



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Medicina

Unidad de Posgrado

**“Evaluación del efecto del consumo de hoja de coca
(*Erythroxylum coca*) micropulverizada en marcadores
bioquímicos de recambio óseo en mujeres
postmenopáusicas”**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Bioquímica

AUTOR

Kusy Micaela TRIGO PÉREZ

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Trigo K. “Evaluación del efecto del consumo de hoja de coca (*Erythroxylum coca*) micropulverizada en marcadores bioquímicos de recambio óseo en mujeres postmenopáusicas” [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina / Unidad de Posgrado; 2018.



Universidad Nacional Mayor de San Marcos ✓
Universidad del Perú. Decana de América



Facultad de Medicina ✓

Unidad de Posgrado ✓
Sección Maestría

98 R.
97 ps. A.

ACTA DE GRADO DE MAGISTER

En la ciudad de Lima, a los 04 días del mes de setiembre del año dos mil dieciocho ²⁰¹⁸ siendo la 11:00 am, bajo la presidencia del Dra. Doris Virginia Huerta Canales con la asistencia de los Profesores: Mg. Lázaro Rubén Valdivieso Izquierdo (Miembro), Mg. Miguel Hernán Sandoval Vegas (Miembro), Mg. Luis Clever Arias Caycho (Miembro) y la Dra. Silvia Suárez Cunza (Asesora); la postulante al Grado de Magister en Bioquímica, Bachiller en Ciencias-Industrias Alimentarias, procedió a hacer la exposición y defensa pública de su tesis Titulada: "EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL CONSUMO DE HOJA DE COCA (ERYTHROXYLUM COCA) MICROPULVERIZADA EN MARCADORES BIOQUÍMICOS DE RECAMBIO ÓSEO EN MUJERES POSTMENOPAUSICAS" con el fin de optar el Grado Académico de Magister en Bioquímica. Concluida la exposición, se procedió a la evaluación correspondiente, habiendo obtenido la siguiente calificación **B MUY BUENO 18**. A continuación el Presidente del Jurado recomienda a la Facultad de Medicina se le otorgue el Grado Académico de **MAGÍSTER EN BIOQUÍMICA** a la postulante **KUSY MICAELA TRIGO PÉREZ**.

Se extiende la presente Acta en tres originales y siendo las 12:00 pm, se da por concluido el acto académico de sustentación.

Mg. Lázaro Rubén Valdivieso Izquierdo
Profesor Asociado
Miembro

Mg. Miguel Hernán Sandoval Vegas
Profesor Principal
Miembro

Mg. Luis Clever Arias Caycho
Profesor Asociado
Miembro

Dra. Silvia Suárez Cunza
Profesora Principal
Asesora

Dra. Doris Virginia Huerta Canales
Profesora Principal
Presidente

AGRADECIMIENTOS

A mi esposo Carlos y a mis padres Javier y Noelia, por creer en mí

A la Dra. Silvia Suárez Cunza por su sabio acompañamiento y vocación de enseñanza

A la Mg. Ysela Agüero Palacios por su permanente disposición

A Alberto Benavides por su apoyo desinteresado

A Willy Cerón

A todas las voluntarias que participaron comprometidamente

A Fernando Gianella por su apoyo

A mi hermano Javier por el tiempo prestado

A cada una de las personas que me ayudaron en las diferentes etapas con su buena voluntad

A los abuelos, quienes nos dejaron muchos conocimientos aún por mirar, entender y aplicar.

ÍNDICE

RESÚMEN

| | <u>Página</u> |
|--|---------------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Situación problemática..... | 1 |
| 1.2 Formulación del problema..... | 3 |
| 1.3 Justificación de la Investigación..... | 3 |
| 1.4 Objetivos de la Investigación | 5 |
| 1.4.1 Objetivo General | 5 |
| 1.4.2 Objetivos específicos | 5 |
| | |
| 2. MARCO TEÓRICO | 6 |
| 2.1 Estudios de investigación de la Erythroxyllum coca | 6 |
| 2.2 Bases Teóricas | 9. |
| 2.2.1 Erythroxyllum coca (coca..... | 9 |
| 2.2.1.1 Aspectos Botánicos..... | 9 |
| 2.2.1.2 Clasificación Taxonómica | 9 |
| 2.2.1.3 Aspectos nutricionales de la hoja de coca | 10 |
| 2.2.2 Tejido Óseo..... | 16 |
| 2.2.2.1 Matriz extracelular ósea | 18 |
| 2.2.2.2 Componente celular del tejido óseo | 19 |
| 2.2.3 Absorción intestinal del Calcio | 20 |
| 2.2.3.1 Balance general del calcio | 21 |
| 2.2.4 Metabolismo del Calcio | 24 |
| 2.2.5 Marcadores Bioquímicos de Recambio Óseo | 25 |
| 2.2.5.1 Marcadores Bioquímicos de Formación Ósea | 29 |
| 2.2.5.1.1 Osteocalcina | 29 |
| 2.2.5.1.2 Fosfatasas Alcalinas | 30 |
| 2.2.5.1.3 Péptidos de extensión del procolágeno 1 | 30 |
| 2.2.5.2 Marcadores Bioquímicos de Resorción Ósea | 31 |
| 2.2.5.2.1 Fosfatasa ácida tartrato resistente | 32 |
| 2.2.5.2.2 Hidroxiprolina | 32 |

| | |
|---|-----------|
| 2.2.5.2.3 Piridinolinas..... | 32 |
| 2.2.5.2.4 Péptidos del Cross link ó Telopéptidos | 33 |
| 2.2.6 Menopausia | 33 |
| 2.2.7 Polifenoles | 34 |
| 3. METODOLOGÍA..... | 37 |
| 3.1 Evaluación de actividad antioxidante y metabolitos secundarios del extracto del pulverizado de coca..... | 37 |
| 3.1.1 Determinación de la Actividad Antioxidante y metabolitos secundarios..... | 38 |
| 3.1.1.1. Método ABTS..... | 38 |
| 3.1.1.2. Método FRAP | 39 |
| 3.1.2 Determinación de Polifenoles totales..... | 40 |
| 3.1.3 Determinación de Flavonoides..... | 40 |
| 3.2 Evaluación de los marcadores de recambio óseo..... | 41 |
| 3.2.1 Análisis bioquímicos | 43 |
| 3.2.1.1 Marcadores de Formación Ósea..... | 44 |
| 3.2.1.2 Marcadores de Resorción Ósea | 50 |
| 3.3 Análisis estadístico | 56 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 58 |
| 4.1 Resultados de la evaluación de actividad antioxidante y metabolitos secundarios del pulverizado de coca..... | 58 |
| 4.2 Resultados de los marcadores bioquímicos de recambio óseo | 60 |
| 4.2.1 Cambios en los marcadores de formación ósea en 90 días | 60 |
| 4.2.3 Cambios en los marcadores de resorción ósea en 90 días | 61 |
| 4.3. Discusión | 63 |
| 5. CONCLUSIONES | 68 |

| | |
|--|-----------|
| 6. LIMITACIONES DEL ESTUDIO | 69 |
| 7. RECOMENDACIONES..... | 70 |
| 8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS | 71 |
| 9. ANEXOS..... | 77 |

LISTA DE TABLAS

| TABLA | Página |
|---|---------------|
| 1. Contenido promedio de nutrientes en muestras de hoja de Coca pulverizada..... | 12 |
| 2. Contenido de alcaloides del pulverizado de hoja de coca..... | 13 |
| 3. Contenido de aminoácidos de la hoja de coca..... | 14 |
| 4. Marcadores Bioquímicos de Recambio Óseo..... | 27 |
| 5. Principales indicaciones de los Marcadores Bioquímicos de Recambio Óseo..... | 28 |
| 6. Reactivos y materiales suministrados..... | 45 |
| 7. Valores referenciales de los marcadores para adulto..... | 56 |
| 8. Resultados de los parámetros antioxidantes de la hoja de Coca Pulverizada..... | 59 |
| 9. Evaluación de los biomarcadores de formación y resorción ósea en mujeres posmenopáusicas después del consumo de coca durante 90 días, aplicando la prueba de Friedman..... | 61 |
| 10. Resumen de las características de las voluntarias que tuvieron una relación positiva entre 0 y 1 con los resultados de los Marcadores..... | 62 |
| 11. Concentración del marcador BALP en cada voluntaria..... | 88 |
| 12. Concentración del marcador P1NP en cada voluntaria..... | 89 |
| 13. Concentración del marcador NTX1 en cada voluntaria..... | 90 |
| 14. Concentración del marcador bCTX en cada voluntaria..... | 91 |
| 15. Porcentaje de captación promedio de los 3 extractos de Pulverizado de coca..... | 96 |

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS

Página

| | |
|--|----|
| 1. Cultivo de hoja de coca por regiones en el Perú (2006-2010) | 16 |
| 2. Porcentaje de Captación promedio de 03 extractos de pulverizado de hoja de coca..... | 59 |
| 3. Curva estándar del marcador BALP..... | 86 |
| 4. Curva estándar del marcador P1NP..... | 86 |
| 5. Curva estándar del marcador NTX1..... | 87 |
| 6. Curva estándar del marcador bCTX..... | 87 |
| 7. Absorbancias promedio del extracto 1 de pulverizado de hoja de coca...95 | |
| 8. Absorbancias promedio del extracto 2 de pulverizado de hoja de coca...95 | |
| 9. Absorbancias promedio del extracto 3 de pulverizado de hoja de coca...96 | |
| 10. Método FRAP con Sulfato Ferroso..... | 97 |
| 11. Método FRAP con Ácido Ascórbico | 97 |

RESUMEN

En la presente investigación se evaluó el efecto del consumo de coca pulverizada en mujeres postmenopáusicas y se analizó la capacidad antioxidante de la coca pulverizada. Las pruebas se llevaron a cabo en el Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición-UNMSM. Las participantes fueron mujeres postmenopáusicas voluntarias. Siendo un único tratamiento y autocontrolado, se seleccionaron 25 voluntarias que cumplieron los criterios de inclusión y exclusión. Terminaron 21. Se les proporcionó hoja de coca pulverizada para un consumo diario de 4 g en agua durante 90 días. Todas continuaron con su dieta normal y estilo de vida. Se tomaron tres muestras de sangre por voluntaria, al inicio, antes del consumo del pulverizado, a los 45 días y a los 90 días. En las voluntarias, se midió cuatro marcadores de recambio óseo. En el micropulverizado, ABTS (Capacidad antioxidante equivalente al trolox), FRAP (Potencial antioxidante de reducción de hierro) y polifenoles. Se observó una reducción significativa del marcador de resorción ósea NTX1 (de 12,719 a 0,994 ng/mL; $p < 0,05$). El marcador de formación ósea P1NP mostró una positiva diferencia de medianas. El extracto de coca exhibió capacidad antioxidante (TEAC-ABTS de 2,74 $\mu\text{mol/mL}$, FRAP de 73,60 mg AAE/g); el contenido de polifenoles fue 3 089,34 mg AG/100 g. Estas características podrían contribuir con los beneficios potenciales en el metabolismo óseo. La complementación de la dieta por 90 días con coca indujo a cambios en indicadores de recambio óseo.

Palabras clave: recambio óseo, *Erythroxylum coca*, capacidad antioxidante

ABSTRACT

The effects of the consumption of coca leaves powder in post-menopausal women and the antioxidant capacity of coca leaves powder were evaluated in Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición-UNMSM. Participants were volunteer post-menopausal women. A unique and self-controlled treatment of 25 volunteers who followed inclusion and exclusion criteria was applied. Twenty one completed the treatment. Women's daily ingestion of 4 g of coca leaves powder mixed with water for a period of 90 days. They kept their regular diet and life style. Three blood samples per volunteer were taken before, after 45 and 90 days of the treatment. In women, it was measured four bone turnover markers. In coca leaves powder: TEAC-ABTS (Trolox equivalent antioxidant capacity), FRAP (Ferric reducing antioxidant power) and polyphenols. A significant decrease in the bone resorption indicator NTX1 (from 12.719 to 0.994 ng/mL; $p < 0.05$) was observed. The bone formation P1NP indicator had a positive median difference. The coca leaves powder showed antioxidant capacity (TEAC-ABTS of 2.74 $\mu\text{mol/mL}$, FRAP of 73.60 mg AAE/g); the content of polyphenols was 3 089.34 mg AG/100 g, these results could potentially benefit bone metabolism. The incorporation of coca leaves powder in the women's regular diet for a period of 90 days generated a change in the indicators of bone density.

Key words: bone turnover, *Erythroxylum coca*, antioxidant capacity

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Situación problemática

Desde inicios del siglo XX, se ha buscado relacionar la hoja de coca (*Erythroxylum coca*) con los problemas y daños que genera el clorhidrato de cocaína. Esto ha imposibilitado que se estimen sus grandes aportes en nutrición y salud, confirmados por diversas investigaciones.

La historia de la coca es un ejemplo dramático de error humano en relación con la naturaleza. Se ignoró la experiencia de los usuarios indígenas de coca, que la consumieron por 300 generaciones (Ramos Aliaga, 1987) y se negó a reconocer los beneficios. Cuando los científicos europeos aislaron la cocaína, la lanzaron al mundo como el único componente de interés en la hoja. Los médicos europeos y norteamericanos luego abusaron de la cocaína, introduciendo a mucha gente a crear las bases para su abuso. Con la criminalización de la cocaína, apareció un vasto mercado negro de la droga, que ha causado mucha miseria en los países productores. El paso final y más absurdo en esta cadena de pensamiento y acción erróneos, es la conclusión de que la planta de coca es responsable de todo este problema, y- por lo tanto, debe ser erradicada (Weil, 2013).

Adicionalmente, diversos estudios poco rigurosos buscaron en su momento desprestigiar la hoja de coca, como los citados por Cáceres (2013): “El cocainismo y la raza indígena” (La crónica médica, 15-7-1913) del Dr. Hermilio Valdizán quien afirmó que el acullico es una “intoxicación crónica”, así como

“La coca. La gran toxicomanía peruana” del Dr. Luis N. Sáenz en los años treinta. Sólo quedaba por demostrar el daño a la salud producido por el coqueo, tarea a la que se dedicó el Dr. Carlos Gutiérrez Noriega en los años 40. La publicación en el Mercurio Peruano “Disertación sobre el aspecto, cultivo, comercio y virtudes de la famosa planta del Perú nombrada Coca” del Dr. Hipólito Unanue fue reducida en su momento a un mero “estudio agronómico”. A pesar de todos estos antecedentes, hasta el día de hoy, no existe ninguna investigación científica rigurosa que pruebe la relación entre la hoja de coca y la toxicomanía.

Por otro lado, cerca de 25 millones de mujeres premenopáusicas del mundo entero entran cada año a la etapa menopáusica. La osteoporosis es una enfermedad que afecta a más del 30% de mujeres con menopausia. Esto evidencia claramente la magnitud del problema, y la manera como se verán afectadas las condiciones de salud y calidad de vida de estas mujeres en las próximas décadas (Chalco, 2011). La pérdida de masa ósea es más frecuente en las mujeres, y se acelera al cesar la producción estrogénica. (Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia, 2004).

Actualmente existe un elevado interés en la recomendación no farmacológica para la atenuación de la pérdida ósea en mujeres posmenopáusicas. Esto se debe principalmente a los resultados obtenidos en estudios a gran escala sobre los efectos adversos del reemplazo hormonal, terapia relacionada con un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular y cáncer de mama (Bonjour y otros, 2008).

En el Perú, las mujeres representan el 50,2% de los adultos de 45 años a más (INEI, Compendio Estadístico Perú , 2014), población numerosa para la que se debe seguir desarrollando medidas de prevención y tratamiento alternativos contra la pérdida ósea. El sistema de salud ofrece diversas medidas, sin embargo, algunos tratamientos convencionales pueden producir efectos colaterales (Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia, 2004), lo cual disminuye la adherencia al tratamiento y el fracaso terapéutico.

En esta búsqueda de alternativas para los problemas de salud de las mujeres posmenopáusicas, se ha venido promoviendo la investigación de los aportes nutracéuticos en diferentes plantas tales como la maca, la uña de gato, el aguaje, entre otras. La hoja de coca es una de ellas.

1.2 Formulación del problema

¿El consumo de la hoja de coca pulverizada modifica los marcadores bioquímicos de recambio óseo en mujeres postmenopáusicas?

1.3 Justificación de la Investigación

Debido a la alta tasa de personas con osteoporosis a nivel mundial, es necesario buscar alternativas de solución con medidas preventivas y correctivas. El Perú es un país con una gran biodiversidad en plantas y alimentos, entre ellos ha destacado históricamente el consumo de la hoja de coca como alimento y medicina.

En 100 g de hoja seca se encuentran 1 011,67 (Penny y otros, 2009) – 2 196 mg de calcio (Collazos, Urquieta, & Alvistur, 1965). Adicionalmente, presenta un contenido importante de compuestos bioactivos tales como polifenoles (3 780 mg AG/100 g) (Penny y otros, 2009) y β carotenos (11 000 UI); y una gran capacidad antioxidante (Documet, 2004). Esto último, podría ser una de las explicaciones de sus beneficios potenciales para mejorar el metabolismo óseo mediante la reducción de la toxicidad celular y marcadores pro-inflamatorios (IL6, TNF), mejorando la actividad de los osteoblastos (Nash & Ward, 2016).

El consumo de coca en la ciudad de Lima se ha incrementado en los últimos años debido a que se le atribuyen múltiples propiedades a favor de la salud.

Una encuesta realizada a 8 193 viviendas de los 24 departamentos del Perú reveló que la hoja de coca adquirida en el año 2 013 ascendió a 10 728 toneladas, lo que representa un incremento del 22,1% respecto al año 2 003 que fue de 8 787 toneladas. También menciona que el 53,9% de la población de Lima Metropolitana que adquiere hoja de coca son mujeres, que el 12,3% de los encuestados la consumen en forma de hoja molida y que el 45,4% de las personas adultas que creen que sí se debería *chacchar* hoja de coca, considera que es medicina (INEI, Encuesta nacional de hogares sobre consumo de Hoja de Coca 2013, 2013).

Este tipo de estudio con pulverizado de hoja de coca no se ha realizado anteriormente en el Perú, por lo que resulta relevante científicamente debido a su contribución a la salud pública nacional proporcionando una alternativa para la prevención y tratamiento de osteoporosis sin los efectos colaterales de los métodos farmacológicos, por alentar el interés en nuevas investigaciones sobre los beneficios de la hoja coca en la salud y promover el desarrollo de nuevos derivados alimenticios y farmacológicos de la hoja de coca.

1.4 Objetivos de la Investigación

1.4.1 Objetivo General

Evaluar el efecto del consumo de hoja de *Erythroxylum coca* (coca) pulverizada en marcadores bioquímicos de recambio óseo en mujeres postmenopáusicas.

1.4.2 Objetivos específicos

1. Analizar los marcadores bioquímicos de resorción ósea antes, durante y después de la dieta enriquecida con hoja de coca pulverizada.
2. Analizar los marcadores bioquímicos de formación ósea antes, durante y después de la dieta enriquecida con hoja de coca pulverizada.
3. Estimar el contenido de polifenoles, flavonoides y capacidad antioxidante de la hoja de coca pulverizada.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Estudios de investigación de la *Erythroxylum coca*

Hasta el momento no existe ninguna publicación que haya evaluado el efecto del consumo de la hoja de coca en el metabolismo óseo. Sin embargo, se han investigado otras propiedades de la hoja, con importantes resultados.

Ramos Aliaga (1988), afirma que los estudios hechos en humanos y animales, favorecen el punto de vista de que, el uso de la hoja de coca -principalmente por su contenido en cocaína y posiblemente, también, en otros componentes, cuyas propiedades no están suficientemente estudiados- ocasiona, respuestas fisiológicas importantes en la adaptación del hombre al medio ambiente y condiciones de vida en los Andes.

Existen evidencias de la no toxicidad del consumo de la hoja de coca, entre ellas su consumo por más de 300 generaciones. Ramos Aliaga (1987), menciona que el doctor Monge establecía que no había signos de toxicomanía ni síndrome clínico apreciable en el hombre que dejaba el hábito y, que la cocaína en la sangre de los habituados era ínfima. También anotaba que, hay millares de conscriptos que dejaban inmediatamente el hábito, al enrolarse al Ejército y que, en la costa, dejan también ese hábito, al cambiar el trabajo agrícola por el servicio doméstico.

La hoja de coca viene siendo investigada desde hace varias décadas. A pesar de que la información acerca de los beneficios en sus diversas formas de

consumo es aún escasa, lo investigado da indicios importantes de su potencial favorable para la salud humana.

Gonzales y otros (2013), concluyeron que la administración del extracto etanólico de hoja de coca tuvo un efecto terapéutico sobre la anemia ferropénica inducida en ratas macho Holtzman, sustentado por el incremento en los niveles de hemoglobina.

En la tesis "Determinación de la actividad antioxidante el extracto refinado atomizado desalcaloinizado de coca en un modelo experimental de ejercicio extenuante", Velásquez (2005) concluye que la administración de ese extracto participa en la respuesta antioxidante frente a una situación de estrés agudo promoviendo una respuesta inmediata antioxidante. Esto se ve principalmente en el incremento de la actividad de superóxido dismutasa (SOD) y en la disminución del grado de peroxidación lipídica. No se observó variación de la glutatión debido probablemente, a la respuesta inmediata que presentó la SOD para combatir el estrés.

Se ha demostrado que disminuye los daños estructurales y funcionales del hígado luego de un deterioro inducido con ingesta de etanol. También se han obtenido resultados positivos en la disminución parcial o total de la lipoperoxidación microsomal hepática (Ramos Aliaga, 2006).

En un reporte clínico Bolo y Ocampo (2004), presentaron el efecto del mate de coca como antidepresivo natural en 8 casos clínicos con diagnóstico de episodio depresivo leve y moderado, realizado en el Consultorio de Medicina Alternativa del Hospital de Apoyo San José, Callao - Perú. Mencionan que a las tres semanas hubo una disminución del puntaje del inventario de Beck, evidenciando que el mate de coca produciría efectos antidepresivos. Los pacientes respondieron positivamente desde la primera semana, disminuyendo el puntaje en el transcurso de tres semanas y evidenciando mejoría clínica. La caída del puntaje del inventario de Beck para el estado depresivo de 23,3 a 7,5 (estado no depresivo). Finalmente, recomendaron realizar un estudio clínico prospectivo con diseño de caso control para demostrar cuantitativamente el efecto del mate de coca sobre la depresión,

sugiriendo que la dosis sea de un sobre filtrante de mate de coca, en una taza de 200 cm³, por cinco minutos de infusión, tres veces al día, después de las comidas y por espacio mínimo de un mes.

Otros estudios en relación al hábito de la masticación de la hoja de coca o coqueo en los Andes utilizando el modelo de la administración crónica del alcaloide con la dieta en ratas, muestran en cambio, una buena tolerancia de este animal al alcaloide así administrado y la presencia en el cuerpo y el hígado de respuestas adaptativas y/o de ajuste favorables al organismo, según su estado nutricional (Ramos Aliaga, 2005).

Se conoce que la cocaína inhibe algunos aspectos del metabolismo oxidativo (fermentación de la glucosa, respiración celular, descarboxilación del piruvato, utilización del acetato en el ciclo de Krebs) y la síntesis del glutamato, aspartato y otros aminoácidos por transaminación, en ciertos organismos y/o sistemas celulares como levadura, langosta de mar, paloma, rata. (Ramos Aliaga, 2005).

Hay evidencias de que la cocaína previene la acumulación de lípidos en el hígado y en los animales mal nutridos. Los resultados indican que el efecto preventivo de la cocaína, se debería, al menos en parte, a una remoción de los triglicéridos hepáticos como las lipoproteínas de muy baja densidad ó VLDL (Ramos Aliaga, 1988)

En “Connotaciones metabólicas y fisiológicas del uso de la cocaína en animales de experimentación y su relación con el cocaísmo”, Ramos Aliaga (1987) afirma que aparte de las propiedades farmacológicas de la hoja de coca, ella tiene también un valor nutritivo que en las condiciones en que se practica el hábito, llegaría a ser muy importante.

2.2 Bases Teóricas

2.2.1 *Erythroxylum coca* (coca)

2.2.1.1 Aspectos Botánicos. La planta de coca es originaria de América del Sur, principalmente de Perú, Bolivia, Chile, Ecuador y Colombia. Es una planta de hoja perenne. El género *Erythroxylum* está formado por unas 250 especies (Documet, 2004). Esta misma autora señala que las especies: *E coca* Lam., (en el sur y centro del Perú, principalmente en Huánuco y Cusco) y la *E novogranatense* (en el norte del país, sobretodo en La Libertad), son las dos especies más cultivadas en el Perú.

A partir de ellas se han desarrollado, bajo la influencia del ambiente, diversas variedades cultivadas. Así, dentro de la especie *E coca* Lam., se han formado cuatro cultivares diferentes: la *E coca cv lambran* en el Cusco, (denominada comúnmente “Coca Cusco”), y tres más en Huánuco: *E coca cv. mollecoca*, *E coca cv. fusiforme* y *E coca ovoide*. De la coca norteña *E novogranatense*, se ha desarrollado el cultivar *E novogranatense cv. truxillense* conocida como “Hoja de Coca Trujillo”.

2.2.1.2 Clasificación Taxonómica. Según Documet Forger (2004), la hoja de coca tiene la siguiente clasificación sistemática:

| | |
|---------------|--------------------------|
| Reino | Plantae |
| División | Fanerógamas |
| Subdivisión | Angiospermae |
| Orden | Malpighiales |
| Familia | Erythroxylaceae |
| Género | Erythroxylon |
| Especie | <i>Erythroxylum coca</i> |
| Nombre vulgar | “coca”, “kuka” |

2.2.1.3 Aspectos nutricionales de la hoja de coca. La hoja de coca es una hortaliza arbustiva con propiedades nutricionales y medicinales particulares y excepcionales. Son cuatro las formas tradicionales de consumo que han sido registradas:

Hoja Seca en infusión

Tradicionalmente usada como digestivo. También se ha comprobado su efecto estimulante hirviendo la hoja unos minutos, logrando extraerle una importante cantidad del alcaloide cocaína. Llosa Rojas (2002), llegó a extraer hasta 5,88 mg/g de este estimulante en quince minutos de hervido.

Hoja seca molida o pulverizada

Permite el consumo de la hoja en su totalidad, que incluye su importante fibra dietaria, antioxidantes y nutrientes concentrados como todo alimento deshidratado (Trigo, 2013).

Algunos cronistas dejaron constancia de este consumo: Martín de Morua dice "...esta coca lo tienen para sus contentos (sic) y regalos y la mascan y la comen...". Juan Betanzos relata que el Inca Yupanqui mandaba hacer bebida con agua y "coca molida y desmenuzada". Bernabé Cobo refiere que "los polvos de coca tomados de ordinario... son contra el asma o ronquera de pecho" (Hurtado Fuertes, 2006).

Henman (2005), da cuenta de la costumbre ancestral de consumo de harina de coca por la población del Cauca colombiano; así mismo, las etnias amazónicas Witoto y Bora que se encuentran en el río Putumayo y los Makú; y todos los del grupo lingüístico Tukano que se encuentran en el río Vaupés.

A nivel urbano, en una encuesta a 62 personas consumidoras de hoja de coca en la ciudad de Lima, se observó que la forma en que más se la consume es en harina (hoja pulverizada). Se la ingiere en promedio de 2 cucharaditas diarias directamente con agua en ayunas o integrada al desayuno y almuerzo (Trigo, 2013). Actualmente se comercializa la hoja molida pura embolsada, en cápsulas y pastillas; repostería y panificación.

Se ha encontrado un significativo contenido de polifenoles en 8 muestras de pulverizado de coca de diferentes regiones de Perú, dando un promedio de $3\ 780,00 \pm 340,00$ mg AG/100 g. Además, representa una fuente potencial de fibra dietaria insoluble ya que contiene $38,02 \pm 1,86$ g/100 g ms Penny y otros (2009).

En la Tabla 1 se detallan los diversos nutrientes presentes en la hoja de coca molida. Destaca en calcio y fibra funcional, así como en hierro, zinc y magnesio; importantes cofactores de enzimas antioxidantes.

La Tabla 2 muestra el contenido de algunos alcaloides, donde la cocaína sobresale con respecto a los otros. Se conoce que la presencia de este alcaloide tiene un efecto inhibitorio sobre el metabolismo oxidativo del piruvato y el acetato en el hígado e inhibe significativamente las actividades de las enzimas indicadoras de daño hepático, glutámico-oxalacético transaminasa (TGO) y glutámico-pirúvico transaminasa (TGP) en ratas bien nutridas (Ramos Aliaga, 2005).

Hay evidencias de que la cocaína previene la acumulación de lípidos en el hígado y en los animales mal nutridos (Ramos Aliaga, 1988).

Tabla 1. Contenido promedio de nutrientes en muestras de hoja de coca pulverizada

| | Contenido (mg/ 100 g peso seco) |
|-----------------|---------------------------------|
| Calcio | 1 011,67 |
| Hierro | 29,16 |
| Zinc | 2,67 |
| Magnesio | 210,95 |
| | Contenido (g/ 100g peso seco) |
| Fibra insoluble | 38,02 |
| Fibra soluble | 2,83 |
| Fibra cruda | 15,46 |
| Acido oxálico | 2,09 |
| Ácido fítico | 0,29 |
| Grasa | 6,12 |
| Cenizas | 5,65 |
| Proteína | 20,28 |
| Polifenoles | 3,78 ^a |
| Energía | 346,23 ^b |

Fuente. Penny y otros (2009)

^a g AG/ 100 g peso seco

^b kcal/ 100 g peso seco

Tabla 2. Contenido de alcaloides del pulverizado de hoja de coca

| | Contenido (g/ 100g peso seco) |
|--------------------------------|-------------------------------|
| Éster metílico anhidroecgonina | 0,02 |
| Éster metílico ecgonina | 0,18 |
| Cocaína | 0,56 |
| Trans-cinnamoilcocaina | 0,04 |
| Cis-cinnamoilcocaina | 0,07 |

Fuente. Penny y otros (2009)

El pulverizado de coca contiene aminoácidos esenciales y no esenciales (ver Tabla 3), estos valores demuestran que este alimento, a pesar de ser un vegetal, sobrepasa los patrones de requerimiento de aminoácidos en niños. El único aminoácido limitante es la lisina. Las proteínas de la coca se podrían completar mezclándola con otros alimentos como la kiwicha o quinua.

Tabla 3. Contenido de aminoácidos de la hoja de coca

| Aminoácido | Contenido de AA (g/100g de hoja seca) ^a | Contenido de AA (mg/ g de proteína) ^b | Patrón de requerimiento de AA en niños (mg/ g de proteína requerida) ^c | Comparación con respecto al patrón ^d |
|-------------------------|--|--|---|---|
| Histidina | 0,418 ± 0,040 | 20,611 | 18 | 1,145 |
| Isoleucina | 0,728 ± 0,072 | 35,897 | 25 | 1,436 |
| Leucina | 1,323 ± 0,147 | 65,237 | 55 | 1,186 |
| Lisina | 0,801 ± 0,095 | 39,497 | 51 | 0,774 |
| Metionina | 0,337 ± 0,036 | 16,617 | | |
| Cisteína | 0,200 ± 0,020 | 9,862 | | |
| Metionina + Cisteína | 0,537 ± 0,057 | 26,479 | 25 | 1,103 |
| Fenilalanina | 0,790 ± 0,094 | 38,955 | | |
| Tirosina | 0,570 ± 0,073 | 28,107 | | |
| Fenilalanina + Tirosina | 1.360 ± 0,167 | 67,061 | 47 | 1,427 |
| Treonina | 0,711 ± 0,076 | 35,059 | 27 | 1,298 |
| Triptófano | 0,265 ± 0,034 | 13,067 | 7 | 1,867 |
| Valina | 0,902 ± 0,096 | 44,477 | 32 | 1,390 |

Fuente. Penny y otros (2009)

^a Promedio de 8 muestras, concentración de AA en 100 g de polvo de hoja de coca.

^b Promedio de 8 muestras, AA mg/ g proteína.

^c Patrón de requerimiento de AA en niños de 3 a 10 años del Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine (FNB/IOM).

^d Cantidad de AA en 1 g de proteína (mg)/ patrón de requerimiento de proteína en niños (mg).

Hoja Fresca

Según Trigo Pesaque (2013) la hoja tierna y cruda, consumida como verdura en ensaladas, cremas, extractos y *picchado* permite aprovechar su proteína integral, clorofila, antioxidantes, vitamina C. En zonas productoras ecológicas, los agricultores las comen directamente de la planta. Es una costumbre ancestral, tal como lo revela el jesuita español Antonio Julián: "... los guajiros lo usan... las hojas no tostadas ni secas, sino frescas, verdes y hermosas..."

Hoja Seca para Picchar, Acullicar, Masticar

En 1965, Collazos y otros publicaron los resultados del primer estudio de asimilación de nutrientes a través del picchado de la hoja de coca y concluyó que en cuatro horas de picchado, la vitamina A se asimila en un 52%, la vitamina B1 se asimila al 100% y la vitamina B2 entre 28 y 46%.

Producción de Hoja de Coca

Se cultiva en diversas zonas del país y su evolución ha sido diferente en cada región (ver Figura N 1).

Existe una alta disponibilidad de hoja de coca en el Perú. Mientras en el año 2 000 se estimó un rendimiento de 1 500 kilos de hoja seca por hectárea, en el 2 010 da cuenta de una cosecha de 2 500 kilos, lo cual representa un vertiginoso aumento de 66% en el período de 10 años (Diario La República, 2012).

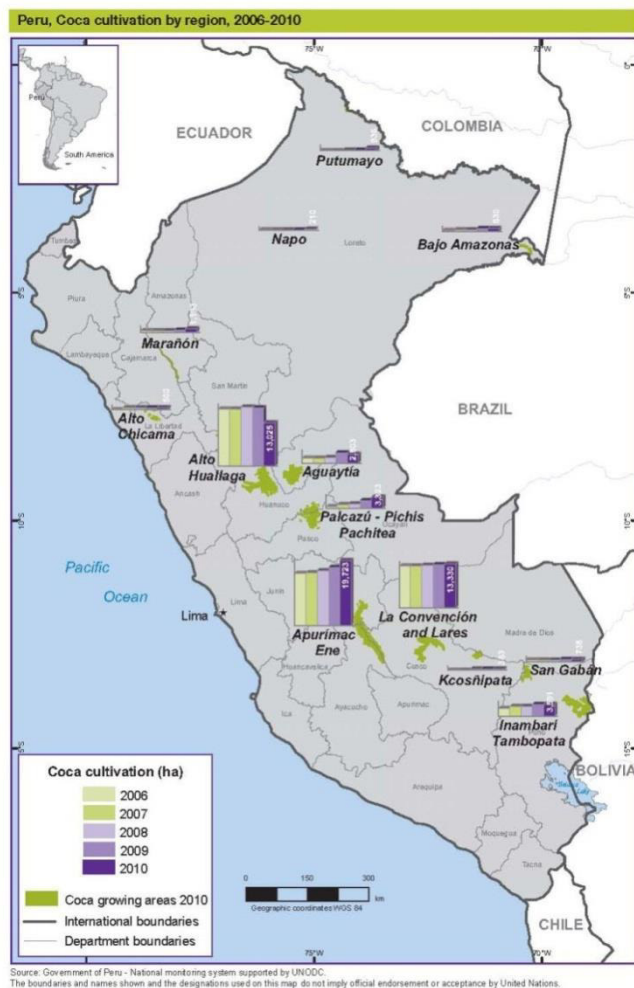


Figura 1. Cultivo de hoja de coca por regiones en el Perú (2006-2010).
Fuente. Datos tomados de Vásquez Bazán (2012).

2.2.2 Tejido Óseo

Es una forma especializada de tejido conjuntivo que se caracteriza por su rigidez y su gran resistencia tanto a la tracción, como a la compresión. Debido a la rigidez, el hueso puede realizar las funciones de soporte y protección, ofreciendo resistencia a la deformación y a la fractura. Está formado por células y material extracelular calcificado (matriz ósea) (Riancho Moral & González Macías, 2004).

El hueso desempeña una función biomecánica (apoyo, articulación y lugar de inserción muscular y ligamentosa), una protectora (órganos vitales y sistema

nervioso central) y otra metabólica (reserva de iones, tales como calcio y fosfato).

Es un tejido conectivo que consiste esencialmente en una matriz extracelular mineralizada y células especializadas: osteoblastos, osteocitos y osteoclastos.

El principal componente orgánico de la matriz es el colágeno tipo I, que supone alrededor del 90%; el 10% restante lo componen una serie de proteínas no estructurales de menor tamaño, entre las que se encuentran la osteocalcina, algunas fosfoproteínas, sialoproteínas, factores de crecimiento y proteínas séricas. La fase inorgánica está compuesta por minúsculos cristales de un mineral de carácter alcalino, la hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ (Riancho Moral & González Macías, 2004). Estos cristales se incrustan entre las fibras de colágeno para formar un material que reúne las características adecuadas de rigidez, flexibilidad y resistencia.

Durante la vida adulta, el esqueleto experimenta un proceso continuo de reparación y renovación. Ese remodelado del hueso se lleva a cabo en las superficies del mismo.

La matriz mineralizada es reabsorbida por los osteoclastos y después sustituida por capas concéntricas o laminillas de hueso nuevo formadas por la acción de grupos de osteoblastos. Esta secuencia de fenómenos está estrechamente coordinada, en el tiempo y el espacio. En circunstancias normales, en los individuos jóvenes el remodelado mantiene la masa esquelética total prácticamente invariable. Sin embargo, con el envejecimiento, la menopausia o algunas enfermedades, se altera el balance de manera que la resorción predomina sobre la formación y se produce una pérdida neta de hueso que conduce a la osteoporosis. Ello puede deberse a una actividad osteoclástica aumentada a una disminución de la actividad osteoblástica. El hueso trabecular, como el de los cuerpos vertebrales, es especialmente sensible a las alteraciones del balance óseo, dado su rápido turnover (aproximadamente un 25% es renovado cada año) (Riancho Moral & González Macías, 2004).

La remodelación continua del hueso es importante porque de esta manera el hueso puede adaptar su resistencia al grado de tensión al que se encuentra sometido, también porque la forma del hueso puede cambiar de disposición para soportar adecuadamente las fuerzas mecánicas y para mantener la dureza normal del hueso ya que con el paso de los años, se vuelve relativamente frágil y débil, necesitando una nueva matriz orgánica (Guyton & Hall, 2009).

El calcio (Ca) es el mineral más importante en el metabolismo del hueso y su bajo consumo es uno de los factores de riesgo para la osteoporosis. El magnesio (Mg) es otro catión divalente que se encuentra comúnmente en asociación con Ca. En la superficie del intestino, Ca y Mg pueden competir entre sí por los sitios de absorción comunes (Riancho Moral & González Macías, 2004).

2.2.2.1 Matriz extracelular ósea. La matriz ósea es mucho más abundante que el componente celular. Está constituida principalmente por: matriz orgánica y sales minerales. Las propiedades biomecánicas del hueso derivan de la composición y la estructura de la matriz ósea. Las fibras colágenas proporcionan flexibilidad y resistencia a la tracción así como el componente mineral aporta dureza, rigidez y resistencia a la compresión (Fuentes Boquete, 2010).

a. Matriz orgánica

Está constituida por una red de fibras colágenas incluida en un material amorfo mucoproteico. El principal componente de la matriz orgánica es el colágeno tipo I, que representa alrededor del 95% del contenido total de colágeno y cerca del 90% del total de proteínas presentes en el hueso. El porcentaje restante corresponde a proteínas no colágenas.

Colágeno

La molécula de colágeno tipo I consiste en una triple hélice que contiene dos cadenas $\alpha 1$ idénticas y una cadena $\alpha 2$. Los colágenos tipo III y V están presentes en baja proporción y se cree que su papel es el de modular el diámetro de las fibras colágenas. Las características del tejido óseo dependen, en gran medida, del grado de organización de las fibras colágenas (Fuentes Boquete, 2010).

b. Componente inorgánico de la matriz

El componente mineral constituye el 50-70% del hueso; el agua sólo el 5-10%. La elevada presencia de sales minerales aporta dureza, rigidez y resistencia a la compresión. El componente inorgánico de la matriz ósea es mayoritariamente fosfato cálcico en forma de cristales de hidroxapatita que se disponen sobre las fibras de colágeno.

2.2.2.2 Componente celular del tejido óseo. El tejido óseo comprende cuatro tipos de células especializadas: osteoblastos, osteoclastos, osteocitos y células de superficie.

Osteoblastos

Se caracterizan por una elevada actividad en la síntesis y la secreción de componentes orgánicos de la matriz ósea, por lo que tienen muy bien desarrollados el retículo endoplasmático rugoso y el aparato de Golgi. Además, producen abundantemente la enzima fosfatasa alcalina, que participa en la mineralización de la matriz orgánica liberando fosfato inorgánico.

Se encuentran en las superficies externas de los huesos y en las cavidades óseas. En todos los huesos vivos existe un pequeño grado de actividad osteoblástica (aproximadamente el 4% de todas las superficies óseas del adulto en cualquier momento), de forma que por lo menos algo de hueso nuevo se está formando siempre (Guyton & Hall, 2009).

Osteocitos

Se constituye cuando el osteoblasto está completamente rodeado de matriz ósea mineralizada. Representa menos del 1% del volumen total de la matriz ósea.

Establece una red de conexiones entre los osteocitos, con los osteoblastos periósticos y endósticos, pero no a los osteoclastos. Este sistema de conexiones permite la transmisión de nutrientes y, como los osteocitos son considerados células mecano-sensoriales del hueso, es crítico para la respuesta del osteoblasto al estímulo físico.

Osteoclastos

Son células fagocitarias, grandes, multinucleadas (hasta 50 núcleos), móviles y con capacidad de resorción ósea. En el adulto, la actividad de los osteoclastos afecta a menos del 1% de las superficies óseas.

2.2.3 Absorción intestinal del Calcio

Gil Hernández (2010), refiere que los iones de calcio se absorben hacia la sangre de manera activa, sobre todo en el duodeno. Esta absorción es controlada por varios mecanismos para cubrir las necesidades diarias orgánicas.

La absorción neta de calcio es resultado del balance entre la absorción intestinal de calcio vía transcelular y paracelular, y la secreción de calcio por diferentes órganos en el intestino. El transporte neto intestinal de calcio está determinado por la disponibilidad de este ión en la dieta, por su solubilidad en el intestino y por la capacidad neta de absorción intestinal.

El transporte paracelular de calcio es un proceso pasivo no saturable, que depende de la concentración luminal de calcio y de la integridad de las uniones comunicantes intercelulares.

El transporte transcelular de calcio es un proceso saturable, funcionalmente importante en condiciones de baja ingesta o deficiencia de calcio. Se produce principalmente en el duodeno y consta de tres fases:

- a. La entrada de calcio a través de la membrana del borde en cepillo mediante canales de calcio específicos.
- b. El transporte intracelular, y
- c. La salida del calcio hacia el torrente sanguíneo en la cara basolateral.

El calcitriol, que es la forma activa de la vitamina D, es el principal factor que controla la absorción intestinal de calcio, actuando sobre las tres fases.

Adicionalmente está la calbindina, proteína que se une directamente al calcio y actúa como su transportador intracelular, haciéndolo llegar a la membrana basolateral, desde donde es expulsado al exterior mediante transporte activo. Se encarga de mantener los niveles de calcio intracelular bajos, contribuyendo a incrementar la captación a nivel apical (Gil Hernández, 2010). La relación entre calcitriol y la producción de calbindina es una medida directa de la deficiencia o suficiencia de vitamina D.

La salida de calcio a través de la membrana basolateral del epitelio intestinal es un proceso activo (en contra del gradiente electroquímico) mediado por dos transportadores de calcio: la bomba de calcio de la membrana plasmática, que es una ATPasa, y un intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ denominado NCX. Este último es responsable del 20% del calcio expulsado a través de la membrana basolateral (Gil Hernández, 2010).

2.2.3.1 Balance general del calcio. La concentración de calcio en el líquido extracelular está regulada y sólo en situaciones infrecuentes varía más allá de un pequeño porcentaje respecto a su valor normal de aproximadamente 9,4 mg/dL. Este control preciso es esencial ya que este el calcio desempeña un papel clave en muchos procesos fisiológicos como la contracción del músculo esquelético, cardíaco y liso, la coagulación de la sangre y la transmisión de impulsos nerviosos.

Los huesos almacenan el 99% del calcio corporal, por lo que pueden actuar como grandes reservorios, liberando calcio cuando disminuye su concentración en el líquido extracelular y almacenándolo en situaciones de exceso (Guyton & Hall, 2009).

El calcio existe en el plasma en tres formas:

- a. Aproximadamente el 41% (1 mmol/L) circula combinado con proteínas plasmáticas y en esa forma no se difunde a través de membranas capilares.
- b. Alrededor del 9% del calcio (0,2 mmol/L) se difunde a través de las membranas capilares, pero está combinado con los aniones del plasma y los líquidos intersticiales (citrato, fosfato) de una forma no ionizada.
- c. El 50% restante de calcio plasmático difunde a través de las membranas capilares y está ionizado.

Este calcio iónico es la forma de calcio importante para la mayor parte de las funciones del mismo en el organismo, incluidos los efectos sobre el corazón y el sistema nervioso, así como la formación del hueso (Castelo Branco, 2009).

En el caso de que disminuya el calcio ingerido con la dieta, descenderá la absorción de calcio y bajará la concentración de calcio sérico. Ello estimulará la secreción de la Hormona Paratiroidea (PTH), que aumentará la resorción ósea, la reabsorción renal de calcio y la producción renal de calcitriol. Éste aumentará la absorción intestinal y reabsorción renal de calcio y en el hueso, favorecerá la acción resortiva de la PTH. El balance de entradas y salidas del organismo tendería a ser neutro, con estabilidad en los valores plasmáticos, pero a expensas de un balance negativo del hueso.

Fisiológicamente, hay circunstancias que tienden a un balance general positivo, como ocurre con la formación de tejido óseo, de ahí la necesidad de un incremento en el aporte dietético del calcio. En otras circunstancias hay tendencia aun balance negativo como en el embarazo (por los requerimientos fetales) o en la senectud, en que disminuye la capacidad absorptiva intestinal, disminuye la capacidad de formar vitamina D, etc., y se mantiene la estabilidad a expensas de perder masa ósea (Castelo Branco, 2009).

Los dos factores reguladores importantes de la absorción del calcio son la hormona paratiroidea, secretada por glándulas paratiroides, la calcitonina y la

vitamina D. La PTH activa la síntesis de vitamina D y ésta estimula la absorción de calcio.

Hormona Paratiroidea (PTH)

Constituye un importante mecanismo para el control de las concentraciones extracelulares de calcio.

Las variaciones de Ca plasmático actúan sobre el receptor localizado en las células paratiroideas y regulan la síntesis, secreción y degradación de la PTH.

Mínimos descensos inducen las acciones de la PTH en forma de:

- 1) Movilización del calcio esquelético hacia el plasma estimulando la resorción ósea (el mayor depósito de calcio del organismo es la hidroxiapatita);
- 2) Aumento de la resorción tubular de calcio y;
- 3) Incremento de la absorción intestinal por estímulo de la hidroxilación de 25(OH)D₃ a calcitriol en el túbulo renal. Con todo ello se eleva de nuevo la calcemia.

Además, contribuye al equilibrio ácido-básico compensando las acidosis metabólicas (Riancho Moral & González Macías, 2004).

Calcitonina

Es una hormona peptídica secretada por la glándula tiroides que tiende a reducir las concentraciones plasmáticas de calcio. Sus efectos se oponen a los de la PTH. Su papel regulador de concentración de iones de calcio es menor que el de la PTH.

La síntesis y la secreción de calcitonina tienen lugar en las células parafoliculares o células C de la tiroides (Guyton & Hall, 2009).

Vitamina D

Ejerce un potente efecto facilitador de la absorción de calcio en el tubo digestivo; también tiene importantes efectos en el depósito como en la resorción del hueso.

La forma activa de esta vitamina es el 1,25-dihidroxicolecalciferol, que tiene varios efectos en el intestino, riñones y huesos, incrementando la absorción de calcio y fosfato hacia el líquido extracelular (Guyton & Hall, 2009).

Cuando la concentración plasmática de calcio es mayor a la requerida, la formación de 1,25-dihidroxicolecalciferol disminuye. A su vez, esta menor formación reduce la absorción de calcio desde el intestino, los huesos y los túbulos renales, lo que hace que la concentración de calcio iónico descienda hacia su nivel normal.

2.2.4 Metabolismo del Calcio

Riancho y González (2004), refieren que el calcio es el catión más abundante del organismo. El 99% del calcio corporal total, unos 1 000 g en un adulto, se encuentra en la fase mineral del hueso en forma de cristales de hidroxapatita. En el plasma se encuentra en un 50% como calcio iónico libre, en un 10% ligado a aniones (citrato, bicarbonato) y en un 40% ligado a proteínas (fundamentalmente albúmina). El calcio iónico es la fracción biológicamente activa y puede sufrir variaciones importantes con cambios en el pH: en situaciones de acidosis disminuye su unión a proteínas y en alcalosis aumenta. La concentración de calcio citosólico es del orden de 10^{-6} M, frente a 10^{-3} M en el líquido extracelular.

Además del calcio, el fósforo y el magnesio también participan en numerosos e importantes procesos biológicos que se ha desarrollado un complejo sistema de regulación homeostática para mantener sus concentraciones séricas en unos límites muy estrechos.

El fósforo forma parte de los fosfolípidos de membrana, de los nucleótidos que conforman el ARN y el ADN, y también de los enlaces de alta energía de moléculas como ATP y GTP y segundos mensajeros (AMPc, GMPc); además,

puede actuar como regulador de diversas enzimas. Su mayor depósito es el esqueleto, donde junto al calcio es el mineral más abundante.

El magnesio se ha involucrado en el mecanismo de sensor del calcio de la PTH y, a través de la misma, participaría de la regulación del calcio, siendo la hipomagnesemia una de las causas de hipocalcemia.

Aunque en la regulación de la homeostasis mineral intervienen numerosos órganos y hormonas, los principales efectores son el intestino, el riñón y el hueso, sobre los que actúan las hormonas calciótropas PTH, vitamina D y calcitonina, modulando la absorción, eliminación y depósito de manera que se mantengan unos niveles séricos constantes. La interrelación entre el sistema hormonal y los niveles séricos de calcio, fósforo y magnesio son tan estrechas que, con frecuencia, la interpretación de los cambios debe ser realizada en conjunto para que tenga sentido fisiopatológico (Riancho Moral & González Macías, 2004).

2.2.5 Marcadores Bioquímicos de Recambio Óseo

Romero y otros (2012), afirman que una utilidad destacada de estos biomarcadores consiste en la posibilidad de identificar a las mujeres que van a presentar una tasa alta de pérdida de masa ósea en los años siguientes a la menopausia, con objeto de iniciar una estrategia preventiva de la osteoporosis. Como ya es conocido, la densitometría ósea es un importante predictor del riesgo de fractura, pero una sola medida no permite augurar la tasa de pérdida ósea. Diversos estudios han demostrado que los marcadores de recambio óseo pueden ser útiles en la determinación de la velocidad de pérdida ósea, ofreciendo un mayor poder predictivo los marcadores de resorción que los de formación.

Es necesario conocer la estabilidad del esqueleto y su relación directa con el manejo que hace el organismo con los constituyentes óseos, calcio y fósforo. Los marcadores que permiten tener índices de formación y resorción ósea ayudan a prevenir y descartar enfermedades como la osteoporosis (ver Tabla 4)

Los marcadores bioquímicos en los adultos pueden servir en el diagnóstico y predicción de la pérdida de masa ósea característica de la postmenopausia, también la monitorización del tratamiento con estrógenos y otros agentes inhibidores del tratamiento con hormona de crecimiento y las enfermedades metabólicas.

Las principales indicaciones que en la práctica clínica tienen estos marcadores, se detallan en la Tabla 5. En la actualidad, la indicación más difundida para su empleo la constituye el control de la eficacia terapéutica. La mayoría de las terapias para la osteoporosis son fármacos antirresortivos, cuyos potenciales cambios en la masa ósea no pueden ser evaluados por densitometría ósea antes del año de tratamiento. En cambio, los cambios en el nivel de los marcadores pueden ser apreciados ya a los 3 meses de tratamiento, al observarse una caída respecto al valor basal mayor que la variabilidad propia de cada marcador, lo que indica una respuesta terapéutica favorable (López, 1999).

Tabla 4. Marcadores Bioquímicos de Recambio Óseo

| MARCADORES BIOQUIMICOS DE RECAMBIO OSEO | |
|---|---|
| Formación | Resorción |
| <p>Suero</p> <ul style="list-style-type: none"> - Osteocalcina. - Fosfatasa alcalina: Total y Óseo específica - Propéptido C-terminal del protocógeno tipo I - Propéptido N-terminal del protocógeno tipo I | <p>Plasma</p> <ul style="list-style-type: none"> - Fosfatasa ácida tartrato resistente - Ácido gamma carboxiglutámico libre - β-Crosslaps - Telopéptido C-terminal del colágeno tipo I - Telopéptido N-terminal del colágeno tipo I <p>Orina</p> <ul style="list-style-type: none"> - Excreción urinaria de calcio - Hidroxiprolina - Telopéptido C-terminal del colágeno tipo I - Telopéptido N-terminal del colágeno tipo I - Piridinolina - Deoxipiridinolina - α-Crosslaps: telopéptido del colágeno |

Fuente. Datos tomados de Romero, Manrique & Rodríguez (2012)

Tabla 5: Principales indicaciones de los Marcadores Bioquímicos de Recambio Óseo

| INDICACIONES DE LOS MARCADORES BIOQUIMICOS DEL RECAMBIO OSEO EN OSTEOPOROSIS. |
|---|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. Control de eficacia terapéutica. 2. Selección de pacientes de alto riesgo de osteoporosis ("perdedoras rápidas"). 3. Predicción de fractura. 4. Selección de terapia (fármacos antirresortivos versus anabólicos, entre otros). |

Fuente. Datos tomados de López (1999)

Criterios de un marcador ideal de recambio óseo

La característica más crítica es que la prueba sea la menos invasiva posible, como ocurre en la colección de sangre u orina, y que permite una fácil medición en diferentes tiempos y frecuencias sin incomodar al paciente. Idealmente el analito a medir debería ser único para evaluar el recambio óseo, o el más específico para procesos osteoblásticos de formación o procesos osteoclásticos de resorción. Para ser válido el marcador debería:

1. Correlacionar con un estándar de referencia de actividad de recambio óseo.
2. Tener correlación con las medidas de los cambios de la masa ósea.
3. Responder apropiadamente después del tratamiento de enfermedades conocidas hacia efectos de formación o resorción ósea.

A diferencia de las mediciones localizadas de recambio óseo que reflejan la actividad de un sitio específico, los marcadores bioquímicos sistémicos, reflejarían un remodelamiento colectivo del esqueleto completo y no debe ser limitado a hueso cortical o trabecular. Los factores que afectan los niveles de

los marcadores, tales como edad, género, ritmo circadiano, dieta, función renal, actividad física y metabólica, drogas, etc. deber ser claramente definidos y apropiadamente ajustados siempre que sea posible (Calderón, Daga, & Méjico, 1998).

2.2.5.1 Marcadores Bioquímicos de Formación Ósea. Los marcadores para monitorear formación ósea son productos de osteoblastos. La fosfatasa alcalina es un marcador de la actividad enzimática de los osteoblastos, mientras la osteocalcina y el procolágeno son producidos y liberados por el osteoblasto durante la formación ósea (Villavicencio, 1994).

2.2.5.1.1 Osteocalcina. La osteocalcina o proteína GLA del hueso (BGP), es uno de los principales componentes de la matriz ósea sintetizada por los osteoblastos; es la proteína no colágena más abundante del hueso. No se conoce las funciones biológicas de la osteocalcina pero se cree que participa en la homeostasis del esqueleto regulando el depósito mineral o también en el recambio óseo.

Es un marcador específico de formación ósea, porque indica la producción de tejido óseo por los osteoblastos. La síntesis de la osteocalcina es dependiente tanto de la $1,25(\text{OH})_2\text{Vit D}$ como de la vitamina K. la vitamina D regula su expresión a nivel transcripcional y la vitamina K es el cofactor para la gammacarboxilación del glutamato; estos residuos permiten unirse a los cristales de hidroxiapatita en la matriz celular del hueso. Luego es incorporada a la matriz extracelular y una parte liberada a la circulación sanguínea donde podrá ser dosificada.

Los niveles de osteocalcina permiten distinguir la osteoporosis con alta remodelación de la con baja remodelación, permitiendo clasificar a las pacientes en perdedoras rápidas y perdedoras lentas de masa ósea. Por lo tanto, se pueden encontrar en los pacientes osteoporóticos niveles altos, bajos o normales de osteocalcina (Barba, 2011).

2.2.5.1.2 Fosfatasas Alcalinas. Se conocen cinco isoenzimas diferentes (hepática, renal, ósea, intestinal y placentaria). Las hepáticas y las óseas son las más abundantes y su diferencia estriba en su patrón de glucosilación. En el adulto con función hepática normal, aproximadamente 50% de la actividad de esta enzima deriva del hígado, mientras que 50% proviene del hueso. Esta enzima juega un papel muy importante en la mineralización y en la formación osteoide. Su fracción ósea es producida por el osteoblasto y puede ser medida mediante desnaturalización con calor, electroforesis, precipitación de lectina, inhibición selectiva y más recientemente por inmunoensayos (Barba, 2011).

Un real avance en cuanto a la separación cuantitativa de ambas isoformas se dio al usar anticuerpos monoclonales dirigidos a la isoforma ósea. Esta técnica mejoró significativamente la sensibilidad del marcador para evaluar el recambio óseo de la mujer postmenopáusica, respecto a la determinación de fosfatasas alcalinas totales. Sin embargo, el inmunoensayo para la isoforma ósea mantiene todavía una reactividad cruzada del 15 a 20% con la isoforma hepática, que limita su utilidad en presencia de daño hepático.

La actividad de Fosfatasa Alcalina Ósea aumenta con la edad en adultos, especialmente en mujeres después de la menopausia.

2.2.5.1.3 Péptidos de extensión del procolágeno 1. Temporalmente, justo antes de la conformación fibrilar del procolágeno 1, se produce el clivaje de sus extremos terminales, amínico y carboxílico, lo que libera péptidos que representan marcadores útiles de formación ósea, en consideración a que el colágeno es el componente orgánico más abundante de la matriz ósea. El péptido carboxílico desprendido (P1CP) se mide en sangre por radioinmunoensayo; experimenta aumento leve en la menopausia y disminuye con el uso de corticoides. Su metabolismo se desconoce y no siempre tiene correlación con otros marcadores de formación ósea, probablemente por las distintas formas inmunorreactivas circulantes. El péptido del extremo amínico (P1NP) está en concentraciones mayores que su homólogo P1CP (López, 1999).

Aproximadamente el 90 % de la matriz ósea sintetizada por los osteoblastos está compuesto por colágeno tipo 1, que es secretada como procolágeno con un gran dominio N terminal y C terminal.

Extracelularmente, el clivaje proteolítico de los dominios C y N terminal ocurre como un requisito para la síntesis correcta de las fibras de colágeno. La concentración en suero de estos propéptidos puede ser usado como un marcador de la síntesis de colágeno tipo 1.

El P1NP muestra cambios más dinámicos que el P1CP en respuesta a agentes que alteran el recambio óseo.

La medición del péptido aminoterminal tiene sensibilidad diagnóstica de 83%, especificidad de 64% y eficiencia diagnóstica de 73% (Barba, 2011).

2.2.5.2 Marcadores Bioquímicos de Resorción Ósea. En general, los marcadores de resorción ósea pueden estar separados en dos grupos, los primeros son marcadores de la función de osteoclastos, mientras que el segundo grupo consiste en productos de degradación de la matriz ósea. El marcador del primer grupo es la fosfatasa ácida tartrato resistente y del segundo grupo son la hidroxiprolina, galactosilhidroxilisina, piridinolina/deoxipiridinolina y el *cross-link* telopéptidos de colágeno tipo 1 (Barba, 2011).

2.2.5.2.1 Fosfatasa ácida tartrato resistente. Son un grupo de enzimas lisosomales, con seis isoenzimas conocidas, entre ellas destaca el tipo 5; la cual es resistente a la inhibición por tartrato y se encuentra en hueso, bazo, placenta, macrófagos, pulmones y piel. Existe en dos subisoformas denominadas 5a y 5b, aunque solamente 5b ha mostrado ser característica de los osteoclastos (Barba, 2011).

2.2.5.2.2 Hidroxiprolina. La hidroxiprolina constituye aproximadamente el 13% del contenido en amino ácidos del colágeno. Gran parte de la hidroxiprolina eliminada deriva del colágeno y sólo una pequeña parte de otros tejidos. Por lo tanto una excreción elevada refleja enfermedades que afectan

al tejido conectivo, los huesos y el crecimiento óseo activo en los niños, y un descenso en la eliminación indica deficiencia del desarrollo del colágeno. La hidroxiprolina es metabolizada en el hígado luego transferida a la circulación renal libre, conjugada o formando proteínas, siendo en la primera forma reabsorbida casi en su totalidad por los túbulos renales y excretada en un 5% -10% a la orina. El 90% restante lo hace como hidroxiprolina conjugada unida a pequeños péptidos dializables y el resto asociado a péptidos mayores, no dializables.

La hidroxiprolina liberada durante la degradación del colágeno no es reutilizada para la síntesis de colágeno, por lo que ha sido empleada como marcador de la resorción ósea (Barba, 2011).

2.2.5.2.3 Piridinolinas. Son compuestos derivados de lisina o hidroxilisina que ligan cadenas del colágeno maduro (cross-link), de modo que estas conexiones estabilizan la molécula. Se distinguen la piridinolina (Pyr) propiamente tal (o hidroxilisilpiridinolina, HP), y la deoxipiridinolina (D-Pyr) (o lisilpiridinolina, LP). Estas ligaduras de estabilización, en base a lisina o hidroxilisina, son propias de las moléculas de colágeno y de elastina.

Las piridinolinas no son reutilizadas en la síntesis de colágeno y tampoco son metabolizadas in vivo, excretándose en la orina en forma libre (40%) o ligada a péptidos (60%). Dado que no se absorben por vía intestinal, su medición no requiere precauciones dietéticas (López, 1999).

2.2.5.2.4 Péptidos del Cross link ó Telopéptidos. En el proceso de resorción, los fragmentos carboxi y aminoterminal del colágeno son liberados. Tanto los telopéptidos N y C (conocidas como moléculas NTX y CTX) son excretados en la orina (Barba, 2011).

Los incrementos significativos durante la menopausia indican que son marcadores sensibles de los cambios metabólicos del hueso. Se ha demostrado una correlación significativa con la densitometría ósea en mujeres posmenopáusicas, por lo que, actualmente, CTX y NTX se consideran los marcadores de resorción ósea más útiles en la práctica clínica. Su especificidad es de 80% y su sensibilidad de 70% (Eastell y otros, 2000).

En resumen, los marcadores de resorción más utilizados actualmente son las piridinolinas y los telopéptidos del Cross link, especialmente NTX1. Sin embargo, si no se dispone de ellos y se cuenta con la técnica fidedigna de hidroxiprolina, y considerando los resguardos dietéticos necesarios, la medición de este aminoácido conserva valor de diagnóstico y pronóstico.

2.2.6 Menopausia

Se refiere a la fecha de la última regla en la cual, de forma variable, el ovario deja progresivamente de producir hormonas, al transcurrir 12 meses consecutivos de amenorrea sin causa aparente.

La edad de presentación de la menopausia espontánea es entre los 45 y 55 años, con una media en torno a los 50-51 años. Algunas mujeres presentan síntomas que no son una amenaza grave para la salud, pero pueden resultar molestos y en ocasiones limitan la actividad (Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia, 2004). Es un proceso crónico que se desarrolla con la edad y que está relacionada con diversas enfermedades e influenciada por factores hereditarios, ambientales y de estilo de vida.

Según la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (2004), inicialmente el ritmo de pérdida aumenta en la perimenopausia y en los primeros años después de la menopausia, para posteriormente disminuir e igualarse al de

los varones. El ritmo de pérdida de masa ósea en los primeros años de la postmenopausia varía de forma importante. En la gran mayoría de las mujeres, este ritmo de pérdida regresa a niveles similares a los años previos al climaterio. La edad y el tiempo transcurrido desde el inicio de la menopausia son los predictores más importantes de la disminución de la densidad mineral ósea (DMO).

La masa ósea que posee una persona en un momento concreto depende de la que llegó a tener al completar su desarrollo y de las pérdidas sufridas posteriormente. Se considera que en la producción del valor máximo de masa ósea los factores implicados más importantes son los genéticos. En cambio, en la velocidad de pérdida de masa ósea los factores genéticos parecen tener menor importancia que los adquiridos (Riancho Moral & González Macías, 2004).

La osteoporosis es una enfermedad sistémica del esqueleto caracterizada por una baja masa ósea y alteraciones de la micro arquitectura del tejido óseo, con una disminución de la resistencia del hueso y un incremento de la fragilidad y de la susceptibilidad de fractura.

2.2.7 Polifenoles

Los polifenoles son el grupo más extenso de sustancias no energéticas presentes en los alimentos de origen vegetal. La capacidad de los polifenoles para modular la actividad de diferentes enzimas e interferir consecuentemente en mecanismos de señalización y en distintos procesos celulares, puede deberse las características fisicoquímicas de estos compuestos, que les permiten participar en distintas reacciones metabólicas celulares de óxido-reducción.

Tomás Barberán (2003), afirma que desde el punto de vista de su actividad biológica, muchos polifenoles tienen propiedades captadoras de radicales libres, lo que les confiere actividad antioxidante, que podría estar relacionada con la prevención de enfermedades cardiovasculares y de algunos tipos de

cáncer. Existen también sustancias con actividad estrogénica (fitoestrógenos), como las isoflavonas, los lignanos y el estilbeno resveratrol, mientras que otros, como los taninos, son capaces de fijar metales y proteínas, lo que afecta a la biodisponibilidad de éstos y puede estar en el origen de algunos efectos inespecíficos (por ejemplo, antimicrobianos), o prevención de enfermedades neurodegenerativas

Existen varias clases y subclases de polifenoles que se definen en función del número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que presentan estos anillos. Los principales grupos son: ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides (Quiñones, M; Miguel, M; Aleixandre, A;, 2012).

La mayoría de los polifenoles están presentes en los alimentos como ésteres, glucósidos o polímeros, formas que no se pueden absorber. Por ello, los polifenoles sufren diversas modificaciones durante el proceso de absorción. Estos compuestos se conjugan en las células del intestino y posteriormente sufren procesos de metilación, sulfatación y/o glucuronidación en el hígado. Como consecuencia de estos procesos, las formas que se encuentran en el plasma y en los tejidos son muy distintas de las que están presentes en los alimentos, y esto dificulta la tarea de identificación de los metabolitos y la evaluación de su actividad biológica.

Nash y Ward (2016), refieren que los polifenoles y los flavonoides pueden aportar en una estrategia dietética que beneficie la salud de los huesos, retrasando o previniendo el inicio de la osteoporosis o trabajando favorablemente con los medicamentos anti-osteoporosis. Los polifenoles están presentes en una amplia gama de alimentos, entre ellos el té. La mayoría de los estudios realizados en mujeres posmenopáusicas han demostrado que el consumo habitual de té está asociado con una mayor densidad mineral ósea (DMO).

Flavonoides

Los flavonoides representan el grupo de polifenoles más ampliamente distribuido en las plantas, y en la actualidad, ya se han identificado más de 4 000 compuestos diferentes. Son una clase importante de pigmentos vegetales, que se encuentran naturalmente en las frutas y hortalizas. Los flavonoides actúan como agentes antivirales, antiinflamatorios y antitumorales, que afectan a la permeabilidad capilar y funcionan como antioxidantes exógenos. Adicionalmente, capturan y neutralizan los agentes oxidativos y extinguen los radicales libres, inhibiendo varias enzimas (ciclooxigenasa, lipooxigenasa, NADPH-oxidasa, xantina-oxidasa, fosfolipasa) y enzimas estimulantes con actividad antioxidante (como la catalasa y la superóxido dismutasa). Por lo tanto, los flavonoides interfieren directamente en la formación y propagación de radicales libres (Pereira Calado y otros, 2015).

3. METODOLOGÍA

Se trabajó con hoja de coca pulverizada donada por productores del distrito de Uchiza, departamento de San Martín, quienes indicaron trabajar con la variedad *E coca*.

3.1. Evaluación de actividad antioxidante y metabolitos secundarios del extracto del pulverizado de coca

Reactivos y equipos empleados

- **Reactivos:** los reactivos son de grado analítico y fueron adquiridos de las casas Sigma y Merck.

- ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3 -etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) 7 mM
- Persulfato potásico
- Buffer acetato 300 mM pH 3,6
- TPTZ (2, 4, 6-tripiryridyl-s-triazine) 10 mM preparado en solución de HCl 40 mM
- Cloruro de hierro III 20 mM
- Reactivo Folin Ciocalteu
- Carbonato de sodio (al 20%)
- Ácido gálico
- Tricloruro de aluminio
- Etanol absoluto
- Quercetina

- Equipos

- Balanza Sartorius BP 2215
- Homogenizador Dubnoff Metabolic Shaking Incubator de GCA/Precision Scientific
- Refrigeradora
- Espectrofotómetro NV203 de Greetmed
- Refractómetro de bolsillo Atago Pal α
- Analizador de microplacas ELISA BEST 2000

3.1.1 Determinación de la Actividad Antioxidante y metabolitos secundarios

Preparación de la muestra

Se prepararon tres extractos de 5%, se pesó 2 g de pulverizado de coca y se completó con agua bidestilada hasta 40 mL. Se llevó al homogenizador por 8 horas con agitación y se dejó en reposo por 7 días en refrigeración. Luego se pasó por filtración y se empleó el extracto líquido para las pruebas de polifenoles totales, flavonoides y capacidad antioxidante.

3.1.1.1. Método ABTS. La determinación de la capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) se evaluó empleando el método del ácido 2,2'-azino-bis (3 -etilbenzotiazolina-6-sulfónico) descrito por (Re y otros, 1999).

- Preparación del reactivo radical libre catiónico ABTS^{•+}

El radical ABTS^{•+} se preparó tras la reacción de ABTS (7 mM) con persulfato potásico para una concentración final de 2,45 mM a temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) y en la oscuridad durante 16 horas (Re y otros, 1999).

- Procedimiento

El radical ABTS^{•+} preparado se diluyó con agua bidestilada hasta obtener un valor de absorbancia de 0,70 ($\pm 0,02$) a 734 nm.

Los extractos de pulverizado de coca se diluyeron con agua bidestilada (1/10) hasta producir una captación del radical desde el 20 al 80% de la absorbancia del radical libre, tras añadir 20 μL de la muestra a 980 μL de dilución del radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ y reposo en oscuridad de 7 minutos. Luego se determinaron las absorbancias a 734 nm.

Las concentraciones finales de los tres extractos fueron de 10, 15, 20, 25 y 30 μg de polvo de coca/mL de extracto. Se trabajó por duplicado. Se usó como antioxidante de referentica una solución de trolox.

Los resultados se expresaron como capacidad antioxidante equivalente al trolox (TEAC-ABTS).

3.1.1.2. Método FRAP. Se realizó de acuerdo a lo indicado por el método FRAP (Benzie & Strain , 1996). Se prepararon 15 mL de la solución de trabajo FRAP con 150 μL de reactivo B, 150 μL de reactivo C y se completó el volumen con reactivo A. Siendo:

Reactivo A: Buffer acetato 300 mM pH 3,6

Reactivo B: TPTZ (2, 4, 6-tripiridyl-s-triazine) 10 mM preparado en solución de HCl 40 mM

Reactivo C: Solución FeCl_3 20 mM.

Las muestras de extracto se diluyeron 5 veces con agua bidestilada.

Se emplearon como estándares el ácido ascórbico y el sulfato ferroso.

El tubo de reacción contenía 50 μL del extracto diluido con 950 μL de solución FRAP. La mezcla se dejó en reposo 10 minutos y se leyeron las absorbancias a 593 nm. Se trabajó por duplicado.

Los resultados se expresaron en: el poder reductor férrico (FRAP) en mg sulfato ferroso /100mL extracto de coca y la actividad antioxidante equivalente a vitamina C (VCEAC) en mg VCE/g polvo de coca.

3.1.2 Determinación de Polifenoles totales

Se empleó el método espectrofotométrico con el reactivo Folin Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965). Se tomaron 100 μL de cada uno de los tres extractos acuosos de coca diluidos (1/30) y se mezclaron con 150 μL del reactivo Folin Ciocalteu que previamente había sido diluido tres veces.

Se dejó en reposo a temperatura ambiente por 5 minutos. Luego se agregó 150 μL de carbonato de sodio (al 20%) y 600 μL de agua bidestilada. Se dejó reposar por 30 minutos y luego se midieron las absorbancias a 760 nm. Se trabajó por duplicado.

El ácido gálico se usó como estándar a una concentración de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Los resultados se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico por 100 g de pulverizado de coca.

3.1.3 Determinación de Flavonoides

La cuantificación de los flavonoides totales se realizó por el método desarrollado por Stalikas (Stalikas, 2007).

El extracto acuoso del polvo de hoja de coca se diluyó al 50% v/v. El reactivo cloruro de aluminio se preparó con 37,5 mg de AlCl_3 disuelto con 4 mL de etanol previamente diluido al 50% v/v.

Cada tubo de reacción contenía 100 μL del extracto acuoso de coca diluido, 100 μL de AlCl_3 diluido y 800 μL de etanol absoluto. Se dejó en reposo a temperatura ambiente por 30 minutos y luego se midieron las absorbancias a 432 nm. Se trabajó por duplicado.

La quercetina se usó como estándar a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Los resultados se expresaron en mg equivalentes de quercetina por 100 g hoja de coca pulverizada.

3.2 Evaluación de los marcadores de recambio óseo

El presente estudio es de tipo cuasi experimental y corresponde a un diseño de investigación prospectivo y longitudinal. Fue autorizado por el Comité de Ética de la Unidad de Postgrado de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Anexo A) y todas las voluntarias firmaron su consentimiento informado.

Población: Mujeres postmenopáusicas.

Muestra: 25 mujeres postmenopáusicas con edad de $57,0 \pm 4,3$ años.

Unidad de análisis: mujer postmenopáusica con edad de $57,0 \pm 4,3$ años.

Por tratarse de un único tratamiento y ser un estudio autocontrolado, se seleccionaron las unidades experimentales buscando garantizar la homogeneidad y la participación voluntaria de las mujeres en el estudio según los siguientes criterios:

Criterios de inclusión

- Mujeres de edad de $57,0 \pm 4,3$ años.
- Mínimo 12 meses desde el último ciclo menstrual.
- Mínimo 12 meses desde la última vez que consumió pulverizado de hoja de coca.
- Firma del consentimiento informado.
- Mujeres que refirieron no tener osteoporosis.
- Mujeres que no estaban consumiendo suplemento de calcio tres meses antes.

Criterios de exclusión generales

Los criterios de exclusión que se aplicaron son los referidos en la investigación "Evaluación de Hidroxiprolina urinaria como indicador de osteoporosis tipo I frente a calcio y densitometría ósea". (Calderón, Daga, & Méjico, 1998). Fue

requisito no presentar síntomas ni signos de padecer las siguientes enfermedades:

- Insuficiencias o patologías renal, hepática y cardíaca.
- Diabetes
- Enfermedades tiroideas
- Insomnio (3 veces por semana o más)
- Tratamiento con terapia de reemplazo hormonal postmenopáusico
- Tratamiento con corticoides
- Hábitos: tabaquismo, alcoholismo, etc.
- Otros: intervenciones quirúrgicas o fracturas con menos de 1 año de antigüedad.

Se trabajó con 2 grupos: el primero fue de 16 mujeres desde Junio hasta Agosto del 2 014. El segundo fue de 9 mujeres y se trabajó desde fines de Julio hasta inicios de Octubre del mismo año. Tres mujeres en el primer grupo y una en el segundo, dejaron el programa debido a problemas personales y familiares.

Cada voluntaria llenó una ficha con su perfil para obtener información acerca de su edad, tiempo transcurrido desde su última menstruación, número de hijos. La ficha también incluyó una encuesta de hábitos de alimentación y de estilo de vida e historial médico (Anexo B).

Preparación de la unidad de análisis

A cada una de las mujeres participantes se le proporcionó hoja de coca pulverizada en cantidad suficiente para que consuman cada día 1 cucharadita (2 g) en ayunas con agua y 1 cucharadita (2 g) al medio día, por un periodo de 90 días. Esta ración ha sido determinada por la información recogida en las mujeres que suelen consumirla (Trigo, 2013) ya que no existen referencias formales. A todas las voluntarias se les pidió llevar su dieta normal y mantener su estilo de vida.

Se tomaron muestras de sangre en tres momentos de la investigación, la primera fue antes de iniciar el consumo del pulverizado, la segunda a los 45 días y la tercera a los 90 días de iniciada la ingesta. En cada encuentro para tomar la muestra de sangre, las voluntarias entregaron una hoja donde registraron diariamente si cumplieron con tomar el polvo de coca o no y la razón de ello (Anexo C). A las mujeres que dejaron de tomar 1 o más días se les prolongó el plazo hasta hacerlas cumplir los 90 días.

Las muestras de sangre fueron obtenidas a primera hora de la mañana y en condición de ayuno. En cada encuentro se tomaron 2 tubos de 6 mL a cada mujer. Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 3 500 rpm por 10 minutos y luego se congeló los viales con suero a -20 °C para conservarlos hasta el día del análisis.

3.2.1 Análisis bioquímicos

Fueron realizados en los laboratorios del Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins.

Reactivos

Los niveles de biomarcadores de calcio en suero como el propéptido N-terminal de procolágeno tipo 1 (P1NP), el telopéptido N-terminal del colágeno tipo 1 (NTX1) y el beta- crosslaps (β -CTX) fueron medidos con kits de inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) de la empresa Uscn Life Science Inc. Las concentraciones de fosfatasa alcalina ósea (BALP) fueron obtenidas con el kit ELISA de la empresa MyBioSource.

3.2.1.1 Marcadores de Formación Ósea

a. Determinación del contenido de Fosfatasa Alcalina Ósea (BALP)

Fundamento de la prueba

La placa de microtitulación viene previamente recubierta con un anticuerpo monoclonal específico para BALP. A continuación, los estándares o las muestras se añaden a los pocillos de placas de microtitulación y si BALP está presente, se unirá al anticuerpo de los pozos pre-recubiertos. Con el fin de determinar cuantitativamente la cantidad de BALP presente en la muestra, una preparación estandarizada de peroxidasa de rábano (HRP) conjugada con anticuerpo policlonal específico para BALP, se añade a cada pocillo para el "sándwich", donde la BALP se quedará inmovilizada en la placa. La placa de microtitulación se somete a incubación, y después se lavan los pocillos meticulosamente para eliminar todos los componentes no unidos.

A continuación, las soluciones de sustrato se añaden a cada pocillo. La enzima (HRP) y el sustrato se dejan reaccionar durante un período de incubación corto. Sólo los pozos que contienen BALP y el anticuerpo conjugado con enzima exhiben un cambio de color. La reacción enzima-sustrato se determina por adición de una solución de ácido sulfúrico y el cambio de color se mide espectrofotométricamente a una longitud de onda de 450 nm. Una curva estándar relaciona la intensidad del color (DO) con la concentración de los Estándares. La concentración BALP en cada muestra se interpola a partir de esta curva estándar.

Sensibilidad

La sensibilidad de este ensayo es 0,1 ng/mL.

El kit incluye reactivos y materiales mostrados en la Tabla 6.

Tabla 6. Reactivos y materiales suministrados

| Concentración | Concentración | Concentración |
|---------------------------|---------------|-------------------|
| Placa de microtitulación | 96 celdas | Tiras de pocillos |
| Enzima conjugada | 10 mL | 1 vial |
| Standard A | 0 ng/mL | 1 vial |
| Standard B | 0,5 ng/mL | 1 vial |
| Standard C | 1,0 ng/mL | 1 vial |
| Standard D | 2,5 ng/mL | 1 vial |
| Standard E | 5,0 ng/mL | 1 vial |
| Standard F | 10 ng/mL | 1 vial |
| Sustrato A | 6 mL | 1 vial |
| Sustrato B | 6 mL | 1 vial |
| Solución de Término | 6 mL | 1 vial |
| Solución de Lavado (100x) | 10 mL | 1 vial |

Preparación de los reactivos

1. Se llevaron todos los componentes del kit y las muestras a temperatura ambiente (20 – 25 °C) antes de su uso.
2. Muestras: el buffer fosfato salino (PBS) se preparó con 250 µL de buffer fosfato pH 7,2. Se usó para la dilución. Los sustratos A y B se incubaron 15 minutos.
3. Solución de Lavado: se diluyeron 10 mL de la solución de lavado concentrada (100x) con 990 mL de agua destilada para preparar 1 000 mL de solución de lavado diluida (1x).

4. No se diluyeron los otros reactivos, pues estaban listos para ser usados.

Procedimiento de ensayo

1. Se aseguraron los números deseados de pozos cubiertos en el soporte, se añadieron 50 μL de los estándares y de las muestras al pocillo apropiado en la placa de microtitulación. Luego se añadieron 50 μL de PBS en el blanco control.
2. Se adicionó 100 μL del conjugado (excepto en el blanco control) a cada celda. Se mezcló bien. Luego se cubrió e incubó la placa por 1 hora a 37 °C.
3. Usando la lavadora automatizada, se lavó la placa 5 veces con la solución de lavado diluida (400 μL). Luego se secó la placa.
4. Se añadieron 50 μL del sustrato A y 50 μL del sustrato B a cada celda, incluyendo la del blanco control. Se cubrieron e incubaron por 15 minutos a 37°C.
5. Luego se adicionaron 50 μL de la solución de término a cada celda, mezclando bien.
6. A continuación, se leyó la absorbancia a 450 nm.

Cálculo de resultados

Se promediaron las lecturas duplicadas para cada estándar, control y muestras, y se restó la densidad óptica media estándar cero.

Se construyó una curva estándar trazando la media de la DO y la concentración de cada estándar y se dibujó una curva de mejor ajuste a través de los puntos de la gráfica con la concentración de BALP en el eje y, y la absorbancia en el eje x (Anexo D).

b. Determinación del contenido de Procolágeno péptido 1-terminal (P1NP)

Fundamento de la prueba

La placa de microtitulación del kit viene previamente recubierta con un anticuerpo específico para P1NP. Los estándares o muestras se añaden a los pocillos de placas de microtitulación adecuados con un anticuerpo conjugado con biotina específico para P1NP. Luego se añade avidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) a cada pocillo de microplaca y se lleva a incubación.

Luego de añadir la solución de sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) sólo los pozos que contienen la P1NP, el anticuerpo biotina-conjugado y la avidina - enzima conjugada exhiben un cambio de color.

La reacción enzima - sustrato se determina mediante la adición de solución de ácido sulfúrico y el cambio de color se mide espectrofotométricamente a una longitud de onda de $450 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$.

La concentración de P1NP en las muestras se determina mediante la comparación de la DO de los muestras con la curva estándar.

Sensibilidad

La dosis mínima detectable de P1NP es típicamente menos de 12,2 pg/mL. La sensibilidad de este ensayo o Límite inferior de detección (LLD) es definida como la mínima concentración de proteína que podría diferenciarse de cero. Los materiales y reactivos a emplear fueron iguales a los mencionados para la fosfatasa alcalina ósea, así como los requerimientos de almacenamiento de los kits y de las muestras; la preparación de la muestra y el procedimiento de ensayo.

Preparación de los reactivos

1. Se llevaron todos los componentes del kit y las muestras a temperatura ambiente ($18 - 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$) antes de su uso.

2. Se diluyó el estándar con 1,0 mL de diluyente estándar, manteniéndolo durante 10 minutos a temperatura ambiente y se agitó suavemente (sin formar espuma).

La concentración de la solución madre fue de 4 000 pg/mL.

Se diluyó en primer lugar la solución madre a 2 000 pg/mL. El estándar diluido sirvió como el de más alto nivel (2 000 pg/mL). Luego, se prepararon 7 tubos con 0,5 mL de diluyente estándar y se utilizó el estándar diluido produciendo una serie de dilución doble. Se mezcló cada tubo antes de la siguiente transferencia.

Se organizaron 7 puntos del estándar diluido con 2 000 pg/mL, 1 000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62,5 pg/mL, 31,2 pg/mL, y los últimos tubos de PE con estándar diluyente es el espacio con el 0 pg/mL.

3. Se centrifugaron los reactivos de detección A y B antes de su uso. Se diluyeron hasta la concentración de trabajo con los diluyentes de ensayo A y B, respectivamente (1:100).

4. Se diluyeron 20 mL de concentrado de solución de lavado (30 x) con 580 mL de agua destilada para preparar 600 mL de solución de lavado (1x).

5. Se aspiró la dosis necesaria de la solución de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) con puntas esterilizadas asegurando que no quede la solución residual en la solución vial.

Preparación de la muestra

Se hizo una prueba antes del ensayo para evaluar la dilución apropiada de la muestra. Finalmente, se decidió trabajar con una dilución de 1:50.

El sustrato TMB se incubó por 20 minutos. La Segunda incubación fue de 20 minutos

Procedimiento de ensayo

1. Se determinaron las celdas para el estándar diluido, el blanco y las muestras. Se prepararon 7 celdas para el estándar y una para el blanco. Se

adicionaron 100 μL del estándar diluido a las celdas del estándar, el blanco y las muestras. Se incubó por 2 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$.

2. Se removió el líquido de cada celda, sin lavar.

3. A cada celda se adicionaron 100 μL de reactivo de detección A. Se incubó por una hora a 37 $^{\circ}\text{C}$.

4. Se aspiró la solución y se lavaron las celdas con 350 μL de solución de lavado 1x empleando la función de autolavado de la máquina. Se dejó reposar por 2 minutos, se removió el líquido remanente con papel absorbente. La placa se lavó en total 3 veces. Luego del último lavado se removió por aspiración cualquier remanente del buffer de lavado. Se volteó la placa hacia el papel absorbente.

5. A cada celda se le adicionó 100 μL de reactivo de detección B. Se incubó por 30 minutos a 37 $^{\circ}\text{C}$.

6. El proceso de lavado/aspirado se repitió 5 veces.

7. Se añadieron 90 μL de Solución TMB a cada celda y se llevó a incubación por 20 minutos a 37 $^{\circ}\text{C}$, protegiendo la placa de la luz. El líquido se tornó azul al adicionar esta solución.

8. Se adicionó 50 μL de solución de pare a cada celda. El líquido se tornó amarillo. Se mezcló bien para asegurar un cambio uniforme del color.

9. Se eliminó cualquier resto de agua, huella digital o burbuja en la superficie del líquido. Se leyó inmediatamente a 450 nm.

Cálculo de resultados

Se promediaron las lecturas duplicadas para cada estándar, control, y muestras; y se restó la densidad óptica media estándar cero.

Se construyó una curva estándar trazando la media de la DO y la concentración de cada estándar y se dibujó una curva de mejor ajuste a través de los puntos de la gráfica con la concentración de P1NP en el eje y, y la absorbancia en el eje x (Anexo D).

3.2.1.2 Marcadores de Resorción Ósea

a. Determinación del contenido de β Crosslaps (β -CTx)

Fundamento de la prueba

Este ensayo empleó la técnica de inmunoensayo enzimático de inhibición competitiva. El anticuerpo monoclonal específico a β -CTx viene previamente revestido sobre una microplaca. Se pone en marcha una reacción de inhibición competitiva entre biotina marcada con β -CTx y β -CTx no marcado (estándares o muestras) con el anticuerpo pre - recubierto específico a β -CTx.

Después de la incubación, el conjugado no unido se eliminará mediante lavado. Luego, la avidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) se añade a cada pocillo de microplaca y se incuba. La cantidad del conjugado HRP unido es inversamente proporcional a la concentración de β -CTx en la muestra.

Después de la adición de la solución de sustrato, la intensidad de color desarrollado será inversamente proporcional a la concentración de β -CTx en la muestra.

Sensibilidad

La dosis mínima detectable de β -CTx es típicamente menos de 35,23 pg/mL. La sensibilidad de este ensayo, o Límite inferior de detección (LLD) se definió como la concentración de proteína más bajo que podría diferenciarse de cero.

Preparación de las muestras

Se hizo una prueba antes del ensayo para evaluar si era necesario diluir la muestra. Finalmente, se decidió trabajar sin dilución.

Preparación de los reactivos

1. Se llevaron todos los componentes del kit y las muestras a temperatura ambiente (18 – 25 °C) antes de su uso.

2. Se reconstituyó el estándar con 0,5 mL de diluyente estándar, se mantuvo durante 10 minutos a temperatura ambiente y se agitó suavemente (sin formar espuma).

La concentración de la solución madre patrón fue de 8 000 pg/mL.

Luego, se prepararon 5 tubos con 0,6 mL de diluyente estándar y se realizaron series de triple dilución. Se mezcló cada tubo a fondo antes de la siguiente transferencia.

Se organizaron 5 celdas del estándar diluido con 8 000 pg/mL, 2 666,67 pg/mL, 888,89 pg/mL, 296,30 pg/mL, 98,77 pg/mL y el último tubo de PE con estándar diluyente fue el espacio con el 0 pg/mL.

3. Se centrifugaron los reactivos de detección A y B antes de su uso. Se diluyeron hasta la concentración de trabajo con diluyente de ensayo A y B, respectivamente (1:100).

4. Se diluyeron 20 mL de concentrado de solución de lavado (30 x) con 580 mL de agua destilada para preparar 600 mL de solución de lavado (1x).

5. Se aspiró la dosis necesaria de la solución con puntas esterilizadas asegurando que no quede la solución residual.

Procedimiento de ensayo de marcadores de resorción (β -CTx y NTX1)

1. Se determinaron los pozos para el estándar diluido, el blanco y la muestra. Se prepararon cinco pozos para el estándar, uno para el blanco. Se añadieron 50 μ L de cada una de las diluciones estándar, blanco y muestras en los respectivos pozos. Inmediatamente se añadieron 50 μ L del reactivo de detección A en cada pocillo. Se agitó la placa suavemente. Se incubó por 1 hora a 37 °C. Se calentó a temperatura ambiente y se mezcló suavemente hasta que la solución se uniformice.

2. Se aspiró la solución y se lavó con 350 μ L de solución de lavado 1X cada pocillo utilizando la función de autolavado y se dejó reposar 2 minutos. Luego se retiró por completo el líquido restante de todos los pocillos mediante el ajuste de la placa sobre papel absorbente. Se repitió 3 veces. Después del

último lavado, se eliminaron los restos de tampón de lavado por aspiración. Se invirtió la placa y se secó contra el papel absorbente.

3. Se añadieron 100 μ L de solución de reactivo de detección B a cada pocillo. Se incubó 30 minutos a 37 °C después de cubrirlo con el sellador de placa.

4. Se repitió el proceso de aspiración /lavado 5 veces (realizado en el paso 2).

5. Se añadieron 90 μ L de solución de sustrato a cada pocillo. Luego se cubrió con un nuevo sellador de placa. Se incubó por 20 minutos a 37 °C. Se protegió de la luz. El líquido se volvió azul mediante la adición de solución sustrato.

6. Se añadieron 50 μ L de solución de parada a cada pocillo. El líquido se volvió amarillo por la adición de esta solución. Se mezcló el líquido punteando en el lado de la placa.

7. Se eliminó cualquier gota de agua y la huella digital en la parte inferior de la placa y se confirmó que no hubieran burbujas en la superficie del líquido. A continuación, se ejecutó el lector de microplacas y se llevó inmediatamente a medición a 450 nm.

Cálculo de resultados

Este ensayo empleó la técnica de inmunoensayo enzimático de inhibición competitiva, por lo que hay una correlación inversa entre la concentración de β -CTx en la muestra y la intensidad de la señal de ensayo.

Se promediaron las lecturas duplicadas para cada estándar, control, y muestras. Se creó una curva estándar con el logaritmo de la concentración β -CTx en el eje y, y la absorbancia en el eje x (Anexo E).

Luego se graficó una línea recta de ajuste a través de los puntos estándar y se determinó por análisis de regresión.

b. Determinación del contenido de Telopéptido N-terminal del colágeno tipo 1 (NTX1)

Fundamento de la prueba

Este ensayo emplea la técnica de Inmunoensayo Enzimático de Inhibición Competitiva. Un anticuerpo monoclonal específico a NTX1 viene previamente revestido sobre una microplaca. Se pone en marcha una reacción de inhibición competitiva entre biotina marcada NTX1 y NTX1 no marcado (estándares o muestras) con el anticuerpo pre - recubierto específico a NTX1. Después de la incubación, el conjugado no unido se elimina mediante lavado. Luego, la Avidina Conjugada con Peroxidasa de Rábano Picante (HRP) es añadida a cada pocillo de microplaca y se incuba. La cantidad del conjugado HRP unido es inversamente proporcional a la concentración de NTX1 en la muestra.

Después de la adición de la Solución de Sustrato, la intensidad de color desarrollado es inversamente proporcional a la concentración de NTX1 en la muestra.

Sensibilidad

La dosis mínima detectable de NTX1 es típicamente menos de 0,88 ng/mL. La sensibilidad de este ensayo, o Límite inferior de detección (LLD) se definió como la concentración de proteína más bajo que podría diferenciarse de cero.

Preparación de las muestras

Se hizo una prueba antes del ensayo para evaluar si era necesario diluir la muestra. Finalmente, se decidió trabajar sin dilución.

Preparación de los reactivos

1. Se llevaron todos los componentes del kit y las muestras a temperatura ambiente (18 – 25 °C) antes de su uso.

2. Se reconstituyó el Estándar con 1,0 mL de diluyente estándar, se mantuvo 10 minutos a temperatura ambiente, luego se agitó suavemente (sin formar espuma).

La concentración del patrón en la solución madre fue de 200 ng/mL. Luego, se prepararon 5 tubos con 0,6 mL de diluyente estándar y se realizaron series de triple dilución. Se mezcló cada tubo a fondo antes de la siguiente transferencia.

Se organizaron 5 puntos del estándar diluido con 200 ng/mL, 66,67 ng/mL, 22,22 ng/mL, 7,41 ng/mL, 2,47 pg/mL y los últimos tubos de PE con estándar diluyente con 0 ng/mL.

3. Se centrifugó los reactivos detección A y B antes de su uso. Se diluyeron hasta la concentración de trabajo con diluyente de ensayo A y B, respectivamente (1:100).

4. Se diluyó 20 mL de la solución concentrada de lavado (30x) con 580 mL de agua destilada para preparar 600 mL de solución de lavado (1x).

5. Se aspiró la dosis necesaria de la solución con puntas esterilizadas asegurando que no quede de nuevo la solución residual en la solución vial.

Cálculo de resultados

Este ensayo empleó la técnica de inmunoensayo enzimático de inhibición competitiva, por lo que dio una correlación inversa entre la concentración de NTX1 en la muestra y la intensidad de la señal de ensayo.

Se promediaron las lecturas duplicadas para cada estándar, control, y muestras. Se creó una curva estándar en log-log, con el logaritmo de la concentración NTX1 en el eje y, y la absorbancia en el eje x (Anexo E).

La empresa USCN Life Science Inc., proveedora de los kits empleados, indicó que no tienen valores referenciales específicos para la población de mujeres

postmenopáusicas y que sólo tienen valores referenciales para una población adulta, los cuales se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7: Valores referenciales de los marcadores para adultos

| Marcador de formación ósea | Unidad | Rango referencial |
|---|---------|-------------------|
| Fosfatasa Alcalina Ósea (BALP) | µg / L | ≤ 22 *** |
| Procolágeno N-terminal del colágeno tipo I (P1NP) | ng / mL | 19 - 50** |
| | | |
| Marcador de Resorción Ósea | Unidad | Rango referencial |
| Telopéptido N-terminal del colágeno tipo 1 (NTX1) | ng / mL | 11,7 - 34,9* |
| β Crosslaps (β-CTX) | ng / mL | 0,08 - 5,73* |

Fuente. Datos tomados de *USCN Life Science Inc. ** Bonjour y otros (2 009)

*** Mayo Medical Laboratories (2 016)

3.3 Análisis estadístico

A cada voluntaria se le tomaron tres mediciones (al inicio, a los 45 y a los 90 días), por lo que los tres grupos de resultados están relacionados. Por esta razón, se aplicó la prueba no paramétrica del Test de Friedman. Se calcularon las medianas de cada día de toma de muestra por cada biomarcador. El Test de Friedman para cada biomarcador se aplicó en sus 3 momentos de toma de muestra. El $p < 0,05$ se consideró como significativo.

También se evaluaron a través de las correlaciones de Pearson los cambios de los marcadores bioquímicos comparando la variación de las concentraciones entre los 90 días de consumo de hoja de coca molida y el momento inicial de la prueba sin consumo. Para determinar si los hábitos alimenticios (deficiente/regular/bueno) tenían algún efecto sobre las

concentraciones finales de cada biomarcador, se utilizó el análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados de la evaluación de actividad antioxidante y metabolitos secundarios del pulverizado de coca

En la Tabla 8 se observa la capacidad antioxidante del pulverizado de coca y los metabolitos secundarios que pueden explicar parte de esa capacidad antioxidante (Anexo I y J). Con el método ABTS se obtuvo un IC_{50} de 21,64 $\mu\text{g/mL}$. De los resultados de polifenoles y flavonoides se estima que la relación flavonoides/ polifenoles es de 0,074.

Tabla 8. Resultados de los parámetros antioxidantes de la hoja de coca pulverizada

| | Contenido promedio |
|---|--------------------|
| TEAC-ABTS ($\mu\text{mol trolox/ mL extracto}$) | 2,74 |
| FRAP (mg Ácido Ascórbico/ g polvo de coca) | 73,60 |
| Polifenoles (mg AG/100 g polvo de coca) | 3 089,34 |
| Flavonoides (mg QC/100 g polvo de coca) | 228,63 |

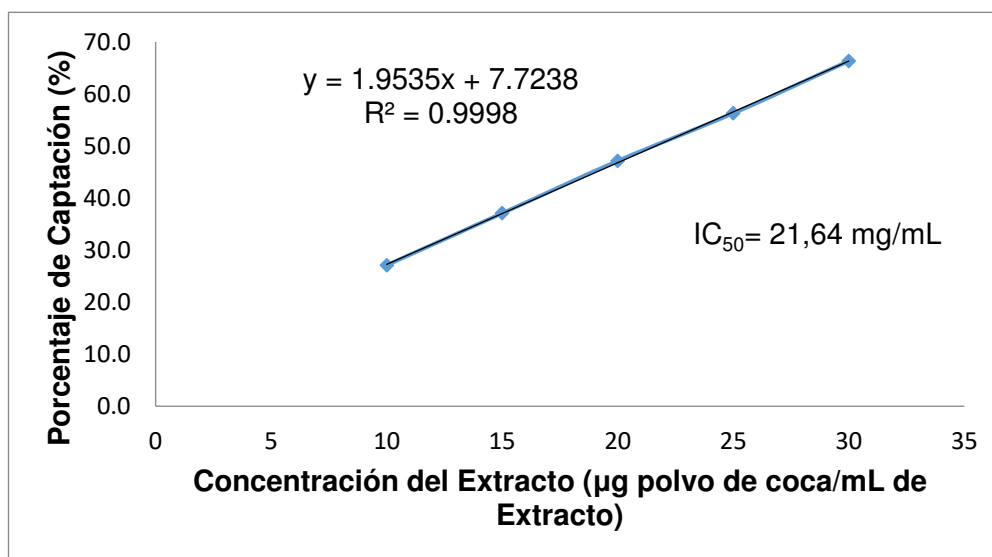


Figura 2. Porcentaje de Captación promedio de 03 extractos de pulverizado de hoja de coca obtenido con el método ABTS

4.2 Resultados de los marcadores bioquímicos de recambio óseo

De las 25 voluntarias iniciales sólo 21 voluntarias completaron el estudio (Anexo F). Las razones por las que 4 voluntarias desistieron fueron: motivos de viaje, problemas familiares, falta de tiempo o problemas de salud no relacionados con el estudio.

Se observaron cambios en un indicador de formación ósea y en un indicador de resorción ósea.

4.2.1 Cambios en los marcadores de formación ósea en 90 días

En la Tabla 9 se muestran los resultados de la Prueba de Friedman. No se observaron cambios significativos en los marcadores de formación ósea BALP y P1NP ($p > 0,05$).

En el caso del P1NP, no hubieron cambios significativos ($p > 0,05$), pero sí se observaron medianas que fueron aumentando en el transcurso de la prueba, lo cual fue un resultado esperado.

En el caso de la BALP se obtuvieron valores significativos pero para una tendencia inversa, ya que disminuyeron las concentraciones de esta proteína.

Tabla 9. Evaluación de los biomarcadores de formación y resorción ósea en mujeres posmenopáusicas después del consumo de polvo de hoja de coca durante 90 días, aplicando la prueba de Friedman

| Marcador | Tiempo cero | Tiempo 45 días | Tiempo 90 días | Significado asintótico* |
|----------------------|-------------|----------------|----------------|-------------------------|
| BALP (ng/mL) | 0,6073 | 0,4141 | 0,3719 | 0,002a |
| P1NP (pg/mL) | 156,39 | 167,33 | 184,51 | 0,688 |
| NTX1 (ng/mL) | 1,2719 | 1,1787 | 0,9945 | 0,047a |
| β -CTX (pg/mL) | 1,5725 | 1,7781 | 1,8705 | 0,368 |

*Prueba de Friedman. a: significativo, $p < 0,05$. n= 21

4.2.3 Cambios en los marcadores de resorción ósea en 90 días

En el caso del marcador de resorción ósea en suero NTX1 se obtuvieron valores significativos ($p < 0,05$), como está indicado en la Tabla 9. Las concentraciones de este péptido disminuyeron significativamente a los 90 días con respecto al momento inicial de la prueba, demostrando un retroceso en el proceso de resorción del hueso de las voluntarias. El tratamiento con el polvo de coca redujo significativamente la concentración del NTX1 a través del tiempo ($p= 0,047$).

En contraste, para el β -CTX se obtuvieron valores significativos ($p < 0,05$) pero para una tendencia inversa, ya que aumentaron las concentraciones de este marcador, expresando un incremento en la resorción ósea.

Las correlaciones de Pearson permitieron comparar la diferencia de las concentraciones de los biomarcadores entre el momento final y el inicial de la prueba con respecto a algunos datos que podrían influir en el metabolismo del calcio como: edad, número de hijos, índice de masa corporal, número de

meses desde su última menstruación y el número de días que dejó de tomar el polvo de hoja de coca; los cuales fueron declarados por las voluntarias en un cuestionario (Anexo B).

Se observó que los cuatro marcadores tienen una correlación positiva baja con las características evaluadas (Anexo G). Las voluntarias con un mayor tiempo transcurrido desde su última menstruación presentaron una mayor concentración del marcador P1NP, favoreciendo el proceso de formación ósea. El marcador de resorción ósea NTX1 reveló que las mujeres que tuvieron más hijos y tuvieron una mayor adherencia durante el estudio, manifestaron mayor variación de este marcador en el tiempo, reduciendo la resorción (ver Tabla 10).

No se observaron diferencias en las concentraciones finales de cada biomarcador por influencia de los hábitos alimenticios (Anexo H).

Tabla 10. Resumen de las características de las voluntarias que tuvieron una relación positiva entre 0 y 1 con los resultados de los marcadores

| Marcador bioquímico | Perfil de voluntarias | Correlación de Pearson |
|---------------------|--|------------------------|
| BALP | Índice de masa corporal | 0,341 |
| P1NP | Tiempo transcurrido desde la última menstruación | 0,269 |
| NTX1 | Adherencia | 0,266 |
| | Número de hijos | 0,220 |
| β-CTX | Número de hijos | -0,268 |
| | Edad de la Voluntaria | 0,232 |

4.3 Discusión

Debido a la variabilidad biológica y analítica de los marcadores, los datos disponibles sobre un mismo marcador de hueso se limitan a la comparación de los resultados del tratamiento (Hlaing & Compston, 2014). El marcador de resorción ósea NTX1 disminuyó significativamente después del consumo de coca durante 90 días (ver Tabla 9). Además, el marcador de formación ósea P1NP no reveló un efecto significativo pero sí una positiva y beneficiosa diferencia de medianas.

Ambos resultados podrían explicarse parcialmente por el importante contenido en calcio (1 011,67 – 2 196 mg) y en cofactores de enzimas antioxidantes de la hoja de coca como magnesio (210,95 mg), zinc (2,67 mg) y hierro (29,16 mg), así como polifenoles (3 089,34 mg AG). Se desconocen los mecanismos bioquímicos por los cuales el pulverizado de coca generaría estos efectos, sin embargo se demostró que una pequeña ración de 4 g diarios generó efectos beneficiosos y relevantes en dos biomarcadores. Por ello, se recomienda ampliar el consumo de la coca enriqueciendo productos como panes, kekes, galletas, barras energéticas; lo que permitiría una mayor ingesta de coca y por consiguiente, mayores beneficios para la salud.

En cuanto a los marcadores BALP y β -CTX, se obtuvieron resultados no esperados (ver Tabla 9). El marcador de resorción β -CTX debió reducirse. Diversos estudios revelan que tras el inicio de la terapia antirresortiva, los resultados pueden ser muy heterogéneos, como un descenso significativo en los marcadores de resorción ósea entre las semanas 4 y 6 (Torres, Mezquita, De la Higuera, Fernández, & Muñoz, 2003), o la disminución inicial de los valores del β -CTX, pero con un aumento después del sexto mes de tratamiento (Min Yu y otros, 2015). Esto se podría corregir prolongando el tiempo de evaluación.

El marcador de formación ósea BALP debió aumentar en el tiempo, pero disminuyó. Esto podría deberse a la alteración de la enzima ya que las

muestras fueron descongeladas dos veces. La estructura terciaria proteica (conformación nativa) es la que determina la actividad enzimática, cualquier perturbación de esta estructura puede llevar a una pérdida de actividad. Otra fuente de variabilidad son las enfermedades asociadas. Como no se realizaron análisis clínicos a las voluntarias para descartar enfermedades, el incremento de la BALP podría haberse debido a la interferencia de las isoenzimas hepáticas (Hlaing & Compston, 2014).

Adicionalmente, otro factor de variabilidad puede ser el cambio de estación. Se han descrito cambios en el metabolismo del hueso con una disminución del recambio, en el verano con respecto al invierno, de entre 20 a 30% (Seibel J, 2005). El incremento del recambio óseo en invierno se puede deber, al menos parcialmente, a la deficiencia de vitamina D. La presente investigación se trabajó con el primer grupo desde Junio hasta Agosto y con el segundo desde Agosto hasta Octubre (Invierno y Primavera).

En general, los marcadores de resorción mostraron ser más fuertemente predictivos de la tasa de pérdida ósea que los marcadores de formación. Los marcadores de recambio óseo pueden complementar los resultados de la densidad mineral ósea en el tratamiento de la osteoporosis, pero su uso en la práctica clínica es desafiado por la variabilidad pre-analítica y analítica. En varios estudios se ha reportado que los marcadores de resorción se incrementan y los de formación pueden crecer, decrecer o no sufrir ningún cambio (Hlaing & Compston, 2014).

Existe mucha variabilidad debido a factores como el género, la edad, el grupo étnico, etc. Estos factores biológicos endógenos evidencian una alta variabilidad de los marcadores, lo que podría haber influido en los resultados alcanzados. Por ello, sería importante incluir una etapa pre-analítica para estandarizar las pruebas.

La coca pulverizada podría intervenir en el metabolismo óseo a través de diferentes mecanismos de la formación del hueso, la resorción ósea, el calcio sérico, la vitamina D, la absorción intestinal o los mediadores de la

inflamación. Sin embargo, el mecanismo exacto de acción no se ha determinado aún debido a la falta de estudios.

Además del alto contenido de calcio y de cofactores de enzimas antioxidantes, la hoja de coca representa una fuente potencial de fibra dietaria insoluble ya que contiene 38,02 g/100g (Penny y otros, 2009). Algunos estudios han demostrado que la fermentación colónica de los carbohidratos no digeribles mejoró la absorción de minerales como el calcio, el magnesio y el hierro. Esto podría tener implicancias positivas, como un aumento de la densidad ósea (Gray, 2006). La absorción de calcio intestinal disminuye de un 30% a un 50% en la edad adulta (Díaz Curiel, Moro Álvarez, & Sanz Baena, 2012). Por ello es importante incluir fibra en esta etapa de las mujeres.

Además, la literatura reporta que otros componentes alimentarios pueden influir favorablemente de manera especial en la población menopáusica. Así, el estudio reportado por Nash y Ward (2016), afirma que la ingesta habitual de té está asociada con una mayor densidad mineral ósea, particularmente en mujeres postmenopáusicas. Se asoció a los polifenoles con marcadores más altos de diferenciación (osteopontina, esclerostina) y la reducción de la toxicidad celular y marcadores pro-inflamatorios (IL6, TNF), mejorando la actividad de los osteoblastos. Esta asociación puede deberse a sus polifenoles, dando como resultado efectos antioxidantes de protección.

La capacidad antioxidante del extracto acuoso de coca pulverizada y el importante contenido de fenoles totales (ver Tabla 8) podrían contribuir entonces en los mecanismos citoprotectores de remodelación ósea. El contenido de polifenoles obtenido fue de 3 089,34 mg AG/100 g de muestra seca, valor similar al mencionado por Penny (2009) de 3 780 mg AG/100 g. El té verde, alimento destacado en este compuesto, contiene entre 2 070 mg AG/100 g y 3 600 mg AG/100 g (Pal y otros, 2012). La coca debería ingresar a la lista de alimentos con mayor aporte de este importante compuesto bioactivo. La coca superó a 51 plantas chinas que dieron 0,48 g AG/L (Fu y otros, 2011) como contenido promedio de polifenoles y la coca con un valor

de 1,54 g AG/L; sería importante caracterizar sus polifenoles para conocer en cuáles destaca y sus beneficios específicos.

El contenido de flavonoides obtenido fue de 228,63 mg Quercetina/100 g (ver Tabla 8) y la relación flavonoides/polifenoles dio 0,074, que es baja. Venegas (2012), menciona que el porcentaje de flavonoides totales en la infusión de té verde es de 1,3%, mientras que la obtenida en el extracto de coca fue de 0,23%. El pulverizado de coca no destaca en flavonoides, por ello sería importante caracterizar sus polifenoles y así, conocer las funciones específicas de estos antioxidantes.

La actividad antioxidante del pulverizado expresada como TEAC-ABTS, resultó 2,74 $\mu\text{mol trolox/mL}$ extracto, valor apreciable teniendo en cuenta que la preparación se realizó en frío, comparado con los resultados de infusiones herbales en agua caliente realizadas por Muñoz y otros (2012), en los que obtuvo valores de $3,61 \pm 0,100 \mu\text{mol/mL}$ para el boldo y de $4,90 \pm 0,180 \mu\text{mol/mL}$ para el té verde. El resto de infusiones como manzanilla, limón, hierba buena y árnica arrojaron valores entre $0,52 \pm 0,020$ y $2,04 \pm 0,070 \mu\text{mol/mL}$. El pulverizado de coca se revela como una opción para la actividad antiradical.

Tomando como resultado el valor obtenido del IC_{50} de 21,64 $\mu\text{g/mL}$ con este radical libre, la coca molida también demuestra tener una buena actividad antioxidante comparada con el IC_{50} del té verde de 209,74 $\mu\text{g/mL}$ (Cázares y otros, 2015). Se requiere 9 veces menos de polvo de coca que de té verde, cantidad considerablemente menor para inhibir la oxidación del ABTS.+.

El poder reductor férrico (FRAP) fue de 73,60 mg AAE/g (ver Tabla 8), valor mucho mayor que el reportado para el té verde con 5,86 mg AAE/g (Avneet y otros, 2015).

Finalmente, los resultados demostraron que una pequeña ración de pulverizado de coca de 4 g diarios, generó efectos beneficiosos de dos biomarcadores, uno de formación y otro de resorción. Con los resultados

obtenidos y la discusión comparativa con la literatura revisada, puede proponerse que el potencial de la hoja de coca molida no sólo está en función del elevado contenido de calcio sino también de los metabolitos secundarios, especialmente polifenoles, que pueden contribuir a modificar favorablemente los marcadores de recambio óseo en la población postmenopáusica.

Además y de manera importante, todas las voluntarias quedaron conformes a la prescripción del consumo del pulverizado de coca. Este grado de adherencia y persistencia durante el período de 90 días de complementación de la dieta, refleja la buena aceptación de este producto.

5. CONCLUSIONES

- El consumo de 4 g de hoja de coca pulverizada durante 90 días disminuye significativamente la resorción ósea expresada en el marcador NTX1.
- El consumo de 4 g de hoja de coca pulverizada durante 90 días tiende a incrementar la formación ósea expresada en el marcador P1NP.
- El efecto favorable del consumo de hoja de coca molida en el metabolismo óseo de mujeres postmenopáusicas puede deberse, además del elevado contenido de calcio y de cofactores de enzimas antioxidantes, a los metabolitos secundarios con capacidad antioxidante expresada en la presencia de polifenoles.

6. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

El tiempo de duración del estudio ha sido una importante limitación. El trabajo experimental debería ampliarse a un mínimo de 6 meses para obtener mejores resultados, sobre todo en los marcadores de formación ósea P1NP y BALP ya que en el ciclo del remodelado óseo en el hombre predomina la fase formativa (meses) sobre la resortiva (días).

Los criterios de exclusión de las voluntarias debieron incluir análisis clínicos que permitieran evaluar con más precisión su estado de salud.

La ausencia de datos sobre la densidad mineral ósea de las voluntarias impidió tener más elementos para evaluar los resultados. La escasez de recursos obligaron a trabajar con un tamaño limitado de muestra y de biomarcadores óseos.

7. RECOMENDACIONES

- Las voluntarias deberían llenar una ficha diaria detallando las comidas y eventos ocurridos que no forman parte de su rutina.
- Las voluntarias deberían recibir las raciones de pulverizado de coca en paquetes individuales para garantizar la homogeneidad en la cantidad de ingesta diaria.
- Medir resultados con diferentes raciones de coca molida.
- Adicionalmente, evaluar marcadores de inflamación. Ello tiene una relación directa con la estimulación en formación/maduración de osteoblastos y reducción de resorción.
- Caracterizar los tipos de polifenoles contenidos en el pulverizado de hoja de coca.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Avneet, K., Milandeep, K., Prabhjot, . K., Harpreet, K., Sarbjeet, K., & Khushwinderjit, K. (2015). Estimation and comparison of total phenolic and total antioxidants in green tea and black tea. *Global journal of Bio-science and Biotechnology*, 4 (1), 116-120.
- Barba, E. (2011). Marcadores de Remodelado Oseo y Osteoporosis. *Revista mexicana de patología clínica*, 113-137.
- Benzie, I., & Strain , J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70–76.
- Bolo Lozano, L. A., & Ocampo Santillán, P. (2004). Mate de coca y episodio depresivo. 5. Medicina Naturista.
- Bonjour, J., Benoit , V., Pourchaire, O., Ferry, M., Rousseau, B., & Souberbielle, J. (2009). Inhibition of markers of bone resorption by consumption of vitamin D and calcium-fortified soft plain cheese by institutionalized elderly women. *British Journal*, 102, 962-966.
- Bonjour, J., Brandolini-Bunlon, M., Boirie, Y., Morel-Laporte, F., Braesco, V., Bertiere, M., & Souberbielle, J. (2008). Inhibition of bone turnover by milk intake in postmenopausal women. *British Journal of Nutrition*. (100), 866-874.
- Cáceres Santa María, B. (2013). La leyenda negra de la coca y el futuro de una industria promisoriosa . En C. d. (CIDDH), *IV Foro Internacional de la hoja de coca. Hacia la construcción de una nueva política de control social y revalorización de la hoja de coca* (págs. 56-60). Lima: Centro de Investigación de Drogas y Derechos Humanos (CIDDH).

- Calderón, C., Daga, J., & Méjico, M. (1998). *Evaluación de hidroxiprolina como indicador de osteoporosis tipo I frente a calcio y densitometría ósea*. Lima: Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM.
- Castelo Branco, C. (2009). *Osteoporosis y Menopausia*. Madrid: Editorial Médica Panamericana.
- Cázares, R., Ruiz, R., Frag, J. C., Charles, J. C., Morales, L. E., Rojas, R., . . . Martínez-Avila, C. (2015). *Actividad antioxidante en 4 variedades de té comercial (Camellia sinensis)*. Guadalajara: XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.
- Chalco, N. (2011). *Factores exógenos que predisponen a la Osteoporosis en mujeres posmenopáusicas de la Comunidad Bocanegra - Callao*. Callao: Universidad Nacional de Callao. Facultad de Ciencias de la Salud.
- Collazos Chiriboga, C., Urquieta A, R., & Alvistur, E. (1965). Coqueo y nutrición. *Revista del viernes médico*, Vol 16 N°1.
- Diario La República. (Mayo de 2012). <http://www.larepublica.pe>. Recuperado el Setiembre de 2013, de <http://www.larepublica.pe/01-05-2012/crecen-cultivos-de-hoja-de-coca-en-zonas-cafeteras>
- Díaz Curiel, M., Moro Álvarez, M. J., & Sanz Baena, S. (2012). *INTECH. Science, Technology and Medicine open access publisher*. Recuperado el 15 de Marzo de 2016, de <http://www.intechopen.com: http://www.intechopen.com/books/nutrition>
- Documet Forger, L. (2004). *Caracterización físico-química y determinación de sus propiedades físicas y fisiológicas del subproducto "Borra de hoja de Coca"*. Lima: UNALM.
- Eastell, R., Mallinak , N., Ettinger, M., Pettinger, M., Cain , D., Flessland, K., & Chesnut, L. (Marzo de 2000). *Biological variability of serum and urinary N-Telopeptides of type I Collagen in Postmenopausal Women*. Recuperado el Enero de 2014, de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1359/jbmr.2000.15.3.594/full>
- Fu, L., Xu, B. T., Gan, R. Y., Zhang, Y., Xu, X. R., Xia, E. Q., & Li, H. B. (2011). Total Phenolic Contents and Antioxidant Capacities of Herbal. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 2112-2124.
- Fuentes Boquete, I. (2010). Estructura del hueso. En L. Arboleya Rodríguez, L. Pérez Edo, & Sociedad Española de Reumatología, *Manual de enfermedades óseas* (págs. 3-7). Madrid: Médica Panamericana.

- Gil Hernández, Á. (2010). *Tratado de Nutrición. Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición* (Vol. 1). Granada: Editorial médica panamericana.
- Gonzales Carazas, E., Melgarejo García, G., Chávez Conde, L., Arellán Bravo, L., Carbajal Lázaro, E., Cabrera Gómez, Y., . . . Choque Nolasco, F. (2013). Efecto terapéutico del extracto etanólico de *Erytroxylum coca* spp en anemia ferropénica inducida en ratas Holtzman macho. *Anales de la Facultad de Medicina de la UNMSM*, 74(1), 7-10.
- Gray, J. (2006). Fibra dietética definición, análisis, fisiología y salud. *International Life Sciences Institute (ILSI)*, 25-33.
- Guyton, A., & Hall, J. (2009). *Tratado de Fisiología Médica*. Madrid: Editorial Elsevier.
- Henman, A. (2005). *Mamacoca*. Lima: Editorial Gutemberg.
- Hlaing, T. T., & Compston, J. (2014). Biochemical markers of bone turnover – uses and limitations. *Annals of Clinical Biochemistry*, 51(2), 189-202.
- Hurtado Fuertes, C. (2006). *Harina de coca*. Lima: Editorial Gutemberg.
- INEI. (Diciembre de 2013). Encuesta nacional de hogares sobre consumo de Hoja de Coca 2013. Lima, Lima, Perú.
- INEI. (2014). Compendio Estadístico Perú . Lima, Lima, Perú. Recuperado el 20 de Octubre de 2016, de INEI: <http://www.inei.gov.pe/biblioteca-virtual/publicaciones-digitales/>
- Laboratories, M. M. (2016). *Mayo Clinic*. Recuperado el 20 de Julio de 2016, de Mayo Medical Laboratories: <http://www.mayomedicallaboratories.com/test-catalog/Clinical+and+Interpretive/82985>
- Llosa Rojas, T. (2002). *El mate de coca peruano*. Lima.
- López, J. (1999). *Utilidad de los marcadores bioquímicos de recambio óseo en Osteoporosis* (Vol. 28). Santiago de Chile: Departameno de Endocrinología de Pontificia Universidad Católica de Chile.
- Min Yu, T., Hsiao Ling, C., Yu Tang, T., Chao Chih, K., Fu Chang, H., & Chuan Mu, C. (2015). Short-Term Effects of Kefir-Fermented Milk Consumption on Bone Mineral Density and Bone Metabolism in a Randomized Clinical Trial of Osteoporotic Patients. *Plos one*, 1-17. doi:10.1371/journal.pone.0144231

- Muñoz Velázquez, E. E., Rivas Días, K., Loarca Piña, M. G., Mendoza Díaz, S., Reynoso Camacho, R., & Ramos Gómez, M. (1 de Mayo de 2012). Comparación del contenido fenólico, capacidad antioxidante y actividad. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(3), 481-495.
- Nash, L., & Ward, W. (2016). Comparison of black, green and rooibos tea on osteoblast activity. *Food and Function*. *The Royal Society of Chemistry*, 7, 1166-1175. doi:10.1039/c5fo01222h
- Pal, S., Ghosh, D., Saha, C., Kumar, A., Datta, S., & Kumar, S. (2012). Total polyphenol content, antioxidant activity and lipid peroxidation inhibition efficacy of branded tea (*Camellia sinensis*) available in India. *International Journal of Tea Science*, 13-17.
- Penny, M., Zavaleta, A., Lemay, M., Liria, M. R., Huaylinas, M. L., Alminger, M., . . . Reddy, M. (2009). Can Coca leaves contribute to improving the nutritional status of the Andean population? *Food and Nutrition Bulletin*, 30(3), 205-212.
- Pereira Calado, J. C., Albertão, P. A., de Oliveira, E. A., Sisto Letra, M. H., Frankland Sawaya, A. C., & Marcucci, M. C. (2015). Flavonoid Contents and Antioxidant. *Agricultural Sciences*, 6, 426-435.
- Quiñones, M; Miguel, M; Aleixandre, A;. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1), 76-89.
- Ramos Aliaga, R. (1988). Connotaciones metabólicas y fisiológicas del uso de la cocaína en animales de experimentación y su relación con el cocaísmo- segunda parte. *Anales de la Academia Peruana de Farmacia*, 3, 305-308.
- Ramos Aliaga, Roger. (1987). Connotaciones metabólicas y fisiológicas del uso de la cocaína en animales de experimentación y su relación con el cocaísmo- primera parte. *Anales de la Academia Peruana de Farmacia*, 2, 289-300.
- Ramos Aliaga, Roger; Chávez T, Himelda; Pagan C, Ofelia. (2006). *Efectos Antioxidante y hepatoprotectores de un extracto alcalino de hojas de Erythroxylum coca var. coca*. Lima: UNMSM.
- Ramos, R; Chiriboga, J;. (2005). Metabolismo oxidativo de los ácidos pirúvico y acético y actividades de transaminación en hígado de ratas que reciben cocaína con la dieta. *Revista de la Sociedad Química del Peru*, 71(2), 491-501.

- Re, R., Pellegrin, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 1231-1237.
- Riancho Moral, J. A., & González Macías, J. (2004). *Manual práctico de Osteoporosis y Enfermedades del Metabolismo Mineral*. Santander, España: Universidad de Cantabria.
- Romero, C., Manrique, S., & Rodríguez, M. (2012). Marcadores bioquímicos en osteoporosis. Utilidad en la práctica clínica. *Reumatología Clínica*, 8(2), 149-152.
- Seibel J, M. (2005). Biochemical markers of bone turnover Part 1: Biochemistry and Variability. *Clinical Biochemical Review*, 26, 97-115.
- Singleton, V., & Rossi, J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia. (2004). Menopausia y postmenopausia. Guía de práctica clínica. Barcelona.
- Stalikas, C. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 30, 3268 – 3295.
- Tomás Barberán, F. A. (2003). Los polifenoles de los alimentos y la salud. *Alimentación, nutrición y salud*, 10(2), 41-53.
- Torres, E., Mezquita, P., De la Higuera, M., Fernández, D., & Muñoz, M. (2003). Actualización sobre la determinación de marcadores de remodelado óseo. *Endocrinología y Nutrición*, 50(6), 237-243.
- Trigo Pesaque, J. (2013). Importancia nutricional de la hoja de coca. En C. d. Humanos, *IV Foro Internacional de la hoja de coca. Hacia la construcción de una nueva política de control social y revalorización de la hoja de coca* (págs. 70-80). Lima: Centro de Investigación Drogas y Derechos Humanos.
- Vásquez Bazán, C. (Abril de 2012). César Vásquez PERÚ: Política, Economía, Historia. Recuperado el 25 de Enero de 2016, de <http://cavb.blogspot.pe/2012/04/el-plan-estados-unidos-usa-y-paises.html?view=classic>
- Velásquez, L. (2005). *Determinación de la actividad antioxidante en el extracto refinado atomizado desalcaloinizado de coca en un modelo*

experimental de ejercicio extenuante. Ayacucho: Universidad Nacional San Cristobal de Huamanga.

Venegas Casanova, E. A. (2012). Cuantificación de flavonoides totales y taninos presentes. *Revista Científica de la Universidad César Vallejo*, 4(2).

Villavicencio, M. (1994). En C. N. Tecnología, *Bioquímica* (Vol. Tomo I). Lima: A y B Editores.

Weil, A. (2013). Revalorización de la coca en el contexto de nuestras relaciones con las plantas y la naturaleza. En C. d. (CIDDH), *IV Foro internacional de la hoja de coca* (págs. 21-28). Lima: Centro de investigación de drogas y derechos humanos (CIDDH).

9. ANEXOS

| | PÁG. |
|--|-------------|
| Anexo A. Autorización por el Comité de Ética de la Unidad de Postgrado de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos | 78 |
| Anexo B. Encuesta de hábitos de consumo de alimentos | 79 |
| Anexo C. Registro diario del cumplimiento de la toma del polvo de coca | 85 |
| Anexo D. Curvas estándar de marcadores bioquímicos de formación ósea | 86 |
| Anexo E. Curvas estándar de los marcadores bioquímicos de resorción ósea | 87 |
| Anexo F. Resultados de las tomas de muestra de sangre de cada voluntaria en los 3 tiempos de estudio | 88 |
| Anexo G. Correlaciones de Pearson | 92 |
| Anexo H. Prueba de Kruskal-Wallis | 94 |
| Anexo I. Evaluación de la capacidad antioxidante del polvo de hoja de coca | 95 |
| Anexo J. Método FRAP con sulfato ferroso y ácido ascórbico | 97 |

Anexo A. Autorización por el Comité de Ética de la Unidad de Postgrado de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN
"Año de la Promoción de la Industria Responsable y del Compromiso Climático"



ACTA N°. 0181

CÓDIGO DE PROYECTO: N°. 0254

ACTA DE EVALUACIÓN ÉTICA

En Lima, a los veinte seis días del mes de junio de 2014, se realizó la **revisión ética expeditiva** de las recomendaciones Metodológicas y Éticas incorporadas como sugerencias de corrección al proyecto: **"Evaluación del efecto del consumo de hoja de coca (ERYTHROXYLUM coca) micropulverizada en marcadores bioquímicos de recambio óseo en mujeres postmenopausicas"** que la Mg., Kusy Micaela Trigo Pérez, ha cumplido satisfactoriamente.

RESULTADO: PROYECTO APROBADO

Lima, 26 de Junio de 2014



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
FACULTAD DE MEDICINA
Ricardo Terukina
DR. RICARDO TERUKINA TERUKINA
Presidente
del Comité de Ética de Investigación

Anexo B. Encuesta de hábitos de consumo de alimentos

| <u>ENCUESTA DE HABITOS DE CONSUMO DE ALIMENTOS</u> | |
|---|----------------------------------|
| | CODIGO _____ |
| NOMBRE Y APELLIDOS: _____ | FECHA: _____ |
| DATOS GENERALES | |
| I. <i>Por favor llene la siguiente información:</i> | |
| Edad: _____ | Distrito en el que reside: _____ |
| Lugar donde nació: _____ | Teléfono: _____ |
| Ocupación: _____ | Talla: _____ |
| Peso: _____ | |
| ¿Cuándo fue su última menstruación? Indicar en número de meses o años: _____ | |
| Número de hijos: _____ | |
| HABITOS ALIMENTARIOS | |
| I. Encierre en un círculo una de las alternativas que más la represente a Ud.: | |
| 1. ¿Cuántas veces consume alimentos durante el día (desayuno, fiambre, almuerzo, lonche, cena)? | |
| a. Menos de 3 veces al día | |
| b. 3 veces al día | |
| c. 4 veces al día | |
| d. 5 veces al día | |
| e. Más de 5 veces al día | |
| 2. Su desayuno habitual consiste en: | |
| a. Extracto de verduras, ensalada de verduras, cereales integrales | |
| b. Comida salada | |
| c. Avena, quinua o soya y pan | |
| d. Leche, infusión o café y pan | |
| e. No desayuno | |
| 3. ¿Dónde desayuna mayormente? | |
| a. En casa | |
| b. En restaurante | |
| c. En kioskos/ ambulante | |
| d. En el trabajo | |
| e. No tengo lugar fijo | |

4. Su almuerzo habitual consiste en:
- a. Extracto de verduras ensalada de verduras, segundo
 - b. Ensalada de verduras, segundo**
 - c. Entrada, segundo, refresco endulzado
 - d. Entrada, segundo, postre, refresco endulzado**
 - e. Segundo, refresco endulzado
5. ¿Qué suele consumir mayormente en su almuerzo?
- a. Comida light (baja en azúcar, en grasas)
 - b. Comida vegetariana
 - c. Comida criolla
 - d. Comida china, pollo a la brasa
 - e. Cualquier producto que encuentre en el kiosko
6. ¿Dónde almuerza mayormente?
- a. En casa
 - b. En restaurante
 - c. En kioskos/ ambulantes
 - d. En el trabajo
 - e. No tengo lugar fijo
7. ¿Qué es lo que acostumbra consumir a media mañana o media tarde?
- a. Frutas frescas
 - b. Frutas secas, semillas, granola
 - c. Sánduche
 - d. Snacks, golosinas
 - e. Nada
8. Su cena habitual consiste en
- a. No ceno
 - b. Fruta, yogurt
 - c. Bebida y pan
 - d. Comida
 - e. Comida rápida (hamburguesa, salchipapas, pizza)
9. ¿Con qué frecuencia consume frituras?
- a. Nunca
 - b. 1- 2 veces por mes
 - c. 1- 2 veces por semana
 - d. Interdiario
 - e. Diario

10. ¿Qué bebidas suele consumir durante el día?
- Agua natural o infusiones sin azúcar
 - Refresco, infusiones con azúcar, jugo natural de frutas
 - Café
 - Bebidas rehidratantes y jugos industrializados
 - Gaseosas
11. ¿Con qué frecuencia consume gaseosa?
- Nunca
 - 1- 2 veces por mes
 - 1- 2 veces por semana
 - Interdiario
 - Diario
12. ¿Cuántas cucharaditas de azúcar agrega por taza normalmente?
- Ninguna
 - 1 cucharadita
 - 2 cucharaditas
 - 3 cucharaditas
 - Más de 3 cucharaditas
13. ¿Cuántas veces al día consume cualquier tipo de carne (pollo, res, pescado, vísceras)?
- Ninguna
 - Rara vez
 - 1 vez al día
 - 2 veces al día
 - 3 veces al día
14. ¿Cuántas veces alasemana consume menestras?
- Ninguna
 - Rara vez
 - 1 vez por semana
 - 2 veces por semana
 - 3 veces o más por semana
15. ¿Cuántas veces al día consume lácteos (leche, queso o mantequilla)?
- Ninguna
 - Rara vez
 - 1 vez al día
 - 2 veces al día
 - 3 veces al día

16. ¿Con qué frecuencia consume un plato grande de ensalada de verduras?

- a. Nunca
- b. 1- 2 veces por mes
- c. 1- 2 veces por semana
- d. Interdiario
- e. Diario

17. ¿Con qué frecuencia consume agua natural o infusiones sin azúcar?

- a. Nunca
- b. 1- 2 veces por mes
- c. 1- 2 veces por semana
- d. Interdiario
- e. Diario

18. ¿Con qué frecuencia realiza actividades físicas (deporte, danza, yoga)?

- a. Nunca
- b. 1- 2 veces por mes
- c. 1- 2 veces por semana
- d. Interdiario
- e. Diario

19. ¿Qué nivel de estrés tiene en su vida diaria?

- a. Ninguno
- b. Poco
- c. Moderado
- d. Bastante
- e. Muy alto

Adaptado del Cuestionario de Hábitos Alimentarios de Universitarios de la Tesis "Relación entre hábitos alimentarios e índice de masa corporal en estudiantes de una universidad pública según área de estudio, de las nutricionistas Rosa Ferro y Vanesa Maguiña de la UNMSM en el año 2012"

HISTORIA CLINICA

1. ¿Actualmente tiene alguna enfermedad? _____

Si no tiene ninguna enfermedad, pasar a la SIGUIENTE PREGUNTA

Relato de enfermedad:

a. signos y síntomas _____

b. Fecha de inicio (número de meses/ años) _____

2. Favor responder cómo se encuentra de las siguientes Funciones biológicas:

2.1 Sed

a. Mucha

b. Regular

c. Poca

d. No tengo sed

2.2 Apetito

a. Mucho

b. Regular

c. Poco

d. No tengo apetito

2.3. Deposiciones

a. Diarias

b. Interdiarias

c. Semanal

d. Muy irregular

4. Insomnio(dificultad para dormir)

a. Nunca

b. Rara vez

c. Semanal

d. Diario, Interdiario

5. El nivel de estrés en su vida diaria es:

a. Sin estrés

b. Bajo

c. Mediano

c. Alto

6.Su Nacimiento fue normal _____

- Peso al nacer (aproximado) _____

5. *Antecedentes familiares.*

- ¿Su madre ha tenido osteoporosis?(Si o No) _____

- ¿Ud. tiene alguna(s) hija(s) con problemas de descalcificación _____

| |
|--|
| 6. Tiene alguna alergia _____ Cuál _____ |
| 7. ¿Qué medicamentos consume y con qué frecuencia? _____ |
| 8. ¿Qué suplementos vitamínicos o nutricionales consume? _____ |
| Información adicional (opcional) _____ |
| 8. Impresión diagnóstica (NO LLENAR) _____ |

Anexo C. Registro diario del cumplimiento de la toma del polvo de coca

NOMBRE: _____

REGISTRO DE INGESTA DIARIA

| DIA | FECHA | ¿TOMÓ LA HARINA DE COCA? Marcar con una "X" | | OBSERVACIONES |
|-----|-------|---|----|---------------|
| | | SI | NO | |
| 1 | | | | |
| 2 | | | | |
| 3 | | | | |
| 4 | | | | |
| 5 | | | | |
| 6 | | | | |
| 7 | | | | |
| 8 | | | | |
| 9 | | | | |
| 10 | | | | |
| 11 | | | | |
| 12 | | | | |
| 13 | | | | |
| 14 | | | | |
| 15 | | | | |

Anexo D. Curvas estándar de marcadores bioquímicos de formación ósea

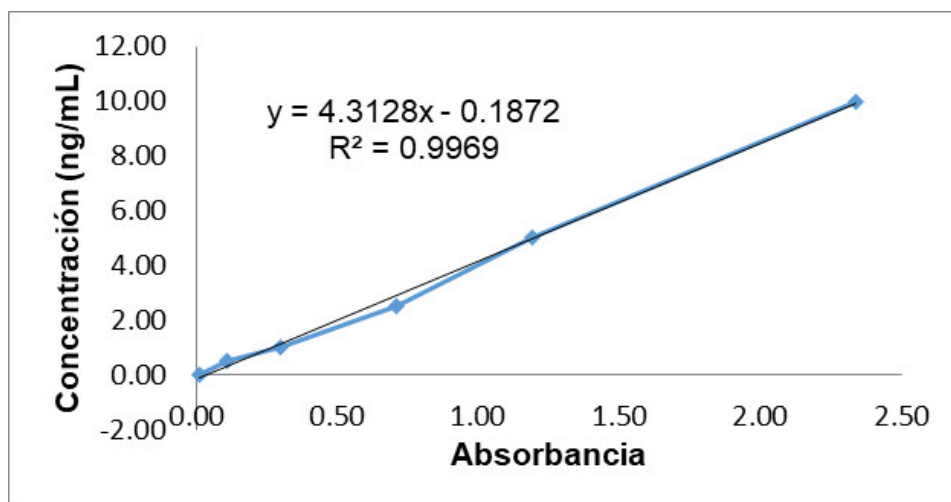


Figura 3. Curva estándar del marcador BALP

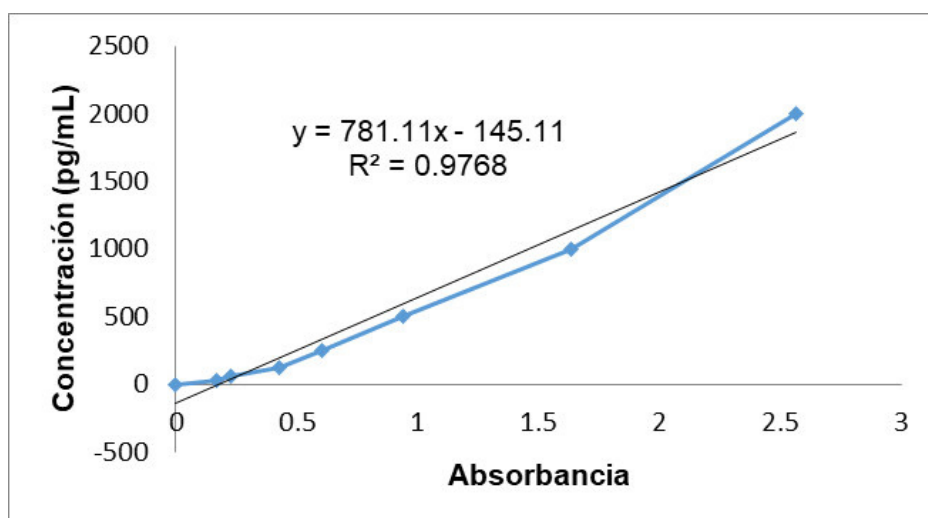


Figura 4. Curva estándar del marcador P1NP

Anexo E: Curvas estándar de los marcadores bioquímicos de resorción ósea

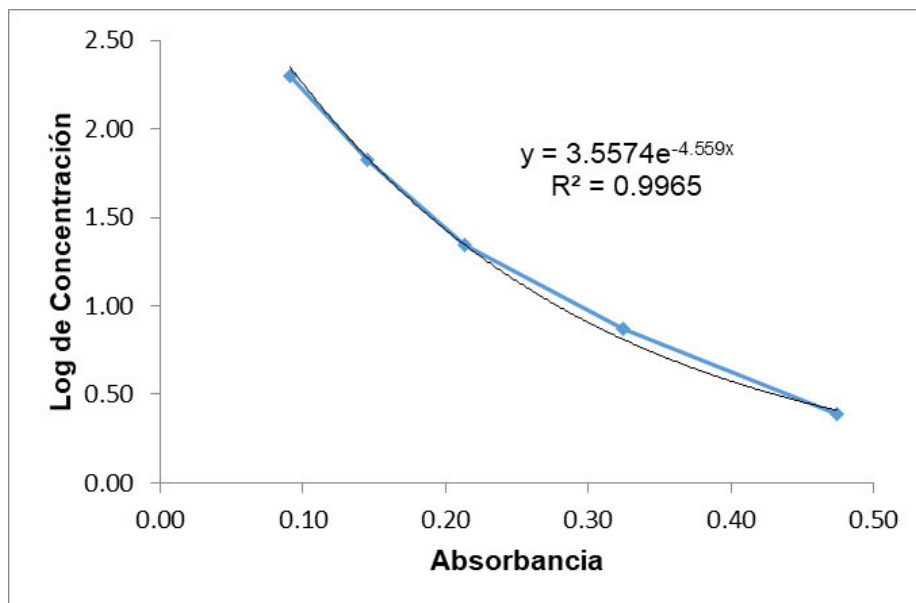


Figura 5. Curva estándar del marcador NTX1

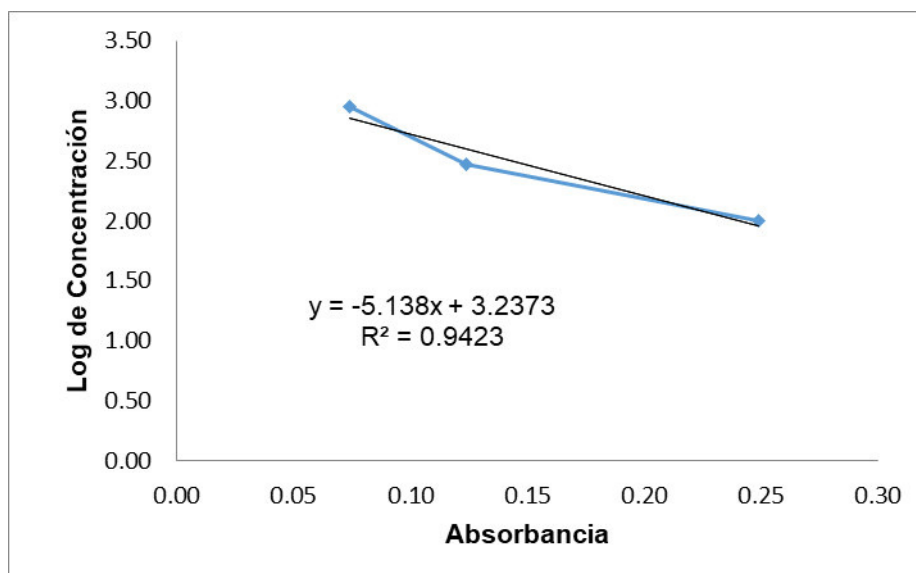


Figura 6. Curva estándar del marcador bCTX

Anexo F: Resultados de las tomas de muestra de sangre de cada voluntaria en los 3 tiempos de estudio.

Tabla 11. Concentración del marcador BALP en cada voluntaria

| Voluntaria | Concentración BALP ₁ (pg/mL) | Concentración BALP ₂ (pg/mL) | Concentración BALP ₃ (pg/mL) |
|------------|---|---|---|
| 1 | 1,0361 | 0,5893 | 0,5168 |
| 2 | 0,3417 | 0,0700 | 0,2934 |
| 3 | 0,2994 | 0,3840 | 0,2210 |
| 4 | 1,4587 | 1,0481 | 0,5953 |
| 5 | 0,3296 | -0,0145 | 0,0760 |
| 6 | 0,9878 | 0,4142 | 0,6195 |
| 7 | 0,6074 | 0,1243 | 0,1908 |
| 8 | 0,5228 | 0,7764 | 0,1666 |
| 9 | 0,2994 | 0,0821 | 0,1002 |
| 10 | 0,6074 | 0,3598 | 0,2330 |
| 11 | 1,1085 | 1,3983 | 0,8851 |
| 12 | 0,5953 | 0,3961 | 2,6240 |
| 13 | 0,3719 | 1,4285 | 0,2994 |
| 14 | 1,2595 | 0,5651 | 0,3719 |
| 15 | 1,1025 | 0,6678 | 0,5047 |
| 16 | 2,5637 | 1,9478 | 0,7583 |
| 17 | 0,3598 | 0,3900 | 0,2330 |
| 18 | 0,3719 | 0,2572 | 0,5530 |
| 19 | 0,4564 | 0,0579 | 0,3357 |
| 20 | 1,4346 | 0,7885 | 1,4587 |
| 21 | 1,2293 | 0,7342 | 0,7885 |

Tabla 12. Concentración del marcador P1NP en cada voluntaria

| Voluntaria | Concentración P1NP ₁ (pg/mL) | Concentración P1NP ₂ (pg/mL) | Concentración P1NP ₃ (pg/mL) |
|------------|---|---|---|
| 1 | 114,2185 | 117,3430 | 206,3895 |
| 2 | 384,4826 | 359,4871 | 304,8094 |
| 3 | 186,0806 | 109,5319 | 209,5139 |
| 4 | 150,1496 | 176,7073 | 143,9007 |
| 5 | 336,0538 | 256,3805 | 248,5694 |
| 6 | 117,3430 | 192,3295 | 184,5184 |
| 7 | 225,1361 | 131,4029 | 136,0896 |
| 8 | 93,9097 | 151,7118 | 128,2785 |
| 9 | 170,4584 | 167,3340 | 132,9652 |
| 10 | 156,3985 | 112,6563 | 103,2830 |
| 11 | 206,3895 | 282,9383 | 401,6670 |
| 12 | 276,6894 | 284,5005 | 248,5694 |
| 13 | 300,1227 | 170,4584 | 212,6384 |
| 14 | 95,4719 | 167,3340 | 222,0117 |
| 15 | 262,6294 | 301,6849 | 206,3895 |
| 16 | 204,8273 | 204,8273 | 72,0386 |
| 17 | 150,1496 | 214,2006 | 42,3564 |
| 18 | 86,0986 | 165,7718 | 239,1961 |
| 19 | 129,8407 | 75,1630 | 137,6518 |
| 20 | 107,9696 | 142,3385 | 172,0207 |
| 21 | 104,8452 | 61,1030 | 56,4164 |

Tabla 13. Concentración del marcador NTX1 en cada voluntaria

| Voluntaria | Concentración NTX1 ₁ (ng/mL) | Concentración NTX1 ₂ (ng/mL) | Concentración NTX1 ₃ (ng/mL) |
|------------|---|---|---|
| 1 | 1,3659 | 1,1788 | 1,0941 |
| 2 | 1,3111 | 1,2158 | 1,4420 |
| 3 | 1,0785 | 1,2855 | 0,9398 |
| 4 | 1,7358 | 0,7889 | 0,8914 |
| 5 | 1,3275 | 1,5146 | 0,9213 |
| 6 | 1,3360 | 1,0187 | 0,9312 |
| 7 | 1,4143 | 1,8340 | 0,8722 |
| 8 | 1,3687 | 1,4904 | 0,9028 |
| 9 | 1,1923 | 1,1745 | 0,9362 |
| 10 | 1,2193 | 1,0735 | 0,7676 |
| 11 | 1,1937 | 0,9967 | 1,1574 |
| 12 | 1,4555 | 0,4332 | 0,9632 |
| 13 | 1,1375 | 1,0586 | 1,3972 |
| 14 | 0,7463 | 1,2378 | 1,2058 |
| 15 | 1,0564 | 1,7564 | 0,9945 |
| 16 | 1,2364 | 1,2841 | 1,0685 |
| 17 | 1,2720 | 1,1311 | 1,1759 |
| 18 | 1,4292 | 1,0223 | 1,8447 |
| 19 | 1,2649 | 1,2072 | 1,1361 |
| 20 | 1,0913 | 0,9298 | 1,0984 |
| 21 | 1,2869 | 1,3609 | 0,9355 |

Tabla 14. Concentración del marcador bCTX en cada voluntaria

| Voluntaria | Concentración bCTX ₁ (pg/mL) | Concentración bCTX ₂ (pg/mL) | Concentración bCTX ₃ (pg/mL) |
|------------|--|--|--|
| 1 | 1,2849 | 1,9990 | 1,9425 |
| 2 | 0,7505 | -0,4621 | 0,3241 |
| 3 | 1,9888 | 1,2129 | 0,3754 |
| 4 | 1,5366 | 2,2354 | 1,4441 |
| 5 | 1,7370 | 2,4769 | 2,4101 |
| 6 | 1,7062 | 2,3022 | 1,6497 |
| 7 | 1,4082 | 1,8963 | 1,8757 |
| 8 | 0,7916 | 2,2251 | 2,0196 |
| 9 | 1,4287 | 1,7627 | 1,8706 |
| 10 | 1,7730 | 1,6240 | 1,6497 |
| 11 | 1,5726 | 0,0826 | 0,7659 |
| 12 | 0,9869 | -0,1024 | 1,7473 |
| 13 | 1,5212 | 1,5469 | 1,5623 |
| 14 | 2,0247 | 2,1532 | 2,0607 |
| 15 | 1,5572 | 1,6086 | 1,8603 |
| 16 | 1,7832 | 1,8500 | 2,0196 |
| 17 | 2,1378 | 1,9785 | 2,0658 |
| 18 | 1,9014 | 1,7781 | 1,9836 |
| 19 | 2,0813 | 2,1429 | 2,2200 |
| 20 | 1,9888 | 1,6548 | 1,7267 |
| 21 | 1,5675 | 1,2283 | 2,2868 |

Anexo G: Correlaciones de Pearson

Correlaciones

| | Diferencia ConcBALP3 - ConcBALP1 |
|----------------------------------|----------------------------------|
| Diferencia ConcBALP3 - ConcBALP1 | 1 |
| edad | ,005 |
| IMC | ,341 |
| num_hijos | -,074 |
| U_menstruacion | ,002 |
| adherencia adherencia | -,073 |

Correlaciones

| | Diferencia NTXpgmLT3 - NTXpgmLT1 |
|---|----------------------------------|
| NTX1ngmLT_31 Diferencia NTXpgmLT3 - NTXpgmLT1 | 1 |
| edad | -,143 |
| IMC | -,070 |
| num_hijos | ,220 |
| U_menstruacion | ,219 |
| adherencia adherencia | ,266 |

Correlaciones

| | Diferencia bCTXpgmLT3 - bCTXpgmLT1 |
|--|------------------------------------|
| bCTXpgmLT31_dif Diferencia bCTXpgmLT3 - bCTXpgmLT1 | 1 |
| edad | ,232 |
| IMC | ,138 |
| num_hijos | -,268 |
| U_menstruacion | ,156 |
| adherencia adherencia | ,015 |

Correlaciones

| | Diferencia ConcP1NPpgmL_B - ConcP1NPpgmL |
|--|--|
| Diferencia ConcP1NPpgmL_B - ConcP1NPpgmL | 1 |
| edad | ,087 |
| IMC | -,045 |
| num_hijos | ,063 |
| U_menstruacion | ,269 |
| adherencia adherencia | -,170 |

Rangos

| | habit_alim Hábitos alimenticios | N | Rango promedio |
|---|------------------------------------|----|-------------------|
| bCTXpgmLT31_dif Diferencia bCTXpgmLT3 - bCTXpgmLT1 | 1 buenos hábitos | 1 | 8,00 |
| | 2 regular | 6 | 11,67 |
| | 3 Deficiente | 14 | 10,93 |
| | Total | 21 | |
| NTX1ngmLT_31 Diferencia NTXpgmLT3 - NTXpgmLT1 | 1 buenos hábitos | 1 | 7,00 |
| | 2 regular | 6 | 11,33 |
| | 3 Deficiente | 14 | 11,14 |
| | Total | 21 | |
| P1NP_dif31 Diferencia ConcP1NPpgmL_B - ConcP1NPpgmL | 1 buenos hábitos | 1 | 17,00 |
| | 2 regular | 6 | 11,67 |
| | 3 Deficiente | 14 | 10,29 |
| | Total | 21 | |
| ConcBALP_dif31 Diferencia ConcBALP3 - ConcBALP1 | 1 buenos hábitos | 1 | 9,00 |
| | 2 regular | 6 | 11,33 |
| | 3 Deficiente | 14 | 11,00 |
| | Total | 21 | |

Anexo H: Prueba de Kruskal-Wallis

a,b

| | bCTXpgmLT3 1_dif Diferencia bCTXpgmLT3 - bCTXpgmLT1 | NTX1ngmLT_ 31 Diferencia NTXpgmLT3 - NTXpgmLT1 | P1NP_dif31 Diferencia ConcP1NPpg mL_B - ConcP1NPpg mL | ConcBALP_di f31 Diferencia ConcBALP3 - ConcBALP1 |
|---------------|--|---|--|---|
| Chi-cuadrado | ,305 | ,440 | 1,191 | ,121 |
| gl | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Sig. asintót. | ,859 | ,802 | ,551 | ,941 |

Prueba de Kruskal-Wallis

Variable de agrupación: habit_alim Habitos alimenticios

Anexo I: Evaluación de la capacidad antioxidante empleando el Método ABTS

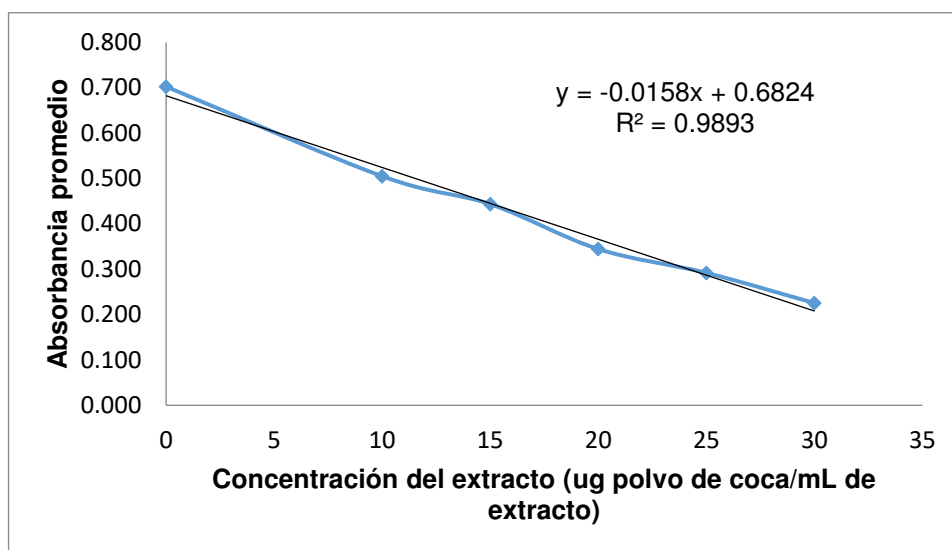


Figura 7. Absorbancias promedio del extracto 1 de pulverizado de hoja de coca

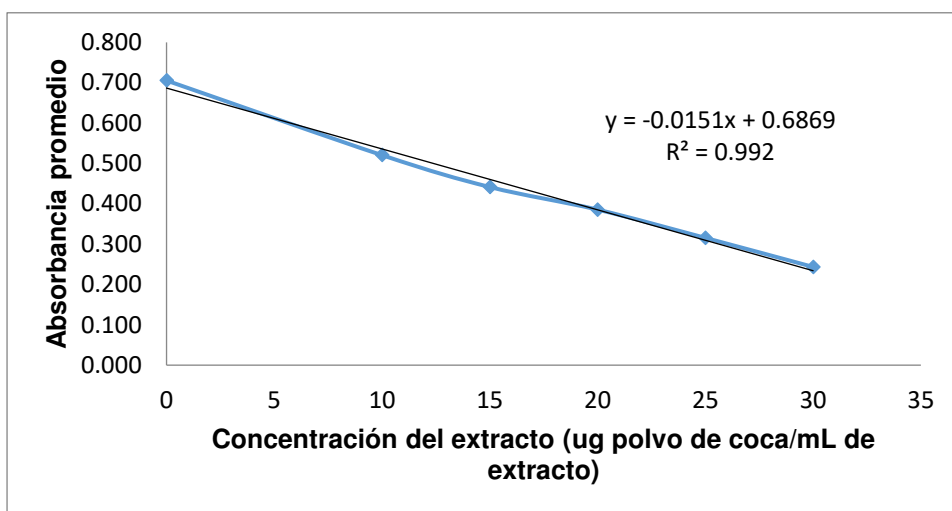


Figura 8. Absorbancias promedio del extracto 2 de pulverizado de hoja de coca

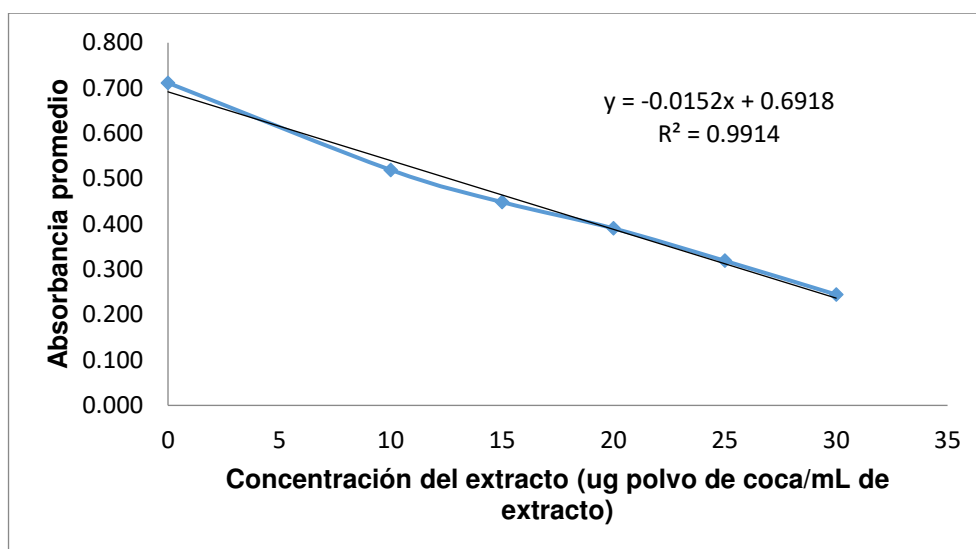
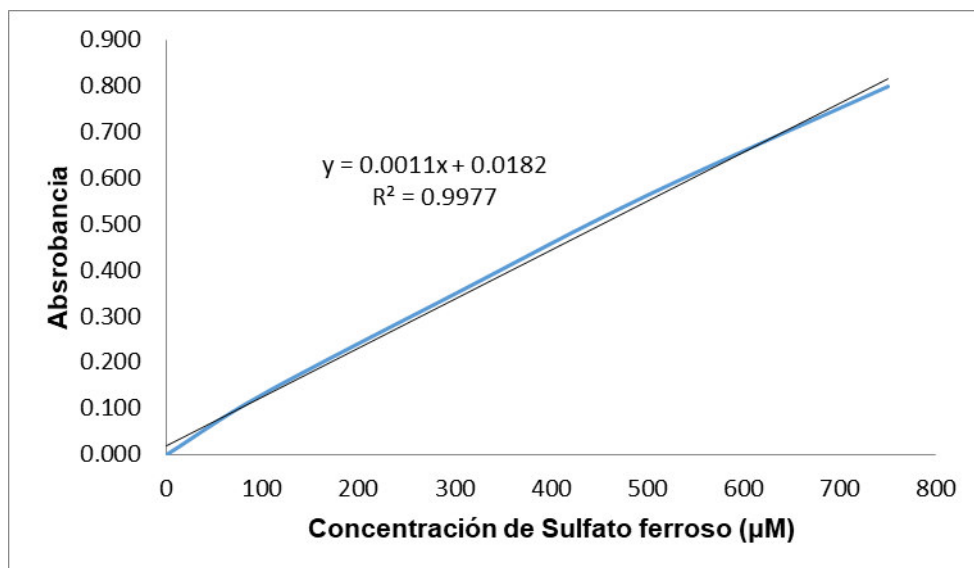
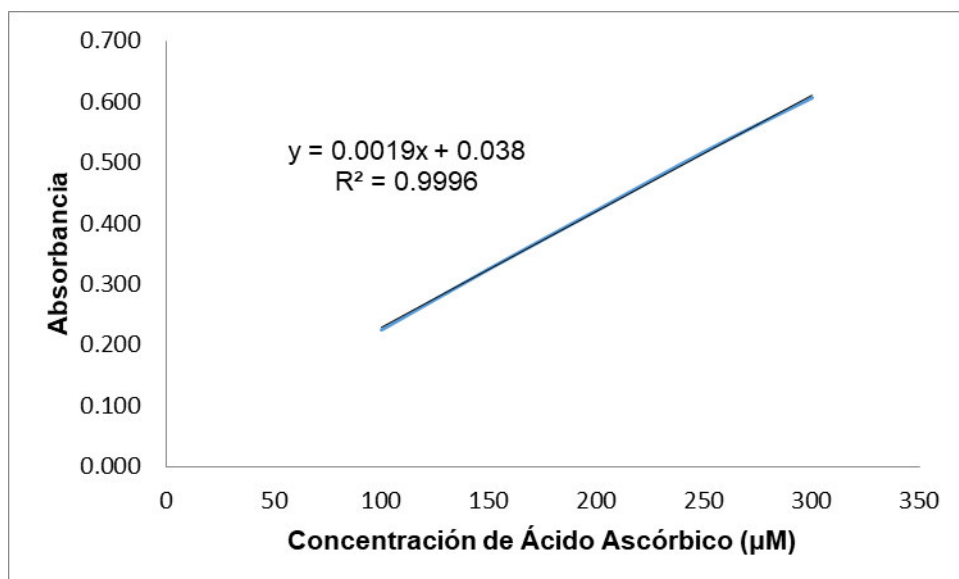


Figura 9. Absorbancias promedio del extracto 3 de pulverizado de hoja de coca

Tabla 15. Porcentaje de captación promedio de los 3 extractos de Pulverizado de coca

| | | | | PROMEDIO |
|----|------|------|------|----------|
| 10 | 28.1 | 26.2 | 27.0 | 27.1 |
| 15 | 36.9 | 37.4 | 37.0 | 37.1 |
| 20 | 51.0 | 45.4 | 45.1 | 47.1 |
| 25 | 58.4 | 55.3 | 55.2 | 56.3 |
| 30 | 67.9 | 65.5 | 65.6 | 66.3 |

Anexo J: Método FRAP con sulfato ferroso y ácido ascórbico**Figura 10. Método FRAP con Sulfato Ferroso****Figura 11. Método FRAP con Ácido Ascórbico**