

Análisis cualitativo de aminoácidos libres presentes en jugos, cremogenados y concentrados de naranjas argentinas por cromatografía de capa delgada. Su utilidad en la detección de adulteraciones

Sobrero, María Silvina; Fernández, Verónica; Muller, Diana; Perren, Martha; Rey, María Carolina; Sanchis, Juan Carlos

Cátedra de Química General. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. CC 530 (3000) Santa Fe, Argentina.

RESUMEN: Se evaluó la utilidad de la técnica de cromatografía en capa delgada (CCD) como ensayo para la investigación cualitativa del contenido de aminoácidos libres en jugos de naranja recién exprimidos, concentrados y cremogenados. Se seleccionó la técnica ascendente unidireccional que mostró ser sencilla, económica y apta para laboratorios de baja complejidad. Se procesaron muestras conjuntamente con patrones, obteniendo las relaciones entre las distancias de corrida de los aminoácidos puros y la del frente del solvente (R_f) y el perfil aminoacídico de las muestras procesadas de naranja. Se verificó la utilidad de la técnica como método de screening para detectar si se realizó mayor dilución de la declarada y/o se ha reemplazado el jugo por otras sustancias como: glutamato de sodio y glicocola. En el caso de sustitución de jugo por cremogenado, como ambos presentaron el mismo perfil, este método no sería suficiente.

Palabras claves: aminoácidos- jugos – adulteración – cromatografía en capa delgada.

SUMMARY: Suitability of Thin – Layer – Chromatography (TLC) technique as assay for the qualitative investigation of free aminoacid content in orange juice, concentrate and comminuted was evaluated. Sobrero, María Silvina; Fernández, Verónica; Muller, Diana; Perren, Martha; Rey, María Carolina; Sanchis, Juan Carlos. The ascending, one dimensional technique was selected, it is a simple and economical, applicable for small laboratories.

Samples were processed simultaneously with standards; the front relations (R_f values) and the aminoacids profile of the orange processed samples were obtained.

The technique could be useful as screening method for the detection of high dilutions or the substitution of juice for glutamate and glicine. On the contrary, this method seems to be insufficient to detect the substitution of juice for comminuted because both presented the same profile.

Key words: aminoacids, juices, adulteration, Thin – Layer – Chromatography (TLC).

Introducción

El control de jugos y bebidas en base a cremogenados y concentrados es una permanente preocupación de la sociedad, ya que los mismos se consumen en forma creciente, fundamentalmente por niños.

La necesidad de garantizar la calidad de estos productos está en relación a una mayor conciencia de los consumidores sobre el valor nutricional de los alimentos, así como la necesidad de los productores e industriales de ajustarse a las condiciones impuestas por la globalización de la economía.

A pesar de esto siguen existiendo en el mercado productos adulterados, que encuadran dentro de las exigencias del Código Alimentario Argentino. (1-2).

Los fraudes más frecuentes son la dilución o el reemplazo del jugo genuino por aminoácidos (glutámico o glicocola), sales de amonio (2-3), cremogenados, jugos de otras frutas, entre otros. (4-6).

Por lo tanto, el análisis del perfil aminoacídico de los jugos de frutas aporta datos de gran valor en casos de peritajes para certificar la calidad (7-11). El mismo se puede obtener realizando cromatografía en capa delgada (CCD), bidimensional. Los datos

obtenidos por dicha técnica son semicuantitativos. Las técnicas recomendadas por las normas internacionales para la cuantificación de aminoácidos consisten en cromatografía de intercambio iónico, o bien el uso de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). (12-14).

En el presente trabajo se propone una técnica sencilla como es la CCD unidireccional, para ser empleada en laboratorios de baja complejidad como ensayo orientador, cuyo objetivo es evaluar si el producto en estudio coincide con los perfiles característicos de los productos puros. En los casos en que esto no ocurra, se deberá continuar el estudio realizando la cuantificación por los métodos antes mencionados para su confirmación.

Materiales y metodología

Columna de vidrio para intercambio iónico de 10 cm de longitud y 1,5 cm de diámetro interno. Resina Amberlite I.R. 120 de 0,3 - 1,2 mm, marca Merck. Cromatofolios de aluminio para CCD, de silicagel 60 GF254, marca Merck. Cuba cromatográfica de vidrio (30 cm x 30 cm x 10 cm). L-aminoácidos marca Sigma Chemical. Ninhidrina (2,2-dihidroxi-1,3-indanediona) y colidina (2,3,6-trimetilpiridina), marca Sigma Chemical. Glutamato de sodio, Glicocola y Benzoato de sodio grado alimentario. Etanol absoluto, alcohol n-butílico, ácido acético glacial, hidróxido de amonio y ácido clorhídrico, marca Cicarelli, calidad pro análisis.

Muestras: Las muestras de jugos recién exprimidos, cremogenados y concentrados de naranjas Valencia, fueron provistas por productores de la costa del río Uruguay de las provincias de Corrientes y Entre Ríos de la República Argentina. El muestreo se llevó a cabo según se indica en Sanchis, J.C. en el año 2000. (15).

Se utilizó benzoato de sodio como conservante de cremogenados y concentrados. Estos últimos se diluyeron con agua suficiente para reconstituirlos.

Preparación de las muestras

Se eliminan sustancias interferentes de las muestras efectuando una extracción con solvente (etanol - agua: 80:20), a razón de 2 ml de muestra por 18 ml de solvente, dejando en contacto durante 24 hs a 4°C. Se centrifuga 10 minutos a 2000 rpm, se lava

el residuo con porciones de solución hidroalcohólica. El sobrenadante se concentra a 40°C y vacío hasta sequedad, con rotavapor, con baño calefaccionado (BÜCHI 461 Water Bath). El extracto seco anterior se redissuelve en agua destilada suficiente para restituir el volumen original de la muestra, ajustando el pH a 2 con ácido clorhídrico.

La resina sulfónica, Amberlite IR 120, se hidrata con agua y se activa con ácido clorhídrico 6N, a continuación se lava con agua destilada hasta reacción de cloruros negativa. Con dicha resina se rellena la columna de vidrio hasta una altura de 5,5 cm. Se siembran en ella 2 ml del extracto redissuelto, se deja en reposo 30 minutos; al cabo de ese tiempo se lava con agua destilada hasta azúcares reductores negativos.

Los aminoácidos que quedaron retenidos en la resina de intercambio iónico son eluidos con una solución de hidróxido de amonio 1M; la velocidad de flujo se ajusta a 1 gota cada 10 segundos. Posteriormente los aminoácidos eluidos son concentrados a sequedad por rotavapor y redissueltos en agua destilada para luego sembrar la CCD.

La puesta a punto se realiza procesando disoluciones acuosas de los aminoácidos puros.

Para controlar que no existan pérdidas de aminoácidos durante los lavados así como para confirmar si se ha terminado de eluir, se realizan controles utilizando la reacción de la ninhidrina: se coloca una gota de eluato en un pocillo de una policubeta, se lleva a sequedad para evaporar el amoniaco y por último se agrega una gota de disolución alcohólica de ninhidrina (0,1%), se calienta y se observa la aparición del color característico.

Cromatografía en capa delgada

Se lleva a cabo la cromatografía en capa delgada, en forma unidimensional ascendente, sobre cromatofolios de silicagel 60 GF254, usando como solvente la mezcla Butanol/Ácido Acético/Agua (80:20:20). El tiempo medio de corrida es de 3 horas, a 4°C. En la misma placa se siembran las muestras y mezclas de aminoácidos patrones. Estas últimas se preparan por combinación de aquellos que presentan Rf diferentes, luego de correr disoluciones acuosas de 1 mg / ml de los aminoácidos puros. La siembra se efectúa con jeringa Hamilton, 2 microlitros para mezclas patrones y 5 microlitros para las muestras incógnitas, a 2 cm del borde inferior del cromatograma.

tofolio, 1 cm de los laterales y 1 cm entre siembras. Se seca la placa y se sumerge el borde inferior de la misma en el solvente de corrida, que se coloca con anterioridad en la cuba cromatográfica para que esta se sature con sus vapores (cuidando que el solvente no bañe la zona de siembra). Se deja el tiempo previsto o bien hasta que el frente del solvente alcance 10 cm del punto de siembra. Se retira y se seca.

Se revela por aspersion, en campana de gases, con una solución de ninhidrina al 0,1% en etanol, con el agregado de colidina (para visualizar de manera diferencial los colores de los aminoácidos), colocan-do 5 minutos en estufa a 100°C, para obtener color.

Resultados

Se experimentó la separación de aminoácidos utilizando la técnica bi y unidireccional. Se eligió la última porque se logró buena separación, en menor tiempo, con menos gasto y desechos de solventes.

Además de esta forma en la misma corrida se puede tener muestras y patrones para controlar los efectos ambientales particulares que pueden afectar a cada ensayo.

Se emplearon dos soportes diferentes, silicagel y celulosa, sobre vidrio y aluminio, concluyendo que silicagel sobre aluminio es el que mejor se ajustó a las necesidades.

Se estudiaron otras mezclas de solventes como: propanol/agua, fenol/agua, butanol/acetona/ácido fórmico, butanol/acetona/hidróxido de amonio y butanol/ácido acético/agua, solos o combinados en corridas bidireccionales. Los mejores resultados separativos se obtuvieron con fenol/agua y butanol/ácido acético/agua. Se seleccionó la última mezcla porque se evitan los inconvenientes y riesgos que implica trabajar con fenol.

Se determinaron las medias de los Rf y colores para cada uno de los aminoácidos puros utilizados como patrones de referencia. Estos resultados se muestran en Tabla 1.

Tabla 1: Cromatografía en capa delgada de disoluciones acuosas de aminoácidos puros. Rf y color característico

Aminoácido ^a	Rf	Color obtenido
Alanina	0,27	Violeta
Arginina	0,08	Violeta-bordeaux
Ac. Glutámico	0,27	Violeta
Asparagina	0,18	Amarillo
Aspártico	0,21	Violeta
Fenilalanina	0,52	Violeta
GABA	0,36	Naranja oscuro
Glicina	0,23	Naranja
Glutamina	0,34	Púrpura
Hidroxiprolina	0,20	Amarillo
Histidina	0,07	Marrón
Isoleucina	0,51	Naranja oscuro
Leucina	0,51	Naranja oscuro
Lisina	0,06	Bordeaux
Metionina	0,43	Parduzco
Ornitina	0,06	Bordeaux
Prolina	0,17	Amarillo
Tirosina	0,24	Bordeaux
Treonina	0,50	Parduzco
Triptofano	0,25	Púrpura
Valina	0,55	Marrón-amarillo
	0,39	Marrón

a: L – aminoácidos.

Soporte: sílica gel

Solvente: Butanol – Acido acético – Agua.

Revelador: ninhidrina – colidina.

Para poder disponer en cada corrida simultáneamente de todos los aminoácidos patrones y muestras incógnitas, se decidió agruparlos en mezclas. Así se logra controlar la variabilidad de los Rf propias de las condiciones particulares de cada corrida. Las mezclas utilizadas tuvieron la siguiente composición:

I- Arginina, Hidroxiprolina, Alanina, Valina, Fenilalanina

II- Histidina, Asparagina, Glicina, Ac. Glutámico, Metionina, Tirosina

III- Ornitina, Prolina, Treonina, Isoleucina, Triptofano, Ac. Aspártico

IV- Lisina, Glutamina, Serina, GABA, Leucina

Luego de seleccionar y ensayar la técnica de purificación y separación, se analizaron 81 muestras de jugos de naranja recién exprimidos, 13 de

cremogenados de naranjas y 6 de jugos de naranja concentrados.

Los resultados obtenidos para jugos de naranja recién exprimidos, se presentan en la Tabla 2, detallando para cada uno de los aminoácidos investigados la proporción (en %) de jugos en que fue encontrado y el intervalo de confianza del 95% para esa proporción. Se destaca la presencia en el 100% de las muestras estudiadas de arginina, ácido gamma amino butírico (GABA) y prolina; de este último se sabe que es el principal aminoácido libre en los jugos y que su cuantificación se utiliza en la investigación de adulteraciones. Otros aminoácidos identificados con mayor frecuencia son glicina, fenilalanina y alanina, en menor proporción ácido glutámico. No se pudo detectar la presencia de asparagina, glutamina, hidroxiprolina, lisina, ornitina y tirosina.

La misma experiencia se repitió con cremogenados de naranjas, obteniendo el mismo perfil cromatográfico que el obtenido para los jugos recién exprimidos.

Tabla 2: Aminoácidos libres en jugo de naranja recién exprimido identificados por cromatografía en placa delgada

Aminoácido	Proporción (%) ^a	IC del 95% ^b
Alanina	65,43	54,85-76,01
Arginina	100,00	100,00
Asparagina	0,00	0,00
Aspártico	44,44	33,39-55,50
Fenilalanina	74,07	64,32-83,82
GABA	100,00	100,00
Glicina	80,25	71,39-89,10
Glutámico	58,02	47,04-69,00
Glutamina	0,00	0,00
Hidroxiprolina	0,00	0,00
Leucina	20,99	11,93-30,05
Lisina	0,00	0,00
Ornitina	0,00	0,00
Prolina	100,00	100,00
Serina	43,21	32,19-54,23
Tirosina	0,00	0,00
Treonina	44,44	33,39-55,50

a: Para 81 muestras estudiadas.

b: Intervalo de confianza del 95%.

En cuanto a los aminoácidos identificados en jugos concentrados no se detectó la presencia de alanina, ácido glutámico, ácido aspártico, leucina y treonina que si se observaron en los jugos recién exprimidos.

Se prepararon diluciones y mezclas del jugo recién exprimido, cremogenado y concentrado simulando productos comerciales y se vio que los perfiles se conservaban, variando la intensidad de la mancha en función de la dilución. Mientras que en aquellos que no tienen jugo o cremogenado el mismo no aparece.

Por último, los Rf que se obtuvieron para el glutamato de sodio y la glicocola comercializados para agregar en alimentos, coincidieron con los de los respectivos aminoácidos puros. Cuando éstos son usados para cumplir con las exigencias del Código Alimentario Argentino de nitrógeno amínico en productos adulterados, sus manchas aparecen en el cromatograma pero no lo hace el resto del perfil.

Conclusiones

De los resultados obtenidos se puede concluir que la técnica de cromatografía en capa delgada puede ser utilizada como método cualitativo para analizar el perfil aminoacídico de jugos recién exprimidos, concentrados y cremogenados de naranja, como paso previo a la cuantificación por intercambio iónico o cromatografía líquida de alta resolución.

Es sencilla, rápida, económica y que puede ser empleada en laboratorios de baja complejidad como ensayo orientador. La técnica unidireccional permite controlar fuentes de error propias de cada corrida, ya que en una única corrida se pueden sembrar patrones y muestras, con la consiguiente disminución de costos, residuos de solventes y tiempo de ejecución.

Permite poner en evidencia adulteraciones: por sustitución de jugo por glicocola, glutamato de sodio o diluciones del mismo no declaradas.

En cambio no permitiría detectar la sustitución total o parcial de jugo de naranja por cremogenado de naranja ya que no se observaron diferencias entre sus perfiles cromatográficos.

Esta técnica y sus resultados contribuyen al conjunto de características de jugos, concentrados y cremogenados de naranja, que se pueden estudiar con el objeto de tipificar los productos genuinos. Lue-

go, se podrán buscar las combinaciones de aquellas que resulten más relevantes y discriminativas para la detección de adulteraciones.

Agradecimientos

A la Bioquímica Susana Denner por la ejecución del tratamiento estadístico.

Al Dr. Victor Mantovani por su asesoramiento.

Bibliografía

- 1- Código Alimentario Argentino, 1992. Capítulo XII pág. 259-260. Vol. 6. Zumos (jugos) de fruta y productos afines. 2ª edición. Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias. Marzochi Ediciones Argentinas.
- 2- Sanchis, J.C.; Mantovani, V., 1997. Comparación de variables fisicoquímicas obtenidas de jugos de naranja con las indicadas por el Código Alimentario Argentino. FABICIB 1, 99-101.
- 3- Spizzo, S.; Fontanarrosa M. E.; Sanchis J. C., 1997. Determinación de amonio en jugos de naranja. Presentado en el II Encuentro Bromatológico Latinoamericano. Córdoba (Argentina).
- 4- Navarro J. L., Frutos, productos hortícolas y derivados. Progresos en la detección de adulteraciones en zumo de naranja Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment 20 (3) 289-297.
- 5- Lemoine, G.; Mialini, C.; Perotti, M. C.; Palma S.; Bernal, S., 1997. Evaluación de adulteraciones en bebidas comerciales a base de jugos de frutas Presentado en el 3º Congreso Bromatológico Latinoamericano, p. 58.
- 6- Navarro, J. L.; Izquierdo, L., 1988. Spain: Authentication of Orange Juice In Adulteration of Fruit Juice Beverages; Nagy, S.; Attaway, J. A.; Rhodes, M. E. Eds.; Marcel Dekker, New York, p. 515-530.
- 7- López, F. and Izquierdo, L., 1990. Unsuitability of data acquired from blended samples for testing orange juice purity J. Sci. Food Agric., 50: 119-125.
- 8- Ranganna, S.; Govindarajan, V. S.; Ramana, K. V. R., 1981. "Citrus Fruits- Varieties, Chemistry, Technology, and Quality Evaluation". C.R.C. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, volume 18, issue (4).
- 9- Navarro, J. L.; Izquierdo, L.; Aristoy, M. and Sendra, J. M., 1986. "Characterization of Spanish Orange Juice Concentrates for Detecting Adulterations" Proceedings of the Nineteenth Symposium of the International Federation of Fruit Juice Producers, The Hague, p. 357-366.
- 10- Capilla, C.; Navarro, J. L.; Sendra, J. M. and Izquierdo L., 1988. "Detection of Orange Juice Dilution by Canonical Correlation Analysis" Analytica Chimica Acta, 212: 309- 315.

- 11- Aristoy, M. C.; Orlando, L.; Navarro, J. L.; Sendra, J. M.; Izquierdo, L., 1989. "Characterization of Spanish Orange Juice for Variables Used in Purity Control" *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 3: 596-600.
- 12- RSK-Values, 1987- Guide Values and Ranges of Specific Numbers Including the Revised Methods of Analysis. Vd. F Association of German Fruit Juice Industry, Bonn.
- 13- Navarro, J. L.; Aristoy, M.; Izquierdo, L., 1984. "Análisis cuantitativo de aminoácidos en zumos de frutas y bebidas refrescantes por cromatografía líquida" *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* **24**, 85-93.
- 14- Chaytor, J. P., 1986. "The Analysis of Amino Acids in Fruit Juices by High-performance Liquid Chromatography" *J. Sci. Food Agric.*, **37**: 1019-1026.
- 15- Sanchis, J.C., Cámara, M.S., Carghi, I., Mantovani, Victor, 2000. " Base de Datos de Variables Físico-Químicas en Jugo Natural de Naranja, Variedad Valencia Late, Zona Costa del Río Uruguay. Estudio comparativo con Cremogenados y Concentrados de un mismo origen". *Revista FABICIB*, **4**: 55-64.