

UNIVERSIDAD
CIENTÍFICA
DEL SUR

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA PROFESIONAL DE ESTOMATOLOGÍA

**“COMPARACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DEL
EXTRACTO ACUOSO Y ALCOHÓLICO DE HOJAS
SECAS DE *Erythroxylum coca* “COCA” FRENTE A
Streptococcus mutans ATCC®35668™ Y *Lactobacillus
acidophilus* ATCC®4356™ ”**

Tesis para optar el grado académico de:
MAESTRO EN ESTOMATOLOGÍA

Presentado por:
Bryan Alexis Cossio Alva (0000-0003-1568-5324)

Asesor:
Eliberto Ruiz Ramirez (0000-0002-5340-7168)

Lima – Perú
2022

UNIVERSIDAD
CIENTÍFICA
DEL SUR

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA PROFESIONAL DE ESTOMATOLOGÍA

**“COMPARACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DEL
EXTRACTO ACUOSO Y ALCOHÓLICO DE HOJAS
SECAS DE *Erythroxylum coca* “COCA” FRENTE A
Streptococcus mutans ATCC®35668™ Y *Lactobacillus
acidophilus* ATCC®4356™ ”**

Tesis para optar el grado académico de:
MAESTRO EN ESTOMATOLOGÍA

Presentado por:
Bryan Alexis Cossio Alva (0000-0003-1568-5324)

Asesor:
Eliberto Ruiz Ramirez (0000-0002-5340-7168)

Lima – Perú
2022

4. Copia de acta de sustentación

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Lima, 10 de agosto de 2022.

Los integrantes del Jurado de tesis:

Presidente: Dr Fernando Alfonso Ortiz Culca	<input checked="" type="checkbox"/>
Miembro: Dr Melvin Cisneros Del Aguila	<input type="checkbox"/>
Miembro: Dra. Evelyn Alvarez Vidigal	<input type="checkbox"/>

Se reúnen para evaluar la tesis titulada: "COMPARACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ACUOSO Y ALCOHÓLICO DE HOJAS SECAS DE *Erythroxylum coca* "COCA" FRENTE A *Streptococcus mutans* ATCC®35668™ Y *Lactobacillus acidophilus* ATCC®4356™ "

Presentado por el estudiante/bachiller:
CD. BRYAN ALEXIS COSSIO ALVA DNI : 70616889

Para optar el Grado Académico de MAESTRO EN ESTOMATOLOGIA
Asesorado por: Mg. Eliberto Ruiz Ramirez
Luego de haber evaluado el informe final de tesis y evaluado el desempeño del estudiante de la Carrera de Estomatología en la sustentación, se concluyen de:

Manera unánime (X)

Por mayoría ()

Calificar a:

Tesista: BRYAN ALEXIS COSSIO ALVA	Nota (en letras): DIECIOCHO
Aprobado ()	Aprobado - Muy buena (X)
Aprobado - Sobresaliente ()	Desaprobado ()

Los miembros del jurado firman en señal de conformidad.



Dr. Fernando Alfonso Ortiz Culca
DNI. 07747839



Dra. Evelyn Alvarez Vidigal
Miembro 2
DNI. 10452711



Dr. Melvin Cisneros del Aguila
Miembro 1
DNI.41176693



Mg Eliberto Ruiz Ramirez
Asesor(a)
DNI. 43493292

T// (51) 610 6738
informa@cientifica.edu.pe
cientifica.edu.pe

5. Dedicatoria

A Dios por brindarme la fortaleza para culminar cada objetivo que me propongo y por la seguridad que me brinda porque siento su respaldo día a día.

A mis apreciados padres por su apoyo incondicional a lo largo de toda mi vida, gracias a sus acertados consejos y enseñanzas he podido desarrollarme debidamente.

A mis queridos hermanos que siempre me aconsejan y guían, siendo parte fundamental para lograr cada objetivo propuesto.

6. Agradecimientos

A mis apreciados docentes de la Maestría en Estomatología, por brindarme sus conocimientos de una manera muy especial, resaltando la humildad y calidad humana que caracteriza a cada uno.

A la Universidad Científica del Sur, por brindarme la autorización para el uso de sus laboratorios para el adecuado desarrollo de la investigación.

A la Empresa Nacional de la Coca (ENACO) – Sede Trujillo, por brindarme las hojas de COCA y su certificación, sin ello no hubiera sido posible desarrollar el estudio.

Un agradecimiento especial al Dr. Mlgo. Miguel Angel Ruiz Barrueto, por su dedicación desde el inicio en la presente investigación y por sus consejos en todo momento.

A mi asesor Mg. CD. Eliberto Ruiz Ramirez, que debido a su experiencia aportó de manera sustancial en la investigación y por su preocupación por obtener un buen producto final.

A la Dra. Ángela Quispe Salcedo, por su gran colaboración con sus acertados aportes para la investigación.

7. Resumen

Introducción: La hoja de *Erythroxylum coca*, se utiliza tradicionalmente en diversos países por sus bondades farmacológicas.

Objetivo: Comparar el efecto antibacteriano del extracto acuoso y alcohólico de hojas de *Erythroxylum coca* frente a *Streptococcus mutans* ATCC®35668™ y *Lactobacillus acidophilus* ATCC®4356™.

Métodos: Estudio experimental *in vitro*. Se obtuvo el extracto acuoso y alcohólico de *E. coca*. La muestra estuvo conformada por 20 placas petri para cada concentración y extracto evaluado. La media de los diámetros de los halos de inhibición, se expresaron en milímetros y se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis y el análisis *post hoc* de Dunn con ajuste de Bonferroni. La comparación de los efectos entre las 24 y 48 horas se realizó mediante el test Wilcoxon con un nivel de significancia del 5 %.

Resultados: La concentración alcohólica de 25 mg/mL fue más efectiva sobre *S. mutans*, al compararla con los otros grupos ($p < 0,05$). En el extracto alcohólico se observó diferencias con la concentración de 50 mg/mL a las 24 y 48 horas frente a *S. mutans* ($p < 0,05$). Se observaron diferencias significativas al comparar el efecto inhibitorio del extracto acuoso de 75 mg/mL y 50 mg/mL a las 24 y 48 horas frente a *L. acidophilus* ($p < 0,05$) y para el extracto alcohólico las diferencias fueron estadísticamente significativas con las concentraciones de 50 mg/mL y 25 mg/mL ($p < 0,05$).

Conclusión: Existen diferencias en el efecto antibacteriano del extracto acuoso y alcohólico de las hojas de *E. coca* frente a *S. mutans* y *L. acidophilus*.

Palabras clave: antibacterianos; coca; *Streptococcus mutans*; *Lactobacillus acidophilus*.

8. Abstract

Introduction: The *Erythroxylum coca* leaf is traditionally used in various countries for its pharmacological benefits.

Objective: To compare the antibacterial effect of the aqueous and alcoholic extract of *Erythroxylum coca* leaves against *Streptococcus mutans* ATCC®35668™ and *Lactobacillus acidophilus* ATCC®4356™.

Methods: Experimental in vitro study. The aqueous and alcoholic extract of *E. coca* was obtained. The sample consisted of 20 petri dishes for each concentration and extract evaluated. The mean diameters of the inhibition halos were expressed in millimeters and analyzed using the Kruskal-Wallis test and Dunn's post hoc analysis with Bonferroni adjustment. The comparison of the effects between 24 and 48 hours was carried out using the Wilcoxon test with a significance level of 5 %.

Results: The alcoholic concentration of 25 mg/mL was more effective on *S. mutans*, when compared to the other groups ($p < 0.05$). In the alcoholic extract, differences were observed with the concentration of 50 mg/mL at 24 and 48 hours against *S. mutans* ($p < 0.05$). Significant differences were observed when comparing the inhibitory effect of the aqueous extract of 75 mg/mL and 50 mg/mL at 24 and 48 hours against *L. acidophilus* ($p < 0.05$) and for the alcoholic extract the differences were statistically significant with concentrations of 50 mg/mL and 25 mg/mL ($p < 0.05$).

Conclusion: There are differences in the antibacterial effect of the aqueous and alcoholic extract of *E. coca* leaves against *S. mutans* and *L. acidophilus*.

Keywords: anti-bacterial agents; coca; *Streptococcus mutans*; *Lactobacillus acidophilus*.

9. Versión aprobada para publicar

Efecto antibacteriano de dos extractos de *Erythroxylum coca* frente a *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus*

Antibacterial effect of two extracts of *Erythroxylum coca* against *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus*

Bryan Alexis Cossio-Alva^{1*} <https://orcid.org/0000-0003-1568-5324>

Eliberto Ruiz-Ramirez¹ <https://orcid.org/0000-0002-5340-7168>

Marco Sánchez-Tito² <https://orcid.org/0000-0001-5886-9372>

Miguel Angel Ruiz-Barrueto³ <https://orcid.org/0000-0002-3373-4671>

¹Universidad Científica del Sur. Lima, Perú.

²Universidad Privada de Tacna. Tacna, Perú.

³Universidad César Vallejo. Piura, Perú.

*Autor para la correspondencia. Correo electrónico: 100066171@cientifica.edu.pe

RESUMEN

Introducción: La hoja de *Erythroxylum coca*, se utiliza tradicionalmente en diversos países por sus bondades farmacológicas.

Objetivo: Comparar el efecto antibacteriano del extracto acuoso y alcohólico de hojas de *Erythroxylum coca* frente a *Streptococcus mutans* ATCC[®]35668[™] y *Lactobacillus acidophilus* ATCC[®]4356[™].

Métodos: Estudio experimental *in vitro*. Se obtuvo el extracto acuoso y alcohólico de *E. coca*. La muestra estuvo conformada por 20 placas petri para cada concentración y extracto evaluado. La media de los diámetros de los halos de inhibición, se expresaron en milímetros y se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis y el análisis *post hoc* de Dunn con ajuste de Bonferroni. La comparación de los efectos entre las 24 y 48 horas se realizó mediante el test Wilcoxon con un nivel de significancia del 5 %.

Resultados: La concentración alcohólica de 25 mg/mL fue más efectiva sobre *S. mutans*, al compararla con los otros grupos (p< 0,05). En el extracto alcohólico se observó

diferencias con la concentración de 50 mg/mL a las 24 y 48 horas frente a *S. mutans* ($p < 0,05$). Se observaron diferencias significativas al comparar el efecto inhibitorio del extracto acuoso de 75 mg/mL y 50 mg/mL a las 24 y 48 horas frente a *L. acidophilus* ($p < 0,05$) y para el extracto alcohólico las diferencias fueron estadísticamente significativas con las concentraciones de 50 mg/mL y 25 mg/mL ($p < 0,05$).

Conclusión: Existen diferencias en el efecto antibacteriano del extracto acuoso y alcohólico de las hojas de *E. coca* frente a *S. mutans* y *L. acidophilus*.

Palabras clave: antibacterianos; coca; *Streptococcus mutans*; *Lactobacillus acidophilus*.

ABSTRACT

Introduction: The *Erythroxylum coca* leaf is traditionally used in various countries for its pharmacological benefits.

Objective: To compare the antibacterial effect of the aqueous and alcoholic extract of *Erythroxylum coca* leaves against *Streptococcus mutans* ATCC®35668™ and *Lactobacillus acidophilus* ATCC®4356™.

Methods: Experimental in vitro study. The aqueous and alcoholic extract of *E. coca* was obtained. The sample consisted of 20 petri dishes for each concentration and extract evaluated. The mean diameters of the inhibition halos were expressed in millimeters and analyzed using the Kruskal-Wallis test and Dunn's post hoc analysis with Bonferroni adjustment. The comparison of the effects between 24 and 48 hours was carried out using the Wilcoxon test with a significance level of 5 %.

Results: The alcoholic concentration of 25 mg/mL was more effective on *S. mutans*, when compared to the other groups ($p < 0.05$). In the alcoholic extract, differences were observed with the concentration of 50 mg/mL at 24 and 48 hours against *S. mutans* ($p < 0.05$). Significant differences were observed when comparing the inhibitory effect of the aqueous extract of 75 mg/mL and 50 mg/mL at 24 and 48 hours against *L. acidophilus* ($p < 0.05$) and for the alcoholic extract the differences were statistically significant with concentrations of 50 mg/mL and 25 mg/mL ($p < 0.05$).

Conclusion: There are differences in the antibacterial effect of the aqueous and alcoholic extract of *E. coca* leaves against *S. mutans* and *L. acidophilus*.

Keywords: anti-bacterial agents; coca; *Streptococcus mutans*; *Lactobacillus acidophilus*.

Recibido: 12/04/2022

Aprobado: 08/07/2022

INTRODUCCIÓN

La caries dental es considerada la enfermedad bucal más prevalente en el mundo. Según datos globales actuales, aproximadamente 2 400 millones de personas adultas y entre el 60 % y 90 % de los escolares padecen esta enfermedad.^(1,2) Estos datos resaltan la relevancia de tomar acciones conjuntas y urgentes entre la comunidad científica y los integrantes del sistema de salud, no solo orientadas al control de la afección sino a promover prácticas preventivas que a mediano y largo plazo disminuyan su alta prevalencia.

La microbiota bucal alberga diversos géneros bacterianos en equilibrio, como los *Streptococcus* con sus diversas especies, entre las que destacan *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. salivarius*, *S. sobrinus*, *S. milleri*, entre otros; también se encuentran representantes de los géneros *Lactobacillus*, *Actinomyces* y *Bifidobacterium*, en concomitancia con los *Streptococos*, como los responsables de las lesiones cariosas en las superficies dentarias, al propiciar disbiosis en el ecosistema oral.^(3,4)

El *S. mutans* tiene mayor capacidad de formar biopelículas, a diferencia de otros *Streptococcus*; además, se sabe que junto al *Lactobacillus acidophilus* y por su metabolismo fermentativo de los carbohidratos provenientes de la dieta, son altos productores de ácido láctico, lo que ocasiona la disminución del pH salival.^(5,6) Estudios previos han reportado la presencia de *L. acidophilus* a nivel superficial y profundo de las lesiones de caries; favorecido principalmente por un polisacárido extracelular producido por *Streptococcus*, para formar la placa bacteriana.⁽⁷⁾ Esta problemática, ha incrementado el interés actual en la búsqueda de nuevas alternativas de tratamientos derivados de productos naturales.

Reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) establecen que aproximadamente el 80 % de la población mundial utiliza la medicina tradicional y complementaria para dar solución a sus principales problemas de salud. El estudio de derivados vegetales para usos curativos se le conoce como medicina herbolaria y es estudiada para conocer nuevos efectos terapéuticos más eficaces y con menor costo.^(8,9,10)

De hecho, la hoja de *Erythroxylum coca* (coca) es una de los recursos que se vienen estudiando para conocer sus diversos recursos fitogenéticos y farmacológicos.

E. coca es una planta utilizada en el Perú desde tiempos remotos. En su composición se han identificado metabolitos primarios tipo lípidos, proteínas, carbohidratos y secundarios, principalmente alcaloides, flavonoides y taninos. Se ha establecido que la cantidad de alcaloides depende de la variedad de *E. coca*; uno de los más estudiados es la cocaína.^(11,12,13) Respecto al potencial antibacteriano de la planta, un estudio precedente ha demostrado que el 5,7-trihidroxi-flavona es el flavonoide más eficaz al inhibir la enzima glucosiltransferasa, determinante en la composición de glucano para la formación de la placa bacteriana oral.⁽¹⁴⁾

La utilización de los productos de *E. coca* por la población es principalmente empírica desde hace muchos años, mediante masticación de las hojas, apósito e infusiones. El potencial farmacológico de este vegetal radica en su capacidad analgésica, antibacteriana, antiinflamatoria y anestésica.^(15,16) Al respecto, *Loyola* y otros,⁽¹⁷⁾ evaluaron la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Erythroxylum coca* Lam y *Schinus molle*, a concentraciones de 50 % y 75 % frente a *S. mutans* ATCC 25175; establecieron que en ambos extractos la concentración más alta tuvo mayor eficacia antibacteriana; sin embargo, dicho efecto no superó al de la clorhexidina, utilizada como control.

A pesar del auge de investigaciones en la búsqueda de nuevos fitoterapéuticos, aún existe un vacío del conocimiento respecto al potencial antimicrobiano de la hoja de *E. coca* sobre microorganismos de interés estomatológico. Al ser la caries dental unas de las enfermedades más prevalentes a nivel mundial, que afecta a todos los grupos etarios sin distinción, existe la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas con base en derivados naturales de menor costo, sin efectos colaterales y de fácil acceso para las poblaciones más necesitadas.

La presente investigación tiene como objetivo comparar el efecto antibacteriano del extracto acuoso y alcohólico de hojas secas de *E. coca* frente a *S. mutans* ATCC®35668™ y *L. acidophilus* ATCC®4356™.

MÉTODOS

Se realizó un estudio de enfoque cuantitativo, experimental *in vitro*, longitudinal y prospectivo, en el laboratorio de microbiología de la Universidad Científica del Sur, en el periodo comprendido entre el 12 de mayo del 2021 y el 28 de enero del 2022.

La investigación fue evaluada por el Comité Institucional de Ética en Investigación (CIEI) de la Universidad Científica del Sur (Código de registro: 695-2020-POS8).

La población, estuvo constituida por placas petri sembradas con cepas estandarizadas de *S. mutans* ATCC®35668™ y *L. acidophilus* ATCC®4356™, obtenidas de la *American Type Culture Collection* (ATCC), importadas por la empresa Genlab S.A.C. Para la muestra se tomó como referencia investigaciones previas,^(18,19) y estuvo conformada por 20 placas petri por cada concentración y tipo de extracto; resultaron 160 unidades experimentales.^(20,21)

Recolección de las hojas e identificación de la planta *E. coca*

Las hojas de coca para la obtención de los extractos acuoso, alcohólico y su identificación taxonómica, fueron proporcionadas por la Empresa Nacional de la Coca (ENACO S.A), sede Trujillo. La caracterización taxonómica fue corroborada en el *Herbarium Truxillense* (HUT) de la Universidad Nacional de Trujillo (UNT), con código de registro N°60841.

Obtención y tamizaje fitoquímico de los extractos etanólico y acuoso de *E. coca*

La obtención de los extractos y su tamizaje fitoquímico fue realizado en el Centro de Control Analítico (CCA) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM). Las hojas fueron secadas en una estufa (Memmert) a 40 °C durante 5 días y trituradas con un molino común. El extracto acuoso de hoja de coca se obtuvo mediante el método de ebullición en agua destilada con 300 g del material vegetal y el extracto etanólico, por el método de maceración en solvente alcohólico 70 ° con la misma cantidad de material. Posterior a la maceración por 7 días, los preparados se filtraron 3 veces con papel filtro (Whatman N° 1). A partir de los extractos acuoso y etanólico secos obtenidos mediante bomba de vacío Vacuubrand® modelo ME 4RNT se prepararon las concentraciones de 25 mg/mL, 50 mg/mL y 75 mg/mL, al momento de la experimentación.

El tamizaje fitoquímico cuantitativo se realizó por espectrofotometría UV-VIS para fenoles, taninos y flavonoides. El análisis y cuantificación de alcaloides totales se obtuvo por el método volumétrico.

Reactivación y estandarización de las cepas de *S. mutans*

ATCC®35668™ y *L. acidophilus* ATCC®4356™

Los cultivos bacterianos fueron reactivados 24 horas antes de la experimentación en caldo Mueller Hinton (Liofilchem®) y cultivadas en condiciones de aerobiosis a 36,5 °C en incubadora microbiológica ShellLab®.^(22,23,24) La estandarización del inóculo de ambas bacterias se realizó por turbidimetría en Espectrofotómetro Thermo Scientific® Genesys 150 y fue equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.⁽²⁵⁾

Evaluación del efecto antibacteriano

El efecto antibacteriano de los extractos fue determinado por el método estandarizado de difusión en disco según el *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI). Para el caso de *L. acidophilus* ATCC®4356™ la evaluación se realizó en Agar Mueller Hinton (Merck®) mientras que para *S. mutans* ATCC®35668™ se efectuó en Agar Mitis Salivarius (Liofilchem®). Se utilizó como control positivo para ambos microorganismos a gluconato de clorhexidina al 0,12 %.^(22,23,24,25) Las condiciones microbiológicas fueron; incubación en aerobiosis a 36,5 °C durante 24-48 horas en incubadora microbiológica ShellLab®. Los resultados fueron reportados como diámetros de las zonas (halos) de inhibición en milímetros (mm) medidos con un vernier mecánico marca Kamasa®.

La variable dependiente fue el efecto antibacteriano, expresado por el diámetro del halo de inhibición mediante el método de Kirby Bauer. Las variables independientes fueron: el tipo de extracto (acuoso o alcohólico), la concentración del extracto (25 mg/mL, 50 mg/mL o 75 mg/mL), el microorganismo (*S. mutans* ATCC®35668™ o *L. acidophilus* ATCC®4356™) y el tiempo (24 o 48 horas).

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se empleó el programa Stata para Mac OS en su versión 16.0 (Stata Corporation, College Station, Texas, EE. UU).

La normalidad y la homocedasticidad de la variable dependiente se verificó con la prueba de Shapiro-Wilk y Bartlett, respectivamente. Al no comprobarse ambos supuestos, se eligieron pruebas no paramétricas. Para identificar las diferencias de los valores de halos de inhibición entre los grupos según los extractos, cepas y concentraciones se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba *post hoc* de Dunn, con ajuste de

Bonferroni. Para la comparación entre los valores obtenidos a las 24 y 48 horas se aplicó la prueba de rangos con signo de Wilcoxon. Se adoptó un nivel de significación de 5 % para todas las pruebas.

RESULTADOS

En la tabla 1 se muestran los resultados promedios del diámetro de los halos de inhibición generados por los extractos acuoso y alcohólico de *E. coca* a distintas concentraciones sobre cultivos de *S. mutans* y *L. acidophilus*.

Los valores más altos de halos de inhibición fueron observados con el control positivo clorhexidina al 0,12 %. En el caso de la inhibición de los extractos se observó que a una mayor concentración, hubo un mayor efecto sobre la inhibición del crecimiento de las cepas estudiadas. La prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn mostraron diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos, cuando se compararon las concentraciones de los extractos frente a las bacterias evaluadas ($p < 0,05$).

Cuando se comparó el efecto de cada una de las concentraciones según el tipo de extracto sobre las cepas, se observó que en el caso de la concentración de 75 mg/mL del extracto acuoso sobre *S. mutans* fue similar al obtenido con el extracto alcohólico sobre *L. acidophilus* ($p > 0,05$). El efecto de la concentración de 50 mg/mL del extracto acuoso fue semejante al extracto alcohólico sobre *S. mutans*; el mismo patrón se observó para *L. acidophilus* ($p > 0,05$). Por otro lado, la concentración de 25 mg/mL del extracto alcohólico fue más efectiva sobre *S. mutans*, al compararla con los otros grupos ($p < 0,05$).

Tabla 1 – Halos de inhibición generados por las diferentes concentraciones de los extractos frente a *S. mutans* y *L. acidophilus*

Concentraciones	Halo de inhibición (mm)			
	Extracto acuoso		Extracto alcohólico	
	<i>S. mutans</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>L. acidophilus</i>
	Media \pm DE*	Media \pm DE*	Media \pm DE*	Media \pm DE*
75 mg/mL	24,19 \pm 0,76 ^{aA}	22,52 \pm 1,55 ^{aB}	24,84 \pm 0,81 ^{aC}	24,03 \pm 1,90 ^{aA}
50 mg/mL	21,88 \pm 1,26 ^{bA}	20,34 \pm 0,99 ^{bcB}	21,87 \pm 1,23 ^{bA}	20,27 \pm 1,47 ^{bB}
25 mg/mL	18,09 \pm 0,93 ^{cA}	17,60 \pm 1,25 ^{cbA}	21,44 \pm 0,90 ^{cB}	17,80 \pm 1,28 ^{cA}
Control	27,76 \pm 1,18 ^{dA}	26,30 \pm 1,94 ^{dB}	28,87 \pm 1,45 ^{dC}	27,20 \pm 1,73 ^{dAB}

*Prueba de Kruskal Wallis, seguida de prueba *post hoc* de Dunn con ajuste de Bonferroni ($p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes en superíndice en las columnas expresan diferencias significativas. Letras mayúsculas entre las filas expresan diferencias significativas.

DE: desviación estándar.

La comparación del efecto inhibitorio del crecimiento de *S. mutans* de los extractos a las 24 y 48 horas se reportan en la tabla 2. Los resultados mostraron que en el caso del extracto acuoso no se observaron diferencias significativas para ninguna de las concentraciones evaluadas a las 24 y 48 horas ($p > 0,05$). En el caso del extracto alcohólico solo se observaron diferencias entre la media de los halos de inhibición a las 24 y 48 horas para la concentración de 50 mg/mL ($p < 0,05$).

Tabla 2 –Halos de inhibición a las 24 y 48 horas, generados por las diferentes concentraciones de los extractos frente a *S. mutans*

Concentraciones	Halo de inhibición (mm) sobre <i>S. mutans</i>			
	Extracto acuoso		Extracto alcohólico	
	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
	Media \pm DE*	Media \pm DE*	Media \pm DE*	Media \pm DE*
75 mg/mL	24,36 \pm 0,66 ^a	24,01 \pm 0,83 ^a	24,80 \pm 0,83 ^a	24,89 \pm 0,81 ^a
50 mg/mL	21,96 \pm 1,40 ^a	21,81 \pm 1,14 ^a	22,65 \pm 0,95 ^a	21,10 \pm 0,98 ^b
25 mg/mL	18,35 \pm 0,89 ^a	17,84 \pm 0,92 ^a	21,36 \pm 0,86 ^a	21,50 \pm 0,96 ^a
Control	27,75 \pm 1,24 ^a	27,77 \pm 1,16 ^a	28,60 \pm 1,59 ^a	29,15 \pm 1,27 ^a

*Prueba de rangos con signo de Wilcoxon. Letras minúsculas diferentes en superíndice en las filas expresan diferencias significativas para la comparación entre las 24 y 48 horas para los extractos. DE: desviación estándar.

En el caso de *L. acidophilus*, se observaron diferencias significativas al comparar el efecto inhibitorio del extracto acuoso a concentraciones de 75 mg/mL y 50 mg/mL, a las 24 y 48 horas ($p < 0,05$). Para el extracto alcohólico las diferencias fueron significativas para las concentraciones de 50 mg/mL y 25 mg/mL ($p < 0,05$) (tabla 3).

Tabla 3 – Halos de inhibición a las 24 y 48 horas, generados por las diferentes concentraciones de los extractos frente a *L. acidophilus*.

Concentraciones	Halo de inhibición (mm) sobre <i>L. acidophilus</i>			
	Extracto acuoso		Extracto alcohólico	
	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
	Media \pm DE*	Media \pm DE*	Media \pm DE*	Media \pm DE*
75 mg/mL	23,54 \pm 1,26 ^a	21,50 \pm 1,08 ^b	24,33 \pm 0,78 ^a	23,74 \pm 1,97 ^a
50 mg/mL	20,92 \pm 1,01 ^a	19,77 \pm 0,54 ^b	21,48 \pm 0,84 ^a	19,06 \pm 0,78 ^b
25 mg/mL	17,81 \pm 1,31 ^a	17,39 \pm 1,18 ^a	18,30 \pm 1,31 ^a	17,30 \pm 1,07 ^b
Control	25,39 \pm 1,90 ^a	27,21 \pm 1,54 ^b	27,34 \pm 1,74 ^a	27,06 \pm 1,75 ^a

*Prueba de rangos con signo de Wilcoxon. Letras minúsculas diferentes en superíndice en las filas expresan diferencias significativas para la comparación entre las 24 y 48 horas para los extractos. DE: desviación estándar.

DISCUSIÓN

La caries dental es una de las enfermedades más prevalentes en el mundo, su ocurrencia tiene consecuencias funcionales, psicológicas y sociales nefastas en la población. Se ha establecido, que *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus* participan de manera activa en el inicio y progresión de la lesión de caries. En los últimos años, existe mayor interés en desarrollar nuevas alternativas de tratamientos derivados de productos naturales. Al respecto, *Erythroxylum coca* (coca) es una planta considerada medicinal debido a la gran cantidad de compuestos bioactivos que presenta y que diversas investigaciones han corroborado su potencial terapéutico.

Las hojas de coca contienen grandes cantidades de alcaloides y tropanos; el contenido total de estos compuestos difiere según su variedad y clima. A ese respecto, los estudios reportan que los niveles más altos del alcaloide de cocaína se obtienen de la especie *E. coca novogranatense*, entre 0,72 % y 0,77 %, diferente de las variedades Ipadu y boliviana, con valores entre 0,11 % y 0,63 % respectivamente.⁽¹¹⁾ También contienen mayor cantidad de otros alcaloides, flavonoides, fenoles y taninos, a diferencia de *E. coca* Lam.^(12,13) Investigaciones precedentes^(17,20,21,26,27) coinciden con lo determinado en el tamizaje fitoquímico cuantitativo de la presente investigación, en la cual se obtuvo que el extracto acuoso de *E. coca* contenía 51,5 mg/mL de alcaloides, 124,3 mg/mL de flavonoides, 94 900 µg de ácido gálico/ mL de fenoles totales y 0,0031 mg/mL de taninos. Respecto al extracto alcohólico de *E. coca*, este contenía 72,5 mg/mL de alcaloides, 245,9 mg/mL de flavonoides, 152 584 µg de ácido gálico/ mL de fenoles totales y 0,0041 mg/mL de taninos. Estos últimos compuestos son considerados importantes debido a que se les considera responsables del potencial antibacteriano de diversas plantas, incluidas *E. coca novogranatense* var. *Truxillense*, a los que se les puede relacionar sus propiedades antibacterianas.

Loyola D y otros,⁽¹⁷⁾ reportan el efecto antibacteriano del extracto etanólico de *E. coca* Lam en las concentraciones de 50 % y 75 % sobre *S. mutans*, formando halos de inhibición a las 24 horas de $10,1 \pm 0,7$ mm y $11,2 \pm 0,7$ mm, respectivamente; el efecto se incrementa a las 48 horas, con halos inhibitorios de $10,5 \pm 0,6$ mm y $11,3 \pm 0,7$ mm en cada concentración. Estos resultados son semejantes a los obtenidos en la presente investigación y los comunicados por Salcedo,⁽²⁶⁾ en el cual las concentraciones de 50 % y 100 % de *E. coca novogranatense* var. *Truxillense* y *E. coca* var. *Coca*, presentaron mayor efecto antibacteriano frente a *S. mutans*. Lo antes mencionado, tiene consistencia

debido a que, teóricamente se ha establecido que a mayor cantidad de principios activos, mayor efecto antibacteriano.

Se ha mencionado que la técnica de extracción y el solvente seleccionado, para la obtención de los metabolitos primarios y secundarios, en plantas medicinales, son importantes en la evaluación del efecto terapéutico de un producto vegetal, pues influirían en la captación de la mayor o menor cantidad de los compuestos bioactivos que puede corroborarse mediante el tamizaje fitoquímico cuantitativo. *Alvarado* y otros,⁽²⁷⁾ identificaron la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de *E. coca novogranatense* var *Truxillense* frente a *S. mutans* y *L. acidophilus*, en concentraciones de 25 µg/mL y 50 µg/mL. La inhibición reportada sobre *S. mutans* fue de 8,8 mm y 10,4 mm para ambas concentraciones respectivamente y para *L. acidophilus* la inhibición fue de 9,8 mm y 10 mm, respectivamente. Estos resultados difieren de los reportados en el presente estudio y podrían deberse al tipo de extracto utilizado (acuoso y alcohólico) y las características botánicas del vegetal.

Luna-Vílchez y otros,⁽²⁸⁾ evaluaron el potencial antimicrobiano de los extractos; acuoso, ácido y alcohólico de *E. coca* var *coca*. Determinaron que solo el extracto alcohólico mostró efectividad antifúngica, pero todos los extractos disminuyeron la velocidad de crecimiento de los hongos estudiados. Al respecto, en la presente investigación se encontró que el extracto alcohólico presentó mayor efecto antibacteriano, en comparación con el extracto acuoso frente a ambas bacterias. Esto se fundamenta en que se ha comunicado que los solventes orgánicos permiten mejor recuperación de compuestos bioactivos presentes en materiales vegetales secos.

A pesar de los resultados prometedores de esta investigación, es importante precisar que al ser un estudio experimental se requieren más investigaciones, para considerar el uso seguro de los extractos de coca por la población de manera directa o incorporada en productos orales dentro de los protocolos de terapia cariogénica.

Existen diferencias en el efecto antibacteriano del extracto acuoso y el extracto alcohólico de hojas de *Erythroxylum coca* (coca) frente a *Streptococcus mutans* ATCC®35668™ y *Lactobacillus acidophilus* ATCC®4356™.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Enfermedades y trastornos bucodentales. Ginebra: WHO; 2022. [acceso: 20/03/2020]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/oral-health>
2. Hong J, Whelton H, Douglas G, Kang J. Consumption frequency of added sugars and UK children's dental caries. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2018; 46(5):457–64. DOI: 10.1111/cdoe.12413
3. Gamboa F. Microbiological, Phenotypic, and Genotypic Characterization of *Streptococcus mutans*: Research Experiences. *Univ Odontol.* 2014; 33(71):65-73. DOI: 10.11144/Javeriana.uo33-71.icmf
4. Conrads G. About I. Pathophysiology of Dental Caries. *Monogr Oral Sci.* 2018; 27:1–10. DOI: 10.1159/000487826
5. Xie Z, Zhang Z, Liu L, Liu X, Chen Y. Secondary metabolites from *Streptococcus mutans* and their ecological roles in dental biofilm. *Chin J Biotech.* 2017; 33(9):1547-1554. DOI: 10.13345/j.cjb.170046
6. Elgamily H, Safy R, Makharita R. Influence of medicinal plant extracts on the growth of oral pathogens *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus*: an *in-vitro* study. *Maced J Med Sci.* 2019; 7(14):2328–34. DOI: 10.3889/oamjms.2019.653
7. Mei ML, Chu CH, Low KH, Che CM, Man Lo EC. Caries arresting effect of silver diamine fluoride on dentine carious lesion with *S. mutans* and *L. acidophilus* dual-species cariogenic biofilm. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2013; 18(6): e824– e831. DOI: 10.4317/medoral.18831
8. Sisay M, Bussa N, Gashaw T, Mengistu G. Investigating In Vitro Antibacterial Activities of Medicinal Plants Having Folkloric Repute in Ethiopian Traditional Medicine. *J Evid Based Integr Med.* 2019; 24:2515690X19886276. DOI: 10.1177/2515690X19886276
9. Kristoffersen AE, Stub T, Broderstad AR, Hansen AH. Use of traditional and complementary medicine among Norwegian cancer patients in the seventh survey of the Tromsø study. *BMC Complement Altern Med.* 2019; 19(1):341. DOI: 10.1186/s12906-019-2762-7
10. Heinrich M, Anagnostou S. From Pharmacognosia to DNA Based Medicinal Plant Authentication Pharmacognosy through the Centuries. *Planta Med.* 2017; 83(14-15):1110–1116. DOI: 10.1055/s-0043-108999

11. Restrepo DA, Saenz E, Jara OA, Calixto IF, Rodríguez S, Zulete P, et al. Erythroxyllum in Focus: An Interdisciplinary Review of an Overlooked Genus. *Molecules*. 2019; 24(20):3788. DOI: 10.3390/molecules24203788
12. Gamarra V, Fuertes C, Chávez N, Contreras D, Goya E, Huamantumba K, et al. Metabolitos detectados en las hojas de Erythroxyllum coca Lam y Erythroxyllum novogranatense (Morris) Hieron y evaluación de sus propiedades biológicas mediante bioensayos. *Rev Peru Med Integrativa*. 2017; 2(4):828-34. DOI: 10.26722/rpmi.2017.24.70
13. Scarpetta L. Reconocimiento Fitoquímico y etnobotánico de Erythroxyllum coca en la población Nasa del Departamento del Cauca – Colombia. *Rev Crit Lib Jurid*. 2017; 14(1):21-46. DOI: 10.18041/1794-7200/criteriojuridico.2017.v14n1.1601
14. Harun M, Ramadhany S, Suryajaya F. Streptococcus Colonial Growth of Dental Plaque Inhibition Using Flavonoid Extract of Ants Nest (*Myrmecodia pendans*): An in Vitro Study. *Pesqui. Bras. Odontopediatria Clín Integr*. 2019; 19:e4250. DOI: 10.4034/pboci.2019.191.19
15. Biondich A, Joslin J. Coca: High Altitude Remedy of the Ancient Incas. *Wilderness Environ Med*. 2015; 26(4):567–571. DOI: 10.1016/j.wem.2015.07.006
16. Weil A. The therapeutic value of coca in contemporary medicine. *J Ethnopharmacol*. 1981; 3(2-3):367–376. DOI: 10.1016/0378-8741(81)90064-7
17. Loyola D, Mendoza R, Chiong L, Rueda M, Alvítez-Temoche D, Gallo W. Ethanol extract of *Schinus molle* L. (Molle) and *Erythroxyllum coca* Lam (Coca): Antibacterial Properties at Different Concentrations against *Streptococcus mutans*: An In Vitro Study. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2020; 10(5):579-584. DOI: 10.4103/jispcd.JISPCD_237_20
18. Salman HA, Venkatesh S, Senthilkumar R, Gnanesh Kumar BS, Ali AM. Determination of antibacterial activity and metabolite profile of *Ruta graveolens* against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *J Lab Physicians*. 2018; 10(3):320-325. DOI: 10.4103/JLP.JLP_160_17
19. Karadağlıoğlu Öİ, Ulusoy N, Başer KHC, Hanoğlu A, Şık İ. Antibacterial Activities of Herbal Toothpastes Combined with Essential Oils against *Streptococcus mutans*. *Pathogens*. 2019; 8(1):20. DOI: 10.3390/pathogens8010020
20. Enciso S. Actividad antibacteriana del extracto de *Solanum tuberosum* “Tocosh” y Clorhexidina al 0.12% sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. In vitro [Tesis de título de Cirujano Dentista]. Lima: Universidad Nacional Federico Villareal,

- Facultad de Odontología; 2019. [acceso: 10/04/2020]. Disponible en:
<http://repositorio.unfv.edu.pe/handle/UNFV/3949>
21. Castro M. Evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana y citotoxicidad de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze “TARA” frente a *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia, Facultad de Estomatología; 2017. [acceso: 10/04/2020]. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.12866/5973>
22. Nassar H, Gregory R. Biofilm sensitivity of seven *Streptococcus mutans* strains to different fluoride levels. *J Oral Microbiol*. 2017; 9(1):1328265. DOI: 10.1080/20002297.2017.1328265
23. Kim YH, Lee SY. Identification of non-streptococcal organisms from human dental plaque grown on the *Streptococcus*-selective medium mitis-salivarius agar. *Arch Oral Biol*. 2015; 60(2):267–271. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2014.11.002
24. Yoo HJ, Jwa SK. Inhibitory effects of β -caryophyllene on *Streptococcus mutans* biofilm. *Arch Oral Biol*. 2018; 88:4246. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2018.01.009
25. Patrzalek M, Kosecka M, Lisowska K, Trela M, Kot M, Kot M, et al. Preliminary evaluation of application of a 3-dimensional network structure of siloxanes Dergall preparation on chick embryo development and microbiological status of eggshells. *Poultry Science*. 2020; 99(3):1581-1590. DOI: 10.1016/j.psj.2019.10.079
26. Salcedo MR. Comparación del efecto antibacteriano del extracto etanólico del *Erythroxylum novogranatense* var. *Truxillense* y *Erythroxylum coca* var *coca* frente al *Streptococcus mutans* [Tesis de título de Cirujano Dentista]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Odontología; 2018. [acceso: 10/04/2020]. Disponible en:
<https://hdl.handle.net/20.500.12672/9308>
27. Alvarado V, Moromi H. Plantas medicinales: Efecto antibacteriano *in vitro* de *Plantago major* L, *Erythroxylum novogranatense* Plowman var *truxillense* y *Camellia sinensis* sobre bacterias de importancia estomatológica. *Odontol Sanmarquina*. 2010; 13(2):21-25. DOI: 10.15381/os.v13i2.2853
28. Luna-Vílchez M, Díaz-Vélez C, Baca-Dejo 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*. *Horiz Med*. 2017 [acceso: 16/03/2022]; 17(1):25-30. Disponible en:
<http://www.scielo.org.pe/pdf/hm/v17n1/a05v17n1.pdf>

10. Versión inicial enviada a publicar

Artículo de investigación

Efecto antibacteriano de dos extractos de *Erythroxylum coca* frente a *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus*

Antibacterial effect of two extracts of *Erythroxylum coca* against *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus*

Bryan Alexis Cossio-Alva^{1*} <https://orcid.org/0000-0003-1568-5324>

Eliberto Ruiz-Ramirez¹ <https://orcid.org/0000-0002-5340-7168>

Marco Sánchez-Tito² <https://orcid.org/0000-0001-5886-9372>

Miguel Angel Ruiz-Barrueto³ <https://orcid.org/0000-0002-3373-4671>

¹Universidad Científica del Sur. Lima, Perú.

²Universidad Privada de Tacna. Tacna, Perú.

³Universidad César Vallejo. Piura, Perú.

* Autor para la correspondencia: 100066171@cientifica.edu.pe

RESUMEN

Introducción: La hoja de *Erythroxylum coca*, se utiliza tradicionalmente en diversos países por sus bondades farmacológicas.

Objetivo: Comparar el efecto antibacteriano del extracto acuoso y alcohólico de hojas de *Erythroxylum coca* “coca” frente a *Streptococcus mutans* ATCC[®]35668[™] y *Lactobacillus acidophilus* ATCC[®]4356[™].

Métodos: Estudio experimental *in vitro* y longitudinal. Se obtuvo el extracto acuoso y alcohólico de *E. coca*. La muestra estuvo conformada por 20 placas petri para cada concentración y extracto evaluado. La media de los diámetros de los halos de inhibición se expresaron en milímetros y se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis y el análisis post hoc de Dunn con ajuste de Bonferroni. La comparación de los efectos entre las 24 y 48 horas se realizó mediante el test Wilcoxon con un nivel de significancia del 5 %.

Resultados: La concentración alcohólica de 25 mg/mL fue más efectiva sobre *S. mutans*, al compararla con los otros grupos ($p < 0,05$). En el extracto alcohólico se observó

diferencias con la concentración de 50 mg/mL a las 24 y 48 horas frente a *S. mutans* ($p < 0,05$). Se observaron diferencias significativas al comparar el efecto inhibitorio del extracto acuoso de 75 mg/mL y 50 mg/mL a las 24 y 48 horas frente a *L. acidophilus* ($p < 0,05$) y para el extracto alcohólico las diferencias fueron estadísticamente significativas con las concentraciones de 50 mg/mL y 25 mg/mL ($p < 0,05$).

Conclusión: Existen diferencias en el efecto antibacteriano del extracto acuoso y alcohólico de las hojas de *E. coca* frente a *S. mutans* y *L. acidophilus*.

Palabras clave: antibacterianos; coca; *Streptococcus mutans*; *Lactobacillus acidophilus*.

ABSTRACT

Introduction: The *Erythroxylum coca* leaf is traditionally used in various countries for its pharmacological benefits.

Objective: To compare the antibacterial effect of the aqueous and alcoholic extract of *Erythroxylum coca* “coca” leaves against *Streptococcus mutans* ATCC®35668™ and *Lactobacillus acidophilus* ATCC®4356™.

Methods: Experimental in vitro and longitudinal study. The aqueous and alcoholic extract of *E. coca* was obtained. The sample consisted of 20 petri dishes for each concentration and extract evaluated. The mean diameters of the inhibition halos were expressed in millimeters and analyzed using the Kruskal-Wallis test and Dunn's post hoc analysis with Bonferroni adjustment. The comparison of the effects between 24 and 48 hours was carried out using the Wilcoxon test with a significance level of 5%.

Results: The alcoholic concentration of 25 mg/mL was more effective on *S. mutans*, when compared to the other groups ($p < 0,05$). In the alcoholic extract, differences were observed with the concentration of 50 mg/mL at 24 and 48 hours against *S. mutans* ($p < 0,05$). Significant differences were observed when comparing the inhibitory effect of the aqueous extract of 75 mg/mL and 50 mg/mL at 24 and 48 hours against *L. acidophilus* ($p < 0,05$) and for the alcoholic extract the differences were statistically significant with concentrations of 50 mg/mL and 25 mg/mL ($p < 0,05$).

Conclusion: There are differences in the antibacterial effect of the aqueous and alcoholic extract of *E. coca* leaves against *S. mutans* and *L. acidophilus*.

Keywords: anti-bacterial agents; coca; *Streptococcus mutans*; *Lactobacillus acidophilus*.

INTRODUCCIÓN

La caries dental es considerada la patología bucal más prevalente en el mundo. Según datos globales actuales, aproximadamente 2400 millones de personas adultas y entre el 60 – 90% de los escolares padecen esta enfermedad.^(1,2) Estos datos resaltan la relevancia de tomar acciones conjuntas y urgentes entre la comunidad científica y los integrantes del sistema de salud, no solo orientadas al control de la afección sino a promover prácticas preventivas que a mediano y largo plazo disminuyan su alta prevalencia.

La microbiota bucal alberga diversos géneros bacterianos en equilibrio, como los *Streptococcus* con sus diversas especies entre las que destacan *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. salivarius*, *S. sobrinus*, *S. milleri*, entre otros; también encontramos representantes de los géneros; *Lactobacillus*, *Actinomyces* y *Bifidobacterium*, en concomitancia con los *Streptococos*, como los responsables de las lesiones cariosas en las superficies dentarias al propiciar disbiosis en el ecosistema oral.^(3,4)

El *S. mutans* tiene mayor capacidad de formar biopelículas a diferencia de otros *Streptococcus*; además, se sabe que junto al *Lactobacillus acidophilus* y por su metabolismo fermentativo de los carbohidratos provenientes de la dieta, son altos productores de ácido láctico lo que ocasiona la disminución del pH salival.^(5,6) Estudios previos han reportado la presencia de *L. acidophilus* a nivel superficial y profunda de lesiones de caries; favorecido principalmente por un polisacárido extracelular producido por *Streptococcus* para formar placa bacteriana.⁽⁷⁾ Esta problemática, ha incrementado el interés actual en la búsqueda de nuevas alternativas de tratamientos derivados de productos naturales.

Reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) establecen que aproximadamente el 80% de la población mundial utiliza la medicina tradicional y/o la medicina complementaria para dar solución a sus principales problemas de salud. El estudio de derivados vegetales para usos curativos se le conoce como *medicina herbolaria*, siendo estudiada para conocer nuevos efectos terapéuticos, más eficaces y con menor costo.^(8,9,10) De hecho, la hoja de *Erythroxylum coca* "coca" es una de los recursos que se vienen estudiando para conocer sus diversos recursos fitogenéticos y farmacológicos.

E. coca, es una planta utilizada en el Perú desde tiempos remotos. En su composición se han identificado metabolitos primarios tipo lípidos, proteínas, carbohidratos y secundarios principalmente alcaloides, flavonoides y taninos. Se ha establecido que la cantidad de alcaloides dependerá de la variedad de *E. coca*; siendo el alcaloide más

estudiado la cocaína.^(11,12,13) Respecto al potencial antibacteriano de la planta un estudio precedente ha demostrado que el 5,7-trihidroxi-flavona es el flavonoide más eficaz al inhibir la enzima glucosiltransferasa, determinante en la composición de glucano para la formación de placa bacteriana a nivel oral.⁽¹⁴⁾

La utilización de los productos de *E. coca* por la población es principalmente empírica desde hace muchos años mediante masticación de las hojas, apósito e infusiones. El potencial farmacológico de este vegetal radica en su capacidad analgésica, antibacteriana, antiinflamatoria y anestésica.^(15,16) Al respecto, Loyola *et al*,⁽¹⁷⁾ evaluaron la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Erythroxylum coca* Lam y *Schinus molle* L, a concentraciones de 50% y 75% frente a *S. mutans* ATCC 25175, estableciendo que en ambos extractos la concentración más alta tuvo mayor eficacia antibacteriana; sin embargo, dicho efecto no superó al de la Clorhexidina utilizado como control.

A pesar del auge de investigaciones en la búsqueda de nuevos fitoterapéuticos, aún existe un vacío del conocimiento respecto al potencial antimicrobiano de la hoja de *E. coca* “coca” sobre microorganismos de interés estomatológico. Siendo la caries dental unas de las enfermedades más prevalentes a nivel mundial, que afecta a todos los grupos etáreos sin distinción de ninguna índole, existe la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas a base de derivados naturales de menor costo, sin efectos colaterales y de fácil acceso para las poblaciones más necesitadas. En ese sentido, la presente investigación tuvo como objetivo comparar el efecto antibacteriano del extracto acuoso y alcohólico de hojas secas de *E. coca* “coca” frente a *S. mutans* ATCC®35668TM y *L. acidophilus* ATCC®4356TM.

MÉTODOS

Se realizó un estudio de enfoque cuantitativo, experimental *in vitro*, longitudinal y prospectivo. La investigación fue evaluada por el Comité Institucional de Ética en Investigación (CIEI) de la Universidad Científica del Sur (Código de registro: 695-2020-POS8). La población, estuvo constituida por placas petri sembradas con cepas estandarizadas de *S. mutans* ATCC®35668TM y *L. acidophilus* ATCC®4356TM. Para la muestra se tomó como referencia investigaciones previas, y estuvo conformada por 20 placas petri por cada concentración y tipo de extracto, haciendo un total de 160 unidades experimentales.^(18,19)

Recolección de las hojas e identificación de la planta *E. coca* “coca”

Las hojas de coca para la obtención de los extractos acuoso, alcohólico y su identificación taxonómica fueron proporcionadas por la Empresa Nacional de la Coca (ENACO S.A) sede Trujillo. Sin embargo, la caracterización taxonómica fue corroborada en el *Herbarium Truxillense* (HUT) de la Universidad Nacional de Trujillo (UNT) con código de registro N°60841.

Obtención y tamizaje fitoquímico de los extractos etanólico y acuoso de *E. coca* “coca”

La obtención de los extractos y su tamizaje fitoquímico fue realizado en el Centro de Control Analítico (CCA) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM). El extracto acuoso de hoja de coca se obtuvo mediante el método de ebullición en agua destilada y el extracto etanólico por el método de maceración en solvente orgánico. El tamizaje fitoquímico cuantitativo se realizó por espectrofotometría UV-VIS para fenoles, taninos y flavonoides. El análisis y cuantificación de alcaloides totales se obtuvo por el método volumétrico. A partir de los extractos acuoso y etanólico secos obtenidos mediante bomba de vacío Vacuubrand® modelo ME 4RNT se prepararon las concentraciones de 25mg/mL, 50mg/mL y 75mg/mL al momento de la experimentación.

Reactivación y estandarización de las cepas de *S. mutans* ATCC®35668™ y *L. acidophilus* ATCC®4356™

Los cultivos bacterianos evaluados correspondieron a cepas ATCC certificadas obtenidas de la empresa Genlab S.A.C. en estado liofilizado. Fueron reactivadas 24 horas antes de la experimentación en caldo Mueller Hinton (Liofilchem®) y cultivadas en condiciones de aerobiosis a 36,5 °C en incubadora microbiológica ShelLab®.^(20,21,22) La estandarización del inóculo de ambas bacterias se realizó por turbidimetría en Espectrofotómetro Thermo Scientific® Genesys 150 y fue equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.⁽²³⁾

Evaluación del efecto antibacteriano

El efecto antibacteriano de los extractos fue determinado por el método estandarizado de difusión en disco según el *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI). Para el caso de *L. acidophilus* ATCC®4356™ la evaluación se realizó en Agar Mueller Hinton (Merck®) mientras que para *S. mutans* ATCC®35668™ se efectuó en Agar Mitis Salivarius (Liofilchem®). Se utilizó como control positivo para ambos microorganismos a Gluconato de Clorhexidina al 0,12%.^(20,21,22,23) Las condiciones microbiológicas fueron; incubación

en aerobiosis a 36,5 °C durante 24 – 48 horas en incubadora microbiológica ShellLab®. Los resultados obtenidos fueron reportados como diámetros de las zonas (halos) de inhibición en milímetros (mm) medidos con un vernier mecánico marca Kamasa®.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se empleó el programa Stata para Mac OS en su versión 16.0 (Stata Corporation, College Station, Texas, EE.UU). La normalidad y la homocedasticidad de los datos se verificó con la prueba de Shapiro-Wilk y Bartlett, respectivamente. Al no comprobarse los supuestos, se eligieron pruebas no paramétricas. Para identificar las diferencias de los valores de halos de inhibición entre los grupos según los extractos, cepas y concentraciones se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba post hoc de Dunn con ajuste de Bonferroni. Para la comparación entre los valores obtenidos a las 24 y 48 horas se aplicó la prueba de rangos con signo de Wilcoxon. Se adoptó un nivel de significancia de 5 % para todas las pruebas.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se muestra los resultados promedios del diámetro de los halos de inhibición generados por los extractos acuoso y alcohólico de *E. coca* a distintas concentraciones sobre cultivos de *S. mutans* y *L. acidophilus*. Los valores más altos de halos de inhibición fueron observados con el control positivo clorhexidina al 0,12%. En el caso de la inhibición de los extractos se observó que a una mayor concentración, hubo un mayor efecto sobre la inhibición del crecimiento de las cepas estudiadas. La prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn mostraron diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos cuando se compararon las concentraciones de los extractos frente a las bacterias evaluadas ($p < 0,05$). Cuando se comparó el efecto de cada una de las concentraciones según el tipo de extracto sobre las cepas, se observó que en el caso de la concentración de 75 mg/mL del extracto acuoso sobre *S. mutans* fue similar al obtenido con el extracto alcohólico sobre *L. acidophilus* ($p > 0,05$). El efecto de la concentración de 50 mg/mL del extracto acuoso fue semejante al extracto alcohólico sobre *S. mutans*; el mismo patrón se observó para *L. acidophilus* ($p > 0,05$). Por otro lado, la concentración de 25 mg/mL del extracto alcohólico fue más efectiva sobre *S. mutans*, al compararla con los otros grupos ($p < 0,05$).

Tabla 1 – Halos de inhibición generados por las diferentes concentraciones de los extractos frente a *S. mutans* y *L. acidophilus*.

Concentraciones	Halo de inhibición (mm)			
	Extracto acuoso		Extracto alcohólico	
	<i>S. mutans</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>L. acidophilus</i>
	Media ± DE*	Media ± DE*	Media ± DE*	Media ± DE*
75mg/mL	24,19 ± 0,76 ^{aA}	22,52 ± 1,55 ^{aB}	24,84 ± 0,81 ^{aC}	24,03 ± 1,90 ^{aA}
50mg/mL	21,88 ± 1,26 ^{bA}	20,34 ± 0,99 ^{bcB}	21,87 ± 1,23 ^{bA}	20,27 ± 1,47 ^{bB}
25mg/mL	18,09 ± 0,93 ^{cA}	17,60 ± 1,25 ^{cbA}	21,44 ± 0,90 ^{cB}	17,80 ± 1,28 ^{cA}
Control	27,76 ± 1,18 ^{dA}	26,30 ± 1,94 ^{dB}	28,87 ± 1,45 ^{dC}	27,20 ± 1,73 ^{dAB}

* Prueba de Kruskal Wallis, seguida de prueba post hoc de Dunn con ajuste de Bonferroni (P<0,05). Letras minúsculas diferentes en superíndice en las columnas expresan diferencias significativas. Letras mayúsculas entre la filas expresan diferencias significativas. DE: desviación estándar.

La comparación del efecto inhibitorio del crecimiento de *S. mutans* de los extractos a las 24 y 48 horas se reportan en la Tabla 2. Los resultados mostraron que en el caso del extracto acuoso no se observaron diferencias significativas para ninguna de las concentraciones evaluadas a las 24 y 48 horas (p>0,05). En el caso del extracto alcohólico solo se observó diferencias entre la media de los halos de inhibición a las 24 y 48 horas para la concentración de 50 mg/mL (p<0,05).

Tabla 2 – Halos de inhibición a las 24 y 48 horas generados por las diferentes concentraciones de los extractos frente a *S. mutans*.

Concentraciones	Halo de inhibición (mm) sobre <i>S. mutans</i>			
	Extracto acuoso		Extracto alcohólico	
	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
	Media ± DE*	Media ± DE*	Media ± DE*	Media ± DE*
75 mg/mL	24,36 ± 0,66 ^a	24,01 ± 0,83 ^a	24,80 ± 0,83 ^a	24,89 ± 0,81 ^a
50 mg/mL	21,96 ± 1,40 ^a	21,81 ± 1,14 ^a	22,65 ± 0,95 ^a	21,10 ± 0,98 ^b
25 mg/mL	18,35 ± 0,89 ^a	17,84 ± 0,92 ^a	21,36 ± 0,86 ^a	21,50 ± 0,96 ^a
Control	27,75 ± 1,24 ^a	27,77 ± 1,16 ^a	28,60 ± 1,59 ^a	29,15 ± 1,27 ^a

* Prueba de rangos con signo de Wilcoxon. Letras minúsculas diferentes en superíndice en las filas expresan diferencias significativas para la comparación entre las 24 y 48 horas para los extractos. DE: desviación estándar.

En el caso de *L. acidophilus*, se observaron diferencias significativas al comparar el efecto inhibitorio del extracto acuoso a concentraciones de 75 mg/mL y 50 mg/mL a las 24 y 48 horas (p<0,05). Para el extracto alcohólico las diferencias fueron significativas para las concentraciones de 50 mg/mL y 25 mg/mL (p<0,05) (Tabla 3).

Tabla 3 – Halos de inhibición a las 24 y 48 horas generados por las diferentes concentraciones de los extractos frente a *L. acidophilus*.

Concentraciones	Halo de inhibición (mm) sobre <i>L. acidophilus</i>			
	Extracto acuoso		Extracto alcohólico	
	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
	Media ± DE*	Media ± DE*	Media ± DE*	Media ± DE*
75 mg/mL	23,54 ± 1,26 ^a	21,50 ± 1,08 ^b	24,33 ± 0,78 ^a	23,74 ± 1,97 ^a
50 mg/mL	20,92 ± 1,01 ^a	19,77 ± 0,54 ^b	21,48 ± 0,84 ^a	19,06 ± 0,78 ^b
25 mg/mL	17,81 ± 1,31 ^a	17,39 ± 1,18 ^a	18,30 ± 1,31 ^a	17,30 ± 1,07 ^b
Control	25,39 ± 1,90 ^a	27,21 ± 1,54 ^b	27,34 ± 1,74 ^a	27,06 ± 1,75 ^a

* Prueba de rangos con signo de Wilcoxon. Letras minúsculas diferentes en superíndice en las filas expresan diferencias significativas para la comparación entre las 24 y 48 horas para los extractos. DE: desviación estándar.

DISCUSIÓN

La caries dental es una de las enfermedades más prevalentes en el mundo, su ocurrencia tiene consecuencias funcionales, psicológicas y sociales nefastas en la población. Se ha establecido, que *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus* participan de manera activa en el inicio y progresión de la lesión de caries. En los últimos años, existe mayor interés en desarrollar nuevas alternativas de tratamientos derivados de productos naturales. Al respecto, *Erythroxylum coca* “coca” es una planta considerada medicinal debido a la gran cantidad de compuestos bioactivos que presenta y que diversas investigaciones han corroborado su potencial terapéutico.

Las hojas de coca contienen grandes cantidades de alcaloides y tropanos, el contenido total de estos compuestos difiere según su variedad y clima. A ese respecto, los estudios reportan que los niveles más altos del alcaloide de cocaína se obtienen de la especie *E. coca novogranatense* entre 0,72% y 0,77%, presentando diferencias con las variedades Ipadu y boliviana con valores entre 0,11% y 0,63% respectivamente.⁽¹¹⁾ Que también contienen mayor cantidad de otros alcaloides, flavonoides, fenoles y taninos a diferencia de *E. coca* Lam.^(12,13) Investigaciones precedentes coinciden con lo determinado en el tamizaje fitoquímico cuantitativo de la presente investigación donde se obtuvo que el extracto acuoso de *E. coca* contenía 51,5 mg/mL de alcaloides, 124,3 mg/mL de flavonoides, 94900 µg ácido gálico/mL de fenoles totales y 0,0031 mg/mL de taninos; ahora bien, respecto al extracto alcohólico de *E. coca*, este contenía 72,5 mg/mL de alcaloides, 245,9 mg/mL de flavonoides, 152584 µg ácido gálico/mL de fenoles totales y 0,0041 mg/mL de taninos. Estos últimos compuestos son considerados importantes

debido a que se les considera responsables del potencial antibacteriano de diversas plantas incluidas *E. coca novogranatense* var. *Truxillense*, a los que se les puede relacionar sus propiedades antibacterianas.^(17,18,19,24,25)

Loyola y otros,⁽¹⁷⁾ reportaron el efecto antibacteriano del extracto etanólico de *E. coca Lam* en las concentraciones de 50 % y 75 % sobre *S. mutans*, formando halos de inhibición a las 24 horas de $10,1 \pm 0,7$ mm y $11,2 \pm 0,7$, respectivamente; incrementándose el efecto a las 48 horas con halos inhibitorios de $10,5 \pm 0,6$ mm y $11,3 \pm 0,7$ mm en cada concentración. Estos resultados son semejantes a los obtenidos en la presente investigación y los comunicados por Salcedo,⁽²⁴⁾ donde las concentraciones de 50% y 100% de *E. coca novogranatense* var. *Truxillense* y *E. coca* var. *Coca*, presentaron mayor efecto antibacteriano frente a *S. mutans*. Lo antes mencionado, tiene consistencia debido a que, teóricamente se ha establecido que a mayor cantidad de principios activos, mayor efecto antibacteriano.

Se ha mencionado, que la técnica de extracción y el solvente seleccionado para la obtención de los metabolitos primarios y secundarios en plantas medicinales son importantes en la evaluación del efecto terapéutico de un producto vegetal, pues influirían en la captación de la mayor o menor cantidad de los compuestos bioactivos que puede corroborarse mediante el tamizaje fitoquímico cuantitativo. Alvarado y otros,⁽²⁵⁾ identificaron la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de *E. coca novogranatense* var *Truxillense* frente a *S. mutans* y *L. acidophilus* en concentraciones de 25 µg/mL y 50 µg/mL. La inhibición reportada sobre *S. mutans* fue de 8,8 mm y 10,4 mm para ambas concentraciones respectivamente y para *L. acidophilus* la inhibición fue de 9,8 mm y 10 mm, respectivamente. Estos resultados difieren de los reportados en el presente estudio, y podrían deberse al tipo de extracto utilizado (acuoso y alcohólico) y las características botánicas del vegetal.

Luna-Vílchez y otros,⁽²⁶⁾ evaluaron el potencial antimicrobiano de los extractos; acuoso, ácido y alcohólico de *E. coca* var *coca*. Determinaron que solo el extracto alcohólico mostró efectividad antifúngica pero todos los extractos disminuyeron la velocidad de crecimiento de los hongos estudiados. Al respecto, en la presente investigación se encontró que el extracto alcohólico presentó mayor efecto antibacteriano en comparación con el extracto acuoso frente a ambas bacterias. Esto se fundamentaría en que se ha comunicado que los solventes orgánicos permiten una mejor recuperación de compuestos bioactivos presentes en materiales vegetales secos.

A pesar de los resultados prometedores de esta investigación, es importante precisar que al ser un estudio experimental se requieren más investigaciones para considerar el uso seguro de los extractos de coca por la población de manera directa o incorporada en productos orales dentro de los protocolos de terapia cariogénica.

En base a lo experimentado se concluye que existen diferencias en el efecto antibacteriano del extracto acuoso y el extracto alcohólico de hojas de *Erythroxylum coca* “coca” frente a *Streptococcus mutans* ATCC® 35668™ y *Lactobacillus acidophilus* ATCC® 4356™.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Who: World Health Organization. Ginebra: Who [acceso: 20/03/2020]. Enfermedades y trastornos bucodentales [aprox. 1 pantalla]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/oral-health>.
- 2.- Hong J, Whelton H, Douglas G, Kang J. Consumption frequency of added sugars and UK children's dental caries. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2018; 46(5):457–464. DOI: <https://doi.org/10.1111/cdoe.124133>
- 3.- Gamboa F. Microbiological, Phenotypic, and Genotypic Characterization of *Streptococcus mutans*: Research Experiences. *Univ Odontol*. 2014; 33(71):65-73. DOI: <https://doi.org/10.11144/Javeriana.uo33-71.icmf>
- 4.- Conrads G. About I. Pathophysiology of Dental Caries. *Monogr Oral Sci*. 2018; 27:1–10. DOI: <https://doi.org/10.1159/000487826>
- 5.- Xie Z, Zhang Z, Liu L, Liu X, Chen Y. Secondary metabolites from *Streptococcus mutans* and their ecological roles in dental biofilm. *Chin J Biotech*. 2017; 33(9):1547-1554. DOI: <https://doi.org/10.13345/j.cjb.170046>
- 6.- Elgamily H, Safy R, Makharitya R. Influence of medicinal plant extracts on the growth of oral pathogens *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus*: an *in-vitro* study. *Maced J Med Sci*. 2019; 7(14):2328–2334. DOI: <https://doi.org/10.3889/oamjms.2019.653>
- 7.- Mei ML, Chu CH, Low KH, Che CM, Man Lo EC. Caries arresting effect of silver diamine fluoride on dentine carious lesion with *S. mutans* and *L. acidophilus* dual-species cariogenic biofilm. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2013; 18(6): e824– e831. DOI: <https://doi.org/10.4317/medoral.18831>
- 8.- Sisay M, Bussa N, Gashaw T, Mengistu G. Investigating In Vitro Antibacterial Activities of Medicinal Plants Having Folkloric Repute in Ethiopian Traditional

- Medicine. *J Evid Based Integr Med.* 2019; 24:2515690X19886276. DOI: <https://doi.org/10.1177/2515690X19886276>
- 9.- Kristoffersen AE, Stub T, Broderstad AR, Hansen AH. Use of traditional and complementary medicine among Norwegian cancer patients in the seventh survey of the Tromsø study. *BMC Complement Altern Med.* 2019; 19(1):341. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2762-7>
- 10.- Heinrich M, Anagnostou S. From Pharmacognosia to DNA Based Medicinal Plant Authentication Pharmacognosy through the Centuries. *Planta Med.* 2017; 83(14-15):1110–1116. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0043-108999>
- 11.- Restrepo DA, Saenz E, Jara OA, Calixto IF, Rodríguez S, Zulete P, et al. *Erythroxylum* in Focus: An Interdisciplinary Review of an Overlooked Genus. *Molecules.* 2019; 24(20):3788. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24203788>
- 12.- 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.* 2017; 2(4):828-34. DOI: <http://dx.doi.org/10.26722/rpmi.2017.24.70>
- 13.- Scarpetta L. Reconocimiento Fitoquímico y etnobotánico de *Erythroxylum coca* en la población Nasa del Departamento del Cauca – Colombia. *Rev Crit Lib Jurid [Internet].* 2017 [acceso: 10/04/2020]; 14(1), 21-46. Disponible en: <https://revistas.unilibre.edu.co/index.php/criteriojuridico/article/view/1601>
- 14.- Harun M, Ramadhany S, Suryajaya F. Streptococcus Colonial Growth of Dental Plaque Inhibition Using Flavonoid Extract of Ants Nest (*Myrmecodia pendans*): An in Vitro Study. *Pesqui. Bras. Odontopediatría Clín Integr.* 2019; 19:e4250. DOI: <https://doi.org/10.4034/pboci.2019.191.19>
- 15.- Biondich A, Joslin J. Coca: High Altitude Remedy of the Ancient Incas. *Wilderness Environ Med.* 2015; 26(4):567–571. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.wem.2015.07.006>
- 16.- Weil A. The therapeutic value of coca in contemporary medicine. *J Ethnopharmacol.* 1981; 3(2-3):367–376. DOI: [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(81\)90064-7](https://doi.org/10.1016/0378-8741(81)90064-7)
- 17.- Loyola D, Mendoza R, Chiong L, Rueda M, Alvítez-Temoche D, Gallo W. Ethanol extract of *Schinus molle* L. (Molle) and *Erythroxylum coca* Lam (Coca): Antibacterial Properties at Different Concentrations against *Streptococcus mutans*: An In Vitro Study. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2020; 10(5):579-584. DOI: https://doi.org/10.4103/jispcd.JISPCD_237_20

- 18.- Enciso S. Actividad antibacteriana del extracto de *Solanum tuberosum* “Tocosh” y Clorhexidina al 0.12% sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. In vitro. [Tesis de título]. Lima: Universidad Nacional Federico Villareal. Facultad de Odontología; 2019.
- 19.- Castro M. Evaluación in vitro de la actividad antibacteriana y citotoxicidad de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze “TARA” frente a *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556). [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia. Facultad de Estomatología; 2017.
- 20.- Nassar H, Gregory R. Biofilm sensitivity of seven *Streptococcus mutans* strains to different fluoride levels. *J Oral Microbiol.* 2017; 9(1):1328265. DOI: <https://doi.org/10.1080/20002297.2017.1328265>
- 21.- Kim YH, Lee SY. Identification of non-streptococcal organisms from human dental plaque grown on the Streptococcus-selective medium mitis-salivarius agar. *Arch Oral Biol.* 2015; 60(2):267–271. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2014.11.002>
- 22.- Yoo HJ, Jwa SK. Inhibitory effects of β -caryophyllene on *Streptococcus mutans* biofilm. *Arch Oral Biol.* 2018; 88:4246. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.01.009>
- 23.- Patrzalek M, Kosecka M, Lisowska K, Trela M, Kot M, Kot M, et al. Preliminary evaluation of application of a 3-dimensional network structure of siloxanes Dergall preparation on chick embryo development and microbiological status of eggshells. *Poultry Science.* 2020; 99(3):1581-1590. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.10.079>
- 24.- Salcedo MR. Comparación del efecto antibacteriano del extracto etanólico del *Erythroxyllum novogranatense* var. *Truxillense* y *Erythroxyllum coca* var *coca* frente al *Streptococcus mutans*. [Tesis de título]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Odontología; 2018.
- 25.- Alvarado V, Moromi H. Plantas medicinales: Efecto antibacteriano *in vitro* de *Plantago major* L, *Erythroxyllum novogranatense* Plowman var *truxillense* y *Camellia sinensis* sobre bacterias de importancia estomatológica. *Odontol Sanmarquina.* 2010; 13(2):21-25. DOI: <https://doi.org/10.15381/os.v13i2.2853>

11. Copias de cartas de respuestas a las observaciones de los revisores

[RCMM] Decisión del editor/a



Dr. C. Carlos R. Quevedo Fonseca

Para: Bryan Alexis Cossio Alva

CC: Eliberto Ruiz Ramirez; Marco Sánchez-Tito <marcosanchez2183@gmail.com> y 1 usuario



Vie 24/06/2022 14:14

Cirujano Dentista Bryan Alexis Cossio Alva:

Tomamos una decisión sobre su envío a Revista Cubana de Medicina Militar, "Efecto antibacteriano de dos extractos de *Erythroxylum coca* frente a *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus*".

Nuestra decisión es: Publicable con modificaciones.

Puede consultar la última versión del Editor que contiene las recomendaciones.

Respetuosamente,

Dr. C. Carlos Rafael Quevedo Fonseca
 Universidad de Ciencias Médicas de las Fuerzas Armadas Revolucionarias. La Habana
 Teléfono 72743863
quevedo@infomed.sld.cu
 Revista Cubana de Medicina Militar

Efecto antibacteriano de dos extractos de *Erythroxylum coca* frente a *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus*



Dr. C. Carlos R. Quevedo Fonseca

Para: Lic. Elvia Isabel Vázquez Velázquez <editormil3@infomed.sld.cu>



Dom 26/06/2022 11:21

Estimada Editora:

Consideramos oportunos los señalamientos; en tal sentido, los cambios han sido realizados.

Respetuosamente,

Bryan Cossio-Alva.
 Revista Cubana de Medicina Militar
<http://www.revmedmilitar.sld.cu/index.php/mil>
revistamil@infomed.sld.cu

12. Abreviaturas

ATCC	American Type Culture Collection
OMS	Organización Mundial de la Salud
CIEI	Comité Institucional de Ética en Investigación
ENACO	Empresa Nacional de la Coca
HUT	Herbarium Truxillense
UNT	Universidad Nacional de Trujillo
CCA	Centro de Control Analítico
UNMSM	Universidad Nacional Mayor de San Marcos
UV-VIS	Ultravioleta Visible
SAC	Sociedad Anónima Cerrada
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
CLSI	Clinical and Laboratory Standart Institute
MAC OS	Sistema Operativo de Macintosh
VAR	Variedad

13. ANEXOS

ANEXO 1

CARTA DE ACEPTACIÓN

REVISTA CUBANA DE MEDICINA MILITAR

[RCMM] Solicitud de revisión de corrección de originales



Dr. C Carlos R. Quevedo Fonseca

Para: Bryan Alexis Cossio Alva

Cirujano Dentista Bryan Alexis Cossio Alva:

Su envío "Efecto antibacteriano de dos extractos de *Erythroxyllum coca* frente a *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus*" para Revista Cubana de Medicina Militar ha sido aprobado para publicar y superó el primer paso de la corrección de originales. Está disponible para su revisión siguiendo estos pasos:

1. Haga clic en la URL del envío que aparece abajo.

ANEXO 2

CARTA DE REGISTRO DE APROBACIÓN ACADÉMICA



FORMATO DE DEFENSA DE PROYECTO DE TESIS O REVISIÓN ACADÉMICA PARA ARTÍCULO ORIGINAL O REVISIÓN SISTEMÁTICA

Lima 23 de febrero del 2021

Nº de Registro : 695-2020-POS8

Título: "COMPARACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ACUOSO Y ALCOHÓLICO DE HOJAS SECAS DE <i>Erythroxylum coca</i> "COCA" FRENTE A <i>Streptococcus mutans</i> ATCC [®] 35668 [™] Y <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC [®] 4356 [™] "				
Alumno/a: Bryan Alexis Cossio Alva				
Secciones del Protocolo:	Presenta y está correcto	Presenta y esta incorrecto	No Presenta	Observaciones
1. Carátula.	X			
2. Pregunta de investigación.	X			
3. Introducción.	X			
4. Justificación.	X			
5. Objetivos e hipótesis de la investigación (Si aplica).	X			
6. Materiales y métodos*	X			
7. Limitaciones del estudio.	X			
8. Cronograma de trabajo.	X			
9. Presupuesto.	X			
10. Referencias bibliográficas.	X			
11. Anexos.	X			

*Para el proyecto de tesis con formato revisión sistemática, la metodología deberá seguir las pautas de "The Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions (<http://www.cochrane-handbook.org>).

Sugerencias:

Observaciones:

Informe concluye:

a) Aprobado con pase a Comité de Ética	c) Aprobado y Requiere solucionar observaciones	b) Desaprobado
X		



Presidente (insertar firma digital)

NOMBRES Y APELLIDOS: ORTIZ CULCA FERNANDO ALFONSO
DNI. 07747839



Miembro (insertar firma digital)

NOMBRES Y APELLIDOS: TERESA ANGELICA EVARISTO CHIYONG
DNI. 09638747

ANEXO 3

DOCUMENTO DE APROBACIÓN DE CIEI

COMITÉ INSTITUCIONAL DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN



CONSTANCIA N° 166-CIEI-CIENTÍFICA-2021

El presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación de la Universidad Científica del Sur (CIEI-CIENTÍFICA) da constancia que el proyecto de investigación, cuyos datos se registran a continuación, ha sido **aprobado** por el CIEI-CIENTÍFICA.

Código de registro: **695-2020-POS8**

Título: **Comparación del efecto antibacteriano del extracto acuoso y alcohólico de hojas secas de *Erythroxylum coca* "Coca" frente a *Streptococcus mutans* ATCC@35668™ y *Lactobacillus acidophilus* ATCC@4356™.**

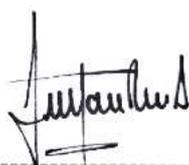
Investigador(a): **Bryan Alexis Cossio Alva**

La aprobación del proyecto de investigación implica que el documento presentado a evaluación cumple con los lineamientos de Universidad en materia de investigación y ética, los cuales se sustentan en la normativa internacional vigente. Adicionalmente, en el contexto de la pandemia de enfermedad por COVID-19, le recomendamos cumplir con las normas publicadas por el estado peruano (accesos, medidas de bioseguridad, etc.) y tener los permisos de las instituciones en las que realizará el estudio antes de ejecutarlo.

En tal sentido, esta aprobación carecerá de valor si es que el proyecto de investigación arriba indicado es modificado de cualquier forma. Toda enmienda, añadido, eliminación o eventualidad (eventos adversos, etc.) posterior a la fecha de aprobación debe ser reportado al CIEI-CIENTÍFICA.

La vigencia de la aprobación de este documento es de dieciocho (18) meses (**hasta el 11 de noviembre del 2022**), periodo en el que puede desarrollarse el proyecto. Cualquier trámite para su renovación deberá ser enviado antes del término de la vigencia de este documento, debiendo suspenderse todo desarrollo hasta que la renovación sea aprobada.

Villa El Salvador, 12 de mayo de 2021




Mg. Fulton Paul Rivera Albinagorta
 Presidente
 Comité Institucional de Ética en Investigación

Asesoría al postulante
 T. // (511) 610 6738 | Campus Villa 2 - Panamericana Sur km 19
 informes@cientifica.edu.pe | Calle Cantuarias 398, Miraflores

ANEXO 4

RESOLUCIÓN DE APROBACIÓN DEL PROYECTO DE TESIS



RESOLUCIÓN DIRECTORAL DE ACEPTACIÓN DEL PROYECTO DE TESIS Y NOMBRAMIENTO DEL ASESOR

RESOLUCIÓN DIRECTORAL DE LA CARRERA DE ESTOMATOLOGÍA N° 015-DACE-DAFCS-U. CIENTÍFICA-2021

Lima, 26 de mayo del 2021

VISTO:

El informe técnico del Comité Institucional de Ética en Investigación de la Universidad Científica del Sur con código N° 695-2020-POS8, se aprueba el proyecto de Tesis Titulado: “Comparación del efecto antibacteriano del extracto acuoso y alcohólico de hojas secas de *Erythroxylum coca* “Coca” frente a *Streptococcus mutans* ATCC@35668™ y *Lactobacillus acidophilus* ATCC@4356™” presentado por **BRYAN ALEXIS COSSIO ALVA**.

CONSIDERANDO:

Que, de acuerdo al Reglamento General de la Universidad Científica del Sur y los reglamentos de pre/posgrado para obtener el Grado Académico de **MAESTRO EN ESTOMATOLOGÍA** en la Carrera de Estomatología de la Universidad Científica del Sur, se debe desarrollar un trabajo de investigación.

Que, de acuerdo con la normativa vigente de la Universidad Científica del Sur, en uso de las atribuciones conferidas al Director Académico de Carrera.

SE RESUELVE:

ART. 1°: APROBAR E INSCRIBIR el Proyecto de Tesis titulado: “Comparación del efecto antibacteriano del extracto acuoso y alcohólico de hojas secas de *Erythroxylum coca* “Coca” frente a *Streptococcus mutans* ATCC@35668™ y *Lactobacillus acidophilus* ATCC@4356™” de el/la Bach. **BRYAN ALEXIS COSSIO ALVA**, con registro: N° 695-2020-POS8 y establecer el inicio de periodo de ejecución del mencionado proyecto, 12 de mayo de 2021.

ART. 2°: NOMBRAR Asesor/a del trabajo de tesis señalado, a al/la Mg. **ELIBERTO RUIZ RAMIREZ**.

Regístrese, comuníquese y archívese.



Mg. Claudio Peña Soto
Director Académico de la Carrera de Estomatología



T // (51) 610 6738
informes@cientifica.edu.pe
cientifica.edu.pe

ANEXO 5

DOCUMENTOS USADOS EN LA INVESTIGACIÓN

CERTIFICADO CEPA *S. MUTANS* ATCC®35668™



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Streptococcus mutans Catalog Number: 0969 Lot Number: 969-55** Reference Number: ATCC® 35668™* Purity: Pure Passage from Reference: 2	Expiration Date: 2021/11/30 Release Information: Quality Control Technologist: Mary L Bowman Release Date: 2019/12/20
Macroscopic Features: Small, circular, white to translucent. Microscopic Features: Gram positive cocci in medium or long chains.	Performance Medium: SBAP Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF (1) See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): negative <div style="text-align: right;">  Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE </div>

**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.

CERTIFICADO CEPA *L. ACIDOPHILUS ATCC®4356™*



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: <i>Lactobacillus acidophilus</i> Catalog Number: 0243 Lot Number: 243-46** Reference Number: ATCC® 4356™* Purity: Pure Passage from Reference: 3	Expiration Date: 2021/9/30 Release Information: Quality Control Technologist: Kieshia L. Negen Release Date: 2019/10/23
--	--

Performance	
Macroscopic Features: Two colony types are present. The predominant colonies are medium to large, circular to slightly irregular, low convex, erose edge and rough; the other type is small, circular, convex, entire edge and smooth. Colonies are translucent and weakly alpha hemolytic.	Medium: CNA
Microscopic Features: Gram positive rods with rounded ends, occurring singly, in pairs, and in short chains.	Method: Gram Stain (1)

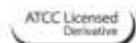
ID System: MALDI-TOF (1) See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): negative PCR Screen for Group B Streptococcus: negative  Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE
---	--

**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 Vittek®: Although the Vittek® 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.



SOLICITUD A ENACO

SOLICITUD

“Año del Bicentenario del Perú: 200 años de Independencia”

Yo, Bryan Alexis Cossio Alva, con número de DNI 70616889, Egresado de la maestría en Estomatología de la Universidad Científica del Sur, solicito a la Empresa Nacional de la Coca (ENACO- SEDE TRUJILLO), muestras de *Erythroxyllum Coca*, para el adecuado desarrollo de mi tesis denominado “ Comparación del efecto antibacteriano del extracto acuoso y alcohólico de hojas secas de *Erythroxyllum Coca* “coca” frente a *Streptococcus Mutans* ATCC®35668™ y *Lactobacillus Acidophilus* ATCC®4356™”.

Muchas Gracias.

Chiclayo, 10 de Mayo del 2021.

CERTIFICADO ENACO



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

"Año del Bicentenario del Perú: 200 años de Independencia"

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

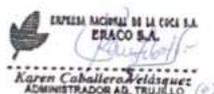
CERTIFICA

Que los 1 kg de hoja de coca, entregado al Sr. Bryan Cossio Alva, para fines de investigación, corresponden a la Familia Erythroxylum Coca, Variedad Novogranatense.

Se entrega el presente documento para determinar el origen de la muestra de hoja de coca que se utilizará en la ejecución de la Tesis denominada: ""COMPARACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ACUOSO Y ALCOHÓLICO DE HOJAS SECAS DE Erythroxylum coca "COCA" FRENTE A Streptococcus mutans ATCC@35668™ Y Lactobacillus acidophilus ATCC@4356

Se expide en la ciudad de Trujillo a los (02) días del mes de Junio del año dos mil veintiuno.

Atentamente,



EMPRESA NACIONAL DE LA COCA S.A.
ENACO S.A.
Karen Caballero Velásquez
ADMINISTRADOR AD. TRUJILLO (1)

CONSTANCIA DE IDENTIFICACIÓN DE ERYTHROXYLUM COCA
NOVOGRANATENSE



ANÁLISIS CUANTITATIVO DEL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE COCA



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
CENPROFARMA
CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º00564-CPF-2021

ORDEN DE ANÁLISIS : 006133/2021
SOLICITADO POR : BRYAN ALEXIS COSSIO ALVA
MUESTRA : EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE COCA
CANTIDAD : 15 mL
FECHA DE RECEPCIÓN : Setiembre 2021

PRUEBA	ESPECIFICACIONES	MÉTODOS	RESULTADOS
ALCALOIDES	-	VOLUMETRIA	51.5 mg/mL del extracto
FLAVONOIDES	-	UV- VIS	124.3 mg/mL del extracto
FENOLES TOTALES	-	UV- VIS	94900 [µg ácido gálico/ mL del extracto]
TANINOS	-	UV- VIS	0.0031mg/mL del extracto

Lima, 22 de Octubre del 2021


Q.F. Paul Ivan Gutiérrez Elescano
Director del Centro de Control Analítico



"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Jc. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú
☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ☒ Ap. Postal 4559 - Lima 1
E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>



ANÁLISIS CUANTITATIVO DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE HOJAS DE COCA



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
CENPROFARMA
CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º00563-CPF-2021

ORDEN DE ANÁLISIS : 006132/2021
SOLICITADO POR : BRYAN ALEXIS COSSIO ALVA
MUESTRA : EXTRACTO ETANOLICO DE HOJAS DE COCA
CANTIDAD : 15 mL aprox
FECHA DE RECEPCIÓN : Setiembre 2021

PRUEBA	ESPECIFICACIONES	MÉTODOS	RESULTADOS
ALCALOIDES		VOLUMETRIA	72.5 mg/mL del extracto
FLAVONOIDES		UV- VIS	245.9 mg/mL del extracto
FENOLES TOTALES		UV- VIS	152584 [µg ácido gálico/ mL del extracto]
TANINOS		UV- VIS	0.0041 mg/mL del extracto

Lima, 22 de Octubre del 2021




Q.F. Paul Ivan Gutiérrez Elescano
Director del Centro de Control Analítico

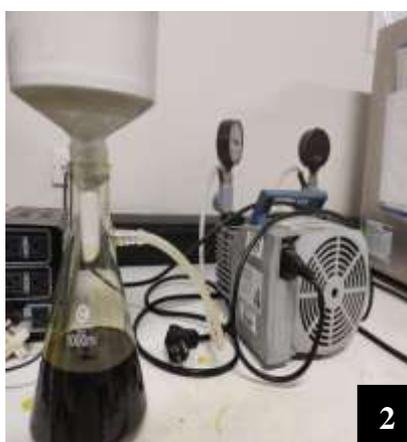
"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú
☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1
E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>



ANEXO 6
INSTRUMENTOS USADOS EN LA INVESTIGACIÓN

Nº	INSTRUMENTO
1	Estufa (MEMMERT)
2	Bomba de vacío (VACUUBRAND)
3	Espectrofotómetro (THERMO SCIENTIFIC GENESYS)
4	Incubadora (SHELLAB)
5	Vernier mecánico (KAMASA)
6	Cabina de bioseguridad (NUAIRE)



ANEXO 7
BASE DE DATOS

**EXTRACTO ACUOSO DE ERYTHROXYLUM COCA “COCA” FRENTE A S.
MUTANS ATCC®35668™**

ID	75mg/mL_24H	50mg/mL_24H	25mg/mL_24H	Control_24H	75mg/mL_48H	50mg/mL_48H	25mg/mL_48H	Control_48H
1	24.5	22	18	29	25	23	17.2	28
2	25	21	18.5	29.5	25	20.5	18	28
3	23.5	22.5	17.3	26.1	25	22.2	19	26.5
4	24	22	19.2	25.5	24	20	17.3	25.5
5	24	21	19	28	24	22.3	16.2	29
6	24	20	20	28	24.5	22.2	17.8	28
7	24	23	18	29	24.5	20	17.2	26.2
8	24	20	17.5	26.5	25	20	18.1	27.5
9	24.5	22.5	17.5	28	23.3	23.5	17	28
10	25	22.3	19	28	23	22.2	17.2	26.3
11	23.3	23.5	17	29.5	23	22.1	16.8	27.2
12	23	24.2	17	28	24	23.1	17.5	27.1
13	25	23	18	28	25	21.5	19	29.4
14	24	22.2	19	26	24	22.1	18	29.5
15	25	20	19	26	24	23.5	18	28.3
16	25	25	19	27	24.5	21	19	29
17	25	20.5	19	27	23.2	21	16.5	29
18	25	21.5	19	28	22.1	22	19	29
19	25.3	22.5	17	29	24.1	21	19	27
20	24.2	20.5	19	29	23.1	23	19	27

EXTRACTO ALCOHÓLICO DE ERYTHROXYLUM COCA “COCA” FRENTE A S.
MUTANS ATCC®35668™

ID	75mg/mL_24H	50mg/mL_24H	25mg/mL_24H	Control_24H	75mg/mL_48H	50mg/mL_48H	25mg/mL_48H	Control_48H
1	25	23	21	28	25.5	20.2	20.3	28
2	25.1	23.2	22	30	23	19.5	21.3	30
3	25.2	23.1	21.5	29.5	24.5	20.2	22	25.5
4	25	24.5	20.3	30	25	22	22	30
5	24.2	23.2	22.5	30	25.2	21	21.2	30
6	24.5	23.5	21.3	30	24.5	21.3	22.1	29.5
7	23	23	21.3	25.5	25.6	20.5	23.1	29.2
8	25.5	22.1	19.3	25	24.5	22	21.5	27.2
9	25.5	22.5	20.2	30	25.8	21	22.1	28.2
10	23	22.2	22.2	30	26	21.3	21	29
11	25.5	22.5	22.1	30	24.5	19.3	21	29
12	25	23.7	23.1	30	25.8	20.2	21	29
13	25.1	24.1	22	28	25.1	22.1	22.2	29
14	25.6	21.2	21	28	25.6	23.1	23	30
15	24.5	21.2	21.5	29	25	22	22	31.2
16	24	22.1	22	29	23	21	19.1	29.5
17	24	22	21	29	24.2	21	20.2	30.5
18	24.5	23	21	27	25	20.3	21.5	28.5
19	25.8	21	21	27	25	22	22.5	29.2
20	26	22	21	27	25	22	21.5	30.5

EXTRACTO ACUOSO DE ERYTHROXYLUM COCA “COCA” FRENTE A L.
 ACIDOPHILUS ATCC®4356™

ID	75mg/mL_24H	50mg/mL_24H	25mg/mL_24H	Control_24H	75mg/mL_48H	50mg/mL_48H	25mg/mL_48H	Control_48H
1	22.5	22	20.5	21.7	21.5	20.5	18.5	26
2	22	21.5	19.5	21.9	22.3	19.5	18	26.5
3	22	19.5	18	24	22.3	19.3	19.5	28.2
4	23.5	22.5	20	23	23	20.2	19	27.1
5	23.5	22	19.3	26	21.2	19.5	18.5	26.1
6	23	22	17.2	24.3	20.1	20.5	17	27.2
7	24	21	18.1	27.1	23	20.2	17	28.5
8	24	21	18.5	25.3	20.2	20.2	18	29
9	23	20	17.9	27.6	20.5	19.5	17	29
10	22	20	16.3	24	21.1	19.2	18.5	30
11	24	21.5	15.4	26	22	19	17.2	25
12	24.5	22	16.5	28	21.5	20	17.2	26.5
13	23.5	21	17	26	23	20	17.5	25.5
14	25.5	21.5	17.5	29	22.1	19	16.2	26.2
15	23	19.5	18	26	22.2	20	15	28.5
16	23.5	20	17.5	25	23	20	15	29
17	24.2	20	18.5	25	20.1	20.5	18	29
18	25.1	22	17.5	26	20.5	20.2	17.2	26
19	26.5	20	16.5	25	20.5	19.1	16.2	26
20	21.5	19.5	16.5	27	20	19	17.3	25

EXTRACTO ALCOHÓLICO DE ERYTHROXYLUM COCA “COCA” FRENTE A L.
 ACIDOPHILUS ATCC®4356™

ID	75mg/mL_24H	50mg/mL_24H	25mg/mL_24H	Control_24H	75mg/mL_48H	50mg/mL_48H	25mg/mL_48H	Control_48H
1	23.5	20.7	17.2	23.5	23.5	20.7	17.2	26
2	24.3	21.3	19.5	24.3	24.5	19.3	18.2	26
3	23.5	22.1	20.5	25.5	22	19.2	19	25
4	25.3	22.1	20	28.3	25.5	19	19	28
5	24.5	21.5	20	29	22	19	18.2	27.2
6	25.5	22.5	18.5	28.5	22	20.5	17	27.5
7	25.5	21.5	18.5	29.3	23.2	20	18	30
8	25	22.5	19.5	28.5	21.5	19.2	17	27.1
9	24.5	21.5	19	30	20.5	19.5	18.5	28.5
10	24	21	18.5	28	25.5	19	16.2	26.2
11	24	22	18	27.5	23	19	15	27
12	24	21	17	28.5	23	19	18	26
13	25	21.5	18	26	24	18	17.1	26
14	24.5	20	17	25.5	24.5	18	17.5	25.2
15	25.5	22	19.5	26	26.3	19.5	16.5	22.5
16	23	21.5	18.3	29	26.5	19	17.3	28
17	24	22	18	27	27.5	19.3	18	28
18	24	23	17	27	20.5	18	16.3	29
19	23	20	16	28.5	24.5	18	16.1	29
20	24	20	16	27	24.9	18	16	29