UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS Fundada en 1551
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

EVALUACIÓN NUTRICIONAL DE LA PROTEÍNA DE LA HOJA DE COCA *(Erythroxylum coca Lamarck var. Coca)*

Tesis
Para optar al Título Profesional de:
QUÍMICO FARMACÉUTICO
Por

TEÓFILA ADRIANA CORDERO VILCA
Dr Roger Ramos
-Aliaga

LIMA-PERÚ 2002

. . 1

AGRADECIMIENTO . 3

ABREVIATURAS . . 5

RESUMEN . 7

SUMMARY . . 9

INTRODUCCIÓN . 11

II- GENERALIDADES . 13

2.1.0 - NATURALEZA DE LAS PROTEÍNAS . 13

2.2.0 - METABOLISMO DE LAS PROTEÍNAS Y AMINOÁCIDOS . 14

2.2.1- BALANCE NITROGENADO . . 15

2.2.2- DEAMINACIÓN OXIDATIVA DE AMINOÁCIDOS Y FORMACIÓN DE UREA . 15

2.3.0- LOS AMINOÁCIDOS ESENCIALES DEBEN ESTAR PRESENTES EN LA DIETA . . 15

2.4.0- PESPECTIVA ALIMENTARIA Y NUTRICIONAL DE LAS PROTEÍNAS VEGETALES . 16

2.5.0- LA HOJA DE COCA *(Erythroxylum coca)* . 17

2.5.1- CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA . . 17

2.5.2- HISTORIA . 17

2.5.3- MORFOLOGÍA . 18

2.5.4- HÁBITAT . . 18

2.6.0 -LA HOJA DE COCA *(Erythroxylum coca Lamarck var. Coca)* COMO FUENTE DE PROTEÍNA . 18

III-PARTE EXPERIMENTAL . 21

MATERIALES EQUIPOS Y REACTIVOS . 21

3.1.1- MATERIAL BIOLÓGICO . 21

3.1.2- ANIMALES . 21

3.1.3 - DIETAS . 21

3.1.4- MATERIALES Y EQUIPO DE LABORATORIO . . 22

3.1.5-REACTIVOS Y ESTÁNDARES . 22

3.2.0 - METODOS TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS . . 22

3.2.1 - EXTRACCIÓN DEL CONTENIDO PROTEICO DE LA HOJA DE COCA . . 22

3.2.2-PREPARACIÓN DE LAS DIETAS CONTROL Y EXPERIMENTAL . 25

3.2.3- TRATAMIENTO DIETARIO . 26

3.2.4 - MUESTRAS PARA ANÁLISIS . 26

3.2.5-DETERMINACIONES QUÍMICAS , ENZIMÁTICAS Y VALORES PER . 27

IV- RESULTADOS . . 39

4.1 CONTENIDO DE NITRÓGENO Y DE PROTEÍNAS EN LAS DIETAS . 39

4.2- CONSUMO Y VALOR PROTEICO DE LAS DIETAS . . 39

4.3- PESO Y CONTENIDO DE PROTEÍNAS EN LOS ÓRGANOS . . 40

4.4- ACTIVIDAD DE ARGINASA HEPÁTICA . 40

4.5- INDICE DE EFICIENCIA PROTEICA :PER . 40

V- DISCUSIÓN . . 43

VI.- CONCLUSIONES . 47

VII. BIBLIOGRAFÍA . . 49

DEDICATORIA A DIANA Y NADIA mis amadas hijas por los tantos momentos de ausencia A JULIO mi esposo por su apoyo amorosoy constante A MIS QUERIDOS PADRES por su cariño incondicional. A TEO mi querido hermano por su generosidad y afecto. A DORITA mi cuñada, por su ayuda y ejemplo de vida

"Programa Cybertesis PERÚ - Derechos son del Autor"

AGRADECIMIENTO

Un agradecimiento muy especial al Doctor Roger Ramos Aliaga, mi maestro, por su ayuda, su orientación, su consejo y por haberme mostrado el camino a seguir..

A los distinguidos miembros del jurado, especialemnte a la Doctora Luz Oyolo Hermozo, por su ayuda eficaz.

"Programa Cybertesis PERÚ - Derechos son del Autor"

ABREVIATURAS

BM
..... Baño maría

CAS
..... Caseína

csp
..... cantidad suficiente para

Fc
..... Factor de calibración

F
P ..... Fracción proteica de hoja de coca

g
..... gramo (s)

L
..... Litro(s)

MP
.... Muestra problema

mM
.... milimolar

M
..... Molar

mg
..... miligramo (s)

mL
..... mililitro (s)

N
.... Normal

nm
..... Nanómetro (s)

PER
..... Indice de eficiencia proteica

p/v
..... peso/volumen

r.p.m
.... revoluciones por minuto

St
..... Estándar

TCA
.... Ácido tricloroacético

µ.....
..... micro

µg
..... microgramo (s)

"Programa Cybertesis PERÚ - Derechos son del Autor"

RESUMEN

Se ha estudiado el valor nutricional del contenido proteico de la hoja de coca (*Erythroxylum coca Lamarck var. Coca*). Para lograr éste objetivo se aislaron por precipitación a pH 5.1 y 4.0 dos fracciones proteicas de un extracto alcalino de ésta hoja preparado con una solución de "tocra" (sustancia alcalina utilizada con la coca en el hábito de su masticación).Después de una purificación parcial con solventes de extracción (éter dietílico ,acetona ,alcohol 96°) de la mezcla de ambas fracciones proteicas, se prepararon dos dietas Experimentales con diferentes niveles de proteína (FP COCA 4.5% y FP COCA 9.0%). De igual modo se prepararon dos dietas Controles a base de caseína (CAS 4.5% y CAS 9.0%). Estas dietas fueron administradas *ad libitum*por 10 días, a grupos de ratas (n=6-9) en desarrollo. Al término de éste periodo los animales fueron sacrificados ,determinándose los valores de los índices PER, las actividades de arginasa hepática y los pesos de los órganos y de sus contenidos proteicos. Los resultados mostraron que los índices PER fueron menores y las actividades de la arginasa hepática mayores en los animales de los grupos FP COCA ,que en los animales alimentados con caseína. En grupos mejor alimentados , FP COCA 9.0% y CAS 9.0% estos valores fueron PER:1.4 ; arginasa 63.6±14.6 µmoles de ornitina/mg de proteína hepática y PER: 3.8 ; arginasa 51.4±9.6 µmoles de ornitina /mg de proteína hepática respectivamente. Los pesos de los órganos fueron igualmente menores en los grupos FP COCA pero sus contenidos proteicos fueron semejantes al de los grupos controles. Estos hallazgos sugieren que la proteína de la coca, cuando es dada en un valor del 9.0% tiene un valor importante el cual puede ser mejorado si se lograse suplementar con otras proteínas. Así mismo los resultados sugieren que se debe obtener fracciones proteicas de mayor pureza para determinar con mayor exactitud su calidad.

Palabras claves: Coca, PER, Eficiencia proteica, Proteína de la coca, Dieta andina.

"Programa Cybertesis PERÚ - Derechos son del Autor"

SUMMARY

NUTRITIONAL VALUE OF THE PROTEIN OF COCA LEAF

(Erythroxylum coca)

The study was designed to search the biological value of the protein contents in the coca leaf (*Erythroxylum coca*) .To aproach this two protein fractions were isolated from an alkaline coca leaves extract prepared with “tocra” (alkaline substance used with coca for chewing) by precipitating them at two different pH(5.1 and 4.0).After partial purification by extracting solvents (diethyl ether ,acetone and ethanol 96 °) of the mixture of both fractions two Experimental diets with different protein levels

(FP COCA 4.5% and FP COCA 9.0%) were prepared. Likewise two casein Control diets (CAS 4.5% and CAS 9.0%) were made. All diets were fed *ad libitum* for 10 days to groups (n=6-9) of growing rats. Ending this period protein efficiency ratio (PER) liver arginase activity , tissue weights and its protein contents were determined. Results show minor PER index values but major arginase activities in both Experimental groups than in Control groups .In FP COCA 9.0% group , PER 1.4;arginase 63.6 ±14.6 µmoles ofornitina/mg liver protein and in CAS 9.0% group, PER 3.8 ; arginase 51.4 ±9.6 µmoles of ornitina/mg liver protein. Tissue weights were also diminished but itsprotein contents were similar .These findings suggest that protein of coca leaf given at 9% has some important biological value wich could be improved bysupplementation with other proteins. Moreover ,these results prompt also to us to obtein a more purified coca leaf protein for improving its utilization.

Key words: Coca, PER , Protein efficient, Coca protein, Andine diet.

"Programa Cybertesis PERÚ - Derechos son del Autor"

INTRODUCCIÓN

Las proteínas cumplen funciones estructurales y esenciales en los seres vivos, por lo que es necesario su continuo aporte al organismo. Sin embargo estas fuentes proteicas son de diversa calidady en lo que respecta al ser humano se suma además su diferente costo. Las proteínas animales de buena calidad son de costo elevado mientras que las proteínas vegetales de menor calidad, son mas asequibles a la economía de la población.

Por esta razón la investigación bioquímica y nutricional trata de estudiar e incorporar nuevas fuentes de proteínas de diverso origen incluyendo a las vegetales.

Un recurso que parece útil para este propósito en el Perú, seria el de la hoja de coca (*Eriythroxylum coca)* que se cultiva tanto para fines de su uso en el tradicional hábito de la masticación de ella como para fines ilícitos. En este sentido, se podría utilizar este recurso como fuente de proteínas, dándole así otro uso alternativo a esta especie. El Instituto de Nutrición del Ministerio de Salud y un grupo de trabajo en el Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición de la UNMSM que cultiva una línea de investigación sobre la coca y el coqueo en el Ande, así como el trabajo de otros investigadores extranjeros han contribuido y/o están contribuyendo al conocimiento del valor proteico que tendría la hoja de coca. Es así, como la hoja de coca constituiría un buen recurso biológico para la obtención de su proteína que pueda ser útil, previo estudio de las condiciones de su extracción, purificación y caracterización, al entendimiento de la fisiología del coqueo así como para su utilización en la alimentación humana y/o animal.

Es por eso que se hace necesario probar el valor nutricional de la proteína de la hoja de coca a través de la experimentación animal. Para ello se extraerá y aislará las

fracciones proteicas de la hoja de coca (proteína de la coca) según metodología estándar del laboratorio del Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición de la UNMSM, lugar en el que se ha realizado éste trabajo ,se prepararan dietas Experimentales con diferentes niveles de proteína de la coca y dietas Controles con caseína para su administración a las ratas en experimentación según el grupo dietario y se obtendrán los índices PER en ratas en desarrollo, por experimentación de 10 días, se medirá las actividad de la arginasa hepática en los animales después de su sacrificio y se medirá el desarrollo de sus órganos y de su contenido proteico.

"Programa Cybertesis PERÚ - Derechos son del Autor"

II- GENERALIDADES

2.1.0 - NATURALEZA DE LAS PROTEÍNAS

Las proteínas ,como su nombre indica (del griego protos , lo primero) han sido consideradas durante muchos años como el componente primario de la materia viviente. Dondequiera que se observan fenómenos de crecimiento y de reproducción se encuentran involucradas las proteínas.(1)

Las proteínas se han ganado una cierta reputación como alimento de construcción del cuerpo. Si bien es cierto que las proteínas son componentes estructurales esenciales de todas las células , las proteínas son igualmente importantes para mantener la producción de secreciones esenciales tales como enzimas digestivas y hormonas peptídicas.

Las proteínas son también necesarias para sintetizar las proteínas plasmáticas que son esenciales para mantener el equilibrio osmótico ,transportar sustancias a través de la sangre o mantener la inmunidad.

El exceso de proteínas se trata simplemente como fuente de energía, convirtiéndose los esqueletos carbonados de los aminoácidos glucogénicos en glucosa y de los aminoácidos cetogénicos en ácidos grasos y cetoácidos. Ambos tipos de estructuras se convierten finalmente en triacilgliceroles en el tejido adiposo si los suministros de grasa y

glúcidos son ya suficientes para satisfacer las necesidades energéticas(2).

El principio básico de la estructura química de las proteínas es bastante simple consisten en largas cadenas de aminoácidos enlazados unos a otros por medio de enlaces peptídicos. No obstante aparecen complicaciones:

Las procedentes de la presencia de alrededor de veinte tipos diferentes de residuos correspondientes a los diferentes aminoácidos, las procedentes de la gran longitud de estas cadenas, que pueden estar formadas por varios cientos de aminoácidos y las que proceden de la configuración particular de las cadenas peptídicas, en otras palabras, su plegamiento específico que puede originar una estructura definida tridimensional. Incluso si todas las proteínas estuvieran constituidas por cadenas peptídicas lineales, se podría formar un número casi infinito de proteínas, aún sin que existiesen dobleces ó vueltas, simplemente por cambios en el orden de veinte aminoácidos en las largas cadenas. Puesto que todas estas cadenas podrían adquirir un número ilimitado de configuraciones, no debe sorprender que cada especie animal ó vegetal tenga proteínas propias características de su especie (1).

La forma particular en que los 20 aminoácidos están combinados en cada proteína determina sus características bioquímicas, pero su valor nutritivo está determina-

do por las cantidades y proporciones entre sí de los distintos aminoácidos que entran en su composición .Debido a ello la información más importante al preparar las dietas consiste en el conocimiento del contenido y balance de estos aminoácidos en la proteína a utilizar((3)

2.2.0 - METABOLISMO DE LAS PROTEÍNAS Y AMINOÁCIDOS

El metabolismo de una proteína es el metabolismo de aminoácidos.

Siempre se ha dicho que el cuerpo no tiene depósito ó almacén para las proteínas, por lo que cada comida ha de aportar la cantidad de proteínas adecuada, pero esto, no es totalmente correcto. Si bien no existe una proteína específica de “almacenamiento,” existe un cierto porcentaje de la proteína que se fija en condiciones de exceso en órganos como el hígado y riñón. Sin embargo, esta proteína tiene también un trámite metabólico fluido por lo que no es propiamente un almacenamiento de la misma. La proteína tisular especialmente la de rápido recambio, disminuye fácilmente en estado de ayuno y la proteína muscular como importante componente de la proteína corporal, se degrada para que sus aminoácidos resultantes se utilicen para la producción de glucosa, la síntesis de compuestos nitrogenados no proteicos y para la síntesis de las proteínas secretoras y plasmáticas esenciales. Incluso en el estado de nutrición algunos de los aminoácidos se utilizan para la producción de energía y como precursores biosintéticos .de este modo el recambio de la proteína corporal es un proceso normal ,así como un rasgo esencial de lo que se denomina equilibrio nitrogenado(2).

"Programa Cybertesis PERÚ - Derechos son del Autor"

Las proteínas después de la digestión son absorbidas como aminoácidos ingresando a la sangre por vía porta y luego pasa al hígado. El hígado toma cierta proporción de ellos para sus propias necesidades sintetizando otros no esenciales que son adicionados al "pool" de aminoácidos que le es propio. Otros aminoácidos derivados de la hidrólisis de proteínas tisulares en condiciones fisiológicas especiales son también incorporados a este "pool" y al "pool" general del organismo para su metabolismo anabólico y catabólico (4).

2.2.1- BALANCE NITROGENADO

El balance de Nitrógeno relaciona la captación alimenticia del nitrógeno con los valores de su excreción.

El balance de nitrógeno es así una comparación entre la ingestión de nitrógeno preferentemente en forma de proteína , y la excreción de él, principalmente en forma de proteína sin digerir presente en las heces ó en forme de catabolitos como la urea y amoniaco en la orina. Este balance puede ser positivo ó negativo según la condición alimentaria en proteínas o la condición fisiológica del organismo

Un balance negativo puede provenir de una ingestión de proteína inadecuada ó de baja calidad en la dieta, ya que los aminoácidos que normalmente son utilizados por el organismo para los fines energéticos y biosintéticos no pueden ser reemplazados por aquellos que se encuentran en deficiencia en la dieta.

Se observa balance positivo de Nitrógeno siempre que se produce un incremento neto de los depósitos proteicos corporales ,tal como sucede en los niños en crecimiento ,mujer embarazada ó adulto convaleciente siempre que reciban una fuente adecuada ó de calidad de proteínas dietarias (2).

2.2.2- DEAMINACIÓN OXIDATIVA DE AMINOÁCIDOS Y FORMACIÓN DE UREA

Los aminoácidos no utilizados para la formación de proteínas tisulares ó para otros fines biosintéticos son catabolizados principalmente en el hígado por deaminación oxidativa. El amonio resultante es convertido luego en urea fundamentalmente en el hígado. La formación de urea que se realiza en el hígado es catalizada a través del ciclo denominado Ciclo de la urea y en el que se va a formar el producto precursor de ella, la arginina .Por acción de la enzima arginasa sobre este sustrato se forma urea y ornitina (4).

2.3.0- LOS AMINOÁCIDOS ESENCIALES DEBEN ESTAR PRESENTES EN LA DIETA

Además de la cantidad necesaria de proteínas de la dieta para el mantenimiento saludable del organismo existen factores que también han de considerarse .Uno de estos es el complemento adecuado de los aminoácidos esenciales presentes en la proteína de la dieta. Los aminoácidos esenciales son aquellos aminoácidos que no pueden ser sintetizados por el organismo. Basta que falte en la dieta uno de estos aminoácidos esenciales para que el cuerpo no pueda sintetizar proteína nueva para reemplazar la proteína perdida debido al recambio normal ,lo que produce un balance negativo de nitrógeno. Generalmente la mayoría de proteínas animales contienen todos los aminoácidos esenciales en las cantidades aproximadamente necesarias para el cuerpo humano.

Las proteínas vegetales por otro lado carecen frecuentemente de la cantidad fisiológicamente adecuada de uno ó mas aminoácidos esenciales y en algunos casos ,todavía, pueden ser mas difíciles de digerir .Aún así las dietas vegetarianas pueden suministrar proteínas fisiológicamente útiles siempre que las diferentes clases de proteínas de los alimentos que conforman la dieta se complementen adecuadamente. Ó que estas proteínas vegetales se consuman con otras proteínas de alimentos de origen animal. Esto significa una complementación aminoacídica eficaz. Por ejemplo si se combina el maíz (que es deficiente en lisina) con legumbres (que son deficientes en metionina pero ricas en lisina), la eficiencia de utilización de la mezcla se acerca a la proteína animal (2).Dietas polivegetales andinas han mostrado ,también, su valor nutricional comparable a la caseina (5).

2.4.0- PESPECTIVA ALIMENTARIA Y NUTRICIONAL DE LAS PROTEÍNAS VEGETALES

Los estudios sobre la calidad de las proteínas dietarias , en especial, de aquellas que se consume en los países sub-desarrollados y la investigación sobre la búsqueda de nuevas fuentes de ella, para la alimentación humana y/o animal han ido en aumento alrededor del mundo, tal como lo han venido imponiendo las crecientes necesidades de alimentación y de salud de la población en el mundo (6). A éste último objetivo se han integrado los estudios sobre las proteínas provenientes de organismos unicelulares (bacterias, algas) y de los vegetales (7), porque permite la obtención de proteínas de más rápida producción y a bajo costo. Es así, como se han trazado políticas o planes de trabajo agrícola con nuevas tecnologías a las ya existentes en zonas de bajo rendimiento o, también, a la intensificación de cultivos de plantas utilizadas como forrajes (alfalfa, pastos) o que sirven como fuente directa en la alimentación humana (cereales, legumbres, leguminosas, etc) (8)(9). Sobre la base a éstas ideas y estudios es que se ha pensado en la utilización en Latinoamérica de cerca de 400 millones de Has. para el cultivo de pastos y plantas forrajeras (10) que puedan ser incorporadas a la alimentación humana pero que podrían servir, junto a la utilización de la vegetación de los trópicos húmedos, para obtener concentrados proteicos (7) que resuelvan, primero, los problemas de la alimentación animal en la zona y, luego, los problemas de la alimentación humana.

"Programa Cybertesis PERÚ - Derechos son del Autor"

Obviamente, que la restricción en el uso directo de ésta proteína foliar, es su composición aminoacídica limitante en metionina (11)(12) y la presencia de pigmentos y compuestos polifenólicos (taninos) (13), así como de inhibidores de la digestión proteica (14) y de hemoaglutininas (15).

2.5.0- LA HOJA DE COCA *(Erythroxylum coca)*

2.5.1- CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

REINO : PLANTAE

DIVISIÓN : MAGNOLIOPHYTA

CLASE : MAGNOLIOPSIDA

(DICOTILEDÓNEAS)

ORDEN : LINALES

FAMILIA : ERYTHROXYLACEAE

GÉNERO : ***Erythroxylum***

ESPECIE *:* ***Erythroxylum coca Lamarck var. Coca***

Nombre vulgar “coca”

2.5.2- HISTORIA

El nombre de coca deriva del aymara "Kkoka" que significa planta divina. Es nativa del Perú y ha sido cultivada desde tiempos muy remotos (2100 AC aprox.).Las hojas de ésta planta han sido halladas en tumbas que datan de antes del siglo IX de nuestra era. Durante la época incaica, la planta fue considerada divina ,reservada esencialmente para las solemnidades religiosas y fue usada por la realeza incaica como un símbolo de aristocracia. Cuando los españoles conquistaron el imperio incaico los nativos fueron forzados a trabajar en los campos y las minas de oro y plata, para conferirles resistencia y reducirles el hambre y la sed, les fueron continuamente suministradas hojas de coca ,en proporción a la severidad de las labores requeridas. Durante el tiempo de la dominación española el hábito de la masticación de las hojas de coca se difundió en toda la población indígena desde el norte argentino hasta Colombia, perdiendo su carácter mágico religioso y llega a ser utilizada como pago de parte del salario de los trabajadores de las minas.

El uso que se hacía de la coca en América inquietó el espíritu europeo primero con fines científicos luego con el codiciado objeto de comercio. En 1858 en Alemania Niemann y Walter aislan la cocaína ,alcaloide activo de la coca. En un principio se empleó en medicina por sus propiedades anestésicas y más tarde para la desintoxicación de heroinómanos En la última década del siglo XIX la empresa Parke Davis empezó a

comercializar polvo de cocaína para inhalar. El consumo de cocaína se introdujo rápidamente entre la alta sociedad y el mundo artístico tanto en estados Unidos de N A como en Europa. Pese a los trabajos de W.G. Mortimer en los cuales se marcaba la diferenciación entre coca y cocaína y los descubrimientos de Freud ,el cual clasificaba la coca como un estimulante y no como un narcótico, la cocaína y por extensión la **coca** terminó siendo clasificada como una droga de la misma categoría que la morfina y la heroína.(16)

2.5.3- MORFOLOGÍA

La hoja de coca *(Erythroxylum coca Lamarck var. Coca)* es un arbusto que mide hasta 3 metros de altura. Su corteza rugosa es de color pardo rojizo. Sus hojas son simples alternas con peciolo corto de borde entero y de forma elíptica u oblongo elíptica, ápice agudo, base aguda ,mide de 2-7 cm de largo por 1-4 cm de ancho ,de color verde lustroso en la parte superior.

Las flores son pequeñas de color blanco marfil. El fruto es una drupa oblonga de color rojo de 6-8 mm de largo y 3-5 mm de diámetro.(17)

2.5.4- HÁBITAT

Las condiciones idóneas para ésta planta son los valles calientes y húmedos de la vertiente oriental de la cordillera de los Andes, entre 600 y 2000 metros de altitud con una temperatura media de 20 °C con humedad de 90 % con suelos arcillosos ricos en Nitrógeno.(15)

2.6.0 -LA HOJA DE COCA *(Erythroxylum coca Lamarck var. Coca)* COMO FUENTE DE PROTEÍNA

Aparte de la perspectiva alimentaria y nutricional en la obtención y uso de las proteínas vegetales y, particularmente, de las foliares, se tiene en la región andina y en particular en el Perú, hechos importantes que caracterizan a la vida de la población en los Andes. Estos hechos son, la práctica tradicional del hábito de la masticación de la hoja de coca *(Erythroxylum coca)* o coqueo y la enorme dimensión de los cultivos de ésta planta para fines ilícitos. Por el primero, el hombre que coquea ingiere no sólo cocaína (alcaloide principal de la hoja de coca) sino que, también, ingiere muchos de los otros componentes de la hoja de coca, entre ellos, su proteína. Esta posibilidad ha sido sugerida por la determinación que se ha hecho del contenido de N total en la hoja seca (18) equivalente así al 19% de proteína. Pero, también, por su identificación como tal (19)(20). Por el segundo hecho se conoce que anualmente se produce más de 200 mil TM. (21) de hoja de coca para fines ilícitos. Esto ha hecho que se proponga (20)(22) de manera alternativa al uso ilícito de la coca, su utilización lícita e industrial, para obtener diversos productos

"Programa Cybertesis PERÚ - Derechos son del Autor"

de su composición, entre los cuales cuenta su proteína.

Por ambas razones es que, la hoja de coca puede constituir un buen recurso biológico para la obtención de su proteína que puede ser útil previo estudio de las condiciones de su extracción, purificación y caracterización, al entendimiento de la fisiología del coqueo, el presente trabajo es una contribución a su posible utilización en la alimentación humana y/o animal.

"Programa Cybertesis PERÚ - Derechos son del Autor"

III-PARTE EXPERIMENTAL

MATERIALES EQUIPOS Y REACTIVOS

3.1.1- MATERIAL BIOLÓGICO

El material biológico empleado para la obtención de la proteína a estudiar fue la hoja de coca (*Erythroxylum coca Lamarck var. Coca)* procedente del Cusco. semifresca con un contenido de humedad del 11.35 %. Estas hojas fueron proporcionadas por la Empresa Nacional de la Coca ENACO.

3.1.2- ANIMALES

Ratas albinas Holtzman macho de 3 semanas de edad , peso promedio

inicial ≈ 47g. Ellas procedieron de la colonia de la Universidad Nacional Agraria. Se agruparon (n=6-9) según el tratamiento dietario dado.

3.1.3 - DIETAS

Se usaron dietas Controles de caseína (CAS 4.5% y CAS 9.0%) y Experimentales a base de la fracción proteica aislada de la coca (FP COCA 4.5% y FP COCA 9.0%) con diferentes niveles proteicos .Ellas fueron isocalóricas y suplementadas con vitaminas y minerales.

Las fórmulas de la dieta se muestran en la TABLA N° I.

3.1.4- MATERIALES Y EQUIPO DE LABORATORIO

- -Equipo de disección (tijeras , pinzas , bisturí)
- -Aparato de digestión “Digesdahl “Hach
- -Extractor Soxhlet “Corning”.
- -Centrífuga refrigerada “International”.
- -Centrífuga refrigerada “Sorvall”.
- -Balanza analítica “Sartorius”.
- -Balanza de torsión “Ohaus”.
- -Potenciómetro pH meter 28
- -Espectrofotómetro “Unicam SP500 series 2”.

3.1.5-REACTIVOS Y ESTÁNDARES

Los reactivos usados fueron de grado analítico y a partir de ellos se prepararon las soluciones y estándares

3.2.0 - METODOS TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS

3.2.1 - EXTRACCIÓN DEL CONTENIDO PROTEICO DE LA HOJA DE COCA

La extracción del contenido proteico de la hoja de coca se hizo previa molienda de la hoja de coca, homogenización y extracción.

A- MOLIENDA Y HOMOGENIZACIÓN

Estas operaciones se realizaron utilizando un molino mecánico casero y solución de “tocra” (ceniza alcalina que se usa en el coqueo en el Ande) para la homogenización

"Programa Cybertesis PERÚ - Derechos son del Autor"

A.1 - MOLIENDA

Esta operación se realizó hasta obtener de la hoja de coca un polvillo fino para lo cual se repitió hasta 2 veces la operación.

A.2- SOLUCIÓN DE TOCRA

La “tocra” ó “llipta” húmeda tiene un aspecto pastoso de color negruzco .Ésta “tocra” se secó en la estufa a 60 °C y se molió con un mortero, el polvo resultante presenta un color gris claro. Para la preparación de la solución se pesó 170 g del polvo de tocra y se completó con agua hasta un volumen de 1000 ml ,se mezcló agitando por 15 minutos se dejó reposar 3 horas ,luego se separó el sobrenadante (de color del té) el cual se valoró con solución de HCl 0.2 N utilizando fenolftaleína como indicador. La solución de tocra tiene una alcalinidad equivalente a 0.4 M.

A.3- HOMOGENIZACIÓN Y EXTRACCÍON

El polvillo fino de la coca fue pesado (6 kilos) y homogenizado con solución de “tocra” con alcalinidad equivalente a 0.4 M, la proporción entre coca y solución de “tocra” fue de 1:8 (p/v).Para la homogenización por 15 minutos se utilizó una licuadora doméstica (Oster). El pH de éste homogenizado fue de 11.

El homogenizado se incubó a 40 °C (24 horas) en la oscuridad a fin de lograr una mejor extracción y protegerlo de la luz. Después se filtró a través de un cedazo centrifugándose el extracto a 2000 rpm a fin de obtener un extracto libre de partículas del bagazo de la hoja de coca.

El bagazo remanente, fue lavado dos veces con solución de “tocra” 0.4M de alcalinidad, repitiéndose el proceso de filtración y centrifugación anteriores.

B - AISLAMIENTO DEL CONTENIDO PROTEICO

Se realizó según metodología estándar del laboratorio que cultiva la línea de investigación de la coca y el coqueo en el Ande el cual pertenece al Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición de la UNMSM, lugar en el que se ejecutó éste trabajo .Según dicha metodología al conjunto de soluciones extraídas y que contienen las proteínas de la hoja de coca se le trató con ácido acético glacial 99% hasta conseguir un pH alrededor de 5.1, con esto se consigue precipitar una fracción de proteínas. Esta fracción se separó por centrifugación (2000 rpm por 15 minutos) obteniéndose a la vez un sobrenadante. El sobrenadante fue tratado con HCl 37% densidad 1.19 g/mL hasta conseguir un pH de 4.0 a fin de precipitar algunas otras fracciones proteicas que tendrían un punto isoeléctrico menor. Igualmente se separó ésta última fracción por centrifugación (2000 rpm por 15 minutos) , eliminándose el sobrenadante.

C. ELIMINACIÓN DE OTROS COMPONENTES QUÍMICOS PRESENTES EN LAS FRACCIONES PROTEICAS

Las fracciones proteicas aisladas a pH 5.1 y pH 4.0 fueron extraídas en el aparato de Soxhlet con los siguientes solventes: acetona ACS, éter dietílico anhidro y finalmente con alcohol de 96° por 12 horas de extracción para cada uno de los solventes.

Las fracciónes proteicas así tratadas quedaron relativamente libres de otros componentes químicos como clorofila ,alcaloides, grasa ,etc Estas fracciones se secan a temperatura ambiente ,se muelen por separado en un mortero y se pesan, obteniéndose para la fracción proteica pH 5.1: 200 g., y para la fracción proteica

pH 4.0: 52 g .

Las fracciones proteícas obtenidas presentan un color marrón claro ,inodoros y de sabor astringente. Se procedió a la mezcla de ambas fracciones que se usaran como fuente de proteínas de la hoja de coca en la preparación de las dietas Experimentales. La mezcla de las fracciones proteicas pH 5.1 y pH 4.0 se llamarán a partir de ahora: FP COCA.

Posteriormente se procedió a la determinación del contenido de Nitrógeno proteico de la mezcla FP COCA. El resultado de ésta determinación fue utilizado para la preparación de las dietas sobre la base de su valor (N total % = 8.8720 g ; Proteínas % =N total % x 6.25 = 55.45g)

"Programa Cybertesis PERÚ - Derechos son del Autor"

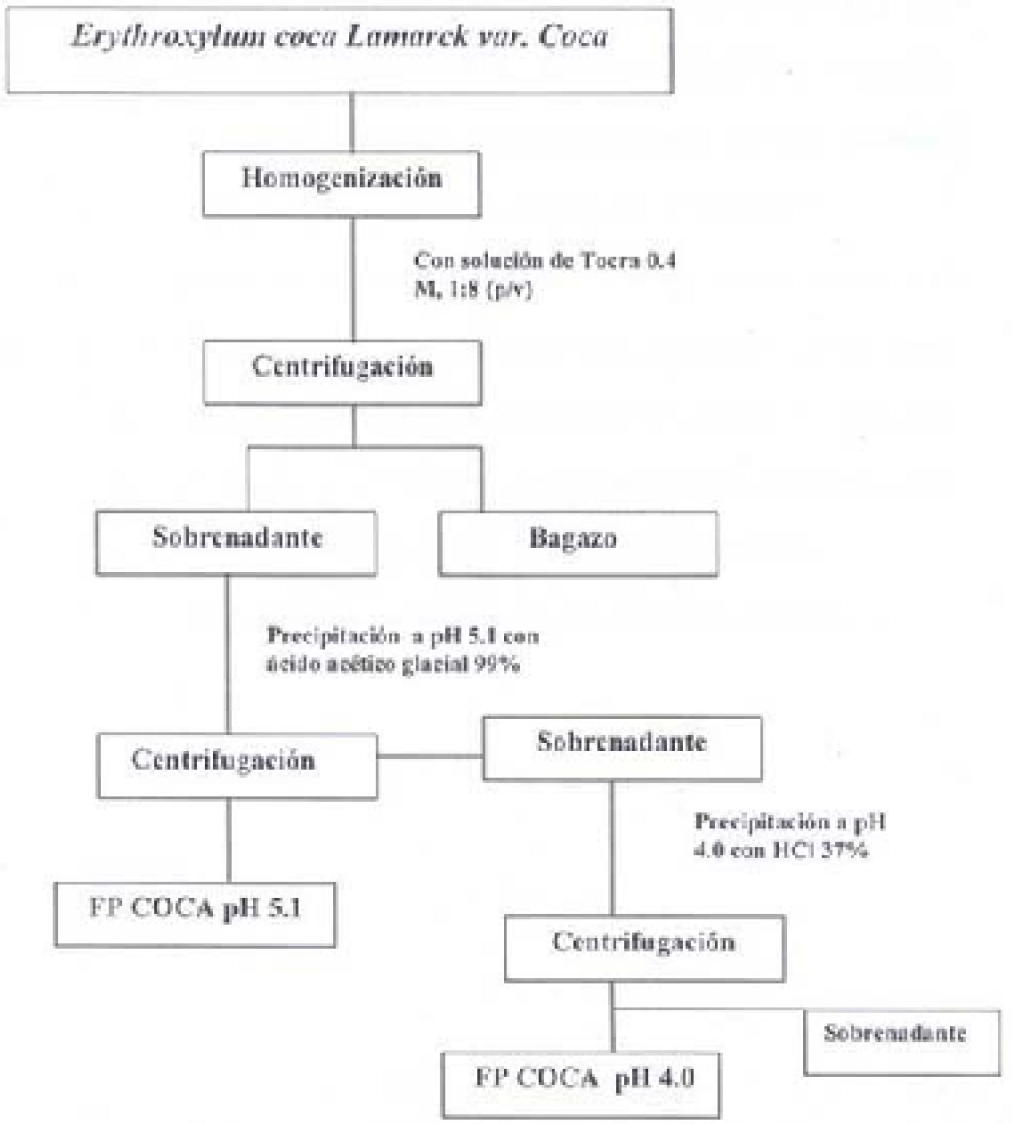


Figura 1. EXTRACCIÓN DEL CONTENIDO PROTEICO DE LA HOJA DE COCA

3.2.2-PREPARACIÓN DE LAS DIETAS CONTROL Y EXPERIMENTAL

Las dietas Control a base de caseína granulada (Eastman – Coleman Co., EUA; N total % = 15.0144 g ; Proteínas %=N total % x6.25 = 93.84g) y las dietas Experimentales a base de FP COCA (N total % = 8.8720 g ; Proteínas %= Ntotal% x6.25 = 55.45 g) fueron preparadas según fórmula señalada anteriormente(23) (24) y las cuales están resumidas en la TABLA N°1.

Esta preparación fue por mezcla de los diferentes componentes y su posterior tamización a fin de homogenizar mejor ésta mezcla y proceder luego a la determinación de su contenido en Nitrógeno por el método de Hach (25) previa digestión en medio sulfúrico y agua oxigenada. Este contenido en N amoniacal fue determinado a su vez por el método de Berthelot (26).

La descripción de éstos métodos analíticos se presentan más adelante.

1, [2]El porcentaje proteico de la caseína y de la fracción proteica de la hoja de coca fue determinada por el contenido de Nitrógeno (N x 6.25). En base a este contenido se prepararon las dietas respectivas al 4.5% y 9.0% de Proteínas. CAS 4.5% (N % = 0.7416; Proteína % = 4.63), CAS 9.0% (N% = 1.4529; Proteína % = 9.08), FP COCA 4.5% (N% = 0.7046; Proteina % = 4.40) FP COCA 9.0% (N% = 1.4488; Proteína % = 9.05).

[3] Fórmula de Hegsted: Carbonato de calcio 1.20 g, Fosfato dipotásico 1.29 g, Fosfato monocálcico 0.30 g, Sulfato de magnesio 0.408 g, Cloruro de sodio 0.670 g, Citrato de fierro 0.11 g, Loduro de potasio 3.2 mg, Sulfato de manganeso 20 mg, Cloruro de zing 1 mg, Sulfato de cobre cristalizado 1.2 mg.

[4] Fórmula de Manna y Hauge: Tiamina 3 mg, Riboflavina 3 mg, Piridoxina clorhidrato 3 mg, Pantotenato de calcio 10 mg, Acido nicotínico 3 mg, Cloruro de colina 150 mg, Biotina 0.01 mg, Acido fólico 0.02 mg, Inositol 40 mg, Acido p-aminobenzoico 30 mg, Menadiona 1 mg, Almidón csp 5g.

3.2.3- TRATAMIENTO DIETARIO

A los animales divididos al azar en 4 grupos dietarios de número variable(n=6-9). según su disponibilidad se les trató con las dietas de caseína y las FP COCA. Los grupos dietarios fueron entonces los siguientes : Controles ,CAS 4.5% y CAS 9.0% Experimentales : FP COCA 4.5% y FP COCA 9.0 %

Para este tratamiento los animales fueron colocados en jaulas de alambre individuales con fondo metálico levantado ,ofreciéndoseles comida y agua *ad libitum* durante 10 días. Durante el período experimental los animales se mantuvieron a temperatura 20 ºC ± 1ºCconperíodos de luz / oscuridad de 12 h cada uno bajo estrictas medidas de limpieza.

El registro del peso y ***el consumo de alimento se hizo cada*** día entre las 8 y 9 de la mañana.

3.2.4 - MUESTRAS PARA ANÁLISIS

Al final de los 10 días, los animales fueron pesados después del retiro del alimento por 12 horas y sacrificados por decapitación en la mañana (9.00 am) bajo ligera anestesia con éter etílico .

El hígado y los demás órganos (riñón, bazo ,corazón ,encéfalo ,pulmón, adrenales) fueron extraídos ,lavados con solución fisiológica (NaCl 0.9%) secados y pesados, guardándose éstos órganos en congelación (-20 ºC) hasta el momento de su análisis. En ese momento ,se prepararon los homogenatos correspondientes utilizados para la determinación de proteínas totales en los órganos y medida de la actividad de arginasa . En el primer caso el homogenato fue preparado con agua bidestilada (1:20 , p/V),. Y para el trabajo con arginasa el homogenato fue según la técnica correspondiente , señalada en la determinación de la actividad de ésta enzima.El remanente de las dietas consumidas

"Programa Cybertesis PERÚ - Derechos son del Autor"

en éste período de 10 días fue pesado para los cálculos respectivos.

3.2.5-DETERMINACIONES QUÍMICAS , ENZIMÁTICAS Y VALORES PER

A- DETERMINACIÓN DEL NITRÓGENO PROTEICO EN LAS DIETAS CONTROLES Y EXPERIMENTALES

La determinación del N total de cada dieta se hizo según el método de Hach(25). Con esto se consigue la conversión del N proteico en sulfato de amonio. La determinación del N amoniacal se hizo por el método de Berthelot (26)

A.1.0 - MÉTODO DE HACH

A.1.1 - FUNDAMENTO

El fundamento de éste método se basa en la conversión por digestión sulfúrica en presencia de peróxido de hidrógeno a 450ºC , del N proteico de la muestra a sulfato de amonio. Este fundamento se complementa con la metodología colorimétrica de Berthelotpara la evaluación del N del sulfato de amonio.

A.1.2- REACTIVOS

- -Acido sulfúrico Q.P ,densidad 1.84 g/ml
- -Agua oxigenada 120 volúmenes.

A.1.3- DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA OPERATORIA

Se pesa de 0.100 -0.200 g de la muestra a analizar : caseína granulada como materia prima para la preparación de las dietas CAS Controles ,FP COCA para la preparación de las dietas Experimentales, dietas Controles a base de CAS (CAS 4.5%, CAS9.0%), dietas Experimentales (FP COCA 4.5%, FP COCA 9.0%) que han sido molidas y mezcladas en forma homogénea.

A.1.4-DIGESTIÓN DE LA MUESTRA

La muestra pesada se colocó en el matraz de digestión del equipo Hach que tiene una capacidad de 100 ml se agregó 4 mL de ácido sulfúrico QP ,densidad 1.84 g/mL, se llevó a 450 °C con el calentador del mismo equipo. La digestión fue de 30 minutos ,al término de ésta se enfrió la solución y agregó 2 mL de agua oxigenada 120 volúmenes y se volvió a llevar a 450 °C por 10 minutos más. El término de la operación se dio cuando la solución se hizo incolora y transparente , se enfrió y enrasó a 100 ml con agua bidestilada.

A.2.0- MÉTODO DE BERTHELOT

A2.1--FUNDAMENTO

El NH_4^+(como sulfato de amonio) presente en la digestión sulfúrica reacciona con el salicilato e hipoclorito de sodio del reactivo(Reactivo Valtex) en ambiente alcalino , formándose un complejo de color verde. La intensidad del color producido es directamente proporcional a la cantidad de N amoniacal presente en la muestra y su absorbancia se lee a 620 n m.

A.2.2--REACTIVOS

- Reactivo Salicilato (Ácido salicílico 5mM ,nitroprusiato de sodio 5mM)
- Reactivo Hipoclorito (Hipoclorito de sodio 10 mM, NaOH 200 mM.)
- Solución “stock” de sulfato de amonio 1mg/ml : 211.8965 µg N / ml
- Soluciones estándar de sulfato de amonio:

St_1 : 10.5948 µg N/ml

St_2 : 21.1897 µg N/ml

St_3 : 31.7845 µg N/ml

St_4 : 42.3793 µg N/ml

A.2.3- DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA OPERATORIA

La técnica que se siguió tanto para la construcción de la curva estándar como para la determinación del contenido de N en las muestras fue la siguiente :

Se tomó 0.02 mL de la solución digerida luego se agregó 1 mL de reactivo salicilato y 1 mL de reactivo de hipoclorito se mezcló ,se colocó en Baño María a 37 °C por 10 minutos y luego se procedió a la lectura en el espectrofotómetro a 620 nm contra un blanco de reactivo

A.2.4-CURVA DE CALIBRACIÓN DE NITRÓGENO

Se construyó una curva de calibración utilizando los estándares de N preparados a partir de la solución stock de sulfato de amonio (1mg/ mL = 211.8965 µg N/ mL)

A.2.4.1-PREPARACIÓN DE LOS ESTÁNDARES DE SULFATO DE AMONIO

A partir de la solución” stock” de sulfato de amonio (1mg/ mL =211.8965 µg N/ ml) se

"Programa Cybertesis PERÚ - Derechos son del Autor"

efectuaron una serie de diluciones con agua bidestilada para obtener los siguientes estándares:

St_1 : 10.5948 µg N /mL

St_2 : 21.1897 µg N /mL

St_3 : 31.7845 µg N /mL

St_4 : 42.3793 µg N /mL

A.2.4.2-CONSTRUCCIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

Los resultados de ésta estandarización (Absorbancia vs µg N/mL) se muestran en la FIGURA N°2.

A.2.4.3-CÁLCULOS

Para la determinación de la concentración de Nitrógeno de los digestos obtenidos se usan dos estándares de N :0.2120 µg N contenido en 0.02 mL de estándar mínimo : 10.5948 µg N / mL y 0.8476 µg N contenido en 0.02 mL de estándar máximo : 42.3793 µg N / mL corridos en forma paralela con las muestras .Con ellos se obtuvo el factor de calibración promedio ,utilizado para los cálculos en las muestras problemas .Se usaron las siguientes fórmulas:

ug N / 100 mL de digesto = Fc x Absorbancia MP x 100/0.02

Donde:

$$Fc = \frac{\frac{0.2120\ \mu g\ N}{Absorbancia} + \frac{0.8476\ \mu g\ N}{Absorbancia}}{2}$$

100/0.02 es el factor de conversión para expresar el contenido de N por 100 mL de digesto. Para expresar µg N como g N se usa el factor de conversión de

1 /1000000

g N / 100 mL de digesto = Fc x Absorbancia MP x 100/0.02 x 1 / 1000000.

Si se usa 0. 1 g de MP en la digestión se obtendrá 100 mL de digesto y el factor de conversión para expresar g N / 100 g MP será :100/0.1 ,por lo tanto la expresión final de la fórmula quedará expresada de la siguiente manera:

g N /100 g MP = Fc x Absorbancia MP x 100/0.02 x 1 / 1000000 x 100/0.1

Los resultados del contenido de N se expresaran entonces por 100 g de cada una de

las muestras sometidas a análisis: g N /100 g de caseína , g N /100 g FP ,

g N /100 g dieta control (CAS 4.5% ó CAS 9.0%),g N /100 g de dieta experimental (FP COCA 4.5% ó FP COCA 9.0%)

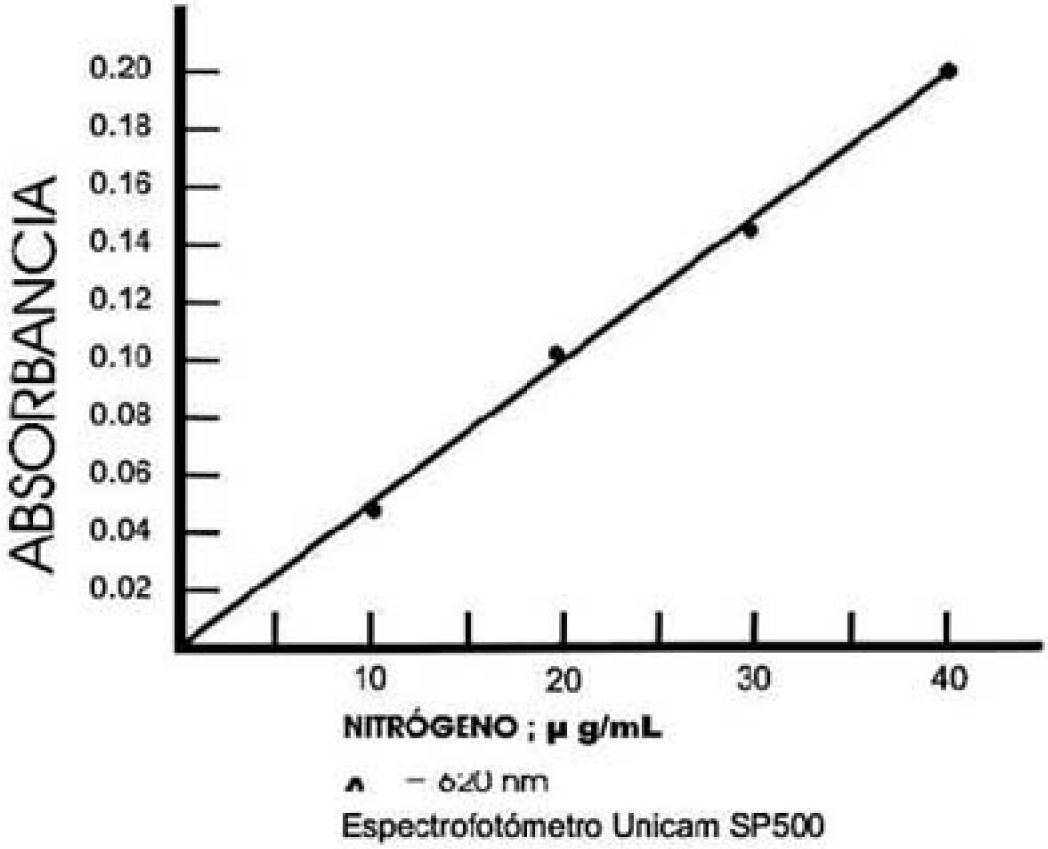


Figura 2 CURVA DE CALIBRACIÓN PARA DETERMINAR N AMONIACAL PROVENIENTES DEL NITRÓGENO PROTEICO (Método de Berthelot)

B. DETERMINACIÓN DE PROTEINAS

B.1.0- MÉTODO DE LOWRY Y Col.

Las proteínas totales fueron determinadas según el método de Lowry y col.(27)

B.1.1- FUNDAMENTO

Las proteínas reaccionan con el reactivo de Folin Ciocalteau para dar un complejo coloreado azul. El color que se forma es debido a la reacción del cobre del reactivo en medio alcalino con la proteína y la redución del fosfomolibdato por la tirosina y el triptófano presentes en la proteína..

B.1.2- REACTIVOS

· Solución de carbonato de sodio anhidro al 2 % : (solución 1)

"Programa Cybertesis PERÚ - Derechos son del Autor"

- Solución de sulfato de cobre pentahidratado al 1% y solución de tartrato de sodio y potasio al 2 %:(solución 2)
- Solución alcalina : prepárese antes de la reacción de color mezclando 50 mL de solución1 y 1 mL de solución 2.
- NaOH 1,0 N
- Reactivo de Folin Ciocalteau diluido 1:3 (v/v) con agua bidestilada. El reactivo de Folin Ciocalteau es una solución de tungstato de sodio y molibdato de sodio en ácido fosfórico y ácido clorhídrico.
- Solución stock de albúmina sérica bovina :1 mg/ mL.

B.1.3-DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA OPERATORIA

La técnica seguida tanto para la construcción de la curva estándar como para la determinación del contenido proteico en las muestras fue la siguiente:

A una alícuota de la solución que contiene la proteína a determinar se le agregó 0.1 mL de NaOH 1 N ,se llevó a BM a 60 °C por 30 minutos .luego se agregó 1 mL de reactivo alcalino recientemente preparado, se dejó en reposo por 30 minutos .se agregó 0,1 mL de reactivo Folin Ciocalteau diluido (1:3) . Se dejó reposar por 15 minutos y se leyó a 660 nm en el espectofotómetro contra un blanco de reactivo. Esta operación se repitió por tres veces para sacar un promedio de las lecturas

B.1.4 -CURVA DE CALIBRACIÓN

Se construyó una curva de calibración utilizando los estándares de albúmina sérica bovina preparados a partir de una solución “stock” de la proteína (1 mg / mL)

B.1.5- PREPARACIÓN DE LOS ESTÁNDARES DE ALBÚMINA

A partir de la solución "stock” de albúmina se hicieron una serie de diluciones para obtener los siguientes estándares:

St1: 0.1 mg/mL

St2: 0.2 mg/mL

St3: 0.4 mg /mL

St4 : 0.8 mg/mL

De éstos estándares se utilizó 0.1 mL de cada uno, equivalentes a 0.01 mg, 0.02 mg

,0.04 mg ,0.08 mg de albúmina.

B.1.6- CONSTRUCCIÓN DE LA CURVA ESTÁNDAR

Los resultados de esta estandarización (absorbancia vs mg albúmina /mL) se grafican en la FIGURA N° 3.

B.1.7 -ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS Y CÁLCULOS

Para la determinación de la proteína en las muestras de cada tejido se utilizó una alícuota (0.010 mL) del homogenato (1:20; p/V) respectivo equivalente a 0.5 mg de tejido ,utilizando en cada corrida 2 estándares de albúmina (0.01mg de albúmina contenida en 0.1 mL de St mínimo, y 0.08 mg de albúmina contenida en 0.1 mL de St máximo) luego se siguió la técnica operatoria antes descrita. Los cálculos se hicieron utilizando el factor promedio según la siguiente formula:

mg proteína / 0.5 mg tejido = Fc x Absorbancia de MP

para luego expresarlo como:

mg proteína / g tejido = Fc x Absorbancia de MP x 2000

Donde:

$$Fc = \frac{\dfrac{0.01 \text{ mg Albúmina}}{\text{Absorbancia}} + \dfrac{0.08 \text{ mg de albúmina}}{\text{Absorbancia}}}{2}$$

2000 = Factor de conversión para expresar mg de proteína por gramo de tejido: 1000/0.5

Por cada MP se trabajó por triplicado y se sacó promedio.

"Programa Cybertesis PERÚ - Derechos son del Autor"

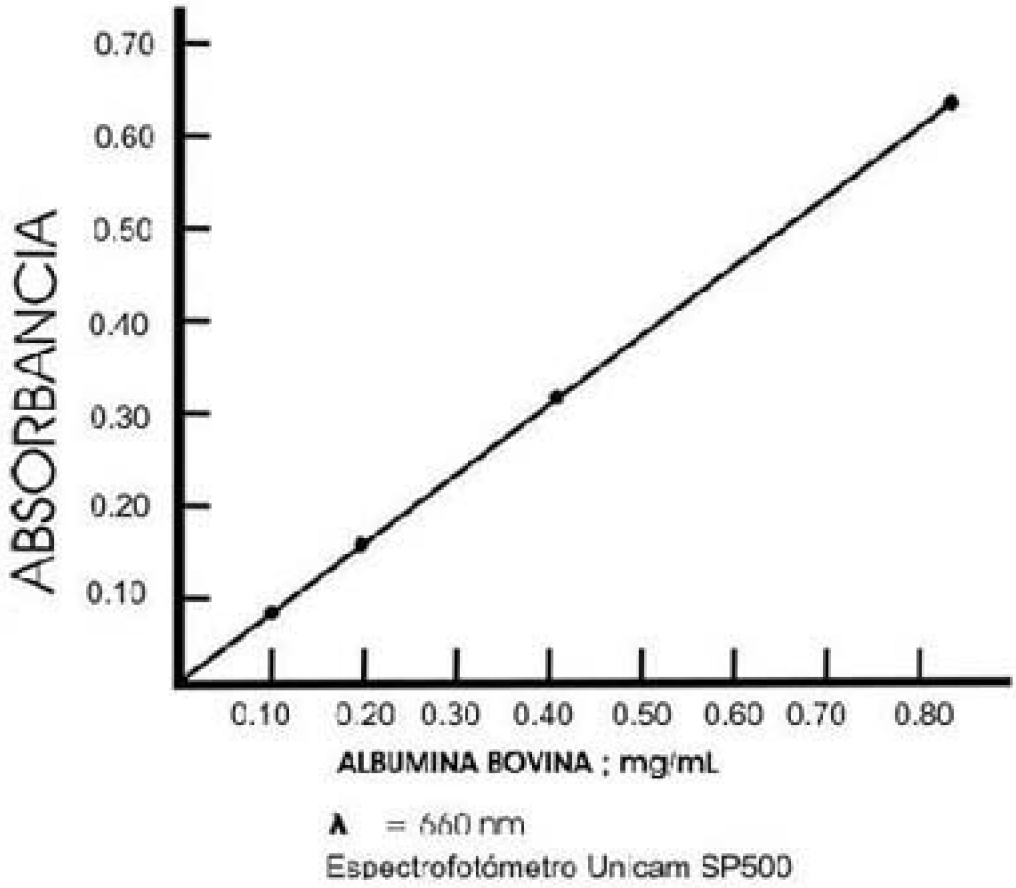


Figura 3. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA DETERMINAR PROTEINAS TOTALES (Método de Lowry et. Al.)

C-DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ARGINASA(E.C.3.5.3.1)

C.1.0-MÉTODO DE ROSSI Y GRAZI

Esta determinación se hizo siguiendo el método de Rossi y Grazi (28) previa activación de la enzima arginasa contenida en el homogenato de hígado y posterior cuantificación colorimétrica de la ornitina liberada, ésta cuantificación se hizo por el método de Chinard (29)

C.1.1- FUNDAMENTO

La arginasa es una enzima del ciclo de la urea que cataliza la hidrólisis de la arginina produciendo ornitina y urea.



C.1.2--REACTIVOS

- -Solución KCl 0.15 M-$MnCl_2$ 5 mM.
- -Buffer maleato 0.1 M- $MnCl_2$ 0.1 M pH 7.0.
- -Buffer Trietilamina-HCl-34 mM – arginina 66mM ,pH 9.5 (TEAM)
- Este reactivo se preparó de la siguiente manera: Por separado se pesó 0.1720 g de TEAM y 0.5746 g de arginina. Después de disolver estos reactivos con HCl 1N y agua bidestilada respectivamente se mezclaron ambas soluciones para luego llevar a pH 9.5 con el agregado de NaOH 1N,al final se enrasó en una fiola a 50 mL.
- -TCA 10%.

C.1.3--PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras de tejido hepático fueron previamente homogenizadas sobre hielo con solución KCl 0.15 M-$MnCl_2$ 5 mM (1:4 ;P/V) usando el homogenizador de Potter-Elvejehm. Este homogenato se centrifugó a 2700 rpm por 10 minutos. Se separó el sobrenadante, el cual fue la muestra sometida a análisis.

C.1.4--DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA OPERATORIA

La técnica que se siguió fue la descrita por Rossi y Grazi (28) la que consistió en lo siguiente:

En una primera fase se realizó la pre-incubación de la muestra a analizar midiendo 0.10 mL de ella en tubos de ensayo y agregando luego 0.4 mL de solución KCl 0.15 M-$MnCl_2$ 5 mM , 2.25 mL de buffer maleato 0.1 M- $MnCl_2$ 0.1 M pH 7.0 y 2.25 mLde agua bidestilada. Esta mezcla se colocó en BM a 37□C por 4 horas.

Al término de ese tiempo se realizó una segunda fase de incubación de la muestra antes pre-incubada; esta operación consistió en tomar en un tubo 0.10 mL del

pre-incubado se le agregó buffer maleato -$MnCl_2$ 0.1 M y 0.6 mL de buffer Trietilamina-HCl-34 mmM – arginina 66mM ,pH 9.5 (TEAM) ; se incubó por 20 minutos. Y se interrumpió la reacción con solución de TCA al 10%.

Se centrifugó a 2000 rpm por 15 minutos. Se separó el sobrenadante para la reacción de color según el método de Chinard (29) para cuantificar la ornitina liberada por actividad de la arginasa

C.2.0-MÉTODO DE CHINARD PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ORNITINA

C.2.1-FUNDAMENTO

A pH 1.0 la reacción de la ninhidrina más ornitina produce un complejo de color rojo proporcional a la cantidad de ornitina presente y que puede ser leído a 515 nm.

C.2.2-REACTIVOS

"Programa Cybertesis PERÚ - Derechos son del Autor"

- -Ácido acético glacial 99%.
- -Ninhidrina.
- -Ácido fosfórico 6M
- -Solución stock de ornitina 25 □mol /mL.
- -TCA 10%
- -Solución mezcla TCA 10%- H_2O bidestilada (4:7)
- -**Solvente de ornitina:** Mezclar ácido fosfórico 6M y ácido acético glacial 99% en la proporción 4:6 respectivamente.
- **Reactivo de color**: Pesar 250 mg de Ninhidrina y agregar 4 mL de ácido fosfórico 6M y 6 mL de ácido acético glacial 99% ,mezclar calentar en BM a 0 □C hasta disolución de la ninhidrina

C.2.3- DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA OPERATORIA

La técnica que se siguió tanto para la construcción de la curva de calibración como para la determinación de ornitina en las muestras ha sido la siguiente:

Se colocó en tubos de ensayo con tapa 0.10 mL de cada uno de los estándares o del sobrenadante TCA 10% de cada muestra obtenida en la prueba de Rossi y Grazi ; se agregó 0.4 mL de la solución mezcla TCA 10%- H_2O bidestilada (4:7) ,0.5 mL de solvente de ornitina ,1 mL de ácido acético glacial 99% ,1 mL de reactivo de color y se llevó a BM hirviente por 1hora ,se enfrió, se agregó 1 mL de ácido acético glacial 99 % , se mezcló y se leyó a 515 nm contra un blanco de reactivo

C.2.4-CURVA DE CALIBRACIÓN

A partir de la solución estándar de ornitina 25 □mol/mL se preparó soluciones estándares de concentración creciente y con ellos se construyó la curva de calibración.

C.2.4.1- PREPARACIÓN DE LOS ESTÁNDARES DE ORNITINA

De la solución stock de ornitina 25 □mol/mL se prepararon los siguientes estándares:

St1 :0.25 μmol / mL

St2 : 0.50 μmol / mL

St3 : 1. 00 μmol /mL

St4 : 1.50 μmol / mL

C.2.4.2-CONSTRUCCIÓN DE LA CURVA ESTANDAR

Los resultados de esta estandarización (Absorbancia vs □mol de ornitina/mL) se muestran en la FIGURA N° 4.

C.2.4.3- A NÁLISIS DE LAS MUESTRAS Y CÁLCULOS

Para la determinación de ornitina en las muestras se usó el sobrenadante proveniente de la incubación llevada a cabo anteriormente ,de éste sobrenadante se usó 0.1 mL y se continuó con la técnica operatoria antes descrita.

Para los cálculos se utilizó un factor de calibración promedio obtenido con estándar mínimo 0.25 □mol/mL y estándar máximo de 1.5 □mol/mL de ornitina,los cuales fueron corridos paralelamente con las muestras.

En 0.1 mL de sobrenadante TCA 10% proveniente la prueba de Rossi y Grazzi hay 0.00003333 g de tejido hepático por lo tanto los resultados se obtuvieron de la siguiente manera:

$$\mu\text{mol ornitina / g tejido hepático} = Fc \times \text{absorbancia MP} \times 30000$$

Donde:

Fc : Factor de calibración promedio que se obtiene :

$$Fc = \frac{\dfrac{0.025\ \mu\text{mol ornitina en St mínimo}}{\text{Absorbancia}} + \dfrac{0.15\ \mu\text{mol ornitina en St máximo}}{\text{Absorbancia}}}{2}$$

3000 = Factor de conversión para expresar µmol ornitina / g tejido hepático:

1/0.000033333

Para expresar la actividad de la arginasa /mg proteina hepática se hace la determinación de proteínas por el método de Lowry en el sobrenadante 2700 rpm en el proceso de homogenización del tejido hepático con Solución KCl 0.15 M-$MnCl_2$ 5 mM siguiendo la técnica explicada anteriormente..

Los resultados se expresaron en micromoles de ornitina/ mg de proteina de tejido hepático x 20 minutos.

"Programa Cybertesis PERÚ - Derechos son del Autor"

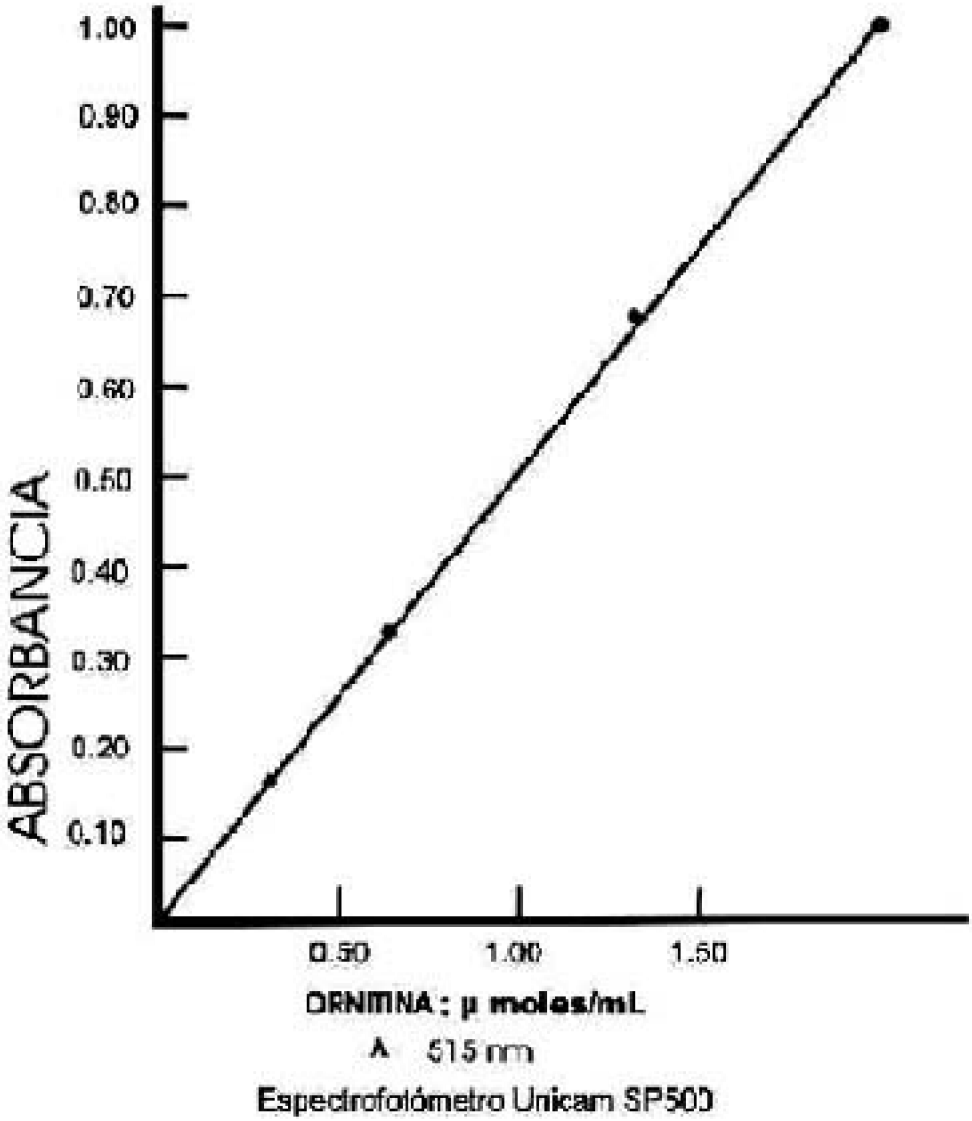


Figura 4. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA DETERMINAR ORTINA EN HIGADO DE RATA (Método de Chinard)

D-INDICES: PER

D.1.0-MÉTODO DE OSBORNE ,MENDEL Y FERRY

Los índices nutricionales de eficiencia proteica (PER) fueron obtenidos en cada grupo dietario después del tratamiento durante 10 días con las dietas respectivas: Controles y Experimentales. Se siguió la técnica de Osborne, Mendel y Ferry (30).

D.1.1- FUNDAMENTO

La eficiencia proteica según éste índice PER se define como los gramos de peso ganados por gramo de proteína dietaria consumida.

D.1.2- DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA OPERATORIA

Los animales que recibieron las dietas respectivas y agua *ad libitum* durante 10 días fueron controlados diariamente en su peso y consumo de alimento a primera hora de la mañana (8-9 a.m.)

El ambiente de experimentación fue señalado anteriormente

D.1.3--CALCULOS

De los incrementos del peso corporal y el consumo de proteína dietaria al término de los 10 días se obtuvo la relación :

PER = Incremento de peso corporal /g proteína consumida

E.-EXPRESIONES ANALÍTICAS Y ESTADÍSTICAS

El peso corporal y el consumo de alimentos por 10 días de experimentación se expresan en g promedio por rata. El consumo de proteína cruda se expresó en g promedio por rata y por día. Los valores de los pesos de los órganos y de su contenido proteico se expresan en g por rata y en mg/g de tejido húmedo respectivamente .Los valores de los índices PER se dieron en cifras promedio por grupo de dietario y los valores de las actividades de la arginasa hepática en µmoles de ornitina formada por mg de proteina hepática.

Los resultados se expresan ó grafican en general como valores promedio con sus desviaciones estandar respectivos. Si estos resultados lo ameritan se explora la aplicación de la prueba estadística de la t de student entre cada grupo Control y su equivalente Experimental. Valores de $p \leq 0.05$ entre los promedios controles ó Experimentales fueron considerados significativos.

"Programa Cybertesis PERÚ - Derechos son del Autor"

IV- RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la experimentación fueron los siguientes:

4.1 CONTENIDO DE NITRÓGENO Y DE PROTEÍNAS EN LAS DIETAS

Los contenidos de N y de proteínas de las dietas preparadas según la metodología experimental se muestran en la TABLA N °2 fueron los siguientes:

4.2- CONSUMO Y VALOR PROTEICO DE LAS DIETAS

Según el tratamiento dietario se tiene los resultados en la TABLA N°3 .En ella se observa un ligero menor consumo de las dietas FP COCA que en las dietas Controles y obviamente el menor consumo de proteína y así un menor valor del desarrollo corporal.

Esto último se deja expresar a su vez en los menores valores de los índices PER. Este menor valor nutricional se deja reflejar también en los pesos de cada órgano de los grupos Experimentales en relación a aquellos de los grupos Controles.

[1]

4.3- PESO Y CONTENIDO DE PROTEÍNAS EN LOS ÓRGANOS

Los resultados se visualizan en la TABLA N°4 en donde se observa que los pesos de los órganos de los animales que recibieron dietas de FP COCA son menores que aquellos de los animales controles .En cuanto al contenido proteico se observa una mínima diferencia entre el contenido proteico de los órganos de animales sometidos a dietas Experimentales de FP COCA con los órganos de los animales Controles .

4.4- ACTIVIDAD DE ARGINASA HEPÁTICA

Estos resultados se grafican en la FIGURA N°6 en la que se observa una mayor actividad de ésta enzima en los animales de los grupos experimentales de FP COCA que aquellos de los grupos Controles. Esta mayor actividad no es significativa.

4.5- INDICE DE EFICIENCIA PROTEICA :PER

Los valores de éstos índices de eficiencia proteica se muestran en la FIGURA N°5, ellos señalan la menor eficiencia proteica en los animales alimentados con dietas experimentales FP COCA en relación a aquellos de los animales controles.

En el caso del grupo FP COCA 4.5% este fue incluso de valor negativo

[1] Las cifras entre paréntesis corresponden al número de animales por grupo. [2,3] Los valores promedio □ Desviación estándar

"Programa Cybertesis PERÚ - Derechos son del Autor"

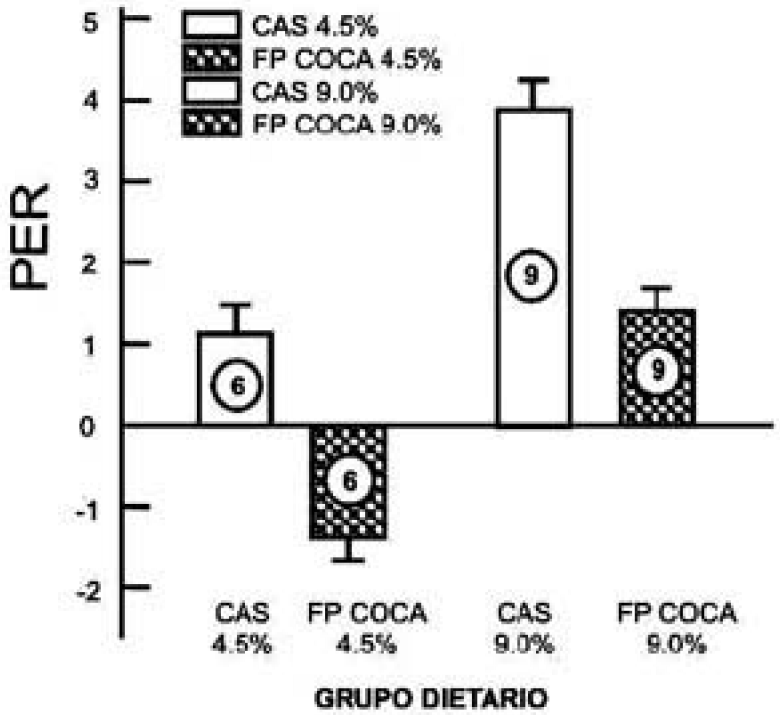


Figura 5. VALORES DE LA EFICIENCIA PROTEICA (PER) EN RATAS TRATADAS CON DIETAS DE CASEINA (CAS) Y FRACCIONES PROTEICAS DE LA HOJA DE COCA (FP COCA) EN DIFERENTES NIVELES.

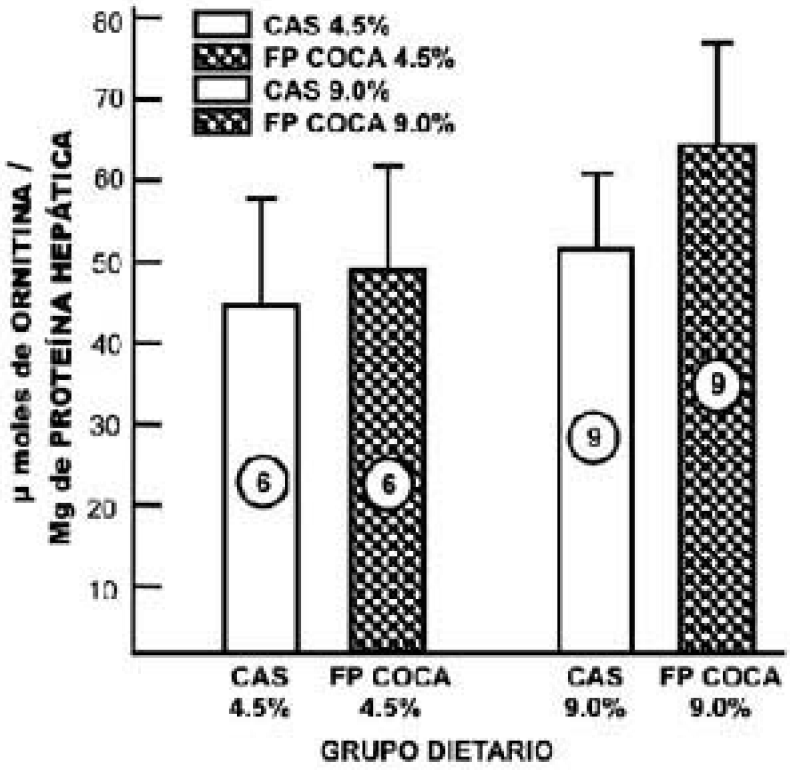


Figura 6. ACTIVIDAD DE ARGINASA EN HIGADO DE RATAS TRATADAS CON DIETAS DE CASEINA (CAS) Y FRACCIONES PROTEICAS DE LA HOJA DE COCA (FP COCA)

EN DIFERENTES NIVELES

"Programa Cybertesis PERÚ - Derechos son del Autor"

V- DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta los resultados presentados en las TABLAS N° 2 y N°3 y N°4 y FIGURAS N°5 y N°6 sobre el valor de la proteína de la hoja de coca, se puede comentar que ésta proteína no sería de una calidad suficiente a las necesidades del organismo de la rata ,animal utilizado en ésta experimentación, aunque habría que tener en cuenta también que en nuestra experimentación las fracciones proteicas que se han obtenido a diferentes pH (5.0 y 4.1) a partir de la hoja de coca no son proteínas en estado de mayor pureza .Son fracciones proteicas separadas en zonas del pH en las que según la literatura (31),(32),(33) se separan muchas proteinas vegetales de sus fuentes naturales y que por ello deben ser purificadas .Las fracciones proteicas de la coca incluyen ,entonces, además de las proteínas separadas a ciertas impurezas químicas remanentes ,todavía, a la acción de los solventes de extracción utilizados (éter dietílico, acetona y alcohol de 96°)para retirar alcaloides, pigmentos y otros componentes propios presentes en ésta hoja. Estas impurezas son las que habrían interferido en algún grado en la evaluación del valor nutricional de las proteínas presentes en las fracciones proteicas separadas de la hoja de coca .

Entre estas impurezas se contarían ,según los análisis hechos por otros autores sobre diversas proteínas vegetales (34),(35) y aquellas realizadas en nuestra propia experimentación adicional a los objetivos principales de éste trabajo algunas sustancias fenólicas, como serían los taninos. Estos taninos tienen una amplia presencia en los tejidos vegetales. Según la literatura disponible (35),(36),(37),(38),(39),(40) estos fenoles ó polifenoles tienen la propiedad de complejarse con las proteínas y carbohidratos muy fácilmente, impidiendo ,en algún valor en el caso de las proteínas, la digestión proteica y,

obviamente, la absorción de sus productos aminoacídicos a nivel intestinal, tal como ha sido demostrado por diversos autores(35),(41),(42)

Es así que posiblemente este haya sido el caso que nos concierne por lo que sería necesario que éstas fracciones proteicas, sean sometidas en posteriores experimentaciones a una mayor purificación a fin de aislar y obtener la proteína en un estado de mayor pureza. Sin embargo hay que tener en cuenta también que ésta proteína de la hoja de coca así aislada, con una mayor ó menor pureza ,según el procedimiento utilizado para su obtención sería una proteína con ciertas limitaciones nutricionales tales como aquellas que caracterizan a la mayor parte de proteinas vegetales. Estas limitaciones estan dadas por la ausencia de un patrón aminoacídico esencial carente ,en alguna medida, de aminoácidos como la metionina, lisina y triptófano .Este es el caso de las proteinas de las leguminosas y cereales(1),(43),(44) .

A favor de ésta suposición sobre el efecto negativo de la presencia de taninos en la fisiología proteica de la coca y sobre las limitaciones en su calidad están también los trabajos que han demostrado que el valor proteico de la hoja de coca integral descocainizada con diferentes solventes es igualmente, pequeño (45).Pero así mismo ,los trabajos realizados en el Instituto nacional de nutrición en 1965 (46) los cuales mostraron que la utilización de la hoja de coca integral sin descocainizar en dietas debidamente suplementadas con otros nutrientes fue tolalmente negativa. Estos trabajos señalan que las impurezas ó agentes químicos propios de la hoja de coca y diferentes a la cocaína que estuvieron presentes en las fracciones proteicas aisladas y sometidas a experimentación nutricional, pudieron ser, tambien las causantes de los valores negativos de los índices PER en el grupo FP COCA 4.5% ,aunque ello si fueron positivos en el grupo FP COCA 9.0%.estos resultados sobre los índices PER obtenidos en el grupo FP COCA 9% y en el grupo FP COCA 4.5% sugieren que el valor nutricional de la proteína de la coca podría ser mejorado si a la dieta FP COCA, se le añadiese algunos aminoácidos complementarios de aquellos que suponemos puede faltar en la planta tales como metionina, lisina ó triptófano. Como prueba del valor nutricional limitado de estas dietas con FP COCA está el hecho del hallazgo mostrado en la FIGURA N° 6, que señala la mayor actividad de la arginasa hepática en los animales tratados con dietas experimentales FPCOCA 4,5% y FPCOCA 9% . Esta enzima es una enzima del ciclo de la urea que interviene en el metabolismo proteico y en el manejo metabólico del exceso de los niveles de la proteína por encima de los valores requeridos del organismo , pero que también muestra una gran actividad en el manejo de los aminoácidos de las proteínas que proporcionan un desbalance de los aminoácidos esenciales y no esenciales necesarios al organismo, como es el caso de las proteínas vegetales incompletas con aminoácidos esenciales limitantes. En ambos casos, sea el exceso de una proteína de buena calidad de la dieta o el de una proteína con desbalance de sus aminoácidos ,se muestra una mayor actividad de esta enzima. (2)y esto último es el caso que nos concierne . Las dietas FP COCA tendrían esas limitaciones antes señaladas causando así un mayor aporte de N amónico provenientes de los grupos amino de los aminoácidos catabolizados al ciclo de la urea y el consiguiente incremento de la actividad de la arginasa hepática. Obviamente que a parte de estas consideraciones , habría que tener en cuenta ,también, el valor de la digestibilidad de las dietas FP COCA., Como

"Programa Cybertesis PERÚ - Derechos son del Autor"

sabemos las proteínas vegetales consumidas con las dietas tienen menor valor de digestibilidad que aquellas dietas con proteínas de origen animal .Estos se debe a una insuficiente capacidad del organismo para digerir y aprovechar estas proteínas vegetales, puesto que ellas se encuentran dentro de células vegetales que tienen cubiertas de celulosa ,la cual no es digerible en el intestino del organismo salvo con la participación en un valor relativo de la flora intestinal. A esta baja digestibilidad de proteínas vegetales provistas por la dieta, FP COCA, contribuiría la complejación que antes hemos señalado entre estos nutrientes y los polifenoles (taninos) presentes en las mismas. Esta suposición está respaldada parcialmente por la observación que en los animales de los grupos FP COCA, hubo una mayor eliminación de heces lo que demostraría la baja digestibilidad de estas dietas y que incluye obviamente ,a sus proteínas, motivando esto a la realización de estudios posteriores. Estudios que deben incluir ,también, la mayor purificación de las proteínas separadas de las hojas de coca, para someterlas a pruebas adicionales sobre su valor nutricional

"Programa Cybertesis PERÚ - Derechos son del Autor"

VI.- CONCLUSIONES

Al probar el valor nutricional de la proteína de la hoja de coca (*Erythroxylum coca Lamarck var. Coca*) se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1- Que las fracciones proteicas de la hoja de coca se extrajeron y precipitaron a pH 5.1 y pH 4.0.

2- Que las dietas Experimentales con diversos niveles de proteína de la hoja de coca (FP COCA 4.5% Y 9.0%) consumidas por ratas jóvenes en desarrollo produjeron un menor desarrollo de sus órganos y menores valores de índices PER con relación a los animales controles que recibieron la dieta de caseína.

3- La actividad de arginasa hepática en ratas sometidas a tratamiento dietario con las dietas Experimentales de FP COCA. (4.5% y 9.0%) fueron mayores (aunque no significativamente) que los de caseína (CAS 4.5% y CAS 9.0%)

"Programa Cybertesis PERÚ - Derechos son del Autor"

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Hawrowitz F. *Química y función de las proteínas*1era edic. Barcelona Ediciones Omega ; 1969 p. 1,2.
2. Devlin T. *Bioquímica ,libro de texto con aplicaciones clínicas* 3era edición,vol 2 España Edit reverté ;2000 p. 1089-91
3. Lloyd I.E. *Fundamentos de Nutrición* 1era edic España Editorial Acribia 1982
4. Guzmán B. *Nutrición humana* tomo I 1era edic Perú ,1980 ,p. 61-64
5. Ramos-aliaga R. Aspectos bioquímicos y nutricionales en ratas en desarrollo que reciben proteínas de dos patrones dietarios de los Andes de Perú Arch. Latinoamer. Nutr. **28** : 378-399,1978.
6. Altshul, A.N. Food; protein for humans. *Chem. Eng. News.* **24**:68, 1969.
7. Pirie, N.W. Research on leaf protein and its application. *Arch. Latinoamer. Nutr*. **22**: 507, 1972
8. Mayorga, H., E. Quintanilla, S. Gonzáles, A. Aizú, J.F. Menchú y C. Rolz. Extracción y precipitación de proteina de semilla de algodón por vía húmeda. *Arch. Latinoamer. Nutr.* **23**:55, 1973.
9. Anson, M.L. Processed Plant Protein Foodstuffs. Original no consultado. Citadopor Sambucetti et. al. *Arch. Latinoamer. Nutr*. **22**:79, 1972.
10. Mc Meekan, C.P. Science, and world animal production (Hammond lecture) *J. Bio. soc. Sci*. **1**:405, 1969.

11. Pirie N.W. *Leaf protein; its agronomy, preparation, quality and use*. Burgess and Son (Abingdon) Limited New England. 1971; p. 110.

12. Wilson, E.D., K.H. Fisher and P. García. *Principles of Nutrition.* Ed. John Wiley and Sons, N.Y., 1979, p. 357.

13. Mondragon, M.C. y D.I. Gonzáles. Caldos de frijoles en relación a su contenido en polifenoles y aminoácidos. *Arch. Latinoamer. Nutr*. **28**:44, 1978.

14. Abbey, B.W., R.J. Neale and G. Norton. Nutritional effects of field bean proteinase inhibitiors fed to rats. *Br. J. Nutr*. **41**:31, 1979.

15. Liener, I.E. Toxic constituents in plant foodstuffs. Original no consultado. Citado por Villanueva, M.R., J.A. Martínez y J. Lanalde. Papel de los polifenoles en el bajo valor nutritivo de la vicia faba. *Arch. Latinoamer. Nutr.* **37**:324, 1987

16. Olascoaga G. La coca peruana en relación con la industria Nacional UNMSM 1942.

17. Machado E. El género Erythroxylum en el Perú, las cocas silvestres y cultivadas en el Perú edit. Raymondiana Lima 1972

18. Duke, J., D. Aulik and T. Plowman. Nutritional value of coca. *Botanical Musseum leaflets,* Harvard University. **24**:111, 1975.

19. Ramos-Aliaga, R., P. Chimoy y A. Cordero. Valor proteico de la hoja de coca. Aspectos químicos preliminares en relación a la composición de la hoja y a su contenido proteico. Trabajo en publicación.

20. Ramos-Aliaga R. Perspectivas nutricionales e industriales no tradicionales de la hoja de coca (Etythroxylum coca) Conferencia, Curso internacional Plantas Medicinales y fundamentos tecnológicos para la producción de Fitomedicamentos Lima Perú (22-25 En.) 2002

21. Zárate, J. Perú: Narcotráfico, realidades y alternativas. *Conferencia Internacional* (5-7 Febrero 1990), Ed. D. García-Sayán. Comisión Andina de Juristas, 1990, p. 49.

22. Ramos-Aliaga, R. Coca andina: reafirmación de su valor y nueva perspectiva en su uso. *Resúmenes III Congreso de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas* "Marco Antonio Garrido Malo", 1996, p. 47.

23. Ramos-Aliaga Y Arroyave G. Bochemical changes produced by cocaine in rats receiving different types of nutrition *Arch. Latinoamer. Nutr*. **19**: 69-81,1969

24. Manna ,L.;M. Hauge A possible relationship of vitamin B12 to orotic acid. *J. Biol. Chem*. **202**: 91-96,1953

25. Hach Company *Instruction Manual Digesdhal Digestion*, Apparatus model 23130 ,20,21 1989

26. Berthelot N.P *Repertoire de Chemie Aplique* 1 (284) 1959

27. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent *J. Biol. Chem.* **193**:265, 1951.

28. Rossi N. y Grzzi E. Characterization of a new type of arginase from chicken liver *Eur. J. Biochem,* **7:** 348-352,1969

29, Chinard, R.P. Photometric estimation of proline and ornithine. *J. Biol. Chem.* **199** *:* 91-95,1952

30. Osborne ,T.; B. Mendel ; L. Ferrry A new way of expressing numerically the growth

promoting value of protein *J. Biol. Chem*. **37,** 223-229, 1919

31. Rajendran S. Isolation and characterization of B globulin low molecular weight from sesame sead /Sesamum indians) *J. Agric. Food Chem.* **36**,269-275 ,1988
32. Hill R. Evaluation of food potential some toxicological aspectts and preparation of a protein isolate from the aerial part of Amaranth ,*J. Agric. Food Chem* **30**,465.469,1982.
33. Cid P. Valor biológico de la proteína foliar de Atriplex suberecta, *Arch. Latinoamer. Nutr* **. 41** 420-427, 1991.
34. Ulloa A. Obtención de un concentrado proteínico de garbanzo (Cicer arietinum) por ultrafiltración *Archivos latinoamer. Nutr* **. 50,** 378-385, 1987
35. Villanueva M. Papel de los polifenoles en el bajo valor nutritivo de la vicia faba, *Arch. Latinoamer. Nutr*. **37** ,324.332,1987.
36. Velez A. Interacción in vitro de la pulpa de café y algunas proteínas*. Arch Latinoamer. Nutr* **. 35**,297-305,1985.
37. Calderón P. Factors influencing the formation of precipitates and hazes by gelatin and condensed and hidrolyzable tannins, *J. Agr. Food Chem*. **16**, 479-492,1968
38. Butler L. Polyphenols in cereal and legumes. Procedings of a Symposium held during the 26 th Annual Meeting of yhe Institute of food technologist,Missouri Otawa canadá,1979.
39. Armstrong G. Hydrophobic interaction in tannin-protein complexes, *J. Agric. Food Chem* **. 28**,394.398.1980
40. Swain T. Plant Biochemistry ,*Academic Press* , New York **4,** 552,1965.
41. Barroga Ch. Effect of condensed tannins on the in vitro protein digestibility of mung bean (vigna radiata) *J. Agric. Food Chem* **. 33**, 1157-1159,1985 .
42. Carmona A. Tannins ,thermostable pigments which complex dietaty proteins and inhibit digestive enzimes. *Arch. Latinoamer. Nutr*. **44,** 31-35 1994.
43. Sotelo A. Utilización del garbanzo (cicer arietinum) en fórmulas no lácteas *Archivos latinoamer. Nutr*. **37**,551-559 1987.
44. Cheterjee S. Aminoacid composition of new varieties of cereals and pulses

J. Food Sci. Tech. **12**, 221-227,1975

45. Ramos-Aliaga, R., K. San Roman y D. Solano. Cambios ponderales y bioquímicos en ratas que reciben dietas con hojas de coca. *Resúmenes III Congreso de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas."Marco Antonio Garrido Malo*,p. 63, 1996.
46. Collazos-Chiriboga, C., R. Urquieta y E. Alvistur. Nutrición y coqueo. *Rev*. .*Viernes Médico*. **16**:36, 1965.