

Fe de erratas: El presente trabajo se publica nuevamente debido a los errores de imprenta cometidos, por lo que pedimos disculpas a sus autores.

# Determinación del contenido de aminoácidos libres del agua de coco tierno por HPLC y Revisión electrónica sobre la nueva tecnología para el envasado del agua de coco

JOSÉ F. OVALLES, ANDRÉS LEÓN L.<sup>1</sup>, ROSALBA VIELMA<sup>2</sup> Y ANA L. MEDINA<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Laboratorio de Análisis de Medicamentos, <sup>2</sup>Laboratorio de Ciencias de los Alimentos. Facultad de Farmacia, Universidad de Los Andes. Mérida, R. B. de Venezuela.

## RESUMEN

Se realizó una evaluación de las razones por las cuales el agua de coco no se comercializa en nuestro país bajo la forma de refresco envasado. Se determinó que recientemente la FAO patentó una metodología que permitirá, a los fabricantes de refrescos, envasar el agua de coco sin que pierda el sabor natural y las propiedades nutritivas. Se expuso la importancia que esta patente puede representar para el Departamento de Ciencias de los Alimentos de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Los Andes. Adicionalmente, se determinó el perfil de aminoácidos libres del agua de coco tierno de la región Sur del Lago, mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa, utilizando una derivatización de aminoácidos con o-ftalaldehído (OPA). Para la validación del método se utilizó una muestra patrón de aminoácidos y una columna OPA-HS. Un total de 11 aminoácidos libres fueron identificados y cuantificados. Los aminoácidos libres encontrados en mayor proporción (> 5 mg / 500 mL) en el agua de coco, por unidad, fueron: serina, glicina, histidina, tirosina, fenilalanina, isoleucina y leucina.

## ABSTRACT

The reasons for which the coconut water is not marketed under the form of bottled cold drink were studied. Recently the FAO patented a technology that will allow to pack the coconut water without it loses the natural flavor and the nutritious properties. The Department of Sciences of the Foods of the Faculty of Pharmacy of the University of Los Andes could benefit of this new technology. The samples were recollected from the South Region of the Maracaibo Lake. Additionally, the total free amino acids content of the

water coconut was determined by reverse phase-high performance liquid chromatography technique. Amino acids were derivatized using o-phthalaldehyde (OPA) reagent. The method was validated using a patron sample of amino acids and an OPA-HS column. A total of 11 free amino acids was identified and quantified. The coconut water, was characterized by a high content (> 5 mg / 500 mL) in serine, glycine, histidine, tyrosine, phenylalanine, isoleucine and leucine.

## PALABRAS CLAVE

Cocos nucifera L., Agua de coco, Aminoácidos, o-ftalaldehído (OPA), HPLC, cromatografía líquida de alta eficiencia.

## AGRADECIMIENTO

Al Personal del Laboratorio de Análisis de Medicamentos de la Facultad de Farmacia de la Universidad de los Andes.

## INTRODUCCIÓN

El consumo de agua de coco, directamente del fruto, ha sido y continúa siendo una práctica habitual en nuestro país, razón por la cual se planteó como objetivo investigar las causas por las cuales el mercado de jugos de frutas no ha podido comercializar un producto natural a base de agua de coco. El agua de coco refrigerada es uno de los alimentos más apreciados cuando el calor agobia y la sed comienza. Además, desde el punto de vista bromatológico, el agua de coco es rico en nutrientes según las tablas de composición de alimentos nacionales e internacionales. Desde el punto de vista de las bebidas para el deporte, los aminoácidos libres resultan de gran interés. Sin

embargo, estos datos no suelen ser incluidos en las tablas de composición de alimentos [INN, 1999], [McCance y Widdowson, 1960], [Hart y Fischer, 1971], [Fischer y Bender, 1972], [Osborne y Voogt, 1986], [Coultrate, 1992], [Holland, et al, 1992], motivo por el cual también se planteó como objetivo realizar esta determinación en del agua de coco tierno.

La planta de coco o cocotero perteneciente a la familia *Arecaceae*, y de nombre científico *Cocos nucifera* L., es una palmera, de tronco largo y elástico, con hojas pinnadas ubicadas solamente en la copa de la planta. El fruto de esta palma es el coco, una drupa de tamaño similar a la de un melón pequeño, cubierto de una capa gruesa y fibrosa. En la parte interna del fruto se encuentra un compartimiento cerrado de capa dura, llamado nuez de coco; dentro de ésta, se descubre la semilla conformada por una pulpa blanca comestible y un líquido ligeramente opaco, conocido como agua de coco. Se especula que esta planta es originaria de las Islas del Pacífico y habita actualmente en todas las zonas del trópico, incluyendo varias regiones de Venezuela. En general, suelen distinguirse tres tipos de cocoteros en función de la altura: gigante, enano e híbrido, y dentro de cada tipo un gran número de variedades [1], [2].

Moog (1997), cita más de veinte usos diferentes de las partes de esta palmera. El fruto maduro es utilizado para extraer la copra o pulpa blanca desecada, y con ella obtener aceite y mantequilla, o fabricar champúes, cremas y bronceadores [1]. La harina de coco se utiliza como suplemento en la alimentación animal [3]. El fruto tierno del cocotero es aprovechado para extraer el líquido o leche con la finalidad de emplearlo como bebida refrescante.

El agua de coco es una bebida a la cual se le atribuyen muchas virtudes por su elevado contenido en sales minerales, vitaminas y carbohidratos (tabla 1). El agua de coco fue utilizada durante la Segunda Guerra Mundial como sustituto del suero glucosado [4]. “Es una bebida isotónica natural (...) con el mismo equilibrio electrolítico que nuestra sangre (...) es el líquido de la vida por así decirlo” afirma Satin [2001], miembro del Departamento de Agricultura de la FAO. Llama poderosamente la atención, que esta bebida refrescante se ingiera extrayéndola directamente del fruto, sin que el mercado mundial de jugos de frutas se interese en envasarlo y expendirlo. Fue precisamente este fenómeno el que emplazó a los autores para abordar los dos objetivos planteados inicialmente.

La razón por la cual el mercado de refrescos o jugos de frutas no había podido comercializar este producto natural era la ausencia de una tecnología adecuada de preservación del agua de coco. Es cierto que en los

**Tabla 1 Valores nutritivos del agua de coco**

Componente	Contenido / 100 g (Venezuela) <sup>[a]</sup>	Contenido / 100 mL (Foráneo)
Calorías	18	20 <sup>[b]</sup>
Humedad (g)	95,1	nd
Proteínas (g)	0,2	0,1 <sup>[b]</sup>
Grasas (g)	0,1	0,05 <sup>[b]</sup>
Carbohidratos totales (g)	4,1	5,5 <sup>[b]</sup>
Fibra dietética total (g)	0,0	nd
Cenizas (g)	0,5	nd
Calcio (mg)	20	nd
Fósforo (mg)	11	0,4 <sup>[b]</sup>
Hierro (mg)	0,4	nd
Magnesio (mg)	nd	10 <sup>[c]</sup>
Zinc (mg)	nd	nd
Cobre (mg)	nd	nd
Sodio (mg)	nd	25 <sup>[b]</sup>
Potasio (mg)	nd	294 <sup>[c]</sup>
Cloruro (mg)	nd	118 <sup>[c]</sup>
Vitamina A	nd	nd
β Caroteno	nd	nd
Tiamina (mg)	nd	nd
Riboflavina (mg)	0,01	nd
Niacina (mg)	0,1	nd
Vitamina B6 (mg)	nd	nd
Ácido ascórbico (mg)	2	nd

<sup>[a]</sup> INN (1999) <sup>[b]</sup> www.infoagro.com [2]

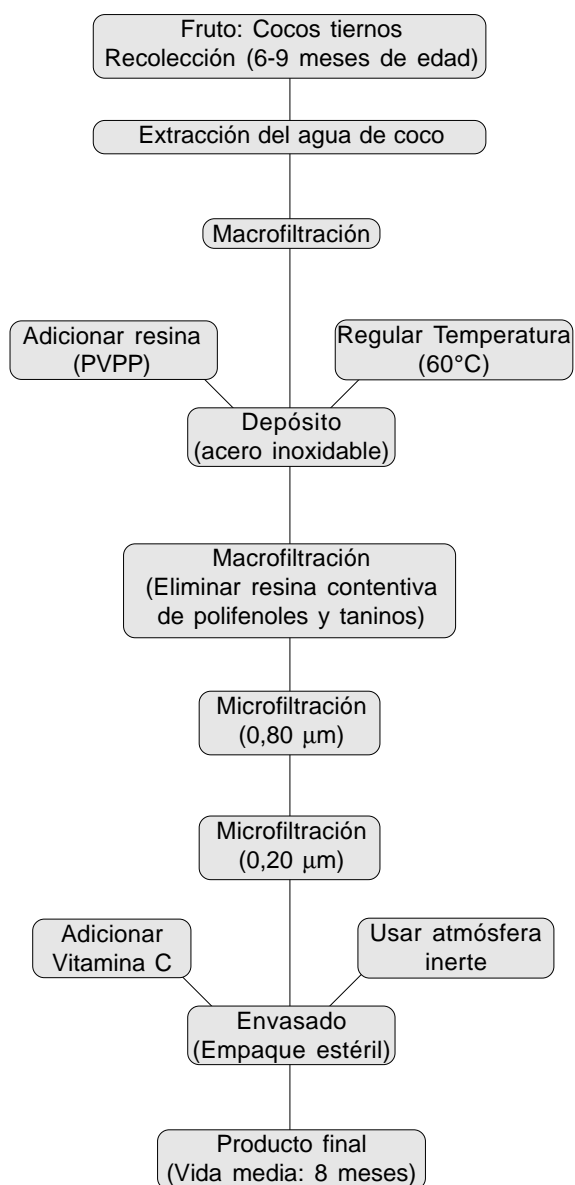
<sup>[c]</sup> www.members.es.tripod.de [5]

nd = no hay datos disponibles

últimos años, se ensayaron algunas técnicas con este fin, sin embargo, no fueron las más idóneas. El proceso rápido de pasteurización a alta temperatura (*HTST*), la misma tecnología para pasteurizar la leche líquida de larga duración, es el utilizado por algunos países asiáticos (Indonesia, Filipinas y Tailandia), con el inconveniente de que el producto final pierde parte del valor nutricional y casi todo el sabor natural [3]. Otra tecnología implementada en la conservación del agua de coco es la carbonatación, no obstante, presumimos que el sabor típico del agua de coco debe ser diferente [6]. Hoy día, varias compañías de refrescos Brasileñas ofrecen agua de coco envasada, sin preservativos o aditivos, con la garantía de que son productos cien por ciento naturales, pero ninguna de ellas menciona la tecnología utilizada [7], [8], [9].

El agua de coco, que durante siglos, se consumió directamente del fruto, ahora, puede envasarse. La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) patentó un nuevo proceso de estabilización del agua de coco. El método se fundamenta en una esterilización en frío, para

conservar el sabor y todas las propiedades nutritivas, utilizando una microfiltración que retiene todos los microorganismos y esporas (Esquema 1). El agua de coco estéril finalmente se transfiere a los envases bajo una atmósfera de nitrógeno con la finalidad de llenar asepticamente los envases, tal como lo hacen algunas compañías de refrescos [10]. Los investigadores lograron estabilizar el color del producto final adicionando una pequeña cantidad de vitamina C (0,015%). El objetivo siguiente de La FAO es desarrollar una política de concesión de la licencia para que este proceso pueda ponerse a libre disposición de una amplia variedad de fabricantes en los países tropicales, de manera que puedan beneficiarse de esta nueva tecnología [3].



El Departamento de Ciencias de los Alimentos, de la Facultad de Farmacia de la Universidad de los Andes, dispone de una planta piloto, que con el equipamiento complementario necesario, podría utilizar la reciente tecnología patentada por la FAO para preparar un refresco natural con el agua de coco. Los productos naturales constituyen una parte cada vez más significativa de la dieta actual, por lo que es de gran importancia no desestimar esta alternativa tecnológica para la facultad de Farmacia y la Universidad de los Andes. Para nuestro país, puede resultar un reto tecnológico ya que otros países vecinos se nos han adelantando en este sentido. Recientemente, Brasil presentó en el Salón Internacional de Alimentos de París el producto DuCoCO. Este refresco natural fue seleccionado como una de las mejores bebidas no alcohólicas del mundo y el mejor lanzamiento nacional en el rango de bebidas no alcohólicas [11]. Este mismo país, ya diseñó una máquina extractora del agua de coco a nivel industrial, la cual procesa aproximadamente 30.000 cocos por día, en lugar de los 1.000 cocos por día que un hombre puede abrir manualmente [12].

La idea de elaborar un refresco para el deporte basado en el agua de coco, resulta de gran interés gracias a que esta bebida es más rica en nutrientes que cualquier otra bebida procesada tecnológicamente. Por otra parte, si esta bebida resultare rica en aminoácidos libres, el interés aumentaría. Hoy en día, se sabe que 8 aminoácidos son esenciales y 2 son semiesenciales para la vida humana. La fuente de aminoácidos por lo general son las proteínas, sin embargo, existen aminoácidos libres en algunos frutos, por ejemplo, los frutos de las plantas de la familia *annonaceae* [Periago, et al, 1994]. La pulpa del *coco maduro* se caracteriza por un elevado contenido de proteínas [13], lo cual permite conjeturar que el agua del *coco tierno* debe ser rica en aminoácidos libres, ya que el líquido lechoso finalmente se convierte en la pulpa. En virtud del interés mostrado por uno de los autores, decidimos llevar a cabo algunos ensayos preliminares, entre ellos, precisamente los correspondientes a la determinación analítica del perfil de aminoácidos libres del agua de coco tierno, que se comercializa mayoritariamente en la región Andina. Este estudio podría representar el preámbulo de una investigación que permita complementar la tabla de composición de alimentos oficiales de Venezuela (tabla 1).

El análisis de aminoácidos se realiza de manera indirecta debido a que no se pueden detectar en la región visible-UV. Existen varios reactivos que reaccionan con los aminoácidos dando compuestos coloreados o fluorescentes, y por lo tanto pueden utilizarse para análisis cualitativos o cuantitativos. El método usual para determinar aminoácidos en

alimentos es la cromatografía de intercambio iónico con detección post-columna mediante reacción con ninhidrina (analizador automático de aminoácidos). No obstante, debido a las diferencias entre estos analizadores y las limitaciones inherentes a ellos, las determinaciones analíticas de aminoácidos sólo deben tomarse en cuenta como orientadoras [14]. Hoy en día, las técnicas de cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (*RP-HPLC*) constituyen los métodos más usados para el análisis de aminoácidos. Uno de los procedimientos más utilizados es la derivatización pre-columna de aminoácidos con o-ftalaldehído (*OPA*). La especie química *OPA* fue originalmente introducida como un reactivo alternativo a la ninhidrina en la derivatización postcolumna y más tarde en la derivatización precolumna, en virtud de la ventaja presentada en términos de sensibilidad. Los aminoácidos reaccionan con el reactivo *OPA* en presencia de un reductor fuerte (2-mercaptoetanol) y condiciones alcalinas (pH 9-11) para originar derivados isoindólicos fluoróforos. La separación en fase reversa seguida de detección fluorescente, constituye un método de detección sensible y selectivo para todos los aminoácidos con grupos amino primario presentes en diferentes muestras, tales como, alimentos, frutas y suero sanguíneo. La metodología no es válida para determinar aminoácidos secundarios sin previo tratamiento de la muestra con hipoclorito de sodio o cloramina T [Hanai, 1991].

En este artículo se reporta el perfil de aminoácidos libres del agua de coco tierno de la región Sur del Lago. La determinación se realizó utilizando muestras de agua de coco fresca, sin tratamiento previo. El método empleado fue la cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa y derivatización precolumna de los aminoácidos con el reactivo *OPA*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### MATERIALES Y EQUIPOS

Filtros de membrana 0,2 mm (Millipore, EE UU) y 0,45 mm GHP (Mfd para Waters Corporation, EE UU). Medidor de pH Orion (modelo 720A, Orion Research Inc. Boston, MA 02129, EE UU). Columna cromatográfica de 100 mm x 4,6 mm, fase estacionaria Adsorbosphere OPA-HS, 5 m (Lote No. 2521 de Alltech Associates, Inc. Deerfield, IL, EE UU) Cromatógrafo para fase líquida de alta eficiencia (Waters, EE UU) provisto de dos bombas 510 HPLC, controlador automático de gradiente (modelo 680), inyector automático (modelo 712 Wisp), detector de longitud de onda de fluorescencia variable (modelo 470), y un módulo registrador (modelo 745B).

### REACTIVOS

Agua destilada (Milli-Q). Metanol grado HPLC (Mallinckrodt, St. Louis, MO, EE UU). Fosfato monopotásico (98-100 %, PA., Riedel-De Haen AG S 1 D-3016 ), Ácido acético glacial (analytical reagent, BDH Chemicals Ltd, Inglaterra). Solución tampón pH 4,00 (lote 9802043 BDH, Canadá). Solución tampón pH 7,00 (lote 9802042 BDH, Canadá). o-Ftalaldehído (reactivo *OPA*) listo para usar (lote No. P-0532, St. Louis, MO, EE UU). 2-mercaptoetanol (St. Louis, MO, EE UU). Aminoácidos individuales y solución patrón de aminoácidos (0,5  $\mu$ moles/mL) (Product N°. A2908. Sigma, St. Louis, MO, EE UU).

### PARTE EXPERIMENTAL

#### MUESTREO

Se recolectaron 10 cocos tiernos de una misma planta (cáscara externa verde-amarillenta y correosa) proveniente de la Región Sur del Lago. Con un cuchillo se retiró el mesocarpo sin perforar el endocarpo. Momentos antes del análisis (30 minutos), se perforó el endocarpo de cada coco para recolectar el líquido en un Erlenmeyer de 6 litros de capacidad (el volumen total resultó equivalente a 520 mL por coco). De esta muestra se midió 100 mL y se hizo pasar por una membrana filtrante de 0,45 mm (solución muestra: SM-1).

#### PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES

**Solución muestra de trabajo (SM-2):** se midió 1 mL de muestra ultrafiltrada y se transfirió a un matraz aforado de 10 mL, se diluyó y llevó a volumen con ácido acético 30 mM, bajo una atmósfera de gas nitrógeno.

**Solución madre de aminoácidos individuales, n = 17 (SP-1):** se pesó por separado una muestra de cada aminoácido equivalente a 2 mM respectivamente, se transfirió a un matraz aforado de 10 mL, se diluyó y se llevó a volumen con ácido acético 30 mM, después cada una de las soluciones se transfirió a un vial color ámbar y se selló bajo una atmósfera de nitrógeno.

**Solución patrón intermedia de aminoácidos individuales (SP-2):** se transfirió 1 mL de cada solución SP-1 a un matraz aforado de 10 mL de capacidad respectivamente, se diluyó y enrasó con ácido acético 30 mM, bajo una atmósfera de nitrógeno, después cada matraz se envolvió con papel aluminio y se conservó en el refrigerador (= 4 °C) hasta el momento de usarse.

**Solución patrón de trabajo de aminoácidos individuales (SP-3):** a partir de cada solución patrón intermedia se preparó una solución 20  $\mu$ M, utilizando ácido acético 30 mM como diluyente.

**Solución patrón de trabajo de una mezcla de aminoácidos (SP-4):** a partir de la solución SP-1 se

preparó una serie de soluciones patrones para construir la curva de calibración equivalentes a 0  $\mu\text{M}$  de cada aminoácido, 2  $\mu\text{M}$  de cada aminoácido, 4  $\mu\text{M}$  de cada aminoácido, 8  $\mu\text{M}$  de cada aminoácido, 12  $\mu\text{M}$  de cada aminoácido y 16  $\mu\text{M}$  de cada aminoácido respectivamente, utilizando ácido acético 30 mM como diluyente.

#### **PROCEDIMIENTO DE DERIVATIZACIÓN**

Se transfirió 100  $\mu\text{L}$  de la solución a ensayar (SP-4 o SM-2) a un vial, bajo atmósfera de nitrógeno, luego se adicionó 200  $\mu\text{L}$  del reactivo OPA (formulado como: o-ftaldialdehído, Brij 35, metanol, 2-mercaptoetanol y tetraborato de potasio, ajustado a pH 10,4) y exactamente 60 segundos después, se adicionó 500 mL de una solución buffer 0,4 M de tetraborato de sodio ajustada a pH 10, inmediatamente se selló, agitó e inyectó en el cromatógrafo.

#### **PREPARACIÓN DE LA FASE MÓVIL**

**Fase acuosa (A):** se preparó 950 mL de una solución 50 mM de fosfato monosódico, se ajustó el pH a 7,2 con ácido fosfórico, luego se transfirió a un matraz aforado de 1000 mL y se llevó a volumen con agua destilada MQ, finalmente se filtró y desgasificó.

**Fase Orgánica (B):** se transfirieron 700 mL de metanol absoluto y 300 mL de la fase acuosa (A) a un frasco cónico con tapa, se agitó, filtró y desgasificó.

#### **PARÁMETROS DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO**

**Fase móvil:** (A) solución 50 mM de fosfato monosódico ajustado a pH 7,2 y (B) metanol - buffer fosfato (70 : 30, v/v). **Flujo:** 2 mL/min. **Temperatura de la columna:** ambiente (20°C). **Volumen de inyección:** 10  $\mu\text{L}$ . **Detector:** Fluorescencia, filtro 1,5 y atenuación 16 x 100. **Detección:** excitación 340 nm y emisión 455 nm. **Gradiente (T - %B - curva):** (0-10-cóncava); (35-65-cóncava); (45-90-convexa).

#### **VALIDACIÓN DEL MÉTODO**

**Ensayo de conveniencia del sistema cromatográfico (SST).** Se comprobó inyectando al menos 10 veces la solución SP-4 hasta obtener picos de altura entre 10 % y 100% con respecto a la respuesta de la señal fluorométrica. La concentración de los aminoácidos con menor señal se ajustó para preparar la curva de calibración. Se examinó un rango de concentraciones entre nM y  $\mu\text{M}$ . Para determinar la porción de muestra y una concentración de aminoácidos dentro de la curva de calibrado, se efectuó un estudio similar al mencionado para la solución SP-4.

**Identificación de los aminoácidos.** Se obtuvo mediante ensayos individuales duplicados de

materiales de referencia (SP-3) y un ensayo duplicado de la mezcla de aminoácidos (SP-4).

**Repetitividad.** La precisión dentro de rachas se examinó mediante inyecciones cuádruples de una solución intermedia de la serie de patrones de la mezcla de aminoácidos (SP-4). La curva de calibración, para el análisis de la muestra SM-2, se obtuvo mediante inyecciones por duplicado.

**Robustez.** Se evaluó la repetitividad dentro de rachas y entre rachas en relación a los tiempos de retención y las áreas de los picos. La estabilidad de los aminoácidos derivados se normalizó mediante un seguimiento riguroso del tiempo de derivatización y posterior inyección de los patrones y la muestra.

**Linealidad.** Cada solución SP-4 se inyectó por duplicado y se determinó las áreas medias de los picos cromatográficos. Para cada aminoácido se construyó una curva de calibrado. Las concentraciones de las soluciones SP-4 para construir las curvas de calibración fueron 0, 2, 4, 8 y 12  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, para aquellos aminoácidos minoritarios se les ajustó la concentración hasta un máximo de 32  $\mu\text{M}$ .

**Determinación de la cantidad de solución muestra a ensayar.** Se derivatizó 100  $\mu\text{L}$  de muestra SM-1 y 100  $\mu\text{L}$  de muestra diluida SM-2.

**Análisis estadístico de los datos.** Se utilizó el programa Microcal Origin 5.0

#### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Los estudios preliminares para optimizar el método se efectuaron como se ha descrito anteriormente [Jones, et al. 1981], [Umagat, et al. 1982], [Hanai, 1991], sin embargo, se encontró escasa resolución entre algunos pares de OPA-derivados, limitada estabilidad de los derivados y una línea base poco uniforme. La columna utilizada en este estudio, OPA-HS, fue diseñada para el análisis rápido de aminoácidos (aproximadamente 20 min). En este sentido, se sacrificó el parámetro tiempo (aproximadamente 45 min) para obtener una mejor resolución. La estabilidad de los derivados isoindólicos aumentó al sustituir la solución de fosfato monopotásico 0,4 M (pH 4,3) [Alltech, 1993] por una solución buffer 0,4 M de tetraborato de sodio ajustada a pH 10. La exclusión de tetrahidrofurano de la fase móvil, y el uso de longitudes de onda de excitación y emisión ligeramente diferentes a las sugeridas por la bibliografía especializada, permitieron mejorar notablemente la línea base y la señal de respuesta para cada uno de los aminoácidos.

La resolución obtenida para la mayoría de los aminoácidos primarios derivatizados fue satisfactoria tanto para el patrón como para la muestra (Fig. 1 y 2). Los derivados isoindólicos de histidina, glicina y

treonina, que normalmente coeluyen, fueron separados usando las condiciones descritas en la sección de materiales y métodos. Los aminoácidos metionina y valina coeluyeron bajo las condiciones descritas (Fig. 1). La falta de resolución de este par de aminoácidos ha sido reportada con anterioridad [Alltech, 1993].

Los tiempos de retención (RT), entre corridas, para la curva patrón (inyecciones por duplicado), no varió representativamente ( $< 0,1$  min), manteniendo en cada caso la resolución esperada. A pesar de que no se usó un patrón interno, la variación de los tiempos de retención diario e interdiario fue inferior a 0,1 min. La precisión dentro de rachas, expresada como coeficiente de variación porcentual (CV), para una solución SP-4 ensayada 4 veces de manera consecutiva fue en todos los casos  $< 5\%$  (tabla 2).

La sensibilidad resultó ser un factor crítico en este estudio, sin embargo se logró obtener un rango lineal a nivel  $\mu\text{M}$ . Un intervalo lineal entre 4 y 16  $\mu\text{M}$  resultó adecuado para la mayoría de los aminoácidos derivatizados, no obstante, la concentración final de algunos aminoácidos se ajustó entre 2 y 32  $\mu\text{M}$ . El coeficiente de correlación (r) fluctuó entre 0,998 y 1,000 (tabla 2). La cantidad de solución muestra óptima para lograr una concentración dentro del rango lineal fue 1 mL de muestra ultrafiltrada (SM-1) diluida a 10 mL con ácido acético 30 mM (SM-2).

Las muestras de agua de coco fueron ultrafiltradas para eliminar las macromoléculas nitrogenadas y material insoluble, e inmediatamente conservadas en una atmósfera de nitrógeno. Este procedimiento, aunado al rápido análisis de las muestras, permitió descartar el uso de estabilizadores o conservadores de los aminoácidos libres. Los resultados demostraron que es posible determinar el perfil de aminoácidos en muestras de agua de coco fresca, sin tratamiento previo.

Un total de 11 aminoácidos libres fueron identificados y cuantificados en el agua de coco tierno (tabla 2). El contenido líquido de cada coco ( $\approx 500$  mL) se caracterizó por un elevado contenido ( $> 5$  mg) en serina, glicina, histidina, tirosina, fenilalanina, isoleucina y leucina (tabla 3). El área de los picos de los aminoácidos metionina y valina fue representativa, sin embargo, no fueron cuantificados debido a la pobre resolución cromatográfica obtenida (Fig. 2). Los datos reportados para leucina corresponden al par enantiomérico leucina-norleucina. Otros aminoácidos, tales como: citrulina, lisina y gaba no fueron detectados. En este estudio no se investigó la presencia de aminoácidos secundarios y tampoco de triptófano.

El contenido de aminoácidos libres del agua de coco varía representativamente de una muestra a otra

**Tabla 2**  
**Conveniencia del sistema cromatográfico y perfil de aminoácidos libres del agua de coco tierno.**

Aminoácidos		Optimización del sistema			Cuantificación
Orden de elución	Sol. Patrón ( $\mu\text{M}$ )	Reproducibilidad <sup>a</sup>		Linealidad <sup>b</sup> (r)	Muestra <sup>c</sup> ( $\mu\text{M}$ )
		TR (DS)	Áreas (%CV)		
1 Asp	12	0,015	2,534	1,000	1,59
2 Glu	12	0,040	2,815	0,999	1,03
3 Ser	12	0,051	3,193	0,998	10,51
4 Gly	16	0,026	1,134	0,999	27,19
5 Thr	12	0,091	4,141	0,999	6,34
6 His	12	0,064	3,767	0,998	25,30
7 Cit	12	0,046	2,353	0,999	ND
8 Ala	12	0,038	1,878	1,000	6,38
9-10 Gaba-Arg	(12-12)	0,058	3,907	-	NC
11 Tyr	12	0,066	1,950	0,999	7,91
12-13 Met - Val	(24-24)	0,033	2,623	-	NC
14 Phe	24	0,054	1,600	0,999	21,34
15 Ile	12	0,029	2,100	0,999	10,48
16 Leu	12	0,025	2,516	0,999	6,76
17 Lys	24	0,062	4,638	0,999	ND

<sup>a</sup> n = 4

<sup>b</sup> n = 5 (duplicado)

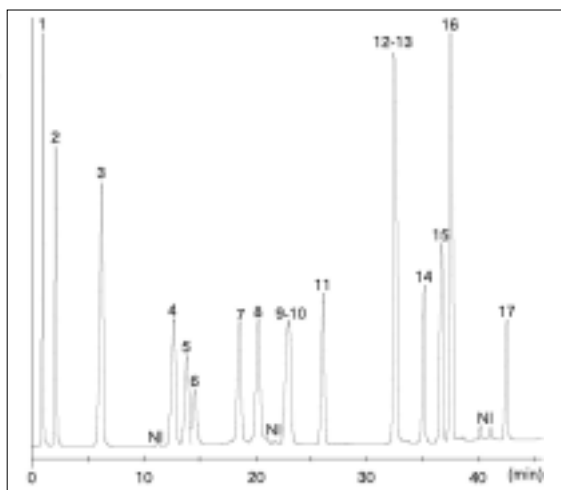
<sup>c</sup> n = 2 (duplicado)

(datos no reportados), debido probablemente a la madurez de los frutos, ya que este líquido lechoso finalmente se convierte en la pulpa de coco, rica en proteínas. Ante la ausencia de datos referentes al perfil de aminoácidos libres del agua de coco en la región Sur del Lago, se propone llevar a cabo un muestreo directamente de las diversas zonas productoras, para poder controlar la edad de los frutos recolectados y a su vez lograr observar la influencia de ésta sobre el parámetro estudiado. Luego de la evaluación química de las muestras sería conveniente someter los datos a un tratamiento estadístico para llegar a establecer conclusiones que permitan caracterizar el agua de coco desde el punto de vista del perfil de aminoácidos libres para una cosecha específica.

El agua de coco, además de aminoácidos libres, contiene sustancias minerales de elevado interés biológico en virtud de que se encuentran en forma de sales solubles fácilmente asimilables por el organismo. Actualmente se consume en Venezuela una cantidad representativa de cocos tiernos, de los cuales se aprovecha únicamente el agua de coco como bebida, generalmente refrigerada y sin tratamiento tecnológico. El precio, al menos en la ciudad de Mérida, por lo general, es inferior a la de cualquier bebida comercial, y tres veces menor que una bebida para el deporte. Si se toman en cuenta estas consideraciones, es posible inferir que los inconvenientes causados por: el transporte, el gran volumen que ocupa, la extracción final y la conservación, quedarían subsanados al comercializarse el producto a gran escala.

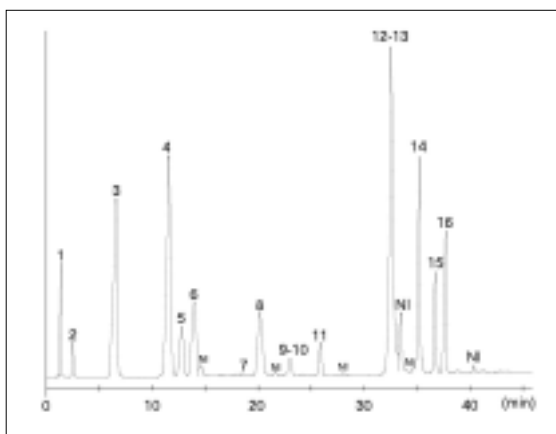
Si el envasado se efectuara en una zona cercana al sitio de la cosecha se podría aprovechar la totalidad de los subproductos, tal como la Universidad de Carabobo, lo vislumbrara, en un excelente estudio sobre el mercado del coco en Venezuela, hace más de tres décadas [Herranz, 1968]. Hoy en día, conocido el método idóneo de preservación y envasado del agua de coco, comercializar el agua de coco, representa un próspero mercado, en el cual la Facultad de Farmacia de la Universidad de Los Andes, podría jugar un rol protagónico gracias a la planta piloto del Departamento de Ciencias de los Alimentos. Sólo desde el punto de vista nutricional basta comparar una de las bebidas comerciales para el deporte con el agua de coco, para darnos cuenta del enorme potencial nutricional que ésta representa (tabla 3).

**Figura 1. Cromatograma de los aminoácidos de una muestra patrón.**



Aminoácidos derivados con ortoftalaldehído/2-mercaptoetanol y separados con ayuda de un gradiente de elusión. Identificación: 1 = Asp, 2 = Glu, 3 = Ser, 4 = Gly, 5 = Treonina, 6 = Hist, 7 = Cit, 8 = Ala, 9-10 = Gaba-Arg, 11 = Tyr, 12-13 = Met-Val, 14 = Phe, 15 = Iso, 16 = Leu, 17 = Lys, y NI = no identificado. Concentración de cada aminoácido: ver tabla 2.

**Figura 2. Cromatograma de los aminoácidos del agua de coco.**



Condiciones cromatográficas: como se indican en el texto. Identificación : ver Figura 1.

**Tabla 3. Cuadro comparativo entre el agua de coco y una bebida comercial para el deporte.**

<b>INFORMACIÓN NUTRICIONAL</b>		
<b>Componente</b>	<b>Marca comercial (500 mL)</b>	<b>Agua de coco <sup>[a]</sup> (500 mL)</b>
Grasas (g)	0	0,25
Carbohidratos (g)	15	27,5
Proteínas (g)	-	0,5
Calorías	59	100
<b>Minerales (mg)</b>		
Sodio	16	125
Potasio	32	800
Magnesio	-	50
Calcio	-	100
Fósforo	-	55
Hierro	-	2
Cloruro	106	590
<b>Vitaminas (mg)</b>		
- Riboflavina	-	0,05
- Niacina	-	0,5
- Ácido ascórbico	-	10
<b>Aminoácidos (mg) <sup>[b]</sup></b>		
- Ácido glutámico	-	1
- Ácido aspártico	-	1
- Alanina	-	3
- treonina	-	4
- Serina	-	6
- Tirosina	-	7
- Isoleucina	-	7
- Leucina	-	9
- Glicina	-	10
- Fenilalanina	-	18
- Histidina	-	20
<b>Aditivos</b>	agua, dextrosa, glucosa, sacarosa, citrato de sodio, fosfato monopotásico, betacaroteno, sabor artificial, color artificial, etc.	ácido ascórbico (0,02%)

<sup>[a]</sup> Contenido equivalente a un coco tierno, basado en la tabla 1. <sup>[b]</sup> Ver tabla 2.

**REFERENCIAS ELECTRÓNICAS**

[URL (sept-nov 2001)]

- [1] www.dietanet.com
- [2] www.infoagro.com
- [3] www.fao.org
- [4] www.readysoft.es
- [5] www.members.es.tripod.de
- [6] www.cocoricointernational.com
- [7] www.peladin.com.br
- [8] www.sococo.com.br
- [9] www.kerococo.com.br
- [10] www.waternunc.com
- [11] www.ducoco.com.br
- [12] www.embrapa.br
- [13] www.readysoft.es/inc/coconut.html
- [14] www.europa.eu.int./eur.lex/es/htm

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Alltech. 1993. **Folleto de Alltech sobre Adsorbosphere® OPA.** Columna OPA-HS. Alltech Associates Inc. USA. Data sheet D28062, p.1. Catálogo de Alltech Associates Inc. U.S.A. Nº 250. P. 410.
- Coulter, T. P. 1992. **Food: the chemistry of its components.** Royal Society of Chemistry. Cambridge. P. 93-96.
- Fischer, P. y Bender, A. 1972. **Valor nutritivo de los alimentos.** Limusa-Wiley. México. P. 69-85.
- Hanai, T. 1991. **Liquid chromatography in biomedical analysis.** Journal of chromatography library. Vol. 50. Editorial Elsevier. The Netherlands. P. 47-80.
- Hart, F. L. y Fischer, H. J. 1971. **Análisis Moderno de los Alimentos.** Editorial Acribia. Zaragoza, España. P. 328, 340-342.



Herranz, M. J. 1968. **Estudio sobre el Mercado del coco en Venezuela.** Departamento de Publicaciones de la Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela.

Holland, B., Welch, A. A., Unwin, I. D., Buss, D. H., Paul, A. A. y Southgate, D. A. T. 1992. **The composition of foods.** The royal Society of Chemistry. Cambridge. P. 120, 316-317.

INN. 1999. **Instituto Nacional de Nutrición.** Tabla de composición para uso práctico. Serie de Cuadernos Azules. Caracas, Venezuela. Publicación N° 52. P. 72-73.

Jones, N. B., Pääbo, S., y Stein, S. 1981. **Amino acid análisis and enzymatic sequense determination of peptides by an improved o-phthaldialdehyde precolumn labeling procedure.** J. Liq. Chromatogr. 4 (4): 565-586.

McCance, R. A. y Widdowson, E. M. 1960. **The composition of food.** Medical Research Council Special Report Series N° 297. Londres. P. 82-83, 137.

Moog, F. A. 1997. **Roles of coconut and the potential of coco-palm juice in animal production in the Philippines.** En: Conferencia Electrónica de la FAO sobre "Agroforestería para la producción animal en Latinoamérica" (alvarod@hilderstone. Ac.uk). V Seminario-Taller Internacional "Sistemas Sostenibles de producción Agropecuaria" y Primer seminario Internacional "Palmas en Sistemas de Producción Agropecuaria para el Trópico". Organizado por la Fundación CIPAV, Cali. Colombia.

Osborne, D. R. y Voogt, P. 1986. **Análisis de los nutrientes de los alimentos.** Editorial Acribia. Zaragoza, España. P. 86-94.

Periago, J. L., Torres, M. N., Sánchez-Medina, L., Gil, A., y Faus, M. J. 1994. **Free amino acids profile of ripening cherimoya fruit.** Ars Pharmaceutica. Vol. 35 (2): 315-326.

Satin, M. 2001. **Nueva bebida para el deporte: agua de coco.** Enfoques del Departamento de agricultura. Organización de las naciones Unidas para la agricultura y la Alimentación (FAO), en: <http://www.fao.org/ag/esp/revista/9810/spot3.htm> (actualizado nov 2000).

Umagat, E., Kucera, P. y Wen, E-F. 1982. **Total amino acid análisis precolumn fluorescence derivatization.** J. Chromatogr. 239: 463-474.