



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL
ESTOMATOLOGIA**

TESIS

**EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL
EXTRACTO HIDROETANÓLICO DE *Erythroxylum
coca* “COCA” FRENTE *Streptococcus mutans* ATCC
35668.**

**PARA OPTAR POR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
CIRUJANO DENTISTA**

Autor:

Cossio Alva Bryan Alexis

Asesor:

Dra. CD. Valenzuela Ramos Marisel Roxana

Línea de Investigación:

**Respuestas biológicas aplicadas en terapias
estomatológicas**

Pimentel – Perú

2018

**EFFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO
HIDROETANÓLICO DE *Erythroxylum coca* "COCA" FRENTE *Streptococcus
mutans* ATCC 35668.**

Aprobación del Jurado

Dra. C.D. Valenzuela Ramos Marisel Roxana
Asesora metodóloga

MG.CD. Portocarrero Mondragón Juan Pablo
Presidente del jurado de tesis

MG. MBLGO. López López Elmer
Secretario del jurado de tesis

Dra. C.D. Valenzuela Ramos Marisel Roxana
Vocal del jurado de tesis

DEDICATORIA

El presente estudio se lo dedico primero a Dios por estar siempre conmigo en los momentos más difíciles, ya que siempre en todo momento sentí su presencia a lo largo de este proyecto.

A mis padres que siempre supieron darme la tranquilidad y apoyo incondicional a lo largo de toda mi vida, gracias a los valores que me transmitieron puedo seguir logrando mis objetivos.

A mis hermanos que también han sabido aportar de distintas maneras a mi desarrollo tanto como persona y profesional dándome lo mejor de cada uno de ellos.

AGRADECIMIENTO

A la Dra. CD. Valenzuela Ramos Marisel, por su tiempo y paciencia en la asesoría de toda la tesis, también por sus acertados aportes que han dado buenos resultados en la finalización de la misma.

Al M.Sc. Mblgo. Ruiz Barrueto Miguel Angel, por su extraordinaria colaboración como asesor especialista a lo largo de todo el desarrollo del presente estudio siguiendo protocolos y normas que se han requerido para un adecuado resultado final.

A mi padre por todo el sacrificio que hizo lejos de mí para poder apoyarme en todo, siendo el soporte económico para poder ejecutar de la mejor manera el presente estudio.

A la Mblga. Arrunátegui Cabrera Fressia, coordinadora del laboratorio de investigación de la facultad de ciencias de la salud, por todas las facilidades que nos brindó para tener un buen ambiente en la ejecución del presente estudio.

A la Empresa Nacional de la Coca (ENACO) sede Trujillo, por darme las facilidades y proporcionarme muestras de *Erythroxylum Coca* con certificado de la misma empresa.

RESUMEN

En el presente estudio el objetivo fue determinar el efecto antibacteriano in vitro del extracto hidroetanólico de *Erythroxylum Coca* frente a *Streptococcus mutans*, en el cual se empleó el tipo de investigación cuantitativa, con diseño experimental verdadero de estímulo creciente, donde se trabajó con tres concentraciones diferentes (25 mg/ml, 50 mg/ml y 75 mg/ml), asimismo del control positivo con Gluconato de clorhexidina al 0.12% y el control negativo el cual fue Cloruro de Sodio al 0.9 %. Para determinar el efecto antibacteriano del extracto hidroetanólico de *Erythroxylum Coca* se procedió a sembrar con hisopo estéril el inóculo de *S.mutans* en placas con agar sangre con base Mueller-Hinton en donde posteriormente se colocaron discos de papel filtro debidamente esterilizados en los cuales se incorporaron 25 µL de cada concentración del extracto, Las placas donde se sembró y enfrentaron las concentraciones del extracto posteriormente fueron incubadas a 37°C durante 24 horas. La lectura de los resultados se hizo midiendo el diámetro, en milímetros, de los halos de inhibición formados con respecto a cada concentración del extracto de *Erythroxylum Coca*.

En los resultados se encontró que a la concentración de 25 mg/ml del extracto hidroetanólico de *Erythroxylum Coca* se produjo un halo promedio de 12,57 mm, mientras que para la concentración de 50 mg/ml del extracto hidroetanólico de *Erythroxylum Coca* se obtuvo un halo de inhibición promedio de 20,07 mm, asimismo para la concentración de 75 mg/ml del extracto hidroetanólico de *Erythroxylum Coca* se obtuvo un halo de inhibición promedio de 24,10 mm. El halo promedio formado por el control positivo de Gluconato de Clorhexidina 0.12% fue de 18,47 mm, con respecto al control negativo de Cloruro de sodio al 0.9% se obtuvo una media de 00 mm. Se concluye que el extracto hidroetanoólico *Erythroxylum Coca* tiene efecto altamente significativo frente a *S. mutans* ATCC 35668 en sus concentraciones de 75 % y 50 %, mientras que en la concentración de 25% el efecto no fue significativo.

Palabras Claves: Antibacteriano, Extracto, Streptococcus Mutans, Inhibición.

ABSTRACT

In the present study, the objective was to determine the in vitro antibacterial effect of the hydroethanolic extract of *Erythroxylum Coca* against *Streptococcus mutans*, in which the type of quantitative research was used, with true experimental design of increasing stimulus, where three different concentrations were worked (25 mg / ml, 50 mg / ml and 75 mg / ml), also of the positive control with 0.12% chlorhexidine gluconate and the negative control which was 0.9% Sodium Chloride. To determine the antibacterial effect of the hydroethanolic extract of *Erythroxylum Coca*, the *S.mutans* inoculum was seeded with Mueller-Hinton-based blood agar plates with sterile swabs, where filter paper disks were duly sterilized and incorporated into them. 25 µL of each concentration of the extract, The plates where they were planted and faced the concentrations of the extract were subsequently incubated at 37 ° C for 24 hours. The reading of the results was done by measuring the diameter, in millimeters, of the inhibition halos formed with respect to each concentration of the *Erythroxylum Coca* extract.

In the results it was found that at the concentration of 25 mg / ml of the hydroethanolic extract of *Erythroxylum Coca*, an average halo of 12.57 mm was produced, while for the 50 mg / ml concentration of the hydroethanolic extract of *Erythroxylum Coca*, an average inhibition halo of 20.07 mm, also for the concentration of 75 mg / ml of the hydroethanolic extract of *Erythroxylum Coca*, an average inhibition halo of 24.10 mm was obtained. The average halo formed by the positive control of 0.12% Chlorhexidine Gluconate was 18.47 mm, with respect to the negative control of 0.9% sodium chloride, an average of 00 mm was obtained. It is concluded that the hydroethanoic extract *Erythroxylum Coca* has a highly significant effect against *S. mutans* ATCC 35668 in its concentrations of 75% and 50%, while in the concentration of 25% the effect was not significant.

Keywords: Antibacterial, Extract, *Streptococcus Mutans*, Inhibition.

INDICE

Aprobación de jurado	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimiento	iv
Resumen.....	v
Palabras claves	v
Abstract.....	vi
Keyword.....	vi
I. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 Realidad Problemática.....	10
1.2 Trabajos previos.	11
1.3 Teorías relacionadas al tema.....	14
1.3.1 Microflora oral.....	14
1.3.2 Película adquirida	14
1.3.3 Saliva	15
1.3.4 Los principales microorganismos cariogénicos.....	15
1.3.5 La colonización inicial por S.mutans	17
1.3.6 Antibacterianos naturales	18
1.3.7 Caries Dental	18
1.3.8 Medicina Alternativa	20
1.3.9 Erythroxyllum Coca.....	20
1.3.10 Alcaloides naturales que posee Erythroxyllum coca	22
1.3.11 Clasificación botánica de Erythroxyllum coca	24
1.3.12 Cabinas de Seguridad Biológica	24
1.3.13 Liofilización.....	25
1.3.14 Medios de Cultivo.....	26
1.3.15 Principios de bioseguridad	27
1.4 Formulación del Problema.....	27
1.5 Justificación e importancia del estudio.	27
1.6 Hipótesis.....	28
1.7 Objetivos	29
1.7.1 Objetivo general	29
1.7.2 Objetivos específicos	29
II. MATERIAL Y MÉTODO.....	30
2.1 Tipo y Diseño de Investigación ⁵⁰	30
2.2 Población y muestra:	30

2.2.1	Criterios de inclusión:	30
2.2.2	Criterios de exclusión:	31
2.3	Variables, Operacionalización	31
2.4	Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad	33
2.4.1	Procedimiento para la recolección de datos	33
2.5	Método de análisis de datos	35
2.6	Aspectos éticos	35
2.7	Criterios de rigor científico	36
III.	RESULTADOS	37
3.1.	Tablas y figuras	37
3.2.	Discusión de resultados	42
3.3.	Aporte científico	44
IV.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	46
	CONCLUSIONES	46
	RECOMENDACIONES	47
	REFERENCIAS	48
	ANEXOS	53
	ANEXO N° 01	53
	ANEXO N° 02	54
	ANEXO N° 03	55
	ANEXO N° 04	56
	ANEXO N° 05	57
	ANEXO N° 06	58
	ANEXO N° 07	59
	ANEXO N° 08	60
	ANEXO N° 09	62
	ANEXO N° 10	64

I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de la caries dental muestra una prevalencia de hasta un 99% en las personas, siendo la principal causa por la que se pierden los dientes, su inicio se da desde una edad muy temprana siguiendo su progreso con el pasar del tiempo. En cuanto a los escolares se ha demostrado que llega hasta un 90% quienes presentan esta afección según la Organización mundial de la Salud (OMS)¹, por otro lado se asocia como uno de los principales microorganismos cariogénicos al *Streptococcus mutans*.

El *Streptococcus mutans* (*s. mutans*), sólo después de la proliferación de los dientes se hospedarán en la microbiota bucal, se sabe que el niño por primera vez entra en contacto con el microorganismo mediante la saliva de su madre. Se ha evidenciado en reportes el ADN en las bacterias iguales en el de los hijos con las de su progenitora. Además es sabido que el *S. mutans* coloniza a los 26 meses de edad del niño, siendo conocido como ventana de infectividad².

Nuestros ancestros con el pasar del tiempo supieron utilizar la medicina natural debido a sus necesidades, pudieron utilizar las bondades de la naturaleza. Así como avanzó mucho la producción farmacéutica, de la mano ha ido el crecimiento en el interés de investigadores en saber los componentes medicinales que presentaban algunas plantas y la utilidad que le pueden dar para la prevención, tratamiento y control de algunas afecciones. Es por eso que en la actualidad el estudio de la medicina alternativa se extendió a distintas ramas, sin embargo eso ha generado una controversia a comparación con los medicamentos de otra procedencia. Ante eso podemos decir que la fitoterapia nunca dejó de tener vigencia³.

Esto motivó a formular la interrogante ¿tiene efecto antibacteriano in vitro el extracto hidroetanólico de *Erythroxylum coca* "coca" frente *Streptococcus mutans* ATCC 35668?, siendo posible el efecto antibacteriano del extracto sobre *S. mutans*, también pudiendo presentar variabilidad del efecto dependiendo de sus concentraciones, cuyo objetivo es determinar el efecto

antibacteriano in vitro del extracto hidroalcohólico de *Erythroxylum coca* “coca” frente *S. mutans* ATCC 35668, esto mediante el método de kirby-bauer.

1.1 Realidad Problemática

Al quedar expuesto el órgano dentario ante los desechos de los microorganismos se da la *caries dental*, se muestra mediante una inestabilidad entre el contenido de la microflora y el órgano dental, dándose como producto una merma del mineral en la superficie del diente, para finalmente darse una destrucción localizada en los tejidos duros⁴.

Además, se le conoce como una disbiosis que se da por una alta ingesta de azúcares, presentándose inicialmente como una disminución en los minerales del diente por acción de los ácidos producidos por los microorganismos, para posteriormente producir la caries de esmalte y dentina, pudiendo muchas veces causar dolor en sus fases más avanzadas. Por otro lado al verse alterado los componentes del sistema estomatognático por la pérdida de dientes, la salud bucal perderá equilibrio funcional, sin embargo si hablamos de microorganismos asociados a la caries dental principalmente debemos reconocer al *S.mutans* como uno de los más importantes⁵.

Se sabe que el *S. mutans* es uno de los microorganismos que normalmente los vamos a encontrar en la etapa inicial de la formación del proceso carioso, su análisis de estudio y medida de prevención se dirige a atenuar la carga bacteriana en la flora bucal⁶.

Por otro lado, se necesita un medio enriquecido de la mano con un ambiente a baja tensión para que el *S. mutans* pueda crecer, asimismo es sabido que es una especie de bacteria aerobio facultativo, gram positivo y finalmente cocácea. Asimismo esta bacteria es capaz de producir enzimas la cual tienen como principal característica generar que el *S. mutans* se adhiera al diente⁷.

En el Perú, el 2017 se reportó en escolares la prevalencia de caries un 59.1% para los que tenían dentición decidua, 85.0% con dentición mixta y finalmente un 56.8%

para los de dentición permanente, según el Ministerio de Salud del Perú (MINSA)⁸, por otro lado en nuestro departamento de Lambayeque, se reportó desde enero a octubre del 2018 una tasa de morbilidad de 61.786 de pobladores con caries dental⁹. Asimismo en nuestra provincia Chiclayo se ha registrado desde enero a octubre del 2018 una tasa de morbilidad de 34.404 en la población presentando caries. Por lo que es importante en nuestra localidad crear hábitos de higiene oral e instruir acerca de alimentos saludables para así disminuir los azúcares diarios¹⁰.

1.2 Trabajos previos.

Vilchez M, Díaz C, Baca F¹¹. Perú. (2017) “efecto del extracto acuoso, ácido y alcohólico de las hojas secas *Erythroxylum coca var coca* (coca) en *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis* y *Candida albicans in vitro*” en su estudio utilizaron cepas de *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis* y *Cándida albicans* las cuales fueron cultivadas en los extractos acuoso, ácido y alcohólico de hoja seca de coca, De los resultados se concluyó que los extractos acuoso, ácido y alcohólico de hoja seca de coca no presentan efecto sobre el crecimiento de CA y TM pero sí sobre el crecimiento de TR y MC en extracto alcohólico. Además hubo diferencia de velocidad de crecimiento de CA, TR y TM en extractos acuoso, ácido y alcohólico, pero entre ellos solo TR, TM y MC presentaron diferencia con la velocidad de crecimiento en el extracto alcohólico.

Enciso C, Ramos D¹². Perú. (2017) “Estudio in vitro de la actividad antibacteriana del extracto de *Erythroxylum coca* sobre bacilos negro pigmentados” Realizaron un estudio donde determinaron si existe actividad antibacteriana del extracto de hoja de coca (*Erythroxylum coca*), sobre bacilos negro pigmentados (BNP). Los resultados de la sensibilidad por dilución determinaron una concentración mínima del extracto capaz de inhibir el crecimiento de dicha bacteria, 100% (concentración mínima inhibitoria), y a las concentraciones de 12,5% y 6,25% se observa una repotenciación del efecto antibacteriano del extracto. Concluyendo que el extracto hidroalcohólico de hoja de coca, sí presenta una actividad antibacteriana frente a BNP, a las concentraciones de 100% y 12,5%.

Vergara C¹³. Perú (2011) “Efecto inhibitorio in vitro del extracto acuoso y el extracto etanólico de la hoja de *Erythroxylum novogranatense* var. *Truxillense* (COCA) sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans*” En su estudio muestra como resultado la generación de halos inhibitorios de pequeña longitud para tres concentraciones de extracto acuoso (25%, 50% y 75%), y la generación de halos de mayor longitud para la concentración al 100% de extracto acuoso y todas las concentraciones de extracto etanólico, con lo que se concluyó que ambos extractos poseen efecto inhibitorio sobre el crecimiento del *Streptococcus mutans*, Asimismo se concluyó que la concentración mínima inhibitoria para el extracto acuoso es del 75%, mientras que para el extracto etanólico es la concentración al 50%.

Minaya P¹⁴. Perú. (2008), Determinó la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de la hoja de *Erythroxylum novogranatense* var *truxillense* (coca) frente a bacterias orales cariogénicas, el objetivo de su investigación fue determinar la actividad antimicrobiana del extracto de la hoja de *Erythroxylum novogranatense* var. *Truxillense* frente a *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus casei*, al realizar las pruebas de sensibilidad obtuvo como resultado que el diámetro de los halos de inhibición para el *S. mutans* tuvieron una media de 34.4mm, y para el caso de *L. casei* 33.7mm. Con respecto a la medida de los halos de inhibición del control negativo y positivo se obtuvieron una medida de 00mm para el agua destilada y de 11.4mm en el caso de alcohol de 96%. Encontrándose que éstos difieren en forma estadísticamente significativa al 95% de confianza.

Negrete M, Quispe A ¹⁵. Bolivia. (2015) “Estudio In vitro de la capacidad antibacteriana de la hoja de coca (*Erythroxylum coca* Lam) frente a bacterias ATCC *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *pseudomonas aeruginosa*”, para obtener el extracto colocaron 1 mL del macerado de las hojas de coca (frescas y secas) con el solvente (solución fisiológica, alcohol, cloroformo) en tubos de ensayo. Los resultados fueron que los macerados preparados con alcohol absoluto de la hoja de coca (*Erythroxylum coca* Lam) frescas y secas provenientes de los departamentos de Cochabamba y La Paz, si presentan actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*. Con solución fisiológica y cloroformo no presentó actividad antibacteriana. Por otro lado los macerados preparados con solución fisiológica, alcohol absoluto y cloroformo de la hoja de coca (*Erythroxylum coca* Lam) frescas y

secas, provenientes de dos regiones (La Paz y Cochabamba) no presentan actividad antibacteriana frente *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Kumarasamy B, Manipal S, Duraisam P¹⁶, et al, India (2014) “Role of aqueous extract of *Morinda citrifolia* (Indian Noni) ripe fruits in inhibiting dental caries-causing *Streptococcus Mutans* and *Streptococcus Mitis*” Tuvieron como objetivo explicar la actividad antibacteriana dependiente de la dosis del extracto acuoso crudo de frutos maduros de *Morinda citrifolia*, contra estreptococos orales, la concentración mínima inhibitoria (CIM) se determinó mediante el método de microdilución, utilizando extracto de fruta diluido en serie 2 veces, de acuerdo con el Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS). Se obtuvo como resultado que el extracto acuoso crudo de frutos maduros de *M. citrifolia* inhibió eficazmente el crecimiento de *S. mutans* (19 ± 0.5 mm) y *S. mitis* (18.6 ± 0.3 mm) en comparación con el control con estreptomycinina (21.6 ± 0.3 mm).

Solano X, Moya T, Zambrano M¹⁷. Ecuador. (2016) “Inhibición del *Streptococcus mutans*, mediante el uso de extracto acuoso y oleoso de *Rosmarinus officinalis* Romero” realizaron un estudio donde determinaron la inhibición de crecimiento bacteriano in vitro de *Streptococcus mutans*, mediante el uso de extractos: acuoso y oleoso de *Rosmarinus officinalis* (romero), los resultados mostraron que los extractos acuosos y el agua destilada produjeron un halo de inhibición de 0 mm. El extracto oleoso elaborado produjo una media de 11,93 mm de halo de inhibición ($p < 0.001$), versus la Clorhexidina que presentó una media de 16.13 mm ($p < 0.001$). No se encontraron diferencias entre el extracto oleoso y la clorhexidina ($p > 0.05$). Concluyéndose que en el extracto acuoso no hubo inhibición contra el *S. mutans* pero el extracto oleoso mostró un efecto antibacteriano parecido al de la clorhexidina.

1.3 Teorías relacionadas al tema.

1.3.1 Microflora oral

Es un hábitat que está conformada por un gran número de gérmenes. Es sabido que un recién nacido no presenta microorganismos en su flora bucal, sin embargo se conoce que antes de que proliferen los dientes, estos llegan a colonizar la microflora. Después que ocurre la erupción dental sino se llega a dar una adecuada y eficiente higiene oral puede llegarse a formar la placa dental en la superficie adamantina del diente que muchas veces está cubierta por una película conformada por glicoproteínas salivales¹⁸.

En la cavidad oral un promedio del 60% de microorganismos que encontramos se pueden cultivar, siendo unas quinientas y setecientas especies las cuales son las que colonizan los dientes y mucosas, entre los más estudiados veremos al *Streptococcus*. Es así que una membrana biológica muy delgada se hospedará en el esmalte, llamada *película adquirida* que así como cuida la integridad del diente, también provee sitios para la adhesión de microorganismos en el mismo¹⁸.

1.3.2 Película adquirida

Se sabe que normalmente sobre la superficie adamantina hay un tegumento que la recubre, siendo muy fina de unas 10 micras de espesor, llamada *película adquirida*, presentando naturaleza orgánica, acelular y estéril, además es conocido que también recubre las obturaciones y prótesis metálicas o acrílicas, siendo muchas veces eliminado con las fuerzas del cepillado, pero solo se necesita que el esmalte entre en contacto para que en cuestión de segundos se forme nuevamente la cutícula. Sin embargo, también encontramos un líquido compuesto por componentes orgánicos e inorgánicos proveniente de las glándulas salivales extendiéndose por toda la cavidad bucal conocido como saliva¹⁹.

1.3.3 Saliva

A la formación de la película adquirida y a la ayuda en la agregación bacteriana, se asocia a las moléculas salivales, que por otra parte también ayudan a metabolizar los alimentos y a la mineralización de igual manera. Es una mezcla saturada en calcio y fosfato, teniendo entre sus contenidos flúor y proteínas, entre otros elementos. Es conocido que al disminuir el flujo salival, la tasa de probabilidad de presentar lesiones cariosas aumenta²⁰.

La saliva mantiene una estabilidad en el medio iónico para que pueda ofrecer la remineralización como una de sus principales funciones, para poder equilibrar fisiológicamente al órgano dentario constantemente. Ante esto podemos ver que en la microbiota bucal encontramos un gran número de microorganismos en los cuáles tenemos que tomar mayor importancia a los que colonizan inicialmente ante un desequilibrio en el órgano dentario²⁰.

1.3.4 Los principales microorganismos cariogénicos

Debemos reconocer que hay principales microorganismos con capacidad cariogénica entre ellos podemos hablar del *S. sobrinus*, y el *S. mutans*, por otra parte encontramos colonizadores iniciales, entre ellos el *S. sanguinis*, *S. mitis*, *S. oralis*, quienes son los que primero se adhieren a la película, generando una biopelícula, creando un ambiente para que las bacterias colonicen y produzcan ácidos, afectando notablemente al órgano dentario; No obstante, es necesario evaluar qué tipos de microorganismos actúan en las diferentes etapas de la lesión cariosa para así poder diferenciarlos según el daño y la zona afectada²¹.

Microorganismos en etapas de la caries dental, Distintos estudios han reportado que conforme evoluciona o avanza la lesión cariosa, actúan distintos microorganismos dependiendo sus etapas, si hablamos del inicio de la enfermedad encontramos al *S. mutans*, mientras que en sus etapas más avanzadas encontraremos *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*²².

1.3.4.1 Lactobacillus

Son bacilos gram positivos, anaerobios facultativos, acidógeno que puede convertir los azúcares en ácidos y acidúricos que puede tolerar un medio ácido, haciéndolo que pueda crecer en un ph cercano a 5, capaz de degradar proteínas gracias a su función proteolítica. A partir de la sacarosa algunas cepas sintetizan polisacáridos, ya que muy poco se adhieren a superficies lisas, pueden colonizar distintamente a la forma en la que lo hacen otras bacterias, por ejemplo, mediante una unión física en zonas retentivas y también uniéndose con otras bacterias²².

1.3.4.2 Bifidobacterium spp.

Se han reportado en diferentes hábitats, lo que nos demuestra que puede subsistir en diferentes ecosistemas, entre ellos la cavidad bucal, son gram positivo, anaerobios, con propiedades acidúricas y acidogénicas, polimórficamente ramificados, no formadores de esporas²³.

1.3.4.3 Streptococcus mitis

Bacteria gram positiva que normalmente se encuentra en la flora bucal, específicamente en toda la cara dorsal de la lengua con mayor magnitud. En equilibrio no es causante de ninguna patología. En su superficie celular encontramos diversos tamaños de apéndices que son prolongaciones²⁴.

1.3.4.4 Streptococcus sanguinis

Colonizador primario por excelencia, con la capacidad de ser antimicrobiano. Es anaerobio facultativo gram positivo, es una bacteria endógena del cuerpo, posee proteínas intracelulares y peróxido de hidrógeno que es un bacteriostático para otros *streptococcus*, también tendría efectos inhibitorios contra patógenos periodontales como *Prevotella intermedia* y *Porphyromonas*

gingivalis, siendo ambas bacterias gram negativas involucradas en el desarrollo de las enfermedades periodontales²⁵.

1.3.4.5 Streptococcus mutans

Una vez que se da la proliferación de los órganos dentarios el *S. mutans* es uno de los primeros en colonizar. Dependen de oxígeno, sin embargo necesitan condiciones de anaerobiosis para desarrollarse. Varía de forma dependiendo el ph en el que se encuentre²⁶.

El *S. mutans* es un coco Gram positivos, puede pasar rápidamente a un ph crítico en 24 horas. Su mecanismo se da fermentando los azúcares y produciendo ácidos, asimismo se han evaluado los factores que pueden intervenir en la adquisición del *S. mutans* en los niños, por lo que es fundamental saber cómo se produce esta colonización inicial²⁶.

1.3.5 La colonización inicial por S.mutans

Hay reportes en donde demuestran que niños predentados ya muestran una presencia del *S. mutans*. Sin embargo, esta presencia aumenta a medida que se da la erupción dental, siendo los dientes posteriores los que van a facilitar la colonización. Se ha comprobado que las actividades diarias entre la madre y el niño favorecen el contacto entre el *S. mutans* y el infante²⁷.

Muchas veces se ha vinculado la transmisión del *S. mutans* al niño con la leche materna. Asimismo se ha observado que madres y tutoras de los infantes presentaban el *S. mutans*, coincidiendo con los niños que también presentaban este microorganismo, Por otro lado, el uso de nuevas alternativas para combatir los altos índices de caries a nivel mundial ha dirigido las investigaciones en encontrar productos o componentes naturales provenientes de plantas evidenciando sus efectos medicinales²⁷.

1.3.6 Antibacterianos naturales

Se debe destacar que la medicina con base de derivados naturales tienen una ventaja con respecto a los fármacos sintéticos. En las plantas gracias a la naturaleza sus principios activos son equilibrados teniendo como resultado efectos adversos limitados. En el área odontológica, el crecimiento de la fitoterapia evaluando las propiedades de plantas ha llevado a investigadores querer conocer más acerca de nuevos productos, con el fin de demostrar los efectos medicinales de distintas plantas, para la prevención, tratamiento y control de gérmenes de importancia odontológica²⁸.

Antibacterianos naturales, los podemos diferenciar en dos tipos, siendo los de origen vegetal los que contengan compuestos fenólicos principalmente y los de origen animal que presentan sus contenidos enzimas y proteínas²⁹.

1.3.7 Caries Dental

La *caries dental* es una afección que se caracteriza por un constante desequilibrio en el proceso de remineralización y desmineralización. Asimismo tiene que presentarse la exposición del diente y que los microorganismos dispongan de una fuente de carbohidratos. Al reducir los minerales del diente constantemente, el primer resultado será una mancha blanca, de no controlar este proceso patológico, la cavitación del tejido será inevitable³⁰.

La *etiología de la caries dental* consta en que es una pérdida de minerales denominado desmineralización que causa daños irreversibles, que inicia con un desequilibrio en la flora bucal para finalmente dañar el órgano dental. Podemos demostrar cómo se instaura la enfermedad mediante la trilogía etiológica de Keyes, modificada por Newman, que dice que tienen que darse tres factores constantes los cuales son: un hospedador susceptible, una microbiota cariogena localizada en la placa bacteriana y un sustrato adecuado, suministrado por los alimentos que serán fuente de energía para los microorganismos³¹.

El problema en un primer momento es el alto consumo de azúcares lo que dará en la placa momentos largos de gran acidez. Estos ácidos son producidos por especies bacterianas que en un adecuado ambiente llegan a colonizar, pueden crecer a pH ácido e incluso seguir generando aquellos a pH bajo, por tal motivo es importante hablar sobre la capacidad de producir daño y las características del *S. mutans* cuando se encuentra en desequilibrio para la formación de caries³¹.

Los factores de virulencia más involucrados en la producción de caries son; la acidogenicidad donde el *streptococcus* fermenta los azúcares produciendo ácido láctico que produce la desmineralización, por su parte se sabe que la aciduricidad tiene la capacidad de producir ácido aun estando en un pH crítico, y finalmente la acidofilicidad hace que el *S. mutans* pueda resistir la acidez del medio bombeando protones fuera de la célula, Por otro lado se han establecido clasificaciones para poder evaluar las cavidades que producen las según su ubicación y su avance dependiendo de cada clasificación³².

Según la *Clasificación de Black* que nos permite distinguir las lesiones de las cavidades las cuales se clasifican en clase I, cuando existe lesión en fosas y fisuras en dientes posteriores, en superficies linguales de incisivos superiores, surcos bucales y linguales de molares, la clase II, cuando la lesión se encuentra en caras proximales de dientes posteriores, clase III, en caras proximales de dientes anteriores, en la clase IV la lesión se presentará en caras proximales de dientes anteriores abarcando el borde incisal, la clase V en el tercio gingival de todos los dientes, y por último la clase VI la lesión se encontrará en las cúspides afectadas, asimismo tenemos una alternativa de clasificación y sustituto actual a la black³³.

Según clasificación de Mount y Hume, modificada por Lasfargues denominan a las cavidades de las lesiones cariosas mediante dos números separados por un punto, siguiendo dos criterios: la localización y el avance de las lesiones. En la zona 1 las lesiones se presentarán en fosas, fisuras y defectos del esmalte en las superficies oclusales de los dientes posteriores, de las superficies palatinas de los dientes antero superiores o un defecto simple del esmalte en una superficie lisa de cualquier diente, en la zona 2, se encontrará la lesión en superficies proximales

ubicadas en el punto de contacto proximal o en la superficie circundante, asimismo en la zona 3 la lesión involucrará el tercio gingival de la corona³⁴.

Según su avance se clasifica por tamaños, en el cual el tamaño 0 es una lesión no presenta cavidad llamada mancha blanca, el tamaño 1 se conserva la corona pero hay cavidad con cierta afección a dentina, en el tamaño 2 hay una moderada afectación de la dentina, la corona es lo suficientemente fuerte para soportar fuerzas oclusales, en el tamaño 3 hay una lesión grande, el diente queda débil pudiendo ceder ante fuerzas de la oclusión, en tamaño 4 la lesión es extensa, pérdida importante del remanente³⁴.

1.3.8 Medicina Alternativa

En la medicina alternativa y complementaria (MAC), hoy en día hay más de medio centenar de técnicas, prácticas de medicina alternativa entre las más conocidas tenemos a la fitoterapia, acupuntura, entre otras. No obstante el uso de plantas como uso curativo cada vez toma mayor fuerza en la parte científica debido a que existe una gran variedad de especies las cuales tienen efectos bondadosos para el cuidado de la salud³⁵.

*La fitoterapia estudia todo aquel producto que tenga origen vegetal para su uso terapéutico para la prevención y tratamientos de patologías. La OMS aún no ha dejado bien en claro el término *fitoterapia*, pero si se refiere a la medicina herbolaria³⁶.*

1.3.9 Erythroxyllum Coca

En el Perú, actualmente se sigue consumiendo tradicionalmente la hoja de coca sola o con una pizca de ceniza alcalina, ya sea como un gran estimulante o para aumentar la resistencia física a gran altitud sobre el nivel del mar de personas que trabajan en el campo grandes jornadas de trabajo, también con fines anestésicos y terapéuticos, en la población campesina su uso viene de familia en familia siendo parte de los productos que normalmente podemos encontrar en sus viviendas ya que juega un

papel importante en sus costumbres. Como se conoce en los consumidores de coca hay una baja prevalencia de caries dental, pero a su vez presentan desgaste dental como la abrasión y la erosión, este último posiblemente por los componentes de la coca y sus derivados, esto demuestra que la hoja de coca forma parte de nuestra historia³⁷.

En la *conquista del Perú*, en América se supo de la manera en la que los peruanos usaban la hoja de coca, desde su cultivo que viene de prácticas antiguas hasta en las formas en la que lo usaban, la arqueología nos ha dejado datos confirmados donde se ha encontrado hojas de coca en las tumbas ancestrales, esto demuestra otro uso más que le daban como ofrenda a los muertos dándole un valor muy alto en la parte religiosa. Con la conquista del Perú, los cronistas queriendo describir las costumbres del supuesto mundo nuevo que encontraban se dieron cuenta de la importancia de la coca en todos los aspectos³⁸.

Acerca del uso y del consumo de la hoja, la coca estaba muy insertada en la cultura era como una deidad, llamándola hija de la Pachamama, es así la importancia de esta. Pero su uso principal era como ofrenda a las cosas más importantes para la cultura entre ellas tenemos ofrendas al Sol, a la Pachamama, a las huacas, a los ancestros, personas, lugares. Por otro lado, era medio para pedir favores a sus dioses como para que les vaya bien en sus cultivos agrícolas o también al terminar una obra grande, entonces llegamos a entender que tan importante y generosa era la hoja de coca que desde tiempos ancestrales nos viene regalando sus bondades³⁸.

La característica de la planta de coca es un arbusto que puede llegar hasta los 3 metros. Crece en América del Sur, en todo el territorio de Perú, Bolivia, Ecuador, Brasil, Chile y Colombia, pudiendo crecer también bajo sombra de grandes árboles en regiones tropicales, sabiendo que se ha registrado un tipo de hoja de coca en las regiones africanas. De color blanco son las flores con unos cinco pétalos. De color rojo el fruto, con una única semilla. Las hojas tienen líneas longitudinales que van hacia el centro de la misma, debido a sus efectos antes mencionados fue posible destacar sus propiedades que muchas veces superan en gran cantidad a verduras y frutos presentes en nuestra alimentación cotidiana³⁹.

Entre sus *propiedades funcionales* se destaca su gran cantidad de calcio siendo casi 20 veces más de calcio que la leche de vaca. Teniendo igual o más vitamina A que la zanahoria. Además, complejo B, B12, que nos hace asimilar mejor los alimentos; presentando zinc, magnesio y calcio. También es energética lo que también nos da una mejor oxigenación celular, por otra parte también nos hacen aumentar nuestra capacidad y resistencia física⁴⁰.

Además es un estimulante por naturaleza en las prácticas físicas e intelectuales. Es baja en grasa y potente antioxidante, también existen estudios donde nos indican que presentan efectos anticancerosos, si bien es cierto la coca viene siendo utilizado desde nuestros ancestros es fundamental conocer como ha venido siendo consumido y utilizado hasta la actualidad esta poderosa hoja con cualidades curativas⁴⁰.

Las formas de uso uno de los usos más conocidos es la masticación llamado también aculli, que en castellano sería “mascar o masticar”. Un dato curioso es que las hojas no se mastican sino se van juntando a un lado de la boca con una pequeña cantidad de sustancia alcalina, hasta obtener un bolo. Se debe conservar el bolo cada vez que se quiera extraer el jugo⁴⁰.

La hoja puede consumirse en forma de mate pudiéndose tomar únicamente con coca o también agregarle otras hierbas. En ocasiones se pega hojas enteras a la altura del cuero cabelludo para aliviar los dolores de cabeza. Además el mismo residuo del bolo que es masticado junto con la saliva se puede utilizar en la heridas para evitar las infecciones, también se conoce que la coca presenta 14 alcaloides que la hacen una de las hojas más completas del mundo⁴⁰.

1.3.10 Alcaloides naturales que posee *Erythroxylum coca*⁴¹

Cocaína: Gran poder anestésico y analgésico.

Atropina: Anestésico por naturaleza unas de sus efectos adversos es que seca el árbol bronquial.

Higrina: Estimulante de saliva cuando hay poco oxígeno en el ambiente.

Pectina: Antidiarreico, mantiene en equilibrio la producción de melanina.

Pyridina: Mejora el funcionamiento cerebral.

Papaína: Acelera la digestión.

Egnonina: Asimila y transforma biomoléculas.

Globulina: Mantiene en equilibrio el oxígeno del cuerpo.

Benzoína: Importante para el tratamiento de afecciones gastrointestinales.

Conina: Poderoso anestésico.

Cocamína: Potencia a los otros alcaloides, siendo un gran analgésico.

Reserpina: Controla la presión del cuerpo.

Inulina: Regula la secreción de la bilis y su acumulación en la vesícula, mejora el funcionamiento del hígado, equilibra la formación de melanina, además ayuda a eliminar las sustancias nocivas y tóxicas no fisiológicas, por otro lado encontramos uno de los alcaloides que más nos llama la atención de acuerdo a los intereses del presente estudio, cuyas características aún no son muy conocidas, a este alcaloide es conocido como quinolina.

Quinolina: Su presencia evita que se forme la caries. Los compuestos de quinolina han sido muy ampliamente estudiados como agentes antipalúdicos y anticancerosos durante muchos años mostrando profundas actividades funcionales. Muestran una potente actividad antibacteriana contra un gran grupo de cepas bacterianas Gram positivas resistentes a múltiples fármacos⁴²

1.3.11 Clasificación botánica de *Erythroxylum coca*⁴³

Se reconocen principalmente dos especies de *Erythroxylum coca*, y un gran número de variedades, siendo las presentadas a continuación las más conocidas, las variedades por lo regular llevan el nombre del lugar donde fueron cultivadas, también se debe conocer que pueden presentar cambios en sus componentes dependiendo su especie y variedad.

Erythroxylum coca Lam, var. Coca, conocida como coca de Bolivia o coca de Huánuco. Puede encontrarse la variedad en África tropical. Normalmente se desarrolla en presencia de gran humedad y a gran altitud pasando los 2000 metros.

Erythroxylum coca Lam., var. Ipuda: Denominada coca Amazónica, se la reconoce como una variante a la variedad coca, su desarrollo se da en climas cálidos, data desde épocas preincaicas.

Erythroxylum novogranatense Morris, var. Novogranatense: También llamada coca colombiana presenta ambas cualidades de las dos cocas antes mencionadas ya que puede adaptarse a climas húmedos como secos, pero existe una variedad que puede ser considerada una unión entre la coca boliviana y la coca colombiana denominada *var. Truxillense*.

Erythroxylum novogranatense Morris, var. Truxillense: También llamada coca de Trujillo, cultivada a baja altura, con riego en valles de la costa de Perú, siendo también resistente a sequías.

1.3.12 Cabinas de Seguridad Biológica⁴⁴

También denominadas *campanas microbiológicas* o también *campanas de flujo laminar*. Al trabajar con agentes altamente infecciosos estos equipos nos dan la garantía de trabajar bajo una estricta protección controlando el ambiente. Muchos de estos equipos pueden variar según su clase o tipo de fabricación de tal manera que podemos clasificarlos del siguiente modo.

Clase I, caracterizada por brindar protección al personal y al ambiente, su desventaja principal es que no brinda seguridad al producto. Se usan para aislar equipos de uso laboratorial.

Clase II, el equipo se caracteriza por dar protección al personal, ambiente y finalmente al producto, gracias a un filtro que presenta podemos evitar una contaminación cruzada.

Clase III, es totalmente cerrada, usado para trabajar con agentes altamente contaminantes.

El objetivo del equipo es de a protección del trabajador expuestos a los agentes altamente contaminantes, asimismo protege al producto a examinarse y fundamentalmente protege al medio ambiente, se puede trabajar cualquier tipo de microorganismo⁴⁵.

1.3.13 Liofilización

Con baja presión y moderada temperatura la liofilización se produce para poder darnos un buen producto seco conservando todas sus propiedades. Mediante un mecanismo donde no se evapora el agua a partir del estado líquido lo que normalmente pasa en los procesos convencionales de secado, pero si hay una sublimación del hielo. Durante este proceso es obligatorio que los productos estén congelados durante el secado. Esto hace a la liofilización una de las técnicas más modernas en la actualidad para extraer extractos⁴⁶.

Ventajas de la liofilización, su principal característica es que mantiene los componentes de los productos, sin perder ninguno, lo que lo hace un equipo muy importante para la obtención de sustancias secas⁴⁷.

1.3.14 Medios de Cultivo⁴⁸

Un medio de cultivo es una solución que usualmente es usado para técnicas en laboratorio, que proporcionan un ecosistema ideal para el crecimiento de muchos microorganismos bajo ciertos criterios estrictos, existen diferentes medios de cultivo específicamente para cada tipo de microorganismo de los cuales vamos a ver los más importantes.

Agar BHI (infusión cerebro corazón), utilizada para el crecimiento de un gran número de microorganismos, presenta agregados de varios tejidos de animales. Pudiéndose utilizar en caldo o medio sólido, asimismo se le puede adicionar sangre.

Agar chocolate, se añaden como suplementos a un agar base muy rico, usa la misma base del agar sangre, se da una lisis de las proteínas y nutrientes,

Agar glucosa de sabouraud, utilizado para el cultivo de microorganismos del reino fungi, actualmente se recomienda sólo para el aislamiento primario de dermatofitos.

Agar MacConkey, es un medio selectivo utilizado para la recuperación de enterobacterias y bacilos gram negativos, contiene sales biliares y cristal violeta que inhibe el desarrollo de bacterias gram positivas.

Agar mueller-hinton, medio de cultivo rico diseñado especialmente para hacer ensayos de sensibilidad, también para la realización del ensayo de difusión en placa, Asimismo para el uso de todos los medios y el trabajo en laboratorio se deben respetar ciertos principios de bioseguridad que tienen como finalidad disminuir el riesgo de accidentes al personal expuesto ante peligros microbiológicos, por ello es indispensable respetar y practicar las siguientes normas.

1.3.15 Principios de bioseguridad⁴⁹

Universalidad, esto nos dice que las medidas de bioseguridad la deben respetar todos los integrantes de una institución.

Uso de barreras, esto nos previene de accidentes y que el personal quede expuesto a agentes contaminantes.

Medios de eliminación del material contaminado, protegemos a la comunidad eliminando adecuadamente los desechos.

Evaluación de riesgos, las probabilidades de que ocurran daños en el laboratorio tienen que ser bajos.

1.4 Formulación del Problema.

¿Cuál es el efecto antibacteriano in vitro del extracto hidroetanólico de *Erythroxylum coca* frente *Streptococcus mutans* ATCC 35668?

1.5 Justificación e importancia del estudio.

El presente estudio se justifica porque existe gran incidencia de caries dental en la población, uno de los principales factores para su inicio y gran responsable es el *S. mutans* que desmineraliza el esmalte dental debido a un desequilibrio en la flora bucal por distintos factores, Asimismo otra de las causas es por el aumento de uso de drogas inmunosupresoras y también por las aparición de infecciones virales que son causantes de pacientes inmunodeprimidos que repercute en el desequilibrio de la flora bucal.

Asimismo porque en la actualidad los extractos de plantas están siendo estudiados y su frecuencia de uso está siendo muy marcado, gracias a sus efectos farmacológicos avalados en reportes científicos. Estudios a lo largo de los últimos años han demostrado la efectividad de *Erythroxylum coca* frente a un gran número de

bacterias y hongos, pero existe insuficiente información acerca de la efectividad del extracto hidroetanólico de *Erythroxylum coca* "coca" frente *S. mutans*.

En nuestra región no se encontró reportes de trabajos que revelen el efecto inhibitorio de *Erythroxylum coca* "coca" frente *S. mutans* ATCC 35668, por lo que aportaríamos mucho a nuestra región con este aporte científico como una base para futuros estudios. Los resultados incentivarán para que otros estudios puedan demostrar el efecto inhibitorio sobre otros microorganismos relacionados a la flora bucal siendo posible no solo enfrentar a bacterias con importancia odontológica sino también a hongos presentes en la cavidad bucal para evaluar si también presenta efecto antifúngico.

Asimismo con los resultados siendo significativos se podrá evaluar la posibilidad de futuros proyectos comerciales como antisépticos como por ejemplo para la desinfección perioral o preparación de campos operatorios, también para la desinfección de prótesis removibles para su mejor cuidado, además pastas dentales o colutorios para la prevención y control de la flora bucal, realizando otros estudios demostrando que el extracto hidroetanólico de *Erythroxylum Coca* también presenta efecto contra otras bacterias se podrían realizar soluciones para cualquier otros procedimientos odontológico como retratamientos endodónticos.

1.6 Hipótesis

H₀: El extracto hidroetanólico de *Erythroxylum coca* "coca" no tiene efecto antibacteriano in vitro frente a *S. mutans* ATCC 35668.

H₁: El extracto hidroetanólico de *Erythroxylum coca* "coca" si tiene efecto antibacteriano in vitro frente a *S. mutans* ATCC 35668.

1.7 Objetivos

1.7.1 Objetivo general

Determinar el efecto antibacteriano del extracto hidroetanólico de *Erythroxyllum coca* frente a *S. mutans* ATCC 35668.

1.7.2 Objetivos específicos

- Determinar el efecto antibacteriano del extracto hidroetanólico de *Erythroxyllum coca* frente a *S. mutans* ATCC 35668 al 75mg/ml.
- Determinar el efecto antibacteriano del extracto hidroetanólico de *Erythroxyllum coca* frente a *S. mutans* ATCC 35668 al 50mg/ml.
- Determinar el efecto antibacteriano del extracto hidroetanólico de *Erythroxyllum coca* frente a *S. mutans* ATCC 35668 al 25mg/ml.
- Comparar en grupo las concentraciones 75mg/ml, 50mg/ml, 25mg/ml, el efecto antibacteriano del extracto hidroetanólico de *Erythroxyllum coca* frente a *S. mutans* ATCC 35668

II. MATERIAL Y MÉTODO

2.1 Tipo y Diseño de Investigación⁵⁰.

Para el presente proyecto de investigación se empleó el tipo de investigación cuantitativa, diseño experimental verdadero de estímulo creciente.

Cuantitativa, ya que recopilaremos datos de medidas para posteriormente analizarlo estadísticamente.

Diseño experimental de estímulo creciente, debido a que podemos manipular nuestra variable en este caso el extracto para realizar las concentraciones y observar su efecto inhibitorio evaluándolo con el grupo control.

2.2 Población y muestra:

Para el presente trabajo se obtuvo una muestra no probabilística, constituidos por 3 concentraciones de extracto, 1 extracto hidroetanólico de *Erythroxylum coca*, 1 cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 35668, se realizaron 30 repeticiones, por lo tanto, se obtuvieron 90 unidades experimentales.

2.2.1 Criterios de inclusión:

- Cepa bacteriana de *S. mutans*
- Placas Petri debidamente sembradas con el inóculo.
- Medio de cultivo correctamente manipulado.
- Discos de papel filtro correctamente recortados.
- Discos de papel filtro debidamente ubicados.
- Halos de inhibición que tengan una forma regular.

2.2.2 Criterios de exclusión:

- Placas Petri donde la bacteria no haya crecido uniformemente.
- Cultivos con inadecuada manipulación.
- Discos de papel filtro que no estén bien recortados.
- Halos de inhibición de formas irregulares.
- Siembras donde se observó contaminación de otro tipo de bacterias.

2.3 Variables, Operacionalización.

Variable Independiente: Extracto hidroetanólico de *Erythroxylum coca* "coca"

Variable Dependiente: Efecto inhibitorio

Variables	Definición Conceptual	Definición Operacional	Tipo de variable	Dimensiones	Escala	Indicadores	Técnica e instrumento de recolección de datos
Variable Dependiente: Efecto inhibitorio sobre <i>S. mutans</i>	Medicamento, químico o sustancia que inhibe o evita que algo suceda ⁵¹	Se evaluó mediante el valor numérico obtenido midiendo el halo de inhibición de acuerdo a su concentración ⁵²	cuantitativa	Crecimiento de <i>Streptococcus mutans</i>	Intervalo	Zona o Halo de inhibición nula (-) menor o igual 8 mm; sensibilidad límite (sensible = +) de 9 a 14 mm; media (muy sensible = ++) de 15 a 19 mm sumamente sensible (S.S. = +++) si será igual o superior a 20 mm.	Método de Kirby-bauer Regla milimetrada
Variable Independiente: Concentración del Extracto de <i>Erythroxylum coca</i> "coca"	Sustancia que en forma concentrada, se extrae de otra, de la cual conserva sus propiedades ⁵³	Capacidad del extracto hidroetanólico para inhibir el crecimiento bacteriano ⁵⁴	Cuantitativa	Hidroetanólico	Nominal	Concentraciones (75mg/ml, 50mg/ml, 25mg/ml)	Ebullición Maceración Dilución doble seriada

2.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad.

2.4.1 Procedimiento para la recolección de datos

En el presente estudio se obtuvo la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 35668 de manera comercial (GenLab del Perú S.A.C). Todo el procedimiento se desarrolló bajo las normas del laboratorio de investigación de la facultad de ciencias de la salud, Universidad Señor de Sipán (USS), por el investigador bajo la supervisión de un microbiólogo, asimismo la cepa bacteriana comercial fue rehidratada y cultivada en placa de Agar Mueller Hinton que es uno de los más utilizados para realizar pruebas de susceptibilidad suplementándola con sangre para el crecimiento de bacterias del género *Streptococcus*.

Las hojas de *Erythroxylum coca* "coca" fueron obtenidas de la empresa nacional de la coca (ENACO S.A) sede Trujillo, para la *desinfección* de las hojas de *Erythroxylum coca* "coca", fueron lavadas con agua destilada y desinfectadas con alcohol de 96 grados, posteriormente se dejó a secar por 3 semanas, pasando la etapa del secado se realizó el licuado y tamizaje de las hojas hasta obtener el material, posteriormente para la preparación del extracto hidroetanólico se maceró 300 g de *Erythroxylum coca* "coca" y se agregó 500 mL de etanol al 100 % (Puro) y 100 ml de agua destilada en una botella de vidrio ámbar hermética, Se agitó la botella diariamente durante una semana.

El producto fue filtrado 3 veces con papel filtro Whatman N° 41 ya que presentan estándares de referencia mundial por su calidad y fiabilidad para el filtrado en laboratorio dependiendo el número se puede controlar la retención de partículas como también la velocidad de absorción, y se obtuvo un extracto purificado libre de residuos, para posteriormente se procedió al secado del extracto purificado en placas Petri expuesto a aire frío por 8 horas para su posterior raspado obteniendo el extracto, que fue guardado en refrigeración a 2 °C en frasco de vidrio color ámbar, hasta su reactivación en agua destilada estéril para su posterior uso.

Siguiendo las recomendaciones del CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute), para evaluar la potencia puede expresarse como porcentaje o en

unidades de $\mu\text{g}/\text{mg}$, mg/mL , (p/p). Por tanto se resuspendió 75mg de residuo seco en 1000ul de la suspensión, siendo considerada como la solución Stock (madre), que es la primera dilución de ella salen las otras concentraciones. Asimismo mediante el método de dilución doble seriada, se calcularon 3 diluciones, los cuales fueron distribuidos en los discos de papel filtro en la superficie del agar en la placa petri⁵⁵.

Las colonias de *Streptococcus mutans* fueron seleccionadas de un cultivo en placa de agar Mitis Salivarius después de 18 a 24 horas⁵⁵, de la placa de agar se seleccionó de tres a cinco colonias bien aisladas y con el mismo tipo morfológico. Por lo que la parte superior de cada colonia se tocó con un asa y se transfirió a un frasco estéril con 4-5 mL de suero fisiológico, con ayuda del turbidímetro el cual mide las partículas suspendidas en un líquido o gas, se midió la turbidez equivalente a 0,5 del estándar de McFarland, con absorbancias de 0,08 – 0,1 para bacterias. La suspensión bacteriana resultante contiene aproximadamente 1 a 2×10^8 (UFC/mL).

Tendrá un lapso de tiempo óptimo de 15 minutos después de ajustar la turbidez de la suspensión del inóculo, mediante un hisopo estéril se sumerge en ella. El hisopo debe ser rotado varias veces y presionado firmemente contra la pared interna del tubo sobre el nivel de líquido. Esto remueve el exceso de inóculo, se inocula la superficie de una placa de agar sangre con base Mueller Hinton por rayado con la torunda sobre toda la superficie. Este procedimiento es repetido rayando dos o más veces, rotando la placa aproximadamente 60° cada vez para asegurar una distribución constante del inóculo.

Como paso final se pasó sobre los bordes del agar, las tapas de la placa pueden quedar entreabiertas por 3 a 5 minutos, pero no más de 15 minutos, para evitar un exceso de humedad. Se colocaron discos de papel de filtro en la superficie de los agares con ayuda de una pinza estéril. Dichos discos tuvieron una dimensión de 6 mm de diámetro, y en cada uno de ellos se incorporó 25 μL del extracto. Se dejó reposar por 30 minutos y después las placas fueron llevadas a incubación a 36 °C, esto crea un ambiente con la humedad y temperatura adecuada para el crecimiento de la bacteria, por un periodo de 24 horas.

Pasada las 24 horas de incubación, cada placa fue examinada, las zonas de inhibición resultantes son uniformemente circulares en una capa homogénea de crecimiento. Los tamaños de las zonas de inhibición fueron medidos con una regla en milímetros y serán interpretados según orientaciones del CLSI (Clínical Laboratory Estándar Institute). La actividad se consideró en función al diámetro del HICM: nula (-) si es inferior o igual a 8 mm sensibilidad límite; (sensible = +) de 9 a 14 mm media; (muy sensible = ++) de 15 a 19 mm y sumamente sensible (S.S. = +++) si es igual o superior a 20 mm⁵⁵.

2.5 Método de análisis de datos.

En este estudio se utilizó la prueba T- Student para medir el efecto antibacteriano y también evaluar la diferencia entre las medias de las muestras del extracto hidroetanólico de *Erythroxylum Coca*, también la prueba D de Cohen para medir la significancia individualmente cada concentración comparado con el grupo control, asimismo un análisis de varianza para evaluar la significancia en conjunto en comparación con el grupo control.

2.6 Aspectos éticos.

Se consideró aspectos de bioseguridad para disminuir el riesgo microbiológico que lo encontramos presente cada vez que se realiza una actividad en el laboratorio, donde se tiene la necesidad de manipular cultivos de microorganismos los cuales tienen que ser manipulados de la mejor manera posible siguiendo criterios internacionales, con respecto a la inactivación de los medios con *Streptococcus mutans* se realizó mediante un proceso con calor húmedo que afecta la estabilidad de estructuras celulares y proteínas que es el autoclavado donde se utiliza vapor de agua, a una temperatura de 121 °C a 1 atm de presión durante 15 minutos, con la finalidad de inactivar todo tipo de microorganismo y asimismo evitar su propagación.

Asimismo se consideró que al finalizar esta investigación se genere nuevos conocimientos, estando sujeta a normas éticas promoviendo el respeto por el

procedimiento de las investigaciones para así mejorar las intervenciones preventivas, diagnósticas y terapéuticas dando como resultados productos finales seguros, efectivos, accesibles y de calidad.

Finalmente, todo el procedimiento realizado en las instalaciones del laboratorio de investigación de la facultad de ciencias de la salud de la Universidad Señor de Sipán fue bajo el uso de normas y pautas de práctica clínica como lo recomienda el Instituto de estándares clínicos y de laboratorio (CLSI), asegurando procedimientos legítimos de muy buena confiabilidad.

2.7 Criterios de rigor científico

La metodología empleada es validada a nivel internacional, cuyos procedimientos aseguran la fidelidad de los resultados. La forma de presentación de las referencias bibliográficas utilizadas fue siguiendo el formato Vancouver, establecido a nivel internacional para aquellas investigaciones en el campo de las Ciencias de la Salud. La presente investigación cumple todos los criterios de rigor científico, siendo por tanto una investigación inédita y debe ser considerada como tal, ya que cumple y respeta todos los principios éticos que guían a la comunidad médica dedicados a la experimentación mediante la declaración de Helsinki en 1964, promulgada por la Asociación Médica Mundial (AMM).

III. RESULTADOS

3.1. Tablas y figuras

Tabla 1:

Efecto antibacteriano del extracto hidroetanólico de *Erythroxylum coca* “coca” frente a *S. mutans* ATCC 35668.

	grupo	N	Media	Desviación estándar	p	D de Cohen
General	CASOS	30	20.07	1.258	0,000	3.21
	CONTROLES	30	18.47	1.042	P < 0,01	

	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
						Inferior	Superior
General	5,367	58	,000	1,600	,298	1,003	2,197

Fuente: Elaboración del autor

En la tabla 1; se observa que, la aplicación del antibacteriano del extracto hidroetanólico de *Erythroxylum coca* “coca” hizo efecto positivo frente a *S. mutans* ATCC 35668 (altamente significativo $p < 0.01$). Siendo corroborado por la prueba D de cohen cuyo efecto del tamaño es muy alta ($d = 3.21$).

Tabla 2:

Efecto antibacteriano del extracto hidroetanólico de *Erythroxylum coca* “coca” frente a *S. mutans* ATCC 35668 al 75mg/ml

	grupo	N	Media	Desviación estándar	p	D de Cohen
75 mg/ml	CASOS	30	24.10	1.029	0,000	7.87
	CONTROLES	30	20.07	1.258	P < 0,01	

	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
						Inferior	Superior
ATCC 35668 al 75 mg/ml	13,6	58	,000	4,033	,297	3,440	4,627

Fuente: Elaboración del autor

En la tabla 2; se observa que, la aplicación del antibacteriana del extracto hidroetanólico de *Erythroxylum coca* “coca” hizo efecto positivo frente a *S. mutans* ATCC 35668 al 75mg/ml (altamente significativo $p < 0.01$). Siendo corroborado por la prueba D de cohen cuyo efecto del tamaño es muy alta ($d = 7.87$).

Tabla 3:

Efecto antibacteriano del extracto hidroetanólico de *Erythroxylum coca* “coca” frente a *S. mutans* ATCC 35668 al 50mg/ml

	grupo	N	Media	Desviación estándar	p	D de Cohen
50 mg/ml	CASOS	30	20.07	1.258	0,000	7.23
	CONTROLES	30	18.73	1.285	P < 0,01	

prueba t para la igualdad de medias							
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
						Inferior	Superior
ATCC 35668 al 50 mg/ml	4,062	58	,000	,133	,328	,676	1,990

Fuente: Elaboración del autor

En la tabla 3; se observa que, la aplicación del antibacteriana del extracto hidroetanólico de *Erythroxylum coca* “coca” hizo efecto positivo frente a *S. mutans* ATCC 35668 al 50mg/ml (altamente significativo $p < 0.01$). Siendo corroborado por la prueba D de cohen cuyo efecto del tamaño es muy alta ($d = 7.23$).

Tabla 4:

Efecto antibacteriano del extracto hidroetanólico de *Erythroxylum coca* “coca” frente a *S. mutans* ATCC 35668 al 25mg/ml

	grupo	N	Media	Desviación estándar	p	D de Cohen
25 mg/ml	CASOS	30	12.57	2.555	0,000 P < 0,01	- 4.76
	CONTROL ES	30	20.07	1.258		

	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
						Inferior	Superior
ATCC 35668 al 25 mg/ml	-14,424	58	,000	-7,500	,520	-8,541	-6,459

Fuente: Elaboración del autor

En la tabla 4; se observa que, la aplicación del antibacteriana del extracto hidroetanólico de *Erythroxylum coca* “coca” hizo efecto negativo frente a *S. mutans* ATCC 35668 al 25mg/ml (altamente significativo $p < 0.01$). Siendo corroborado por la prueba D de cohen cuyo efecto del tamaño es muy baja ($d = -4.76$).

Tabla 5:

Análisis de varianza efecto antibacteriano del extracto hidroetanólico de *Erythroxyllum coca* “coca” frente a *S. mutans* ATCC 35668

ANOVA						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
mg_75	Entre grupos	244,017	1	244,017	184,845	,000
	Dentro de grupos	76,567	58	1,320		P < 0.01
	Total	320,583	59			
mg_50	Entre grupos	26,667	1	26,667	16,501	,000
	Dentro de grupos	93,733	58	1,616		P < 0.01
	Total	120,400	59			
mg_25	Entre grupos	843,750	1	843,750	208,038	,000
	Dentro de grupos	235,233	58	4,056		P < 0.01
	Total	1078,983	59			
General	Entre grupos	38,400	1	38,400	28,800	,000
	Dentro de grupos	77,333	58	1,333		P < 0.01
	Total	115,733	59			

Fuente: Elaboración del autor

En la tabla 5; se observa el análisis de varianza (ANOVA), el cual nos indica la significancia en grupo del extracto hidroetanólico de *Erythroxyllum Coca* frente al *S. mutans* ATCC 35668.

3.2. Discusión de resultados

En la actualidad están aumentando las investigaciones dirigidas a buscar nuevas alternativas para su uso en terapias odontológicas a partir de una fuente natural, es por eso que se presentan nuevos estudios evaluando extractos o aceites esenciales de plantas y frutos tradicionales de cada región utilizados antiguamente, la hoja de *Erythroxylum coca* fue muy aprovechado por antiguas culturas preincaicas e incas, utilizándolas para atenuar dolores y también como estimulante para trabajos que necesitaban un gran esfuerzo físico, la presente investigación tuvo como objetivo determinar el efecto antibacteriano del extracto hidroetanólico de *Erythroxylum Coca* frente a *S. mutans* siendo este un microorganismo cariogénico por excelencia, quedando comprobado que las concentraciones 75 % y 50 % presentaron efecto antibacteriano significativo, mientras que la concentración 25% presentó efecto antibacteriano no significativo en comparación con el grupo control.

Por otro lado, Vilchez M¹¹ *et al*, Evaluaron el efecto del extracto acuoso, ácido y alcohólico de las hojas secas de *Erythroxylum Coca* en *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Microsporum canis*, teniendo como resultados que solo el extracto alcohólico tiene efecto sobre *Trichophyton rubrum* y *Microsporum canis*, con lo que coincide con el presente estudio por el método de maceración con contenido alcohólico con el que se obtuvo el extracto, el efecto antibacteriano del extracto hidroetanólico de *Erythroxylum coca* es también sustentado por estudios como el de Enciso C y Ramos D¹², donde demostraron mediante dos pruebas las cuales fueron test de difusión de agar y dilución en medio líquido que el extracto hidroalcohólico de hoja de coca si presenta actividad antibacteriana frente a Bacilos negros pigmentados (BNP) a las concentraciones de 100% y 12,5%, cabe recalcar que utilizaron como control negativo alcohol de 96° lo que difiere del presente estudio donde utilizamos como control negativo Cloruro de sodio 0.9%.

Según Vergara C¹³, en los resultados de su estudio donde determinó el efecto inhibitorio in vitro del extracto acuoso y el extracto etanólico de la hoja de *Erythroxylum novogranatense var. Truxillense* (COCA) sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans*, mostraron que tanto el extracto acuoso y etanólico presentan

halos inhibitorios sobre el *S. mutans* lo que coincide con el presente estudio quedando demostrado que los extractos acuoso, etanólico e hidroetanólico presentan efecto inhibitorio sobre el *S. mutans*, asimismo se demuestra que tanto el extracto etanólico como el hidroetanólico presentaron mayor efecto significativo a diferencia del extracto acuoso.

Minaya P¹⁴, en su estudio al realizar las pruebas de sensibilidad demostró que el extracto alcohólico de la hoja de *Erythroxylum novogranatense var. Truxillense*, presenta efecto antibacteriano significativo frente a *S. mutans* con halos promedios de 34.4mm, coincidiendo con el presente estudio donde los halos promedio de la concentración máxima fueron de 24.10mm, pero sus controles difieren del presente estudio ya que utilizó como control negativo agua destilada y como control positivo alcohol a 96°.

Negrete M y Quispe A¹⁵ demostró que los macerados preparados con alcohol absoluto de *Erythroxylum Coca* presenta actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, siendo esta también una bacteria gram positiva, esto demuestra que el extracto de *Erythroxylum Coca* presenta un gran efecto tanto antibacteriano como antifúngico frente a un gran número de microorganismos. Es importante mencionar que en los resultados de los estudios coinciden que hay mayor efecto cuando se maceró totalmente alcohólico o hidroalcohólico las hojas de *Erythroxylum Coca*.

Kumarasamy B¹⁶ *et al*, en su estudio demostraron que el extracto acuoso crudo de frutos maduros de *M. citrifolia* “noni” inhibió eficazmente el crecimiento de *S. mutans* con halos promedio de 19mm, esto demuestra que los efectos del extracto hidroetanólico de *Erythroxylum coca* presenta mayor efecto a comparación con el extracto acuoso de frutos de *M. citrifolia* “noni”.

Finalmente Solano X¹⁷ *et al*, en su estudio demostraron que el extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* (romero), no produjo halo de inhibición siendo 00mm, mientras que el extracto oleoso si produjo halo de inhibición promedio de 11.93mm, por otro lado los controles que utilizaron como positivo y negativo fueron clorhexidina al 0.12% y agua destilada respectivamente, no presentándose diferencia significativa ya

que los halos que presentó la clorhexidina al 0.12% fueron de 16.13mm, mayor a los del extracto, esto difiere de los resultados encontrados en el presente estudio ya que en las concentraciones de 50% y 75% si se encontraron diferencia significativa con los grupos controles.

Es importante mencionar que en el presente estudio se controló de manera muy estricta la esterilidad de todos los materiales que van a ser utilizados, esto nos lleva a tener un mayor conocimiento de los equipos que se usan para tal fin como lo son el autoclave, esterilizador al calor seco y el uso de las cabinas de bioseguridad, un inadecuado uso de estos equipos sería un limitante ya que no nos darían los resultados obtenidos en la presente investigación.

3.3. Aporte científico

En la presente investigación donde se evaluó el efecto antibacteriano in vitro del extracto hidroetnaólico de *Erythroxylum Coca* frente *Streptococcus mutans* ATCC 35668, quedando comprobado que las concentraciones 75 % y 50 % presentaron efecto antibacteriano significativo, mientras que la concentración 25% presentó efecto antibacteriano no significativo en comparación con el grupo control.

Se obtuvo el extracto exponiéndolo al aire frío durante 8 horas por lo que no podría ser a alta temperatura ya que podrían perderse algunos compuesto de la hoja de *Erythroxylum coca*, conociéndose que podría presentar componentes termolábiles que se destruyen a una temperatura más o menos elevada, para posteriormente pasar a su raspado, esto se hubiera podido manejar con el uso de un liofilizador que permite la eliminación del agua de productos o disoluciones en condiciones de baja presión y temperatura lo que hace que estos productos deshidratados mantengan todas sus propiedades estables y por otro lado sería un método más rápido, pudiendo tener un mejor control del extracto, una desventaja es el precio del equipo por lo que no es muy fácil tener acceso a este.

Asimismo, en el periodo de maceración del extracto hidroetnaólico de *Erythroxylum* en el presente estudio se agitó la botella ámbar de manera manual diariamente, por otro lado, se hubiera podido utilizar un agitador automático para que constantemente esté en

movimiento el extracto hidroetnaólico de *Erythroxylum* y así obtener una mejor extracción de los compuestos.

Los resultados de la presente investigación demuestran el efecto antibacteriano de *Erythroxylum Coca* en sus concentraciones al 25%, 50%, 75%, se podría continuar en el futuro realizando un estudio de cada uno de los componentes del *Erythroxylum Coca* por separado, evaluando la toxicidad y poder así utilizarlo en estudios in vivo posteriormente, pudiéndose elaborar productos de importancia odontológica a base de *Erythroxylum Coca*.

IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

Se concluye que el extracto hidroetanólico de *Erythroxylum Coca* tuvo efecto antibacteriano frente a *S. mutans* al 75 mg/ml, obteniéndose halos promedios de 24,10mm.

Se concluye que el extracto hidroetanólico de *Erythroxylum Coca* tuvo efecto antibacteriano frente a *S. mutans* al 50 mg/ml, obteniéndose halos promedios de 20,07mm.

Se concluye que el extracto hidroetanólico de *Erythroxylum Coca* a la concentración 25mg/ml no presenta efecto significativo con respecto a las dos primeras concentraciones obteniéndose halos promedios de 12,57mm.

Se concluye que al comparar las tres concentraciones del extracto hidroetanólico de *Erythroxylum Coca*, solo las concentraciones de 75% y 50 % presentaron efecto positivo en comparación a la concentración de 25%.

RECOMENDACIONES

El extracto hidroetanólico de *Erythroxylum coca* puede ser en el futuro de mucha importancia en el área odontológicas si se estudian por separados sus componentes químicos para así determinar su relevancia de cada uno de ellos y poder evaluar su índice de toxicidad.

Realizar estudios con otro tipo de bacterias de importancia odontológica como *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus*, *Streptococcus sanguis*, entre otros para poder determinar si el extracto hidroetanólico de *Erythroxylum coca* tiene efecto sobre éstos.

Realizar estudios con hongos de importancia odontológica como *Cándida albicans* para poder determinar si el extracto hidroetanólico de *Erythroxylum coca* no sólo tiene efecto antibacteriano sino también antifúngico.

Estudiar también si con alguna otra solución para la maceración de *Erythroxylum coca* como por ejemplo extracto acuoso, oleoso o totalmente alcohólico, se puede tener efectos antibacterianos o antifúngicos.

REFERENCIAS

1. Ministerio de salud pública. Caries guía de práctica clínica. Ecuador: El telégrafo EP; 2015. Disponible en: <http://salud.gob.ec>
2. Gamboa F. Identificación y caracterización microbiológica, fenotípica y genotípica del *Streptococcus mutans*: experiencias de investigación. Universitas Odontológica. 2014; 33(71): 65-73. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.11144/Javeriana.uo33-71.icmf>
3. Aricapa D. Actividad antimicrobiana de plantas sobre microorganismos cariogénicos [Tesis]. Colombia: Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de ciencias básicas bacteriología; 2009.
4. Medwave| Estudio descriptivo transversal sobre promoción de salud bucal y nivel de conocimientos de caries dental en niños de 11-12 años [Internet]. [Citado 23 de mayo de 2018].
5. Ministerio de salud. Prevalencia nacional de caries dental, fluorosis de esmalte y urgencia de tratamiento en escolares de 6 a 8, 10, 12 y 15 años. Perú. 2005.
6. Plazas L. Recuento e identificación de *streptococcus mutans* de saliva en niños con caries dental: seguimiento a 3 y 6 meses después de un proceso educativo [Tesis]. Colombia: Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de ciencias básicas bacteriología; 2015.
7. Santamaría F. Estudio comparativo de la técnica de cepillado dental convencional y la técnica de cepillado dental convencional más higiene lingual en el recuento salival de *streptococcus mutans* [Tesis]. Chile: Universidad de Chile, Facultad de odontología; 2010.
8. MINSA| Guía de práctica clínica para la prevención, diagnóstico y tratamiento de la caries dental en niñas y niños [Internet]. 2017 [Citado 31 de octubre de 2018].
9. Gobierno regional de Lambayeque. Gerencia regional de salud, morbilidad y HIS. 2018.
10. Gobierno regional de Lambayeque. Gerencia regional de salud, morbilidad y HIS. 2018.
11. Luna M, Díaz C, Baca F. Efecto del extracto acuoso, ácido y alcohólico de las hojas secas de *Erythroxylum coca var coca* (coca) en *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton*

- mentagrophytes, *Microsporum canis* y *Candida albicans* in vitro [Tesis]. Perú: Universidad San Martín de Porres, Facultad de Medicina; 2017.
12. Deza C, Ramos D. Estudio in vitro de la actividad antibacteriana del extracto de *Erythroxyllum coca* sobre bacilos negro pigmentados [Tesis]. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de odontología; 2017.
 13. Vergara C. “Efecto inhibitorio in vitro del extracto acuoso y el extracto etanólico de la hoja de *Erythroxyllum novogranatense* var. *Truxillense* (COCA) sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans*” [Tesis]. Perú: Universidad Nacional de Trujillo, Facultad de Medicina. Escuela de Estomatología.
 14. Minaya P. “Determinación de la actividad antibacteriana "in vitro" del extracto etanólico de la hoja de *Erythroxyllum novogranatense* var *truxillense* (coca) frente a bacterias orales cariogénicas”, [Tesis]. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de odontología; 2008.
 15. Negrete M, Quispe A. Estudio in vitro de la capacidad antibacteriana de la hoja de coca (*erythroxyllum coca lam*) frente a bacterias atcc *staphylococcus aureus*, *escherichia coli* y *pseudomonas aeruginosa* [Tesis]. Bolivia: Universidad Cristiana de Bolivia; 2015.
 16. Kumarasamy B, Manipal S, Duraisamy P, Ahmed A, Mohanaganesh SP, Jeevika C. Role of Aqueous Extract of *Morinda Citrifolia* (Indian Noni) Ripe Fruits in Inhibiting Dental Caries-Causing *Streptococcus Mutans* and *Streptococcus Mitis*. Journal of Dentistry, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran (2014; Vol. 11, No. 6).
 17. Solano X, Moya T, Zambrano M. Inhibición del *Streptococcus mutans*, mediante el uso de extracto acuoso y oleoso de *Rosmarinus officinalis* “romero” [Tesis]. Ecuador: Universidad Central del Ecuador, Facultad de odontología; 2016.
 18. Ojeda J, Oviedo E, Salas L. *Streptococcus mutans* and dental caries. Revista CES Odontología ISSN 0120-971X. Volumen 26 No. 1. Primer Semestre de 2013.
 19. Poyato M, Segura J, Ríos V, Bullón P. La placa bacteriana: Conceptos básicos para el higienista bucodental. Periodoncia Volumen 11, Número 2, Abril-Junio 2001.
 20. Estrada J, Pérez J, Hidalgo I. Caries dental y ecología bucal, aspectos importantes a considerar. Facultad de Ciencias Médicas de Matanzas “Juan Guiteras Gener”.

21. Martino N. Evaluación de la fermentación de distintos tipos de endulzantes utilizados en la dieta por streptococci orales [Tesis]. Chile. Universidad Andrés Bello, Facultad de Odontología; 2015.
22. Figueroa M. Alonso G. Acevedo A. Microorganismos presentes en las diferentes etapas de la progresión de la lesión de caries dental. Acta Odontológica Venezolana. Volumen 47 N° 1/ 2009.
23. Carraco C. Diversidad de especies y genotipos de bifidobacterium en saliva y caries de niños chilenos de 7 a 11 años de edad con y sin caries [Tesis]. Chile. Universidad de Chile. Facultad de Odontología; 2016.
24. Cajal A. Streptococcus Mitis: Características, taxonomías, patologías. Lifeder. Disponible en: <https://www.lifeder.com/streptococcus-mitis-caracteristicas-taxonomia-patologias/>.
25. Hernández F. Interacción de streptococcus Sanguinis en la viabilidad y crecimiento de Cándida Albicans en la cavidad oral [Tesis]. Chile. Universidad de Chile. Facultad de Odontología; 2016.
26. Larrea N. Revisión bibliográfica de transmisión vertical y presencia de Streptococcus mutans en la cavidad oral de niños lactantes pre-dentados [Tesis]. Quito: Universidad San Francisco de Quito USFQ; 2016.
27. Lamas M. Estudio de la colonización por Estreptococos Mutans y hábitos dietéticos durante la lactancia y primera infancia [Tesis]. España: Universidad Complutense de Madrid, Departamento de Estomatología IV; 2003.
28. Ramos A. Actividad antibacteriana del extracto de *Erythroxylum coca* sobre *Porphyromonas Gingivalis*, estudio in vitro [Tesis]. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Odontología; 2012.
29. Rodríguez E. Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. Ra Ximhai Vol. 7, Número 1, enero -abril 2011. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=46116742014>.
30. Wright, J. T. (2012). Response from the American Dental Association Council on Scientific Affairs. The Journal of the American Dental Association, 143(6), 556.
31. Fontes C. presencia de *streptococcus mutans* y *lactobacillos spp* en pacientes con xerostomía, antes y después del tratamiento con neuro-electro-estimulación [Tesis]. México: Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Odontología; 2012.

32. Núñez D, García L. Bioquímica de la caries dental. Revista Habanera de Ciencias Médicas 2010;9(2) 156-166.
33. Asmat K. Secuencia de una restauración con resina compuesta clase I [Tesis]. Perú: Universidad Nacional Federico Villarreal, Facultad de odontología; 2010.
34. Chaple A. Comparación de dos clasificaciones de preparaciones cavitarias y lesiones cariosas: Mount y Hume, y Black. Rev. Cubana Estomatol. 2015;52(2) ISSN-1561-297X.
35. MINSA| Medicina alternativa y complementaria. 2002 [Citado el 01 de agosto de 2018].
36. Hernández A. Fitoterapia. Bases científicas y legales para su aplicación. Cuba. 2004.
37. Ramos E. Efectividad de la masticación de la hoja de coca en la prevención de la caries dental en el centro poblado de San Juan de la Libertad Huasahuas-Tarma en 2008 [Tesis]. Perú: Universidad Federico Villarreal. Facultad de odontología; 2008.
38. Villena M, Sauvain M. Usos de la hoja de coca y salud pública. Bolivia.1997.
39. ECURED| Coca (planta) [Internet]. [Citado 23 de mayo de 2018]. Disponible en: [https://www.ecured.cu/Coca_\(planta\)](https://www.ecured.cu/Coca_(planta)).
40. COCA NATURAL|Hojas de Coca: Propiedades de este alimento funcional milenario [Internet]. [Citado 23 de mayo de 2018]. Disponible en: <http://www.cocanatural.com/es/arti.asp?ref=hojas-coca>
41. García J. De la coca a la cocaína una historia por comprender. Colombia. 2002.
42. Peng T, Chunhui L, Zhong P. *et al.* Facilely accessible quinoline derivatives as potent antibacterial agents. Bioorganic & Medicinal Chemistry. USA. 26 (2018) 3573-3579.
43. Neumann R. Aptitud ecológica para el cultivo de coca. Argentina. 2004.
44. Organización panamericana de la salud. Cabinas de seguridad biológica, uso, desinfección y mantenimiento. Washington, DC. Primera edición. 2002.
45. Pérez W, Mantenimiento de cabinas de flujo laminar, memorias taller internacional sobre calidad en el laboratorio de salud pública. Bogotá. Instituto Nacional de Salud. 2003.
46. Terroni equipamentos LTDA. Manual básico de liofilización. Sao carlos SP. Pag 1-8. Disponible en:

http://ocsvr.langebio.cinvestav.mx/mediawiki/images/c/cb/Manual_B%C3%A1sico_para_Liofilizar.pdf.

47. Secado por liofilización. Universidad de Granada. Facultad de ciencias COD. 10-71. Vicedecanato de actividades científicas, culturales y de prácticas externas.
48. Microbiología clínica. Medios de cultivo. (2013), disponible en: <http://asignatura.us.es/mbclinica/docs/recursos/12/medios-de-cultivo.pdf>.
49. Principios y recomendaciones generales de bioseguridad para la facultad de bioquímica y ciencias biológicas. Comisión de higiene y seguridad en el trabajo. Argentina. 2013.
50. Hernández R, Fernández C, Baptisita P. Metodología de la Investigación. 6ta Edició. Mexico: Editorial McGraw-Hill Interamericana. 2014. 689.
51. Hospital Alemán Asociación Civil. (2018), disponible en : <https://www.hospitalaleman.org.ar/diccionario-medico/i/>.
52. Pérez S. Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de Stevia Rebaudiana sobre Streptococcus mutans ATCC 25175 [Tesis]. Perú: Universidad Nacional de Trujillo, Escuela de estomatología; 2013.
53. Wordreference. Online lenguaje dictionaries. Disponible en: <http://www.wordreference.com/definicion/extracto>.
54. López M. Efectividad antibacteriana in vitro del gel de burm.f. (aloe vera) y extracto hidroetanólico de matricaria chamomilla (manzanilla) sobre cepas de Streptococcus mutans ATCC 25175 [Tesis]. Perú: Universidad católica Los Ángeles de Chimbote. Facultad de ciencias de la salud. Escuela profesional de Odontología. 2018.
55. Clinical and Laboratory Standars Institute. Métodos de dilución para determinar la sensibilidad a los antimicrobianos de bacterias que crecen en condiciones aeróbicas. Norma aprobada—octava edición. 2009; (26)2: 1 -100. M07-A8.

ANEXOS
ANEXO N° 01

Ficha de Recolección de datos

Muestras	Concentraciones					
	75%		50%		25%	
	Casos	Controles	Casos	Controles	Casos	Controles
1	25	20	18	20	12	20
2	22	22	20	22	12	22
3	25	20	20	20	15	20
4	24	19	18	19	11	19
5	22	22	18	22	11	22
6	24	21	21	21	11	21
7	25	21	20	21	13	21
8	24	22	20	22	11	22
9	25	20	20	20	10	20
10	25	19	18	19	11	19
11	25	19	17	19	13	19
12	22	21	20	21	11	21
13	23	20	18	20	13	20
14	24	20	18	20	21	20
15	25	19	17	19	12	19
16	23	20	20	20	15	20
17	23	22	19	22	11	22
18	23	18	20	18	13	18
19	25	21	21	21	21	21
20	25	21	19	21	12	21
21	25	18	20	18	11	18
22	24	18	18	18	12	18
23	25	21	18	21	11	21
24	25	19	17	19	13	19
25	23	20	19	20	12	20
26	24	18	17	18	12	18
27	24	21	17	21	11	21
28	24	21	18	21	12	21
29	25	20	17	20	12	20
30	25	19	19	19	12	19

ANEXO N° 02

MUESTRA DE *ERYTHROXYLUM*



ANEXO N° 03

CERTIFICADO DE MUESTRA DE *ERYTHROXYLUM*



HERBARIO
PEDRO RUIZ GALLO

UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

CONSTANCIA

La directora del herbario PRG de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, que suscribe;

Hace constar:

Que, el alumno Bryan Alexis Cossio Alva, ha hecho llegar al herbario PRG 02 muestras botánicas, como parte de su tesis denominada **Efecto antibacteriano in vitro del extracto hidroetanolico Erythroxyllum coca "Coca" frente a Streptococcus mutans ATCC 35668**, las cuales ha sido identificada como *Erythroxyllum coca* Lam. Y registradas con el número de herbario 18026 PRG.

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado para los fines que estime conveniente.

Lambayeque 26 de setiembre del 2018

M.Sc. Josefa Escurra Puicon
Directora



ANEXO N° 04

SOLICITUD PARA ENACO



SOLICITUD

“Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional”

Yo, Cossio Alva Bryan Alexis con número de DNI 70616889, estudiante del X ciclo de odontología de la Universidad Señor de Sipán (Lambayeque), solicito a la empresa Nacional de Coca (ENACO) que se me brinde una muestra de Erythroxyllum Coca, para el adecuado desarrollo de mi tesis denominado “Efecto antibacteriano in vitro del extracto hidroetanólico de Erythroxyllum Coca frente a Streptococcus Mutans ATTC 35668”.

Por lo expuesto:

Pido a la empresa acceder a mi solicitud por ser de justicia.

Trujillo, 16 de julio de 2018

ANEXO N° 05

CERTIFICADO DE ENACO



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

EL ADMINISTRADOR DE LA AGENCIA TRUJILLO DE ENACO S.A.

CERTIFICA

Que, los 0.5 Kg. de hoja de coca, entregado al Sr. Cossio Alva Bryán Alexis para fines de investigación, corresponden, a la Familia Erythroxylaceae, Genero Erythroxylum, Especie Erythroxylum Coca, Variedad Novogranatense.

Se entrega el presente documento para determinar el origen de la muestra de hoja de coca que se utilizara en la ejecución de la Tesis denominada "EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO HIDROETANÓLICO DE ERYTHROXYLUM COCA "COCA" FRENTE A STREPTOCOCCUS MUTANS ATCC 35668".

Se expide en la ciudad de Trujillo a los (16) días del mes de julio del año dos mil dieciocho.

Atentamente,


EMPRESA NACIONAL DE LA COCA
ENACO S.A.
Ing. Francisco Cárdenas López
ADMINISTRADOR DE AG. TRUJILLO

ANEXO N° 06

SOLICITUD DE PERMISO
LABORATORIO



SOLICITUD DE PERMISO

Señor:

Jorge Luis Leiva Piedra

Yo Carla Ana Bujon Con DNI N° 70616889

Email Bujonessa@hotmail.com Teléfono 920080325

Me dirijo a usted en condición de alumna(o) de la escuela de estomatología del X ciclo, con el fin de solicitarle permiso para el uso del parque tecnológico del vicerrectorado de investigación, por el motivo de realizar mi estudio de investigación que tiene como título

"Efecto antibacteriano in vitro del extracto proteolítico de *Cyathium "Coco"* frente a *Streptococcus mutans* ATCC 35668"

Chiclayo, 15 de junio del 2018


Firma del solicitante


Firma del ingeniero


ANEXO N° 07

CERTIFICADO *STREPTOCOCCUS MUTANS* ATCC 35668



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Streptococcus mutans Catalog Number: 0969 Lot Number: 969-49** Reference Number: ATCC® 35668™* Purity: Pure Passage from Reference: 3	Expiration Date: 2019/9/30 Release Information: Quality Control Technologist: Kieshia L. Negen Release Date: 2017/12/6
---	---

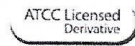
Performance	
Macroscopic Features: Small, circular, white to translucent. Microscopic Features: Gram positive cocci in medium or long chains.	Medium: SBAP Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): negative  Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE

**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.



ANEXO N° 08

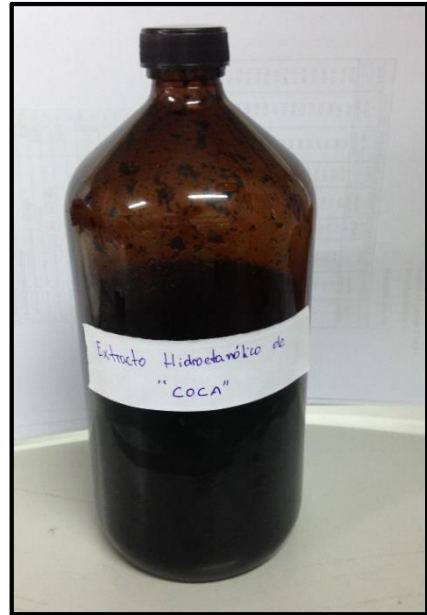
Obtención del extracto hidroetanólico de *Erythroxylum Coca*



Fuente: Cossio B

25/09/2018

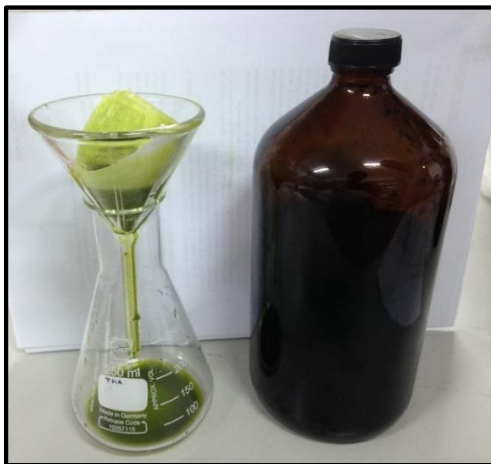
1
Trituración de la hoja 300 g
Erythroxylum Coca



Fuente: Cossio B

25/09/2018

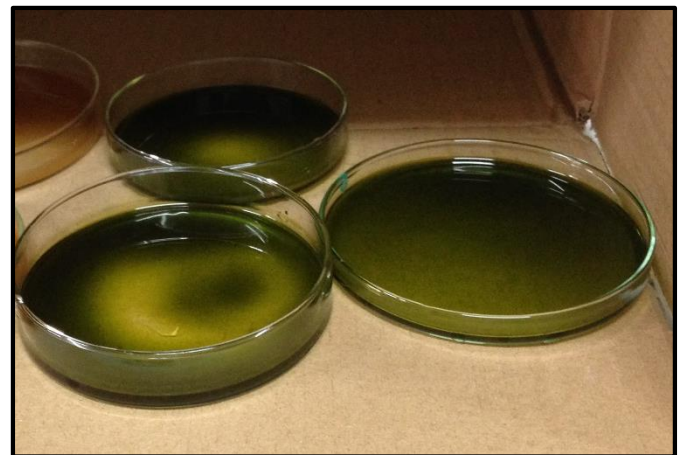
2
Macerado hidroetanólico 600 ml
Erythroxylum Coca



Fuente: Cossio B

02/10/2018

3
Filtrado
Erythroxylum Coca



Fuente: Cossio B

02/10/2018

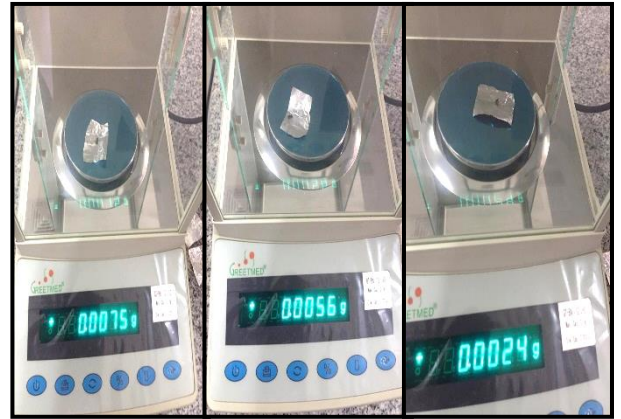
4
Proceso de secado
Erythroxylum Coca



Fuente: Cossio B 02/10/2018



Fuente: Cossio B 02/10/2018



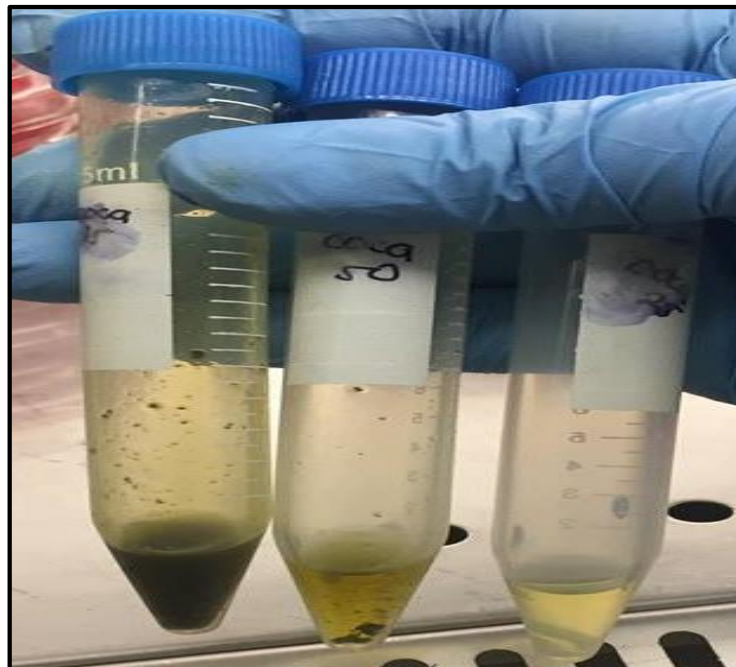
Fuente: Cossio B

05/10/2018

5
Secado
Erythroxylum Coca

6
Extracto (2,12 g)
Erythroxylum Coca

7
**Extracto pesado antes de
realizar la dilución**

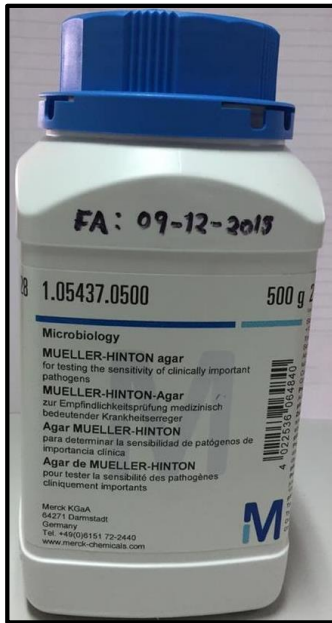


Fuente: Cossio B

05/10/2018

8
Obtención de las concentraciones de
Erythroxylum Coca

ANEXO N° 09



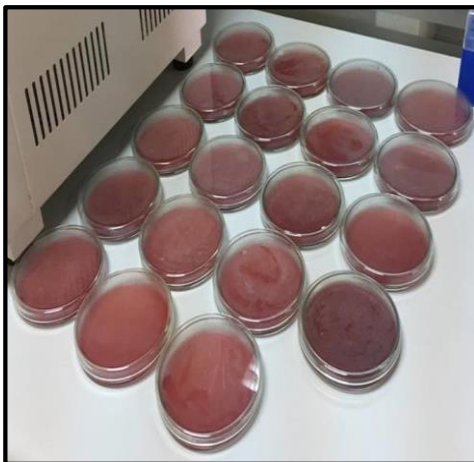
Fuente: Cossio B 05/10/2018

Agar base Mueller Hinton



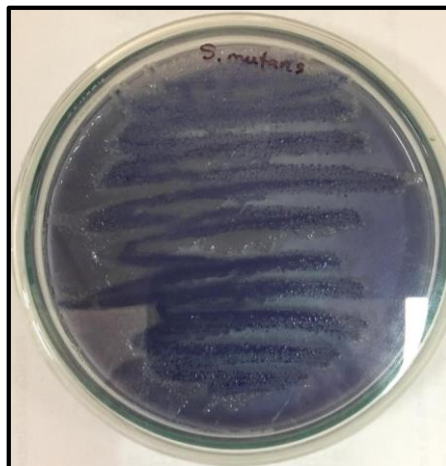
Fuente: Cossio B 05/10/2018

Pesado de Agar base Muller Hinton



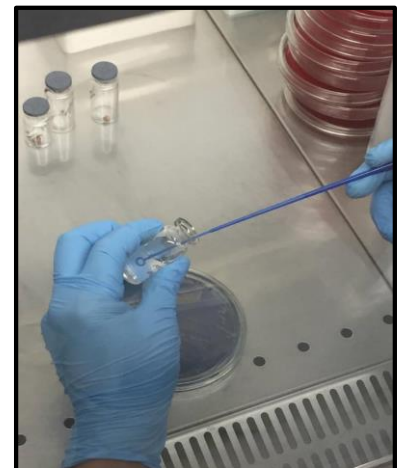
Fuente: Cossio B 05/10/2018

Placas Petri con Agar sangre, un total de 40 placas



Fuente: Cossio B 05/10/2018

Cepa de *S. mutans* reactivada en Agar Mitis Salivarius



Fuente: Cossio B 05/10/2018

Dilución de colonias en suero fisiológico



Fuente: Cossio B

05/10/2018

**Sembrado del inóculo en
placas con Agar sangre**



Fuente: Cossio B

05/10/2018

**Colocación de los discos en la
superficie del agar sangre**



Fuente: Cossio B

05/10/2018

**Aplicación del extracto en los
discos según las concentraciones
(75%,50%,25%)**

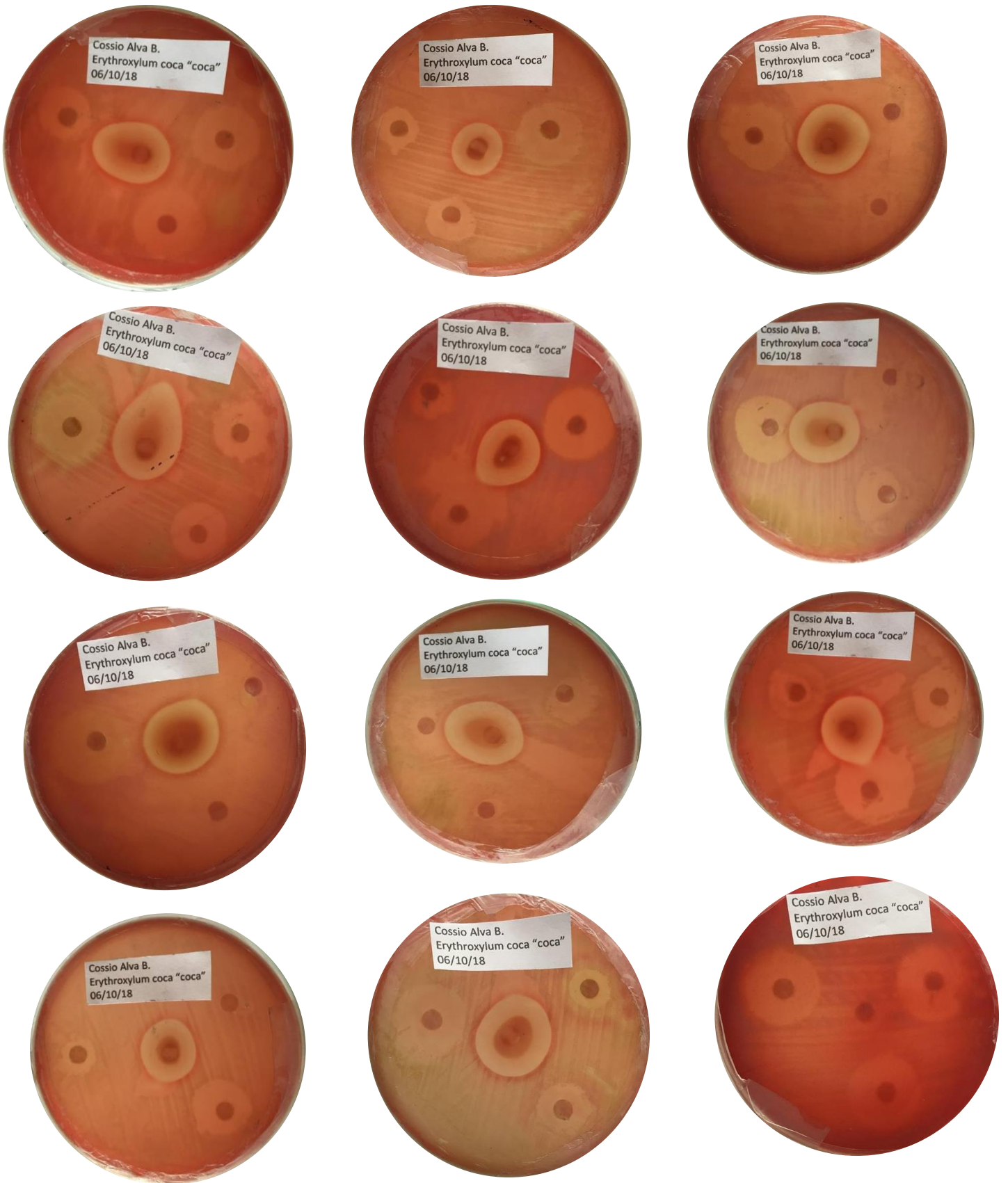


Fuente: Cossio B

05/10/2018

**Placas llevadas a incubación
durante 24 horas a 36 °C**

ANEXO N° 10



Fuente: Cossio B

06/10/2018

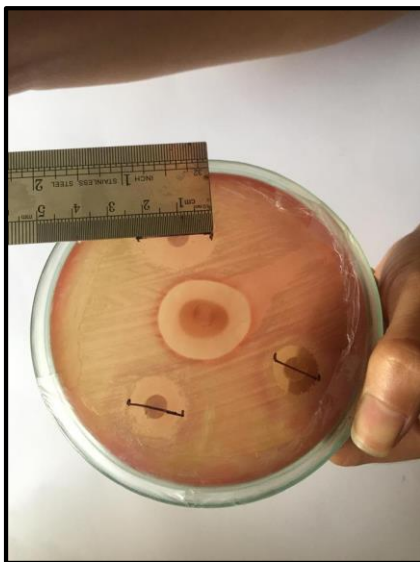
Halos de inhibición del efecto antibacteriano de *Erythroxyllum Coca*



Fuente: Cossio B

06/10/2018

Halos de inhibición de los controles con Gluconato de Clorhexidina 12% y Suero fisiológico



Fuente: Cossio B

06/10/2018



Fuente: Cossio B

06/10/2018

Medición de los halos de inhibición con regla milimetrada