

FRACCIONAMIENTO QUÍMICO DE LA HOJA DE COCA Y OBTENCIÓN DE UN PRODUCTO RICO EN PROTEÍNAS.

Róger Ramos-Aliaga*

RESUMEN

Se ha obtenido un producto blando, pegajoso y de color pardo claro derivado de la hoja de coca (valle de La Convención, Cuzco; *E. coca* var. *coca*) semiseca, liberada de sus principales componentes naturales (humedad, grasa, alcaloides, clorofila, taninos) y probablemente, también, de otros productos formados durante su secado (complejos de carbohidratos y alcaloides con proteínas) con el uso de diversos métodos y solventes de extracción [secado, extracción con éter dietílico a reflujo y con mezclas de acetona y agua (85:15 v/v) en frío y de acetona y etanol (80:30 v/v) a reflujo]. Del producto residual se ha extraído, identificado y evaluado su contenido de proteínas y aminoácidos según los solventes y condiciones de extracción utilizados (agua fría, agua BM 100 °C NaHCO₃ 0.1M, pH 8.5 y HCl 1N BM 100 °C) dejando una fracción final de fibra que fue, igualmente, determinada. Se considera que este producto rico en proteínas, sin estar exento totalmente de otros compuestos químicos (fibra), puede ser una fuente adecuada de proteínas para los estudios químicos y nutricionales respectivos.

Palabras clave: hoja de coca, proteína vegetal, coqueo, aminoácidos

ABSTRACT

A soft glutinous and light brown product derived from the coca leaf (Convención Valley, Cuzco; *E. coca* var. *coca*) treated successively with different methods and solvents [dried at 100 °C, extraction by refluxing with diethyl ether and with both cold acetone: water mixture (85:15 v/v) and by refluxing with acetone: ethanol mixture (70:30 v/v)] for removing its main natural chemical components (moisture, fat, alkaloids, chlorophyll, tannins) as well as other probably substances formed by its environment drying (carbohydrates – and alkaloids – protein complexes) has been obtained. From this residual fragment it has been isolated, identified and evaluated its protein and aminoacids contents according to what solvent and extraction condition it was used (cold water, hot, – 100 °C – water, 0.1M NaHCO₃, pH 8.5 and hot – 100 °C- 1N HCl). At the end a last fragment of fiber was also determined. It has been considered that the residual product rich in proteins it is useful as a protein source for further chemical and nutritional studies even when it is not totally free of impurities.

Key words: coca leaf, vegetable proteins, coca chewing, aminoacids

INTRODUCCIÓN

En un trabajo previo en ratas¹ se demostró que la hoja de coca (valle de La Convención, Cuzco, *E. coca* var. *coca*), semiseca y como harina o polvo, libre de

* Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición (CIBN), Facultad de Medicina Humana, UNMSM, Apartado Postal 529, Lima, Perú. Fax: 328-3236. E-mail: ramosaliaga@hotmail.com

alcaloides y pigmentos por su extracción con solventes, tiene un valor proteico importante aunque significativamente menor que el de la caseína y de sentido opuesto al efecto negativo observado por otros autores² con el uso de la harina integral de esta hoja. Este resultado sería la consecuencia tanto de la calidad de la proteína presente en la hoja, como de algunos otros componentes naturales presentes en la misma o que habrían sido formados secundariamente durante el secado de la hoja, pero que en uno o en otro caso no fueron suficientemente extraídos por los solventes utilizados.

Con estos antecedentes, se realiza ahora, este trabajo para obtener de la hoja de coca, por fraccionamiento químico selectivo, identificación y/o determinación de sus principales componentes, un producto apropiado como fuente de proteínas. Este producto podría servir así al estudio de la química y fisiología de estas proteínas con el fin de lograr su utilización en la alimentación humana y/o animal. Con ello, se abriría, además, la posibilidad de utilizar industrialmente para este propósito los excedentes del cultivo lícito de esta planta o los subproductos de su empleo actual de la producción de extractos descocainizados de la hoja³.

PARTE EXPERIMENTAL

Material biológico.- Se utilizaron muestras (n=5-7) de hoja de coca semiseca (valle de La Convención, Cuzco; *E. coca*. var. coca) pulverizadas (partículas de 1mm de diámetro) proporcionadas por la Empresa Nacional de la Coca S.A. (ENACO S.A.), las mismas que fueron sometidas a las siguientes operaciones: a) fraccionamiento químico y obtención de un producto con fuente de proteínas (PCFP); b) extracción de las proteínas del PCFP y c) análisis de cada uno de los componentes extraídos y/u obtenidos previamente.

Fraccionamiento químico de la coca y obtención del PCFP.- Las muestras de coca (n = 5-7; 0.5-1.0 g c/u) fueron sometidas a diversos tratamientos con el objeto de que queden libres, en lo posible, de sus principales componentes químicos no proteicos naturales o de aquellos formados secundariamente durante su secado. La metodología fue según lo señalado por AOAC^{4,5,6} y Broadhurst y Jones⁷ para las siguientes operaciones: a) secado a 100 °C (humedad); b) extracción por reflujo con éter dietílico (24 h) de los componentes liposolubles (grasa, pigmentos, alcaloides) del producto seco; c) separación de la clorofila del extracto etéreo con la mezcla de acetona y agua (85:15 v/v) en frío para dejar un residuo de grasa y alcaloide; d) extracción de taninos (no conjugados) con una mezcla de acetona y etanol (70:30 v/v) en BM hirviendo a partir de la muestra deslipidada, despigmentada y libre de alcaloides y también de otros posibles productos presentes por formación secundaria (v.g. complejo de carbohidratos y alcaloides con aminoácidos y/o proteínas o productos de Maillard⁸ y/o de cocaína-aminoácidos⁹; CAAP) y que pueden también ser investigados en esta frac-

ción; e) el producto final o fracción residual del proceso de fraccionamiento químico descrito, es el PCFP el que se somete a un proceso de extracción de su proteína y de análisis de estos extractos.

Extracción de proteínas del PCFP.- Diferentes porciones del PCFP (25-100 mg c/u) fueron extraídas individualmente con cada solución o de manera sucesiva con todas las soluciones, utilizando: a) agua destilada fría, con agitación constante por 5 min.; b) agua destilada al BM 100 °C por 15 min.; c) solución de NaHCO_3 0.1M, pH 8.5 y homogenización con arena lavada en un mortero y d) HCl 1N, al BM 100 °C por 15 min. Después de la separación de los sobrenadantes por cetrifugación a 2000 rpm, se utilizan estas muestras para la identificación y determinación en ellas, según el caso, del contenido proteico y otros productos resultantes de su hidrólisis ácida (aminoácidos y también taninos derivados de los taninos conjugados remanentes en el PCFP)

Análisis químico.- La humedad y la grasa (más alcaloides, pero sin clorofila) fueron determinadas según AOAC^{4,5}. La clorofila se identificó y determinó después de su extracción según su máxima absorción a 660-670 nm por comparación con la clorofila aislada de la alfalfa⁶. Los taninos libres, totales y condensados, en el extracto aceton-etanólico fueron determinados según Folin-Denis¹⁰ y Broadhurst y Jones⁷, respectivamente. Mientras la identificación de los complejos CAAP se hizo después de una hidrólisis ácida (HCl 1N) del extracto aceton-etanólico en BM 100 °C por 15 min y suspensión de residuo en 0.1-0.2 ml de buffer de fosfato de pH 7, por la búsqueda de trazas de glucosa, alcaloides y aminoácidos, utilizando los métodos de la glucosa oxidasa¹¹, Dragendorff modificado¹² y la reacción de la ninhidrina¹³, respectivamente. Como referencia de la intensidad de las reacciones de color se tomaron estándares de 10 µg de cocaína, glucosa y aminoácidos. En el PCFP y sus sobrenadantes 2000 rpm se evaluaron los contenidos proteicos determinando el N total según el Manual de Procedimientos de Análisis Digesdahl de Hach¹⁴ y el factor de conversión 5.75. La identificación y determinación de proteínas se hizo, también, según los métodos del biuret¹⁵ y de Lowry et. al.¹⁶ poniendo en evidencia y cuantificando los aminoácidos resultantes de la hidrólisis ácida, con el reactivo de la ninhidrina¹³ mientras que los remanentes de taninos se identificaron según las técnicas antes señaladas^{10,7}. La fibra de PCFP se determinó según AOAC¹⁷.

RESULTADOS

Fraccionamiento químico de la coca y determinación de sus componentes.- Los valores de estos componentes y de aquellos del producto o fracción residual PCFP se expresan en términos de 100 g de hoja (Tabla 1). En esta composición destacan los altos contenidos proteicos (19.28 g/100), de fibra (13.67 g/100) y de taninos libres (3.27 g/100) y conjugados (3.62 g/100) de la hoja de coca.

TABLA 1. VALORES PORCENTUALES DE LOS COMPONENTES DE LAHOJADE COCA DESPUÉS DE SU FRACCIONAMIENTO QUÍMICO^{a,b}

COMPONENTES	VALORES g.100 ⁻¹	
FRACCIONES PRELIMINARES		
- Humedad	14.98	0.21
- Extracto etéreo ^c	5.47	0.29
- Grasa ^d	3.65	0.23
- Clorofila ^e	1.81	0.18
- Taninos (libres) ^f	3.27	0.28
FRACCIÓN RESIDUAL (PCFP)		
- N total	3.35	0.18
- Proteínas ^g	19.28	1.05
- Aminoácidos ^h	3.97	0.43
- Taninos (conjugados) ⁱ	3.62	0.11
- Fibra	13.67	1.27

a Muestras (n=5-7) de coca del valle de La Convención, Cuzco; *E. coca*. var. coca; ^bla composición es expresada en valores (g) promedio por 100g de esta hoja? DS; ^ccontiene grasa, alcaloides, clorofila; ^dSeparadas por la acetona 85%; ^eserían taninos simples y condensados no conjugados; ^fN x 5.75; ^gobtenidos por hidrólisis ácida; ^hserían taninos conjugados. Detalles en la PARTE EXPERIMENTAL.

Investigación de los complejos CAAP.- Su presencia se demostró de manera indirecta y solo a través de las reacciones positivas obtenidas para trazas de glucosa, alcaloides y aminoácidos en el extracto acetón-etanolico previamente hidrolizado con HCl 1N en caliente (Tabla 2).

TABLA 2. IDENTIFICACIÓN DE LOS PROBABLES COMPLEJOS QUÍMICOS CAAP^a EN LOS EXTRACTOS ACETON-ETANÓLICOS (EAE) DE LA HOJA DE COCA^b SIN Y CON HIDRÓLISIS^c

EXTRACTO	COMPUESTOS QUÍMICOS IDENTIFICADOS ^d		
	GLUCOSA	ALCALOIDES	AMINOÁCIDOS
EAE sin hidrólisis	+	+	+
EAE con hidrólisis 3	++++	+++	+++

^aComplejos de carbohidratos, alcaloides (cocaína, otros) y aminoácidos y/o restos de proteínas; ^bhoja de coca (*E. Coca* var coca) del valle de la Convención, Cuzco; ^cla hidrólisis de EAE e identificación de los compuestos químicos presentes o resultantes fueron hechos según lo señalado en la PARTE EXPERIMENTAL, siendo 5+ la máxima intensidad de color para cada reacción.

PCFP: identificación y evaluación proteica y de otros constituyentes.-

Este producto aparece como una sustancia blanda, pegajosa, de color pardo claro, ligeramente soluble en agua. La identificación y valoración de sus constituyentes a través del análisis de los diferentes extractos obtenidos (sobrenadantes 2000 rpm acuosos, con NaHCO₃ 0.1M, pH 8.5 y con HCl 1N) y del propio PCFP muestran reacciones fuertemente positivas con los reactivos de biuret, Lowry et al. y de ninhidrina, según el caso y un alto contenido proteico en el PCFP (Tabla 3; Fig. 1) así como los mayores porcentajes de extracción de esta proteína por las soluciones de HCl 1N (74.64%), de NaHCO₃ 0.1M (72.09%). Con esta proteína se extrae, identifica y valora también taninos remanentes (conjugados) quedando un residuo de fibra.

TABLA 3. VALORES DE EXTRACCIÓN PROTEICA Y DE LA HIDRÓLISIS ÁCIDA DEL PRODUCTO RESIDUAL (PCFP)^a EN EL FRACCIONAMIENTO QUÍMICO DE LA HOJA DE COCA^b

PRODUCTO ^c	VALORES EXTRAIDOS/DETERMINADOS g/100 ^d					
	PROTEÍNAS		AMINOÁCIDOS		TANINOS	
	U ^e	S ^f	U ^e	S ^f	U ^e	S ^f
PCFP						
- Agua fría	7.03 (36.46)	8.29 (49.08)	0.76 (19.14)	0.81 (22.95)	3.42 (49.64)	3.40 (41.21)
- Agua BM 100°C	8.07 (41.86)	3.14 (18.59)	1.09 (27.46)	0.88 (24.93)	3.52 (51.09)	1.27 (15.39)
- NaHCO ₃ 0.1M	13.90 (72.09)	3.24 (19.18)	2.10 (52.90)	0.29 (8.22)	2.21 (32.08)	1.60 (19.39)
- HCl 1N BM 100°C	14.39 (74.64)	2.21 (13.08)	4.64 (116.88)	1.55 (43.91)	3.98 (57.76)	1.98 (24.00)
TOTAL	—	16.89	—	3.53	—	8.25
H. COCA ^g	19.28 (100.00)		3.97 (100.00)		6.89 (100.00)	
EXTRACCION %	87.55		88.92		119.74	

^aMuestras de PCFP (n=5-7) correspondiente a la ^bhoja de coca del valle de La Convención, Cuzco; E. coca. var. coca; ^cPCFP extraído con diferentes soluciones; ^dvalores corregidos por 100 g de hoja de coca semiseca; ^eextracción única (con una sola solución) y ^fextracción sucesiva (con todas la soluciones); ^gvalores obtenidos por la determinación del N total y de las sumatorias de los valores parciales obtenidos en el análisis de las fracciones químicas correspondientes. Entre paréntesis los valores porcentuales.

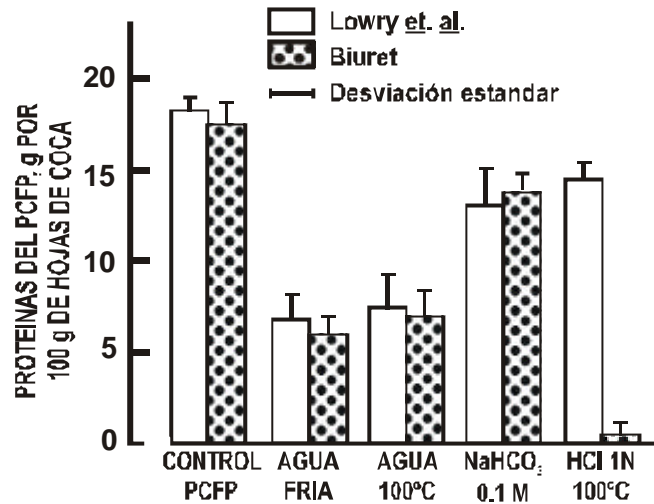


Fig. 1 Identificación y valores de las proteínas extraídas con diversas soluciones de la fracción residual PCFP obtenida por fraccionamiento químico de la hoja de coca (valle de la Convención, Cuzco; *E. coca* var. coca)

DISCUSIÓN

El fraccionamiento químico de la hoja de coca (valle de La Convención, Cuzco; *E. coca* var. coca) utilizando la harina o polvo de esta hoja y diversos métodos y solventes para separar, identificar y cuantificar sus principales componentes no proteicos -muchos de ellos de presencia natural, pero otros, de formación secundaria y posiblemente durante su secado (CAAP)- a fin de contar con una fracción residual rica en proteínas (PCFP), libre de algunos componentes con efectos negativos para la nutrición del organismo tal como se ha comprobado según los resultados previos obtenidos por otros autores² con el uso de la harina integral de esta hoja como fuente de proteínas en la rata², constituye una vía importante para alcanzar el objetivo de disponer de una fuente apropiada de proteínas de esta planta para los fines de los estudios químicos, fisiológicos y de utilización alimentaria, respectivos.

Haciendo un análisis de los resultados obtenidos con la aplicación de esta metodología se puede decir, en primer término, que se confirma muchos de los valores dados por la literatura sobre la composición química de esta planta (Tabla 1) salvo en lo que se refiere a la clorofila, taninos, complejos CAAP, proteínas y aminoácidos cuya presencia hasta hoy no consta en la literatura como parte de la composición química de ella, salvo aquella de la proteína como un contenido de N supuestamente proteico. Este sería, entonces, el primer informe fundamentado en las evidencias correspondientes, al respecto de la presencia de

tales especies químicas en la hoja de coca, las mismas que fueron separadas y analizadas siguiendo técnicas particulares. Las tres primeras, clorofila, taninos y probables complejos CAAP aislados en la fracción acetona-agua en frío (clorofila) y en la fracción acetona-etanol en caliente (taninos y complejos CAAP). Y las dos últimas, proteínas y aminoácidos, en la fracción residual PCFP antes y después de la hidrólisis ácida respectiva. La elevada proporción de clorofila (1.81 g/100), identificada espectrofotométricamente, aparece en concordancia con la intensa actividad fotosintética que se le atribuye a la planta para obtener la compleja composición química que posee¹⁸. Mientras que los taninos se identifican por la forma de su extracción y análisis respectivo, como taninos libres (simples y/o condensados) quedando, sin embargo, en la fracción PCFP otros taninos residuales que, al ser liberados por la hidrólisis con HCl 1N en caliente, aparecen como taninos conjugados (v.g. con proteínas y otros polímeros formando complejos estables). La presencia y cantidad significativamente alta de ambas clases de taninos (6.89 g/100) nos sugiere el rol fisiológico que estas sustancias podrían tener no sólo en la utilización medicinal de la hoja como astringente y hemostático sino en la fisiología de la proteína de esta hoja desde que se conoce la propiedad de estos polifenoles para formar complejos con las proteínas¹⁹, limitando así su posible utilización por el organismo²⁰. Con respecto a la presencia de los complejos CAAP investigados -que probablemente incluyen a los productos de Maillard (complejos azúcares-aminoácidos y/o residuos de proteínas) de presencia tan generalizada en las plantas durante su secado⁸ y a aquellos complejos fruto de las reacciones entre alcaloides y ciertos aminoácidos (v.g. complejo cocaína-aminoácido)⁹- su presencia en esta hoja se ha demostrado sólo indirectamente a través de las reacciones positivas obtenidas para sus constituyentes (glucosa, alcaloides y aminoácidos) después de la hidrólisis ácida del extracto acetón-etanólico. Sin embargo, la importancia fisiológica de su presencia en esta hoja resulta obvia si se tiene en cuenta que la formación de cualquiera de estos complejos reduciría la disponibilidad para los fines de la nutrición de muchos aminoácidos presentes en la dieta. Por esta razón es que aparte de esta investigación preliminar se debe tratar en el futuro de identificar y cuantificar mejor dichos compuestos en esta hoja, así como de evaluar su propiedad de antinutriente.

Por último y en relación a los resultados que se han mostrado, la fracción residual PCFP semisólida y pegajosa obtenida de la hoja, constituye una fuente importante de proteínas y de aminoácidos de la planta. Su extracción con diversas soluciones (agua, NaHCO₃ 0.1 M, pH 8.5) e identificación como especies químicas proteicas sin hidrólisis (proteína y aminoácidos libres) y con hidrólisis química (aminoácidos) en diversos valores utilizando diversas reacciones (biuret, Lowry et al, ninhidrina) caracterizan definitivamente a esta fracción rica en N (Tabla 3; Fig. 1) aunque se debe señalar que mucho antes se habían realizado pruebas preliminares al respecto en nuestro laboratorio²¹. De estas soluciones, el

NaHCO₃ 0.1M, pH 8.5 fue más efectivo en la extracción de la proteínas (72% de extracción) mientras que el HCl 1N en caliente lo es en la liberación de los aminoácidos de la muestra (3.97 g/100). Con esta última solución se extrae también un remanente de taninos (taninos conjugados) dejando un residuo de fibra de la hoja (13.67 g/100). El PCFP así obtenido no está pues totalmente exento de productos innecesarios. Y la extracción de su proteína para los fines que hemos señalado anteriormente requiere, según el caso, una purificación adicional.

CONCLUSIONES

1. Se ha utilizado un proceso de fraccionamiento químico de la hoja de coca (valle de La Convención, Cuzco; *E. coca* var. coca) para obtener un producto final rico en proteínas (PCFP) que contiene aún fibra y un remanente de taninos conjugados.
2. En este proceso se han aislado, identificado y evaluado diversos componentes químicos de esta hoja, siendo para algunos de ellos, sus valores semejantes a los que informa la literatura para la composición de esta planta. Para otros, como clorofila, taninos, complejos de carbohidratos y alcaloides con aminoácidos y/o proteínas o de cocaína y aminoácidos, no existe aún información previa al respecto de su cuantificación (clorofila, taninos) o identificación (complejos de Maillard o de cocaína-aminoácidos).
3. Del PCFP se ha extraído en diversos valores y con diferentes soluciones su contenido en proteínas y aminoácidos quedando un residuo de fibra. El NaHCO₃ 0.1M, pH 8.5 fue el más efectivo en la extracción proteica y el HCl 1N en caliente, el que produjo mayor cantidad de aminoácidos.

AGRADECIMIENTOS

Se reconoce el apoyo y la colaboración recibidos tanto del Consejo Superior de Investigaciones de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos a la realización del Proyecto de investigación N° 80104091 como de la Lic. TM. Rosa Patrón Berrios de la Universidad Nacional Federico Villarreal.

REFERENCIAS

1. Ramos-Aliaga R, San Roman K, Solano D. *Rev. Soc. Quim. Perú* 2004; 70:67-75.
2. Collazos-Chiriboga C, Urquieta R, Alvistur E. *Rev. Viernes Médico* 1965; 6:36-44
3. Ramos-Aliaga R. *Actas III Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas*, Lima, Perú 1996; pag. 47

4. AOAC *Official Methods of Analysis* 1995; Chapter 3, pag. 1
5. AOAC *Official Methods of Analysis* 1995; Chapter 3, pag. 24
6. AOAC *Official Methods of Analysis* 1995; Chapter 3, pag. 26
7. Broadhurst RB, Jones WT. *J. Sci. Fd. Agric* 1978; 20: 788-794
8. Coultate TP *Manual de Química y Bioquímica de los Alimentos*. Ed Acribia S.A. Zaragoza. España 1998; pag. 21-26.
9. Deng SX, Bharat N, Fischman M, Landry DW *PNAS-Abstract* 2002; 99:3412-3416.
10. AOAC *Official Methods of Analysis* 1970; Chapter 9, pag. 154
11. Sigma-Aldrich Catalog. Determinación de glucosa por el método de la glucosa oxidasa. *Sigma Manual Procedures* 1999.
12. Gibaja S. *Guía para el análisis de los compuestos de carbono* Dirección Universitaria de Biblioteca y Publicaciones, UNMSM, Lima, Perú 1977; pag. 123-124.
13. Plummer D. *Bioquímica Práctica* Ed. McGraw-Hill Latinoamericana SA, 1981; pag. 129-130.
14. Hach Test Methods *Systems for Food, Feed and Beverage Analysis Procedures. Digestion Procedures and Crude Protein Analysis. DR/3000, DR/2000 or DR/3A Method*. Hach Company Loveland, Colorado, USA 1989; 18-23.
15. Rendina G. *Experimental Methods in Modern Biochemistry*. Ed. Saunders WB. Co. USA 1971; pag. 75-77
16. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. *J. Biol. Chem* 1951; 193: 265-275.
17. AOAC *Official Methods of Analysis* 1995; Chapter 4, pag. 26
18. Mortimer WG, Mantegazza P, Mariani A, Morales JA, Molina R. *La hoja increíble*. 1992; pag. 7-23
19. Oh HI, Hoff JE, Armstrong GS, Hoff IA. *J. Agric. Food Chem.* 1980; 28:394-398
20. Sobrine FJ, Martinez JA, Ilundain A, Larralde J. *Plant Food for Human Nutrition* 1983; 33:125-131
21. Chimoy P. *Informe de Práctica Profesional, Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM*. 1981.