negativo
- Analítico: Este estudio intentó demostrar la relación entre las variables determinadas y determinar la influencia que tiene entre estas.

4.2. Población y muestra

4.2.1. Población

Conformada por las bacterias periodontopatógenas *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522

4.2.2. Muestra

Conformada por 12 placas Petri inoculadas con cepas *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29522, número elegido por similitud en

trabajos de investigación similares [7,8,20,22].

4.2.2.1. Criterios de inclusión

- Placas inoculadas con la cepa bacteriana certificada y estandarizada ATCC 29522 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans.* Marca: KwikStick (Microbiologics)
- Pozos de diámetro adecuado e inoculados con 20 microlitros de las concentraciones del extracto etanólico de *E. novogranatense var. truxillense*

4.2.2.2. Criterios de exclusión

Placas de medio de cultivo con presencia de contaminantes.

4.2.2.3. Unidad de análisis

Conformada por los halos de inhibición obtenidos tras la incubación, lo cual permite medir el efecto antimicrobiano de las concentraciones del extracto y realizar comparaciones entre grupos.

4.3. Técnica, procedimiento e instrumento de recolección de datos

4.3.1. Técnica de recolección de datos

Para este estudio se realizó un ensayo de difusión en pozos en agar, lo cual permite evaluar la acción antibacteriana del extracto etanólico de *E. novogranatense var. truxillense* frente a *Aggregatibacter*

actinomycetemcomitans, mediante la medición de los diámetros de inhibición de cada pozo.

4.3.2. Procedimiento experimental

4.3.2.1. Obtención de las hojas y preparación del extracto etanólico de *E. novogranatense var. truxillense*

- Se adquirieron hojas de coca de Trujillo (presentación de hoja picada y sin irradiar) de ENACO S.A., empresa pública autorizada para la distribución de dicha planta en el Perú.
- La obtención del extracto etanólico se realizó en el laboratorio de química orgánica de la facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, con la guía y supervisión de un Químico Farmacéutico experimentado.
- Las hojas fueron sometidas a maceración alcohólica en etanol al 96% durante 14 días, con agitación manual dos veces por día (mañana y tarde).
- El macerado se filtró al vacío utilizando papel Whatman Nº40, para luego ser concentrado en un evaporador rotatorio y desengrasado en un equipo Soxhlet, el producto final se almacenó en un frasco oscuro de boca ancha en refrigeración.
- El extracto obtenido fue de una consistencia casi sólida, dificultando su manipulación, por lo cual se optó por realizar una dilución en partes iguales con dimetilsulfóxido (DMSO), la cual fue considerada como el extracto puro (100%).
- Se realizaron diluciones con DMSO al 25%, 50%, 75% que, junto

con el extracto al 100%, fueron comparadas con Clorhexidina 0.12% (control positivo) y DMSO (control negativo).

4.3.2.2. Obtención de la cepa bacteriana

- Se adquirió la cepa ATCC certificada de *A. actinomycetemcomitans* de la empresa importadora GenLab del Perú. La cepa se distribuye bajo el nombre comercial Kwik Stik, de la marca estadounidense Microbiologics.

4.3.2.3. Preparación del medio de cultivo

- Se adquirieron 50 ml de sangre de ovino desfibrinada del Instituto Nacional de Salud.
- Se prepararon 20 placas petri de Agar Schaedler enriquecido con sangre desfibrinada de ovino, que fueron almacenadas en refrigeración hasta el día del ensayo experimental.

4.3.2.4. Ensayo de difusión en agar con pozos

- Se inició con la activación del tubo de la cepa ATCC *A. actinomycetemcomitans*, el inóculo bacteriano obtenido se distribuyó equitativamente entre 15 placas de Agar Schaedler. 12 placas fueron sometidas al extracto y los controles, además de 3 placas que fueron sembradas y almacenadas como reserva de la bacteria.
- Una vez sembradas las 12 placas, se realizaron 6 pozos con ayuda de un sacabocados estéril, en 4 pozos se distribuyeron las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *E.*

novogranatense var. truxillense (25, 50, 75 y 100%) y los respectivos controles en los 2 pozos restantes.

- Las 15 placas se incubaron en 03 jarras de anaerobiosis, 2 jarras fueron usadas para las 12 placas con el extracto (6 cada una) y una jarra fue usada para la reserva de la cepa, todas con sobre generador de anaerobiosis en incubación a 37ºC por 72h
- Pasado el período de incubación se procedió a la lectura de resultados mediante la medición de los diámetros de los halos de inhibición haciendo uso de un vernier digital calibrado.

4.3.3. Instrumento de recolección de datos

- Se recolectaron las mediciones de los diámetros de los halos de inhibición, los cuales fueron clasificados según la escala de sensibilidad de Duraffourd, que clasifica en sensibilidad nula, sensible, muy sensible y sumamente sensible [62].
- Se registraron las mediciones obtenidas en las fichas de recolección de datos.
- El registro incluyó el código de cada muestra, así como la concentración respectiva a cada medición, el diámetro del halo de inhibición en mm y observaciones adicionales.

4.4. Procesamiento y análisis de resultados

Las mediciones obtenidas fueron registradas en la ficha de recolección de datos, para posteriormente ingresar la data en una hoja de cálculo de Microsoft Office Excel, organizada en dos columnas, para grupos y medidas de los halos

registrados en milímetros.

Se realizó la prueba de Shapiro-Wilk, para conocer la normalidad en la distribución de los datos

La tabla obtenida en Microsoft Office Excel fue importada al software IBM SPSS Statistics 27 donde se analizó para obtener estadísticos descriptivos, normalidad de la distribución de datos, comparación del efecto entre concentraciones y entre estos con los controles, así como correlación dosis- efecto.

Se obtuvieron media, mediana, desviación estándar (DE), rango intercuartílico (IQR), mínimo y máximo para cada grupo (25 %, 50 %, 75 %, 100 %, clorhexidina 0.12 % y DMSO), luego se realizó la prueba de normalidad Shapiro – Wilk para cada grupo.

Se realizaron las pruebas de Kruskal – Wallis y U de Mann Whitney con corrección de Bonferroni para las comparaciones entre grupos, posteriormente se realizó el análisis de correlación de Spearman para determinar relación dosis – efecto.

Para la interpretación cuantitativa de los diámetros de halos de inhibición obtenidos en las pruebas de difusión en disco, se empleó la escala de Duraffourd, que clasifica la actividad antimicrobiana relativa basada en el tamaño del halo, categorizando la sensibilidad bacteriana como nula (halo <9 mm, sin actividad significativa), sensible (9-14 mm, actividad limitada), muy sensible (14-19.99 mm, buena inhibición) y sumamente sensible (≥20 mm, alta eficacia).[62–64] Esta escala se utiliza para evaluar extractos naturales en contextos donde se prioriza una clasificación monotónica y cualitativa,

permitiendo identificar tendencias de sensibilidad. [63,64]. En este estudio, se aplicó para resaltar el efecto dosis-dependiente del extracto etanólico, complementando los análisis estadísticos no paramétricos.

V. RESULTADOS

Se evaluaron un total de 72 observaciones (12 repeticiones por cada uno de los 6 grupos: concentraciones del extracto etanólico al 25%, 50%, 75% y 100%, control positivo con clorhexidina 0.12% y control negativo con DMSO). A continuación, se presentan los hallazgos estadísticos.

5.1. Estadísticos Descriptivos

La Tabla 5 resume los estadísticos descriptivos de los diámetros de halos de inhibición (mm) por grupo. Se observó un incremento progresivo en la mediana y la media de los halos a medida que aumentaba la concentración del extracto. El control positivo (clorhexidina) presentó los valores más altos, mientras que el control negativo (DMSO) no mostró inhibición alguna (mediana y media = 0 mm).

Tabla 5. Estadísticos descriptivos de los diámetros de halos de inhibición (mm) por concentración del extracto etanólico y controles (n=12 por grupo)

Grupo	Mediana (mm)	IQR (mm)	Media ± DE (mm)	Mínimo (mm)	Máximo (mm)
25%	9.58	0.97	9.44 ± 0.76	7.47	10.15
50%	10.33	0.55	10.11 ± 0.60	8.77	10.68
75%	11.09	0.94	10.95 ± 0.95	8.48	12.10
100%	11.85	0.52	11.67 ± 0.82	9.47	12.57
Clorhexidina 0.12%	14.99	1.38	15.11 ± 0.93	13.50	16.72
DMSO	0.00	0.00	0.00 ± 0.00	0.00	0.00

IQR: rango intercuartílico; DE: desviación estándar.

La Figura 8 muestra el diagrama de cajas y bigotes de los diámetros de halos de inhibición por grupo. Se observó un aumento progresivo en la mediana a medida que incrementaba la concentración del extracto. Se identificaron valores atípicos moderados (círculos) y extremos (asteriscos) en varios grupos, particularmente en concentraciones intermedias y altas.

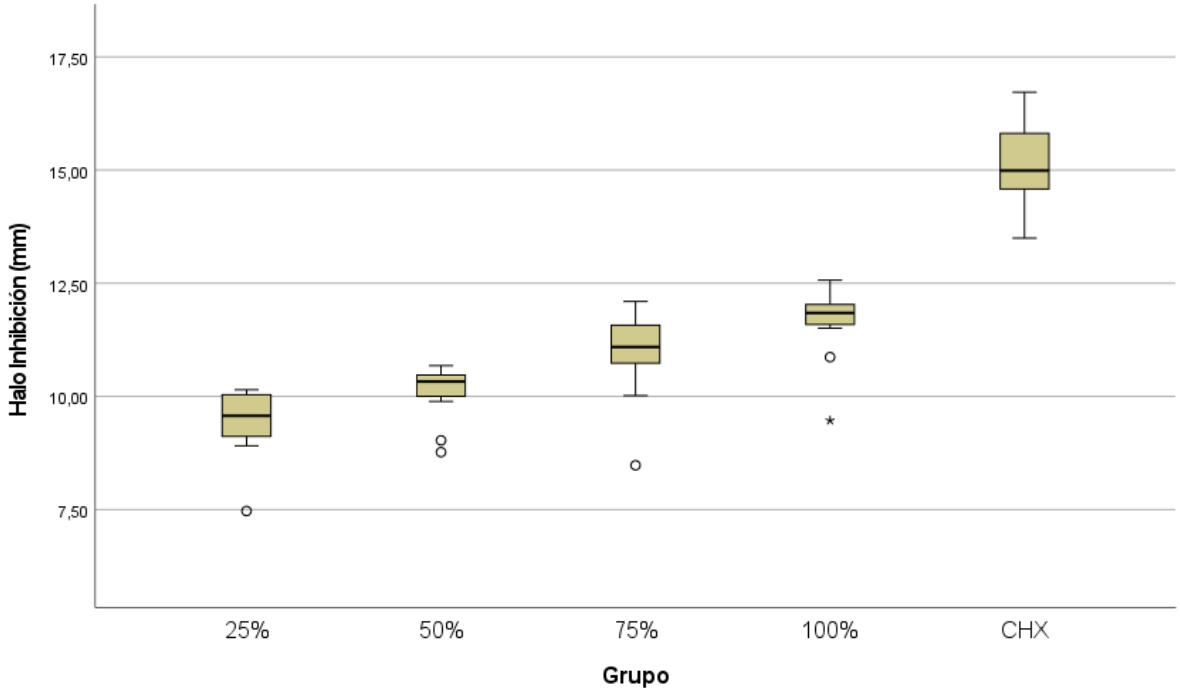


Figura 8. Diagrama de cajas y bigotes de los diámetros de halos de inhibición (mm) por concentración del extracto etanólico de *Erythroxylum novogranatense var. truxillense* y controles

La línea central representa la mediana, la caja abarca del cuartil 1 al cuartil 3 (rango intercuartílico), los bigotes se extienden hasta 1.5 × IQR, y los círculos/asteriscos indican valores atípicos.

5.2. Pruebas de normalidad

La prueba de Shapiro-Wilk rechazó la hipótesis de normalidad en la mayoría de los grupos del extracto (25%: p=0.023; 50%: p=0.005; 75%: p=0.042; 100%: p=0.011), mientras que el control positivo (clorhexidina) sí presentó normalidad (p=0.846), como se aprecia en la tabla 6. El control negativo (DMSO) no aplica por varianza cero. Por lo tanto, se procedió con pruebas no paramétricas.

Tabla 6. Estadísticos de la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk

Grupo	Estadístico	gl	Sig.
25%	.833	12	.023
50%	.777	12	.005
75%	.855	12	.042
100%	.806	12	.011
CHX	.965	12	.846

5.3. Análisis Comparativo

La prueba de Kruskal-Wallis reveló diferencias significativas en los diámetros de halos de inhibición entre las concentraciones del extracto (25%, 50%, 75%, 100%) y el control positivo (clorhexidina) (H=46.356, gl=4, p<0.001).

Tabla 7. Estadísticos de la prueba de Kruskal-Wallis para comparar diámetros de halos de inhibición entre grupos

Estadístico	Halo
H de Kruskal-Wallis	46.356
gl	4
Sig. asintótica	<0.001

Las comparaciones post hoc mediante la prueba U de Mann-Whitney (con corrección Bonferroni para múltiples comparaciones) se resumen en la Tabla 8. Todas las concentraciones del extracto presentaron diferencias significativas con el control positivo ($p<0.001$), con halos mayores en clorhexidina. Entre concentraciones del extracto, se observaron diferencias significativas en pares adyacentes (ej. 75% vs 100%: $U=112.000$, $Z=2.310$, $p=0.020$), con halos mayores en concentraciones superiores. Todas las concentraciones difirieron significativamente del control negativo (DMSO) ($p<0.001$).

Tabla 8. Comparaciones post hoc mediante U de Mann-Whitney entre concentraciones del extracto y controles

Comparación	U	Z	p-valor	Diferencia significativa (p<0.05)	Grupo con halos mayores
25% vs 50%	118.000	2.656	0.007	Sí	50%
50% vs 75%	121.500	2.859	0.003	Sí	75%
75% vs 100%	112.000	2.310	0.020	Sí	100%
25% vs CHX	144.000	4.157	<0.001	Sí	CHX
50% vs CHX	144.000	4.157	<0.001	Sí	CHX
75% vs CHX	144.000	4.157	<0.001	Sí	CHX
100% vs CHX	144.000	4.157	<0.001	Sí	CHX
Todas vs DMSO	[Valores triviales]	—	<0.001	Sí	Extracto/CHX

Nota: p-valores ajustados con Bonferroni para 8 comparaciones (umbral 0.00625).

5.4. Análisis de Correlación

La correlación de Spearman mostró una relación positiva fuerte y altamente significativa entre la concentración del extracto etanólico y el diámetro de los halos de inhibición, como se presenta en la Tabla 9. Se consideró un nivel de significancia positivo cuando $p<0.05$

Tabla 9. Resultados de la correlación de Spearman entre el diámetro de halos de inhibición (mm) y la concentración del extracto etanólico

Variables	Rho de Spearman	Sig. (bilateral)	n
Diámetro del Halo de Inhibición – Concentración del extracto	0.771	<.001	48

Nota: **. La correlación es significativa en el nivel 0.01 (bilateral). Análisis realizado con n=48 observaciones (solo concentraciones del extracto). Este resultado confirma un efecto dosis-dependiente.

5.5. Clasificación según la escala de Duraffourd

La Figura 9 presenta la clasificación cualitativa de los halos de inhibición según la escala de Duraffourd, cruzando las concentraciones del extracto etanólico y el control positivo (clorhexidina 0.12%). Se observó que las concentraciones del extracto (25%, 50%, 75% y 100%) cayeron predominantemente en la categoría "Sensible" (9-14.99 mm), con recuentos cercanos a 10-12 observaciones por grupo, y un bajo número de casos en "Nula" (< 9 mm, 1-2 por grupo en concentraciones bajas). El control positivo (Clorhexidina 0.12%) mostró una distribución predominantemente "Muy sensible" (14-19.99 mm, 11 observaciones) y una observación en la categoría “Sensible”. Ningún grupo presentó halos en "Sumamente sensible" (≥20 mm). Las barras de error (IC 95%) indican variabilidad moderada, consistente con la dispersión observada en los estadísticos descriptivos.

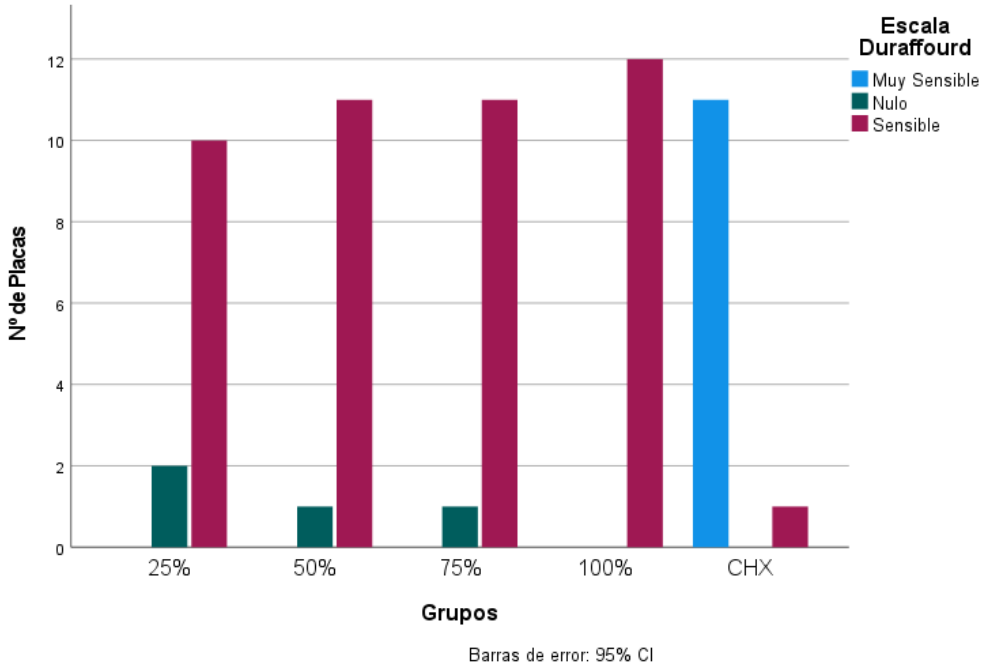


Figura 9. Clasificación de los resultados según la escala de Duraffourd

VI. DISCUSIÓN

La presente discusión tiene como propósito interpretar los resultados obtenidos en la evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum novogranatense* var. *truxillense* sobre *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 29522). Este análisis se enmarca en el objetivo general y los objetivos específicos del estudio, que buscaron determinar la actividad antibacteriana de este extracto vegetal frente a uno de los patógenos periodontales más agresivos asociados a la periodontitis y la pérdida ósea.

Los hallazgos principales demuestran de manera consistente la existencia de un efecto antibacteriano dosis-dependiente. Se observó un incremento progresivo en los diámetros de los halos de inhibición generados sobre *A. actinomycetemcomitans* a medida que aumentaba la concentración del extracto etanólico de *E. novogranatense var. truxillense*, mostrando una clara tendencia ascendente desde la concentración más baja (25%) hasta la concentración más alta (100%). Esta relación se cuantificó mediante la correlación de Spearman, mostrando un coeficiente positivo fuerte (rho = 0.812) y altamente significativo ($p < 0.001$), lo que confirma que mayores concentraciones del extracto se asocian con mayor inhibición bacteriana. El análisis inferencial con la prueba de Kruskal-Wallis reveló diferencias significativas entre grupos de concentración ($p < 0.05$). Las comparaciones post-hoc (Mann-Whitney con corrección de Bonferroni) identificaron variaciones específicas entre concentraciones. Además, por la escala de Duraffourd, el extracto se clasificó mayormente como "Sensible", mientras el control positivo (clorhexidina 0.12%) fue "Muy sensible".

Estos resultados validan la inhibición del crecimiento de *A. actinomycetemcomitans* por el extracto etanólico de *E. novogranatense var. truxillense*, sentando bases para interpretaciones microbiológicas, comparativas y clínicas.

Desde una vista microbiológica, los efectos son atribuibles a la fitoquímica de *E. novogranatense var. truxillense*, rica en alcaloides menores y flavonoides como quercetina y kaempferol [46], que alteran la permeabilidad de membranas bacterianas, causando lisis y fuga intracelular [57]. La quercetina, a 1 mg/mL, muestra bacteriostasis significativa contra cepas ATCC de *A. actinomycetemcomitans* en agar sangre, al disruptir paredes celulares e inhibir síntesis de ácidos nucleicos [59]. Similarmente, el kaempferol bloquea topoisomerasa IV, frenando replicación de ADN y potenciando sinergias antimicrobianas [58].

En *A. actinomycetemcomitans*, Gram-negativo virulento con LtxA y OMVs, estos flavonoides podrían reducir liberación de citoquinas proinflamatorias y enzimas proteolíticas que agravan destrucción tisular en periodontitis[51]. Las OMVs facilitan internalización vía endocitosis dependiente de la proteína clatrina, amplificando inmunidad disbiótica[51], y el extracto podría estabilizar membranas externas.

En síntesis, el extracto emerge como inhibidor natural contra *A. actinomycetemcomitans*, alineado con extractos flavonoides como alternativas a resistencia antimicrobiana[10], aunque su rol complementario podría verse influido por pH y redox oral[15].

En particular, estos hallazgos adquieren relevancia en el contexto peruano, donde la periodontitis representa un problema de salud pública significativo, con una prevalencia de hasta un 80% en la población general, atribuida principalmente a

deficiencias en la higiene oral y la falta de acceso a servicios preventivos, según menciona la literatura[2].

La bibliografía existente se centra mayoritariamente en especies cariogénicas como *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus casei*, o periodontopatógenas como *Porphyromonas gingivalis*, revelando un vacío en estudios sobre *A. actinomycetemcomitans*, patógeno clave en la periodontitis agresiva [4,16]

En 2006 se evaluó el extracto etanólico de la misma variedad (*E. novogranatense* var. *truxillense*) contra flora mixta salival, reportando halos de inhibición dependientes de la concentración (10.95-14.71 mm), similares a los observados en el presente estudio, con una correlación positiva entre dosis y efectividad [18]. Por otra parte, otros estudios han reportado halos significativos (34.4 mm para *S. mutans* y 33.7 mm para *L. casei*) ampliamente superiores al control negativo, sugiriendo un potencial inhibitorio sobre patógenos orales que coincide con los hallazgos de este estudio, aunque los organismos evaluados corresponden a bacterias anaerobias grampositivas de potencial más cariogénico que periodontal [7]. Estos hallazgos refuerzan la acción antimicrobiana de los compuestos bioactivos, como flavonoides, aunque los halos en la presente investigación fueron menores, posiblemente debido a la mayor resistencia de *A. actinomycetemcomitans* como Gram-negativo virulento [51].

En patógenos periodontales, se ha demostrado sensibilidad límite al 100% del extracto etanólico de *E. coca* y una CMI del 6.25% contra *P. gingivalis* [8], indicando un potencial contra flora similar a la asociada con *A. actinomycetemcomitans* en complejos microbianos subgingivales [18]. Otro estudio confirmó actividad del extracto de *E. coca* contra bacilos negro pigmentados con resultados comparables (CMI 6.25%), destacando efectos notables a altas concentraciones [14], lo que se

correlaciona con las diferencias significativas por Kruskal-Wallis ($p < 0.001$) entre concentraciones obtenidas en el presente estudio. Sin embargo, otra investigación muestra que *E. coca* var. *coca* exhibe halos mayores (18.65 mm al 100%) contra *S. mutans* que la variedad *truxillense* (15.30 mm)[22], sugiriendo variaciones interespecíficas en alcaloides y flavonoides que podrían explicar las discrepancias en nuestra actividad moderada [22].

Otras investigación comparó concentraciones del extracto de *E. coca var. coca* al 50% y 75% contra *S. mutans*, con halos de 11.2-11.6 mm inferiores a los obtenidos por la clorhexidina [20], resultado similar a nuestra comparación donde el control positivo superó al extracto ($p < 0.001$), pero con un perfil dosis-dependiente consistente. También se han reportado halos de 10.73-16.05 mm para *E. coca* var. *coca* contra *S. mutans*, enfatizando la superioridad de otros extractos vegetales, lo que resalta la necesidad de aislar compuestos específicos en futuras evaluaciones [19].

Otros ensayos ampliaron el espectro a múltiples patógenos orales, con efectos variables (7.4-20 mm), atribuyendo la actividad a compuestos como guaia-1(5),11-diene, alineándose con nuestra variabilidad observada en diagramas de cajas (valores atípicos en concentraciones intermedias), posiblemente influida por el uso de DMSO como diluyente, que no mostró inhibición en el control negativo [23,24].

La escasez de literatura directa sobre *A. actinomycetemcomitans* subraya la novedad de este trabajo, aunque estudios como Haubek (2008) vinculan clones virulentos como JP2 a mayor riesgo de periodontitis agresiva, sugiriendo que nuestros resultados podrían extenderse a cepas clínicas [4]. La variabilidad experimental, como valores atípicos, es común en ensayos *in vitro* y podría mitigarse en futuros diseños con muestras salivales reales, en lugar de cepas ATCC, para capturar interacciones

microbianas complejas[15]. En resumen, mientras que los hallazgos concuerdan con el potencial antimicrobiano de extractos de coca en patógenos orales, este estudio contribuye a llenar una brecha poco estudiada al enfocarse en *A. actinomycetemcomitans*, aunque con una eficacia moderada que invita a comparaciones sinérgicas con antibióticos.

Los resultados de este estudio tienen implicaciones relevantes tanto en el ámbito teórico como práctico de la odontología y la microbiología. En primer lugar, resaltan el potencial del extracto como adyuvante terapéutico en el manejo de la periodontitis, de alta prevalencia en el Perú (80% en promedio) y asociaciones sistémicas como diabetes y enfermedades cardiovasculares [2,30]. Al inhibir un patógeno clave como *A. actinomycetemcomitans*, responsable de formas agresivas de la enfermedad, el extracto podría complementar tratamientos convencionales, reduciendo la dependencia de antibióticos y mitigando el riesgo de resistencia bacteriana, un problema global en ascenso [5]. Además, dada la relevancia cultural y accesibilidad de la hoja de coca en regiones andinas peruanas, este enfoque promueve la integración de prácticas tradicionales con evidencia científica, fomentando opciones sostenibles y de bajo costo para comunidades con limitado acceso a servicios odontológicos [12]. En contextos clínicos, podría explorarse su incorporación en enjuagues bucales o geles tópicos, potenciando efectos sinérgicos con agentes como la clorhexidina, aunque con una eficacia moderada que sugiere un rol complementario más que sustitutivo [56].

No obstante, el estudio presenta limitaciones inherentes a su diseño *in vitro*, que restringen la extrapolación a escenarios clínicos reales. La evaluación se limitó a una cepa ATCC 29522 estandarizada, lo que no captura la variabilidad genética y de

virulencia observada en aislados clínicos, como los clones JP2 asociados a mayor patogenicidad en poblaciones vulnerables [4]. Además, factores como la interacción con la microbiota oral compleja o el pH subgingival no fueron considerados, potencialmente subestimando o sobrestimando la eficacia[15]. La variabilidad en los halos de inhibición, evidenciada por valores atípicos en diagramas de cajas, podría atribuirse a inconsistencias en la preparación del extracto o condiciones de incubación, limitando la reproducibilidad [55]. Finalmente, la ausencia de ensayos de toxicidad celular o estudios *in vivo* impide evaluar la seguridad y biodisponibilidad en tejidos orales, aspectos cruciales para aplicaciones terapéuticas [59].

En conjunto, estas implicaciones y limitaciones subrayan la necesidad de investigaciones adicionales para validar el potencial del extracto en contextos más representativos.

VII.CONCLUSIONES

- El extracto etanólico de *Erythroxylum novogranatense var. truxillense* demostró efecto antibacteriano sobre *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* a las cuatro concentraciones evaluadas (25 %, 50 %, 75 % y 100 %), generando halos de inhibición significativos que aumentaron progresivamente con la concentración del extracto.
- Se observaron diferencias estadísticamente significativas en el efecto antibacteriano entre las distintas concentraciones del extracto, siendo las concentraciones superiores (75 % y 100 %) las que produjeron los mayores diámetros de halos de inhibición, confirmando un efecto dosis-dependiente.
- El efecto antibacteriano del extracto etanólico de *E. novogranatense var. truxillense* fue significativamente inferior al de la clorhexidina al 0.12 % en todas las concentraciones evaluadas, aunque mantuvo actividad inhibitoria relevante.
- El extracto etanólico mostró un claro efecto antibacteriano superior frente al control negativo DMSO, el cual no produjo ningún halo de inhibición (0 mm), con diferencias altamente significativas en todas las concentraciones probadas
- Se determinó una fuerte correlación positiva y altamente significativa entre la concentración del extracto y el diámetro de los halos de inhibición, demostrando un claro efecto dosis-respuesta.

VIII. RECOMENDACIONES

Basado en los hallazgos de este estudio, que demuestran un efecto antibacteriano dosis-dependiente pero moderado del extracto etanólico de *Erythroxylum novogranatense* var. *truxillense* sobre *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, se proponen las siguientes recomendaciones para investigaciones futuras, con el objetivo de superar las limitaciones identificadas y avanzar hacia aplicaciones clínicas:

- En primer lugar, se sugiere realizar ensayos *in vivo* en modelos animales o ensayos clínicos fase I en humanos para evaluar la eficacia del extracto en entornos biológicos reales, considerando interacciones con la microbiota oral y factores como el flujo salival, que podrían modular su actividad inhibitoria [3]. Esto permitiría validar su potencial como coadyuvante en terapias periodontales, especialmente en poblaciones peruanas con alta prevalencia de la enfermedad [2].
- Adicionalmente, se recomienda aislar y caracterizar compuestos bioactivos específicos, como flavonoides (quercetina y kaempferol), mediante técnicas avanzadas como cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) o espectrometría de masas, para identificar los responsables principales de la actividad antimicrobiana y optimizar formulaciones purificadas [45].
- Futuras evaluaciones deberían incorporar cepas clínicas aisladas de muestras salivales o bolsas periodontales de pacientes peruanos, en lugar de cepas ATCC, para capturar la variabilidad genética y de virulencia observada en contextos locales, como los clones JP2 asociados a periodontitis agresiva [4]. Esto podría lograrse mediante colaboraciones con laboratorios de

microbiología oral, aplicando métodos de secuenciación para comparar perfiles de resistencia [51].

- Es aconsejable realizar estudios de toxicidad celular en líneas epiteliales orales y de biodisponibilidad para asegurar la seguridad del extracto, evaluando concentraciones terapéuticas que minimicen efectos adversos como irritación gingival [59].
- Se propone investigar efectos sinérgicos con antibióticos convencionales o antisépticos como la clorhexidina, utilizando diseños factoriales y análisis estadísticos multivariados para detectar interacciones que potencien la inhibición bacteriana y reduzcan dosis requeridas, contribuyendo a estrategias contra la resistencia antimicrobiana.

Estas recomendaciones buscan fortalecer la evidencia científica sobre extractos naturales, promoviendo su integración sostenible en la odontología peruana.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Trindade D, Carvalho R, Machado V, Chambrone L, Mendes JJ, Botelho J. Prevalence of periodontitis in dentate people between 2011 and 2020: A systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. J Clin Periodontol. 2023;50(5):604-26. doi:10.1111/jcpe.13769

2. Lazo Meneses GA. PROBLEMÁTICA ACTUAL EN SALUD BUCAL EN EL PERÚ. SCIENTIARVM. 4 de julio de 2015;1(1):1. doi:10.26696/sci.epg.0060

3. Sedghi LM, Bacino M, Kapila YL. Periodontal Disease: The Good, The Bad, and The Unknown. Front Cell Infect Microbiol. 2021;11:766944. doi:10.3389/fcimb.2021.766944 PubMed PMID: 34950607; PubMed Central PMCID: PMC8688827.

4. Haubek D, Ennibi OK, Poulsen K, Vaeth M, Poulsen S, Kilian M. Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans in Morocco: a prospective longitudinal cohort study. Lancet Lond Engl. 19 de enero de 2008;371(9608):237-42. doi:10.1016/S0140-6736(08)60135-X PubMed PMID: 18207019.

5. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev. octubre de 1999;12(4):564-82. doi:10.1128/CMR.12.4.564 PubMed PMID: 10515903; PubMed Central PMCID: PMC88925.

6. Zapata-Ortiz V. The Chewing of Coca Leaves in Peru. Int J Addict. 1 de enero de 1970;5(2):287-94. doi:10.3109/10826087009056996 PubMed PMID: 5524116.

7. Minaya Flores P. Determinación de la actividad antibacteriana «in vitro» del extracto etanólico de la hoja de Erythroxylum novogranatense var truxillense (coca) frente a bacterias orales cariogénicas. Univ Nac Mayor San Marcos [Internet]. 2008 [citado 18 de abril de 2024]. Disponible en: https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/2759

8. Ramos Clemente AW. Actividad antibacteriana del extracto de Erythroxylum coca sobre Porphyromonas Gingivalis, estudio in vitro. Univ Nac Mayor San Marcos [Internet]. 2012 [citado 18 de abril de 2024]. Disponible en: https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/2824

9. Chouhan S, Sharma K, Guleria S. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. Medicines. 4(3):58. doi:10.3390/medicines4030058 PubMed PMID: 28930272; PubMed Central PMCID: PMC5622393.

10. Vieira de Castro Macambira D, Sousa de Almeida Júnior J, Fernandes de Magalhães Silveira C, Ferreira Sarrazin SL, Pires Moraes TM, da Silva BA, et al. Antimicrobial Activity on Streptococcus mutans and Enterococcus faecalis of Cyperus articulatus Ethanolic Extracts [Internet]. [citado 3 de octubre de 2024]. Disponible en: https://www.mdpi.com/2223-7747/13/5/689

11. Plants of the World Online [Internet]. [citado 22 de mayo de 2025]. Erythroxylum novogranatense var. truxillense (Rusby) Plowman | Plants of the World Online | Kew Science. Disponible en: http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:97008-2

12. Bauer I. Travel medicine, coca and cocaine: demystifying and rehabilitating Erythroxylum - a comprehensive review. Trop Dis Travel Med Vaccines. 2019;5:20. doi:10.1186/s40794-019-0095-7 PubMed PMID: 31798934; PubMed Central PMCID: PMC6880514.

13. Jenkins AJ, Llosa T, Montoya I, Cone EJ. Identification and quantitation of alkaloids in coca tea. Forensic Sci Int. 9 de febrero de 1996;77(3):179-89. doi:10.1016/0379-0738(95)01860-3

14. Enciso Deza C, Ramos Perfecto D. Estudio in vitro de la actividad antibacteriana del extracto de Erythroxylum coca sobre bacilos negro pigmentados. Odontol Sanmarquina. 8 de agosto de 2017;20(1):1. doi:10.15381/os.v20i1.13540

15. Asikainen S, Chen C. Oral ecology and person-to-person transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. Periodontol 2000. junio de 1999;20(1):65-81. doi:10.1111/j.1600-0757.1999.tb00158.x

16. Slots J, Reynolds HS, Genco RJ. Actinobacillus actinomycetemcomitans in Human Periodontal Disease: a Cross-Sectional Microbiological Investigation. Infect Immun. septiembre de 1980;29(3):1013-20. PubMed PMID: 6968718; PubMed Central PMCID: PMC551232.

17. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol. febrero de 1998;25(2):134-44. doi:10.1111/j.1600-051x.1998.tb02419.x PubMed PMID: 9495612.

18. Borrovic Ramos F. Efecto antibacteriano del extracto alcohólico de la hoja de Erythroxylum Novogranatense var. truxillense (coca) sobre flora mixta salival. Univ Nac Mayor San Marcos [Internet]. 2006 [citado 18 de abril de 2024]. Disponible en: https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/2810

19. Cervantes-Alagón SL, Padilla-Cáceres TC, Caballero-Apaza LM, Flores-Atencio R, Mamani-Zambrano R. Antibacterial Effect of the Ethanolic Extract of Curcuma longa L. and Erythroxylum coca var. Coca at Different Concentrations Against Streptococcus mutans: Comparative Study in Vitro. En: Iano Y, Saotome O, Kemper Vásquez GL, de Moraes Gomes Rosa MT, Arthur R, Gomes de Oliveira G, editores. Proceedings of the 8th Brazilian Technology Symposium (BTSym'22). Cham: Springer International Publishing; 2023. p. 530-9. doi:10.1007/978-3-031-31007-2_50

20. Loyola D, Mendoza R, Chiong L, Rueda M, Alvítez-Temoche D, Gallo W, et al. Ethanol extract of Schinus molle L. (Molle) and Erythroxylum coca Lam (Coca): Antibacterial Properties at Different Concentrations against Streptococcus mutans: An In Vitro Study. J Int Soc Prev Community Dent. 2020;10(5):579-84. doi:10.4103/jispcd.JISPCD_237_20 PubMed PMID: 33282766; PubMed Central PMCID: PMC7685273.

21. Alarcón Quispe ML. Eficacia del extracto hidroalcohólico de coca, de la sangre de grado y del gluconato de clorhexidina en el diámetro del halo inhibitorio de las cepas certificadas de porphyromonas gingivalis en el laboratorio de microbiología UCSM 2017 [Internet]. 17 de septiembre de 2022 [citado 18 de abril de 2024]. Disponible en: https://repositorio.ucsm.edu.pe/handle/20.500.12920/12004

22. Salcedo Calderón MDR, Moromi Nakata H. Efecto del extracto etanólico Erythroxylum novogranatense var. truxillense y Erythroxylum coca var. coca frente al Streptococcus mutans. Rev Estomatológica Hered. 15 de diciembre de 2022;32(4):4. doi:10.20453/reh.v32i4.4376

23. Alvarado V, Moromi H. Plantas medicinales: Efecto antibacteriano in vitro de Plantago major L, Erythroxylum novogranatense, Plowman var truxillense y Camellia sinensis sobre bacterias de importancia estomatológica. Odontol Sanmarquina. 31 de diciembre de 2010;13(2):2. doi:10.15381/os.v13i2.2853

24. Ventura G, Castro A, Roque M, Ruiz J. Composición química del aceite esencial de Erythroxylum coca Lam var. Coca (coca) y evalua-ción de su actividad antibacteriana. Cienc E Investig. 15 de junio de 2009;12(1):1. doi:10.15381/ci.v12i1.3382

25. Novák M, Salemink CA, Khan I. Biological activity of the alkaloids of Erythroxylum coca and Erythroxylum novogranatense. J Ethnopharmacol. mayo de 1984;10(3):261-74. doi:10.1016/0378-8741(84)90015-1

26. Moutsopoulos NM, Madianos PN. Low-Grade Inflammation in Chronic Infectious Diseases. Ann N Y Acad Sci. 2006;1088(1):251-64. doi:10.1196/annals.1366.032

27. Sima C, Viniegra A, Glogauer M. Macrophage immunomodulation in chronic osteolytic diseases—the case of periodontitis. J Leukoc Biol. marzo de 2019;105(3):473-87. doi:10.1002/JLB.1RU0818-310R PubMed PMID: 30452781; PubMed Central PMCID: PMC6386606.

28. Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. Periodontol 2000. 2014;64(1):57-80. doi:10.1111/prd.12002

29. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. Nat Rev Immunol. enero de 2015;15(1):30-44. doi:10.1038/nri3785

30. Nazir MA. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. Int J Health Sci. 2017;11(2):72-80. PubMed PMID: 28539867; PubMed Central PMCID: PMC5426403.

31. World Health Organization. Oral health country profile: Peru. [Internet]. [citado 1 de julio de 2025]. Disponible en: https://www.who.int/publications/m/item/oral-health-per-2022-country-profile

32. Armitage GC. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. Ann Periodontol. 1999;4(1):1-6. doi:10.1902/annals.1999.4.1.1

33. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. J Clin Periodontol. 2018;45(S20):S1-8. doi:10.1111/jcpe.12935

34. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. J Periodontol. 2018;89(S1):S159-72. doi:10.1002/JPER.18-0006

35. Babay N, Alshehri F, Al Rowis R. Majors highlights of the new 2017 classification of periodontal and peri-implant diseases and conditions. Saudi Dent J. 1 de julio de 2019;31(3):303-5. doi:10.1016/j.sdentj.2019.04.006

36. Fidyawati D, Masulili SLC, Iskandar HB, Suhartanto H, Kiswanjaya B, Li X. Clinical and Radiographic Parameters for Early Periodontitis Diagnosis: A Comparative Study. Dent J. 13 de diciembre de 2024;12(12):12. doi:10.3390/dj12120407

37. Jacobs R, Fontenele RC, Lahoud P, Shujaat S, Bornstein MM. Radiographic diagnosis of periodontal diseases – Current evidence versus innovations. Periodontol 2000. 2024;95(1):51-69. doi:10.1111/prd.12580

38. Plowman T. The Ethnobotany of Coca (Erythroxylum spp., Erythroxylaceae). Adv Econ Bot. 1984;1:62-111.

39. Lock Sing de Ugaz O, Ciencias PUC del PD de. Investigación fitoquímica : métodos en el estudio de productos naturales [Internet]. [citado 7 de mayo de 2025]. Disponible en: https://repositorio.pucp.edu.pe/items/676110bf-80f4-4336-b3d4-b54e9569f8ed

40. Plowman T, Hensold N. Names, types, and distribution of neotropical species of Erythroxylum (Erythroxylaceae). Brittonia. 1 de enero de 2004;56(1):1-53. doi:10.1663/0007-196X(2004)056[0001:NTADON]2.0.CO;2

41. Stevens PF. Angiosperm Phylogeny Website [Internet]. [citado 22 de mayo de 2025]. Disponible en: https://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/

42. Erythroxylum novogranatense var. truxillense. En: Wikipedia, la enciclopedia libre [Internet]. 2025 [citado 22 de mayo de 2025]. Disponible en: https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Erythroxylum_novogranatense_var._truxillense&oldid=167519526

43. Restrepo D, Saenz E, Jara-Muñoz O, Calixto-Botía, Rodríguez Suarez S, Zuleta P, et al. Erythroxylum in Focus: An Interdisciplinary Review of an Overlooked Genus. PubMed [Internet]. 2019 [citado 22 de mayo de 2025]. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31640255/

44. Johnson EL, Foy CD. Biomass accumulation and alkaloid content in leaves of Erythroxylum coca and Erythroxylum novogranatense var. novogranatense grown in soil with varying pH. J Plant Physiol. enero de 1996;149(3-4):444-50. doi:10.1016/S0176-1617(96)80147-7

45. Johnson EL, Schmidt WF, Norman HA. Leaf Flavonoids as Chemotaxonomic Markers for Two Erythroxylum Taxa [Internet]. 1 de octubre de 1997 [citado 28 de mayo de 2025]. Disponible en: https://www.degruyterbrill.com/document/doi/10.1515/znc-1997-9-1004/html

46. Johnson EL, Schmidt WF, Norman HA. Flavonoids as markers for Erythroxylum Taxa. Biochem Syst Ecol. octubre de 1998;26(7):743-59. doi:10.1016/S0305-1978(98)00042-8

47. Nørskov-Lauritsen N, Claesson R, Jensen AB, Åberg CH, Haubek D. Aggregatibacter Actinomycetemcomitans: Clinical Significance of a Pathobiont Subjected to Ample Changes in Classification and Nomenclature. Pathogens. 18 de noviembre de 2019;8(4):243. doi:10.3390/pathogens8040243 PubMed PMID: 31752205; PubMed Central PMCID: PMC6963667.

48. Talapko J, Juzbašić M, Meštrović T, Matijević T, Mesarić D, Katalinić D, et al. Aggregatibacter actinomycetemcomitans: From the Oral Cavity to the Heart Valves. Microorganisms. 17 de julio de 2024;12(7):7. doi:10.3390/microorganisms12071451

49. Raja M, Ummer F, Dhivakar CP. Aggregatibacter Actinomycetemcomitans – A Tooth Killer? J Clin Diagn Res JCDR. agosto de 2014;8(8):ZE13-6. doi:10.7860/JCDR/2014/9845.4766 PubMed PMID: 25302290; PubMed Central PMCID:

PMC4190817.

50. Zhou X, Li Y. Subgingival Microbes. En: Atlas of Oral Microbiology [Internet]. Elsevier; 2015 [citado 2 de junio de 2025]. p. 67-93. Disponible en: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128022344000045 doi:10.1016/B978-0-12-802234-4.00004-5

51. Belibasakis GN, Maula T, Bao K, Lindholm M, Bostanci N, Oscarsson J, et al. Virulence and Pathogenicity Properties of Aggregatibacter actinomycetemcomitans. Pathogens. 6 de noviembre de 2019;8(4):4. doi:10.3390/pathogens8040222

52. Benso B. Virulence factors associated with Aggregatibacter actinomycetemcomitans and their role in promoting periodontal diseases. Virulence. 13 de septiembre de 2016;8(2):111-4. doi:10.1080/21505594.2016.1235128 PubMed PMID: 27623711; PubMed Central PMCID: PMC5354162.

53. Malik R, Changela R, Krishan P. Virulence factors of Aggregatibacter actinomycetemcomitans - A status update [Internet]. 3 de junio de 2025. doi:10.4103/2231-0754.164390

54. Fu Y, Maaβ S, Cavallo FM, de Jong A, Raangs E, Westra J, et al. Differential Virulence of Aggregatibacter actinomycetemcomitans Serotypes Explained by Exoproteome Heterogeneity. Microbiol Spectr. 21 de diciembre de 2022;11(1):e03298-22. doi:10.1128/spectrum.03298-22

55. Negroni M. Microbiología Estomatológica: fundamentos y guía práctica. 3.ª ed. Editorial Medica Panamericana; 2018.

56. Mullin GS, Rubinfeld RS. The Antibacterial Activity of Topical Anesthetics : Cornea [Internet]. [citado 2 de julio de 2025]. Disponible en: https://journals.lww.com/corneajrnl/citation/1997/11000/the_antibacterial_activity_of_topical_anesthetics.10.aspx

57. Shamsudin NF, Ahmed QU, Mahmood S, Ali Shah SA, Khatib A, Mukhtar S, et al. Antibacterial Effects of Flavonoids and Their Structure-Activity Relationship Study: A Comparative Interpretation. Molecules. 9 de febrero de 2022;27(4):4. doi:10.3390/molecules27041149

58. Wang S, Yao J, Zhou B, Yang J, Chaudry MT, Wang M, et al. Bacteriostatic Effect of Quercetin as an Antibiotic Alternative In Vivo and Its Antibacterial Mechanism In Vitro. J Food Prot. 1 de enero de 2018;81(1):68-78. doi:10.4315/0362-028X.JFP-17-214

59. Gutiérrez-Venegas G, Gómez-Mora JA, Meraz-Rodríguez MA, Flores-Sánchez MA, Ortiz-Miranda LF. Effect of flavonoids on antimicrobial activity of microorganisms present in dental plaque [Internet]. [citado 2 de julio de 2025]. Disponible en: https://www.cell.com/heliyon/abstract/S2405-8440(19)36672-1

60. Periferakis A, Periferakis K, Badarau IA, Petran EM, Popa DC, Caruntu A, et al. Kaempferol: Antimicrobial Properties, Sources, Clinical, and Traditional Applications. Int J Mol Sci. 30 de noviembre de 2022;23(23):23. doi:10.3390/ijms232315054

61. Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. J Pharm Anal. 1 de abril de 2016;6(2):71-9. doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005

62. Duraffourd C, Lapraz J, d' Hervicourt L. Cahiers de phytothérapie clinique. Vol. 5.

Masson; 1996.

63. Castillo JAM, Ibarra MCB. Eficacia inhibitoria del aceite esencial de Cymbopogon Citratus sobre cepas de Porphyromona Gingivalis: Estudio in vitro. Odontología. 31 de diciembre de 2018;20(2):5-13.

64. Lezma MCV, Ulloa CCR, Valdivia JNB, Jacinto MAR. Efecto antibacteriano del aceite esencial de Salvia macrophylla (salvia) frente a aislados clínicos de Streptococcus mutans. Rev Cubana Med Trop [Internet]. 10 de abril de 2024 [citado 22 de enero de 2026];76. Disponible en: https://revmedtropical.sld.cu/index.php/medtropical/article/view/1181

X. ANEXOS

Anexo 01: Instrumento de recolección de datos

Ficha 01: Halo de inhibición generado por el extracto etanólico de *E. novogranatense var. truxillense* según concentración sobre cepa ATCC 29522 de *A. actinomycetemcomitans*

CEPA ATCC 29522 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*						
Repetición	**Concentración del extracto de *E. novogranatense var truxillense***				**Control positivo: Clorhexidina 0.12%**	**Control negativo: DMSO**
	25%	**50%**	**75%**	**100%**		
1	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:
2	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:
3	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:
4	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:
5	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:
6	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:
7	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:
8	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:
9	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:
10	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:
11	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:
12	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:

HI: Diámetro del halo de inhibición expresado en milímetros

ANEXO 02: Aprobación por Comité de Ética

Facultad de Odontología
Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Comité de Ética Institucional

"Año de la recuperación y consolidación de la economía peruana"

CONSTANCIA DE APROBACIÓN N°090-CEI-FO-2025

El Comité de Ética Institucional de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos ha **APROBADO** el proyecto de investigación, de tipo Exento de revisión sin riesgo, titulado: **"EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE ERYTHROXYLUM NOVOGRANATENSEVAR. TRUXILLENSE "COCA DE TRUJILLO" SOBRE AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETEMCOMITANS: ESTUDIO IN VITRO", (Exp. N°175-2025)** a cargo del investigador principal **DIEGO ALONSO VALDERRAMA ALPACA,** según consta en el Acta N°020-FO-CEI-2025 de fecha 30 de setiembre del presente año.

La presente aprobación del Comité de Ética Institucional de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos tiene una vigencia de tres años, del 30 de setiembre de 2025 al 30 de setiembre de 2028 bajo los siguientes considerandos:

- El proyecto de investigación se encuentra registrado y almacenado en los archivos digitales del comité.
- Los datos obtenidos de la investigación deberán ser rigurosamente resguardados y almacenados por un periodo mínimo de tres años pudiendo ser solicitados por este comité en cualquier momento.
- El comité se reserva el derecho de solicitar en cualquier momento un informe del avance del proceso de ejecución del proyecto de investigación
- Cualquier modificación al proyecto presentado deberá ser informado al Comité.
- Al finalizar la ejecución el investigador responsable debe enviar una copia del informe final a este comité.
- El Comité de Ética está a disposición para posteriores esclarecimientos o dudas.

Ciudad Universitaria, 01 de octubre de 2025

UNMSM
Firmado digitalmente por GAMARRA CONTRERAS Maria Del Pilar FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 03.10.2025 10:16:13 -05:00

Dra. MARÍA DEL PILAR GAMARRA CONTRERAS
Presidenta del Comité de Ética Institucional
Facultad de Odontología

ANEXO 03: Certificación de ENACO S.A. sobre las hojas usadas en la investigación.

ENACO S.A.
EMPRESA NACIONAL DE LA COCA S.A.

CERTIFICADO DE ANALISIS

N° 003-25 HC

MUESTRA	: HOJA DE COCA PICADA IRRADIADA A GRANEL (Procedencia Trujillo)
PRESENTACION	: A GRANEL
LOTE	: 202385-02
CODIGO DEL PRODUCTO	: 38 (PLP3)
CERTIFICADO DE IRRADIACION	: N° 0104-2024
CANTIDAD	: 03 kilogramos (03 bolsas por 1 kilogramo c/u)
F.ELABORACION	: FEBRERO - 2025
F.VENCIMIENTO	: FEBRERO – 2027
FECHA DE EMISION	: 25/ 02/ 2025

ANALISIS FISICOQUIMICO	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS
Humedad (g%)	6 - 12%	8. 00 %

ANALISIS MICROBIOLOGICO

ANALISIS	RESULTADOS	ESPECIFICACION N.T.S. N° 071-MINSA /DIGESA-V-01	Test Method
Numeración Enterobacterias ufc/g	< 3	10^2 ufc/g	ICMSF 1988
Numeración Hongos ufc/g	< 3	10^2 ufc/g	ICMSF 1988

CONCLUSION:

El producto analizado HOJA DE COCA PICADA IRRADIADA A GRANEL de lote 202385-02 presenta las características fisicoquímicas, organolépticas y microbiológicas de acuerdo a las especificaciones de la N.T.S. N° 071-MINSA /DIGESA-V-01.

EMPRESA NACIONAL DE LA COCA S.A.
JUDITH LIZETH HUILLCA MEJIA
Analista de Desarrollo de Productos y Control de Calidad

ANEXO 04: Fotografías de la ejecución de la investigación

- **Elaboración del Extracto**





Maceración alcohólica de las hojas de coca picadas durante 14 días







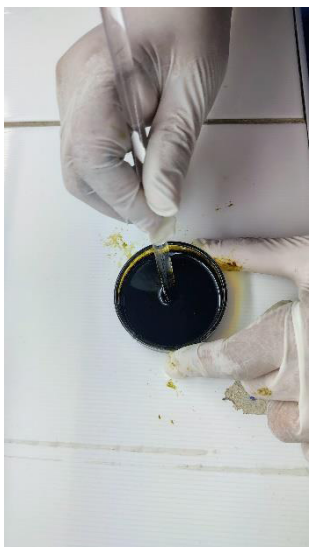
Filtrado con papel Whatman Nº 42 y equipo de filtrado al vacío (Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM)





Obtención del extracto tras concentración en equipo Soxhlet y 7 días de evaporación del alcohol en estufa a temperatura constante

- **Activación, siembra de la cepa e inoculación de los pozos con las diferentes concentraciones del extracto y los controles positvo y negativo**





Dilución del extracto en sus diferentes concentraciones, en tubos rotulados







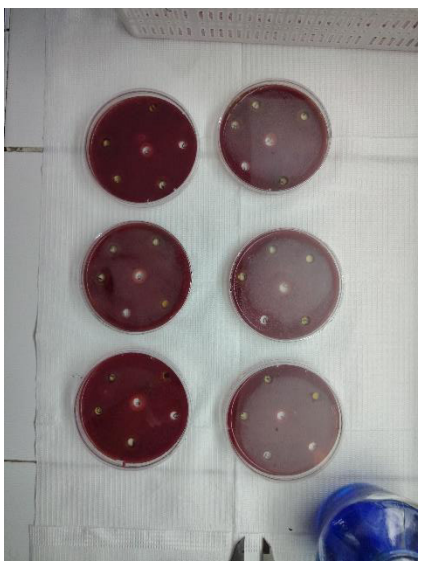
Activación, siembra de la bacteria e inoculación de los pozos en las placas de Agar Schaedler enriquecido con sangre desfribinada de ovino.

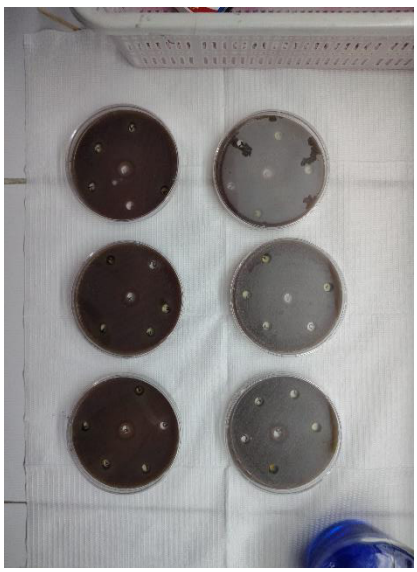


Colocación en jarras con sobre generador de anaerobiosis, que fueron incubadas a 37ºC durante 72h

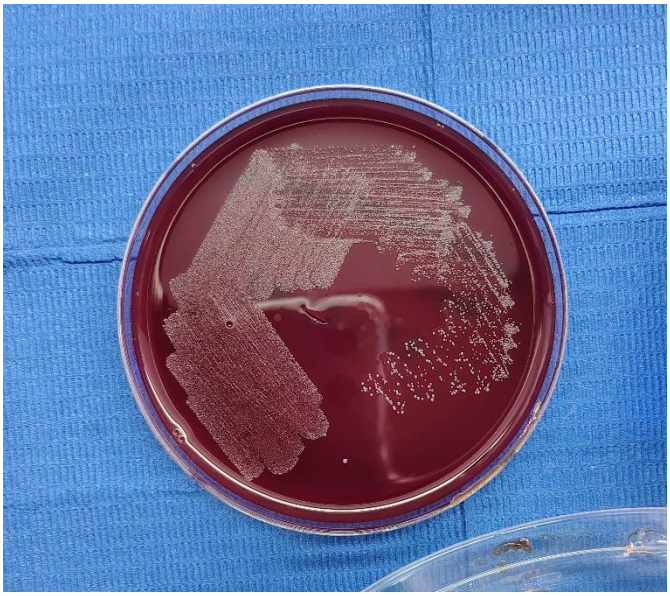
- **Lectura de resultados tras 72h de incubación**

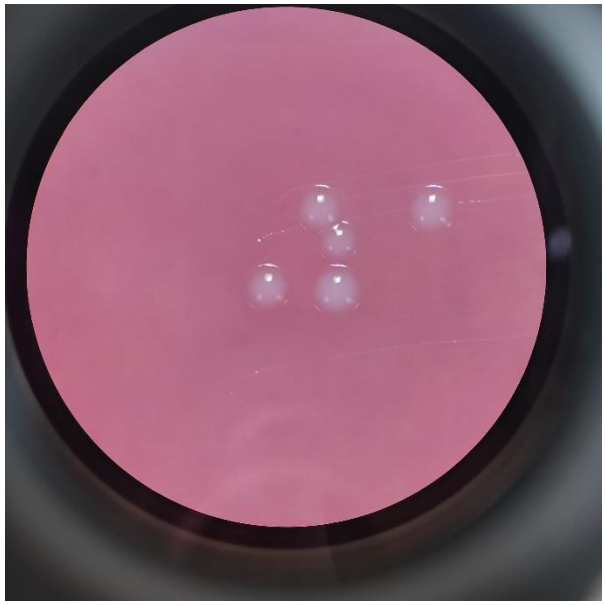




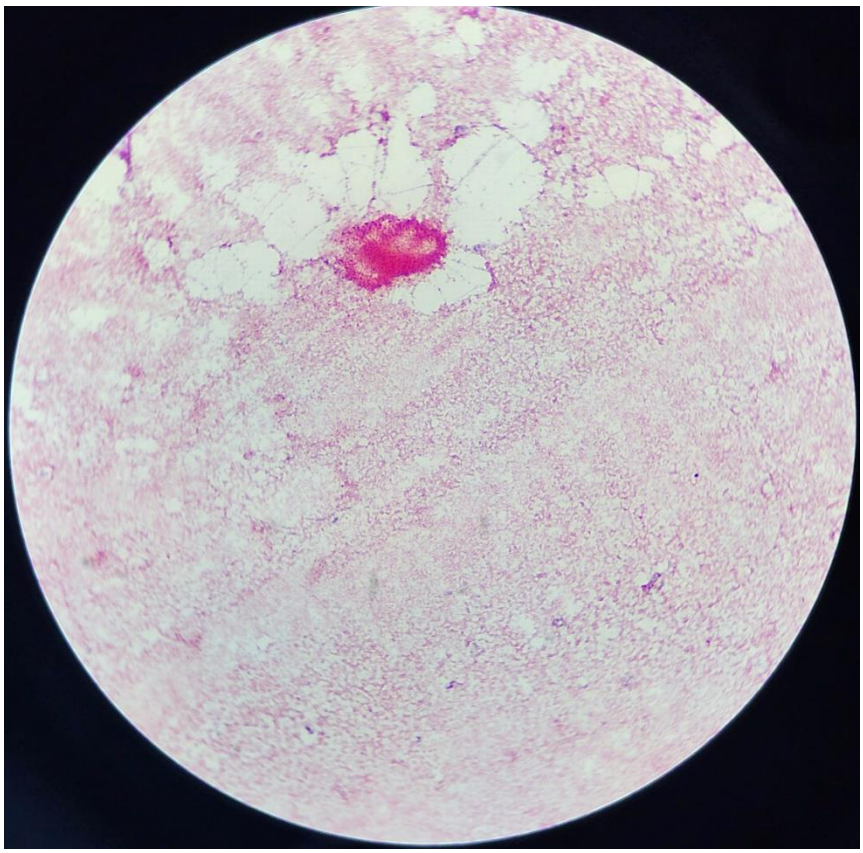


Materiales utilizados para la lectura de las 12 placas experimentales donde se enfrentó la cepa de *Aa* con las concentraciones del extracto y los controles

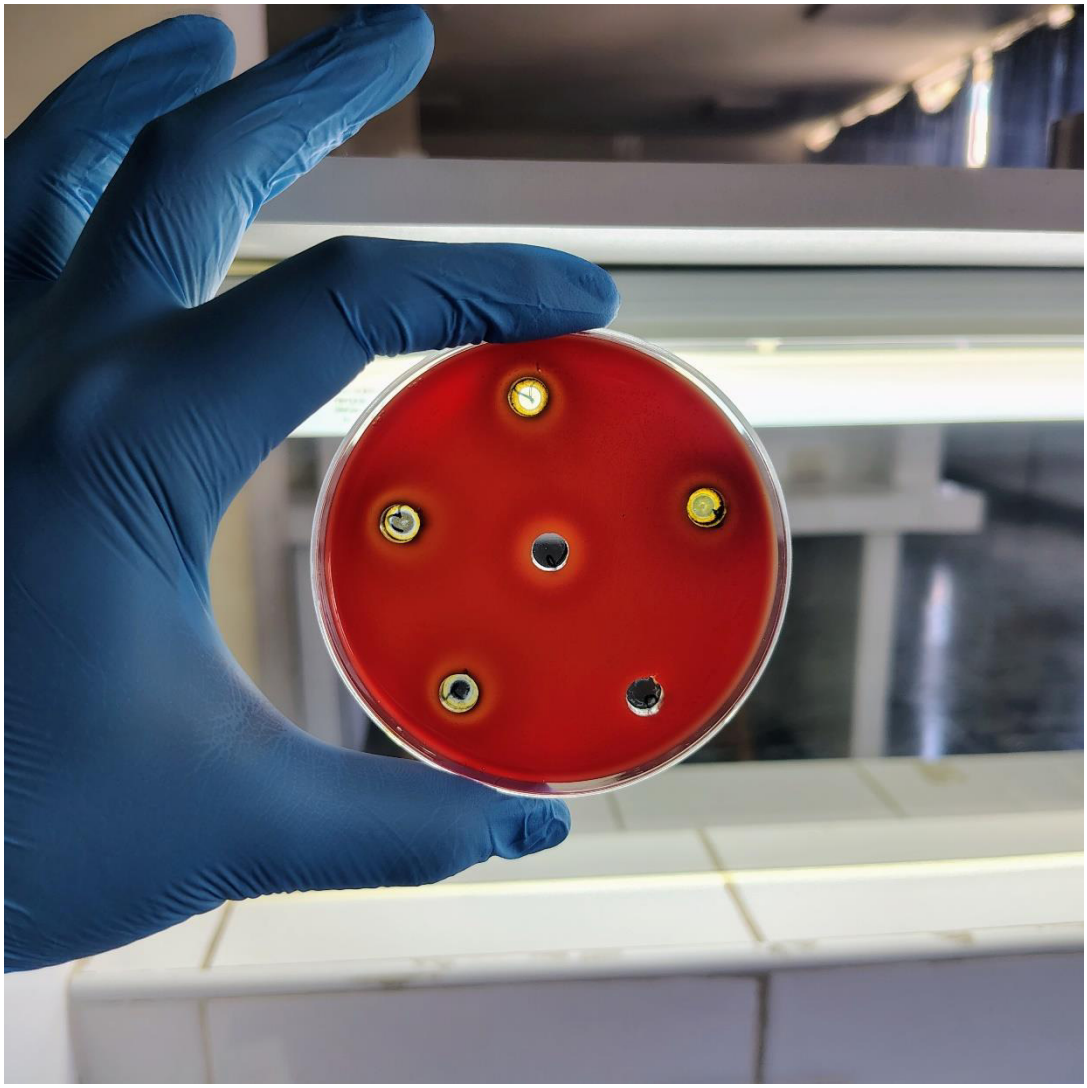




Crecimiento libre de la cepa de Aa y observación de sus colonias al estereoscopio (Laboratorio de Microbiología, Facultad de Odontología UNMSM)



Tinción Gram de la bacteria donde se aprecian sus formas en cocos. (Laboratorio de Microbiología, Facultad de Odontología UNMSM)



Detalle de los halos inhibitorios generados por el extracto etanólico de *E. novogranatense var. truxillense* sobre *A. actinomycetemcomitans.*