

1. Ingeniera de Industrias Alimentarias, Unidad de Posgrado de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú
2. Doctor en Farmacia y Bioquímica, Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

El material contenido en el manuscrito no ha sido publicado previamente o remitido a otra revista biomédica.

Se obtuvo el consentimiento del Comité de Ética de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y de las mujeres voluntarias para la investigación.

**Origen del apoyo recibido:** equipos del laboratorio y reactivos del Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición de la Facultad de Medicina de la UNMSM y de los laboratorios del Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins, Lima, Perú

**Conflicto de intereses:** Kusy Trigo es gerente general de la microempresa Campos de Vida EIRL, que elabora productos con pulverizado de hoja de coca.

**Recibido:** 18 enero 2017

**Aceptado:** 16 marzo 2017

**Correspondencia:**

Kusy Trigo P.

📍 Jr. Leoncio Prado 497 Magdalena.

☎ 999589942

✉ trigucha@gmail.com

Citar como: Trigo-Pérez K, Suárez-Cunza S. Evaluation of the effect of coca leaf powder consumption on bone turnover in postmenopausal women. Rev Peru Ginecol Obstet. 2017;63(4):519-527

# Evaluation of the effect of coca leaf powder consumption on bone turnover in postmenopausal women

## Evaluación del efecto del consumo de hoja de coca pulverizada en marcadores de recambio óseo en mujeres posmenopáusicas

Kusy Trigo-Pérez<sup>1</sup>, Silvia Suárez-Cunza<sup>2</sup>

### ABSTRACT

**Introduction:** Every year, about 25 million women all over the world experience menopause. Nearly 30% of them will suffer from osteoporosis. Conventional treatments tend to have side effects. In Peru, we have *Erythroxylum coca*, a vegetal alternative high in calcium, fiber and polyphenols. **Objectives:** To test the effects of the consumption of coca leaf powder in postmenopausal women and analyze the antioxidant capacity of coca leaf powder. **Design:** Quantitative, quasi-experimental, pre-test post-test study. **Institution:** Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. **Participants:** Volunteer postmenopausal women. **Methodology:** Unique and self-controlled treatment of 25 volunteers who met inclusion and exclusion criteria. Twenty one completed the treatment, which consisted of the daily ingestion of 4 g of coca leaf powder mixed with water for a period of 90 days. They kept their regular diet and lifestyle. Three blood samples per volunteer were taken before, after 45 and 90 days of treatment. **Main outcomes:** We measured procollagen 1 N-terminal propeptide (P1NP), N-telopeptide of type 1 collagen (NTX1), beta-crosslaps (BCTX) and human bone alkaline phosphatase (BALP) in the volunteers. TEAC-ABTS (Trolox equivalent antioxidant capacity), FRAP (Ferric reducing antioxidant power) and polyphenols were determined in coca leaf powder. **Results:** A significant decrease in the bone resorption indicator NTX1 (from 12.719 to 0.9945 ng/mL;  $p < 0.05$ ) was found. The bone formation indicator P1NP had a positive median difference. Coca leaf 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 show coca leaf powder could potentially benefit bone metabolism. **Conclusion:** The incorporation of coca leaf powder into the regular diet for a period of 90 days generated a change in the indicators of bone density in women.

**Keywords:** Bone turnover, *Erythroxylum coca*, Antioxidant capacity.

### RESUMEN

**Introducción.** Anualmente, cerca de 25 millones de mujeres en el mundo ingresan a la menopausia; alrededor de 30% sufrirá osteoporosis. Los tratamientos convencionales suelen tener efectos colaterales. En el Perú, existen alternativas en los recursos vegetales, como el *Erythroxylum coca*, con alto contenido de calcio, fibra y polifenoles. **Objetivos.** Evaluar el efecto del consumo de coca pulverizada en mujeres posmenopáusicas, y analizar la capacidad antioxidante de la coca pulverizada. **Diseño.** Estudio cuantitativo, cuasiexperimental, preprueba-posprueba. **Institución.** Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. **Participantes.** Mujeres posmenopáusicas voluntarias. **Metodología.** 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. **Principales medidas de resultados.** En las voluntarias, se midió propéptido N-terminal de procolágeno tipo 1 (P1NP), telopéptido N-terminal del colágeno tipo 1 (NTX1), *beta-crosslaps* (BCTX) y fosfatasa alcalina ósea (BALP). En el micropulverizado, ABTS (capacidad antioxidante equivalente al trolox), FRAP (antioxidante potencial de reducción de hierro) y polifenoles. **Resultados.** Existió reducción significativa del marcador de resorción ósea NTX1 (de 12,719 a 0,9945 ng/mL;  $p < 0,05$ ). El marcador de formación ósea P1NP mostró una diferencia positiva 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. **Conclusiones.** La complementación de la dieta por 90 días con coca indujo cambios en indicadores de recambio óseo.

**Palabras clave.** Recambio óseo, *Erythroxylum coca*, Capacidad antioxidante.



## INTRODUCTION

Unhealthy diet and lack of physical activity are among the main causes of non-communicable diseases, such as osteoporosis<sup>(1)</sup>. There is much interest in the non-pharmacological recommendations for the attenuation of bone loss in postmenopausal women<sup>(2)</sup>, mainly due to results obtained through large-scale studies on the adverse effects of hormone replacement. Research is needed on alternative food sources, which help in the prevention and treatment of people with decreased bone mineral density.

Peru owns an important food culture and the use of coca leaf is part of its heritage<sup>(3)</sup>. The information about its benefits is still scarce but research gives significant indications of its potential for nutrition and human health<sup>(3,4)</sup>. There is evidence of non-toxicity of coca leaf, which includes its consumption by more than 300 generations of Peruvians<sup>(5)</sup>. Its usage in Peru has increased by 22.1% in 10 years<sup>(6)</sup>. 45.4% of adults believe that coca leaf should be chewed, because they consider it as medicine. 12.3% consume it in the form of pulverized leaf<sup>(6)</sup>. In 100 g of dry leaf, there are 1 011.67<sup>(4)</sup> – 2 196 mg of calcium<sup>(7)</sup>, 29.16 mg of iron, 210.95 mg of magnesium and 2.67 mg of zinc<sup>(4)</sup>. In addition, coca leaf has an important content of bioactive compounds such as polyphenols (3 780 mg GAE / 100 g)<sup>(4)</sup> and  $\beta$  carotenes (11 000 IU)<sup>(8)</sup>, and a great antioxidant capacity<sup>(8)</sup>. The latter could be another explanation for its potential beneficial effect on bone metabolism by reducing cellular toxicity and pro-inflammatory markers (IL6, TNF), thus improving the activity of osteoblasts<sup>(9)</sup>. For these reasons, coca leaf could become a viable product for the prevention and treatment of osteoporosis. The objectives of the present investigation were to evaluate the effect of coca leaf powder consumption on four biochemical markers of bone turnover in postmenopausal women before, during and after 90 days of dietary supplementation, and to estimate the antioxidant capacity and content of polyphenols of coca leaf powder.

## METHODS

We worked with pulverized coca leaf donated by farmers in the district of Uchiza, Department of San Martín. The 5% aqueous extract was pre-

## INTRODUCCIÓN

La alimentación poco saludable y la falta de actividad física figuran entre las principales causas de enfermedades no transmisibles como la osteoporosis<sup>(1)</sup>. Existe mucho interés en la recomendación no farmacológica para la atenuación de la pérdida ósea en mujeres posmenopáusicas<sup>(2)</sup>, debido principalmente a los resultados obtenidos en estudios a gran escala sobre los efectos adversos del reemplazo hormonal. Se requieren investigar alternativas terapéuticas de fuentes alimenticias que coadyuven en la prevención y tratamiento de personas con disminución de la densidad mineral ósea.

El Perú es heredero de una importante cultura alimentaria y el uso de la hoja de coca es parte de ello<sup>(3)</sup>. La información acerca de sus beneficios es aun escasa, pero lo investigado da indicios significativos de su potencial favorable para la nutrición y salud humana<sup>(3,4)</sup>. Existen evidencias de la no toxicidad de la hoja de coca, entre ellas su consumo por más de 300 generaciones<sup>(5)</sup>. Su uso en el Perú se ha incrementado 22,1% en 10 años<sup>(6)</sup>. El 45,4% de las personas adultas que creen que sí se debería *chacchar* hoja de coca, la considera medicina. El 12,3% la consume en forma de hoja molida<sup>(6)</sup>. En 100 g de hoja seca se encuentran 1 011,67<sup>(4)</sup> – 2 196 mg de calcio<sup>(7)</sup>, 29,16 mg de hierro, 210,95 mg de magnesio y 2,67 mg de zinc<sup>(4)</sup>. Adicionalmente, la hoja de coca presenta un contenido importante de compuestos bioactivos tales como polifenoles (3 780 mg AG/100 g de ms)<sup>(4)</sup> y  $\beta$  carotenos (11 000 UI)<sup>(8)</sup>; y una gran capacidad antioxidante<sup>(8)</sup>. Esto último, podría ser otra 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<sup>(9)</sup>. Por estas razones, la hoja de coca podría convertirse en un producto viable para la prevención y tratamiento de la osteoporosis. Los objetivos de la presente investigación fueron evaluar el efecto del consumo de coca pulverizada en cuatro marcadores bioquímicos de recambio óseo en mujeres posmenopáusicas antes, durante y después de la dieta enriquecida con este alimento por 90 días, y estimar la capacidad antioxidante y el contenido de polifenoles del polvo de hoja de coca.



pared by stirring for 8 h and then resting for 7 days in refrigeration. It was subject to filtration. After this, we only worked with the filtrate.

We performed the process three times. The determination of trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) was evaluated using the ABTS.+ [2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)] radical cation assay described by Re et al<sup>(10)</sup>. The dilution factor of the coca extracts was 1/10. The final concentrations of the extracts were 10, 15, 20, 25 and 30 µg of coca powder / mL. Trolox was used as the reference antioxidant. Absorbance readings were at 734 nm. The results were expressed as trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC-ABTS). The potential antioxidant ferric reducing ability test (FRAP) was performed according to Benzie<sup>(11)</sup>. The extract sample was diluted 5 times with double-distilled water. Ascorbic acid was used as standard. The absorbances were then determined at 593 nm. The results were expressed as equivalent to vitamin C (VCE), as mg VCE / g coca powder.

The determination of polyphenols or total phenols was done with the technique of Singleton and Rossi, using the reagent of Folin Ciocalteu<sup>(12)</sup>. The absorbance was measured at 760 nm. Gallic acid was used as the standard at a concentration of 40 µg / mL. The results were expressed in mg equivalents of gallic acid per 100 g of coca powder.

Because it was a single treatment and a self-controlled study, the experimental units for the evaluation of the bone turnover markers were selected in order to guarantee the homogeneity and the voluntary participation of the women in the study.

The number of experimental units (women) of 25 was determined with a significance level of 5%. The volunteers were followed from June to October 2014; four women left the program due to personal and family problems. Each woman filled out a chart with her profile and a survey of eating habits, lifestyle and medical history. The volunteers reported no symptoms or signs of cancer, diabetes, renal, hepatic or cardiac insufficiency or pathology, nor thyroid diseases; they were not using hormone replacement therapy or corticosteroids and did not have habits such as smoking, alcoholism; none suffered from fractures within less than 1 year.

## MÉTODOS

Se trabajó con hoja de coca pulverizada donada por agricultores del distrito de Uchiza, departamento de San Martín. Se preparó el extracto acuoso al 5% con agitación durante 8 h y luego en reposo por 7 días en refrigeración. Se sometió a filtración y se trabajó con el filtrado. El proceso se realizó por triplicado. La determinación de la capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC) se evaluó empleando el método del radical libre catiónico ABTS.+ [ácido 2,2'-azino-bis (3 -etilbenzotiazolina-6-sulfónico)] descrito por Re y col<sup>(10)</sup>. El factor de dilución de los extractos de coca fue de 1/10. Las concentraciones finales de los extractos fueron de 10, 15, 20, 25 y 30 µg de polvo de coca/mL de extracto. Se empleó trolox como antioxidante de referencia. Las lecturas de absorbancia fueron a 734 nm. Los resultados se expresaron como capacidad antioxidante equivalente al trolox (TEAC-ABTS). El ensayo potencial antioxidante de reducción de hierro (FRAP) se realizó de acuerdo a Benzie<sup>(11)</sup>. La muestra de extracto se diluyeron 5 veces con agua bidestilada. Se empleó como estándar el ácido ascórbico. Luego se determinaron las absorbancias a 593 nm. Los resultados se expresaron en equivalente a vitamina C (VCE), como mg VCE/g polvo de coca.

La determinación de polifenoles o fenoles totales se realizó mediante la técnica de Singleton y Rossi, empleando el reactivo de Folin Ciocalteu<sup>(12)</sup>. Se midió la absorbancia a 760 nm. El ácido gálico se usó como estándar a una concentración de 40 µg/mL. Los resultados se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico por 100 g de pulverizado de coca.

Para la evaluación de los marcadores de recambio óseo, por tratarse de un único tratamiento y ser un estudio autocontrolado, las unidades experimentales se seleccionaron buscando garantizar la homogeneidad y la participación voluntaria de las mujeres en el estudio.

Se determinó el número de unidades experimentales (mujeres) de 25, con un nivel de significación del 5%. Las voluntarias fueron observadas desde junio hasta octubre del 2014, cuatro mujeres dejaron el programa debido a problemas personales y familiares. Cada mujer llenó una ficha con su perfil y una encuesta de hábitos alimentarios y estilo de vida e historial médico.



Each volunteer was given coca leaf powder in sufficient quantity to consume 1 teaspoon (2 g) before breakfast and 1 teaspoon (2 g) at noon, for a period of 90 days. All volunteers were asked to take their normal diet and maintain their lifestyle. Fasting blood samples were taken at three moments of the investigation; the first one before starting the consumption of the powder, the second at 45 days and the third at 90 days following the start of the intake. At each meeting for the blood draw, the volunteers delivered a chart where they recorded daily whether they had complied with taking the coca powder or not and the reason for it. Women who had stopped taking it for 1 or more days continued supplementation until completion of 90 doses.

The blood samples were centrifuged at 3 500 rpm for 10 minutes and then the vials were frozen with serum at -20 °C to preserve them until the day of analysis. The serum samples were taken in a cold chain to the laboratories of the Edgardo Rebagliati Martins National Hospital, Lima, Peru. The serum bone turnover biomarkers N-terminal procollagen propeptide type 1 (P1NP), N-terminal telopeptide of collagen type 1 (NTX1) and beta-crosslaps ( $\beta$ CTX) were measured with enzyme-linked immunoassay kits (ELISA) from USCN Life Science Inc. Bone alkaline phosphatase (BALP) concentrations were obtained with the MyBioSource ELISA kit.

We applied Friedman's non-parametric test for paired samples (three moments) for the statistical analysis of the results. The changes in biochemical markers were also evaluated through Pearson's correlation coefficient by comparing the variation of concentrations before starting consumption and after 90 days of supplementation with coca leaf powder. In order to determine if dietary habits (deficient / regular / good) had any effect on the final concentrations of each biomarker, non-parametric Kruskal-Wallis analysis of variance was used.

## RESULTS

The evaluation of the aqueous extract of the coca leaf powder showed antioxidant activity in both the radical cation uptake assay (ABTS+) and the ferric reducing potential assay (FRAP). It also showed a total phenol content comparable to other vegetal resources considered as sources of polyphenols (Table 1). The IC50 versus the ABTS+ radical gave a value of 21.64  $\mu$ g / mL.

Las voluntarias refirieron no presentar síntomas ni signos de padecer cáncer, diabetes, insuficiencia o patología renal, hepática y cardíaca, enfermedades tiroideas; no empleaban terapia de reemplazo hormonal, tratamiento con corticoides ni hábitos como tabaquismo, alcoholismo; no habían tenido fracturas en al menos 1 año.

A cada voluntaria se le proporcionó hoja de coca pulverizada en cantidad suficiente para que consumiera diariamente 1 cucharadita (2 g) en ayunas con agua y 1 cucharadita (2 g) al medio día, por un periodo de 90 días. A todas las voluntarias se les pidió llevar su dieta normal y mantener su estilo de vida. Se tomaron muestras de sangre en ayuno 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. A las mujeres que dejaron de tomar 1 o más días se les prolongó el plazo hasta el cumplimiento de los 90 días.

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. Las muestras séricas fueron llevadas en cadena de frío a los laboratorios del Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins, Lima, Perú. Los niveles de biomarcadores de recambio óseo en suero, el propéptido N-terminal de procolágeno tipo 1 (P1NP), el telopéptido N-terminal del colágeno tipo 1 (NTX1) y el *beta-crosslaps* ( $\beta$ 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.

Para el análisis estadístico de los resultados, se aplicó la prueba no paramétrica de Friedman para muestras emparejadas (tres momentos). 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)



Regarding bone turnover markers, changes were observed in the results of a bone resorption indicator and in an indicator of bone formation (Table 2).

The four markers had a low positive correlation with the characteristics evaluated. The volunteers with a longer time since their last menstrual period had a higher concentration of the P1NP marker, favoring the process of bone formation. The NTX1 bone resorption marker revealed that women who had more children and had shown greater adherence during the study manifested greater variation of this marker over time, reducing the resorption.

We observed no differences in the final concentrations of each biomarker due to the influence of eating habits.

## DISCUSSION

Due to their biological and analytical variability, available data on the same bone marker are limited to the comparison of the treatment results<sup>(13)</sup>. The NTX1 bone resorption marker decreased significantly after coca leaf powder use for 90 days (Table 2). In addition, the P1NP bone formation marker did not reveal a significant effect but showed a positive and beneficial difference of medians. This could be partially explained by the high content of calcium (1 011.67 – 2 196 mg of calcium mg)<sup>(4,7)</sup> and cofactors of an-

tenían algún efecto sobre las concentraciones finales de cada biomarcador, se utilizó el análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis.

## RESULTADOS

La evaluación del extracto acuoso del micropulverizado de coca mostró actividad antioxidante en las dos técnicas, captación de radicales libres (ABTS+) y potencial reductor de hierro (FRAP); también mostró un contenido de fenoles totales comparable a otros recursos vegetales considerados como fuentes de polifenoles (tabla 1). El IC50 frente al radical ABTS+ dio un valor de 21,64 µg/mL.

En los marcadores bioquímicos de recambio óseo se observaron modificación en los resultados de un indicador de resorción ósea y en un indicador de formación ósea (tabla 2).

Se observó que los cuatro marcadores tuvieron correlación positiva baja con las características evaluadas. 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 una mayor adherencia durante el estudio, mostraron mayor variación de este marcador en el tiempo, reduciendo la resorción.

TABLE 1. RESULTS OF THE ANTIOXIDANT PARAMETERS OF THE COCA LEAF POWDER

Test	Content
TEAC-ABTS (µmol trolox / mL extract)	2.74
FRAP (mg ascorbic acid / g coca powder)	73.60
Polyphenols (mg GAE / 100 g coca powder)	3 089.34

TABLE 1. RESULTADOS DE LOS PARÁMETROS ANTIOXIDANTES DE LA HOJA DE COCA PULVERIZADA

Prueba	Contenido
TEAC-ABTS (µmol trolox/ mL extracto)	2,74
FRAP (mg ácido ascórbico/ g polvo de coca)	73,60
Polifenoles (mg AG/ 100 g polvo de coca)	3089,34

TABLE 2. EVALUATION OF BIOMARKERS OF BONE FORMATION AND RESORPTION IN POSTMENOPAUSAL WOMEN AFTER CONSUMPTION OF COCA LEAF POWDER FOR 90 DAYS, APPLYING THE FRIEDMAN TEST.

Markers	Time (days)			p*
	Start	45	90	
BALP (ng/mL)	0.6073	0.4141	0.3719	0.002 <sup>a</sup>
P1NP (pg/mL)	156.39	167.33	184.51	0.688
NTX1(ng/mL)	12.719	11.787	0.9945	0.047 <sup>a</sup>
βCTX (pg/mL)	15.725	17.781	18.705	0.368

\*Friedman Test. a: significant, p<0,05. n= 21

TABLE 2. 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.

Marcadores	Tiempo (días)			p*
	Inicio	45	90	
BALP (ng/mL)	0,6073	0,4141	0,3719	0,002 <sup>a</sup>
P1NP (pg/mL)	156,39	167,33	184,51	0,688
NTX1(ng/mL)	12,719	11,787	0,9945	0,047 <sup>a</sup>
βCTX (pg/mL)	15,725	17,781	18,705	0,368

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



tioxidant enzymes such as magnesium (210.95 mg)<sup>(4)</sup>, zinc (2.67 mg) and iron (29.16 mg) of the coca leaf, as well as polyphenols (3 089.34 mg GAE)<sup>(4)</sup>. The biochemical mechanisms by which powdered coca would generate these effects are unknown. However, it was established that a small daily ration of 4 g generated beneficial and relevant effects in two biomarkers.

As for the BALP and  $\beta$ -CTX markers, unexpected results were obtained (Table 2). The  $\beta$ -CTX resorption marker should have been reduced. Several studies have shown that after the start of antiresorptive therapy, the results may be very heterogeneous, such as a significant decrease in bone resorption markers between weeks 4 and 6<sup>(14)</sup> or the initial decrease in  $\beta$ -CTX values followed by an increase after the sixth month of treatment<sup>(15)</sup>. This could be corrected by prolonging the evaluation time. We had expected the bone formation marker BALP to increase over time, but it decreased. This could be due to the alteration of the enzyme since the samples were thawed twice. The protein tertiary structure (native conformation) is what determines the enzymatic activity; any perturbation of this structure can lead to a loss of activity. Another source of variability are associated diseases. Since no clinical analysis was performed on volunteers to rule out diseases, the increase in BALP might have been caused by the interference of hepatic isoenzymes<sup>(13)</sup>.

The coca leaf powder could intervene in bone metabolism through different mechanisms of bone formation, bone resorption, serum calcium, vitamin D, intestinal absorption or inflammatory mediators. However, the exact mechanism of action has not yet been determined due to lack of studies. In addition to the high calcium content and cofactors of antioxidant enzymes, coca leaf represents a potential source of insoluble dietary fiber, as it contains 38.02 g / 100 g<sup>(4)</sup>. Some studies have shown that colonic fermentation of non-digestible carbohydrates improved the absorption of minerals such as calcium, magnesium and iron. This may have positive implications, such as increased bone density<sup>(16)</sup>.

In addition, the literature reports that other dietary components may favorably affect the menopausal population. The study reported by Nash and Ward<sup>(9)</sup> states that habitual tea intake is associated with increased bone mineral densi-

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

## DISCUSIÓN

Debido a su variabilidad biológica y analítica, los datos disponibles sobre el mismo marcador de hueso se limitan a la comparación de los resultados del tratamiento<sup>(13)</sup>. El marcador de resorción ósea NTX1 disminuyó significativamente después del consumo de coca durante 90 días (tabla 2). Además, el marcador de formación ósea P1NP no reveló un efecto significativo pero sí una positiva y beneficiosa diferencia de medianas.

Esto podría explicarse parcialmente por el importante contenido en calcio (1 011,67 – 2 196 mg de calcio mg)<sup>(4,7)</sup> y cofactores de enzimas antioxidantes como magnesio (210,95 mg)<sup>(4)</sup>, zinc (2,67 mg) y hierro (29,16 mg) de la hoja de coca, así como polifenoles (3 089,34 mg AG)<sup>(4)</sup>. 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.

En cuanto a los marcadores BALP y  $\beta$ -CTX, se obtuvieron resultados no esperados (tabla 2). El marcador de resorción  $\beta$ -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<sup>(14)</sup> o la disminución inicial de los valores del  $\beta$ -CTX, pero, un aumento después del sexto mes de tratamiento<sup>(15)</sup>. 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<sup>(13)</sup>.



ty, particularly in postmenopausal women. Polyphenols were associated with higher markers of differentiation (osteopontin, sclerostin) and reduced cell toxicity and proinflammatory markers (IL6, TNF), enhancing osteoblast activity. This association may be due to its polyphenols, resulting in protective antioxidant effects.

The antioxidant capacity of the aqueous extract of pulverized coca and the significant content of total phenols (Table 1) could then contribute to the cytoprotective mechanisms of bone remodeling. The content of polyphenols obtained was 3 089.34 mg GAE/100 g of a dry sample, a value similar to that mentioned by Penny<sup>(4)</sup> of 3 780 mg GAE/100 g. Green tea, a prominent nutrient in this compound, contains between 2 070 mg GAE/100 g and 3 600 mg GAE /100 g<sup>(17)</sup>. Coca powder should be included in the list of foods with the highest contribution of this important bioactive compound. Powdered coca, which has an average polyphenol content of 1.54 g GAE/L, exceeded 51 Chinese plants that gave 0.48 g GAE/L<sup>(18)</sup> as their average content. It would be important to characterize their polyphenols in order to know which ones stand out and their specific benefits.

The antioxidant activity expressed as TEAC-ABTS resulted in 2.74  $\mu\text{mol}$  trolox/mL extract. This is an appreciable value considering that the preparation was performed in cold, compared to the results of herbal infusions in hot water made by Muñoz et al.<sup>(19)</sup>, with values of 3.61  $\mu\text{mol}$ /mL for boldo and 4.90  $\mu\text{mol}$ /mL for green tea. Coca powder is revealed as an option for antiradical activity. Taking the IC50 value of 21.64  $\mu\text{g}$ /mL with this free radical, pulverized coca also shows a good antioxidant activity compared to the green tea IC50 value of 209.74  $\mu\text{g}$ /mL<sup>(20)</sup>. It takes 9 times less coca powder than green tea to inhibit the oxidation of ABTS, a considerable difference. The ferric reducing power (FRAP) was 73.60 mg AAE/g (Table 1), a much higher value than that reported for green tea with 5.86 mg AAE/g<sup>(21)</sup>.

Finally, the results showed that a small daily ration of coca leaf powder of 4 g generated beneficial effects of two biomarkers, one of formation and another of resorption. With the obtained results and the comparative discussion with the reviewed literature, it can be proposed that the potential of the pulverized coca leaf is not

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/100 g<sup>(4)</sup>. 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<sup>(16)</sup>.

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<sup>(9)</sup> afirma que la ingesta habitual de té está asociada con una mayor densidad mineral ósea, particularmente en mujeres posmenopáusicas. 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 (tabla 1) 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<sup>(4)</sup> 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<sup>(17)</sup>. El polvo de coca debería ingresar a la lista de alimentos con mayor aporte de este importante compuesto bioactivo. La coca pulverizada superó a 51 plantas chinas que dieron 0,48 g AG/L<sup>(18)</sup> como contenido promedio de polifenoles y el polvo de coca con un valor de 1,54 g AG/L; sería importante caracterizar sus polifenoles para conocer en cuáles destaca y sus beneficios específicos.

La actividad antioxidante expresada como TEAC-ABTS, resultó 2,74  $\mu\text{mol}$  trolox/mL extracto, va-



only a function of the high calcium content but also of the secondary metabolites, especially polyphenols, that can contribute to a favorable modification of the markers of bone turnover in the postmenopausal population. In addition, and importantly, all volunteers complied with the prescription of coca leaf powder. This degree of adherence and persistence during the 90-day period of supplementation of the diet reflects the good acceptance of this product.

## ACKNOWLEDGMENTS

To the Center for Research in Biochemistry and Nutrition of the Faculty of Medicine of the Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Peru, for the facilitation of the laboratory equipment and reagents. To Mg. Ysela Agüero Palacios, professor of the Faculty of Mathematics of the UNMSM, for her advice. To Willy Cerón.

## REFERENCES

1. Organización Mundial de la Salud. Estrategia mundial sobre régimen alimentario, actividad física y salud. 2004. Ginebra: OMS; 2004. Available in: [http://www.who.int/dietphysicalactivity/strategy/eb11344/strategy\\_spanish\\_web.pdf](http://www.who.int/dietphysicalactivity/strategy/eb11344/strategy_spanish_web.pdf). Obtained on September 9, 2013.
2. Bonjour JP, Brandolini-Bunlon M, Boirie Y, Morel-Laporte F, Braesco V, Bertiere MC, Souberbielle JC. Inhibition of bone turnover by milk intake in postmenopausal women. *Br J Nutr* 2008;100:866-74.
3. Hurtado C. Harina de coca. Editorial Juan Gutemberg. 2006.
4. Penny M, Zavaleta A, Lemay M, Liria MR, Huaylinas ML, Alminger, et al. Can coca leaves contribute to improving the nutritional status of the Andean population? *Food Nutr Bulletin*. 2009;30(3):205-12.
5. Ramos R. Connotaciones metabólicas y fisiológicas del uso de la cocaína en animales de experimentación y su relación con el cocaísmo- primera parte. *Boletín de la Academia Peruana de Farmacia*. Lima, Perú. 1987:289-300.
6. Instituto Nacional de Estadística e Informática. Encuesta nacional de hogares sobre consumo de Hoja de Coca 2013. Lima: INEI; 2013.
7. Collazos C, Urquieta R, Alvistur E. Nutrición y coqueo. *Rev Viernes Médico*. 1965;6(1):36-44.
8. Documet L. Caracterización físico-química y determinación de sus propiedades físicas y fisiológicas del subproducto "Borra de hoja de Coca" (Tesis de Licenciatura). Lima, Perú: UNALM, 2004:93 pp.
9. Nash LA, Ward WE. Comparison of black, green and rooibos tea on osteoblast activity. *Food Funct*. 2016 Feb;7(2):1166-75. doi: 10.1039/c5fo01222h.
10. Re R, Pellegrin N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*.

lor 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 col.<sup>(19)</sup>, en los que obtuvo valores de 3,61  $\mu\text{mol/mL}$  para el boldo y 4,90  $\mu\text{mol/mL}$  para el té verde. El polvo de coca se revela como una opción para la actividad antirradical. Tomando como resultado el valor obtenido del IC50 de 21,64  $\mu\text{g/mL}$  con este radical libre, la coca molida también demuestra tener una buena actividad antioxidante comparada con el IC50 del té verde de 209,74  $\mu\text{g/mL}$ <sup>(20)</sup>. 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 (tabla 1), valor mucho mayor que el reportado para el té verde con 5,86 mg AAE/g<sup>(21)</sup>.

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 solo 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 posmenopáusicas. 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.

## AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú, por la facilitación de equipos y reactivos de laboratorio. A la Mg. Ysela Agüero Palacios, profesora de la Facultad de Matemáticas de la UNMSM, por su asesoría. A Willy Cerón.





- 1999;26:1231-7.
11. Benzie I, Strain J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP Assay. *Anal Biochem* 1996;239(1):70-6.
  12. Singleton V, Rossi J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic*. 1965;16:144-58.
  13. Hlaing TT, Compston J. Biochemical markers of bone turnover – uses and limitations. *Clin Biochem*. 2014;51(2):189-202. doi: 10.1177/0004563213515190.
  14. Torres E, Mezquita P, De la Higuera M, Fernández D, Muñoz M. Actualización sobre la determinación de marcadores de remodelado óseo. *Endocrinol Nutr*. 2003;50(6):237-43.
  15. Tu MY, Chen HL, Tung YT, Kao CC, Hu FC, Chen CM. 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*. 2015;10(12):1-17. doi: 10.1371/journal.pone.0144231.
  16. Gray J. *Fibra dietética definición, análisis, fisiología y salud*. Bruselas: International Life Sciences Institute (ILSI). 2006:1-37.
  17. Pal S, Ghosh D, Saha C, Kumar A, Datta S, Kumar S. Total polyphenol content, antioxidant activity and lipid peroxidation inhibition efficacy of branded tea (*Camelia sinensis*) available in India. *Int J Tea Sci*. 2012;8:13-20.
  18. Fu L, Xu BT, Gan RY, Zhang Y, Xu XR, Xia EQ, Li HB. Total phenolic contents and antioxidant capacities of herbal. *Int J Mol Sci*. 2011;12:2112-24. doi: 10.3390/ijms12042112.
  19. Muñoz E, Rivas K, Loarca MG, Mendoza S, Reynoso R, Ramos M. Comparación del contenido fenólico, capacidad antioxidante y actividad antiinflamatoria de infusiones herbales comerciales. *Rev Mex Cienc Agric*. Mayo 2012;3(3):481-95.
  20. XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Guadalajara; 21-26 de Junio de 2015. Guadalajara: Universidad Autónoma de Nuevo León; 2015.
  21. Avneet K, Milandeep K, Prabhjot K, Harpreet K, Sarbjeet K, Khushwinderjit K. Estimation and comparison of total phenolic and total antioxidants in green tea and black tea. *Global J Biosci Biotechnol* [serial on the internet]. 2015 [cited 2016 Aug 28];4(1):[about 5p.]. Available at: [http://scienceandnature.org/GJBB\\_Vol4\(1\)2015/GJBB-V4\(1\)2015-23.pdf](http://scienceandnature.org/GJBB_Vol4(1)2015/GJBB-V4(1)2015-23.pdf) Obtained on July 30, 2016.

