

Evaluación química y antibacteriana in vitro del aceite esencial de *Erythroxylum coca* Lam. Var. “Coca Huánuco”: diseño de una formulación farmacéutica

*Chemical evaluation and antibacterial activity in vitro of essential oil of Erythroxylum coca Lam. Var. “Coca Huánuco”: design of a pharmaceutical formulation.*

AMÉRICO CASTRO<sup>1</sup>, SILVIA SUÁREZ<sup>2</sup>, NORMA RAMOS<sup>1</sup>, MARIO CARHUAPOMA<sup>1</sup>, JULIO RUIZ<sup>3</sup>, MARIO ALCARRAZ<sup>4</sup>, SIXTO GONZALES<sup>1</sup>, LUIS INOSTROZA<sup>1</sup>, OMAR SANTA MARÍA<sup>1</sup>, RUTH LUCAS<sup>1</sup>, WALTER VICENTE<sup>1</sup>

- 
- 1 Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM.  
2 Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición “Alberto Guzmán Barrón Facultad de Medicina Humana UNMSM.  
3 Instituto de Microbiología y Parasitología “Simón Pérez Alva” Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM.  
4 Instituto de Ciencias Biológicas “Antonio Raimondi” UNMSM.  
Proyecto Multidisciplinario 2012, financiado por el Vicerrectorado de Investigación UNMSM.

## Resumen

Objetivo: Elucidar la composición química del aceite esencial de *Erythroxylum coca* Lam. var. "coca Huánuco" y determinar su actividad antioxidante y antibacteriana in vitro, frente a *Streptococcus mutans* ATCC 35668 y el diseño de una formulación farmacéutica. Diseño: Estudio experimental, analítico, longitudinal y prospectivo. Lugar: tres institutos y un centro de investigación de la UNMSM. Material biológico: Hojas de coca y la bacteria cariogénica. Métodos: análisis preliminar y elucidación estructural por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (CG/EM). La actividad antioxidante in vitro se realizó por DPPH, CDP y captación del radical anión superóxido. La actividad antibacteriana in vitro se efectuó por el método de microdilución colorimétrico y difusión en agar. Se elaboró pastas dentífricas que contienen los aceites esenciales de coca, menta y orégano al 1%. Resultados: El análisis de CG/EM identificó los siguientes componentes químicos:  $\beta$ -pineno,  $\beta$ -mirreno, ácido esteárico, nerolidol, fitol, ácido metil éster 7, 10, 13 hexadecatrienoico y nonacosano. Los fitocompuestos del aceite demostraron capacidad antioxidante. Conclusiones: El aceite esencial expresó capacidad antioxidante que participaría en los sistemas de redox biológicos y una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de  $0,625\mu\text{L/mL}$  contra *Streptococcus mutans* ATCC 35668 y expresando halo de inhibición de 37 mm y 38 mm en las pastas dentífricas.

**Palabras clave:** *Erythroxylum coca* Lam, antioxidante, antibacteriano, *Streptococcus mutans* ATCC 35668, pasta dentífrica.

## Abstract

Objective: To elucidate the composition chemistry of essential oil of *Erythroxylum coca* Lam.var. "Coca Huánuco" and determine their in vitro antioxidant and antibacterial activity against *Streptococcus mutans* ATCC 35668 and the design of a pharmaceutical formulation. Design: Experimental, analytical, longitudinal and prospective study. Place: Three institutes and a research centre of San Marcos University. Biological material: coca leaves and cariogenic bacteria. Methods: preliminary analysis and structural elucidation by chromatography of Gases/spectrometry (GC/MS). In vitro antioxidant activity was carried out by DPPH, CDP and uptake of the superoxide anion radical. Antibacterial activity in vitro was made by the method of microdilution colorimetric and diffusion in agar. Developed toothpastes containing essential oils of coca, mint and oregano to 1%. Results: The GC/MS analysis, identified the following chemicals:  $\beta$ -pinene,  $\beta$ -myrcene, stearic acid, nerolidol, Phytol, acid methyl ester 7, 10, 13 hexadecatrienoico and nonacosano. The fitocompuestos of oil showed antioxidant capacity. Conclusions: The essential oil expressed antioxidant capacity that would participate in biological redox systems and a minimum inhibitory concentration (MIC) of  $0,625\mu\text{L/mL}$  against *Streptococcus mutans* ATCC 35668 and expressing inhibition zone of 37mm and 38mm intoothpastes.

**Key Words:** *Erythroxylum coca* Lam, antioxidant, antibacterial, *Streptococcus mutans* ATCC 35668, toothpaste.

## Introducción

El Perú posee una flora autóctona que ha llegado a trascender a nivel mundial desde el punto de vista social, económico, científico y cultural. Una de ellas la constituye la coca. *Erythroxylum coca* Lam. Var. Coca "Coca Huánuco", de la familia *Erythroxylaceae* es una planta cultivada y conocida por el contenido de su principal metabolito secundario el alcaloide cocaína. La planta de coca es de hoja perenne, originaria de América del Sur, sobre todo de Perú, Bolivia, Brasil y Colombia. El género *Erythroxylum* está formado por unas 250 especies que proliferan en la zona tropical, sobre todo en el continente americano. Solo dos especies de este género son cultivadas y están relacionadas entre sí; *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Var. Truxillense que se cultiva en la costa desértica del norte del Perú y *Erythroxylum coca* Lam. Var. Coca "coca Huánuco" cultivada principalmente en los departamentos de Huánuco y Cusco<sup>15, 2</sup>.

La investigación de esta especie nativa radica en el uso que tiene en la medicina tradicional por su efecto antibacteriano de la cavidad bucal, atribuido a su aceite esencial y del que no se tiene mayor información en la literatura científica. La cavidad bucal alberga innumerables microorganismos en un ecosistema de complejidad que todavía no ha sido investigado en su totalidad, siendo la flora bucal una entidad dinámica afectada por numerosos cambios de los dientes temporales y posteriormente los dientes permanentes, la cavidad bucal está sujeta al crecimiento y desarrollo de *Streptococcus mutans*, bacteria que se encuentra normalmente en la cavidad bucal formando parte de la placa dental. Esta bacteria Gram-positiva está implicada como el principal agente etiológico de la caries dental.

El aceite esencial de la hoja de esta especie contiene una mezcla de sustancias orgánicas constituidas por terpenos, sesquiterpenos y compuestos aromáticos que se obtienen por destilación con arrastre de vapor de agua. Este aceite tiene un agradable olor debido a su contenido de ácidos grasos volátiles que son usados como saborizantes en la industria de bebidas gaseosas. La caracterización química de este aceite se realiza a través de una técnica combinada de cromatografías

de gases y espectrometría de masas que permiten separar e identificar su composición química<sup>11</sup>.

El estudio realizado halla su justificación en la composición química del aceite y su uso a través de una pasta dentífrica como descontaminante bacteriano y de medida preventiva en el control de enfermedades que afectan la cavidad bucal, presentándose como una alternativa de origen natural contra agentes químicos de naturaleza sintética; como el triclosán y la clorhexidina, utilizados como antisépticos bucales.

Los objetivos del estudio fueron determinar la composición química del aceite y actividad antioxidante, evaluar la actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans* ATCC 35668 y diseñar una formulación farmacéutica de pasta dentífrica suplementada con aceites esenciales de orégano y menta.

## Métodos

La investigación realizada es de tipo experimental, analítica, longitudinal y prospectiva.

La muestra fue colectada en el valle tropical de la zona occidental de los Andes en ceja de selva del departamento de Huánuco, Perú, entre 1000 y 2000 msnm, a una temperatura media entre 20 y 22 °C. Su cultivo se da en suelo poco profundo y pedregoso. Su clasificación taxonómica fue realizada en el Museo de Historia Natural de La Universidad Nacional Mayor de San Marcos. El aceite de las hojas *Erythroxylum coca* Lam. Var. Coca "coca Huánuco", se obtuvo tratando 20 kg de hojas secas en un sistema de destilación por arrastre con vapor de agua. El rendimiento de aceite esencial fue de 0.025% V/P, efectuándose el análisis preliminar y fisicoquímico: aceite de color amarillo, aromático y picante; pH 6.7, miscible en metanol, etanol, n-hexano y éter etílico e inmisible en agua. Presentó una gravedad específica de 0.923 g/mL a 21°C. La composición química del aceite se realizó por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (CG/EM)<sup>3</sup>. La evaluación de la actividad antioxidante se efectuó por los métodos de captación del radical 2,2-difenilpicrilhidrazil (DPPH), radical libre anión superóxido y descomposición del peróxido de hidrógeno (CDP)<sup>9, 12</sup>. La determinación de la actividad antibacteriana in vitro del aceite frente

a *Streptococcus mutans* ATCC 35668 se realizó con la aplicación del método de microdilución colorimétrico en microplaca 10,5 y el método de difusión en agar 7.

Se diseñaron dos formulaciones farmacéuticas, pastas dentífricas, una de estas contenía 1% de aceite esencial de coca y menta, y la otra 1% de cada uno de los aceites esenciales de coca, menta y orégano 8, 14.

## Resultados

Se analizó el aceite esencial de la especie *Erythroxylum coca* Lam. Var. Coca "coca Huánuco", destacándose la presencia del ácido alifático metil éster 7,10,13-hexadecatrienoico, beta pineno con efecto inhibidor de bacterias Gram positivas y fitol, un diterpenoacíclico de naturaleza alcohólica; los que serían responsables de potenciarla propiedad antioxidante y antibacteriana del aceite esencial (Tabla 1).

**Tabla 1.** Componentes químicos del aceite esencial de *Erythroxylum coca* Lam. var. "coca Huánuco" determinado por Cromatografía de Gases/ Espectrometría de Masas (CG/EM)

Componentes químicos	Tiempo de Retención (TR) (minutos)
β - pineno	5,81
β - mirceno	5,93
Ácido estreárico	8,83
Nerolidol	9,10
Fitol	9,65
Ácido metil éster 7,10,13 hexadecatrienoico	9,91
Nonacosano	14,15

Los métodos aplicados para la determinación de la capacidad antioxidante del aceite esencial expresaron que el aceite posee fitocompuestos con capacidad antioxidante que participarían en los sistemas redox biológicos (Tabla 2).

**Tabla 2.** Captación del radical DPPH, radical superóxido y peróxido de hidrógeno

Concentración (ug/mL)	% Captación del Radical DPPH	% Captación del radical Superóxido	% Capacidad de Descomposición de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
32,5	nd	69	61,6
65,0	37,5	nd	nd
97,5	45,9	nd	nd

\*nd: no determinado

Respecto a la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), se encontró que la menor concentración de aceite esencial que inhibe el crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 35668 fue 0,625 μL/mL, semejante al aceite esencial de orégano (Tabla 3).

**Tabla 3.** Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los aceites esenciales de coca y orégano.

Muestras	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)
Aceite esencial de coca	0,625 μL/mL
Aceite esencial de orégano	,0.625 μL/mL
Vancomicina	≤ 1 μg/mL

En el resultado de la microplaca por el método de microdilución colorimétrico frente a *Streptococcus mutans* ATCC 35668, se obtuvo la CMI del aceite esencial de coca; y el del halo de inhibición fue de 37 mm para el dentífrico que contenía 1% de aceite esencial de coca y menta, para el dentífrico con 1% de aceites esenciales de coca, menta y orégano, el halo fue de 38 mm; con lo que se demuestra que ambos aceites presentan actividad antibacteriana contra *Streptococcus mutans* ATCC 35668 (Figura 1 y Tabla 4).

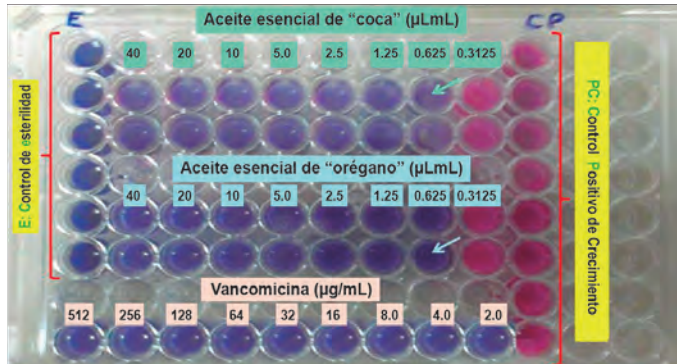


Figura 1. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de "coca" y "orégano" por el método de microdilución colorimétrico contra *Streptococcus mutans* ATCC 35668. En la microplaca se observan las diferentes concentraciones mínimas inhibitorias. \*La flecha indica la Concentración Mínima Inhibitoria.

Tabla 4. Actividad de los dentífricos con aceites esenciales de coca, menta y orégano contra *Streptococcus mutans* ATCC 35668 por el método de difusión en agar.

Muestras	Diámetro de halos de inhibición en mm			
	Al 100%	Diluido *	Dil. 1/2	Dil. 1/4
A	37	31	24	-
B	38	32	30	23

A: Dentífrico con aceite esencial de coca y menta al 1% respectivamente. B: Dentífrico con aceite esencial de coca, menta y orégano al 1% respectivamente. Diluido \*: 3g del dentífrico en 10 mL de agua.

En las figuras 2 y 3 se presentan la formación de los halos de inhibición de los dentífricos A y B.

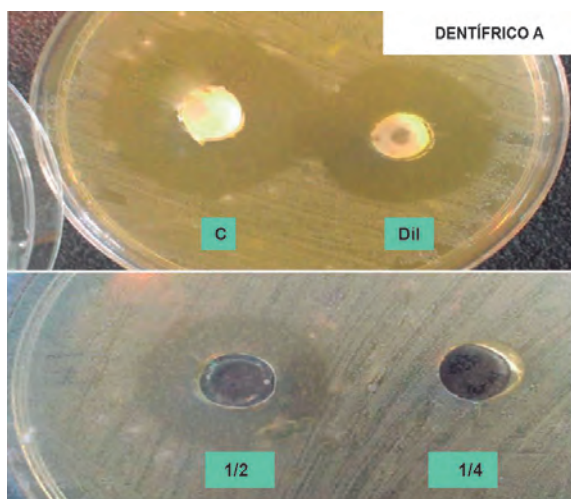


Figura 2. Formación de halos de inhibición del dentífrico "A" contra *Streptococcus mutans* ATCC 35668. Dentífrico A con aceite esencial de coca y menta al 1% respectivamente. C: Dentífrico al 100%. Dil: 3g de dentífrico A/10 mL de agua. 1/2: Dilución al 50% de la primera dilución (dil). 1/4: Dilución al 25% de la primera dilución (dil)

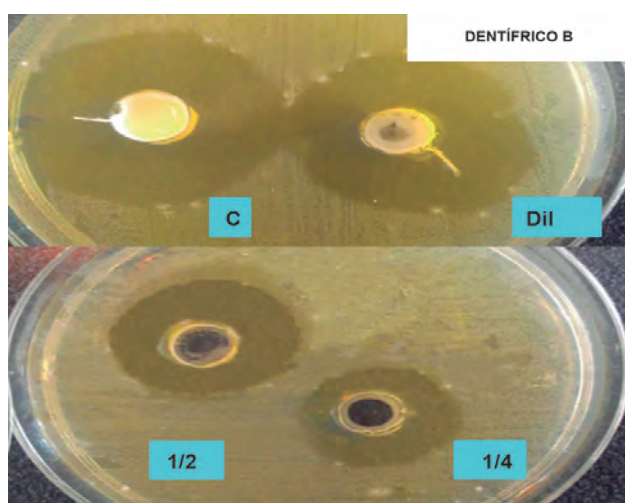


Figura 3. Formación de halos de inhibición del dentífrico B contra *Streptococcus mutans* ATCC 35668.

Dentífrico B con aceite esencial de coca, menta y orégano al 1% respectivamente. C: Dentífrico B al 100%. Dil: 3g de dentífrico B en 10 mL de agua. 1/2: Dilución al 50% de la primera dilución (dil). 1/4: Dilución al 25% de la primera dilución (dil).

## Discusión

De las hojas de la especie vegetal de *Erythroxylum coca* Lam. Var. "coca Huánuco", se obtuvo un rendimiento de aceite esencial de 0,025% v/p, similar a lo encontrado por Ventura G y col.4. En este resultado se encuentran implicadas las características geográficas, la época y la zona de colecta de la especie, ya que la altitud y el carácter climático tienen efectos en la producción del aceite esencial, considerando que para un material húmedo existen intervalos de variaciones de una especie a otra<sup>13</sup>.

Por el análisis preliminar y fisicoquímico se pudo determinar que las propiedades del aceite obtenido, corresponden a las que se reportan en la literatura científica; evidenciándose que los componentes químicos del aceite son de baja polaridad, miscibles en solventes orgánicos e inmiscible en agua. La elucidación de la composición química del aceite esencial permitió identificar entre otros a los siguientes componentes químicos: beta pinenocon efecto inhibitor de bacterias Gram-positivas, fitolun diterpenoacíclico de naturaleza alcohólica, y un ácido metiléster 7, 10, 13-hexadecatrienoico, el cual se destaca por su carácter orgánico funcional. El ácido metiléster 7, 10, 13 hexadecatrienoico cumpliría una función semejante al salicilato de metilo; que fue identificado por Ventura G. y col. en el análisis del aceite esencial de *Erythroxylum coca* Lam. var. Coca, resultado que coincide con lo reportado en el estudio de la especie *Erythroxylum*

*novogranatense* (Morris) Coca Var. Truxillense realizado por Castro A. y col<sup>1</sup>.

Los resultados muestran que el aceite esencial de coca exhibe actividad antioxidante en los tres métodos ensayados. En la capacidad captadora del radical DPPH (Tabla 2) puede observarse, sin embargo, que esta actividad es 11 veces menor que la vitamina C, utilizado como patrón de referencia; lo que significa que el aceite tiene un comportamiento aceptable frente al radical DPPH. Estudios previos del aceite esencial de coca, como en el de Castro A. y col.<sup>15</sup>, también reportaron capacidad de captar el radical DPPH. En la actividad frente a los radicales oxigenados, superóxido y peróxido de hidrógeno, es importante resaltar que los resultados señalan que también posee actividad antioxidante. Puede observarse en que la actividad atrapadora del radical superóxido es cercana a la molécula de referencia, ácido ascórbico, y solo se requiere duplicar la concentración del aceite esencial, para exhibir una actividad semejante (Tabla 2). Este radical también fue ensayado en otra variedad de aceite esencial de coca donde también demostró capacidad de captación de superóxido<sup>1</sup>.

En lo que respecta a la CDP puede leerse que prácticamente tiene la misma capacidad de reducir el peróxido de hidrógeno que la sustancia de referencia (Tabla 2). El peróxido de hidrógeno es una molécula estable simétrica, que tiene un potencial agresivo mayor al superóxido y puede moverse en un medio hidrofílico e hidrofóbico, de



manera que este resultado nos lleva a proponer que esta sería una ruta importante para su actividad antioxidante<sup>6</sup>.

En lo referente a la actividad antibacteriana in vitro, el aceite esencial de las hojas de *Erythroxylum coca* mostró tener una buena actividad contra *Streptococcus mutans* ATCC 35668 con una CMI de 0,625  $\mu$ L/mL, equivalente al encontrado para el aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* (Tabla 3). Estos resultados concuerdan con la actividad reportada por Castro el 2008<sup>1</sup>, donde se evidenció la actividad del aceite esencial de las hojas de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) "coca" contra *Streptococcus mutans* por el método de difusión en agar, con halos de inhibición de 30 mm. La gran diferencia es la sensibilidad de las técnicas usadas, que en el presente trabajo es la microdilución, que sirve para encontrar la CIM, un parámetro mucho más sensible y exacto que el método de difusión usado en otros trabajos (Figura 2). Por otro lado, Ventura G. y col.<sup>4</sup>, encontraron actividad en las hojas de *Erythroxylum coca* Lam var. Coca "Huánuco", contra otras bacterias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Bacillus subtilis*.

En cuanto a los resultados obtenidos para los dentífricos de coca suplementados con los aceites esenciales de menta y orégano, son satisfactorios, presentando halos de inhibición de 37 y 38 mm (Tabla 4 y Figura 3). Asimismo, en los dentífricos elaborados con estos aceites esenciales, se puede corroborar la liberación del aceite de coca en la formulación y su no interferencia con los otros (Figura 4). En la literatura no se han reportado trabajos similares usando aceite esencial de "coca" incorporado en dentífricos. En el estudio de Barreto L. y col.<sup>7</sup>, trabajaron dentífricos que contenían especies fitoterapéuticas como mirra, salvia, camomila, eucalipto y aloe vera, con flúor y sin flúor; evaluando su acción contra *Streptococcus mutans* por el método de difusión en agar, dando halos de inhibición menores a 15 mm; valor inferior a lo encontrado en el presente trabajo de investigación. La acción contra el *Streptococcus mutans* ATCC 35668 del aceite esencial de *Erythroxylum coca* Lam.va, se debería a sus componentes químicos.

Respecto al diseño de la formulación farmacéutica, pasta dentífrica, la base para su elaboración se hizo utilizando componentes de uso común en el comercio lo que facilita su oportuno acceso y bajo costo. La asociación de los aceites esenciales de menta y orégano, al aceite esencial de coca, permitió obtener productos innovadores de origen natural y útiles para la higiene bucal.

### Conclusiones

En las hojas secas del aceite esencial de *Erythroxylum coca* Lam. var. "coca Huánuco", se identificaron, entre otros componentes:  $\beta$ -pino, fitol, y ácido metil éster 7, 10, 13-hexadecatrienoico. El aceite esencial de coca con los tres métodos aplicados para determinar la capacidad antioxidante, demostró poseer fitocompuestos con capacidad antioxidante que participarían en los sistemas redox biológicos. Para el aceite esencial de coca se determinó una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 0,625  $\mu$ L/mL contra *Streptococcus mutans* ATCC 35668. El dentífrico que contenía 1% de aceites esenciales de coca y menta presentaron actividad frente a *Streptococcus mutans* ATCC 35668 con halo de inhibición de 37 mm y el dentífrico a base de 1% de los aceites esenciales de coca, menta y orégano presentó actividad contra *Streptococcus mutans* ATCC 35668 con halo de inhibición de 38 mm.

### Agradecimientos

Al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por su apoyo en la realización de la presente investigación de Proyecto Multidisciplinario 2012.

### Referencias bibliográficas

1. A, C. (2008). Composición química del aceite esencial de las hojas de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) "coca", actividad antioxidante y determinación antibacteriana frente a *Streptococcus mutans*. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia y Bioquímica - UNMSM.
2. A., B. E. (1999). Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles en el Perú - Cuzco. Centro Bartolomé de las Casas.

3. C, M., & McMaster. (2008). GC/MS: A Practical Users Guide (Second Edition ed.). New Jersey: John Wiley & Sons.
4. G, V., A, C., M, R., & J, R. Composición Química del Aceite Esencial de *Erythroxylum coca* Lam var. Coca (coca) y Evaluación de su Actividad Antibacteriana.
5. GP, A., CE, C., HJ, D., EB, R., MH, M., KA, W., y otros. (2012). Antimicrobial activity of selected essential oils against cariogenic bacteria. Nat Prod Res.
6. HF, O., WF, S., & E, M. J. (2009). Potencial antioxidante de hojas y corteza de *Bauhiniaakalbreyeri* Harms: Contribución de sus flavonoides en esta actividad. Rev. Acad. Colomb. , 183-191.
7. L, B., Costa M, d. A., K, C., & K, C. (2005). Acción antimicrobiana in vitro de dentífricos conteniendo fitoterápicos. Av. Odontostomatol.
8. L, C., & A, C. (1998). Formulaciones Magistrales Dermocosméticas. Caracas: Corpográfica, S.A.
9. M, J., F, M., & J, F. (1995). Screening of antiradical, antilipoperoxidant and hepatoprotective effects of nine plant extracts used in Caribbean folk medicine. Phytotherapy Research.
10. MA, F., TC, C., ICC, T., NAJC, F., CHG, M., NP, L., y otros. (2010). Antimicrobial activity of *Aegiphila* against oral pathogens. Rev Bras Farmacogn.
11. MC, G., & M, D. (s.f.). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor. Recuperado el 3 de 7 de 2012 de <http://upcommons.upc.edu/revistes/bits-tream/2099/2733/1/5CROMGASES.pdf>
12. N, B., T, Y. A., R, S., K, S., & S, S. (2005). Antioxidant properties of palm fruit extracts, Asia Pac J ClinNutr.
13. O, L. d. (1994). Investigación Fitoquímica. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú.
14. Pharmaceutical Excipients. American Pharmaceutical Published by the Association and the Pharmaceutical Society of Great Britain. (1983). New Jersey.
15. T, P. (1981). Aspectos botánicos de la coca. Acta del Seminario Interamericano sobre Coca y Cocaína. Lima-Perú.
16. W, B. -W., MF, C., & C, B. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm. Wiss. Technol.