

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**UNIDAD DE POST GRADO**

**Composición química del aceite esencial de las hojas de  
Erythroxylum novogranatense (Morris) "coca",  
actividad antioxidante y determinación antibacteriana  
frente a Streptococcus mutans**

**TESIS**

para optar al grado académico de Doctor en Farmacia y Bioquímica

**AUTOR**

Américo Jorge Castro Luna

**ASESOR**

Pedro Cotillo Zegarra

**Lima – Perú**

**2008**

A mis padres, esposa e hijos:

**Wenceslao**

**Graciela**

**Norma**

**Jorge**

**William**

## Agradecimientos:

A las Instituciones que con su generoso apoyo, hicieron posible la realización del presente estudio.

- Empresa Nacional de la Coca S.A.
- Planta piloto de la Facultad de Química e Ingeniería Química-UNMSM.
- Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición “Alberto Guzmán Barrón” – Facultad de Medicina-UNMSM.
- Instituto de Microbiología y Parasitología “Simón Pérez Alva” – Facultad de Farmacia y Bioquímica-UNMSM.
- Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” - Facultad de Farmacia y Bioquímica-UNMSM.

**Al Dr. Pedro Cotillo Zegarra:**

Por el asesoramiento en la ejecución de la presente tesis.

# SUMARIO

	Pág.
RESUMEN	
SUMMARY	
RESUMO	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. GENERALIDADES	3
2.1. Aspectos botánicos	3
2.1.1. Clasificación sistemática	3
2.1.2. Características morfológicas	3
2.1.3. Anatomía foliar: Sección transversal de la hoja	3
2.1.4. Variedades del género <i>Erythroxylum</i>	4
2.1.5. Distribución geográfica	4
2.1.6. Usos en la medicina tradicional	4
2.1.7. Composición química	5
2.1.8. Aceites esenciales	5
2.1.9. Métodos de extracción de aceites esenciales	6
2.1.10. Aceite esencial de <i>Erythroxylum novogranatense</i> (Morris)	6
2.2. Radicales libres	6
2.2.1. Antioxidantes	7
2.2.2. Antioxidantes naturales	8
2.2.3. Aceites esenciales como antioxidantes	8
2.2.4. Cavidad bucal y placa dental	10
2.2.5. <i>Streptococcus mutans</i>	11
III. PARTE EXPERIMENTAL	13
3.1. Materiales, reactivos y equipos	13
3.2. Entidades donde se desarrolló la investigación	14
3.3. Tipo de investigación	15
3.4. Flujograma de trabajo experimental	15
3.4.1. Colecta y clasificación taxonómica	16
3.4.2. Extracción del aceite esencial	16
3.4.3. Rendimiento de aceite esencial	16
3.4.4. Análisis preliminar y fisicoquímico	17
3.4.5. Determinación de los componentes químicos del aceite esencial, por Cromatografía de Gases y Espectrofotometría de Masas (CG/EM)	17
3.4.6. Determinación de la actividad antioxidante	17
3.4.6.1. Método de captación del radical 2,2-difenilpicrilhidrazil (DPPH)	17
3.4.6.2. Método de captación del radical libre anión superóxido	19
3.4.6.3. Método de captación de radicales hidroxilo	20
3.4.7. Determinación de la actividad antibacteriana <i>in vitro</i> del aceite esencial frente a <i>Streptococcus mutans</i>	22
3.4.7.1. Método de difusión en agar	22
IV. RESULTADOS	24
V. DISCUSIÓN	39
VI. CONCLUSIONES	45
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
VIII. ANEXOS	58

## RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar la composición química del aceite esencial de las hojas frescas de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) "Coca" var. *Truxillense*, actividad antioxidante *in vitro* y la determinación antibacteriana *in vitro*, frente a *Streptococcus mutans*. El aceite esencial se obtuvo tratando aproximadamente 10kg de hojas en un sistema de hidrodestilación con arrastre de vapor de agua a temperatura y presión controlada, obteniéndose un rendimiento de 0.06 por ciento v/p, realizándose así mismo el análisis preliminar del aceite esencial y sus propiedades fisicoquímicas: gravedad específica (0,914 g/mL), índice de refracción (1,463) y pH (6,45). Del análisis cualitativo de la composición química realizado por Cromatografía de Gases / Espectrometría de Masas (CG/EM), se destaca en el cromatograma y señales espectrales de identificación la elucidación de los siguientes componentes químicos: Nona-3,5- dien-2-ona, salicilato de metilo, ácido nonanoico,  $\alpha$ -longipineno, ácido decanoico, 2-Propenal, 3-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-yl)-,  $\alpha$ -ciclocitrideneacetona, trans- $\beta$ -ionona, olivetol, apiol, ácido hexadecanoico, pitol, ácido 9,12,15-octadecatrienoico, metil éster y ácido octadecanoico. La evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* del aceite esencial se realizó utilizando los métodos: 1) Método de captación del radical 2,2-difenilpicrilhidrazil (DPPH), 2) Método de captación del radical libre anión superóxido y 3) Método de captación del radical hidroxilo. El aceite esencial de coca tiene capacidad antioxidante como donador de electrones o hidrógeno al radical DPPH y como secuestrante del radical superóxido, y presenta actividad prooxidante incrementando la degradación de la deoxirribosa mediante la adición de iones ferroso. La determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial, se realizó utilizando el método de difusión en agar, demostrando actividad significativa frente a *Streptococcus mutans* cepa clínica en concentraciones de 100 y 50 por ciento. La composición química del aceite esencial de *Erythroxylum novogranatense*, ejerce un prometedor efecto como un antioxidante natural y como un agente antibacteriano frente a *Streptococcus mutans*.

**Palabras clave:** Aceite esencial, *Erythroxylum novogranatense*, actividad antioxidante, actividad antibacteriana, *Streptococcus mutans*.

## SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the chemical composition of essential oil of fresh leaves of *Erythroxylum novogranatense* (Morris) "Coca" var. Truxillense, antioxidant activity in vitro and in vitro antibacterial determination, against *Streptococcus mutans*. The essential oil was obtained from 10kg of leaves in a system with hydrodistillation drag of water vapor temperature and controlled pressure, getting a yield of 0.06 percent v / p, also performed the preliminary analysis of the essential oils and their physicochemical properties: specific gravity (0914 g / mL), refractive index (1463) and pH (6.45). Qualitative analysis of the chemical composition performed by gas chromatography / mass spectrometry (GC / MS), points in the chromatogram and spectral signals identifying the elucidation of the following chemicals: Nona-3, 5 - dien-2 - one, methyl salicylate, nonanoic acid,  $\alpha$ -longipineno, decanoic acid, 2-Propenal, 3 - (2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl) -  $\alpha$ -ciclocitrildeneacetona, trans- $\beta$ -ionone , olivetol, apiol, Hexadecanoic acid, pitol, 9,12,15-octadecatrienóico acid, methyl ester and octadecanoic acid. The evaluation of the *in vitro* antioxidant activity of essential oil was conducted using the methods: 1) Method of capturing 2.2-difenilpicrilhidrazil radical (DPPH), 2) Method of harvesting the free radical and superoxide anion 3) Method of capturing hydroxyl radical. The essential oil of coca has antioxidant capacity as electron donor or hydrogen andalusia DPPH radical and superoxide radical sequestrant and presents prooxidant activity increasing degradation of deoxirribosa by the addition of ferrous ions. The determination of *in vitro* antibacterial activity of the essential oil was performed using the agar diffusion method, showing significant activity against *Streptococcus mutans* strain clinical concentrations of 100 and 50 percent. The chemical composition of essential oil of *Erythroxylum novogranatense* exerts an effect as a natural antioxidant and as a natural antibacterial agent against *Streptococcus mutans*.

**Keywords:** Essential oil, *Erythroxylum novogranatense*, antioxidant activity, antibacterial activity, *Streptococcus mutans*.

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a composição química do óleo essencial de folhas frescas de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) "Coca" var. *Truxillense*, atividade antioxidante in vitro e in vitro antibacteriana determinação, contra a *Streptococcus mutans*. O óleo essencial foi de cerca de 10 kg de folhas que procuram em um sistema com hidrodestilação arraste de vapor de água pressão e temperatura controladas, para um rendimento de 0,06 por cento v / p, também realizou a análise preliminar dos óleos essenciais e suas propriedades físicoquímicas: densidade (0.914 g / mL), índice refractométrico (1463) e pH (6,45). A análise qualitativa da composição química por cromatografia em fase gasosa / espectrometria de massa (CG / MS), os pontos no cromatograma espectral sinais e identificar a elucidação dos seguintes produtos químicos: Nona-3, 5 - dien-2 - one, methyl salicylate, nonanoic acid,  $\alpha$ -longipineno, decanoic acid, 2-Propenal, 3 - (2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl) -  $\alpha$ -ciclocitrideneacetona, trans- $\beta$ -ionone , olivetol, apiol, Hexadecanoic acid, pitol, 9,12,15-octadecatrienóico acid, methyl ester and octadecanoic acid. A avaliação da atividade antioxidante in vitro do óleo essencial foi realizada utilizando os métodos: 1) Método de captura 2,2-difenilpicrilhidrazil radical (DPPH), 2) Método de colheita de radicais livres e ânion superóxido 3) Método de colheita radicais hidroxila. O óleo essencial de coca tem capacidade antioxidante do elétron doador ou hidrogênio andaluzia DPPH radical e radical superóxido sequestrante e apresenta atividade aumentada prooxidant degradação do deoxirribose pela adição de íons ferrosos. A determinação da atividade antibacteriana in vitro do óleo essencial foi realizada utilizando teste de difusão em ágar, mostrando significativa atividade contra *Streptococcus mutans* estirpe clínicas das concentrações de 100 e 50 por cento. A composição química do óleo essencial de *Erythroxylum novogranatense* exerce Um efeito como uma promissora antioxidantes naturais e como um agente antibacteriano contra *Streptococcus mutans*.

**Palavras-chave:** Óleo essencial, *Erythroxylum novogranatense*, atividade antioxidante, atividade antibacteriana, *Streptococcus mutans*.

# I. INTRODUCCIÓN

El estudio de los componentes químicos de los aceites esenciales está demostrando que tienen propiedades antioxidantes, antibacterianas, antivirales, antimicóticas, antiinflamatorias, insecticidas y antitumorales<sup>1,2,3,4,5,6,7</sup>. Sin embargo, estos productos naturales inocuos, han entrado en competencias con sucedáneos sintéticos que suelen presentar efectos nocivos con desventaja sobre animales de experimentación y cuyos resultados obtenidos no son extrapolables al hombre por las diferencias fisiológicas y anatómicas que éste presenta. Los radicales libres (RL) son especies químicas activas de oxígeno altamente reactivas que causan reacciones de oxido reducción en cadena, dañando diversas estructuras lipídicas, protéicas e incluso ADN y ARN<sup>8,9,10,11</sup>. Estos RL son removidos de nuestro organismo por diversos mecanismos antioxidantes, principalmente por la acción de las enzimas antioxidantes Superóxido Dismutasa (SOD), Glutation Peroxidasa (GPO) y Catalasa (CAT), manteniendo un “equilibrio oxidativo”<sup>12,13</sup>. En ocasiones, las defensas antioxidantes no son suficientes para contrarrestar la acción de los RL y dan lugar al “estrés oxidativo”. Este ha sido involucrado en diversos estados patológicos de tipo degenerativo e incluso en los procesos naturales de envejecimiento y muerte<sup>14,15</sup>.

Investigaciones realizadas sobre los aceites esenciales han demostrado sus efectos antioxidantes<sup>16,17</sup>. En la investigación sobre la evaluación de la actividad antioxidante de aceites esenciales en emulsiones degradadas por radiación ultravioleta, de los aceites esenciales de *Origanum vulgare* L., “orégano”; *Rosmarinus officinalis* L., “romero”; y *Coriandrum sativum* L., “cilantro”; se concluye que el aceite esencial de orégano presentó actividad antioxidante superior a la del cilantro y el romero, e incluso a la de la vitamina E, en concentraciones de 1,10 y 20 g/kg<sup>18,19,20,21,22</sup>. Estudios realizados sobre la actividad de los antioxidantes, reportan que la acción de éstos pueden variar desde el efecto antioxidante hasta el efecto prooxidante, de acuerdo con el medio de reacción utilizado<sup>23,24,25,26,27,28,29,30,31,32</sup>. Así mismo, el estudio sobre la actividad antioxidante del aceite esencial *Luma chequen*, demostró efecto

antioxidante con aplicación de tres modelos antioxidantes; concluyendo que las moléculas del aceite esencial actúan en sinergismo potenciando su capacidad antiradicalaria, dando una protección a las macro moléculas biológicas, como las proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y carbohidratos, por lo que es usado para el tratamiento de afecciones de las vías respiratorias<sup>1</sup>.

Referente a la investigación realizada, no existen estudios sobre la actividad antioxidante del aceite esencial de las hojas frescas de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) "Coca" var. *Truxillense*. El objetivo del presente estudio es investigar la composición química del aceite esencial, determinar la actividad antioxidante *in vitro* a través de la captación del radical ácido 1,2-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)<sup>33</sup>, de la captación del radical superóxido<sup>34</sup> y la captación del radical hidroxilo<sup>35</sup>. Así mismo, determinar la actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Streptococcus mutans*<sup>36,37</sup>.

## II. GENERALIDADES

### 2.1. ASPECTOS BOTÁNICOS

#### 2.1.1. Clasificación sistemática

Según el sistema de clasificación de A. Cronquist (1988), la especie vegetal tiene la siguiente posición taxonómica:

<b>DIVISIÓN</b>	: Magnoliophyta
<b>CLASE</b>	: Magnoliopsida
<b>SUB. CLASE</b>	: Rosidae
<b>ORDEN</b>	: Linales
<b>FAMILIA</b>	: Erythroxylaceae
<b>GÉNERO</b>	: <i>Erythroxylum</i>
<b>ESPECIE</b>	: <i>Erythroxylum novogranatense</i> (Morris) Hieron, Var. Truxillense (Rugby) Plowman.

**Sinonimia vulgar:** “Coca” (Anexo 1)

#### 2.1.2. Características morfológicas

*Erythroxylum novogranatense* Var. Truxillense (Rugby), conocida como “Coca Trujillo”, es un arbusto de 1 a 3 metros de altura, con hojas membranosas, verde intenso, elípticas y de ápice agudo, mide de 1,8 a 4,8cm de largo y 0.5 a 2.5cm de ancho, las líneas laterales son prominentes en el envés. Las flores son pequeñas de 5mm de largo, con los pétalos de color blanco o crema, los frutos son drupas anaranjadas, ovadas, sulcadas, de 6 a 10mm de largo por 4 a 5 mm de ancho<sup>38.39.40.</sup> (Anexo 2, foto 1,2)

#### 2.1.3. Anatomía foliar: Sección transversal de la hoja

Tiene un grosor que varía entre 100 a 130 micras, la epidermis superior formada por un solo estrato de células de forma variable; las células de la epidermis inferior son células semejantes a las células de la epidermis superior, con papilas bien desarrolladas; el

parénquima en empalizada está formado por células uniformes en cuanto a altura y ancho, el parénquima esponjoso consta de tres a seis estratos de células, siendo las células del estrato superior del parénquima aplanadas y las células del estrato inferior isodiamétricas. Los cristales de oxalato de calcio son particularmente abundantes en las células de este parénquima<sup>39</sup>.

#### **2.1.4. Variedades del género *Erythroxylum***

El género *Erythroxylum* está conformado por unas 250 especies, de las cuales 200 especies corresponden a la zona tropical americana. A menos de 1000 metros de altitud crecen las especies silvestres y las cultivadas a 2000 metros de altura. Solo dos especies de este género son cultivadas y están relacionadas entre sí; *Erythroxylum coca* Lam. var. *Coca* y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) var. *Truxillense*. Ambas se diferencian teniendo en cuenta su distribución geográfica, ecología, sus relaciones de cultivo, morfología, anatomía y composición química<sup>39</sup>.

#### **2.1.5. Distribución geográfica**

*Erythroxylum novogranatense* (Morris) var. *Truxillense*, conocida como “coca Trujillo” fue descrita como una especie distinta en el año 1900 por Rugby y posteriormente en el año 1972 se le dio el nombre científico que hoy tiene<sup>38</sup>. Se cultiva en la costa desértica del norte del Perú, cerca a la ciudad de Trujillo (La Libertad, Perú) y en las estribaciones andinas adyacentes; también existen numerosas plantaciones en el valle seco superior del Marañón, el cual se parece a la costa Peruana. Es tolerante a la sequedad y resiste prolongadas sequías<sup>38</sup>.

#### **2.1.6. Usos en la medicina tradicional**

El uso de la hoja de coca data de tiempos muy antiguos, los Incas la llamaban “hoja sagrada” por sus virtudes curativas. Los pobladores de la región andina del Perú la siguen utilizando ya

sea masticándola, en infusión, mate, emplastos, y cataplasmas. Existen preparaciones galénicas oficiales a base de las hojas de coca como mate de coca, polvo, tintura y extracto fluido. Por su contenido de cocaína tiene efecto fármacodinámico, terapéutico y tóxico; también tiene propiedad anestésica y antidepresiva; haciendo énfasis que bajo la forma de hoja de coca, ésta no produce toxicidad o dependencia. Tiene propiedad nutritiva por la presencia de vitamina A, complejo B y vitamina E, como también presencia de nutrientes tales como calcio, hierro, zinc, magnesio, potasio, etc.<sup>41,42</sup>.

#### **2.1.7. Composición química**

Los componentes químicos de la hoja de coca en cultivo no son uniformes, dependiendo de factores intrínsecos entre los que están la edad de la planta, la identidad de las variedades, el estado de las hojas y como factores extrínsecos las zonas geográficas, la forma de cultivo y el medio ambiente principalmente<sup>43</sup>.

La hoja de coca contiene metabolitos primarios como proteínas, carbohidratos y lípidos; y metabolitos secundarios como alcaloides, taninos, glicósidos y aceite esencial. Los componentes principales son los alcaloides, destacándose entre ellos la cocaína, siendo para *Erythroxylum coca* Lam. var. Coca, conocida como “coca Huánuco” tener un promedio de cocaína de 1,1 por ciento y para *Erythroxylum novogranatense* cultivada en áreas secas de Colombia y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) var. *Truxillense*, cultivada en el norte del Perú, un contenido promedio de 0,56 por ciento<sup>44</sup>.

#### **2.1.8. Aceites esenciales**

Son mezclas de sustancias orgánicas químicamente constituidas por terpenos, sesquiterpenos y compuestos aromáticos que se localizan en determinados órganos de la planta como flores, hojas, frutos; y se les obtienen por destilación dependiendo del

método y la condición del vegetal, destacándose entre ellos el de arrastre con vapor de agua. Son líquidos solubles en solventes orgánicos e insolubles en agua<sup>45,46</sup>.

#### **2.1.9. Métodos de extracción de aceites esenciales**

En método a utilizarse para la obtención de los aceites esenciales estará sujeto a la morfología de la especie vegetal, variedad de la especie y porcentaje de rendimiento. Entre los métodos de extracción se consideran a los siguientes: destilación con vapor de agua, columna de destilación discontinua, hidrodestilación con arrastre de vapor de agua a presión y temperatura controlada, extracción por fluidos supercríticos, extracción por expresión y extracción con solventes orgánicos<sup>5,6,7,46,47</sup>.

#### **2.1.10. Aceite esencial de *Erythroxylum novogranatense* (Morris)**

Esta variedad de coca es muy comerciable por el agradable olor de su aceite esencial debido a su contenido de ácidos grasos volátiles que son usados como saborizantes en la industria de bebidas gaseosas<sup>40</sup>. Los aceites esenciales se hallan en una cantidad menor de 0,1 por ciento y le confiere a la hoja su aroma especial, cuyo componente principal es el salicilato de metilo, procedente a su vez del desdoblamiento de un heterósido<sup>42,48</sup>.

### **2.2. RADICALES LIBRES**

Se considera un radical libre (RL) a una entidad química de átomo o molécula que presenta un electrón desapareado en el orbital externo y puede tener carga eléctrica positiva, negativa o neutra. Una molécula se convierte en radical libre al perder o ganar un electrón<sup>49,50</sup>.

Los radicales libres son átomos, por lo general de oxígeno, altamente reactivos e inestables; que se liberan cuando el alimento es

metabolizado en nuestra células para producir energía y son inactivos por mecanismos enzimáticos y otros de atrapamiento<sup>51</sup>.

Si bien el oxígeno es vital para nuestra vida, éste por formación natural adquiere un carácter tóxico para nuestro organismo por la formación de radicales libres, que causan reacciones de óxido reducción en cadena, dañando diversas estructuras lipídicas, protéicas e incluso al ADN y ARN<sup>8,9,10,11</sup>. Aproximadamente el 2 por ciento del oxígeno de la respiración se transforma en el radical anión superóxido el que al poseer un electrón desapareado no tiene capacidad para salir de la mitocondria de la célula, debido a que la membrana interna de la mitocondria es impermeable a este radical. Por otro lado, cuando se activan las células fagocíticas, incrementan su consumo de oxígeno con la consecuente formación del anión superóxido; así mismo, los metales de transición, como el hierro y el cobre pueden reaccionar con el ascorbato formando el radical hidroxilo que viene a ser también un radical libre<sup>52,53,54</sup>. A estos radicales libres que derivan del oxígeno se les denomina más propiamente “especies reactivas de oxígeno” (ERO), para diferenciarlos de las “especies reactivas de nitrógeno” (ERN)., que comprenden al óxido nítrico y al dióxido nítrico<sup>55,56,57</sup>.

### **2.2.1. Antioxidantes**

Los antioxidantes son nutrientes capaces de neutralizar la acción oxidantes de los radicales libres, sin perder su estabilidad electroquímica. Actúan donando electrones y evitando que los radicales libres los capten de las células. Los antioxidantes utilizados en alimentos, previenen o inhiben el desarrollo de la rancidez o la aparición de otros compuestos de deterioro debido a la oxidación<sup>58,59</sup>.

Frecuentemente los antioxidantes pierden su actividad a altas concentraciones y se comportan como prooxidantes al intervenir como promotores de las reacciones de iniciación<sup>60</sup>. De acuerdo a su modo de acción los antioxidantes se clasifican como

bloqueadores de radicales libres, quelantes de iones metálicos y como eliminadores de oxígeno<sup>61,62</sup>.

### **2.2.2. Antioxidantes naturales**

Se conoce que las sustancias naturales son más inocuas que las realizadas por síntesis y es así que se está buscando, en las fuentes naturales nuevas sustancias con propiedades antioxidantes que puedan reemplazar a los antioxidantes sintéticos. Entre los antioxidantes sintéticos más usados en la industria alimentaria que estabilizan y protegen grasas vegetales y animales tenemos al Butil hidroxitolueno (BHT), Butil hidroxianisol (BHA), Terbutil hidroquinona (TBHQ) y el Galato de propilo (PG)<sup>59,61</sup>. Entre los antioxidantes naturales encontrados en las plantas tenemos a los flavonoides, derivados del ácido cinámico, tocoferoles y ácidos orgánicos polifuncionales<sup>58</sup>. Las plantas superiores tienen un alto contenido de antioxidantes, como vitamina C, vitamina E, vitamina B, carotenos, flavonoides entre otros, compuestos que tienen la propiedad de reaccionar con los radicales libres y evitar de esta manera el efecto nocivo que puedan causar a las células<sup>63</sup>. Los tocoferoles protegen a los ácidos grasos poliinsaturados y el  $\alpha$ -tocoferol reduce la concentración de dióxido de nitrógeno y su acción está vinculada con la reducción de enfermedades cardiovasculares y prevención del cáncer<sup>64</sup>. El consumo de carotenoides está relacionado con la prevención de cataratas, aterosclerosis, degeneración muscular y esclerosis simple, así como, a una baja de incidencia de cáncer de próstata<sup>65</sup>. Así mismo, la ingesta de licopeno,  $\beta$ -caroteno y compuestos polifenólicos; entre los que destacan los flavonoides, antraquinonas, cromonas, cumarinas y otros, constituyen un importante grupo de antioxidantes naturales<sup>66,67</sup>.

### **2.2.3. Aceites esenciales como antioxidantes**

Los aceites esenciales a través de numerosas investigaciones están demostrando que tienen actividad antioxidante, así, en un

estudio sobre la actividad antioxidante *in vitro* de los aceites esenciales de *Origanum vulgare* L. (orégano), *Rosmarinus officinalis* L. (romero) y *Coriandrum sativum* L. (cilantro), en emulsiones de agua en aceite (Ag/Ac) y aceite en agua (Ac/Ag), sometidas al deterioro oxidativo por medio de la radiación ultravioleta, se demostró que en la emulsión de Ag/Ac, el aceite esencial de orégano presentó actividad antioxidantes superior a la del cilantro y el romero, e incluso a la de la vitamina E y así mismo; el aceite esencial de orégano presentó una acción protectora más baja en la emulsión de Ac/Ag<sup>18</sup>. En un estudio sobre la evaluación de la actividad antifúngica del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. sobre *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* y *Cándida albicans*; se demostró que tiene esta actividad, debido posiblemente a la presencia de compuestos fenólicos como el timol y el carvacrol en su composición química<sup>68</sup>. En la investigación realizada sobre *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán” se demuestra su actividad antioxidante mediante la aplicación de tres modelos ensayados con resultados muy cercanos a la vitamina C, debido a la estructura de sus componentes químicos<sup>1</sup>. El aceite esencial obtenido de *Zengiber officinalis* “jengibre” basado en su composición química de monoterpenos y sesquiterpenos, se estimó que puede ejercer una acción antimicrobiana sobre algunos microorganismos como *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus faecalis*<sup>69</sup>.

Al realizar el estudio de las actividades anti-*Helicobacter pylori* y antioxidante del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* Epling “urqu muña” con la aplicación de tres modelos antioxidantes, se determinó que la especie posee efecto anti-*Helicobacter pylori* y que su aceite esencial muestra un significativo efecto antioxidante comparado con el trolox como muestra control, atribuyendo la actividad antioxidante a los siguientes constituyentes de su composición química: pulegona, linalol, mentona,  $\beta$ -pineno,  $\beta$ -myrceno limoneno, p-cimeno, y  $\alpha$ -terpineol<sup>70</sup>.

En la determinación del efecto antibacteriano del aceite esencial de *Dittrichia viscosa subs.* frente a *Helicobacter pylori* a 44,40ug/mL se encontró efecto antibacteriano y a 88,8 - 133,2ug/mL inhibición completa del crecimiento de *Helicobacter pylori*<sup>71</sup>. El aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) demostró actividad antimicótica *in vitro* frente a las cepas de *Cándida albicans* a las concentraciones de 50 y 100 por ciento y frente a los dermatofitos *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton tonsurans*; son sensibles en los volúmenes de 5 y 50mL; encontrándose en el aceite esencial los siguientes componentes químicos: Pulegona, mentona y limoneno<sup>72</sup>.

#### **2.2.4. Cavidad bucal y placa dental**

La boca constituye una de las estructuras de nuestro cuerpo que constantemente está expuesta a sustancias extrañas y de los hábitos que tiene cada persona, es así que sustancias como el tabaco, el alcohol, el café entre otras son temas de investigación. La boca alberga innumerables microorganismos en un ecosistema de complejidad considerable que todavía no ha sido investigado en su totalidad. La boca fue considerada como un hábitat simple para los microorganismos pero en la actualidad se reconoce que la mucosa oral, los dientes, el surco gingival, la lengua, la saliva y otras superficies forman hábitats o sitios diferentes donde los microorganismos se multiplican. Cada zona tiene su propia población característica, a menudo con muchas especies microbianas diferentes, las cuales pueden complementarse o competir con otras en la misma población, por tanto la flora bucal es una entidad dinámica afectada por numerosos cambios durante la vida del huésped. El más común que se aísla de la boca de los recién nacidos es el *Streptococcus salivarius* y *Staphylococcus albus*, y en ocasiones *Cándida albicans*. La erupción de los dientes temporales proporciona una superficie diferente para la adherencia microbiana y esto se

caracteriza por la aparición de *Streptococcus sanguis* y *Streptococcus mutans* como habitantes regulares de la cavidad bucal. Con la erupción de los dientes permanentes el número de los microorganismos en la boca es mayor y se incrementan especies como *Leptotricia* y *Fusobacierium*. En el adulto la flora bucal es más compleja, por la variedad de placa dental y el grado de enfermedad periodontal. Las lesiones cariosas y las restauraciones pocas satisfactorias propician ambiente para acumulaciones de bacterias. En el adolescente se incrementan los *Bacteroides* y las *Espiroquetas* y la placa superficial acoge numerosos *Streptococcus*, entre ellos a *Streptococcus mutans* y *sanguis*. Así mismo se han aislado actinomicetos y otros Gram positivos y Gram negativos de posición taxonómica incierta. Con la pérdida de los dientes la colonización bacteriana disminuye pero aumentan las levaduras<sup>73,74</sup>.

Algunas bacterias tienen la habilidad de adherirse a los tejidos blandos, así *Streptococcus salivarius* puede adherirse a la mucosa del dorso de la lengua y también a otros tejidos blandos. Otras en particular *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguis*, se adhieren al esmalte debido a la producción de polisacáridos extracelulares por la bacteria<sup>74</sup>.

#### **2.2.5. *Streptococcus mutans***

Esta bacteria está implicada como el principal agente etiológico de la caries dental la que se considera como una enfermedad infecciosa más común en el ser humano. Es una bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa que se encuentra normalmente en la cavidad bucal humana formando parte de la placa dental. Se asocia al inicio y desarrollo de las caries dentales. Es acidofílica porque vive en pH bajo, acidogénica porque metaboliza los azúcares a ácido y acidúrica porque sintetiza ácidos. Metaboliza la sacarosa para producir polisacáridos extracelulares facilitando su adhesión a las piezas dentarias<sup>73, 74</sup>.

En una investigación realizada sobre el té verde, planta nativa del Asia demostraron que por su contenido polifenólico, puede ser utilizada como una alternativa en la prevención de la formación de la placa dental<sup>75</sup>. En un estudio realizado en niños en edades de pre escolar y educación primaria, se determinó la prevalencia de caries dental del 56 por ciento, estableciéndose presencia y cantidad de *Streptococcus mutans*<sup>76</sup>. El flúor inhibe la acción enzimática y los flavonoides inhiben la adherencia y la inhibición de la producción de ácido láctico<sup>77</sup>; el ácido láctico inhibe la síntesis de dextranos solubles e insolubles por las cepas de *Streptococcus mutans*<sup>78</sup>. En la evaluación realizada *in vivo* en hombres y mujeres voluntarios para determinar la formación de biofilm, utilizando los aceites esenciales de *Mentha piperita*, *Cuminum cyminum* y la clorhexidrina contra *Streptococcus mutans* y *Streptococcus pyogenes*, se determinó que los aceites esenciales fueron eficaces en comparación con la clorhexidrina; exponiendo un posible papel de los aceites esenciales en el desarrollo de nuevos tratamientos anticaries<sup>80</sup>.

### III. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

##### 3.1.1. Materiales

- Embudo de decantación.
- Embudo simple.
- Probeta florentino.
- Tubos de ensayo.
- Vaso Beaker.
- Fiolas.
- Placas petri.
- Micropipetas.
- Cubeta espectrofotométrica.

##### 3.1.2. Reactivos

- Agua destilada.
- Metanol.
- Etanol.
- n-hexano.
- Butanol.
- Sulfato ferroso.
- Manitol.
- Trolox: Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico.
- Pirogalol.
- Agar Mueller Hinton.
- DPPH: Ácido 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo.
- Deoxirribosa.
- Vitamina C.

Los reactivos utilizados fueron de grado analítico y adquiridos de Merck Darmstad y Sigma Chemical Company.

### 3.1.3. Equipos

- Balanza analítica Mettler. Sensibilidad 0,1mg
- Hidroextractor de destilación de acero inoxidable.
- Refractómetro Carl Seizz. Modelo 74078.
- Potenciómetro Orion. Modelo SA720.
- Picnómetro de 1mL.
- Cromatógrafo de Gases / Espectrometría de Masas (CG/EM). Modelo CG: Trace/EM:Trace.
- Espectrofotómetro: Espectro UV.VIS Double Beam PC.
- Homogenizador Vortex Mixer. VM300.
- Estufa Memmert.
- Estufa microbiológica con temperatura regulable.

#### **Microorganismo de ensayo**

*Streptococcus mutans* - cepa clínica

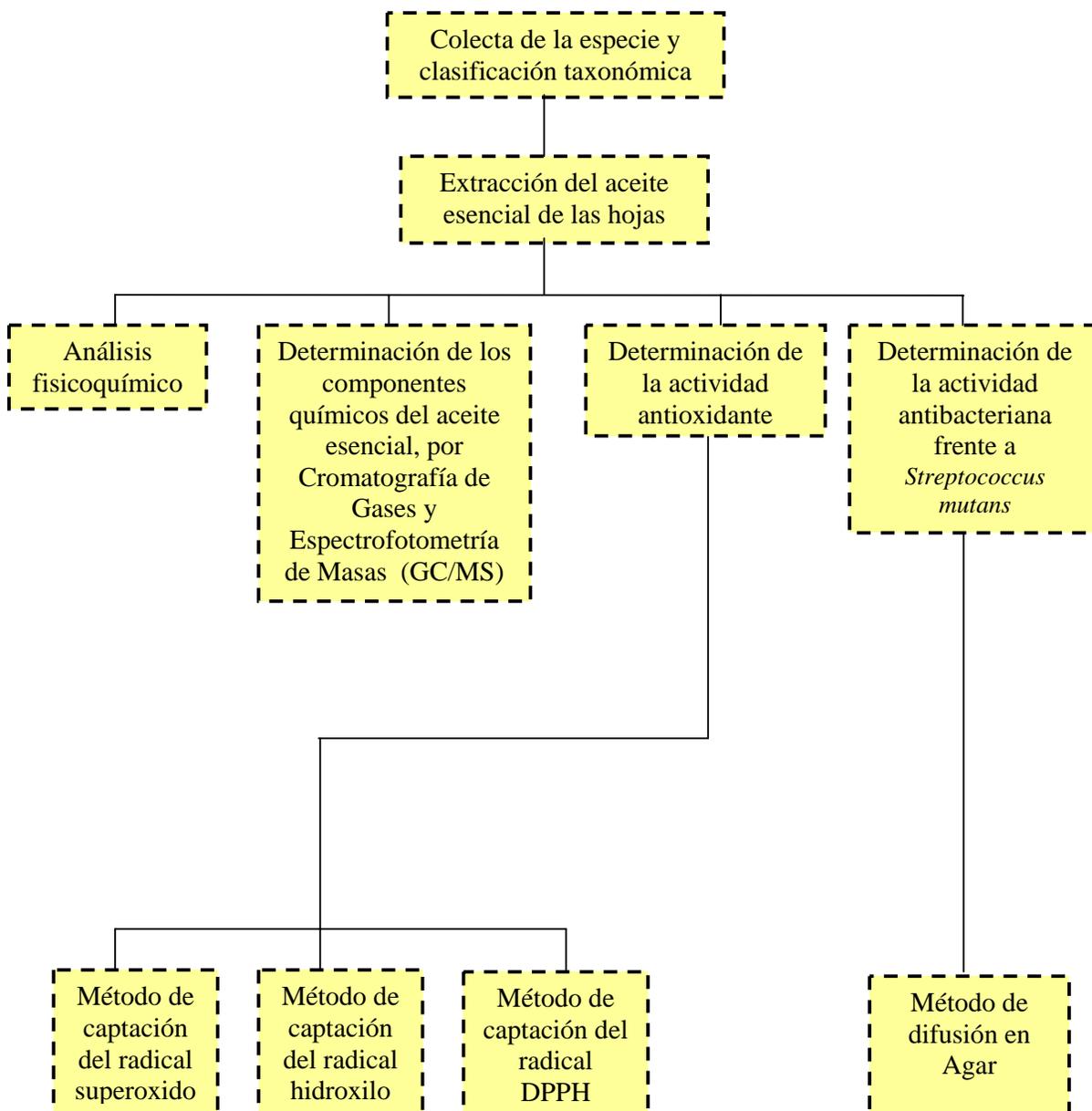
### 3.2. ENTIDADES DONDE SE DESARROLLÓ LA INVESTIGACIÓN

La hidroextracción por destilación con arrastre de vapor de agua y con control de presión y temperatura, se desarrollo en la planta piloto de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la UNMSM, y el análisis fisicoquímico en la sección de síntesis y semisíntesis del Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM. La investigación de la actividad antioxidante se efectuó en el Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición “Alberto Guzmán Barrón”, de la Facultad de Medicina Humana de la UNMSM. El estudio de la determinación antibacteriana se realizó en el Instituto de Microbiología y Parasitología “Simón Pérez Alva” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM.

### 3.3. TIPO DE INVESTIGACIÓN

El análisis del estudio pertenece al tipo analítico, experimental, prospectivo y longitudinal.

### 3.4. FLUJOGRAMA DEL TRABAJO EXPERIMENTAL



#### **3.4.1. Colecta y clasificación taxonómica**

Un peso aproximado de 10kg de hojas frescas de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) "Coca" fueron proporcionadas por la Empresa Nacional de la Coca (ENACO-S.A.), proveniente del norte del Perú, del departamento de la Libertad-Trujillo, colectadas a 2200 msnm durante el mes de Marzo del 2007. La clasificación taxonómica de la especie vegetal, se realizó en el Museo de Historia Natural de la UNMSM.

#### **3.4.2. Extracción del aceite esencial**

El material de hojas frescas fue tratado en un sistema de hidrodestilación (HD) con arrastre de vapor de agua a presión y temperatura controlada durante dos horas. Se realizó dos extracciones y el destilado del aceite esencial fue recibido en una probeta florentino. La deshidratación del aceite esencial se realizó utilizando sulfato de sodio anhidro grado reactivo, con posterior filtración y conservación del aceite en un frasco de vidrio de color ámbar a temperatura de 4°C.

#### **3.4.3. Rendimiento de aceite esencial**

Se realizó con el volumen de destilado del aceite esencial obtenido en la probeta florentino. Por el método gravimétrico-volumétrico se determinó el Porcentaje de Rendimiento de Aceite Esencial (%RAE) con la siguiente expresión:

$$\%RAE = \text{Vol. AE(mL)} / P_{\text{muestra}} \text{ (g)} \times 100$$

*Donde:*

Vol. AE: Volumen del aceite esencial obtenido en mililitros.

P<sub>muestra</sub>: Peso de la muestra a destilar en gramos.

El rendimiento de aceite esencial fue de 0,06 por ciento v/p

#### **3.4.4. Análisis preliminar y fisicoquímico**

Se realizó el análisis organoléptico, solubilidad y análisis fisicoquímico determinándose las principales constantes físicas de índice de refracción y la gravedad específica<sup>45,47</sup>.

#### **3.4.5. Determinación de los componentes químicos del aceite esencial, por Cromatografía de Gases / Espectrofotometría de Masas (CG/EM)**

El análisis se realizó en las siguientes condiciones: Columna silicagel fundida 30 metros de largo, temperatura inicial 40°C, 10°C/min., temperatura final 110°C (1 min.), inyección 240°C y volumen de inyección 5µL. Mediante este sistema se detectó y elucidó los componentes químicos del aceite esencial de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) "Coca", los que se identificaron por comparación con los estándares de espectros de masas de las respectivas bibliotecas.

#### **3.4.6. Determinación de la actividad antioxidante**

Se realizó utilizando el método del radical 2,2-difenilpicrilhidrazil (DPPH), el método de captación del radical libre anión superóxido y el método de captación de radicales hidroxilo.

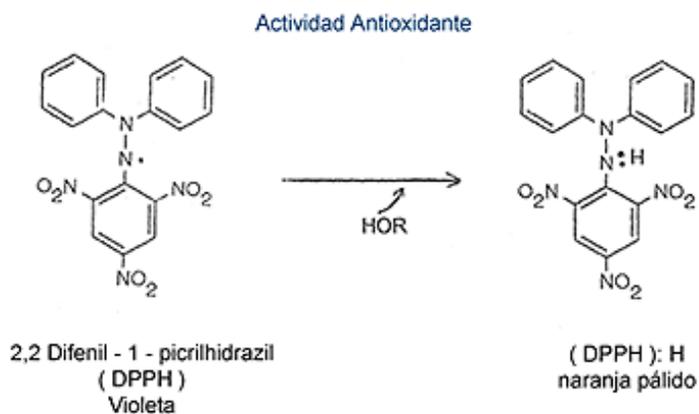
##### **3.4.6.1. Método de captación del radical 2,2-difenilpicrilhidrazil (DPPH)<sup>33</sup>**

###### **Fundamento:**

El 2,2-difenilpicrilhidrazil (DPPH) es un radical libre estable, presenta una coloración púrpura con absorbancia a 517nm. Las sustancias atrapadoras de radicales libres (donadoras de H) reaccionan con este compuesto y producen la desaparición del color. La reacción es seguida midiendo la disminución de la absorbancia a 517nm. Los resultados se pueden expresar como IC50, % de inhibición, % de

actividad antirradicalaria o equivalentes a trolox o a vitamina C.

En una primera evaluación se preparan extractos a concentraciones de 100, 50 y 10 ug/mL.



Se emplea como sustancia de referencia de captación de DPPH al trolox y la muestra problema es tratada con butanol.

#### Procedimiento (A)

	Blanco	Control	Muestra	Trolox
Agua bidest. (mL)	0,4	0,4	-	-
Etanol (mL)	0,8	-	-	-
Muestra (mL)	-	-	0,4	-
Trolox				0.4
DPPH* (mL)	-	0,8	0,8	0.8

Proceder de la siguiente manera:

Mezclar y dejar en reposo a temperatura ambiente alejado de la luz 30 minutos.

Leer a 517nm. El DPPH se prepara en metanol a una concentración de 20 mg/L. Se prepara una curva patrón de trolox.

Preparar una solución hidroalcohólica (1:1) de trolox en concentración 36 ug/mL y preparar una batería de concentración de 10,0; 7,2 y 3,6 siguiendo el procedimiento A

Los resultados se expresan en:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

A= Lectura DPPH

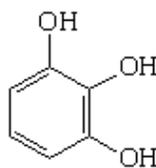
B= Lectura del aceite esencial y DPPH

Y se determina IC50 para el trolox y para el aceite esencial de coca

#### 3.4.6.2. Método de captación del radical libre anión superóxido<sup>34</sup>

##### Fundamento:

El pirogalol es un derivado fenólico generador de superóxido, en medio alcalino se autooxida formando la pirogalina compuesto coloreado que absorbe a 325nm. El método consiste en inhibir la autooxidación en condiciones alcalinas.



Pirogalol

##### Procedimiento (B)

Se emplea como sustancia atrapadora de referencia al ácido ascórbico (vitamina C).

En una cubeta de 1mL colocar: Buffer tris HCl 0,05 M pH 8,2 950µL. Incubar por 1 minuto a 37°C, añadir:Pirogalol 2mM/ HCl 0,1 M 50µL. Mezclar y leer a 325nm durante 3

minutos. La adición de 50µL del aceite esencial de coca o vitamina C, como sustancias atrapadoras del radical superóxido, disminuyen la autooxidación.

### 3.4.6.3. Método de captación de radicales hidroxilo<sup>35</sup>

**Fundamento:**

La desoxirribosa reacciona con radicales hidroxilo generados por el ión Fe<sup>+2</sup> y es degradada produciendo malondialdehído (MDA) que reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar un complejo coloreado de Malondialdehido – Ácido tiobarbitúrico (MDA-TBA) que exhibe absorbancia a 532nm.

Procedimiento (C)

	<b>Con hierro</b>		<b>Sin hierro</b>	
	Tubo Nº 1	Tubo Nº 2	Tubo Nº 3	Tubo Nº 4
	<b>Aceite de coca o manitol</b>	<b>Blanco</b>	<b>Aceite de coca o manitol</b>	<b>Blanco</b>
<b>Solución Deoxirribosa 5mM* (mL)</b>	0,8	0,8	0,8	0,8
<b>Aceite esencial de coca o manitol</b>	0,2	-	0,2	-
<b>Fe SO<sub>4</sub> 3mM* (µL)</b>	0,2	0,2	-	-
<b>Buffer Fosfato 0,1 M pH 7,4 en NaCl 0,15M (mL)</b>	-	0,2	0,2	0,4

Incubar a 37<sup>o</sup> por 15 minutos.

Medir 0,5mL de cada uno de los tubos 1, 2, 3 y 4 proceder según el cuadro siguiente:

<b>Tubos 1, 2, 3 y 4:</b>	<b>0,5</b>	<b>0,5</b>	<b>0,5</b>	<b>0,5</b>
<b>TBA 1% en NaOH 0,05N (mL)</b>	1,0	1,0	1,0	1,0
<b>Ac. Acético glacial (mL)</b>	1,0	1,0	1,0	1,0

Incubar en BM hirviente durante 20 minutos. Enfriar. Leer a 532nm.

Se emplea el manitol como sustancia de referencia atrapadora del radical hidroxilo.

### 3.4.7. Determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial frente a *Streptococcus mutans*<sup>36,37</sup>

#### 3.4.7.1. Método de Difusión en Agar

##### Fundamento:

En la inhibición del crecimiento bacteriano, mediante la difusión de las sustancias activas en un medio sólido la que se evidencia con la formación de halos de inhibición.

##### **Microorganismo**

Bacteria Gram positiva: *Streptococcus mutans* cepa clínica.

##### **Muestra**

Aceite esencial de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) "Coca" en concentraciones de 100, 50 y 10 por ciento. Utilizándose como diluyente alcohol etílico de 96°.

##### **Preparación de la suspensión del inóculo**

El cultivo del microorganismo de prueba fue reactivado en solución salina al 0,9 por ciento.

##### **Preparación de las placas**

Se utilizó el agar Mueller Hinton; previamente reconstituido, esterilizado, enfriado y mantenido a 45°C.

##### **Inoculación e incubación de la muestra**

Se procedió a colocar 20µL del aceite esencial en las concentraciones señaladas anteriormente.

##### **Control negativo**

Se utilizó alcohol de 96°

### ***Lectura e interpretación de los resultados***

Se realizó la lectura con la observación de las zonas claras de inhibición del crecimiento, mediante el registro de los diámetros en mm de estas zonas.

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Extracción del aceite esencial de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) var. *Truxillense*

Con la aplicación del método de hidroextracción con arrastre de vapor a temperatura y presión controlada, se obtuvo un rendimiento de 0,06 por ciento v/p.

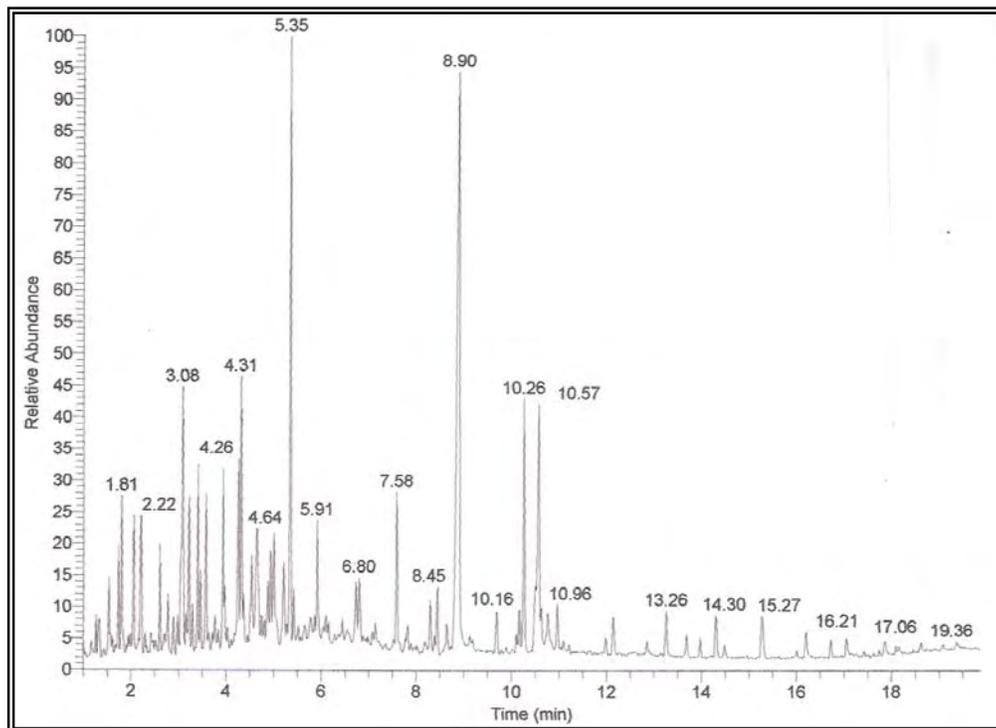
### 4.2. Análisis preliminar y constantes físicas (Tabla 1)

**Tabla 1.** Análisis preliminar y constantes físicas de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) “Coca”.

DETERMINACIONES	RESULTADOS
<b>Análisis organoléptico</b>	Líquido, oleoso, medianamente amarillo, aromático, agradable y altamente volátil, ligeramente picante, pH 6.5
<b>Solubilidad</b>	Insoluble en agua y en etanol 50 por ciento, ligeramente soluble en metanol, soluble en etanol absoluto, n-hexano y éter etílico
<b>Constantes físicas</b>	Índice de refracción (21°C):1,482 Gravedad específica (21°C):0,914g/mL

### 4.3. Determinación de la composición química del aceite esencial de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) “Coca”

El análisis del aceite esencial realizado por Cromatografía de Gases / Espectrometría de Masas (CG/EM), permitió identificar 14 componentes químicos que se presentan en la figura 1 y tabla 2.



**Figura 1.** Cromatograma de Gas del aceite esencial de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) var. *Truxillense*

**Tabla 2.** Composición química del aceite esencial de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) “Coca” determinado por Cromatografía de Gases / Espectrometría de Masas (CG/EM).

COMPONENTES QUÍMICOS	TIEMPO DE RETENCIÓN (T.R.) (Minutos)
Nona-3,5-dien-2-ona	1.74
Salicilato de metilo	1.81
Ácido nonanoico	2.06
$\alpha$ -longipineno	2.61
Ácido decanoico	2.78
2-Propenal,3-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-yl)-	3.22
$\alpha$ -ciclocitrildeneacetona	3.41
Trans- $\beta$ -ionona	3.94
Olivetol	4.31
Apiol	5.35
Ácido hexadecanóico	8.90
Pitol	10.26
Ácido 9,12,15-octadecatrienóico, metil éster	10.57
Ácido octadecanoico	10.75

4.4. Espectros de los componentes químicos del aceite esencial de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) "Coca" var. *Truxillense*

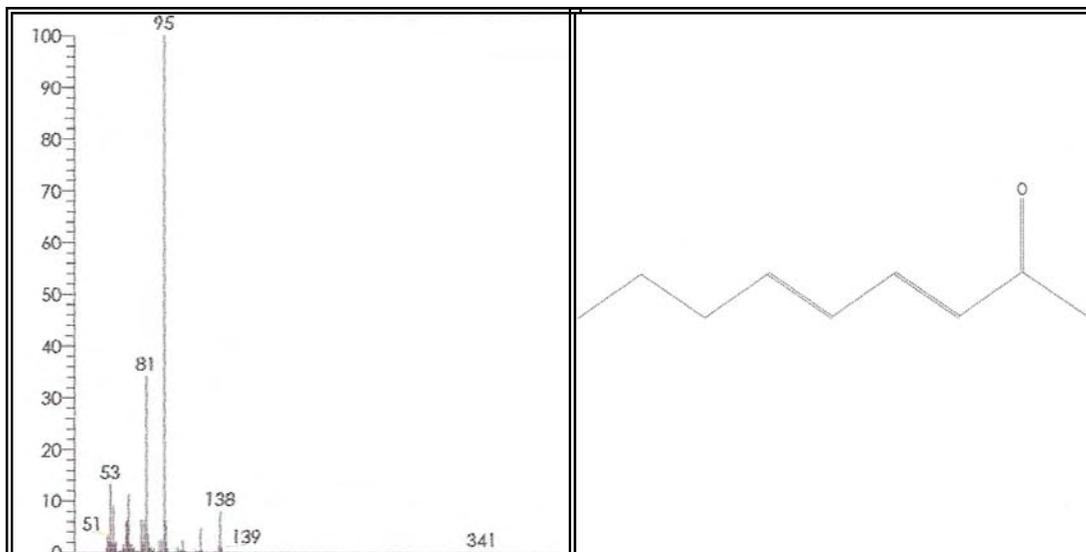


Figura 2. Espectro de la estructura del Nona-3,5-dien-2-ona

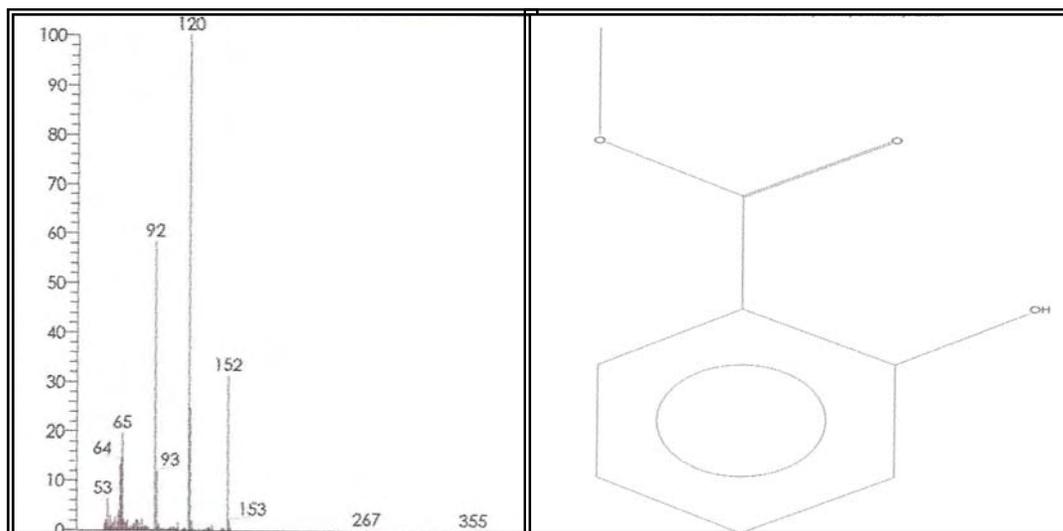
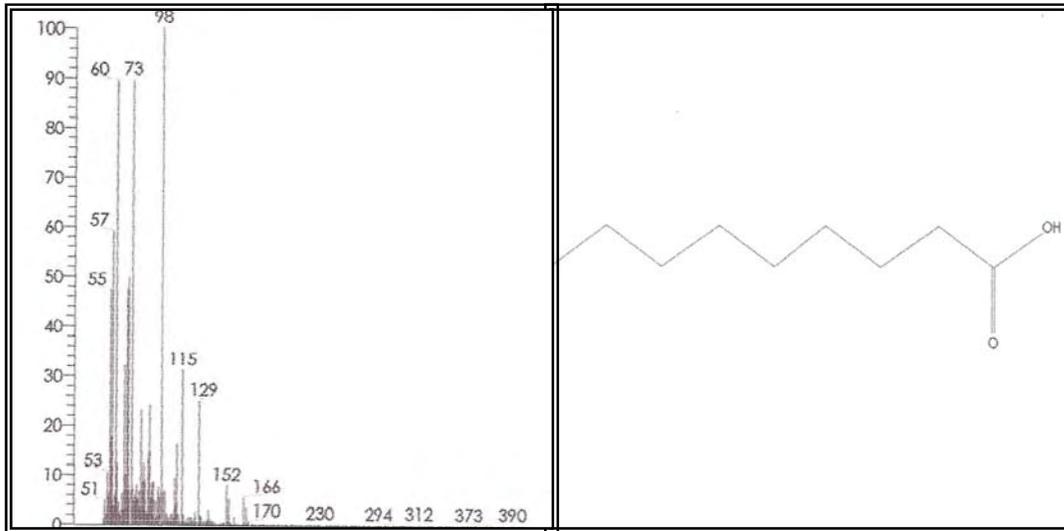
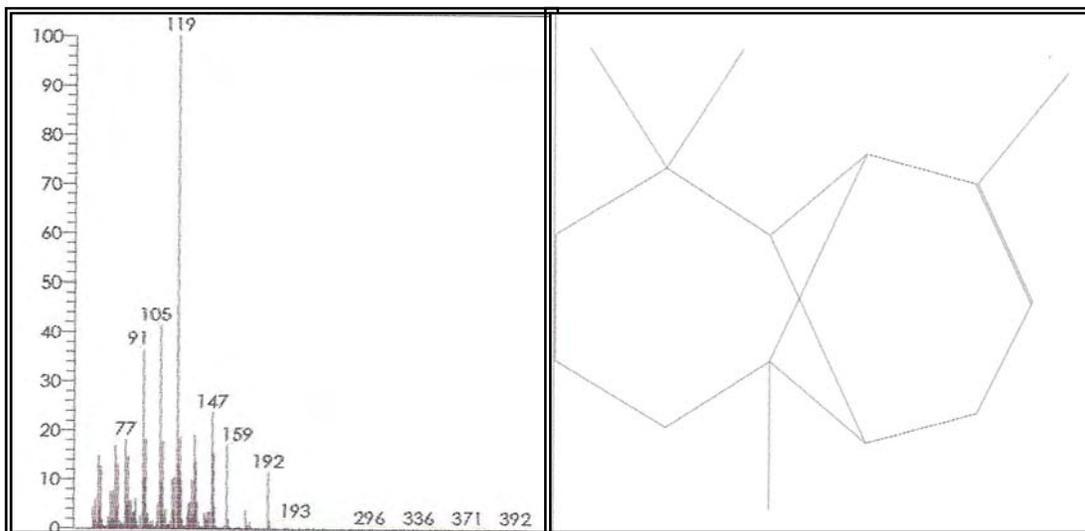


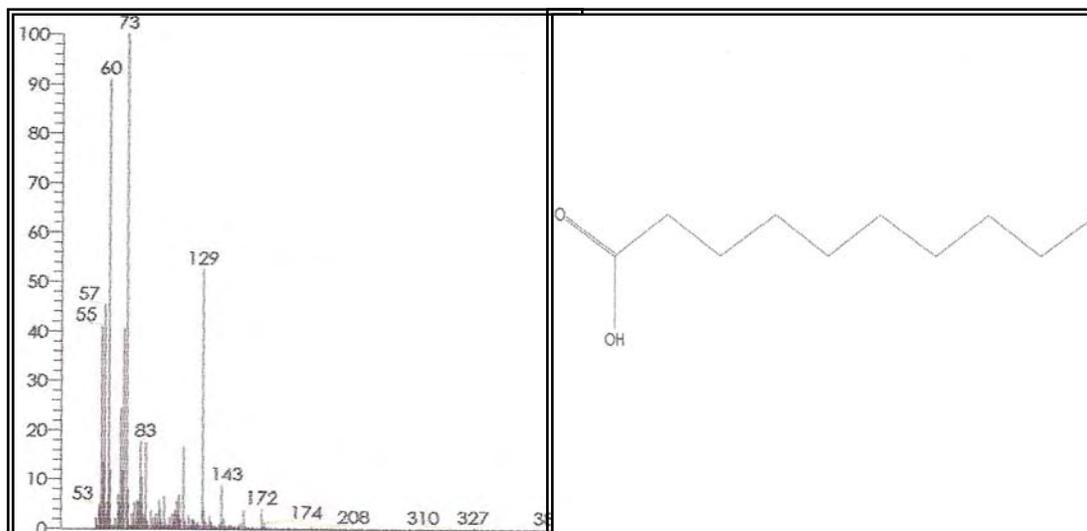
Figura 3. Espectro de la estructura del Salicilato de metilo



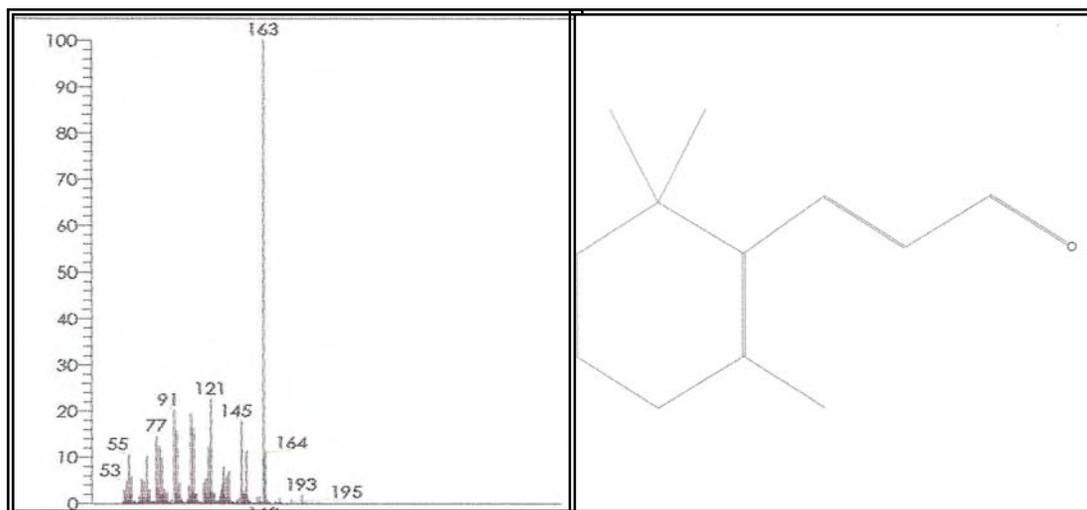
**Figura 4.** Espectro de la estructura del Ácido nonanoico



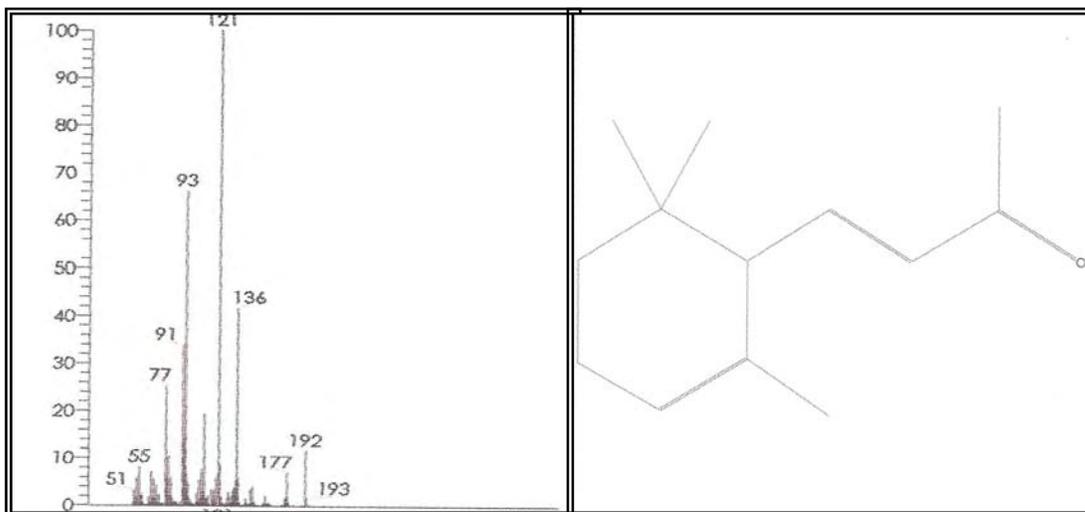
**Figura 5.** Espectro de la estructura del  $\alpha$ -longipineno



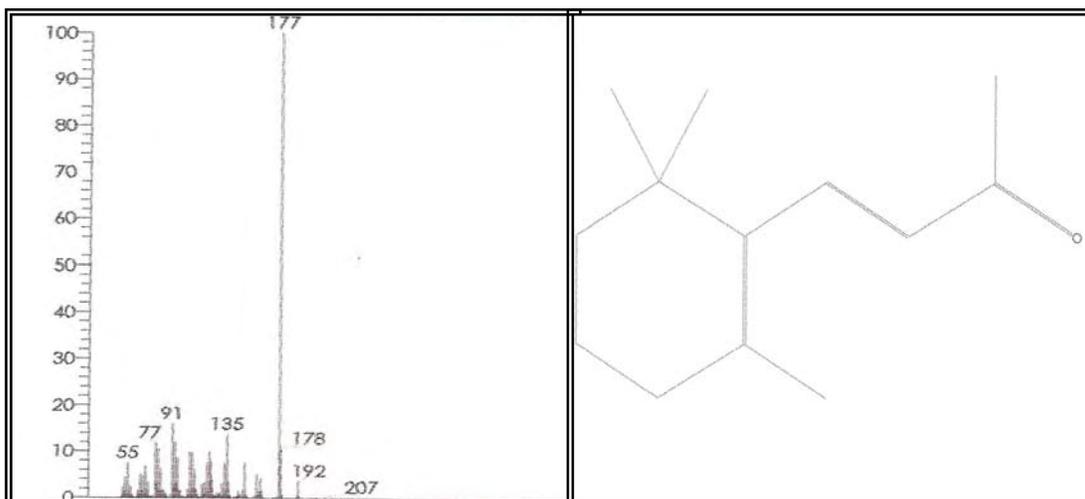
**Figura 6.** Espectro de la estructura del ácido decanoico



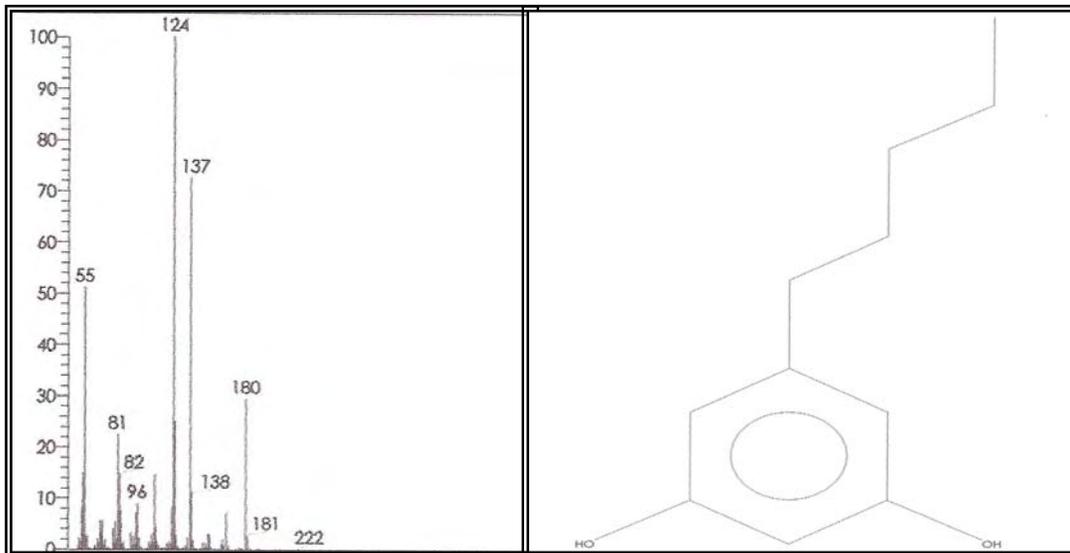
**Figura 7.** Espectro de la estructura del 2-propenal, 3-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-



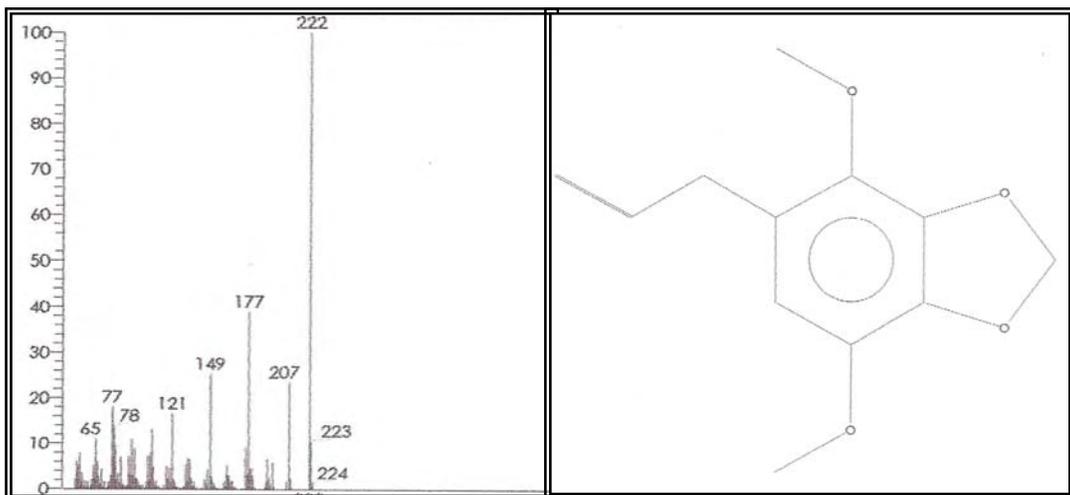
**Figura 8.** Espectro de la estructura del  $\alpha$ -cyclocitryldeneacetona



**Figura 9.** Espectro de la estructura del trans- $\beta$ -ionona

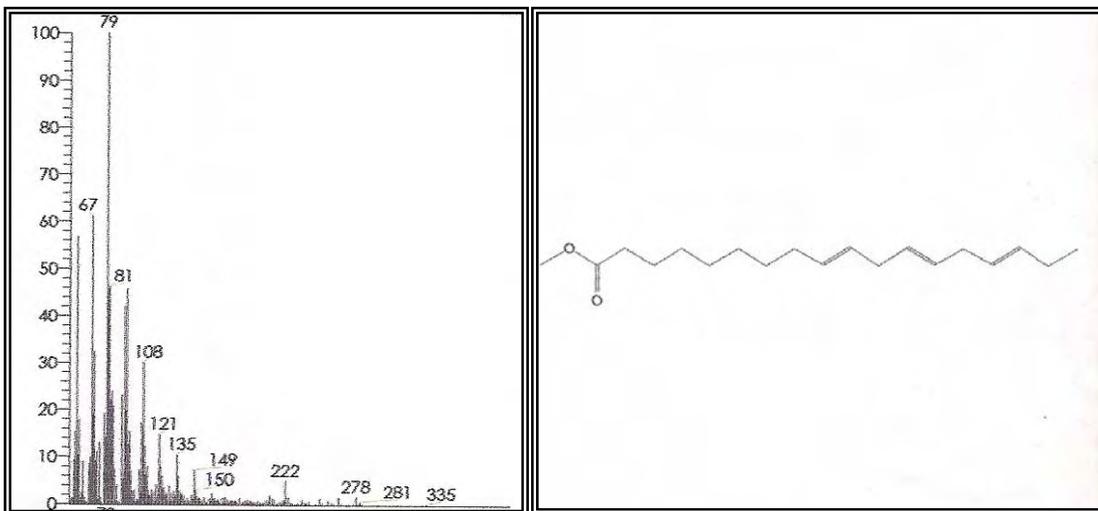


**Figura 10.** Espectro de la estructura del olivetol

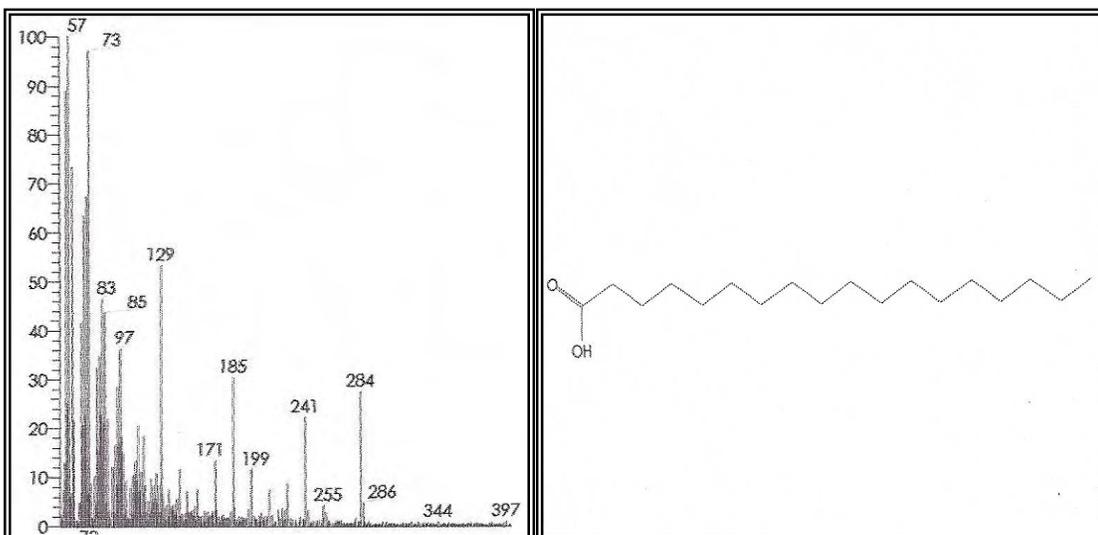


**Figura 11.** Espectro de la estructura del apiol





**Figura 14.** Espectro de la estructura del ácido 9,12,15-octadecatrienónico, metil éster



**Figura 15.** Espectro de la estructura del ácido octadecanoico

#### 4.5. Determinación de la actividad antioxidante del aceite esencial de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) "Coca" var. *Truxillense*

##### 4.5.1. Método de captación del radical 2,2-difenilpicrilhidrazil (DPPH)

Los resultados obtenidos se presentan en la figura N° 15 y 16

CAPACIDAD DE CAPTACIÓN DEL RADICAL LIBRE DIFENILPICRILHIDRAZIL (DPPH)

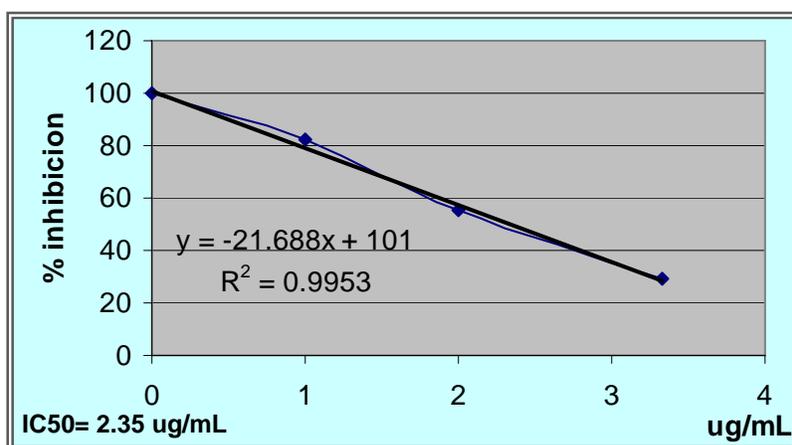


Figura 15. Curva de captación de DPPH del trolox

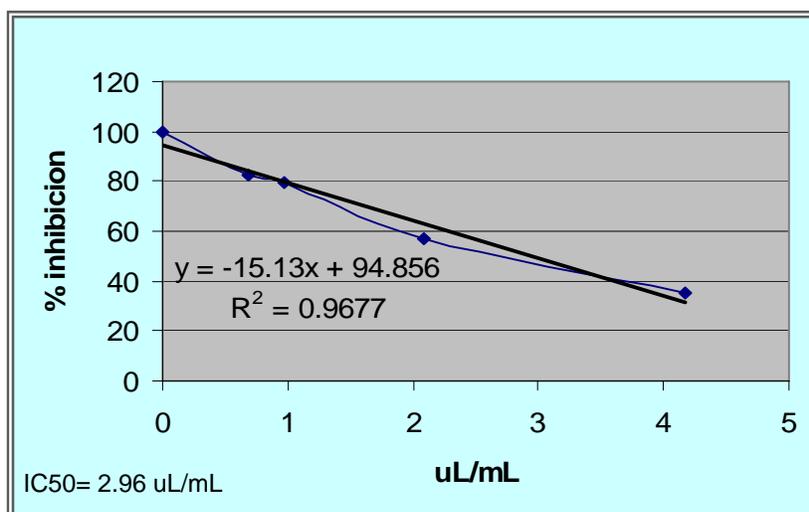


Figura 16. Curva de captación de DPPH del aceite esencial de coca

#### 4.5.2. Método de captación del radical libre anión superóxido

Los resultados obtenidos se presentan en la figura N° 17 y 18

##### CAPTACIÓN DEL RADICAL LIBRE ANIÓN SUPERÓXIDO

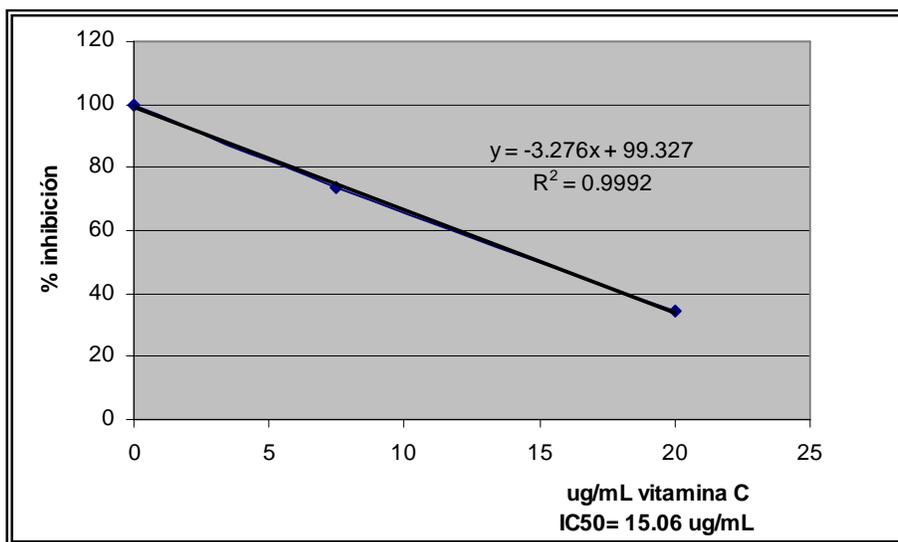


Figura 17. Curva de captación de radical superóxido de la vitamina C

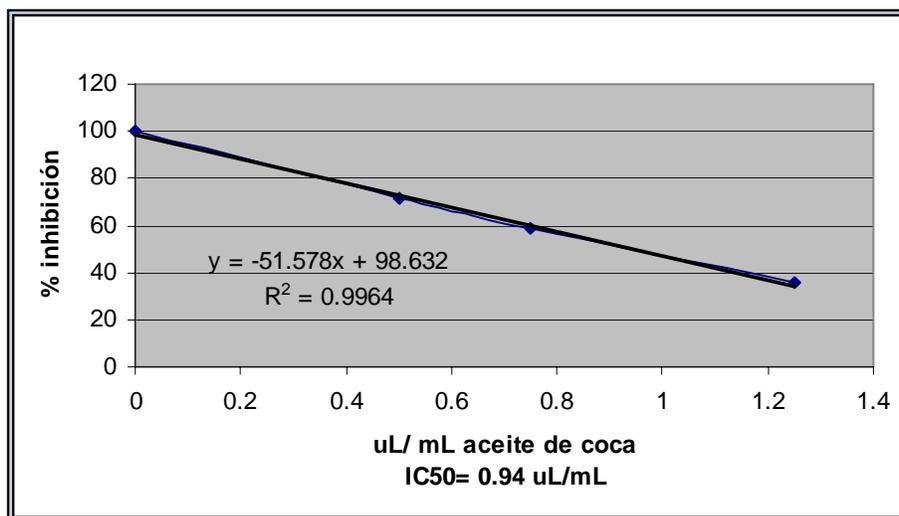


Figura 18. Curva de captación del radical superóxido del aceite esencial de coca

### 4.5.3. Método de captación de radicales hidroxilo

Los resultados obtenidos se presentan en la figura N° 19, 20, 21 y 22.

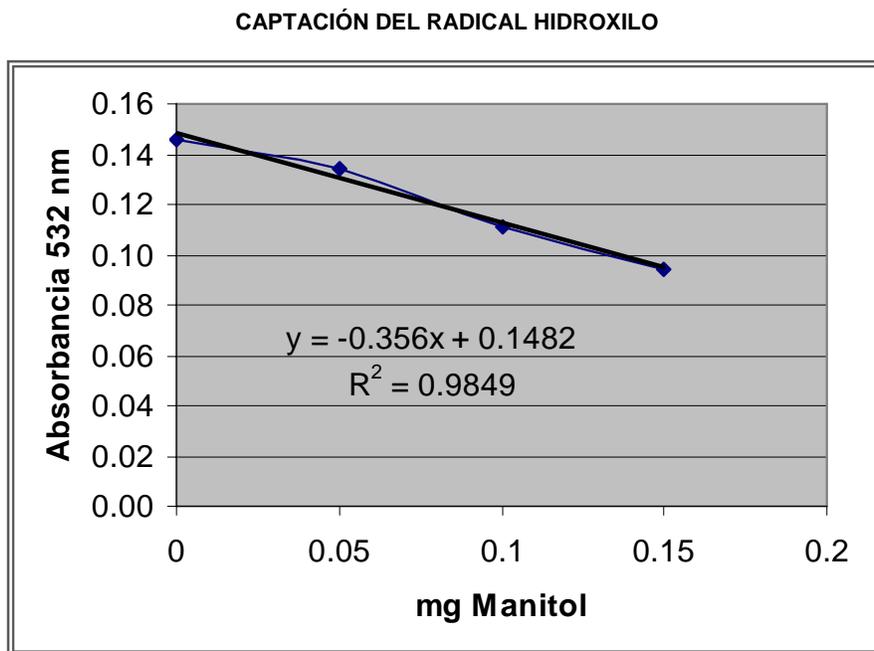


Figura 19. Curva de captación de radical libre hidroxilo del manitol

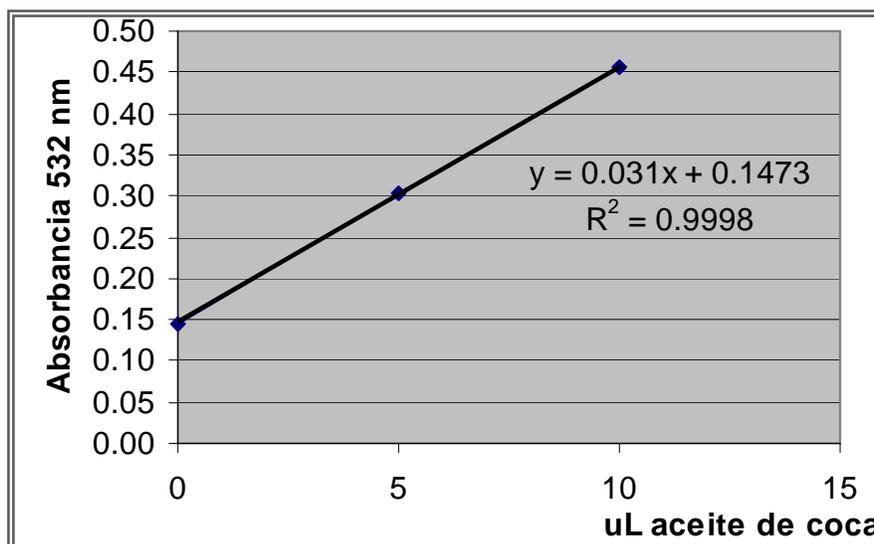


Figura 20. Curva de captación del radical libre hidroxilo del aceite esencial de coca

Actividad prooxidante del aceite esencial de coca en un medio de radical hidroxilo en presencia de ion ferroso

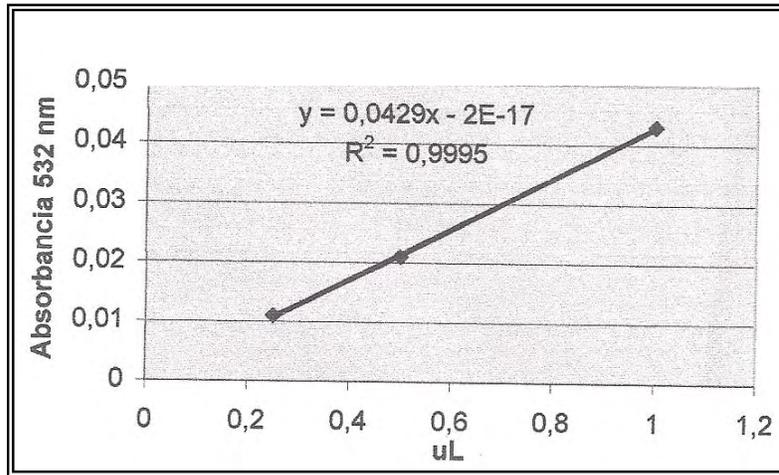


Figura 21. Curva de captación del radical hidroxilo del aceite esencial de coca en presencia del ion ferroso

Actividad prooxidante del aceite esencial de coca en un medio de radical hidroxilo en ausencia del ion ferroso

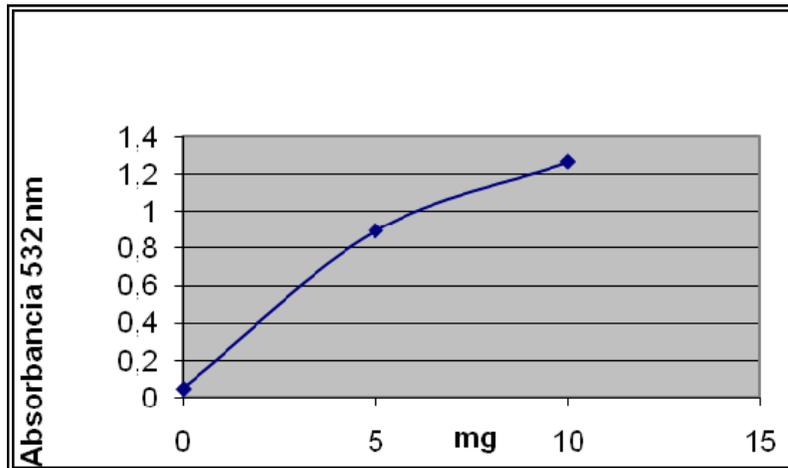


Figura 22. Curva de oxidación de la deoxirribosa por el radical hidroxilo del aceite esencial de coca en ausencia del ion ferroso

**4.6. Determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) “Coca” var. *Truxillense* frente a *Streptococcus mutans***

Los resultados obtenidos se clasificaron de acuerdo a las concentraciones utilizadas del aceite esencial. Tabla 3.

**Tabla 3.** Formación de halos de inhibición de *Streptococcus mutans* en agar Mueller Hinton, empleando el método de difusión en agar

MUESTRA	CONCENTRACIÓN	<i>Streptococcus mutans</i> (Halos de inhibición en mm)
Aceite esencial de Coca	100%	30
	50%	28
	10%	12
Control negativo	Etanol 96°	Inactivo

## V. DISCUSIÓN

Se ha obtenido de la hojas frescas de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron, var. *Truxillense* (Rugby) Plowman “coca”; proveniente del norte del Perú (Trujillo - La Libertad), un rendimiento del 0,06 por ciento v/p, que estaría sujeto a factores como variedad de la especie, medio ecológico y zonas geográficas<sup>38,43</sup>. Los datos obtenidos en las determinaciones físicas de densidad, índice de refracción, solubilidad y pH, indican que presenta características fisicoquímicas propias de los aceites esenciales<sup>47</sup>. Respecto a la composición química cualitativa determinada por Cromatografía de Gases / Espectrometría de Masas (CG/EM), en base a su tiempo de retención (RT) del aceite esencial, los resultados nos indican que está conformado por componentes terpenoides, aromáticos y de naturaleza diversa; lo que se sustenta en trabajos realizados en aceites esenciales obtenidos en otras especies; tal como *Origanum vulgare* L. (orégano), (0,22 por ciento)<sup>68</sup>, *Minthostachys mollis* (muña) (0,19 por ciento)<sup>72</sup>, *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán” (1,25 por ciento)<sup>1</sup>, *Zingiber officinalis* “Jengibre” (0,8 por ciento)<sup>69</sup>.

En la elucidación estructural se ha identificado 14 constituyentes químicos, entre los que destacan por su carácter orgánico funcional, los ácidos alifáticos esterárico, linoléico, decanoico, hexadecanoico, nonanoico y el éster de salicilato de metilo, así mismo el olivetol, un derivado fenólico proveniente del resorcinol, un compuesto aromático oxigenado el apiol, también el pitol, un diterpeno de naturaleza alcohólica y trazas de otros compuestos insaturados y oxigenados como nona-3,5-dien-2-one,  $\alpha$ -longipineno, 2-Propenal,3-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-yl)-,  $\alpha$ -ciclocitrideneacetona y la trans- $\beta$ -ionona.

En estudios realizados en *Origanum vulgare* L. (orégano) y *Thymus vulgaris* L. “tomillo” se ha observado presencia de dos isómeros de carácter fenólico, el timol y el carvacrol, a los que se les señala responsables del efecto antimicrobiano<sup>68,79</sup>.

En la investigación realizada se ha determinado presencia de dos componentes químicos de naturaleza fenólica, el olivetol que viene a ser el pentil resorcinol derivado de la resorcina y el salicilato de metilo, un éster derivado del ácido salicílico con carácter fenólico. Éste último también fue identificado en el análisis del aceite esencial de *Erythroxyllum coca* Lam. Var. Coca por CG / EM con un porcentaje de 13.6 por ciento sobre otros componentes coincidiendo su presencia con el estudio realizado en la especie *Erythroxyllum novogranatense* (Morris) Coca var. *Truxillense*<sup>81</sup>.

El mecanismo de acción de los polifenoles está vinculado a su capacidad para donar hidrógeno y a su acción quelante con iones metálicos; la potente actividad antioxidante reside en sus estructuras químicas con un grupo o-difenólico, un doble enlace conjugado 2-3 y grupos hidroxilos en posiciones 3 y 5, lo que les permite reaccionar con los radicales libres caracterizados por su inestabilidad, alta energía y de efectos dañinos a las células de nuestro organismo; actuando eficientemente contra los radicales hidroxilo y peroxilo<sup>67</sup>.

La presencia e identificación de ácidos grasos saturados e insaturados en la composición química del aceite esencial como: ácido nonanóico, decanóico, hexadecanóico, 9,12,15-octadecatrienóico, metil éster y octadecanoico fortalecerían en sinergismo las propiedades de esta especie. Así mismo, la presencia de componentes hidrocarbonados y oxigenados entre los que se halla el alfa-longipineno y el pitol de naturaleza terpénica; también influirían en las características del aceite esencial que lo hace muy agradable y preferido como saborizante por el aroma especial que tiene<sup>40</sup>.

Existen evidencias de que los compuestos polifenólicos constituyen un importante grupo de antioxidantes, ampliamente distribuidos en las frutas y los vegetales; comprendiendo a los flavonoides, antraquinonas, cromonas, cumarinas y otros. Pueden aparecer desde simples moléculas fenólicas hasta compuestos muy polimerizados con elevado peso molecular<sup>67,82,83</sup>.

El efecto antioxidante determinado en *Erythroxyllum novogranatense* (Morris) Coca var. *Truxillense*, realizado a través de tres modelos experimentales *in*

*vitro*: Modelo de captación del radical DPPH, modelo de captación del radical superóxido y el modelo de captación del radical hidroxilo; nos indican que la acción secuestradora de radicales libres (RL), estaría sujeta a especies químicas y que el aceite esencial de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Coca var. *Truxillense*, estaría interfiriendo en las reacciones de propagación de los radicales libres y en la formación del radical en sí. En el modelo de captación del radical hidroxilo se ha observado que el aceite esencial de coca también puede actuar como agente prooxidante en las condiciones experimentales en las que se ha trabajado.

El aceite esencial de las hojas de coca posee actividad antioxidante variable cuando es probada en diversos sistemas. Si bien los metabolitos antioxidantes en plantas son estudiados principalmente en base a sus estructuras polifenólicas, existe literatura que refiere que también se halla actividad antioxidante en los aceites esenciales cuyos componentes principalmente son terpenos y terpenoides<sup>84</sup>. En el ensayo con DPPH, compuesto que permite poner en evidencia la actividad donadora de electrones o de átomo de hidrógeno no específico se observa un IC<sub>50</sub> de 2,96µL/mL, y el secuestrante de referencia trolox exhibe un IC<sub>50</sub> de 2,35µg/mL, si bien no corresponden a las mismas unidades estos resultados sugieren el buen comportamiento del aceite esencial como donador de electrones al radical libre DPPH. En la investigación realizada en 11 diferentes aceites esenciales hallaron por este mismo ensayo con DPPH que los aceites esenciales proveniente de *Cananga odorata*, *Cymbopogon citratus*, *Rosmarinus officinalis* y *Curcuma longa* mostraron la mayor efectividad con un rango de inhibición del radical de 59,6± 0,42-64,3±0,45%.<sup>84</sup>. Con estos resultados, sería interesante ensayar el aceite esencial en un medio lipídico con el fin de valorar su capacidad protectora de la peroxidación lipídica como el realizado en algunas especies de aceites esenciales<sup>85</sup>. En la literatura no se reporta ensayos similares con el aceite esencial de hojas de coca por lo que no puede compararse este resultado. Estos resultados constituyen entonces conocimiento de base para posteriores estudios.

También es un efectivo secuestrante del radical libre anión superóxido, ensayado en la capacidad de inhibir la autooxidación del pirogalol en medio

alcalino. Debido a la coloración del aceite fue necesario realizar la modificación de la longitud de onda a 325nm<sup>86</sup>. Igualmente este resultado es conocimiento generado puesto que no se dispone de información previa. Cuando el aceite esencial de coca es ensayado como secuestrante del radical hidroxilo mediante la técnica de degradación de la deoxirribosa por presencia de ión ferroso en medio acuoso a pH 7,4 muestra una capacidad prooxidante; resultado semejante al realizado con el camu camu en el que se empleó el ión férrico en lugar del ión ferroso<sup>87</sup>.

El ácido ascórbico y algunos antioxidantes oxigenados sin embargo pueden actuar como prooxidantes a determinadas condiciones, como por ejemplo la presencia de iones metálicos de hierro y cobre, generando especies reactivas del oxígeno, reacción que se produce en sistemas *in vitro* e *in vivo*<sup>88</sup>.

Por los resultados obtenidos en la actividad antibacteriana se ha demostrado que el aceite esencial de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Coca var. *Truxillense* presenta actividad significativa frente a *Streptococcus mutans*. Con respecto al estudio en el extracto acuoso y alcohólico de las hojas, se manifiesta que estos tienen propiedades inhibitorias en el crecimiento de hongos oportunistas<sup>89</sup>. Otros estudios han encontrado acción inhibitoria sobre *Mycobacterium tuberculosis* y otras especies de *Mycobacterium*<sup>90</sup>, uropatógenos Gram negativos multiresistentes<sup>91</sup>, frente a bacterias Gram negativas y Gram positivas<sup>92</sup>, *Enterobacterias*, *Cocos* y *Bacillus*<sup>93</sup>, sobre *Streptococcus* de la cavidad bucal<sup>94</sup>, y sobre bacterias Gram negativas resistentes a antibacterianos<sup>95</sup>.

En otra investigación realizada con el extracto alcohólico de las hojas de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Coca var. *Truxillense*, se logró determinar que tienen acción antibacteriana positiva a las concentraciones de 250, 500, 1000 y 1500µg/20µL del extracto frente a cultivos de la flora mixta salival<sup>96</sup>.

En el estudio realizado con el aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb (muña) frente a bacterias orales de importancia estomatológica, se encontró

que la bacteria más sensible a la amoxicilina utilizada como control positivo, fue *Streptococcus mutans* con una media de 68mm de diámetro en sus halos de inhibición<sup>97</sup>.

Estudio realizado sobre la relación entre la caries y la composición microbiana de la placa dental han determinado una positiva correlación entre la caries y la frecuencia en la placa de *Streptococcus mutans* y microorganismos productores de polisacáridos intracelulares<sup>98</sup>. Así mismo, en el estudio del efecto de la infusión del té verde al 10 por ciento p/v en la formación de la placa bacteriana por *Streptococcus mutans* ATCC 25175, se determinó una notoria disminución y falta de adherencia en la formación de la placa<sup>99</sup>. En la evaluación *in vitro* del efecto de la papaína, una enzima proveniente de la papaya con propiedad antimicrobiana frente a *Streptococcus mutans*, determinó que una concentración de 2 por ciento no fue suficiente para inhibir su crecimiento, pero sí logró reducirlo<sup>100</sup>. Al evaluar el estudio de la actividad anti-*Streptococcus mutans* con el aceite esencial de *Hyptis pectinata*, se concluye que éste puede considerársele como una alternativa ante la clorhexidrina para el control de las bacterias bucales y las enfermedades relacionadas con la higiene<sup>101</sup>. Los aceites esenciales de *Mentha piperita*, *Rosmarinus officinalis*, y la clorhexidrina fueron evaluados contra *Streptococcus mutans* y *Streptococcus pyogenes in vivo*, manifestando que los aceites esenciales fueron significativamente más eficaces que la clorhexidrina y que pueden ser considerados como agentes de seguridad en el desarrollo de nuevos agentes antibiofilm<sup>102</sup>. La aparición de la caries dental se debe especialmente al agente patógeno cariogénico *Streptococcus mutans*. Del extracto metanólico *Myristica fragans* (nutmeg), se identificó el principio macelignan, que posee fuerte actividad inhibitoria contra *Streptococcus mutans* y una concentración mínima inhibitoria (MIC) más baja que otros anticariogénicos naturales como la sanguinarina, el eucaliptol, timol, carvacrol y salicilato de metilo y así mismo contra otros microorganismo orales como *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus salivarius* y *Streptococcus sanguis* entre otros sugiriendo que podría ser empleado como un antibacteriano natural para el cuidado bucal<sup>103</sup>. Las caries dentales y la enfermedad periodontal están asociadas con los patógenos orales y componentes químicos de plantas han sido evaluados contra microorganismos

patógenos. Tal es el caso del estudio del aceite esencial *Lippia sidoides*, arbusto de Brasil, que por CG / EM se caracterizó entre otros componentes al timol (56.7 por ciento) y carvacrol (16.7 por ciento) con efecto antibacterianos a *Streptococcus mutans* y *Candida albicans*, ejerciendo prometedoros efectos contra los patógenos orales y el crecimiento microbiano oral<sup>104</sup>. Los estudios clínicos con enjuagues bucales han demostrado importante actividad antiplaca y en la gingivitis como la variable clínicamente relevante. Existen enjuagues bucales que tienen agentes activos eficaces contra *Streptococcus mutans*, tal como la clorhexidrina, que también puede tener un papel en la inhibición de la caries dental. Estudio realizado *in vitro* con el fin de evaluar la eficacia de distintos enjuagues bucales antisépticos por medio de la determinación de la concentración inhibitoria mínima (MIC), ante bacterias como *Streptococcus mutans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* y *Actinobacillus*; y realizándose también el experimento *in vivo* en voluntarios, determinó que los valores de MIC no es un método fiable para evaluar el efecto antibacteriano de los enjuagues bucales y que el lavado con soluciones que contienen agentes que producen oxígeno, como el peróxido de carbamida tienen mayor eficacia contra las bacterias anaerobias en comparación con los enjuagues bucales antisépticos que contienen clorhexidrina y triclosan como agentes activos; demostrando que los enjuagues a base de aceites esenciales eliminan a las bacterias más rápido<sup>105</sup>.

La investigación de bacteria orales presentes en la placa dental como biofilms y el efecto antibacteriano de los aceites esenciales de Manuka, té del árbol de aceite, aceite de eucalipto, aceite de lavándula y aceite de rosmarinus en bacterias orales como: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* y *Actinobacillus*; determinaron que los aceites esenciales inhibieron el crecimiento y la adhesión de *Streptococcus mutans* en la placa dental<sup>106</sup>.

## VI. CONCLUSIONES

1. En las hojas frescas *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron, Var. *Truxillense* (Rugby) Plowman "Coca", se indentificaron los siguientes componentes químicos: Nona-3,5-dien-2-one, salicilato de metilo, ácido nonanoico,  $\alpha$ -longipineno, ácido decanoico, 2-Propenal,3-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-yl),  $\alpha$ -ciclocitrildeneacetona, trans- $\beta$ -ionona, olivetol, apiol, ácido hexadecanóico, pitol, ácido linolénico, ácido esteárico.
2. El aceite esencial de coca tiene capacidad antioxidante como donador de electrones o hidrógeno al radical DPPH y como secuestrante del radical superóxido, y presenta actividad prooxidante incrementando la degradación de la deoxirribosa mediante la adición de iones ferrosos.
3. Se determinó que el aceite esencial de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) var. *Truxillense* presenta actividad antibacteriana significativa frente a *Streptococcus mutans*.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Carhuapoma YM. 2006. Estudio de la composición química y actividad antioxidante del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán”. UNMSM, Lima.
2. Contreras, N. 2002. Evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* de algunos aceites esenciales en el proceso de peroxidación lipídica inducida por la radiación ultravioleta. Tesis de maestría. Química. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Bucaramanga. Colombia.
3. Deans, SG., Svoboda, K.P. 1990. The Antimicrobial Properties of Marjoram (*Origanum majorana* L.) Volatil Oil. *Flavour and Fragrance Journal*. 5: 187-190.
4. Lazo, W. 1983 Acción Antifúngica de *Allium sativum*. Boletín Micológico. 1: 185-186.
5. Kucera I.S, Herrmann ECJr. 1967. Antiviral Substances in plants of the mint family (Labiatae). I Tannin of *Melissa officinalis*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*124: 865-869.
6. Dimitrova Z. *et. al.* 1993. Antiherpes effect of *Melissa officinales*. L. extracts. *Acta Microbiol Bulg*, 29: 65-72.
7. Larrondo JV *et. al.* 1995. Antimicrobial activity of essences from labiates. *Microbios*; 82: 171-172.
8. Pryor, W. 1983. Oxyradicales and Related Species: Their Formations, Lifetime and reactions. *Ann. Rev. Phys.* 48: 657-667.
9. Mc Cord, J. 1983. The Superoxide free radical: Its biochemistry and pathophysiology. *Surgery* 94 (3): 412-414.

10. Tiskow G. 1996. Radicales Libres en Biología y Medicina: Una Breve Revisión. *Gac. Cient. Vet.* 1: 44-57.
11. Fridovich, I. 1995. Superoxido radical and Superoxide Dismutasa *Ann. Rev. Biochem*, 64: 97-112.
12. Bruce S, McEwen. 1998. Protective and Damaging Effects of Stress Mediators. *The New England Journal of Medicine* 338 (3), 171-178.
13. Montero, M. 1996. Los Radicales Libres y las Defensas Antioxidantes. Revisión. *Anales de la Facultad de Medicina. UNMSM.* 57 (4), 278-281.
14. Marx J. L. 1987. Oxygen Free Radicals Linked to Many Diseases. *Science* 235: 529-531.
15. Kasapoglu M., Ozben T. 2001. Alterations of Antioxidants Enzymes and Oxidative Stress Markers in Aging. *Exp. Gerontol* 36 (2). 209-220.
16. García BL, García GL, Rojo DD, Sánchez GE. (2001). Plantas con propiedades antioxidantes. *Rev. Cubana Invest Biomed*; 20(3): 231-235.
17. Cadena E, Packer L. 2002. *Handbook of antioxidants* New York: Marcel Dekker, Inc.
18. Tafur GG., Martínez JR., Stashenko EE. 2005. Evaluación de la actividad antioxidante de aceites esenciales en emulsiones degradadas por radiación ultravioleta. *Revista Colombiana de Química* Vol. 34, Nº 1. 43-55.
19. Contreras, N. 2002. Evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* de algunos aceites esenciales en el proceso de peroxidación lipídica inducida por la radiación ultravioleta. Tesis de maestría. Química. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Bucaramanga.
20. Delgado, W. A. 2002. Evaluación en dos sistemas lipídicos modelo de la actividad antioxidante *in vitro* de tres aceites esenciales extraídos de

plantas pertenecientes a la familia *Umbelliferae*. Tesis de maestría. Química. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Bucaramanga.

21. Salgar, W. 2002 Evaluación en dos sistemas lipídicos modelo de la actividad antioxidante *in vitro* de aceites esenciales extraídos de las plantas pertenecientes a la familia *Labiatae*. Tesis de maestría. Química. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Bucaramanga.
22. Fuentes, H. V. 1999. Monitoreo de la termodegradación de los ácidos grasos en los aceites vegetales de consumo humano, por medio de la Cromatografía de Gases de Alta Resolución y evaluación *in vitro* de la actividad antioxidantes de productos naturales. Tesis de grado. Química Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Bucaramanga.
23. Schwarz, K.; Huang, S. W.; German, J.B.; Tiersch, B.; Hartmann, J.; Frankel E. N. 2000. Activities of antioxidants are affected by colloidal properties of oil in water and water-in-oil emulsions and bulk oils. *J. Agric. Food Chem.* 48, 4874.
24. Jacobsen, C.; Schwarz, K.; Stockmann, H.; Meyer, A.S.; Adler-Nissen, J. 1999. Partitioning of selected antioxidants in mayonnaise. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3601.
25. Mei, L.; McClements, D. J.; Decker, E.A. 1999. Lipid oxidation in emulsions as affected by charge status of antioxidants and emulsion droplets. *J. Agric. Food Chem.* 47, 2267.
26. Pekkarinen, S.; Stockmann, H.; Schwarz K.; Heinonen, I. M.; Hopia, A. I. 1999. Antioxidant activity and partitioning of phenolic acids in bulk and emulsified methyl linoleate. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3036.

27. Van Ruth, S. M.; Roozen, J.P.; Posthumus, M. A.; Jansen, F. J. H. M. 1999. Volatile composition of sunflower oil-in-water emulsions during initial lipid oxidation; influence of pH. *J. Agric. Food Chem.* 47, 4365.
28. Foti, M.; Piattelli, ;; Baratta, M. T.; Ruberto, G. 1996. Flavonoids, coumarins, and cinnamic acids as antioxidants in a micellar system. Structure-activity relationships. *J. Agric. Food Chem.* 47, 497.
29. Huang, S. W.; Hopia, A.; Schwarz, K.; Frankel, E. N.; German, J. B. 1996. Antioxidant activity of  $\alpha$ -tocopherol and trolox in different lipid substrates: bulk oil vs oil in water emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 44, 444.
30. Huang, S. W.; Frankel, E. N.; Schwarz, K.; German, J.B. 1996. Effect of pH on antioxidant activity of  $\alpha$ -tocopherol and trolox in oil-in water emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 44, 2496.
31. Frankel, E. N.; Huang, S. W.; Kaner, J. 1994. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oil vs emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 42, 1054.
32. Pryor, W. A.; Strickland, T.; Church, D. 1998. Comparison of the efficiencies of several natural and synthetic antioxidants in aqueous sodium dodecyl sulfate micelle solutions. *J. Agric. Food Chem.* 110, 2224.
33. Joyeux M., Mortier, F., Fleurentin J. 1995. *Phytother. Res.* 9,228.
34. Marklund, S. and Marklund, G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of piragalol and convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. Biochemical.*
35. Rice-Evans, Diplock and Symons. 1991. Techniques in free radical research. Elsevier. 291 pp. Amsterdam.

36. Rojas R, Bustamante B, Bauer J, Fernández I, Albán J, Lock O. 2003. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants, J. Ethnopharmacol. 88 (2-3): 199-204
37. Magaldi S, Matta-Essayag S, Hartung de Capriles C, Perez C, Colella MT, Olaizola C, Ontiveros Y. 2004. Well diffusion for antifungal susceptibility testing. Int. J. Infect. Dis. 8(1):39-45.
38. Plowman, T. 1980. Aspectos botánicos de la hoja de coca. Cocaína. R. Jeri. Edit. Pacific Press. Lima 100-116.
39. Machado, E. 1980. Determinación de variedades y cultivares en cocas Peruanas. Cocaína. R. Jeri. Edit. Pacific Press. Lima.
40. Plowman. T. 1981. Aspectos botánicos de la coca. Acta del Seminario Interamericano sobre Coca y Cocaína. Lima-Perú.
41. Weil A. 1978. Coca Leaf as a Therapeutic Agent. Am. J. Drug Alcohol Abuse. 5(1). 75-86.
42. Collazos. C.; Urquieta R.; Alvistur E. 1965. "Nutrición y Coqueo". Simposium sobre Nutrición. Rev. Viernes médico 16:36-44 Lima.
43. Carter, William. 1983. Ensayos científicos sobre la coca. La Paz. Editorial Juventud. 1era edición.
44. Díaz L. M. 1971. Coca Leaves, Cocaine and its substitutes. Circular Farmacéutico. 230(29):59-81.
45. Bandoni, A. 2000. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento Industrial para la producción de aromas y sabores. Edit. UNLP-CYTED. Bs. As.
46. Lahlou M. 2004. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. J. Phytother Res; 18:435-448.

47. Dominguez, X; 1985. Métodos de Investigación Fitoquímica. 3era edición. Edit. Limusa, S.A. México. 229-238.
48. Llosa T. 1994. Chemistry and toxicology of coca pastes and coca paste cigarettes smoking. Journal of Chemical Adicción. Lima.
49. Rodríguez J. Menéndez López J. Trujillo López Y. 2001 Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativa. Revista cubana Médica Militar 30(1):36-44.
50. Fleschin S., Fleschin M.; Nita S.; Pavel E.; Magearu V. 2000. Free radicals mediated proteins oxidation in biochemistry Roum. Biotechnol. Lett; 5(6): 479-795.
51. Depeng W.; Cederbaum A. 2003. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. Alcohol Research & Health; 27 (4)277-284.
52. Balz F. 1994. Natural antioxidants in human health and disease. New York: academia Press Inc.
53. Guija E. Troncoso L. 2000. Radicales libres y envejecimiento. Bol. Soc. Quim. Perú; 45:33-55.
54. Roza C. Mamone M. 1986. Vitaminas, Agentes Nutritivos y Terapéuticos. España: Ed. Doyma S.A.
55. Fehér J. Csomós G. Vereckei A. 1987. Free radicals reactions in medicine. Berlin, Heidelberg: Spring – Verlag.
56. Barja G. 1997. Radicales libres y antioxidantes. En: cascales M. Bioquímica y Fisiopatología del estrés oxidativa. Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia.
57. Lee J. Koo, Min DB. 2004. Reactive oxygen species, aging and antioxidants nutraceuticals. Compreh Rev. Food Science and Food Safety. 3: 21-33.

58. Pokony J, Yanishlieva N, Gordon M, editors. 2001. Antioxidantes de los alimentos aplicaciones prácticas. España.: Acibia.
59. Shahidi F, Janitha P, Wanasundara P. 1992. Phenolic Antioxidants. Critical reviews un food science and nutrition. 32(1):67-103.
60. Beckel R, Kingnert H, Lundgren B, Hall G, Walter G. 1985. Effect of maillard reaction products on the stability of minced herring in frozen storage. J. Food. Sci. 50:501-502.
61. International Life Sciences Institute. 1996. Antioxidants : scientific basis, regulatory aspects and industry perspectives. Summary of workshop held 8-9 february.
62. Grinsted M. 1994. Types of antioxidants and their historical background. Boletín técnico N° 13, Dinamarca.
63. Cao G, Prior R. 2000. Postprandial increases un serum antioxidant Capacity in older women. J. Appl. Physiol; 89: 877-83.
64. Meydani M. 2000. Effect of functional food ingredients: vitamin E modulation of cardiovascular diseases and immune status in the elderly. Am. J. Clin. Nutr; 71: 16665-85.
65. Giovannucci E, Ascherio A. Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC. 1995, Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer. J. Natl. Cancer Inst; 87 (23):1767-77.
66. Weisburger JH. 1999. Mechanism of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes and tea. Food Chem. Toxicol; 37(9/10): 943-8.
67. Bravo L. Polyfenols. 1998. Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. Nutr. Rev, 56:317-33.
68. Anchante R. 1998. Estudio de la actividad antifúngica del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. Tesis para optar al Título de Químico Farmacéutico. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM. Lima.

69. Vázquez O; Alva A; Marreros J. 2001. Extracción y caracterización del aceite esencial de jengibre (*Zingiber officinali*) RAI A, V1, N°1, P.38-42.
70. Carhuapoma YM. 2007. Composición química actividad antioxidante anti-*Helicobacter pylori* y antioxidante del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* Epling "urqu muña". Tesis para optar al Grado de Doctor en Farmacia y Bioquímica. UNMSM. Lima.
71. Silva D. Denham E, Faleiro L, Miguel G. Cavaleiro C. Salgueiro L. 2001. Antimicrobial activity of the essential oils of *Dittrichia viscosa subs. viscosa* on *Helicobacter pylori*. Traditional Medicine and Nutraceuticals, 6: 680.
72. Cano C. 2007. Actividad antimicótica *in vitro* y elucidación estructural del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña). Tesis para optar al Grado de Magister. Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM. Lima.
73. Shafer W.; Levy B. 1986. Tratado de patología bucal. Nueva editorial Interamericana S.A. 4ta edición.
74. Ross, Philip W.; Holbrook, Peter W. 1985. Microbiología bucal u clínica. Editorial Científica PLM, S.A. C.V. México.
75. Moromi NH, Martinez CE. 2006. Efecto del té verde en la formación de la placa bacteriana por *Streptococcus mutans*. Rev. Odontología San Marquina. UNMSM. Lima.
76. Aguilera G. *et al.* 2004. Niveles de *Streptococcus mutans* y prevalencia de caries dental en una población de escolares de la zona urbana de la ciudad de Zacatecas. Revista ADM. 61(3):85-91.
77. Beck FM., Beck Ex. 1984. Anticariogenic effects of tea in rats. J. Dent. Res; 63 (5) 658-660.

78. Koompirojn K, Guay M, Peawchana W, Suesuwan A, Ingkasate A. 2001. Inhibition of lactic acid polysaccharide formation of *Streptococcus mutans* by tea extracts *in vitro*. *CU Dent. J*; 24:195-202.
79. Acosta LO. 2000. Composición química del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. "Tomillo" por Cromatografía de Gases-Espectómetro de Masa GC/MS y análisis de su actividad antimicrobiana. Tesis para optar al título profesional del Químico Farmacéutico. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM. Lima.
80. Shayegh S, Rasooli I, Taghizadeh M, Astaneh SD. 2008. Phytotherapeutic inhibition of supragingival dental plaque. *Nat. Prod Res.* 22 (5):428-39.
81. Novak M., Salemiak C, Khan I. 1984. *J. Ethnopharmacol.* 10;261-274.
82. Van Acquire SA, Van den Berg DJ, Tromp MN, Griffioen DH, Van Bennekom WP, Vander Vijgh WJ, et al. 1966. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic. Biol Med*; 20:331-42.
83. Groot H de, Rawen U. 1998. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundam Clin Pharmacol*; 3:249-55.
84. Sacchetti G. *et al.* 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobial in foods. *Food Chemistry*, Vol. 91, pág. 621-632
85. Tomaino A. *et al.* 2005. Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. *Food Chemistry* vol. 89, pág. 549-554
86. Shibu M, Poulouse, Edward D, Bhimanagouda S, Patil 2005. Citrus Limonoids Induce Apoptosis in Human Neuroblastoma Cells and Have Radical Scavenging Activity *J. nutr.* 135:870-877.

87. Guija H, Troncoso L, Guija E. 2005. Propiedades Prooxidantes del camu camu (*Myrciaria dubia*) An. Fac. Med. Vol. 66, N° 4 pag. 261-568.
88. Pérez G. 2003. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes, Rev. Cubana Invest. Biomed 22(1) pág. 48-57.
89. Li SC. 1994. Propiedades inhibitorias del crecimiento de hongos oportunistas *in vitro* de *Erythroxylum coca* y *Erythroxylum novogranatense* var. *Truxillense* (Mate de coca). Tesis para optar al título profesional de Químico Farmacéutico. UNMSM.
90. Aguilar FE., Encarnación MJ. 1995. Comportamiento *in vitro* de *Erythroxylum coca* - *Erythroxylum novogranatense* "mate de coca" sobre *Mycobacterium tuberculosis* y otras especies de *Mycobacterium*. Tesis para optar al título profesional de Químico Farmacéutico. UNMSM. Lima.
91. Castro VP., Chávez DJ. 1995. Acción inhibitoria *in vitro* de *Erythroxylum* Lam. var. *Coca* y *Erythroxylum novogranatense* var. *Truxillense* "mate de coca" frente a uropatógenos Gram negativos multiresistentes. Tesis para optar al título profesional de Químico Farmacéutico. UNMSM. Lima.
92. Cam AO., Villanueva VP. 1996. Acción inhibitoria *in vitro* del extracto acuoso y extracto metabólico de la hoja de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) var. *Truxillense* (Rusby) frente a bacterias Gram negativas y Gram positivas. Tesis para optar al título profesional de Químico Farmacéutico. UNMSM. Lima.
93. Mertz LM., Reyes GE. 1996. Propiedades inhibitorias del crecimiento *in vitro* de enterobacterias, Cocos y Bacillus, de *Erythroxylum coca* Lam. y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) var. *Truxillense* (Rugby) "mate de coca". Tesis para optar al título profesional de Químico Farmacéutico. UNMSM. Lima.

94. Solano OD. 1996. Acción antibacteriana de extracto acuoso y metabólico de principios activos totales de *Erythroxylum coca* Lam. y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) var. *Truxillense* (Rugby) sobre *Streptococcus* de la cavidad bucal. Tesis para optar al título profesional de Químico Farmacéutico. UNMSM. Lima.
95. Gálvez EO. 1997. Acción inhibitoria del extracto acuoso de principios activos totales de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) var. *Truxillense* (Rugby) frente a bacterias Gram negativas resistentes a cinco antibacterianos. Tesis para optar al título profesional de Químico Farmacéutico. UNMSM. Lima.
96. Borrovic RF. 2006. Efecto antibacteriano del extracto alcohólico de la hoja de *Erythroxylum novogranatense* var. *Truxillense* (coca) sobre flora mixta salival. Tesis para optar al título profesional de Cirujano Dentista. Facultad de Odontología. UNMSM. Lima.
97. Díaz LK, 2005. Determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* de *Mythostachys mollis* Griseb (muña) frente a bacterias orales de importancia estomatológica. Tesis para optar al título profesional de cirujano dentista. Facultad de Odontología. UNMSM. Lima.
98. Mikkelsen L, Poulsen S. 1997. Microbiological studies on plaque in relation to development of dental caries in man. *Caries Res.* 10: 178-188.
99. Moromi NH, Martinez CE. 2006. Efecto del té verde en la formación de la placa bacteriana por *Streptococcus mutans*. Revista científica Odontología Sanmarquina. Facultad de Odontología UNMSM.
100. Castro AV, 2005. Inhibición del crecimiento *in vitro* de *Streptococcus mutans* por papaína y sanitrend. Tesis para optar al título de Cirujano-Dentista. Universidad de Chile. Santiago.
101. Nascimento PF. *et al.* 2008 *Hyptis pectinata* essential oil: Chemical composition and anti-*Streptococcus mutans* activity. *Oral Dis*; 14 (6):485-9.

102. Razooli I, Shayeagh S, Taghizadeh M, Astaneh SD. 2008. Phytotherapeutic prevention of dental biofilm formation. *Phytother Res.*; 22(9):1162-7
103. Chung JY, Choo JH, Lee MH, Hwang JK. 2006. Anticariogenic activity of macelignan isolated from *Myristica fragran* (nutmeg) against *Streptococcus mutans*. *Phytomedicine* 13(4):261-6.
104. Botelho MA. *et al.* 2007. Antimicrobial activity essential oil from *Lipia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *J. Med Biol Res.* 40(3):349-56.
105. Gautier G, Noguer M, Costa N, Canela J, Viñas M. 2000 Mouthrinses: a comparative microbiological study. *Bull Int Rech Sci Stomatol Odontol* 42(1):23-9.
106. Takarada K, Kimizuka R, Takahashi N, Honma K, Okuda K, Kato T. 2004. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. *Oral Microbiol Immunol.* 19(1):61-4.

# VIII. ANEXOS

## Anexo 1

### Clasificación botánica



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA

**MUSEO DE HISTORIA NATURAL**



#### CONSTANCIA N° 88-USM-2008

EL JEFE ( e ) DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (tallos, hojas), recibida del Sr. AMERICO CASTRO LUNA, ha sido estudiada y clasificada como: *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron, var. *Truxillense* (Rugby) Plowman, y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: ROSIDAE

ORDEN: LINALES

FAMILIA: ERYTHROXYLACEAE

GENERO: *Erythroxylum*

ESPECIE: *Erythroxylum novogranatense* (Morris)  
Hieron, var. *Truxillense* (Rugby) Plowman,

Nombre vulgar: "Coca"

Determinada por: Mg. María Isabel La Torre A.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines de investigación.

Lima, 29 de Agosto de 2008

Dr. GERARDO LAMAS MÜLLER  
DIRECTOR



Av. Arenales 1256, Jesús María  
Apdo. 14-0434, Lima 14, Perú

Telfs.: (511) 471-0117, 470-4471,  
470-7918, 619-7000 anexo 5703  
Fax: (511) 265-6819

e-mail: [museohn@unmsm.edu.pe](mailto:museohn@unmsm.edu.pe)  
<http://museohn.unmsm.edu.pe>

## Anexo 2

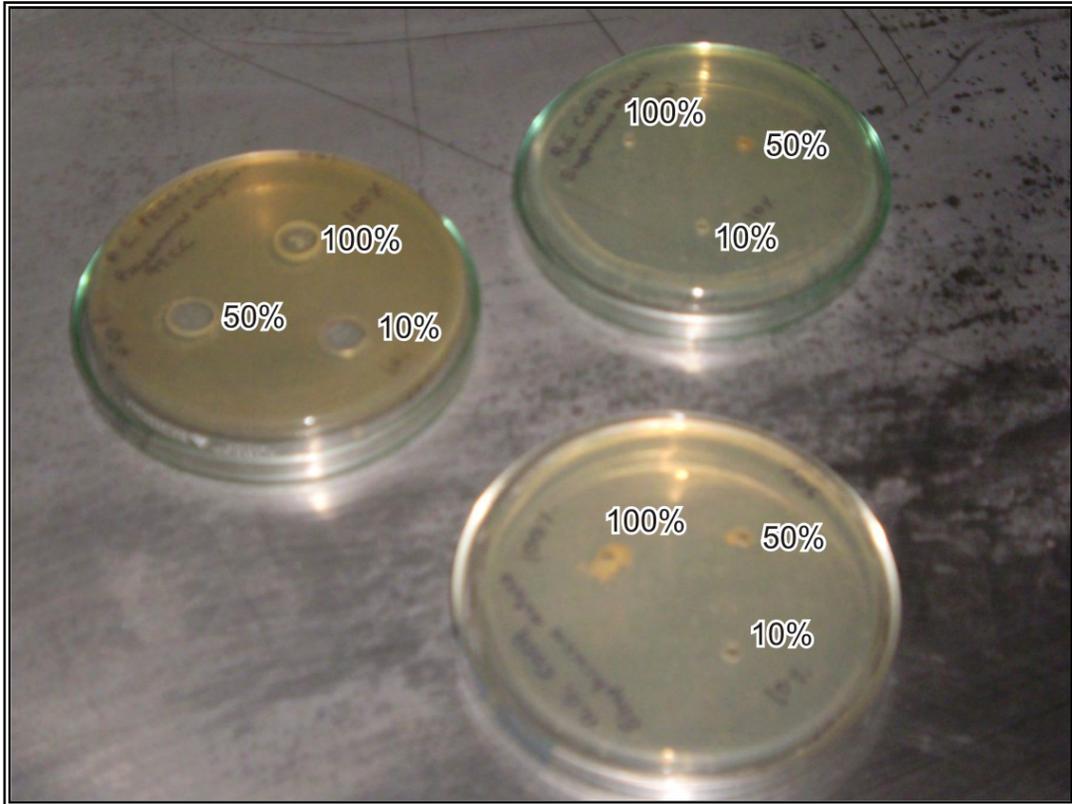


**Foto 1:** Ramas de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) "Coca"



**Foto 2:** Hojas de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) "Coca"

### Anexo 3



**Foto 3:** Aceite esencial de *Erythroxyllum novogranatense* (Morris) var. *Truxillense* - *Streptococcus mutans*