



Metabolitos detectados en las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron y evaluación de sus propiedades biológicas mediante bioensayos

Vidal Gamarra O¹; César Fuertes R¹; Nadia Chávez S¹; Dennis Contreras C¹; Eri Goya S¹; Kelly Huamantumba B²; Fernando Retuerto P²; Gustavo Ruiz Paccó¹

Información del artículo

Historia del artículo

Recibido: 05/12/2017

Aprobado: 27/12/2017

Autor correspondal

Vidal Gamarra-Ochoa
vgomaster@yahoo.es

Financiamiento

Autofinanciado

Conflictos de interés

Ninguno

Citar como

Vidal Gamarra O, César Fuertes R, Nadia Chávez S, Dennis Contreras C, Eri Goya S, Kelly Huamantumba B, Fernando Retuerto P, Gustavo Ruiz P. Metabolitos detectados en las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron y evaluación de sus propiedades biológicas mediante bioensayos. Rev Peru Med Integrativa. 2017;2(4):828-34.

Resumen

Objetivo. Realizar el screening fitoquímico y determinar la actividad antioxidante y antibacteriana de los flavonoides y alcaloides aislados de extractos etanólicos de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron. **Materiales y métodos.** La capacidad antioxidante de los flavonoides y alcaloides aislados fue evaluada mediante el ensayo de DPPH, utilizando como control positivo a la vitamina C, y la actividad antibacteriana mediante el cálculo del halo de inhibición (mm) ante *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *E. coli*. **Resultados.** Los alcaloides de *E. coca* presentaron mayor actividad antibacteriana frente a *S. epidermidis* y *P. aeruginosa*, y los flavonoides de *E. novogranatense* tuvieron mayor actividad frente a *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*. *E. novogranatense* mostró un EC₅₀ de 271,20 µg/mL para extracto crudo y 250,29 µg/mL para flavonoides, mientras que *E. coca* presentó un EC₅₀ de 172,59 µg/mL para extracto crudo y 611,29 µg/mL para flavonoides. **Conclusión.** En ambas especies se identificaron alcaloides (cocaína y benzoilecgonina), flavonoides (chalconas y flavonoles), fenoles y carbohidratos. Los flavonoides de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron, y el extracto de *Erythroxylum coca* Lam presentaron mayor actividad antioxidante. El extracto de *Erythroxylum coca* Lam mostró mayor actividad antibacteriana frente a *S. aureus*, *S. epidermidis* y *E. coli*, excepto para *P. aeruginosa*. Los alcaloides de *Erythroxylum coca* Lam, exhibieron buena actividad frente a *S. epidermidis* y *P. aeruginosa*; excepto para *E. coli*, donde *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron tuvo mejor desempeño. Los flavonoides aislados de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron mostraron actividad frente a *S. epidermidis*.

Palabras clave: *Erythroxylum*, antibacteriana, antioxidante, alcaloides, flavonoides. (Fuente: DeCS BIREME).

Metabolites detected in *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron leaves and evaluation of their biological activities by bioessay

Abstract

Objective. To carry out phytochemical screening, to determine the antioxidant and antibacterial activity of the flavonoids and alkaloids isolated from ethanolic extracts of leaves of *Erythroxylum coca* Lam and *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron. **Materials and Methods.** The antioxidant capacity of isolated flavonoids and alkaloids was assessed by the DPPH assay, using vitamin C as the positive control; and the antibacterial activity was assessed by calculating the inhibition halo (mm) against *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *E. coli*. **Results.** The alkaloids of *E. coca* showed greater antibacterial activity against *S. epidermidis* and *P. aeruginosa*, and the flavonoids of *E. novogranatense* had greater activity against *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* and *S. aureus*. *E. novogranatense* showed an EC₅₀ of 271.20 µg/mL for crude extract and 250.29 µg/mL for flavonoids, while *E. coca* showed an EC₅₀ of 172.59 µg/mL for crude extract and 611.29 µg/mL for flavonoids. **Conclusion.** In both species were identified alkaloids (cocaine and benzoylecgonine), flavonoids (chalcones and flavonols), phenols and carbohydrates. The flavonoids of *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron, and the extract of *Erythroxylum coca* Lam showed greater antioxidant activity. The extract of *Erythroxylum coca* Lam showed greater antibacterial activity against *S. aureus*, *S. epidermidis* and *E. coli*, except for *P. aeruginosa*. The alkaloids of *Erythroxylum coca* Lam exhibited good activity against *S. epidermidis* and *P. aeruginosa*; except for *E. coli*, while *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron performed better. The isolated flavonoids from *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron showed activity against *S. epidermidis*.

Keywords: *Erythroxylum*, antibacterial, antioxidant, alkaloids, flavonoids. (Source: MeSH NLM).

¹ Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales "Juan de Dios Guevara" de la Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM, Lima-Perú.

² Instituto de Investigación "Antonio Raimondi" de la Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM, Lima-Perú.

Introducción

Se estima que en los países desarrollados mueren anualmente 25 000 pacientes debido a infecciones causadas por bacterias multidrogorresistentes ^(1,2); con costos adicionales estimados entre 21-34 billones de dólares ⁽³⁾. En Perú, si bien no se tienen aún indicadores específicos, se reconoce que la resistencia antimicrobiana es un problema creciente, especialmente en el caso de bacterias Gram negativas ⁽⁴⁾; sin embargo, las alternativas de prevención, como estrategias educativas o elaboración de un marco legal regulatorio, aún son escasas ⁽⁵⁾.

Una alternativa en la lucha contra la resistencia antimicrobiana, es el desarrollo de nuevos compuestos basados en principios activos de las especies vegetales, aceites esenciales y extractos vegetales ^(6,7). Los compuestos activos aislados de plantas se pueden usar como tal, modificados por semisíntesis química; o intentar obtenerlos por la vía de síntesis ⁽⁸⁾. En los últimos años se ha apreciado un incremento en el interés en productos naturales con efectos antibacterianos, básicamente, debido a que no han desarrollado mecanismos de resistencia conocidos y están apoyados por su uso tradicional ancestral, con relativo éxito ⁽⁹⁾.

El Perú es el principal productor de coca del mundo y su consumo es una costumbre ancestral ⁽¹⁰⁾. El género *Erythroxylum* está formado por unas 250 especies que proliferan en la zona tropical, especialmente en el continente americano. Solo dos especies son cultivadas en el Perú: *Erythroxylum coca* var. *Coca*, en el sur y centro del Perú, principalmente en el departamento de Huánuco y Cusco, y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) var. *Truxillense* (Rusby) Plowman, en el norte del país, sobre todo en el departamento de La Libertad ^(10,11). Ambas se diferencian en su distribución geográfica, ecológica, sus relaciones de cultivo, morfología, anatomía y composición química ⁽¹²⁾.

Las hojas de *Erythroxylum coca*, son particularmente grandes y gruesas, con forma oblonga elíptica y de color verde oscuro; rinde un promedio de cocaína de 1,1% y tiene un olor parecido al heno, té de China y a vainilla ⁽¹³⁾. Por otro lado, *Erythroxylum novogranatense*, posee hojas más pequeñas, estrechas y delgadas, muy brillantes y de color verde amarillento, redondeadas en el ápice. Produce elevadas cantidades de salicilato de metilo en sus hojas y flores y contiene un promedio de 0,17 – 0,76 de cocaína ^(12,14).

Estudios previos han mostrado que la hoja de coca contiene metabolitos primarios como proteínas, carbohidratos y lípidos; y metabolitos secundarios como alcaloides

(p. ejemplo, cocaína), flavonoides y taninos ⁽¹⁵⁾. Si bien se han demostrado que los extractos alcohólicos de *Erythroxylum coca* ^(16,17) y *Erythroxylum novogranatense* ^(18,19) han probado tener cierta actividad antibacteriana, no se ha evaluado a profundidad qué componentes pueden ser los responsables de estos efectos.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la composición química, la actividad antioxidante y antibacteriana *in vitro* de los flavonoides y alcaloides del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron.

Materiales y métodos

Material vegetal

Las hojas de coca de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron, fueron proporcionadas por la Empresa Nacional de la Coca S.A., y la clasificación taxonómica de ambas especies se realizó en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM). Los ensayos se realizaron en los laboratorios del Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM contando con el apoyo del Centro de Control Analítico (CCA) de la misma facultad, para las pruebas microbiológicas.

Preparación de los extractos

Los extractos fueron preparados a partir de las hojas secas pulverizadas de las especies de coca seleccionadas. Se utilizaron 500 g de muestra en polvo y 3 L de alcohol comercial de 96° para elaborar un macerado que, posteriormente, fue filtrado e introducido en un evaporador rotatorio para luego ser desecado en una estufa a 37 °C.

Screening fitoquímico ⁽²⁰⁾

Se realizó un *screening* fitoquímico para identificar los metabolitos contenidos en los extractos con los reactivos de Molish (polisacáridos), cloruro de hierro-III (fenoles), Shinoda (flavonoides), Dragendorff, Popoff y Mayer (alcaloides), Bertrand (saponinas), Rosenheim y Liebermann-Burchard (esteroides); y finalmente ninhidrina (aminoácidos libres).

Aislamiento de alcaloides ⁽²¹⁾

Se realizó en 5 g de extracto seco, al cual se le añadió 100 mL de cloroformo y se extrajo con 2x50 mL de ácido cítrico

al 1,5% (p/v) en embudo de decantación. A esta mezcla se le eliminó la capa clorofórmica y la capa acuosa se ajustó a pH 8,2 con solución de carbonato de sodio. Se realizó una segunda extracción con 2x50 mL de cloroformo; en donde se eliminó la capa acuosa y removió el solvente de la capa clorofórmica haciendo uso del evaporador rotatorio. El residuo clorofórmico, el cual contiene los alcaloides totales, se concentró dejándolo en campana de extracción y fue al que se le realizó una prueba rápida con el reactivo de Dragendorff para corroborar la presencia de alcaloides.

Aislamiento de flavonoides⁽²²⁾

Primero se procedió a remover la clorofila en 5 g de extracto⁽²³⁾. A ello se agregó 25 mL de ácido clorhídrico 1M hasta llegar a un pH=2, y se realizó una primera extracción con 3x10 mL de éter etílico en embudo de decantación. Con ello, la clorofila quedó aislada en la capa etérea, por lo que se procedió a su eliminación. La capa acuosa se ajustó a pH 8,2 adicionando una solución de carbonato de sodio y se realizó una segunda extracción con 3x10 mL con éter etílico. La capa etérea con los alcaloides se separó, y la capa acuosa rica en compuestos fenólicos y flavonoides, se ajustó a pH = 5 con ácido clorhídrico; luego se filtró y colocó bajo campana de extracción para eliminar algún remanente de solvente. Finalmente, las muestras fueron liofilizadas.

Actividad antioxidante mediante el ensayo de DPPH⁽²⁴⁾

Se preparó una solución de DPPH al 2% en metanol. En caso de las muestras, para ambos extractos crudos se prepararon diluciones de 800, 600, 400, 200 y 100 µg/mL; para los flavonoides totales de *Erythroxylum coca Lam* se trabajó con 3000, 2000, 1500, 1000 y 500 µg/mL, y para los flavonoides totales de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron, se elaboraron soluciones con concentraciones de 1000, 750, 500, 250, 125 µg/mL; utilizando como control

positivo a la vitamina C. Los resultados se leyeron en un espectrofotómetro de UV-Vis a 517 nm.

Actividad antibacteriana⁽²⁵⁾

Las muestras probadas en el ensayo fueron extractos crudos, alcaloides y flavonoides totales. Se usó el método de difusión en placa Petri, frente a bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*) y Gram negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*) en agar Müller-Hinton. Se usó como controles positivos ciprofloxacino 10 µg y gentamicina 5 µg y como control negativo agua destilada más dimetilsulfóxido (DMSO). Las muestras fueron disueltas en 1,5 mL de agua destilada y 0,5 mL de DMSO, de esa solución, se tomó 400 µL y se procedió a la medición de halos de inhibición a las 48 h posteriores a la aplicación en la placa Petri.

Resultados

Los resultados obtenidos del *screening* fitoquímico de los extractos secos de las hojas de *Erythroxylum coca Lam* y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron, mostraron gran cantidad de alcaloides, fenoles y flavonoides. Cabe destacar que entre los alcaloides visualizados se encontró cocaína y benzoilecgonina en el perfil cromatográfico. Asimismo, se encontró que el extracto de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron tenía una menor cantidad de carbohidratos (Tabla 1).

Asimismo, se puede observar que, si bien el extracto de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron fue en donde se pudo determinar mayor cantidad de flavonoides y alcaloides, fue en el extracto de *Erythroxylum coca Lam* de donde se pudo extraer un mayor porcentaje de alcaloides (Tabla 2).

Tabla 1. *Screening* fitoquímico de los extractos secos de las hojas de *Erythroxylum coca Lam* y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron

Compuestos	<i>Erythroxylum coca Lam</i>	<i>Erythroxylum novogranatense</i> (Morris) Hieron
Alcaloides	++	+++
Flavonoides	++	+++
Esteroides y quinonas	-	-
Fenoles	+++	+++
Carbohidratos	++	+++

Ausencia: - / Ligera presencia: + / Moderadamente: ++ / Abundante: +++

Tabla 2. Metabolitos aislados de los extractos secos de las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron

Especie	Flavonoides totales (mg/g)	Alcaloides totales (mg/g)	Alcaloides extraídos (%)
<i>Erythroxylum coca</i> Lam	590,0	70-80	2,694
<i>Erythroxylum novogranatense</i> (Morris) Hieron	610,0	95-100	1,677

Se encontró que en todos los grupos de estudio hubo una relación directamente proporcional entre el porcentaje de inhibición y la dosis administrada. En el caso del extracto total de *Erythroxylum coca* Lam, se encontró un EC_{50} de 172,6 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2=0,999$), mientras que los flavonoides extraídos alcanzaron un EC_{50} de 611,3 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2=0,966$). Por otro lado, el extracto total de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron mostró un EC_{50} de 271 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2=0,988$), en contraste con los flavonoides extraídos con un EC_{50} de 250,3 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2=0,999$). Esto fue similar al desempeño mostrado por el control ($EC_{50}=1,6 \mu\text{g/mL}$; $R^2=0,990$) (Figura 1).

Se encontró un mayor halo de inhibición en el grupo de flavonoides totales en ambas especies en estudio, en

comparación con la acción del extracto crudo y de los alcaloides totales. Sin embargo, los controles positivos mostraron halos de inhibición frecuentemente mayores a los grupos de estudio. Por ejemplo, el grupo de ciprofloxacino 10 μg desarrolló un halo de 68 mm en el cultivo de *Staphylococcus epidermidis*, y de 48 mm en el cultivo de *Pseudomonas aeruginosa*. Por otro lado, el grupo que recibió gentamicina 5 μg mostró halos de inhibición de 30 mm y 16 mm en los cultivos de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente. En el único caso en que los grupos de estudio obtuvieron mayores halos de inhibición fue en los que se aplicó extracto crudo, alcaloides totales y flavonoides totales de *Erythroxylum coca* Lam comparados con gentamicina contra *Pseudomonas aeruginosa*.

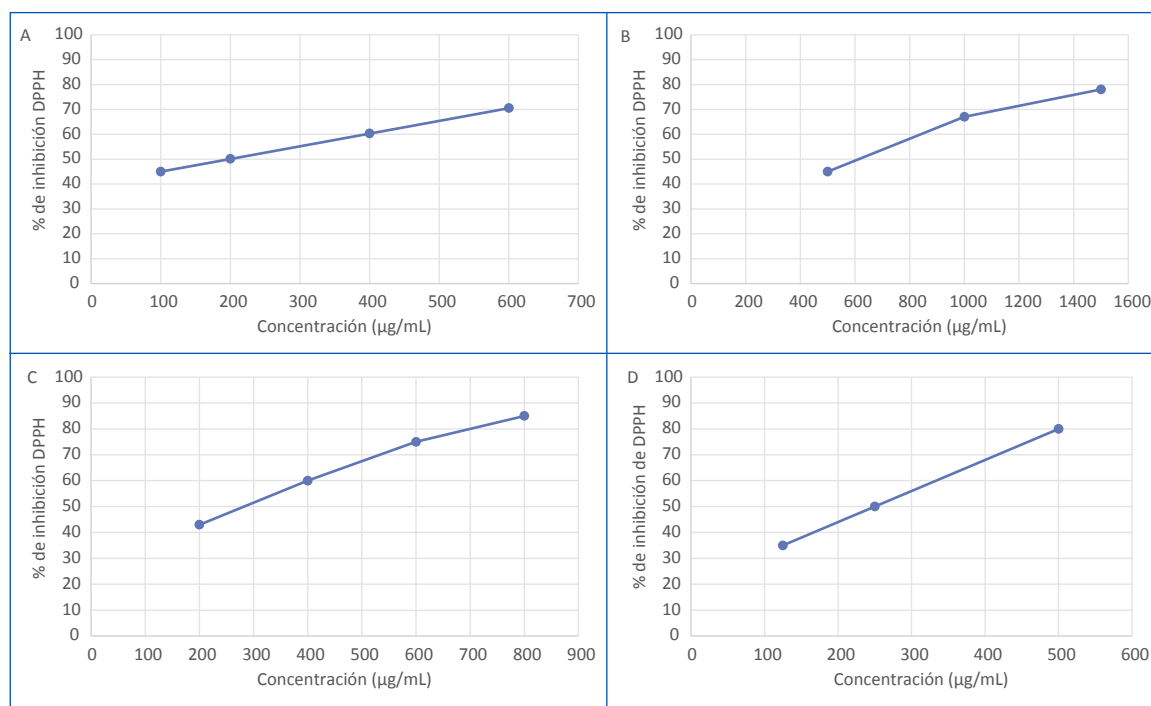


Figura 1. Porcentaje de inhibición de DPPH en diferentes concentraciones de extracto total de *Erythroxylum coca* Lam (A), alcaloides extraídos de este (B), y extracto total de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron (C) y alcaloides extraídos (D).

Tabla 3. Actividad antibacteriana por difusión en agar para *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron tomando como indicador el diámetro del halo

Especie	Muestra (500 µL)	Halo de Inhibición (mm)		
		Extracto crudo (1 g/mL)	Alcaloides totales (40 mg/mL)	Flavonoides totales (0,5 g/mL)
<i>Erythroxylum coca</i> Lam	<i>Staphylococcus aureus</i>	23	NP	21
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	33	25	26
	<i>Escherichia coli</i>	18	18	20
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23	26	28
<i>Erythroxylum novogranatense</i> (Morris) Hieron	<i>Staphylococcus aureus</i>	22	20	23
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	28	23	35
	<i>Escherichia coli</i>	24	22	20
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19	NP	20

NP: no presentó

Discusión

Según trabajos publicados por la Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC) ⁽¹⁰⁾, Galindo y Fernández ⁽²⁶⁾; y Johnson y Emche ⁽²⁷⁾, en la hoja de coca se encuentran compuestos principales como la cocaína (>1% en peso), compuestos accesorios (<1% en peso) y compuestos en trazas (<1% en peso); entre los compuestos principales y accesorios están la cinamoilcocaína, metilecgonina, benzoilecgonina, ecgonina, norcocaína, N-formilnorcocaína ^(10,26) higrina, tropinona, *trans*-cinnamoilcocaína, *cis*-cinnamoilcocaína, cuscohigrina y tropacocaína ⁽²⁷⁾. Esto se confirmó en nuestro estudio al encontrarse cocaína y benzoilecgonina en la determinación de alcaloides.

La extracción de alcaloides totales se hizo por el método establecido de Turner ⁽²¹⁾ y para la cuantificación se llevó a cabo por el método estandarizado de la USP-34-2011 ⁽²⁵⁾. El contenido de alcaloides totales presentes en el extracto crudo fue de 2,69% para *Erythroxylum coca* Lam y de 1,67 % para *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron. Según los datos de la UNODC ⁽¹⁰⁾, la especie *Erythroxylum novogranatense* var. *Truxillense* tiene un contenido normal de 0,42 – 1,02 %, *Erythroxylum novogranatense* var. *Novogranatense* 0,17–0,76 % y la *E. coca* var. *Ipadu* contiene 0,11 - 0,41 %. Por su parte, para Galindo y Fernández ⁽²⁶⁾ las hojas de coca de la especie *coca* cv. *Lambran* contiene 1,12% y *coca* cv. *Mollecoca* 0,86%. Todos estos valores son inferiores a los hallados en el presente estudio, para explicar ello se puede apelar a otros factores que afectan el contenido de alcaloides durante el desarrollo de la planta.

Por ejemplo, el trabajo de Johnson y Emche ⁽²⁷⁾ monitoreó el contenido de alcaloides de la hoja de coca, desde el brote hasta hoja seca, en un período de 36 semanas. Así, se observó que el contenido de alcaloides fue aumentado hasta los 7 días en promedio, al llegar al período de hoja seca y su posterior desprendimiento de la planta, los niveles de alcaloides presentan un decaimiento.

Por el método de captación del radical DPPH, expresado en EC₅₀, se obtuvo para la especie *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron 271,20 µg/mL para el extracto crudo y 250,29 µg/mL para flavonoides totales, mientras que para *Erythroxylum coca* Lam, los valores como extracto crudo y flavonoides aislados fueron 172,59 y 611,29 µg/mL, respectivamente. Se conoce que las flavonas y flavonoles tienen actividad frente a los radicales libres ⁽²⁸⁾ Estos resultados son similares a lo encontrado por Castro Luna *et al.* ⁽¹⁸⁾, donde el aceite esencial de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) “coca” var. *Truxillense* mostró una actividad antioxidante similar al referente usando el método de DPPH.

En cuanto a la actividad antibacteriana, se encontraron resultados destacables en los grupos de flavonoides y alcaloides totales pertenecientes a la *Erythroxylum coca* Lam comparado con la gentamicina frente a la *P. aeruginosa*. De forma similar, en los cultivos de *E. coli* la mayor actividad fue de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron, en extracto crudo, seguido por los alcaloides de la mencionada, pero no superior al halo de inhibición producido por el ciprofloxacino, como control positivo. Estos resultados difieren de lo encontrado por Negrete Zavala *et al.* ⁽²⁹⁾

y Ventura *et al.* ⁽³⁰⁾ quienes no encontraron actividad antibacteriana, haciendo uso de extractos acuosos, alcohólicos y aceite esencial de *Erythroxylum coca* Lam en los cultivos de estas dos especies.

Frente a las bacterias Gram positivas, destacaron los flavonoides de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron, seguido por el extracto crudo de *Erythroxylum coca* Lam frente a *S. epidermidis*. Para *S. aureus*, el extracto de *Erythroxylum coca* Lam y los flavonoides de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron destacan frente a las otras muestras. Minaya ⁽¹⁹⁾ y Borrovic ⁽³¹⁾ encontraron resultados similares al evaluar el efecto del extracto etanólico de *Erythroxylum novogranatense* var. *truxillense* ante cepas de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus casei*, con halos de inhibición promedio de 34,4 y 33,74 mm respectivamente. Castro *et al.* ⁽¹⁸⁾, también encontraron efectos similares a nuestro estudio, usando aceite esencial de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron ante

cepas de *Streptococcus mutans*, con halos de inhibición entre 20-30 mm.

Se recomienda que futuros estudios intenten caracterizar las estructuras químicas de estos compuestos con fines de mejorar el entendimiento de las posibles interacciones sinérgicas entre ellos y así optimizar el potencial terapéutico de estas especies.

Finalmente, se concluye que los alcaloides totales de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron, tienen potencial antioxidante similar al control (vitamina C). Asimismo, los flavonoides y alcaloides totales extraídos de *Erythroxylum coca* Lam tienen mayor actividad antibacteriana contra *S. epidermidis* y *P. aeruginosa*. Mientras que, *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron es mayormente activa contra *E. coli*. comparados con el control positivo ciprofloxacino y gentamicina, respectivamente.

Referencias bibliográficas

1. While A. "No action today means no cure tomorrow": the threat of antimicrobial resistance. Br J Community Nurs. julio de 2016;21(7):344–7.
2. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Francia: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data; 2014. 256 p.
3. Van Duin D, Paterson D. Multidrug Resistant Bacteria in the Community: Trends and Lessons Learned. Infect Dis Clin North Am. junio de 2016;30(2):377–90.
4. García Apac C. Resistencia antibiótica en el Perú y América Latina. Acta Médica Peru. abril de 2012;29(2):99–103.
5. Ade MP. Perfil de País Perú – Resistencia Antimicrobiana. Washington DC: Organización Panamericana de la Salud; 2009. 174 p.
6. Enioutina EY, Salis ER, Job KM, Gubarev MI, Krepkova LV, Sherwin CMT. Herbal Medicines: challenges in the modern world. Part 5. status and current directions of complementary and alternative herbal medicine worldwide. Expert Rev Clin Pharmacol. marzo de 2017;10(3):327–38.
7. Altemimi A, Lakhssassi N, Baharlouei A, Watson DG, Lightfoot DA. Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. Plants Basel Switz. 22 de septiembre de 2017;6(4).
8. Moir DT, Opperman TJ, Butler MM, Bowlin TL. New classes of antibiotics. Curr Opin Pharmacol. octubre de 2012;12(5):535–44.
9. Van Vuuren S, Holl D. Antimicrobial natural product research: A review from a South African perspective for the years 2009-2016. J Ethnopharmacol. 17 de agosto de 2017;208:236–52.
10. Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito. Perú. Monitoreo de Cultivos de Coca-2015. Lima: Imaginen; 2016. 102 p.
11. Machado E. Determinación de Variedades y Cultivares en Cocas Peruanas. Actas del Seminario Interamericano sobre Aspectos Médicos y Sociológicos de la Coca y de la Cocaína. Lima: Pacific Press; 1980.
12. Mostacero J, Castillo F, Mejía F, Gamarra O, Charcape J, Ramirez R. Plantas Medicinales del Perú: Taxonomía, Ecogeografía, Fenología y Etnobotánica. Trujillo: Fondo Editorial Asamblea Nacional de Rectores.; 2011.
13. Stolberg VB. The use of coca: prehistory, history, and ethnography. J Ethn Subst Abuse. 2011;10(2):126–46.
14. Plowman T. The identification of coca (*Erythroxylum* species): 1860–1910. Bot J Linn Soc. 1 de junio de 1982;84(4):329–53.
15. Sauvain M, Rerat C, Moretti C, Saravia E, Arrazola S, Gutierrez E, *et al.* A study of the chemical composition of *Erythroxylum coca* var. *coca* leaves collected in two ecological regions of Bolivia. J Ethnopharmacol. mayo de 1997;56(3):179–91.
16. Deza CE, Perfecto DR. Estudio *in vitro* de la actividad antibacteriana del extracto de *Erythroxylum coca*

- sobre bacilos negro pigmentados. *Odontol Sanmarquina*. 8 de agosto de 2017;20(1):17–21.
17. Luna-Vílchez M, Díaz-Vélez C, Baca-Dejo F. Efecto del extracto acuoso, ácido y alcohólico de las hojas secas de *Erythroxylum coca* var *coca* (coca) en *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis* y *Candida albicans* *in vitro*. *Horiz Méd*. enero de 2017;17(1):25–30.
 18. Luna AC, Cevallos NR, Eizaguirre JJ, Cunza SS, Quiroz JR, Elera SG. Composición química del aceite esencial de las hojas de *Erythroxylum novogranatense* (MORRIS) “coca”, actividad antioxidante y determinación antibacteriana frente a *Streptococcus mutans*. *CIENTÍFICA* [Internet]. 2013 [citado 29 de enero de 2018];10(3). Disponible en: <http://revistas.cientifica.edu.pe/index.php?journal=cientifica&page=article&op=view&path%5B%5D=220>
 19. Minaya Flores P. Determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de la hoja de *Erythroxylum novogranatense* var *truxillense* (coca) frente a bacterias orales cariogénicas [Internet] [Tesis para obtener el grado de Cirujano Dentista.]. [Lima]: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2008 [citado 29 de enero de 2018]. Disponible en: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/2759>
 20. Lock O. Investigación fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. 2.^a ed. Lima: Fondo Editorial PUCP; 1994. 98–102 p.
 21. Turner CE, Ma CY, Elsohly MA. Constituents in *Erythroxylum coca* I: gas chromatographic analysis of cocaine from three locations in Peru. *Bull Narc*. marzo de 1979;31(1):71–6.
 22. Nagai A. Efeito induzido pelo vírus Y da batata (Potato virus Y) no metabolismo secundário do camapu (*Physalis angulata* L.) [Internet] [Tesis Magistral]. [Sao Paulo]: Universidade de São Paulo; 2012 [citado 29 de enero de 2018]. Disponible en: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41132/tde-01052013-111617/>
 23. Oropeza Guerrero MP. Alcaloides totales y actividad antioxidante de extractos metanólicos de hojas de *Ipomoea murucoides* (casahuate) [Tesis para obtener el título de Ingeniero en Alimentos.]. [Oaxaca]: Universidad Tecnológica de la Mixteca; 2012.
 24. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol*. 1 de enero de 1995;28(1):25–30.
 25. Rojas R, Bustamante B, Bauer J, Fernández I, Albán J, Lock O. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. octubre de 2003;88(2–3):199–204.
 26. Galindo Bonilla A, Fernández Alonso JL. Especies cultivadas del género *Erythroxylum* P. Browne. Revisión del tema desde la perspectiva forense. 2009 [citado 30 de enero de 2018]; Disponible en: <https://digital.csic.es/handle/10261/33547>
 27. Johnson EL, Emche SD. Variation of Alkaloid Content in *Erythroxylum coca* Leaves from Leaf Bud to Leaf Drop. *Ann Bot*. 1 de junio de 1994;73(6):645–50.
 28. Jiménez CIE, Martínez EYC, Fonseca JG. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Rev Fac Med UNAM*. 2009;52(2):73–5.
 29. Negrete Zabala MR, Quispe A. Estudio *in vitro* de la capacidad antibacteriana de la hoja de coca (*Erythroxylum coca* lam) frente a bacterias atcc *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. *Univ Cienc Soc*. 2015;1(15):38–47.
 30. Ventura G, Castro A, Roque M, Ruiz J. Composición química del aceite esencial de *Erythroxylum coca* Lam var. *Coca* (coca) y evaluación de su actividad antibacteriana. *Cienc E Investig*. 14 de mayo de 2014;12(1):24–8.
 31. Borrovc Ramos YF. Efecto antibacteriano del extracto alcohólico de la hoja de *Erythroxylum novogranatense* var. *truxillense* (coca) sobre flora mixta salival [Internet] [Tesis para obtener el grado de Cirujano Dentista.]. 2006 [citado 30 de enero de 2018]. Disponible en: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/2810>