



**UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO**

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA PROFESIONAL DE ESTOMATOLOGÍA

Efecto antibacteriano *in vitro* del extracto hidroetanólico de  
*Erythroxylum coca* (coca) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:  
Cirujano Dentista

**AUTORES:**

Delgado Pacco, Cleofé (ORCID: 0000-0001-8426-9047)

Quispe Ccanchi, Kenneth (ORCID: 0000-0002-5343-6946)

**ASESORA:**

Mg. Ibáñez Sevilla, Carmen Teresa (ORCID: 0000-0002-5551-1428)

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:**

Enfermedades infecciosas y transmisibles

PIURA – PERÚ

2021

## **Dedicatoria**

A Dios por su bendición, por guiarme, protegerme y permitir cumplir esta meta.

A mi hermano Hernán, por su amor y paciencia. Por creer en mí y ser mi soporte incondicional, por apoyarme siempre en los buenos y malos momentos.

A mis padres, por inculcarme los buenos valores para seguir adelante y a todos mis hermanos a quienes amo y respeto.

A toda mi familia y amigos por estar a mi lado cuando más los necesité y cuyo apoyo emocional fue fundamental.

**Cleo Delgado**

A Dios por permitirme culminar esta etapa tan importante de mi vida.

A mis padres, en especial a mi papá quién es mi mayor ejemplo y me impulsó a seguir estudiando.

A mi hija *Thaiz Valeria*, por darme las fuerzas para alcanzar mis metas.

A mi pareja, por su amor, paciencia y apoyo incondicional.

A mis hermanos, que siempre estuvieron para ayudarme y a mis amigas *Hasly* y *Cleo* por su apoyo incondicional siempre.

**Kenneth Quispe**

## **Agradecimiento**

A mi hermano *Hernán*, por su amor. Gracias por apoyarme en los momentos más difíciles de mi vida y por siempre estar a mi lado. Con tu esfuerzo ahora seré una gran profesional y el orgullo tanto tuyo como el de toda la familia y de nuestros padres *Margarita* y *Rafael*.

A Dios, por siempre protegerme y darme fuerzas para superar obstáculos y dificultades a lo largo de toda mi vida.

A la Universidad César Vallejo por la oportunidad de ser parte de esta casa de estudios.

A mi asesora Mg. Carmen Ibáñez por su constante apoyo durante el proceso de la investigación.

A mi asesor especialista Mg. Miguel por su apoyo en la parte procedimental.

### ***Cleo Delgado***

A toda mi familia, por estar siempre junto a mí, brindándome su apoyo incondicional su cariño para enfrentar cada etapa de mi vida, sin ellos no hubiese sido posible alcanzar mis objetivos y sueños.

De manera muy especial a nuestra asesora Mg. Carmen Ibáñez, por su paciencia, guía, y sus importantes aportes para la culminación de esta investigación.

A todos mis verdaderos amigos, por haber compartido conmigo inolvidables momentos en la etapa universitaria.

### ***Kenneth Quispe***

## Índice de contenidos

Dedicatoria .....	ii
Agradecimiento .....	iii
Índice de contenidos .....	iv
Índice de tablas .....	vi
Resumen.....	vii
Abstract.....	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	9
II. MARCO TEÓRICO.....	12
III. METODOLOGÍA.....	21
3.1. Tipo y diseño de investigación.....	21
3.2. Variables y operacionalización .....	21
3.3. Población (criterios de selección), muestra, muestreo, unidad de análisis.....	21
3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos .....	22
3.5. Procedimientos .....	22
3.6. Método de análisis de datos .....	25
3.7. Aspectos éticos.....	25
IV. RESULTADOS .....	26
V. DISCUSIÓN.....	29
VI. CONCLUSIONES.....	33
VII. RECOMENDACIONES .....	34
REFERENCIAS.....	35
ANEXOS .....	43
ANEXO 1 .....	43
ANEXO 2 .....	44
ANEXO 3 .....	45

ANEXO 4 .....	46
ANEXO 5 .....	47
ANEXO 6 .....	48
ANEXO 7 .....	53

## Índice de tablas

Tabla 1.....	26
Tabla 2.....	27
Tabla 3.....	28

## Resumen

Su objetivo fue evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* de diferentes concentraciones del extracto hidroetanólico de *Erythroxylum coca* (coca) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Corresponde a una investigación básica, experimental *in vitro*. El extracto se obtuvo mediante maceración con agitación en mezcla hidroetanólica. Se evaluaron 5 concentraciones en mg/mL del extracto hidroetanólico, un control positivo clorhexidina 0,12% y un control negativo dimetilsulfóxido 1%. El efecto antibacteriano fue determinado por el método de difusión en disco. La concentración mínima inhibitoria y bactericida (CMI y CMB) por el método de microdilución. Se reportó que la concentración de 5 mg/mL formó un halo de inhibición de  $16,37 \pm 0,485$  mm; la de 10 mg/mL un halo de  $18,45 \pm 0,384$  mm; la de 15 mg/mL un halo de  $20,13 \pm 0,245$  mm; la de 20 mg/mL un halo de  $22,62 \pm 0,312$  mm y la de 25 mg/mL un halo de  $24,22 \pm 0,365$  mm. El control positivo un halo de  $14,55 \pm 0,896$  mm. La CMI y la CMB fue 5 mg/mL. Se concluye que el extracto hidroetanólico de *E. coca* (coca) presenta efecto antibacteriano sobre *S. mutans* ATCC 25175 en todas las concentraciones evaluadas superando al control gluconato de clorhexidina 0,12%.

**Palabras clave:** Antibacterianos, coca, *Streptococcus mutans*, Extractos vegetales.

## Abstract

Its objective was to evaluate the antibacterial effect in vitro of different concentrations of the hydroethanolic extract of *Erythroxylum coca* (coca) on *Streptococcus mutans* ATCC 25175. It corresponds to a basic, experimental in vitro investigation. The extract was obtained by maceration with stirring in a hydroethanolic mixture. 5 concentrations in mg / mL of the hydroethanolic extract, a 0.12% chlorhexidine positive control and a 1% dimethylsulfoxide negative control were evaluated. The antibacterial effect was determined by the disk diffusion method. The minimum inhibitory and bactericidal concentration (MIC and CMB) by the microdilution method. It was reported that the concentration of 5 mg/mL formed an inhibition halo of  $16.37 \pm 0.485$  mm; that of 10 mg/mL a halo of  $18.45 \pm 0.384$  mm; that of 15 mg/mL a halo of  $20.13 \pm 0.245$  mm; the 20 mg/mL halo had  $22.62 \pm 0.312$  mm and the 25 mg / mL halo had  $24.22 \pm 0.365$  mm. The positive control had a halo of  $14.55 \pm 0.896$  mm. The MIC and WBC was 5 mg/mL. It is concluded that the hydroethanolic extract of *E. coca* (coca) has an antibacterial effect on *S. mutans* ATCC 25175 in all the concentrations evaluated, exceeding 0.12% chlorhexidine gluconate control.

**Keywords:** Antibacterials, coca, *Streptococcus mutans*, Plant extracts.



## I. INTRODUCCIÓN

Desde el enfoque de la salud pública, las patologías orales son las más prevalentes con grandes consecuencias sociales y económicas en diversos países a nivel mundial.<sup>1</sup> Según el Global Burden of Disease Study 2017 la caries dental es el trastorno de salud más frecuente.<sup>2</sup> Desde el año 1960 diversos estudios establecieron que *Streptococcus mutans* es el principal agente etiológico de la caries dental.<sup>3,4</sup> Esta bacteria se transmite de padres a hijos a través de la saliva durante la alimentación.<sup>5</sup> Sus factores de virulencia la definen como un agente patógeno, sin embargo, está presente minoritariamente en superficies dentales sanas.<sup>6</sup> Es considerada cariogénica debido a su capacidad de sintetizar grandes cantidades de polisacáridos extracelulares a partir de la sacarosa, su potencial acidogénico y acidúrico para metabolizar gran cantidad de carbohidratos a ácidos orgánicos y persistir en un ambiente ácido y tolerar el oxígeno.<sup>5,7,8</sup>

Si bien, los avances tecnológicos actuales han permitido conocer que *S. mutans* no es el único responsable del desarrollo de la caries dental, también han corroborado fehacientemente el importante papel que desempeña en la alteración de la homeostasis de los microambientes orales, formando un medio rico en polisacáridos extracelulares y de pH bajo. Condiciones favorables y necesarias para el progreso de otras especies acidogénicas y acidúricas involucradas en el progreso de la caries dental.<sup>9,10</sup> De allí que la reducción de este microorganismo en la cavidad bucal siga siendo uno de los objetivos principales de la investigación dirigida a prevenir o curar esta patología.<sup>11</sup>

En ese sentido, la medicina tradicional y complementaria es una parte importante y comúnmente subestimada de los sistemas de salud. Es utilizada en diversos países del mundo para el restablecimiento de la salud, prevenir y tratar enfermedades y debido a los efectos contrarios reportados por los fármacos sintéticos<sup>12</sup> su demanda y aceptación se ha incrementado. Para muchas personas, la fitoterapia representa la principal o única fuente de atención sanitaria. La fitoterapia de calidad, segura y eficaz contribuyen a restablecer la salud de la población, por ello la Organización Mundial de la Salud (OMS) alienta la investigación y uso seguro de plantas medicinales.<sup>13</sup>

Los actuales tratamientos utilizados contra la caries dental, se caracterizan por tener efectos colaterales y propiciar el desarrollo de resistencia a los fármacos. Por lo tanto, se necesita con urgencia el desarrollo de compuestos alternativos eficaces contra las bacterias cariogénicas.<sup>14</sup> En los últimos años se han estudiado un mayor número de productos derivados de plantas, con actividad antimicrobiana frente a distintos microorganismos incluido *S. mutans*.<sup>15</sup> Actualmente y por recomendación de la OMS, las plantas medicinales son consideradas como una alternativa de solución para contrarrestar a las enfermedades infecciosas que afectan a la población debido a que contienen una serie de compuestos bioactivos como alcaloides, taninos, aceites esenciales y flavonoides que son reconocidos por su potencial antimicrobiano.<sup>16</sup>

*Erythroxylum coca* (coca) es una planta medicinal propia de América del Sur, adaptada y cultivada en territorio peruano. Diversas investigaciones destacan sus capacidades farmacológicas y potencial antimicrobiano a nivel clínico y estomatológico.<sup>17-21</sup> Sin embargo, debido a los efectos negativos de la cocaína, uno de los principales compuestos bioactivos de la coca, esta planta es incomprendida y muchas veces difamada, restándole la importancia y beneficios otorgados por sus otros metabolitos secundarios.<sup>19</sup>

En este contexto y analizada la realidad problemática se propone la siguiente interrogante; ¿Cuál es el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto hidroetanólico de *Erythroxylum coca* (coca) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175?

Justifica esta investigación teóricamente pues a pesar que se han realizado diversas investigaciones con la planta *E. coca*, la mayoría estuvieron dirigidas a demostrar propiedades diferentes a la antimicrobiana, y pocos estudios han evaluado su potencial antibacteriano sobre bacterias cariogénicas, por lo que dichas investigaciones no son concluyentes y aún existen vacíos del conocimiento que pretendemos llenar con los resultados de esta investigación. Este estudio también tiene justificación práctica, pues si se comprueba su capacidad antibacteriana sobre microorganismos orales potencialmente patógenos, se estaría contribuyendo a revalorar otras propiedades de esta planta y se generaría el contexto teórico para la fabricación de productos orales con principios activos de la coca orientados al mantenimiento de la higiene oral y control microbiano.

Esta investigación presenta justificación social pues el revalorar otras propiedades de la planta ayudaría a eliminar el desprestigio y prejuicios del que está llena debido al estigma de la cocaína. Su justificación por conveniencia radica en que esta investigación se realiza con la finalidad de obtener el título profesional de Cirujano Dentista en la Universidad César Vallejo previa sustentación y aprobación frente a un jurado calificador.

Por ello, para responder el problema planteado se propone el siguiente objetivo general; evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* de diferentes concentraciones del extracto hidroetanólico de *Erythroxylum coca* (coca) y de un control clorhexidina 0,12% sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. El cual se fundamentó en los siguientes objetivos específicos; Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto hidroetanólico de *Erythroxylum coca* (coca) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Determinar la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto hidroetanólico de *Erythroxylum coca* (coca) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Como respuesta a priori al problema se plantea la siguiente hipótesis: A mayor concentración del extracto hidroetanólico de *Erythroxylum coca* (coca) mayor efecto antibacteriano sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

## II. MARCO TEÓRICO

Barbosa, et al<sup>22</sup> (2021) en Brasil, evaluaron el efecto antibacteriano de combinaciones híbridas de extracto etanólico (EREE) o fracción enriquecida en alcaloides (ERAF) obtenida de hojas de *Erythroxylum revolutum* y antibióticos convencionales. Fue una investigación experimental. La actividad antibacteriana se evaluó contra cepas estándar de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Los resultados mostraron que la concentración mínima inhibitoria (CIM) tanto de EREE y ERAF fue  $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ . Sin embargo, Se observó un efecto sinérgico total en las combinaciones híbridas ERAF + gentamicina, ERAF + norfloxacin y ERAF + eritromicina contra *S. aureus* con una reducción significativa de la CMI del 84,7%, 75,0% y 89,85%, respectivamente. Concluyeron que los datos resaltan la primera evidencia de fracciones de alcaloides de *E. revolutum* en combinaciones híbridas con antibióticos, y que propone al alcaloide de tropano como nuevo candidato potencial en combinación con antibióticos para el tratamiento de infecciones causadas por *S. aureus*.

Peretti, et al<sup>23</sup> (2021) en Brasil, determinaron el rendimiento extractivo, el contenido de espilantol y las actividades bactericida y antibiofilm de extractos acuosos e hidroetanólicos de dos variaciones regionales de *Acmella oleracea* contra *Streptococcus mutans*. Fue una investigación experimental in vitro. Los extractos hidroetanólicos se obtuvieron a partir de hojas y tallos. La concentración mínima inhibitoria (CIM) y la concentración mínima bactericida (CMB) se determinó por microdilución. Los extractos de hojas de la variación de Pará y el tallo de la variación de Amapá presentaron el mayor contenido de espilantol y fueron seleccionados para los ensayos antimicrobianos. Los resultados reportaron que la MIC y la MBC fue  $125 \mu\text{g/mL}$  contra *S. mutans* en ambos extractos. En el ensayo antibiofilm, el extracto etanólico de la variante de Pará a  $500 \mu\text{g/mL}$  presentó una inhibición del 50,89% tras una sola aplicación, similar a la inhibición generada por la clorhexidina al 0,12%. Concluyeron que los extractos de *A. oleracea* son ricos en espilantol y muestran una notable actividad antibacteriana contra *S. mutans* y podrían convertirse en un coadyuvante asequible utilizado en productos dentales para prevenir y controlar la caries dental.

De Carvalho, et al<sup>24</sup> (2021) en Brasil, analizaron los efectos antimicrobianos del extracto hidroalcohólico liofilizado y nanopartículas de plata de semilla y flor de *S. cumini*. Fue una investigación experimental *in vitro*. El cribado fitoquímico se realizó mediante Cromatografía de gases - espectrometría de masas. Las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos se analizaron mediante métodos de microdilución en caldo y difusión en agar sobre cepas ATCC de *A. naeslundii*, *F. nucleatum*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. mutans*, *S. oralis*, *V. dispar* y *C. albicans*. Reportaron que todas las especies microbianas estudiadas fueron susceptibles a los extractos de plantas y a las nanopartículas de los extractos evaluados. El extracto hidroalcohólico de semilla generó la mayor zona de inhibición sobre *F. nucleatum* con 18 mm, seguido de *V. dispar* con 15 mm y *A. naeslundii* y *S. mutans* con 13 mm. El extracto hidroalcohólico de la flor formó zonas de inhibición de 15 mm sobre *V. dispar* Seguido de *A. naeslundii* con 14 mm y *S. aureus* con 12 mm. La CIM y la CMB para *S. mutans* fue de 1.296,8 µg/mL y 2.593,7 µg/mL respectivamente. Concluyeron que los extractos de semilla y flor de *S. cumini* tienen acción antimicrobiana contra patógenos de interés médico y dental.

Asma, et al<sup>25</sup> (2021) en Argelia, evaluaron la actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos de *Salvadora persica* y *Juglans regia* contra cepas microbianas de la cavidad oral. Fue una investigación experimental. Se prepararon las concentraciones de 5, 10 y 15 mg/mL de cuatro extractos a base de éter de petróleo, cloroformo, acetato de etilo y metanol. La actividad antimicrobiana se determinó con el método de difusión en disco contra *S. saprophyticus*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. marcescens*, *S. salivarius*, *S. mutans* y *C. albicans*. Los resultados mostraron que los extractos de *J. regia* fueron más eficaces que los extractos de *S. persica*. La mayor inhibición se reportó sobre *S. mutans* con una media de inhibición de 10,29 mm, seguido de *S. salivarius* con 9,75 mm, *C. albicans* con 6,45 mm, *P. vulgaris* con 5,75 mm, *S. aureus* con 5,62 mm, *S. marcescens* con 5,58 mm, *P. aeruginosa* con 4,87 mm y *S. saprophyticus* con 3,08 mm. Concluyeron que *J. regia* tuvo mayor eficacia antimicrobiana que *S. persica* y que esta eficacia pudo estar correlacionada con el alto contenido de taninos y compuestos fenólicos en los extractos de *J. regia*. Se demostró que *S. mutans* fue la bacteria más sensible a todos los extractos de las dos plantas analizadas.

Loyola, et al<sup>21</sup> (2020) en Perú, compararon *in vitro* la actividad antibacteriana de un extracto etanólico de *Erythroxylum coca* Lam y *Schinus molle* L. frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Fue una investigación experimental. El extracto etanólico se obtuvo a partir de hojas de coca y molle a través del método de filtración al vacío. Se evaluaron dos concentraciones de 50% y 75% y se comparó con clorhexidina al 0,12% utilizado como control positivo. La capacidad antibacteriana se determinó por el método de difusión en disco. Reportaron halos de inhibición de  $11,2 \pm 0,7$  mm;  $11,6 \pm 0,5$  mm y  $11,3 \pm 0,7$  mm;  $11,8 \pm 0,5$  mm con la mayor concentración de ambos extractos sobre *S. mutans* respectivamente; sin embargo, no superaron el efecto del control positivo. Concluyeron que los extractos etanólicos de coca y molle a concentraciones de 50% y 75% presentan actividad antibacteriana frente a *S. mutans* ATCC 25175.

Schovelin, et al<sup>26</sup> (2018) en Chile, evaluaron el efecto antibacteriano del extracto acuoso de *Origanum vulgare* a diferentes concentraciones sobre el crecimiento *in vitro* de *Streptococcus mutans*. Fue una investigación experimental. El efecto antibacteriano fue determinado mediante la medición de halos de inhibición por una variante del método de difusión en disco que es el método del pozo de agar. Los resultados no mostraron halos de inhibición con las concentraciones de 1, 5 y 10 %; mientras que las concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 % formaron halos de inhibición promedios de 14.3, 18.1, 19.8, 22.6 y 25.8 mm respectivamente. La clorhexidina 0,12% utilizado como control positivo formó un halo de inhibición promedio de 14,8 mm. Concluyeron que el efecto antibacteriano es directamente proporcional a la concentración del extracto acuoso. Además, *O. vulgare* podría ser utilizado como una alternativa de colutorio, pasta dental u otros coadyuvantes de higiene bucal para prevenir la aparición de caries.

Gamarra, et al<sup>27</sup> (2017) en Perú, realizaron el screening fitoquímico y determinaron la actividad antioxidante y antibacteriana de los flavonoides y alcaloides aislados de extractos etanólicos de hojas de *Erythroxylum coca* y *Erythroxylum novogranatense*. Fue una investigación experimental *in vitro*. La actividad antibacteriana se determinó mediante el método de difusión en agar sobre *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *E. coli*. Reportaron que el extracto crudo (1 g/mL) y los flavonoides totales de (0,5 g/mL) de *E. coca* formaron halos de

inhibición de 23 y 21 mm sobre *S. aureus*), de 33 y 26 mm sobre *S. epidermidis*, de 18 y 20 mm sobre *E. coli* y de 23 y 28 mm sobre *P. aeruginosa* respectivamente; por su parte los extractos y flavonoides de *E. novogranatense* formó halos de inhibición de 22 y 23 mm sobre *S. aureus*, de 28 y 35 mm sobre *S. epidermidis*, de 24 y 20 mm sobre *E. coli* y de 19 y 20 mm sobre *P. aeruginosa* respectivamente. Concluyeron que en ambas especies se identificaron alcaloides, flavonoides, fenoles y carbohidratos. El extracto de *E. coca* mostró mayor actividad antibacteriana frente a *S. aureus*, *S. epidermidis* y *E. coli*.

Enciso, et al<sup>28</sup> (2017) en Perú, determinó la actividad antibacteriana del extracto de hoja de coca (*Erythroxylum coca*), sobre bacilos negro pigmentados (BNP). Fue una investigación experimental. La actividad antibacteriana fue determinada mediante el Test de Difusión en Agar y el método de Dilución. Las cepas de BNP fueron aisladas a partir de bolsas periodontales de pacientes con enfermedad periodontal. El extracto hidroalcohólico de hoja de coca fue proporcionado por la Empresa Nacional de la Coca (ENACO). Reportaron que los BNP solo presentan sensibilidad frente al extracto de *E. coca* (halos de inhibición de 9 -14 mm) en el 60% de los casos del extracto al 12,5% y 100% de concentración. La concentración mínima inhibitoria (CMI) a las concentraciones de 12,5%. Concluyeron que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *E. coca*, sí presenta actividad antibacteriana frente a BNP a las concentraciones de 100% y 12,5%.

Negrete, et al<sup>29</sup> (2015) en Bolivia, evaluaron la capacidad antibacteriana de la hoja de coca (*Erythroxylum coca*) frente a bacterias ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Fue una investigación experimental in vitro. Las hojas de *Erythroxylum coca* Lam provinieron de los departamentos de Cochabamba y La Paz. Los extractos se obtuvieron por maceración a partir de los solventes solución fisiológica, alcohol absoluto y cloroformo. La actividad antibacteriana de los extractos se obtuvo por el método de dilución sobre *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*. Reportaron actividad antibacteriana sobre *S. aureus*, pero no frente a *E. coli* y *P. aeruginosa* con los tres extractos utilizados. Concluyeron que los preparados alcohólicos de la hoja de *E. coca* presenta capacidad antibacteriana frente a bacterias grampositivas.

En ese sentido, muchas afecciones de la boca son reconocidas como problemas de salud pública por su prevalencia, gravedad, impacto individual y comunitario. Las enfermedades bucodentales se encuentran entre las enfermedades más prevalentes a nivel mundial y tienen graves cargas sanitarias y económicas, lo que reduce en gran medida la calidad de vida de los afectados.<sup>30</sup> Aunque las enfermedades bucodentales se pueden prevenir, en gran medida, persisten con una alta prevalencia, lo que refleja las desigualdades sociales y económicas generalizadas y la financiación inadecuada para la prevención y el tratamiento, especialmente en los países en vías de desarrollo. Como sucede con la mayoría de las enfermedades no transmisibles, las afecciones bucales son crónicas y tienen un marcado patrón social. Estas patologías afectan todos los grupos etarios de bajos recursos y con un acceso deficiente a la atención dental. En muchos países pobres, las enfermedades bucodentales siguen sin tratarse en gran medida porque los costos del tratamiento superan los recursos disponibles. Las consecuencias personales de las enfermedades bucales crónicas no tratadas suelen ser graves y afectan tanto al individuo como a su entorno familiar. El tratamiento de las enfermedades dentales es muy caro en todos los países por ello hacer frente a las condiciones adversas de la salud bucodental requiere una acción coordinada por parte de la sociedad, los sistemas de salud y el profesional odontológico.<sup>31-34</sup>

La caries dental es una enfermedad dinámica multifactorial, mediada por biopelículas, promovida por la sacarosa que da como resultado la desmineralización progresiva de los tejidos duros dentales. Esta enfermedad puede ocurrir durante toda la vida, tanto en la dentición temporal como en la permanente, dañando la corona del diente y, posteriormente, las superficies radiculares expuestas.<sup>35</sup> La caries dental no tratada es considerada la patología más prevalente a nivel mundial (el 50% de los niños en todo el mundo la padecen) y su asociación con otras enfermedades sistémicas y la carga global de morbilidad ya ha sido establecida.<sup>30,31</sup> Si no se trata a tiempo, puede afectar no solo la función de masticación sino también el habla, la sonrisa y el entorno psicosocial y la calidad de vida de los individuos y de la familia.<sup>36</sup>

El equilibrio entre factores patológicos y protectores influye en el inicio y progresión de la caries.<sup>35</sup> La dinámica de las lesiones cariosas depende principalmente de la



presencia de carbohidratos fermentables, ausencia de oxígeno, otras condiciones ambientales, bacterias y factores asociados al huésped. Lo que se conoce actualmente de los microorganismos implicados en el inicio y progresión de la caries aun es incompleto. Las bacterias acidógenas, acidúricas y acidofílicas más importantes son *Streptococcus mutans*, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*. Se ha propuesto que *S. mutans* es iniciador del proceso cariogénico mientras que los otros géneros están involucrados en el progreso de la enfermedad.<sup>37</sup>

Se ha establecido que aproximadamente 700 especies comprenden el componente bacteriano del microbioma oral. La caries dental está mediada por el microbioma oral y los sustratos provenientes de la dieta. La transición de la salud a la patología de la caries no es causada por la introducción de patógenos exógenos, sino por cambios en la estructura de la comunidad microbiana existente a nivel oral, es decir, el paso de un estado eubiótico a un estado disbiótico en el individuo. La evidencia actual propone que el microbioma humano realiza diversas funciones que son beneficiosas para el individuo. Se ha propuesto que una función principal de los microorganismos residentes es actuar como barrera física y bioquímica para prevenir la colonización de organismos exógenos.<sup>38</sup>

La especie *S. mutans* está fuertemente correlacionada con la caries dental. Esta bacteria fermenta fácilmente la sacarosa y otros carbohidratos para sintetizar energía y ácido láctico como producto de desecho. Por tanto, la acumulación de lactato es responsable de la acidificación local del entorno de caries. En consecuencia, el desarrollo de la caries está marcado por un cambio en la composición de la comunidad supragingival de una que promueve la salud a una que promueve la enfermedad. Esta alteración de la homeostasis en la composición de la comunidad microbiana, es un fenómeno común de las enfermedades mediadas por microbiomas. Durante la exposición frecuente a carbohidratos fermentables, las regiones localizadas de pH bajo generadas por los productores de lactato seleccionan aún más los organismos acidúricos, lo que da como resultado un ciclo de retroalimentación positiva, que finalmente conduce a una desmineralización altamente localizada.<sup>38,39</sup>

La sacarosa dietética es especialmente cariogénica porque sus componentes azúcares de 6 carbonos, glucosa y fructosa, son utilizados por *S. mutans* para

sintetizar sustancias poliméricas extracelulares (EPS) en forma de glucanos y fructanos. La matriz de biopelícula extracelular, compuesta de EPS, glucoproteínas y ADN extracelular, proporciona sitios de unión para microbios incrustados, protege contra la eliminación de biopelícula durante los procedimientos normales de higiene bucal y contribuye a la generación de regiones altamente localizadas de pH bajo al inhibir el intercambio de saliva. El EPS también tiene la capacidad de alterar la difusión y secuestrar antimicrobianos, lo que tiene implicaciones para la intervención terapéutica. Se ha observado que las exoenzimas de la glucosiltransferasa (Gtf) secretadas por *S. mutans* se unen a la superficie de las células de *Candida albicans* y funcionan para sintetizar más glucanos. De esta manera, las hifas de *C. albicans* actúan como andamios físicos importantes para el desarrollo de microcolonias de *S. mutans* y otros organismos que contribuyen al progreso de la caries dental.<sup>39-42</sup>

Si bien la caries es una enfermedad polimicrobiana, la orientación selectiva de *S. mutans* en las biopelículas dentales se considera un enfoque adecuado para su prevención. Esto se debe principalmente a que la síntesis de glucanos insolubles a partir de sacarosa por *S. mutans* es fundamental para la formación de una matriz de biopelícula estable que facilita la colonización bacteriana de la superficie del diente y, al mismo tiempo, sirve como barrera de difusión ayudando a mantener la acidez para el progreso de otras bacterias cariogénicas. Una de las líneas de pensamiento actuales en la prevención de la caries dental es que puede ser posible detener el desarrollo de biopelículas cariogénicas dirigiéndose selectivamente a *S. mutans* de manera que el microbioma oral asociado con la salud no se vea afectado.<sup>41,42</sup>

Durante las últimas décadas diversos productos químicos han demostrado ser eficaces contra *S. mutans* y prevenir la caries dental, sin embargo, conforme ha pasado el tiempo y su uso se generalizó también se han ido reportando efectos adversos en el microbioma oral y en los usuarios. Entre los agentes antimicrobianos desarrollados para atacar las bacterias orales que causan enfermedades orales, destacan el fluoruro, la clorhexidina y las sales de amonio cuaternario. El fluoruro es el anión más simple del flúor, pero es uno de los agentes de prevención de caries de mayor éxito, especialmente para prevenir la caries dental. Sin embargo, la

fluorosis dental y esquelética, así como el desarrollo de bacterias orales resistentes al fluoruro, ha llevado a reconsiderar la administración de fluoruro. Por otro lado, la clorhexidina es una polibisguanida catiónica que fue uno de los primeros agentes antisépticos propuestos para la caries dental y ha demostrado ser el más eficaz. Hasta la fecha, la clorhexidina sigue siendo el "estándar de oro" de los agentes antiplaca.<sup>43</sup> La clorhexidina es activa contra bacterias grampositivas y gramnegativas, anaerobios facultativos, aerobios y levaduras al dañar la membrana citoplasmática interna. Pero su uso constante ha demostrado que puede causar genotoxicidad al inducir daño al ADN en leucocitos, células renales y células de la mucosa oral, también puede inducir la apoptosis celular, pigmentación dental y alteración de la percepción de los sabores. Las sales de amonio cuaternario se utilizan ampliamente como agentes antimicrobianos. Desde 1970 en adelante se han incorporado en enjuagues bucales para inhibir la placa oral. A consecuencia de su uso se han reportado efectos secundarios que incluyen síntomas gastrointestinales, coma, convulsiones, hipotensión y muerte, además de resistencia bacteriana.<sup>41-44</sup>

Todos estos efectos colaterales, asociados al uso de productos químicos en el control de *S. mutans* y de la placa dental ha propiciado el surgimiento de nuevos enfoques prometedores para el desarrollo de nuevas estrategias anticaries que se dirigen específicamente a *S. mutans* dentro de los cuales encontramos el uso de productos de origen vegetal. Diversas plantas catalogadas como medicinales se vienen investigando en la búsqueda de alternativas saludables y seguras y sin los efectos adversos reportados por las sustancias sintéticas para controlar a esta bacteria.<sup>39,40</sup> En ese sentido, el género *Erythroxyllum* contiene especies utilizadas por los pueblos indígenas de América del Sur mucho antes de la domesticación de las plantas. Se pueden encontrar más de 200 especies diferentes de *Erythroxyllum* en América del Sur, el Caribe, África, India, Asia tropical y Oceanía. Las dos especies cultivadas en América del Sur son *E. coca* y *E. novogratense*, cada una con dos variaciones adaptadas a diferentes topografías, condiciones de suelo y clima. Las mejores condiciones se encuentran en los valles subtropicales de la vertiente andina del Amazonas.<sup>45</sup>

Aparte de fibras, aceites esenciales, minerales y vitaminas, las hojas de coca contienen hasta 15 tipos de alcaloides en cantidades variables. Debido al enfoque en la cocaína, ha habido poca investigación sobre las propiedades de los otros alcaloides de la hoja. De hecho, el uso de productos beneficiosos de esta planta con fines medicinales se está convirtiendo en el foco de varios países y grupos científicos. Además, con las capacidades cada vez mayores de los análisis químicos y genéticos, la especie *E. coca* se está sometiendo a nuevos estudios que identifican su potencial para el desarrollo futuro de medicamentos. Se ha propuesto que la amplia distribución del género *Erythroxylum* ha llevado a sus especies miembros a enfrentar diversos climas, tipos y nutrientes de suelos, plagas, lo que ha dado como resultado una amplia gama de adaptaciones que incluyen la síntesis de múltiples metabolitos con potencial biomédico.<sup>21</sup>

El valor potencial de la hoja de coca en la medicina contemporánea se hipotetiza con base tanto en los informes de la medicina tradicional como en el pequeño número de estudios que han logrado superar las limitaciones legales, las barreras logísticas y el estigma que rodea a esta planta. Sin embargo, se necesita más trabajo para explorar las moléculas y las interacciones detrás de los efectos fisiológicos observados. En ese sentido, Las culturas tradicionales andinas le atribuyen a la coca efectos dentales positivos, dentro de los que destacan el blanqueamiento dental, promover la recuperación de las encías, atenuar el dolor de dientes, curar diversas infecciones y lesiones orales. Algunos reportes resaltan su capacidad antibacteriana sobre los microorganismos periodontopatógenos y capacidad antiséptica general.<sup>46</sup>

### III. METODOLOGÍA

#### 3.1. Tipo y diseño de investigación

Investigación de tipo básica. Este tipo de investigación tiene como objetivo aumentar la generación de nuevo conocimiento científico, a través de estudios experimentales o teóricos que se realizan primordialmente para esclarecer los fundamentos de los fenómenos y hechos observables en la realidad.<sup>47</sup>

Investigación de diseño experimental puro. Es aquel diseño en la que las unidades de ensayo o los sujetos son asignados a los grupos experimentales al azar, se manipula la variable independiente y se intentan controlar las variables extrañas para investigar el efecto de una o más variables independientes sobre la variable dependiente.<sup>48</sup>

#### 3.2. Variables y operacionalización

Variable Independiente: Extracto hidroetanólico de *Erythroxylum coca* (coca). Variable cuantitativa. Se define conceptualmente como el producto total que contiene fitoquímicos obtenido a partir de la maceración en solvente orgánico polar del material vegetal seco de *E. coca* (Anexo 1).<sup>49</sup>

Variable dependiente: Efecto antibacteriano *in vitro* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Variable cuantitativa. Se define conceptualmente como la capacidad de una sustancia de inhibir el crecimiento de *S. mutans* ATCC 25175 de forma temporal o permanentemente en condiciones de laboratorio (Anexo 1).<sup>50</sup>

#### 3.3. Población (criterios de selección), muestra, muestreo, unidad de análisis

La población la constituyó la planta *Erythroxylum coca* (coca) y la cepa bacteriana de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. La muestra estuvo conformada por 5 concentraciones (5, 10, 15, 20, y 25 mg/mL) del extracto hidroetanólico de *E. coca* y la concentración del inóculo de *S. mutans* ATCC 25175 equivalente a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL.

En los estudios experimentales no existe el muestreo. Esta fase, es equivalente al cálculo del número de unidades de ensayo o repeticiones (Anexo 2). En ese sentido mediante el desarrollo de la fórmula para el cálculo de las repeticiones se estableció que las unidades de ensayo fueran 10 por cada grupo experimental<sup>51</sup> (Anexo 3). Se establecieron 7 grupos experimentales que corresponden a las 5 concentraciones del extracto, un grupo control positivo (clorhexidina 0,12%) y el grupo control negativo (Dimetilsulfóxido 1%). Realizados los cálculos respectivos se obtuvo que el número total de unidades de ensayo sea 70 de la siguiente manera: Grupo 1 (concentración de extracto 5 mg/mL); Grupo 2 (10 mg/mL); Grupo 3 (15 mg/mL); Grupo 4 (20 mg/mL); Grupo 5 (25 mg/mL); Grupo 6 (Clorhexidina 0,12% = control positivo); Grupo 7 (DMSO 1% = control negativo) (Anexo 2).

### **3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos**

La confiabilidad de los datos obtenidos se garantizó mediante la utilización de métodos y técnicas estandarizados por el *Clinical and Laboratory standard institute* (CLSI).<sup>52</sup> Se utilizó el método espectrofotométrico para la estandarización del inóculo bacteriano de *S. mutans* ATCC 25175. El método de siembra por dispersión en superficie fue empleado para la inoculación microbiana. El extracto hidroetanólico fue obtenido por maceración en agitación constante. El efecto antibacteriano fue determinado mediante el método de difusión en disco. La concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) se calcularon por el test de microdilución.<sup>52-56</sup> El procesamiento microbiológico fue realizado por un especialista en microbiología (Anexo 3-4).

### **3.5. Procedimientos**

#### **Obtención y certificación del material vegetal**

Las hojas de *Erythroxylum coca* (coca) fueron proporcionadas por La Empresa Nacional de la Coca (ENACO S.A) sede Cuzco quienes otorgaron también la certificación de identificación botánica (Anexo 5).

### **Obtención del extracto hidroetanólico y dosificación**

Las hojas de *E. coca* (coca) fueron transportadas al laboratorio de Investigación *Science Experiment* E.I.R.L. en la ciudad de Trujillo donde se realizó la clasificación y selección del material vegetal adecuado para la obtención del extracto. El material clasificado fue lavado con agua corriente, escurridas y secadas en estufa a 40 °C durante 48 horas. Después del secado se procedió a la molienda en molino artesanal y el material pulverizado se pesó en balanza analítica. Posteriormente se depositó en un matraz protegido de la luz con papel aluminio para la extracción hidroetanólica mediante maceración con agitación durante 72 h / 40 °C en agitador magnético con calefacción marca FOUR E'S Scientific modelo MI0102003. Después de este proceso se separó el sobrenadante y se filtró dos veces con papel de filtro Whatman N° 1 y N° 2. Al extracto filtrado se le secó a calor seco en estufa microbiológica a 38 °C durante 24 h. Las 5 concentraciones del extracto se prepararon a partir de la disolución del extracto seco total utilizando como solvente dimetilsulfóxido al 1 % (DMSO Sigma®) (Anexo 6).<sup>52-56</sup>

### **Obtención de la cepa de *S. mutans* ATCC 25175**

La bacteria liofilizada y certificada de *S. mutans* cepa ATCC 25175, fue adquirida de la empresa de GenLab del Perú S.A.C (Anexo 6).

### **Preparación de medios de cultivo y condiciones microbiológicas**

La cepa de *S. mutans* ATCC 25175 fue reactivada en caldo Mueller-Hinton (Merck®) y mantenida en fase logarítmica en Mitis Salivarius Agar (Liofilmchem®). Fue incubada en microaerofilia a 37 °C por 24 h. El medio de cultivo Mitis Salivarius Agar (Liofilmchem®) fue utilizado también para la determinación del efecto antibacteriano<sup>52-56</sup> (Anexo 6).

## **Obtención y estandarización del inóculo bacteriano**

El inóculo bacteriano se preparó a partir de *S. mutans* desarrollado en medio de cultivo sólido. Mediante espectrofotometría se logró estandarizar el inóculo en espectrofotómetro de luz visible marca Kytel® modelo KV-1200. La concentración del inóculo se estableció en  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL con una absorbancia de 0,09 a una longitud de onda de 625 nm (Anexo 6).<sup>52-56</sup>

## **Evaluación del efecto antibacteriano y determinación de la CMI y CMB**

### **Método Difusión en Disco**

El inóculo de *S. mutans* ATCC 25175 preparado y estandarizado previamente fue sembrado en las superficies de placas con Mitis Salivarius Agar (Liofilmchem®). Una vez inoculadas todas las placas se dejaron reposar durante 15 minutos e inmediatamente se colocaron los discos de sensibilidad con las concentraciones del extracto y los controles. Se sellaron las placas con cinta Parafilm y se incubaron en estufa microbiológica marca Kytel modelo HHA-12 a 37 °C durante 24 h (Anexo 6).<sup>52-56</sup>

### **Método de Microdilución**

Se utilizó una microplaca estéril de 96 pocillos con tapa. En los pocillos de la microplaca codificados con números del 1 al 7 se colocaron las concentraciones del extracto y los controles. Los pocillos codificados con letras de la A hasta la H fueron las repeticiones de los ensayos. Con ayuda de una micropipeta se agregó a cada pocillo 50 µL de las concentraciones de los extractos y 50 µL del inóculo bacteriano. El volumen final en cada pocillo fue de 100 µL. Las microplacas se incubaron a 37°C °C por 20 horas. Finalizada la incubación se tomó una alícuota de cada uno de los pocillos donde no se observó crecimiento microbiano y se inocularon placas con Mitis Salivarius Agar (Liofilmchem®) para la corroboración de la CMI y CMB (Anexo 6).<sup>52-56</sup>



### **Lectura de resultados.**

Los resultados en el método de discodifusión se reportaron mediante halo de inhibición en mm según concentración o sustancia evaluada. La medición de las zonas de inhibición se realizó con un vernier mecánico marca Starrett®. Estas mediciones se reportaron en mm según tratamiento  $\pm$  desviación estándar y registrados en la ficha de recolección de datos (Anexo 4). Se estableció que la CMI fue la concentración más baja en la que no se aprecia crecimiento bacteriano. La CMB se determinó mediante la ausencia de UFC en las placas con Mitis Salivarius Agar (Liofilmchem®) sembradas a partir de los pocillos donde no se observó crecimiento bacteriano (Anexo 6).<sup>52-56</sup>

### **3.6. Método de análisis de datos**

Los datos recabados se registraron en una ficha de recolección de datos (Anexo 4) y se tabularon en el programa Excel 2019. El análisis estadístico se realizó en SPSS v.26. Para establecer la normalidad de los datos se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se realizó análisis paramétrico de comparación de medias mediante ANOVA unidireccional y la significancia estadística se determinó por el test de comparaciones múltiples de Tukey con un nivel de confianza del 95% (Anexo 7).<sup>51</sup>

### **3.7. Aspectos éticos**

Se garantizó la ética en la investigación experimental mediante cumplimiento de las normas de bioseguridad, gestión, disposición y eliminación de residuos biocontaminados establecidas en el Manual de Bioseguridad y Gestión de residuos comunes y biocontaminados del laboratorio Science Experiment E.I.R.L.; del Ministerio de Salud (MINSA)<sup>57</sup> y de la Organización Mundial de la Salud (OMS).<sup>58</sup>

#### IV. RESULTADOS

Tabla 1. Evaluación del efecto antibacteriano *in vitro* de diferentes concentraciones del extracto hidroetanólico de *Erythroxylum coca* (coca) y de un control clorhexidina 0,12% sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Bacteria	Concentración	Halo de inhibición en mm				P**
		Media	D.E*	Mínimo	Máximo	
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	5 mg/mL	16,37	0,485	15,5	17,0	0,000
	10 mg/mL	18,45	0,384	18,0	19,0	
	15 mg/mL	20,13	0,245	19,8	20,5	
	20 mg/mL	22,62	0,312	22,0	23,0	
	25 mg/mL	24,22	0,365	23,4	24,6	
	DMSO 1%	0,00	0,000	0,00	0,0	
	CLX 0,12%	14,55	0,896	13,5	16,0	

Fuente: Base de datos

\*D. E= Desviación estándar.

\*\*  $p = \text{Sig.} = \text{Significancia (HSD Tukey}^a\text{)}$ .

DMSO= Dimetilsulfóxido

CLX= Gluconato de Clorhexidina

En la tabla 1 se muestran las medias de halos de inhibición formados por las 5 concentraciones del extracto hidroetanólico de *E. coca* (coca) un control positivo gluconato de clorhexidina 0,12% y un control negativo dimetilsulfóxido (DMSO) 1%. La concentración de 5 mg/mL del extracto formó un halo de inhibición promedio de  $16,37 \pm 0,485$  mm; la concentración de 10 mg/mL formó un halo de  $18,45 \pm 0,384$  mm; la concentración de 15 mg/mL un halo de  $20,13 \pm 0,245$  mm; la concentración de 20 mg/mL un halo de  $22,62 \pm 0,312$  mm y la concentración de 25 mg/mL un halo de inhibición promedio de  $24,22 \pm 0,365$  mm. El control positivo formó una zona de inhibición de  $14,55 \pm 0,896$  mm. No se reporta inhibición del control negativo. Existe diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre todos los tratamientos evaluados.

Tabla 2. Concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto hidroetanólico de *Erythroxylum coca* (coca) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

BACTERIA	CONCENTRACIÓN mg/mL / %						
	5	10	15	20	25	C-*	C+**
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	-	-	-	-	-	+++	-

**CMI**

Fuente: Base de datos

(+) = Presencia de crecimiento Bacteriano.

(-) = Ausencia de Crecimiento Bacteriano.

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria.

En la tabla 2 se reporta la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto hidroetanólico de *E. coca* (coca) sobre *S. mutans* ATCC 25175. No se observó crecimiento bacteriano aparente en ninguna de las concentraciones evaluadas. Por ello, al ser la concentración de 5 mg/mL la concentración más bajo donde no se observa crecimiento bacteriano se constituye en la concentración mínima inhibitoria (CMI).

Tabla 3. Concentración mínima bactericida (CMB) del extracto hidroetanólico de *Erythroxylum coca* (coca) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

BACTERIA	CONCENTRACIÓN mg/mL / %						
	5	10	15	20	25	C-*	C+**
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	-	-	-	-	-	+++	-
<b>CMB</b>							

Fuente: Base de datos

(+) = Presencia de crecimiento Bacteriano.

(-) = Ausencia de Crecimiento Bacteriano.

CMB: Concentración Mínima Bactericida.

En la tabla 3 se reporta la determinación de la concentración mínima inhibitoria bactericida (CMB) del extracto hidroetanólico de *E. coca* (coca) sobre *S. mutans* ATCC 25175. No se observó crecimiento bacteriano aparente en ninguna de las concentraciones evaluadas. Para la determinación de la CMB se sembró en Mitis salivarius agar una alícuota de cada uno de los pocillos correspondientes a las concentraciones del extracto evaluadas. Después del proceso de incubación no se observó crecimiento de UFC en las placas sembradas por lo que la concentración de 5 mg/mL también fue la CMB.

## V. DISCUSIÓN

En la presente investigación se evaluó el efecto antibacteriano in vitro del extracto hidroetanólico de *Erythroxylum coca* (coca) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Los resultados reportados mostraron que las cinco concentraciones del extracto evaluadas (5,10, 15, 20 y 25 mg/mL) fueron capaces de inhibir el desarrollo de esta bacteria cariogénica. Además, se pudo comprobar que el efecto antibacteriano es directamente proporcional a la concentración del extracto. Estableciéndose que a mayor concentración del extracto mayor inhibición bacteriana. Las zonas de inhibición formadas fueron de  $16,37 \pm 0,485$  mm para la concentración de 5 mg/mL, en el caso de la concentración 10 mg/mL el halo formado fue de  $18,45 \pm 0,384$  mm; mientras que para la concentración de 15 mg/mL se formó un halo promedio de  $20,13 \pm 0,245$  mm; la concentración de 20 mg/mL formó un halo de  $22,62 \pm 0,312$  mm y finalmente la concentración de 25 mg/mL un halo de inhibición promedio de  $24,22 \pm 0,365$  mm. El control positivo formó un halo de inhibición de  $14,55 \pm 0,896$  mm. La concentración mínima inhibitoria y bactericida (CMI y CMB) fue 5 mg/mL. Como se mencionó líneas arriba, solo existe una investigación en la ha evaluado el efecto antibacteriano del extracto de *Erythroxylum coca* sobre microorganismos orales. Pero debido a que es una investigación experimental, este tipo de investigación permite contrastar los resultados con especies vegetales del mismo género o la misma familia taxonómica.

En ese sentido, Barbosa, et al<sup>22</sup> evaluaron el efecto antibacteriano de combinaciones híbridas de extracto etanólico y fracción enriquecida en alcaloides obtenida de hojas de *Erythroxylum revolutum* y antibióticos convencionales. Establecieron que la concentración mínima inhibitoria (CIM) de ambas sustancias sobre *Staphylococcus aureus* fue  $\geq 1024$   $\mu\text{g/mL}$ . Estos resultados son similares a los reportados en esta investigación. Primero porque ambas especies de plantas pertenecen al mismo género vegetal, además las especies bacterianas evaluadas presentan no solo la misma reacción a la tinción de gram (grampositivas) sino que comparten la misma morfología (cocos). Teniendo en cuentas esas similitudes si hacemos una pequeña conversión de  $\mu\text{g}$  a mg podemos ver que la CIM reportada por Barbosa, et al<sup>22</sup> es equivalente

es equivalente a 1,024 mg/mL. En la investigación realizada la menor concentración evaluada fue 5 mg/mL y esta fue tanto la CMI como la CMB. Ambos resultados son coherentes con lo establecido por Restrepo, et al<sup>45</sup> quien afirma que en los extractos y aceites esenciales de diversas especies del género vegetal *Erythroxylum* existen biomoléculas con capacidad inhibitoria microbiana como los taninos y flavonoides que le otorgan a esta planta su potencial antiséptico.

Del mismo modo, Peretti, et al<sup>23</sup> determinaron las actividades bactericida y antibiofilm de extractos acuosos e hidroetanólicos de dos variaciones regionales de *Acmella oleracea* contra *Streptococcus mutans*. Esta planta pertenece a la misma familia vegetal que la especie *Erythroxylum coca*. Ellos reportaron que reportaron que la CMI y la CMB fue 125 µg/mL contra *S. mutans* en ambos extractos. Estos resultados difieren con los reportados en esta investigación pues tanto la CMI como la CMB reportada por Peretti, et al<sup>23</sup> es mucho menor a la del presente estudio. Este contraste podría estar relacionado a que son especies vegetales distintas y que si bien pertenecen a la misma familia no necesariamente contienen los mismos principios bioactivos, pues la diversidad y cantidad de estos está determinada por una serie de factores dentro de los que se incluyen los geográficos, ambientales, nutricionales, patógenos y otros factores adversos. La hoja de coca utilizada en este estudio fue proporcionada por ENACO y es cultivada en condiciones controladas, quizá eso pudo influir en que sea necesaria mayor concentración del extracto para demostrar efectividad antibacteriana.

Por su parte, De Carvalho, et al<sup>24</sup> analizaron los efectos antimicrobianos del extracto hidroalcohólico liofilizado y nanopartículas de plata de semilla y flor de *Syzygium cumini*. Reportaron halos de inhibición de 13 mm sobre *S. mutans* con una CMI de 1.296,8 µg/mL y una CMB de 2.593,7 µg/mL. Como se puede apreciar, estos resultados son cercanos a los reportados en esta investigación y similares a los comunicados por Barbosa, et al<sup>22</sup>. Para entender la similitud es necesario realizar la equivalencia de las concentraciones establecidas como CMI y CMB. Así tenemos que 1296,8 µg/mL es igual a 1.29 mg/mL; y 2593,7 µg/mL es igual a 2,59 mg/mL. Concentraciones cercanas a los 5 mg/mL del extracto

total de *E. coca*, establecidas como CMI y CMB contra *S. mutans* en el presente estudio. Del mismo modo, Asma, et al<sup>25</sup> evaluaron la actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos de *Salvadora persica* y *Juglans regia* contra cepas microbianas de la cavidad oral. Ellos evaluaron las concentraciones de 5, 10 y 15 mg/mL que están incluidas dentro de las 5 concentraciones estudiadas en esta investigación. Ellos reportaron que la bacteria más afectada por el efecto antibacteriano de estos extractos fue *S. mutans* con una media de inhibición de 10,29 mm. Estos resultados se relacionan con los resultados reportados en esta investigación desde el aspecto que *S. mutans* es sensible a los principios activos vegetales con capacidad antibacteriana, sin embargo, contrastan respecto a la potencia de la inhibición. Pues en este estudio se reportó una media de inhibición de  $16,37 \pm 0,485$  mm con la concentración de extracto más baja que fue 5 mg/mL mientras que la inhibición en promedio comunicada por Asma, et al<sup>25</sup> fue de solo 10,29 mm. Un factor importante que pudo haber influenciado en los resultados es probablemente que son especies vegetales distintas, y que el tipo de extractos evaluados también fueron diferentes y el tipo de extracto es un punto clave a la hora de valorar la efectividad de un producto de origen vegetal pues el tipo de solvente y el método de extracción influyen en la capacidad de recuperar la mayor cantidad y tipos de principios activos a partir del material vegetal.

Una investigación base para el desarrollo de este estudio fue la realizada por Loyola, et al<sup>21</sup> también en territorio peruano. Ellos compararon *in vitro* la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Erythroxylum coca* Lam y *Schinus molle* L. frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175 pero la diferencia con esta investigación es que Loyola, et al<sup>21</sup> evaluó concentraciones porcentuales de los extractos preparados. Reportaron halos de inhibición de  $11,2 \pm 0,7$  mm con la concentración de 50% y de;  $11,6 \pm 0,5$  mm con la concentración de 75% del extracto de *E. coca* sobre *S. mutans*. Estos resultados son congruentes con los reportados por Asma, et al<sup>25</sup> pero difieren respecto a la potencia del efecto antibacteriano con los resultados de la investigación realizada.

Similares resultados fueron reportados por Schovelin, et al<sup>26</sup> quienes evaluaron el efecto antibacteriano del extracto acuoso de *Origanum vulgare* a diferentes concentraciones sobre el crecimiento *in vitro* de *Streptococcus mutans*.

Establecieron que las concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 % formaron halos de inhibición promedios de 14.3, 18.1, 19.8, 22.6 y 25.8 mm respectivamente. La clorhexidina 0,12% utilizado como control positivo formó un halo de inhibición promedio de 14,8 mm. Estos resultados son similares a los reportados en la presente investigación desde la perspectiva de la potencia del efecto antibacteriano, pues los halos formados son muy cercanos a los de este estudio. De igual manera, Gamarra, et al<sup>27</sup> en Perú y Negrete, et al<sup>29</sup> en Bolivia determinaron la actividad antioxidante y antibacteriana de los extractos, flavonoides y alcaloides aislados de extractos etanólicos de hojas de *Erythroxylum coca* y *Erythroxylum novogranatense*. Reportaron que el extracto crudo (1 g/mL) y los flavonoides totales de (0,5 g/mL) de *E. coca* formaron halos de inhibición de 23 y 21 mm sobre *S. aureus* y de 33 y 26 mm sobre *S. epidermidis*. Mientras que *E. novogranatense* formó halos de inhibición de 22 y 23 mm sobre *S. aureus*, de 28 y 35 mm sobre *S. epidermidis*. Bajo el mismo contexto, Enciso, et al<sup>28</sup> determinaron la actividad antibacteriana del extracto de hoja de coca (*Erythroxylum coca*), sobre bacilos negro pigmentados (BNP). Comunicaron la formación de halos de inhibición de 9 -14 mm con la concentración de 12,5% y 100% del extracto. Estas investigaciones comprueban que los extractos totales de especies del género *Erythroxylum* y de otras especies de la clase Magnoliopsida obtenidos con solventes orgánicos polares tienen gran potencial antimicrobiano sobre bacterias grampositivas y gramnegativas entre las que se incluye la bacteria cariogénica *S. mutans*. Sin embargo, es necesario continuar con las investigaciones que permitan esclarecer que sustancias bioactivas presentes en los extractos totales de estas plantas son las responsables del efecto antibacteriano de tal manera de que puedan ser identificadas, purificadas e incorporadas a productos orales para inhibir el desarrollo de *S. mutans* y de esa manera evitar el progreso de la caries dental en la población mundial.



## VI. CONCLUSIONES

1. El extracto hidroetanólico de *Erythroxylum coca* (coca) presenta efecto antibacteriano sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en todas las concentraciones evaluadas superando al control gluconato de clorhexidina 0,12%.
2. La concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto hidroetanólico de *Erythroxylum coca* (coca) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 fue 5 mg/mL.
3. La concentración mínima bactericida (CMB) del extracto hidroetanólico de *Erythroxylum coca* (coca) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 fue 5 mg/mL.

## VII. RECOMENDACIONES

1. Establecer a que componente(s) bioactivo(s) presente en el extracto hidroetanólico total de *Erythroxylum coca* (coca) se debe la actividad antibacteriana reportada en el presente estudio.
2. Determinar si la concentración de 5 mg/mL tiene algún efecto citotóxico a en cultivos provenientes de líneas celulares orales.
3. Determinar si la concentración de 5 mg/mL tiene algún efecto genotóxico en cultivos provenientes de líneas celulares orales.

## REFERENCIAS

1. Ghasemianpour M, Bakhshandeh S, Shirvani A, Emadi N, Samadzadeh H, Moosavi Fatemi N, et al. Dental caries experience and socio-economic status among Iranian children: a multilevel analysis. *BMC Public Health* [Internet]. 2019 [citado 30 Jun 2021]; 19(1):1569. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12889-019-7693-1>.
2. Organización Mundial de la Salud (OMS) [Internet]. Ginebra: Centro de prensa: Salud Bucodental [citado 30 Jun 2021]; Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/oral-health#>
3. Lemos JA, Palmer SR, Zeng L, Wen ZT, Kajfasz JK, Freires IA, Abranches J, Brady LJ. The Biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2019 [citado 30 Jun 2021]; 7(1): 10.1128/microbiolspec.GPP3-0051-2018. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0051-2018>.
4. Escalante-Medina RP, Asmat-Abanto AS, Ruiz-Barrueto MA. Efecto antibacteriano de una pasta dental con xilitol sobre *Streptococcus mutans* en saliva de gestantes. *Rev Cubana Estomatol* [Internet]. 2019 [citado 30 Jun 2021]; 56(4):1-10. Disponible en: <http://www.revestomatologia.sld.cu/index.php/est/article/view/1825>.
5. Esberg A, Sheng N, Mårell L, Claesson R, Persson K, Borén T, Strömberg N. *Streptococcus mutans* Adhesin Biotypes that Match and Predict Individual Caries Development. *EBioMedicine* [Internet]. 2017 [citado 30 Jun 2021]; 24: 205-215. Disponible en: <https://doi.org/10.1016 / j.ebiom.2017.09.027>.
6. Huang X, Browngardt CM, Jiang M, Ahn SJ, Burne RA, Nascimento MM. Diversidad en las interacciones antagonistas entre estreptococos orales comensales y *Streptococcus mutans*. *Caries Res* [Internet]. 2018 [citado 30 Jun 2021]; 52 (1-2): 88-101. Disponible en: <https://doi.org/10.1159 / 000479091>.
7. Astasov-Frauenhoffer M, Varenganayil MM, Decho AW, Waltimo T, Braissant O. Exopolysaccharides regulate calcium flow in cariogenic biofilms. *PLoS ONE* [Internet]. 2017 [citado 30 Jun 2021]; 12(10): e0186256. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186256>.

8. Oliveira R, Albuquerque Y, Spolidorio D, Koga-Ito C, Giro E, Brighenti F. Effect of dietary sugars on dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* – a pilot study. *Rev odontol UNESP* [Internet]. 2016 [citado 30 Jun 2021]; 45(2): 90-96. Disponible en: <https://doi.org/10.1590/1807-2577.00615>.
9. Eidt G, Andrade C, Negrini T, Arthur R. Role of *Candida albicans* on enamel demineralization and on acidogenic potential of *Streptococcus mutans* in vitro biofilms. *J Appl Oral Sci* [Internet]. 2019 [citado 30 Jun 2021]; 27: e20180593. Disponible en: <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2018-0593>.
10. Krzyściak W, Jurczak A, Kościelniak D, Bystrowska B, Skalniak A. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2014 [citado 30 Jun 2021]; 33(4):499-515. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10096-013-1993-7>.
11. Baker JL, Faustoferri RC, Quivey RG Jr. Acid-adaptive mechanisms of *Streptococcus mutans*-the more we know, the more we don't. *Mol Oral Microbiol* [Internet]. 2017 [citado 30 Jun 2021]; 32(2):107-117. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/omi.12162>.
12. Chavant F, Boucher A, Le Boisselier R, Deheul S, Debruyne D. New Synthetic Drugs in Addictovigilance. *Therapies* [Internet]. 2015 [citado 26 Jul 2021]; 70(2): 179-189. Disponible en: <https://doi.org/10.2515/therapie/2015001>.
13. Organización Mundial de la Salud (OMS). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014 – 2023. Ginebra, 2013. ISBN 978 92 4 350609 8. Disponible en: [https://www.who.int/topics/traditional\\_medicine/WHO-strategy/es/](https://www.who.int/topics/traditional_medicine/WHO-strategy/es/).
14. Qiu W, Zhou Y, Li Z, Huang T, Xiao Y, Cheng L, Peng X, Zhang L, Ren B. Application of Antibiotics/Antimicrobial Agents on Dental Caries. *Biomed Res Int* [Internet]. 2020 [citado 26 Jul 2021]; 2020:5658212. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2020/5658212>.
15. Wang S, Wang H, Ren B, Li X, Wang L, Zhou H, et al. Drug resistance of oral bacteria to new antibacterial dental monomer dimethylaminohexadecyl methacrylate. *Sci Rep* [Internet]. 2018 [citado 26 Jul 2021]; 8:5509. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23831-3>.

16. Cui T, Luo W, Xu L, Yang B, Zhao W, Cang H. Progress of Antimicrobial Discovery Against the Major Cariogenic Pathogen *Streptococcus mutans*. *Curr Issues Mol Biol* [Internet]. 2019 [citado 26 Jul 2021]; 32:601-644. Disponible en: <https://doi.org/10.21775/cimb.032.601>.
17. Biondich AS, Joslin JD. Coca: The History and Medical Significance of an Ancient Andean Tradition. *Emerg Med Int* [Internet]. 2016 [citado 26 Jul 2021]; 2016:4048764. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2016/4048764>.
18. Novák M, Salemink CA, Khan I. Biological activity of the alkaloids of *Erythroxylum coca* and *Erythroxylum novogranatense*. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 1984 [citado 26 Jul 2021]; 10(3):261-74. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(84\)90015-1](https://doi.org/10.1016/0378-8741(84)90015-1).
19. Bussmann RW, Paniagua NY, Moya LA, Hart R. Changing markets - Medicinal plants in the markets of La Paz and El Alto, Bolivia. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2016 [citado 26 Jul 2021]; 193:76-95. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.07.074>.
20. Biondich AS, Joslin JD. Coca: High Altitude Remedy of the Ancient Incas. *Wilderness Environ Med* [Internet]. 2015 [citado 26 Jul 2021]; 26(4):567-71. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.wem.2015.07.006>.
21. 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* [Internet]. 2020 [citado 26 Jul 2021]; 10(5):579-584. Disponible en: [https://doi.org/10.4103/jispcd.JISPCD\\_237\\_20](https://doi.org/10.4103/jispcd.JISPCD_237_20).
22. Barbosa M, Miranda P, Souza C, Ramos C, Melo A, Rocha J. Effect of hybrid combinations of *Erythroxylum revolutum* Mart. leaf ethanolic extract or alkaloid-enriched fraction with antibiotic drugs against multidrug-resistant bacteria strains. *Phytomedicine Plus* [Internet]. 2021 [citado 26 Ago 2021]; 1(4): 100105. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2021.100105>.
23. Peretti P, Tavares E, Maia de Souza B, Messias R, Guitián E, Oliveira F. Spilanthol content of *Acmella oleracea* subtypes and their bactericide and

- antibiofilm activities against *Streptococcus mutans*. S African J Bot [Internet]. 2021 [citado 26 Ago 2021]; 143: 17-24. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.08.001>.
24. De Carvalho W, Gomes M, Coradi C, Da Silva J, Moraes F, Martins A. Antimicrobial effects of silver nanoparticles and extracts of *Syzygium cumini* flowers and seeds: Periodontal, cariogenic and opportunistic pathogens. Arch Oral Biol [Internet]. 2021 [citado 26 Ago 2021]; 125: 105101. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2021.105101>.
25. Asma K, Yasmine Ch. In vitro antimicrobial activity of *Salvadora persica* and *Juglans regia* extracts against microbial strains from oral cavity. Biocatal Agric Biotechnol [Internet]. 2021 [citado 26 Ago 2021]; 33: 102003. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102003>.
26. Schovelin A, Muñoz M. Efecto Antibacteriano de la Infusión de Orégano (*Origanum vulgare*) sobre el Crecimiento in Vitro de *Streptococcus mutans*, 2015. Int J Odontostomat [Internet]. 2018 [citado 26 Jul 2021]; 12(4):337-342. Disponible en: [http://www.ijodontostomatology.com/wp-content/uploads/2018/12/2018\\_v12n4\\_001.pdf](http://www.ijodontostomatology.com/wp-content/uploads/2018/12/2018_v12n4_001.pdf).
27. Gamarra V, Fuertes C, Chávez N, Contreras D, Goya E, Huamantumba K, et al. Metabolitos detectados en las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron y evaluación de sus propiedades biológicas mediante bioensayos. Rev Peru Med Integrativa [Internet]. 2017 [citado 30 Jun 2021]; 2(4):828-34. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.26722/rpmi.2017.24.70>.
28. Enciso C, Ramos D. Estudio in vitro de la actividad antibacteriana del extracto de *Erythroxylum coca* sobre bacilos negro pigmentados. Odontol Sanmarquina [Internet]. 2017 [citado 30 Jun 2021]; 20(1):17-21. Disponible en: <https://doi.org/10.15381/os.v20i1.13540>.
29. Negrete M, Quispe A. 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*. Univ Cienc Soc [Internet]. 2015 [citado 30 Jun 2021]; (15): 38-47. Disponible en:

[http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S8888-88882015000200007&script=sci\\_arttext](http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S8888-88882015000200007&script=sci_arttext).

30. Antunes JL, Toporcov TN, Bastos JL, Frazão P, Narvai PC, Peres MA. Oral health in the agenda of priorities in public health. *Rev Saude Publica* [Internet]. 2016 [citado 30 Jun 2021]; 50:57. <http://dx.doi.org/10.1590/S1518-8787.2016050007093>.
31. Peres MA, Macpherson LM, Weyant RJ, Daly B, Venturelli R, Mathur MR, et al. Oral diseases: a global public health challenge. *Lancet* [Internet]. 2019 [citado 30 Jun 2021]; 394(10194):249-260. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31146-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31146-8).
32. Yactayo-Albuquerque MT, Alen-Méndez ML, Azañedo D, Comandé D, Hernández-Vásquez A. Impact of oral diseases on oral health-related quality of life: A systematic review of studies conducted in Latin America and the Caribbean. *PLoS ONE* [Internet]. 2021 [citado 30 Jul 2021]; 16(6): e0252578. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252578>.
33. Koistinen S, Olai L, Ståhlacke K, Fält A, Ehrenberg A. Oral health-related quality of life and associated factors among older people in short-term care. *Int J Dent Hyg* [Internet]. 2020 [citado 30 Jun 2021]; 18(2):163-172. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/idh.12424>.
34. Balaji SM. Dental caries: Research perspective. *Indian J Dent Res* [Internet]. 2018 [citado 30 Jun 2021]; 29(1):3. Disponible en: [https://doi.org/10.4103/ijdr.IJDR\\_61\\_18](https://doi.org/10.4103/ijdr.IJDR_61_18).
35. Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, et al. Dental caries. *Nat Rev Dis Primers* [Internet]. 2017 [citado 30 Jun 2021]; 3:17030. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.30>.
36. Mathur VP, Dhillon JK. Dental Caries: A Disease Which Needs Attention. *Indian J Pediatr* [Internet]. 2018 [citado 30 Jun 2021]; 85(3):202-206. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s12098-017-2381-6>.
37. Conrads G, About I. Pathophysiology of Dental Caries. *Monogr Oral Sci* [Internet]. 2018 [citado 30 Jun 2021]; 27:1-10. Disponible en: <https://doi.org/10.1159/000487826>.

38. Valm AM. The Structure of Dental Plaque Microbial Communities in the Transition from Health to Dental Caries and Periodontal Disease. *J Mol Biol* [Internet]. 2019 [citado 30 Jun 2021]; 431(16):2957-2969. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.05.016>.
39. Kuang X, Chen V, Xu X. Novel Approaches to the Control of Oral Microbial Biofilms. *Biomed Res Int* [Internet]. 2018 [citado 30 Jun 2021]; ID 6498932: 13. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2018/6498932>.
40. Ccahuana-Vásquez RA, Aparecido J. S. mutans biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. *Braz oral res* [Internet]. 2010 [citado 30 Jun 2021]; 24 (2): 135-141. Disponible en: <https://doi.org/10.1590/S1806-83242010000200002>.
41. Zhang J, Kuang X, Zhou Y, Yang R, Zhou X, Peng X, et al. Antimicrobial activities of a small molecule compound II-6s against oral streptococci. *J Oral Microbiol* [Internet]. 2021 [citado 30 Jun 2021]; 13(1): 1909917. Disponible en: 10.1080/20002297.2021.1909917.
42. Qiu W, Zhou Y, Li Z, Huang T, Xiao Y, Cheng L, et al. Application of Antibiotics/Antimicrobial Agents on Dental Caries. *Biomed Res Int* [Internet]. 2020 [citado 30 Jun 2021]; 2020:5658212. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2020/5658212>.
43. Lemos JA, Palmer SR, Zeng L, Wen ZT, Kajfasz JK, Freires IA, et al. The Biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2019 [citado 30 Jun 2021]; 7(1): 10.1128/microbiolspec.GPP3-0051-2018. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0051-2018>.
44. Salehi B, Kregiel D, Mahady G, Sharifi-Rad J, Martins N, Rodrigues CF. Management of *Streptococcus mutans*-*Candida* spp. Oral Biofilms' Infections: Paving the Way for Effective Clinical Interventions. *J Clin Med* [Internet]. 2020 [citado 30 Jun 2021]; 9(2):517. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/jcm9020517>.
45. Restrepo DA, Saenz E, Jara-Muñoz OA, Calixto-Botía IF, Rodríguez-Suárez S, Zuleta P, et al. *Erythroxyllum* in Focus: An Interdisciplinary Review of an



- Overlooked Genus. *Molecules* [Internet]. 2019 [citado 30 Jun 2021]; 24(20):3788. <https://doi.org/10.3390/molecules24203788>.
46. Bauer I. Travel medicine, coca and cocaine: demystifying and rehabilitating *Erythroxylum* - a comprehensive review. *Trop Dis Travel Med Vaccines* [Internet]. 2019 [citado 30 Jun 2021]; 5:20. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s40794-019-0095-7>.
47. Proyectos de Investigación Básica 2021-01 [Internet]. Concytec. 2021 [citado 20 julio 2021]. Disponible en: <https://www.fondecyt.gob.pe/convocatorias/investigacion-cientifica/proyectos-de-investigacion-basica-2021-01>
48. Rodríguez N. Diseños experimentales en educación. *Rev Pedagog* [Internet]. 2011 [citado 20 julio 2021]; 32(91):147-158. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=65926549009>.
49. Abubakar AR, Haque M. Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. *J Pharm Bioallied Sci* [Internet]. 2020 [citado 20 julio 2021]; 12(1):1-10. Disponible en: [https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS\\_175\\_19](https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_175_19).
50. De la Fuente-Salcido NM, Villarreal-Prieto JM, Díaz M, García A. Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana. *Rev Mex Cienc Farm* [revista en la Internet]. 2015 [citado 20 julio 2021]; 46(2): 7-16. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1870-01952015000200007&lng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952015000200007&lng=es).
51. Steel RG, Torrie JH. *Bioestadística: Principios y Procedimientos*. 2da. Ed. Bogotá: Editorial Mcgraw-Hill; 1988. 622 p.
52. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 28th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
53. Sacaquispe R, Velásquez J. *Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de Disco Difusión (Serie de Normas Técnicas; 30)*. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2002. 68 p. Disponible en: [https://bvs.ins.gob.pe/insprint/SALUD\\_PUBLICA/NOR\\_TEC/30.pdf](https://bvs.ins.gob.pe/insprint/SALUD_PUBLICA/NOR_TEC/30.pdf)

54. Klancnik A, Piskernik S, Jersek B, Mozina SS. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *J Microbiol Methods* [Internet]. 2010 [citado 20 julio 2021]; 81(2):121-6. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.02.004>.
55. Humphries RM, Kircher S, Ferrell A, Krause KM, Malherbe R, Hsiung A, et al. The Continued Value of Disk Diffusion for Assessing Antimicrobial Susceptibility in Clinical Laboratories: Report from the Clinical and Laboratory Standards Institute Methods Development and Standardization Working Group. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2018 [citado 20 julio 2021]; 56(8): e00437-18. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/JCM.00437-18>.
56. Abubakar AR, Haque M. Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. *J Pharm Bioallied Sci* [Internet]. 2020 [citado 20 julio 2021]; 12(1):1-10. Disponible en: [https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS\\_175\\_19](https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_175_19).
57. Ministerio de Salud. Manual de Procedimientos Bioseguridad en Laboratorios de Ensayo, Biomédicos y Clínicos. Perú: Instituto Nacional de Salud [Internet]. 2005 [citado 20 julio 2021]; 109 p. Disponible en: <http://bvs.minsa.gob.pe/local/minsa/1669.pdf>
58. Organización Mundial de la Salud. Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. Ginebra [Internet]. 2005 [citado 20 julio 2021]; 223 p. Disponible en: [https://www.who.int/topics/medical\\_waste/manual\\_bioseguiridad\\_laboratorio.pdf](https://www.who.int/topics/medical_waste/manual_bioseguiridad_laboratorio.pdf)

## ANEXOS

### ANEXO 1

#### MATRIZ DE OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Dimensiones	Indicador	Escala
Extracto hidroetanólico de <i>Erythroxylum coca</i> (coca)	Producto total que contiene fitoquímicos obtenido a partir de la maceración en solvente orgánico polar del material vegetal seco de <i>E. coca</i> . <sup>49</sup>	Cantidad en mg del extracto hidroetanólico seco total de <i>E. coca</i> (coca) diluido en un solvente inerte de DMSO 1%.	Concentración mg /mL	5 mg/mL 10 mg/mL 15 mg/mL 20 mg/mL 25 mg/mL	De Razón
Efecto antibacteriano <i>in vitro</i> sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	Capacidad de una sustancia de inhibir el crecimiento de <i>S. mutans</i> ATCC 25175 de forma temporal o permanentemente en condiciones de laboratorio. <sup>50</sup>	Formación o ausencia de halo de inhibición y de UFC de <i>S. mutans</i> ATCC 25175 al ser expuesta a 5 concentraciones del extracto hidroetanólico total de <i>E. coca</i> (coca)	Sin efecto  Efecto Bacteriostático  Efecto bactericida	Halos de Inhibición 0 mm = Sin efecto  < 12 mm = Efecto Bacteriostático  ≥ 14 mm = Efecto bactericida	De Razón

## ANEXO 2

### CÁLCULO DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA

Se desarrolló la fórmula para la determinación del número de unidades de ensayo (repeticiones) en estudios experimentales:

$$n = \frac{W - W^2 \cdot Z_{\beta} + 1,4 \cdot Z_{\alpha}^2}{W^2}$$

Dónde:

n: Número mínimo de repeticiones a realizarse en la investigación.

Z $\alpha$ : Valor correspondiente al nivel de confianza asignado.

Z $\beta$ : Valor correspondiente al valor estadístico.

W: Eficiencia mínima observable.

$$n = \frac{W - W^2 \cdot Z_{\beta} + 1,4 \cdot Z_{\alpha}^2}{W^2}$$
$$n = \frac{0,8 - (0,8)^2 \cdot (0,842) + 1,4 (1,96)^2}{(0,8)^2}$$
$$n = \frac{0,8 - (0,64) \cdot (0,842) + 1,4 (3,842)}{0,64}$$
$$n = 9$$

Reemplazando los valores en la fórmula se obtiene que el número de repeticiones necesarias son 9. Entonces cada grupo experimental estuvo conformado por 10 unidades de ensayo (1 ensayo original + 9 repeticiones). Debido a que fueron 7 grupos (5 concentraciones y 2 controles) el total de unidades de ensayo fueron 70.

## CONSTANCIA DE EJECUCIÓN MICROBIÓLOGO



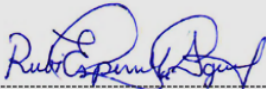
**SCIENCE EXPERIMENT**  
Research Laboratory

### CONSTANCIA

La que suscribe, **Rubi Jackeline Espinola Aguirre** identificada con **DNI N° 43303261**, Bióloga Microbióloga, especialista en Análisis Clínico y biológicos con CBP N° 8258; hace constar que ha colaborado como microbióloga especialista en la ejecución de la investigación titulada: **"Efecto antibacteriano in vitro del extracto hidroetanólico de *Erythroxylum coca (coca)* sobre *Streptococcus mutans ATCC 25175"***, de los Sres. **Delgado Pacco Cleofé**, identificada con **DNI N° 46057931** y **Quispe Ccanchi Kenneth**, identificado con **DNI N° 42088678** bachilleres en Estomatología de la Universidad Alas Peruanas y estudiantes del Taller de Titulación para Universidades No Licenciadas de la Universidad César Vallejo. La ejecución de la investigación fue realizada entre el 12 de julio y el 12 de agosto del 2021 en el Laboratorio de investigación Science Experiment E.I.R.L., de la Ciudad de Trujillo.

Se expide la presente a solicitud de los interesados, para los fines que estimen conveniente.

Trujillo, 13 de agosto de 2021.

  
Rubi J. Espinola Aguirre  
Biólogo Microbiólogo  
C.B.P 8258



## FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS



**SCIENCE EXPERIMENT**  
Research Laboratory

## FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

**Título de Tesis:** Efecto antibacteriano in vitro del extracto hidroetanólico de *Erythroxylum coca* (coca) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

**Autores:**

Bach. Delgado Pacco Cleofé

Bach. Quispe Ccanchi Kenneth

**Microbiólogo Especialista:**

Mblgo. Esp. Rubi Jackeline Espinola Aguirre

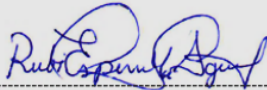
## MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO

REPETICIONES	HALOS DE INHIBICIÓN EN mm						
	5 mg/mL	10 mg/mL	15 mg/mL	20 mg/mL	25 mg/mL	CLX* 0,12%	DMSO** 1%
1	16,3	18,5	20,1	22,6	24,2	15,5	0,0
2	16,0	18,9	19,9	22,0	24,5	13,5	0,0
3	16,5	18,0	20,1	22,5	23,4	14,0	0,0
4	15,9	18,8	20,4	22,9	24,5	16,0	0,0
5	17,0	19,0	20,3	23,0	24,6	14,0	0,0
6	16,8	18,0	19,8	23,0	24,0	14,0	0,0
7	15,5	18,5	20,3	22,8	24,4	13,5	0,0
8	16,4	18,6	19,8	22,5	24,1	15,5	0,0
9	17,0	18,0	20,5	22,4	24,5	14,5	0,0
10	16,3	18,2	20,1	22,5	24,0	15,0	0,0

\*CLX= Gluconato de clorhexidina.

\*\* DMSO= Dimetilsulfóxido.

Trujillo, 13 de agosto de 2021.

  
Rubi J. Espinola Aguirre  
Biólogo Microbiólogo  
C.B.P 8258



CERTIFICADO DE IDENTIFICACIÓN DE PLANTA



**CONSTANCIA DE ENTREGA DE HOJAS DE COCA**

La Empresa Nacional de la Coca S.A. hace entrega de 0.50 kilos de hojas de coca del tipo H011 (procedente de los valles de La Convención Cusco) a estudiantes de la Universidad Cesar Vallejo, Srtas. Delgado Pacco Cleofe y Quispe Ccanchi Kenneth, para fines de investigación corresponden al género ERYTHROXYLUM.

El producto entregado es para determinar el origen de la muestra de la hoja de coca que se utilizara en la ejecución de la tesis denominada "EFECTO ANTIBACTERIANO EN VITRO DEL EXTRACTO ALCOHOLICO DE ERYTHROXYLUM COCA SOBRE STREPTOCOCCUS MUTANS ATCC 25175"

Cusco, Junio del 2021.

  
EMPRESA NACIONAL DE LA COCA S.A.  
Luis A. Solis Bejar  
ADMINISTRADOR AGENCIA CUSCO

## ANEXO 6

### GALERÍA FOTOGRÁFICA PROCEDIMIENTO

#### MATERIALES, EQUIPOS E INSUMOS



1	Incubadora microbiológica	7	Agua destilada y Etanol absoluto
2	Molino artesanal	8	Mitis Salivarius Agar
3	Espectrofotómetro VIS	9	Cepa estándar de <i>S. mutans</i>
4	Autoclave	10	Material vegetal de <i>E. coca</i>
5	Balanza analítica y vernier mecánico	11	Micropipeta rango variable
6	Agitador magnético temperado	12	Placas Petri e hisopos estériles



## OBTENCIÓN DE EXTRACTO



1	Hojas de coca seleccionadas.	7	Incorporación de material molido a matraz con mezcla hidroetanólica.
2	Secado de hojas de coca en estufa.	8	
3	Material vegetal seco.	9	Maceración en agitación temperada.
4	Molienda de material vegetal seco.	10	Filtración del extracto total.
5	Material vegetal seco y molido.	11	Secado de extracto en estufa.
6	Pesado de material molido.		

## PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO



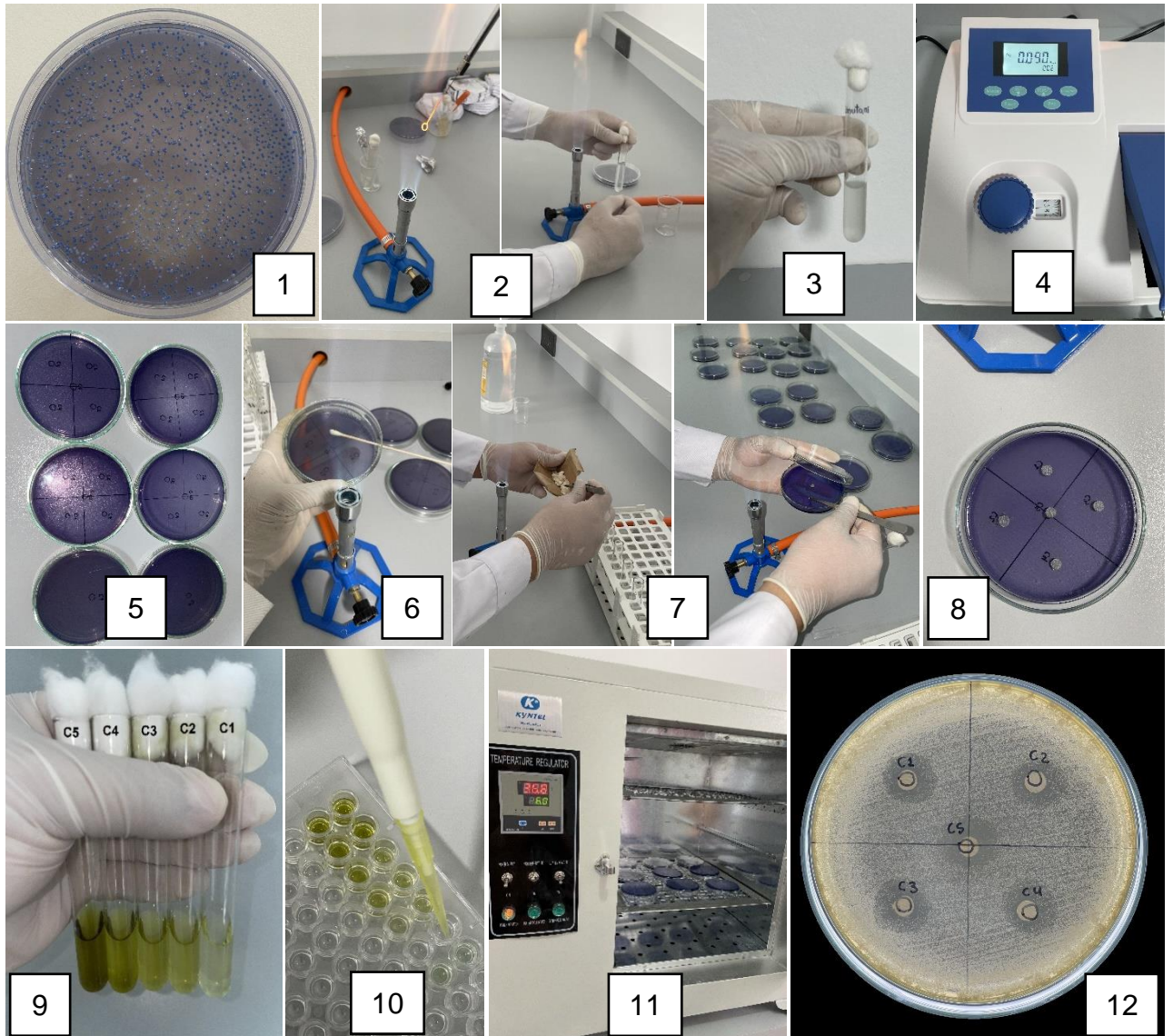
1	Mitis Salivarius Agar.	6	Esterilización en autoclave.
2	Pesado de medio de cultivo.	7	Medio de cultivo estéril.
3	Insumos para preparación de medio de cultivo.	8	Preparación para servir medio de cultivo en placas estériles.
4	Incorporación del medio de cultivo al matraz.	9	Servida de medio de cultivo en condiciones de esterilidad.
5	Hidratación de medio de cultivo.	10	Placas servidas con Agar Mitis Salivarius.

## REACTIVACIÓN DE CEPA BACTERIANA



1	Cepa de <i>S. mutans</i> ATCC 25175.	5	Reactivación en caldo CC.
2	Insumos para reactivación de cepa.	6	Colocación en estufa.
3	Apertura de empaque con cepa.	7	Incubación a 36.5 °C.
4	Ruptura de vial para aplicación de caldo.	8	Cepa reactivada.

## ESTANDARIZACIÓN DEL INÓCULO Y EVALUACIÓN DE EFECTO ANTIBACTERIANO



1	UFC de <i>S. mutans</i> en Agar Mitis salivarius.	7	Colocación de discos de sensibilidad.
2	Preparación de inóculo bacteriano.	8	Placa con discos de sensibilidad.
3	Inóculo bacteriano.	9	Concentraciones de extracto de <i>E. coca</i> .
4	Estandarización del inóculo.	10	Inoculación en microplacas.
5	Rotulación de placas antes de inoculación.	11	Incubación en estufa microbiológica.
6	Siembra de placa por dispersión en superficie.	12	Halos de inhibición formados.

## ANEXO 7

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

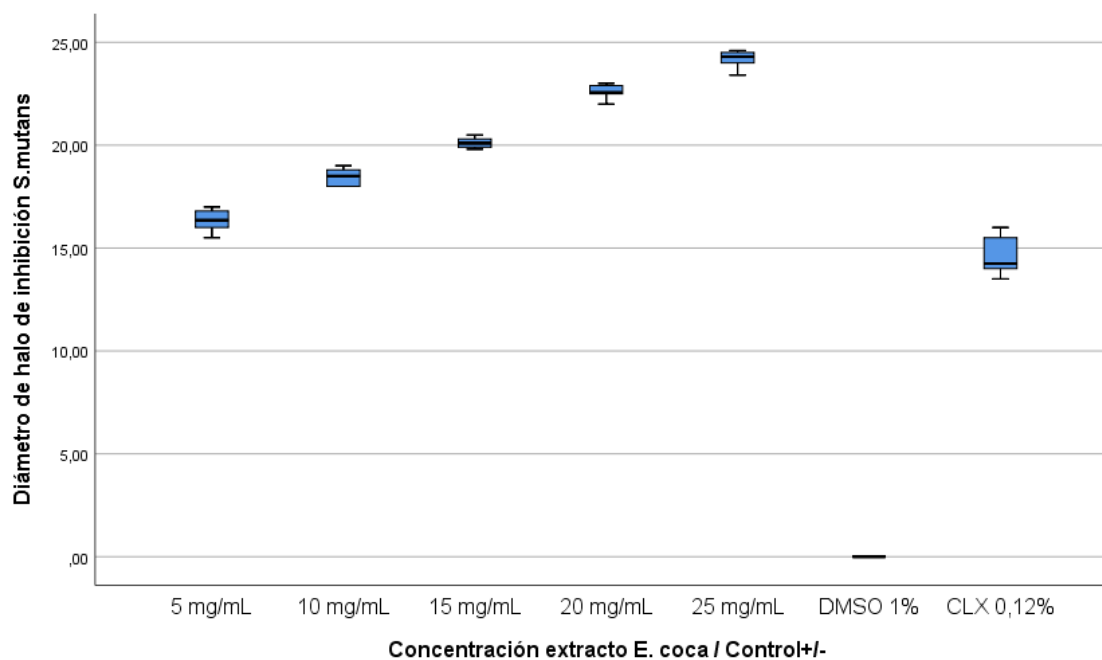
#### Explorar

#### Concentración extracto *E. coca* / Control+/-

Diámetro de halo de inhibición <i>S. mutans</i> : Resumen de procesamiento de casos						
Concentración extracto <i>E. coca</i> / Control+/-	Casos					
	Válido		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
5 mg/mL	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
10 mg/mL	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
15 mg/mL	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
20 mg/mL	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
25 mg/mL	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
DMSO 1%	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
CLX 0,12%	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%

Pruebas de normalidad			
Concentración extracto <i>E. coca</i> / Control+/-	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>		
	Estadístico	gl	Sig.
5 mg/mL	0,143	10	0,200*
10 mg/mL	0,180	10	0,200*
15 mg/mL	0,156	10	0,200*
20 mg/mL	0,150	10	0,200*
25 mg/mL	0,189	10	0,200*
DMSO 1%	.	10	.
CLX 0,12%	0,230	10	0,142

\*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.  
a. Corrección de significación de Lilliefors



## Unidireccional

Descriptivos								
Diámetro de halo de inhibición S. mutans								
	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
5 mg/mL	10	16,3700	0,48546	0,15351	16,0227	16,7173	15,50	17,00
10 mg/mL	10	18,4500	0,38370	0,12134	18,1755	18,7245	18,00	19,00
15 mg/mL	10	20,1300	0,24518	0,07753	19,9546	20,3054	19,80	20,50
20 mg/mL	10	22,6200	0,31198	0,09866	22,3968	22,8432	22,00	23,00
25 mg/mL	10	24,2200	0,36454	0,11528	23,9592	24,4808	23,40	24,60
DMSO 1%	10	0,0000	0,00000	0,00000	0,0000	,0000	0,00	0,00
CLX 0,12%	10	14,5500	0,89598	0,28333	13,9091	15,1909	13,50	16,00
Total	70	16,6200	7,53089	0,90011	14,8243	18,4157	0,00	24,60

Prueba de homogeneidad de varianzas				
Diámetro de halo de inhibición S. mutans	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Se basa en la media	10,043	6	63	0,000
Se basa en la mediana	7,062	6	63	0,000
Se basa en la mediana y con gl ajustado	7,062	6	26,554	0,000
Se basa en la media recortada	9,726	6	63	0,000

ANOVA					
Diámetro de halo de inhibición S. mutans					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	3900,008	6	650,001	3082,662	0,000
Dentro de grupos	13,284	63	0,211		
Total	3913,292	69			

## Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: Diámetro de halo de inhibición S. mutans.						
HSD Tukey						
(I) Concentración extracto E. coca / Control+/-	(J) Concentración extracto E. coca / Control+/-	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
5 mg/mL	10 mg/mL	-2,08000*	,20536	,000	-2,7054	-1,4546
	15 mg/mL	-3,76000*	,20536	,000	-4,3854	-3,1346
	20 mg/mL	-6,25000*	,20536	,000	-6,8754	-5,6246
	25 mg/mL	-7,85000*	,20536	,000	-8,4754	-7,2246
	DMSO 1%	16,37000*	,20536	,000	15,7446	16,9954
	CLX 0,12%	1,82000*	,20536	,000	1,1946	2,4454
10 mg/mL	5 mg/mL	2,08000*	,20536	,000	1,4546	2,7054
	15 mg/mL	-1,68000*	,20536	,000	-2,3054	-1,0546
	20 mg/mL	-4,17000*	,20536	,000	-4,7954	-3,5446
	25 mg/mL	-5,77000*	,20536	,000	-6,3954	-5,1446
	DMSO 1%	18,45000*	,20536	,000	17,8246	19,0754

15 mg/mL	CLX 0,12%	3,90000*	,20536	,000	3,2746	4,5254
	5 mg/mL	3,76000*	,20536	,000	3,1346	4,3854
	10 mg/mL	1,68000*	,20536	,000	1,0546	2,3054
	20 mg/mL	-2,49000*	,20536	,000	-3,1154	-1,8646
	25 mg/mL	-4,09000*	,20536	,000	-4,7154	-3,4646
	DMSO 1%	20,13000*	,20536	,000	19,5046	20,7554
	CLX 0,12%	5,58000*	,20536	,000	4,9546	6,2054
20 mg/mL	5 mg/mL	6,25000*	,20536	,000	5,6246	6,8754
	10 mg/mL	4,17000*	,20536	,000	3,5446	4,7954
	15 mg/mL	2,49000*	,20536	,000	1,8646	3,1154
	25 mg/mL	-1,60000*	,20536	,000	-2,2254	-,9746
	DMSO 1%	22,62000*	,20536	,000	21,9946	23,2454
	CLX 0,12%	8,07000*	,20536	,000	7,4446	8,6954
25 mg/mL	5 mg/mL	7,85000*	,20536	,000	7,2246	8,4754
	10 mg/mL	5,77000*	,20536	,000	5,1446	6,3954
	15 mg/mL	4,09000*	,20536	,000	3,4646	4,7154
	20 mg/mL	1,60000*	,20536	,000	,9746	2,2254
	DMSO 1%	24,22000*	,20536	,000	23,5946	24,8454
	CLX 0,12%	9,67000*	,20536	,000	9,0446	10,2954
DMSO 1%	5 mg/mL	-16,37000*	,20536	,000	-16,9954	-15,7446
	10 mg/mL	-18,45000*	,20536	,000	-19,0754	-17,8246
	15 mg/mL	-20,13000*	,20536	,000	-20,7554	-19,5046
	20 mg/mL	-22,62000*	,20536	,000	-23,2454	-21,9946
	25 mg/mL	-24,22000*	,20536	,000	-24,8454	-23,5946
	CLX 0,12%	-14,55000*	,20536	,000	-15,1754	-13,9246
CLX 0,12%	5 mg/mL	-1,82000*	,20536	,000	-2,4454	-1,1946
	10 mg/mL	-3,90000*	,20536	,000	-4,5254	-3,2746
	15 mg/mL	-5,58000*	,20536	,000	-6,2054	-4,9546
	20 mg/mL	-8,07000*	,20536	,000	-8,6954	-7,4446
	25 mg/mL	-9,67000*	,20536	,000	-10,2954	-9,0446
	DMSO 1%	14,55000*	,20536	,000	13,9246	15,1754

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

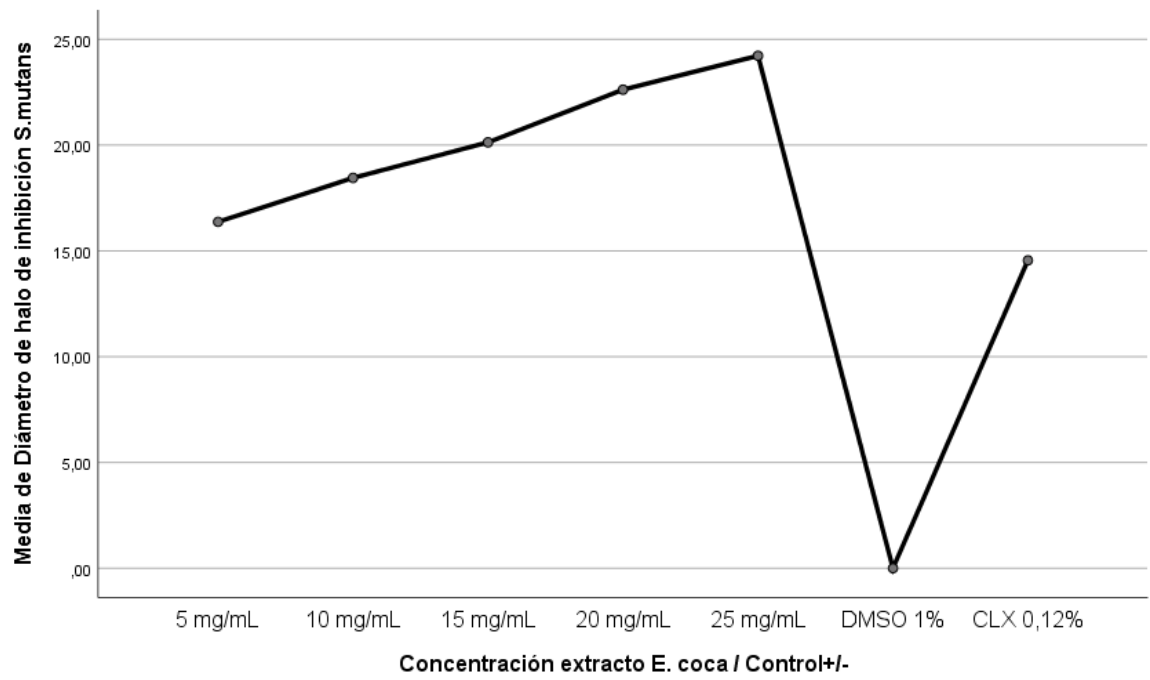
## Subconjuntos homogéneos

Diámetro de halo de inhibición S. mutans								
HSD Tukey <sup>a</sup>								
Concentración extracto E. coca / Control+/-	N	Subconjunto para alfa = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
DMSO 1%	10	0,0000						
CLX 0,12%	10		14,5500					
5 mg/mL	10			16,3700				
10 mg/mL	10				18,4500			
15 mg/mL	10					20,1300		
20 mg/mL	10						22,6200	
25 mg/mL	10							24,2200
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 10,000.

## Gráficos de medias







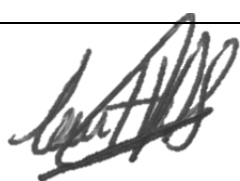
## Declaratoria de Autenticidad del Asesor

Yo, **Carmen Teresa Ibáñez Sevilla**, docente de la Facultad de Ciencias de la Salud y Escuela Profesional de Estomatología de la Universidad César Vallejo Sede Piura, asesora de la Tesis titulada: “Efecto antibacteriano *in vitro* del extracto hidroetanólico de *Erythroxylum coca* (coca) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175”, de los autores: **Delgado Pacco, Cleofé** y **Quispe Ccanchi, Kenneth**; constato que la investigación tiene un índice de similitud de **24%** verificable en el reporte de originalidad del programa Turnitin, el cual ha sido realizado sin filtros, ni exclusiones.

He revisado dicho reporte y concluyo que cada una de las coincidencias detectadas no constituyen plagio. A mi leal saber y entender la tesis cumple con todas las normas para el uso de citas y referencias establecidas por la Universidad César Vallejo.

En tal sentido asumo la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión tanto de los documentos como de información aportada, por lo cual me someto a lo dispuesto en las normas académicas vigentes de la Universidad César Vallejo.

Piura, 26 de setiembre 2021.

Apellidos y Nombres del Asesor:	
<b>Ibáñez Sevilla Carmen Teresa</b>	
DNI: 18212665	
ORCID: 0000-0002-5551-1428	
Firma	