



Comunicación

Identificación de aminoácidos libres por cromatografía de capa fina en jugo fresco de naranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) variedad “Valencia”

Free amino acids identification in Valencia orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) fresh juice by thin layer chromatography

Myrna Luisa **Medina Bracamonte**^{1*}, María Alejandra **Gallo Gagliotta**²

¹Laboratorio de Productos Vegetales, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA),
Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela (UCV).

²Departamento de Tecnología de Alimentos, Escuela de Biología,
Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela (UCV).

Calle Suapure, Colinas de Bello Monte, Apartado Postal 47097, Caracas, Venezuela.

*Autora para correspondencia: myrna.medina@ciens.ucv.ve

Aceptado 17-Diciembre-2013

Resumen

Con el interés de aportar al conocimiento de los aminoácidos libres en el jugo de naranja “Valencia” producido en Venezuela, se propuso aplicar cromatografía de capa fina, al jugo recién extraído de 2 lotes de naranjas “Valencia” adquiridas en mercados locales diferentes de la ciudad de Caracas. El jugo se centrifugó a 960 g (15 min)⁻¹. El sobrenadante se homogeneizó con igual volumen de etanol 95 % (v/v), por 3 s y se centrifugó a 900 g (15 min)⁻¹. Se ajustó el pH del sobrenadante a 1,7. Se pasó 30 mL del sobrenadante acondicionado a una columna de intercambio iónico de poliestireno activada en forma de H⁺ (6 x 1,7 cm). El volumen del eluato recogido se evaporó a 40 °C a vacío hasta sequedad. El residuo seco se suspendió en 2,5 mL de una solución metanol:agua 50:50 (v/v) a pH 1,7 y de allí se tomó una muestra de 5 µL con una micropipeta digital Calibra® 822, capacidad 2-20 µL y se aplicó sobre cromatofolios de sílica gel 60 para la cromatografía bidireccional: solvente I, cloroformo:metanol:amoníaco 25 % (v/v) 40:40:20; solvente II, fenol:agua 80:20 (m/v). Hubo

diferencias en el número de aminoácidos revelados e identificados entre los jugos de ambos lotes. Ambos cromatogramas coincidieron en 8 de los aminoácidos revelados: ácido aspártico, serina, alanina, valina, metionina, prolina, probablemente triptófano y/o fenilalanina y uno no identificado. En ambos predominó prolina y en ambos se identificó el ácido aspártico predominando en el lote 2 en proporción muy similar a la de prolina. El jugo del lote 2 se caracterizó por mayor índice de madurez y de nitrógeno aminoacídico que el jugo del lote 1, en donde el ácido aspártico estuvo en muy baja proporción. También se identificó metionina. Solo en el lote 1 se identificó lisina, ácido glutámico, asparagina y tirosina.

Palabras claves: aminoácidos libres, cromatografía en capa fina, jugo de naranja Valencia.

Abstract

As contribution to the knowledge of free amino acids in “Valencia” orange juices produced in Venezuela, it was proposed to apply thin layer chromatography. It was acquired two batches of “Valencia” orange fruits in different local markets of Caracas city. The juice was extracted and centrifuged at $960\text{ g (15 min)}^{-1}$. The supernatant was homogenized with an equal volume of ethanol 95 % (v/v), by 3 s and centrifuged at $900\text{ g (15 min)}^{-1}$, then the pH was adjusted a 1.7. It passed 30 mL of supernatant adjusted to column of ion exchange polystyrene activated in H^+ (6 x 1.7 cm). The eluate was evaporated at 40 °C under vacuum to dryness. The dry residue was suspended in 2,5 mL methanol:water 50:50 (v/v) at pH 1.7, then was applied with digital micropipette Calibra® 822, 2-20 μL capacity, a sample of 5 μL of dry residue resuspended on silica gel 60 chromatofils for bidirectional chromatography: solvent I, chloroform:methanol:ammonia 25 % (v/v) 40:40:20 and solvent II, phenol:water 80:20 (m/v). There were differences in the number of amino acids revealed and identified between batches juices. Both chromatograms agreed in 8 amino acids: aspartic acid, serine, alanine, valine, methionine, proline, tryptophan and/or phenylalanine and one unidentified. Proline prevaled in both chromatograms, and aspartic acid was identified predominantly in batch 2, in similar proportion to proline. Batch 2 was characterized by greater maturity index and amino acidic nitrogen that juice batch 1, wherein the aspartic acid was in very low proportion. Methionine was also identified. Lysine, glutamic acid, asparagine and tyrosine were identified in batch 1 only.

Key words: free amino acids, orange juice Valencia, thin layer chromatography.

INTRODUCCIÓN

La producción de naranjas en el mundo incrementó aproximadamente en los últimos 30 años de 39 millones a 70 millones de toneladas en el 2011, representando más del 60 % de la producción mundial de cítricos en la que participaron más de 34 países. En el 2011 de 29 millones de toneladas de cítricos destinados a la industria procesadora 24 millones eran de naranjas (FAO, 2012). En Venezuela el naranjo

está plantado desde oriente hasta occidente y las principales tierras productoras están en los estados Carabobo y Yaracuy, en donde se encuentran las principales industrias procesadoras (Aular y Aular-Rodríguez, 2007). Para el 2004 había una superficie total de 43.847 ha plantadas con cítricos de las cuales 29.819 ha eran de naranjo que produjeron más de 370.000 toneladas (Aular y Aular-Rodríguez, 2007; FAO, 2012).

El jugo de naranja como todos los jugos

de frutas, es una bebida refrescante, fuente importante de vitaminas, minerales y azúcares naturales, ingerido principalmente por niños. El jugo de naranja al igual que otros jugos y productos alimenticios altamente apreciados, es blanco probable de adulteración y fraude (Vaclavik *et al.*, 2012). Entre los principales procedimientos fraudulentos con fines de lucro más frecuentes aplicados solos o en combinación están: reducción de contenido de fruta incorporando agua, azúcares sin declarar, ácidos, lavado de pulpa, mezclas artificiales o sustitución parcial del jugo o de la fruta por otro más económico buscando beneficios financieros potenciales (Voldřich *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2003; Vaclavik *et al.*, 2012). Šnurkovič (2013) cita que la sustitución de componentes de calidad por otros más económicos puede causar serios problemas de salud a los consumidores. Maireva *et al.* (2013) sugieren que debería ser mandatorio para los pequeños y grandes fabricantes la certificación para garantizar autenticidad de los jugos de fruta y la honestidad en el rotulado. Por ello la autenticación del jugo de naranja cobra importancia en la industria alimentaria y el primer paso es conocer los componentes que lo integran (Gómez-Ariza *et al.*, 2005), lo que permite caracterizar las variedades a través de sus atributos y con ello conocer sus potencialidades para consumo fresco y para uso industrial (Cavalcante *et al.*, 2006). Citas de Tadeo *et al.* (1988) mencionan que los aminoácidos libres integran la principal fracción nitrogenada del fruto, en donde se ubica aproximadamente el 50 % del nitrógeno absorbido por la planta de cítricos.

Los aminoácidos libres han sido identificados y cuantificados en variedades de naranjas de España, Estados Unidos, Israel, Italia, Japón, Pakistán, Egipto y Argentina; así como también en algunas variedades de mandarinas, limones, toronjas, guayaba y mango; se han encontrado diferencias en el contenido y en el perfil (Coussin y Samish, 1968; Aranda *et al.*, 1969; Elahi y Khan, 1971;

Abdalla y Abu-Salem, 1976; Sobrero *et al.*, 2001; Fabiani *et al.*, 2002; Medina *et al.*, 2004). Y han sido incluidos como uno de los criterios de calidad requeridos para jugos de frutas en La Guía del Código de Prácticas de la Asociación de Industrias de Jugos y Néctares de Frutas y Vegetales de la Comunidad Económica Europea (AIJN, 1999 cp Voldřich *et al.*, 2002).

El interés en obtener el perfil del espectro aminoacídico en cada tipo de fruta ha surgido porque se ha revelado que es característico para cada una de ellas (Wallrauch y Faethe, 1988 cp de Oliveira *et al.*, 2002). El perfil aminoacídico se ha usado en la caracterización de las pulpas, jugos y purés de frutas (Kacem, Cornell *et al.*, 1987; Kacem, Matthews *et al.*, 1987; Lo Voi *et al.*, 1995; Del Castillo, Corzo *et al.*, 1998; Del Castillo, Santa María *et al.*, 1998; Koca *et al.*, 2003); permite evidenciar adulteración en jugo comercial de naranjas (Gómez-Ariza *et al.*, 2005); es útil para diferenciar el jugo de naranja recién extraído y procesado del obtenido por dilución de un concentrado (Del Castillo, Santa María *et al.*, 1998); y el aminograma relativo no es modificado por tratamientos térmicos comunes como la concentración, ni por pulsos eléctricos con la excepción de algunos aminoácidos (Giraud *et al.*, 2004; Garde-Cerdán *et al.*, 2007).

La regulación europea incluyó el valor de prolina para evaluar la autenticidad de jugos y néctares de frutas, y para el jugo de naranja estableció los límites máximos y mínimos de 20 aminoácidos (RSK-Values, 1987 cp Sobrero *et al.*, 2001; Fabiani *et al.*, 2002). En Argentina también se cuantifica prolina en la investigación de jugos de naranja Valencia, adulterados (Sobrero *et al.*, 2001). Fabiani *et al.* (2002) citando, destacan lo complicado de su aplicación por su variabilidad natural como componentes de las frutas y que la maduración es una de las fuentes de variación en el patrón de aminoácidos libres. En las naranjas españolas Navelina, Washington Navel y Navelate el contenido total de aminoácidos

libres incrementa con la maduración (Tadeo *et al.*, 1988).

Desde el punto de vista de la estabilidad en el almacenamiento de los jugos de naranjas procesados, los aminoácidos intervienen en las reacciones de oscurecimiento no enzimático y no deseables que suceden durante su almacenamiento a temperatura ambiental. Los resultados de Del Castillo, Corzo *et al.* (1998) parecen indicar que los cambios en la composición de aminoácidos y en los compuestos de Amadori, pueden ser índices adecuados para establecer las condiciones de almacenamiento del jugo de naranja procesado antes que se evidencie el cambio de color.

Brunini *et al.* (2003) citan que los aminoácidos libres también han sido señalados como uno de los factores que incide en la degradación de la vitamina C en guayabas, además del O₂, la energía luminosa, el pH y los azúcares. Kacem, Matthews *et al.* (1987) concluyeron que la pérdida de ácido ascórbico en bebidas de naranja es significativa si la concentración de los aminoácidos es del 0,8 % y no se observa si es < 0,4 %.

La cromatografía de capa fina es una de las técnicas aplicadas en la separación e identificación de aminoácidos libres en frutos. Ventajas: procedimiento sencillo, rápido, económico, buena resolución, las reacciones colorimétricas reveladas son compactas y se pueden separar con facilidad de la cromatoplaqueta para recuperar el analito en cantidades inferiores al µg; puede ser empleada en laboratorios de baja complejidad como ensayo orientador, y la resolución puede aumentarse empleando técnicas bidireccionales (Abbott y Andrews, 1977; Sobrero *et al.*, 2001). La capa fina es recomendada por los cromatografistas como procedimiento previo a las separaciones por cromatografía líquida en columna, porque proporciona una idea rápida de los aminoácidos predominantes en la muestra, lo que permite estimar su concentración favoreciendo la instauración de las condiciones óptimas para las separaciones por columna (Rounds y Nielsen,

1998). Destacan Sobrero *et al.* (2001) que los resultados obtenidos con la cromatografía de capa fina aportan información al conjunto de características de jugos, concentrados y cremogenados de naranjas, información que se puede evaluar con el objeto de tipificar el carácter genuino de los productos y se puede usar como paso previo a la cuantificación por intercambio iónico o por cromatografía líquida de alta resolución. Los autores recomiendan la técnica monodireccional, ya que si la resolución es buena, además del ahorro de tiempo y de solventes, se pueden minimizar los efectos ambientales sobre el ensayo al correr simultáneamente sobre una placa la muestra y los patrones.

En Venezuela hay experiencias previas de evaluación de aminoácidos libres en frutos como la guayaba “Criolla Roja” (Medina *et al.*, 2004) y en el agua de coco de la región del sur del Lago de Maracaibo (Ovalles *et al.*, 2002), sin embargo en la literatura no se encuentran referencias de identificación de aminoácidos libres en naranjas variedad Valencia producidas en Venezuela, en consecuencia se planteó como una contribución, aplicar el método de cromatografía de capa fina descrito para cítricos por Aranda *et al.* (1969) y aplicado en guayaba “Criolla Roja” con algunas modificaciones (Medina *et al.*, 2004), para separar e identificar los aminoácidos libres predominantes en el jugo fresco de naranjas Valencia recién extraído.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima y caracterización fisicoquímica

Se adquirió en 2 puntos diferentes del mercado local de la ciudad de Caracas 2 lotes de 10 kg cada uno de naranjas (*Citrus sinensis* L. Osbeck var. Valencia) Se seleccionaron por tamaño, forma, color del endocarpio, y atributos de la corteza, gruesa, dura y coriácea. Los lotes se trasladaron al Laboratorio de Análisis de Alimentos del Instituto de Ciencia y

Tecnología de Alimentos (ICTA), Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela. Las frutas se lavaron con agua de chorro a presión, se secaron y se cortaron en mitades transversales. Se verificaron las características de la variedad: forma, color del endocarpio, número de gajos y de semillas, y porcentaje de jugo (Avilán y Rengifo, 1988).

Se obtuvo el jugo de 4 kg de naranjas (tamaño mínimo de la muestra de ensayo, COVENIN (1981)) directamente por extracción mecánica con un extractor de jugos cítricos, casero. Se determinó el porcentaje de jugo de cada fruto midiendo el volumen de jugo extraído en un cilindro graduado. Se contó el número de semillas por fruto. Se midió el pH (COVENIN, 1979) utilizando un potenciómetro marca HANNA, modelo HI 9321 (HANNA Instruments, Inc., Woonsocket, RI, USA). Siguiendo la metodología descrita por la AOAC (2005) se determinaron los parámetros: sólidos solubles (SS) (N° 932.12), ácido ascórbico (N° 967.21), acidez total titulable (ATT) (N° 942.15B), nitrógeno de aminoácidos (N° 965.31B), azúcares totales y reductores (N° 925.35B), sacarosa por diferencia entre los azúcares totales y los reductores. Índice de madurez (SS/ATT) (Avilán y Rengifo, 1988). La separación e identificación de los aminoácidos libres por cromatografía de capa fina, según Aranda *et al.* (1969), con algunas modificaciones: centrifugación del sobrenadante, desproteínización del suero, la resina de intercambio iónico y la cromatografía propiamente dicha (Medina *et al.*, 2004).

Separación de la fracción de aminoácidos libres del jugo de naranja recién extraído

Separación de la fase estructural del jugo: el jugo se centrifugó a $960\text{ g (15 min)}^{-1}$ en una centrífuga Damon/IEC Division, modelo CRU-5000 (International Equipment Co., Div. Damon Corp., Needham Heights, MA, USA). Se recuperó el sobrenadante.

Acondicionamiento del sobrenadante.

Desproteínización: treinta mL del sobrenadante se homogeneizaron en un vórtex por 3 s con igual volumen de etanol 95 % (v/v), se dejó reposar 10 s y se centrifugó nuevamente a $900\text{ g (15 min)}^{-1}$ en una centrífuga de mesa marca BHG, modelo Fixette (Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Alemania). Se recuperó el sobrenadante y se le ajustó el pH a 1,7 para que los aminoácidos libres en solución se encontraran en forma catiónica, considerando que el pK_1 del aminoácido histidina (1,82) es el menor de los aminoácidos proteicos (Nelson y Cox, 2000).

Acondicionamiento y activación de la resina: se hicieron lavados consecutivos de la resina con agua destilada hasta obtener pH igual al del agua destilada de lavado (papel tornasol). Se continuó el lavado con etanol al 80 % (v/v), seguido de lavados con agua destilada, hasta obtener eluatos incoloros. Se activó la columna añadiendo 200 mL de HCl 2 M con agitación lenta por 1 h. Se desechó el exceso del HCl y se lavó con agua destilada hasta obtener el pH igual al del agua destilada de lavado (papel tornasol). Todos los lavados se realizaron con agitación magnética. La resina así acondicionada y activada se empacó en la columna de vidrio.

Cromatografía de intercambio iónico: para eliminar del sobrenadante acondicionado las impurezas que pudiesen interferir con la capa fina, se pasó un volumen de 30 mL del mismo por la resina de intercambio iónico, poliestireno Dowex® 50WX4-200R (Sigma-Aldrich®, Co. LLC, St. Louis, Missouri, USA), activada previamente en forma de H^+ con 200 mL de HCl 2 M, empacada en una columna de vidrio (6 x 1,7 cm), cuidando no perturbar el lecho de la resina al colocar la alícuota. Luego se lavó la resina con agua destilada hasta que el pH del eluato fuese igual al del agua destilada de lavado.

Elución de los aminoácidos: Los aminoácidos retenidos en la columna fueron desplazados con 60 mL de NH_4OH 1 M.

Seguido por igual volumen de agua destilada. El volumen recogido se evaporó a 40 °C a vacío hasta sequedad. El residuo seco se suspendió en 2,5 mL de una solución metanol:agua 50:50 (v/v) a pH 1,7. Se conservó en refrigeración (4 °C) hasta su aplicación en los cromatofolios.

Preparación de la solución de aminoácidos patrones

Se prepararon las soluciones de los siguientes 18 aminoácidos patrones, todos de 99 % de pureza, suspendiendo 1 mg (0,99) de cada aminoácido/2,5 mL de solución metanol:agua (50:50, v/v) a pH 1,7: L(+)-ácido glutámico (Fisher Scientific); L-ácido aspártico, L-alanina, DL-fenilalanina, L(+)-glicina, lisina monoclóridato y L-tirosina (Merck); L(+)-leucina, L(-)-treonina y L(+)-valina (Riedel-de Haën); L-arginina y L-cisteína clorhidrato anhidro (Scharlau); L-prolina, L-serina y DL-triptófano (Sigma); monohidrato de L-asparagina, L-histidina y DL-metionina (Prolabo). Estimándose cada solución de aminoácido patrón en 39,6 % (m/v), salvo las soluciones de lisina 31,69 % y de cisteína 30,44 %. Se guardaron en refrigeración (4 °C) hasta el momento de su aplicación en los cromatofolios.

Preparación de las combinaciones de solventes y el revelador de aminoácidos

Solvente I: cloroformo:metanol:amoníaco 25 % (v/v) (40:40:20) (Aranda *et al.*, 1969; Niederwieser, 1975).

Solvente II: fenol:agua 80:20 (m/v). A un recipiente de 500 g de fenol (Riedel-de Haën), nuevo, se le añadió lentamente 125 mL de agua destilada. Se cerró y se dejó en reposo toda la noche. La solución es estable indefinidamente en envase opaco a la luz (Smith y Feinberg, 1979).

Revelador de aminoácidos: solución de ninhidrina (Riedel-de Haën) al 0,2 % (m/v): 0,2000 g de ninhidrina (Riedel-de Haën) en 95 mL de n-butanol. Se aforó a 100 mL con ácido

acético al 10 % (v/v) (5 mL aproximadamente). Se conserva indefinidamente en refrigeración (Stahl y Mangold, 1975).

Límite de detección de la ninhidrina: de 0,1 a 1 µg del aminoácido (Domínguez-S., 1982). En 10 µL de cada una de las soluciones de aminoácido de referencia hay 3,96 µg del aminoácido correspondiente, aproximadamente el cuádruple del límite superior del intervalo de detección de la ninhidrina, salvo lisina (3,2 µg) y cisteína (3,0 µg), que lo triplican.

Preparación de la cromatografía de capa fina

El límite de detección de la cromatografía de capa fina se ubica entre 0,01 y 0,001 µmol del analito; y 0,1 µmol es suficiente para identificaciones rápidas (Piez y Saroff, 1961). Los µg de glicina (MM: 75 g mol⁻¹) y de triptófano (MM: 204 g mol⁻¹) que corresponden al límite de detección (0,001 µmol) son 7,5 x 10⁻² µg y 20,4 x 10⁻² µg, respectivamente. En las alícuotas de 10 y 5 µl de cada una de las soluciones de aminoácidos de referencia se supera el límite inferior para la detección de la glicina (3,96 y 1,98 µg) en cromatografía de capa fina.

Preparación de las cubetas cromatográficas de vidrio (28 x 13 x 10 cm): Se vertieron 50 mL de cada una de las soluciones de solventes en una cubeta destinada a esa solución. En el caso de la combinación de solventes II, fenol:agua 80:20 (m/v), una vez decantados los 50 mL de la solución, en la cubeta correspondiente, se le añadió 0,25 mL de NH₃ 0,880 % (v/v) (Smith y Feinberg, 1979). Las cubetas se taparon y se esperó la saturación de la atmósfera antes de introducir en ellas los cromatofolios correspondientes a la corrida cromatográfica con esa combinación de solventes. Temperatura promedio durante la ejecución de las cromatografías 23 °C ± 2 °C. No hubo grandes fluctuaciones de temperatura ni durante el día ni entre los días en que se ejecutaron las corridas.

Preparación de las cromatofolios de sílica gel 60 (Merck) 20 x 20 cm, espesor 0,25 mm, sin indicador (Coussin y Samish, 1968): No se activaron por calor, por lo cual el gel de sílice contiene humedad suficiente para que el mecanismo de reparto de los aminoácidos sea similar al de la cromatografía en papel (Stahl y Mangold, 1975; Smith y Feinberg, 1979).

Cromatografía monodireccional de las muestras de jugos y de las soluciones de los 18 aminoácidos patrones: se aplicó en un extremo, de cada uno de 4 cromatofolios, una muestra de 10 μL del residuo seco procedente del jugo de naranja recién extraído y suspendido en metanol:agua. En cada par de cromatofolios, a continuación de la muestra del jugo se distribuyeron, además, muestras de 10 μL de cada una de las soluciones de los 9 aminoácidos de referencia y 9 en la otra. Dos cromatofolios para la cromatografía monodireccional I (con la combinación de solventes I), y 2 para la cromatografía monodireccional II (con la combinación de solventes II).

Cromatografía bidireccional: se aplicó, en un extremo de cada uno de 2 cromatofolios, una muestra de 5 μL del residuo seco procedente de la muestra del jugo de naranja recién extraído y suspendido en metanol:agua. En todos los casos se siguieron las recomendaciones de Smith y Feinberg (1979).

Se aplicaron los volúmenes de muestras con una micropipeta digital Calibra® 822, capacidad 2-20 μL (Socorex Isba, S. A., Ecublens, Suiza). Se secaron con corriente de aire caliente, y una vez secos, se colocaron 2 cromatofolios con las superficies de trabajo contrapuestas para la corrida monodireccional en la cubeta con la combinación de solventes I, y 2 en la cubeta con la combinación de solventes II. Se dejó ascender el solvente de ambas cubetas sobre los cromatofolios, hasta que el frente del mismo alcanzó una distancia de 150 mm en cada una. Se sacaron los cromatofolios y se dejaron expuestos al aire bajo campana y a temperatura ambiental hasta evaporación completa del solvente. Se revelaron los aminoácidos.

Corrida bidireccional: se colocaron 2 cromatofolios, ya preparados, en la cubeta con la combinación de solventes I, con las superficies de trabajo contrapuestas. Una vez el frente recorrió los 150 mm, se sacaron, se dejó evaporar el solvente completamente bajo campana, se giró cada placa 90° en el sentido de las agujas del reloj y se colocaron en la cubeta para el desarrollo con la combinación de solventes II. Una vez el frente recorrió los 150 mm, se sacaron y se dejó evaporar el solvente completamente bajo campana. Se revelaron los aminoácidos.

Revelado de los aminoácidos

Se roció cada cromatofolio con el revelador y se dejó evaporar el solvente, en corriente de aire, bajo campana y a temperatura ambiental. Luego se colocaron las láminas en estufa a 100 °C x 5 min hasta el desarrollo del color azul característico de la reacción de condensación entre la ninhidrina y cada aminoácido. Si la reacción ocurrió entre el revelador y los α -aminoácidos el color se desarrolla en frío, mientras que los aminoácidos heterocíclicos no aromáticos y los alifáticos, desarrollan el color en caliente (Browning, 1969).

Identificación de los aminoácidos separados en la capa fina

Una vez revelados los aminoácidos, se delineó el borde de cada uno de ellos y se marcó el centro respectivo con lápiz de grafito. Se obtuvo el Factor de Retardo (Rf) para cada reacción revelada midiendo la distancia recorrida por cada aminoácido en cada combinación de solventes, desde el punto de origen en la línea base del cromatofolio, donde se sembró la muestra, y el centro de cada una de las reacciones reveladas. Luego se calculó el cociente de cada una de las distancias con respecto al recorrido del frente del solvente

(150 mm). Se expresa en porcentaje del desplazamiento (Rf %). Ese cociente es característico para cada uno de los aminoácidos en iguales condiciones de trabajo.

Con la intención de controlar algunas de las variables que afectan al Factor de Retención (Rf): humedad de las fases móvil y estacionaria, temperatura, grado de saturación de la cámara de desarrollo con los vapores de la fase móvil, se obtuvo el Factor de Retención Relativo (Rx) para cada aminoácido libre revelado con respecto al del aminoácido de referencia asociado, o cociente entre las distancias recorridas por el aminoácido a identificar y el patrón asociado en igualdad de condiciones. Si bien no es posible un dominio absoluto de las mismas se minimiza el efecto (Rounds y Nielsen, 1998; Skoog *et al.*, 2001).

La identificación se realizó comparando: 1º, los Rf % de cada una de las reacciones positivas a la ninhidrina desarrollada a partir de cada muestra de jugo, con los Rf % obtenidos de las muestras de las soluciones patrones de cada uno de los 18 aminoácidos. 2º, superponiendo la reacción a identificar con el patrón asociado. 3º, considerando el color de las reacciones desarrolladas frente a la ninhidrina por los aminoácidos libres en cada una de las muestras con el color desarrollado por los aminoácidos patrones en igualdad de condiciones. 4º, considerando el Rx entre el aminoácido libre revelado con respecto al del aminoácido de referencia asociado. 5º, considerando las ubicaciones relativas de los aminoácidos revelados y los patrones durante esta experiencia con las señaladas por Aranda *et al.* (1969).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Atributos físicos de las naranjas; y parámetros fisicoquímicos de sus jugos recién extraídos

Los atributos físicos de las naranjas de ambos lotes adquiridas en 2 mercados locales,

corresponden con los de la variedad Valencia (Avilán y Rengifo, 1988; FUSAGRI, 1983; Morton, 1987; COVENIN, sin fecha). Se diferencian de la variedad Pineapple en el número de gajos y de semillas (Cuadro 1). En naranjas Valencia cultivadas en Curimagua (Falcón, Venezuela) Russián-L. (2006) encontró de 8 a 5 semillas por fruto y entre 46,42 y 36,89 % de jugo, y destaca que en general los parámetros evaluados en estas naranjas se ubicaron en los intervalos hallados en la misma variedad procedente de otras localidades del país. El contenido de jugo puede alcanzar el 46,25 % a los 400 días para luego disminuir significativamente (Avilán y Rengifo, 1988), además, puede variar con la altitud, a mayor altitud mayor porcentaje de jugo (Zambrano *et al.*, 2001).

En el Cuadro 1 se presentan los parámetros fisicoquímicos de los jugos de naranjas extraídos de ambos lotes. El pH en los cítricos se ubica entre 3,5 y 4,0 lo que favorece el proceso de conservación de sus jugos al retardar el crecimiento microbiano (Avilán y Rengifo, 1988). De ambos jugos, solo el extraído del lote 2 presentó pH, SS, ATT y SS/ATT dentro de lo establecido por COVENIN (sin fecha) para el jugo fresco de naranja, y se aproximó a lo hallado por Russián-L. (2006) en el jugo de la naranja Valencia cultivada en Curimagua (valores promedios de SST: 10,29 °Bx; ATT: 1,09 % y SS/ATT: 10,07).

El índice de madurez (SS/ATT) del jugo del lote 1 fue inferior a lo establecido por COVENIN (sin fecha) y al promedio encontrado por Russián-L. (2006) (10,11). El índice de madurez en cítricos, es uno de los factores internos de calidad para su consumo fresco, el intervalo ideal es entre 11 y 14, aceptando de 6 a 10 (Avilán y Rengifo, 1988). Los autores citan a Martínez y Sánchez (1977) quienes encontraron un índice mayor a 9 a partir de los 360 días en la naranja Valencia cultivada en Venezuela, y de allí hasta los 405 días se encuentra en condiciones de ser cosechada.

Cuadro 1.- Atributos físicos de las naranjas de los lotes 1 y 2; y parámetros fisicoquímicos de los jugos de naranjas extraídos de ambos lotes.

| Atributos | Lotes | | Avilán y Rengifo (1988) | | FUSAGRI (1983); Morton (1987) | COVENIN (sin fecha) |
|----------------------|------------|------------|--------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|------------------------|
| | 1 | 2 | Valencia | Pineapple | | |
| Forma | Esféricas | Esféricas | Globosa o casi esférica | Esférica | Globosa o casi esférica | nh |
| Color del endocarpio | Anaranjado | Anaranjado | Anaranjado más o menos intenso | Anaranjado o amarillo anaranjado | Anaranjado más o menos intenso | nh |
| Nº de gajos | 12 | 9-12 | 8 a 13 | 10 a 13 | 8 a 13 | nh |
| Nº de semillas | 3 | 1 a 3 | < 6 | 10 a 21 | < 6 | nh |
| Jugo (%) | 45,56 | 56 | > 40 | nh | nh | ≥ 40 |

| Parámetros | Lotes | | COVENIN (sin fecha) |
|----------------------------|--------------|--------------|------------------------|
| | 1 | 2 | |
| pH | 3,88 ± 0 | 3,32 ± 0 | nh |
| SS (°Bx) | 8 ± 0,58 | 12,20 | ≥ 7 |
| ATT (% de ácido cítrico) | 1,32 ± 0,01 | 1,12 ± 0,04 | ≥ 0,4 |
| Índice de madurez (SS/ATT) | 6,06 | 10,89 | 10 a 24 |
| Ácido ascórbico (mg %) | 36,24 ± 0,58 | 55,90 ± 2,88 | nh |
| N de aminoácidos (mg %) | 13,9 ± 0,77 | 18,07 ± 2,62 | nh |
| Azúcares totales (%) | 7,93 ± 0 | 24,75 ± 2,26 | nh |
| Azúcares reductores (%) | 4,15 ± 0,18 | 11,22 ± 1,21 | nh |
| Sacarosa (%) | 3,59 | 12,85 | nh |

SS: sólidos solubles. ATT: acidez total titulable. nh: no hay cifras.

En cuanto a los SS en naranjas, en Venezuela no hay un criterio establecido con claridad, Flores, 1983 (cp Zambrano *et al.*, 2001) menciona una calidad mínima normal no inferior a 9 °Bx. La Comisión del Codex Alimentarius (FAO/WHO, 2005), si bien no ha establecido un acuerdo definitivo, presenta el intervalo de 11,8 - 11,2 °Bx, como el apropiado para zumo de naranja. El jugo del lote 2 se aproximó a este intervalo.

La ATT disminuye con la edad y es inferior al 1 % luego de los 400 días (Avilán y Rengifo, 1988), y aumenta con la altitud (Zambrano *et al.*, 2001).

El % de N de aminoácidos en el lote 2 ($1,807 \times 10^{-4}$ %) se encontró dentro de los valores hallados por Royo-Iranzo y Cervelló (1973) en los jugos de 70 naranjas españolas ($1,6 \times 10^{-4}$ y $5,0 \times 10^{-4}$ %); mientras que el % de N de aminoácidos en el lote 1 fue menor

($1,39 \times 10^{-4} \%$).

El jugo de naranja del lote 2 cumplió con todos los requisitos establecidos por COVENIN (sin fecha) para el jugo de naranja fresco, el índice de madurez estuvo acorde a lo señalado por Avilán y Rengifo (1988) y presentó mayor contenido de ácido ascórbico, azúcares en general y N de aminoácidos que el jugo del lote 1.

Ensayos cromatográficos en capa fina

Las Figs. 1 y 2 corresponden a la

cromatografía monodireccional del jugo de naranja del lote 1 en la combinación de solventes II (fenol:agua), por duplicado, y en ambos cromatofolios se distribuyeron los 18 aminoácidos de referencia. Se aislaron 10 reacciones positivas a la ninhidrina. Las Figs. 3 y 4 corresponden a las cromatografías bidireccionales de los jugos de naranja Valencia extraídos de ambos lotes. La resolución obtenida con esta cromatografía superó la lograda con la monodireccional.

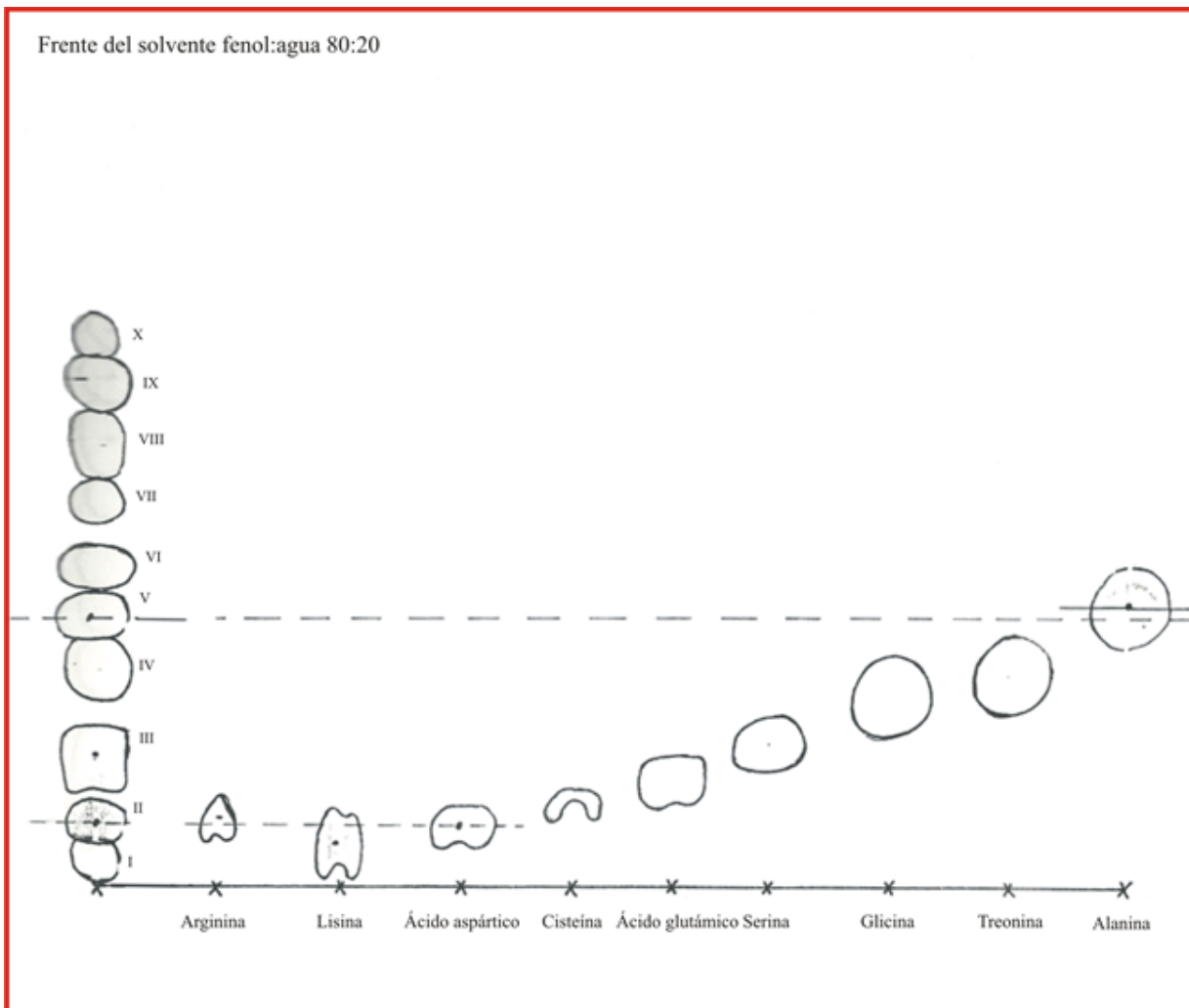


Figura 1.- Cromatografía monodireccional del jugo de naranja Valencia extraído del lote 1, y 9 aminoácidos patrones en la combinación de solventes II (fenol:agua 80:20).

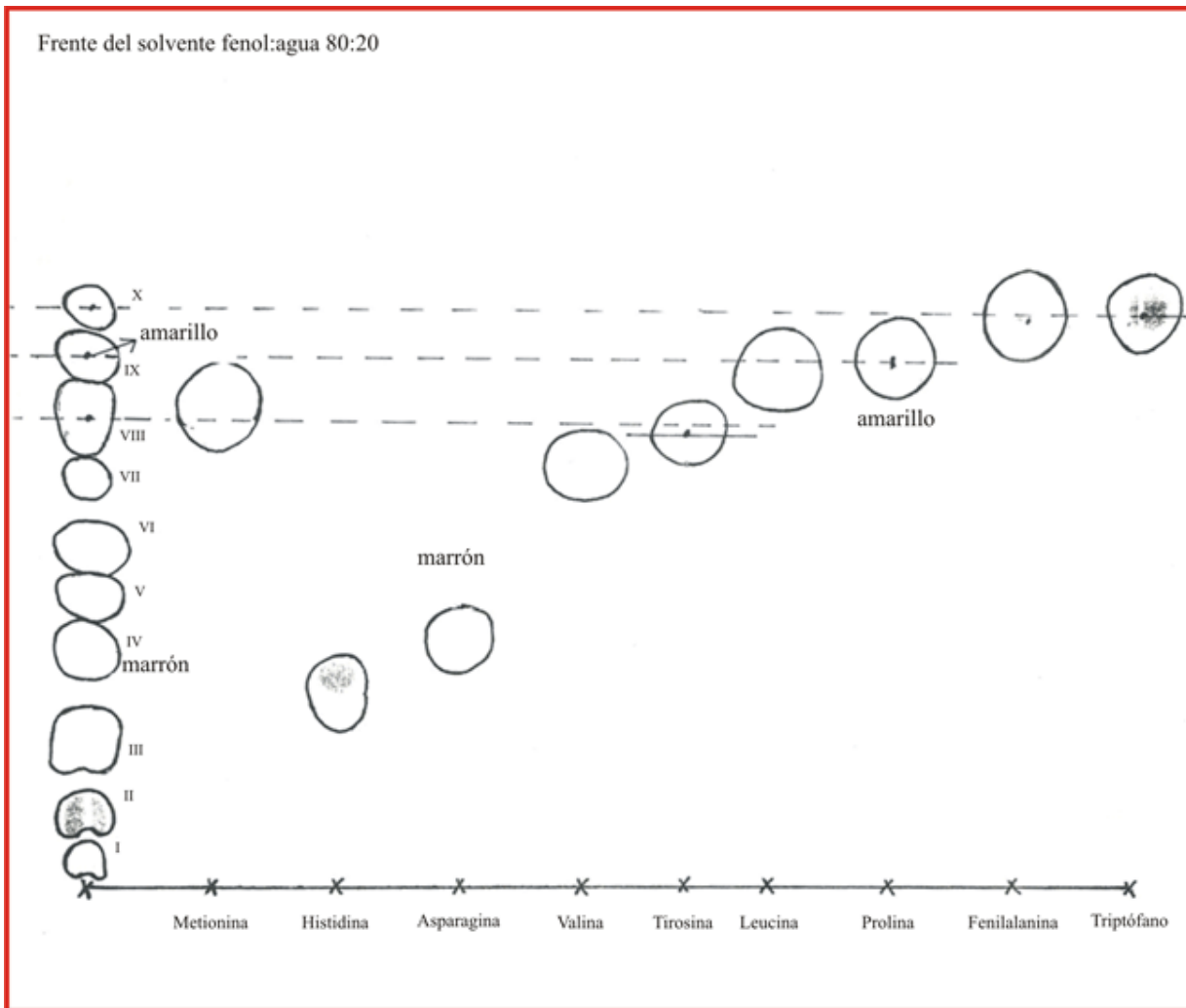


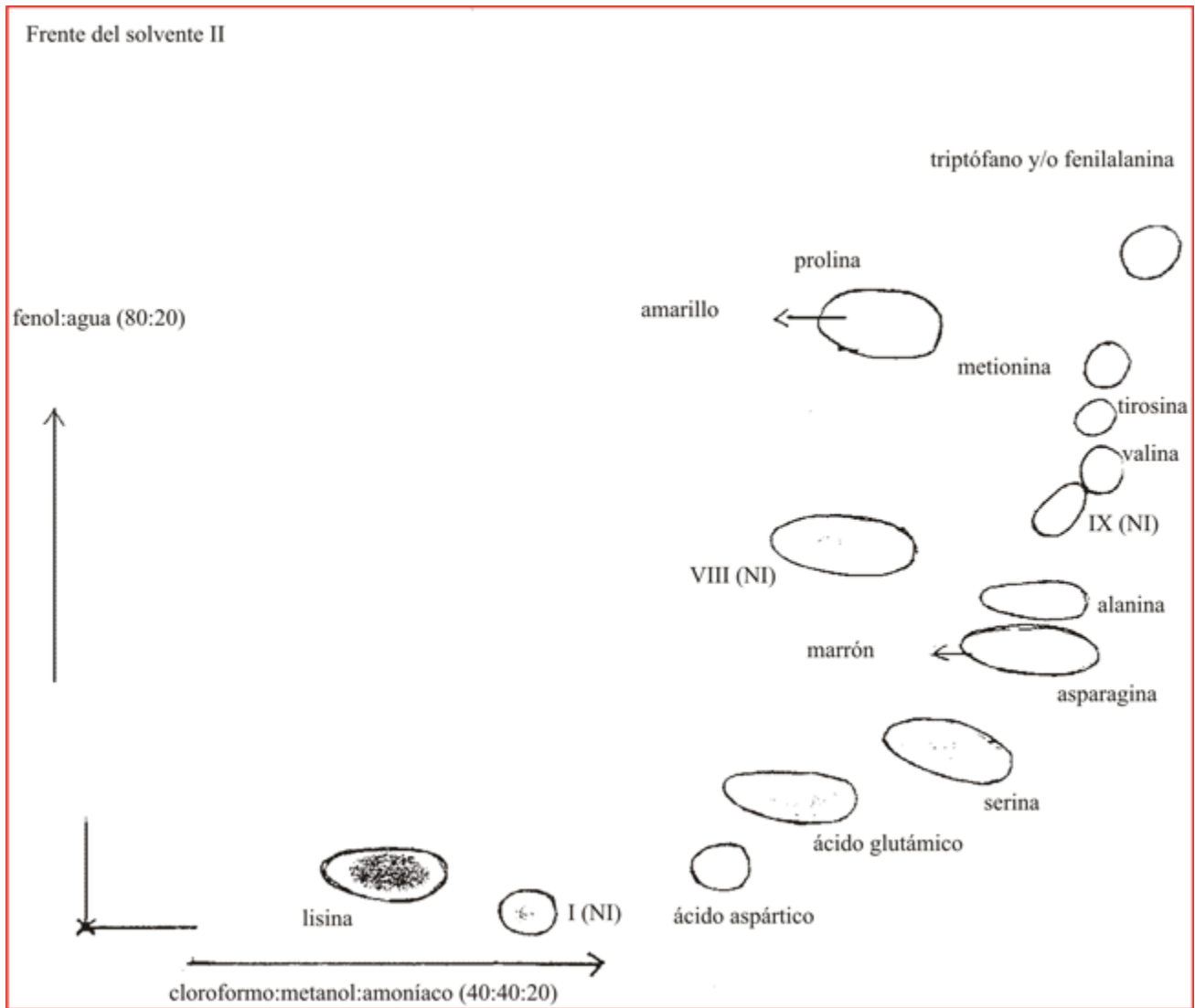
Figura 2.- Cromatografía monodireccional del jugo de naranja Valencia extraído del lote 1, y 9 aminoácidos patrones en la combinación de solventes II (fenol:agua 80:20).

Ambos cromatogramas bidireccionales presentaron la misma tendencia y difieren en el número de aminoácidos revelados. Todos los aminoácidos patrones como los separados en ambos lotes de jugo de naranja desarrollaron color rosado azulado salvo los aminoácidos, prolina (amarillo) y asparagina (marrón).

En el Cuadro 2 se presentan los Rf % de los 18 aminoácidos de referencia en la combinación de solventes I, cloroformo: metanol:amoníaco (40:40:20) bajo las condiciones de trabajo descritas. Hubo buena resolución entre los aminoácidos: arginina, lisina y prolina; ácido aptartico y glicina; serina

y asparagina. Mientras que los Rf % de los aminoácidos ácido glutámico e histidina coincidieron, así como los de tirosina y valina. El resto de los aminoácidos tuvo Rf % que no favorecieron la identificación.

En el Cuadro 3 se presentan los Rf % de cada uno de los aminoácidos libres separados en ambos lotes por cromatografía bidireccional, así como los Rf %, de cada uno de los aminoácidos de referencia y los Rx correspondientes a cada uno de los aminoácidos libres separados con respecto al aminoácido de referencia asociado. En el jugo del lote 1 caracterizado por índice de madurez 6,06;

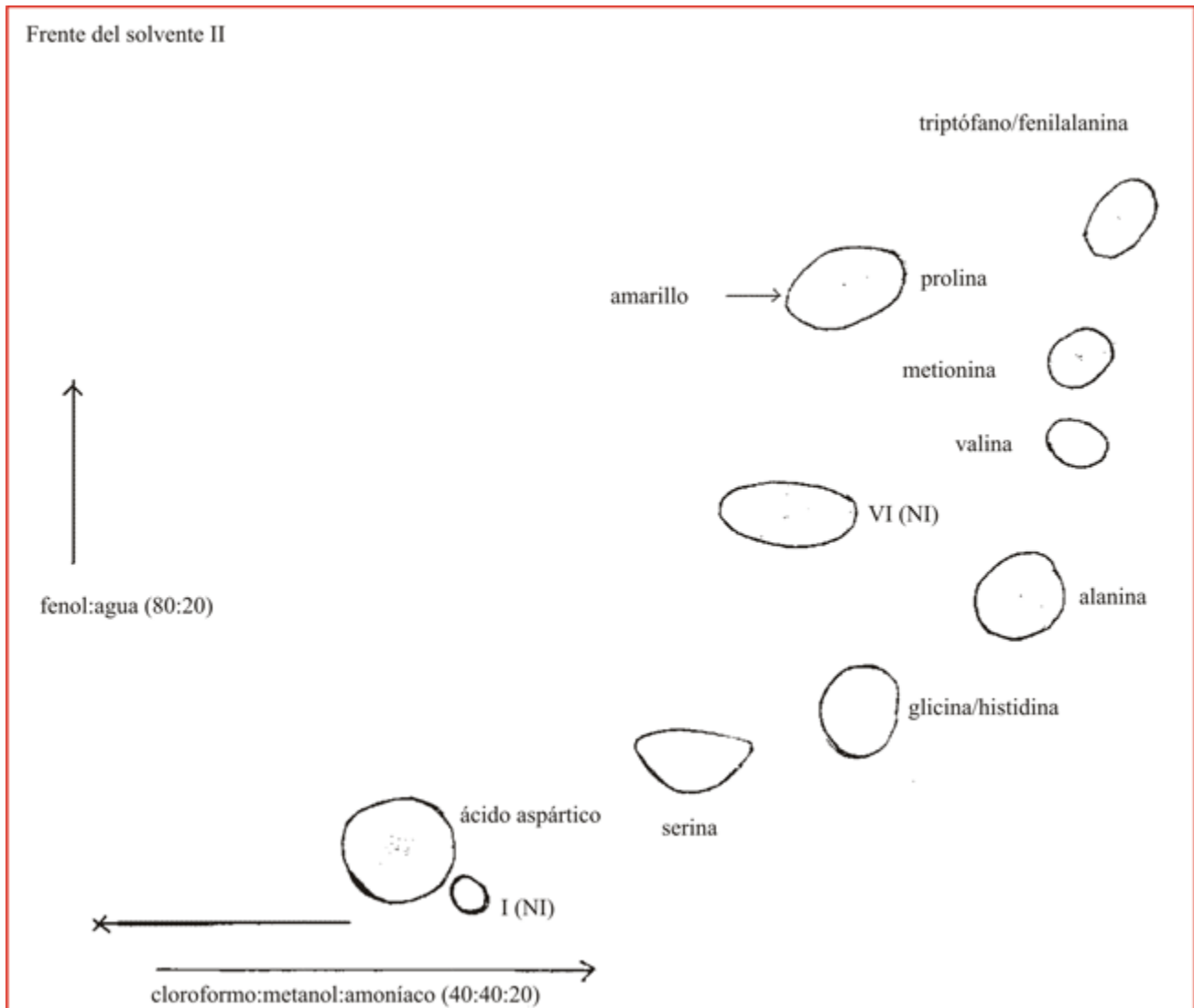


NI: no identificado.

Figura 3.- Cromatografía bidireccional del jugo de naranja Valencia extraído del lote 1.

es decir, frutos cosechados antes de alcanzar los 9 °Bx, pH 3,88 y % N aminoacídico de $1,39 \times 10^{-4}$, se revelaron 14 reacciones e identificaron 11 aminoácidos: lisina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, asparagina, alanina, valina, tirosina, metionina, prolina, triptófano y/o fenilalanina; 4 esenciales, predominando lisina, seguida de probablemente triptófano y/o fenilalanina, valina y metionina; y 3 condicionalmente esenciales, sobresaliendo prolina y serina, y tirosina. En general, el orden

decreciente de predominio fue: prolina, VIII, ácido glutámico, serina, lisina, asparagina, alanina, triptófano y/o fenilalanina, ácido aspártico, I, IX, metionina, valina y tirosina. En el jugo del lote 2 caracterizado por índice de madurez 10,92; es decir, frutos cosechados después de superar los 9 °Bx (óptimo de cosecha), pH 3,32 y % N aminoacídico de $1,807 \times 10^{-4}$, se revelaron 10 reacciones e identificaron 8 aminoácidos. Comparando con el cromatograma 1, no se revela-



NI: no identificado.

Figura 4.- Cromatografía bidireccional del jugo de naranja Valencia extraído del lote 2.

ron lisina, ácido glutámico, asparagina, ni tirosina, y sí se reveló glicina y/o histidina, que no se evidenciaron en el jugo del lote 1, y 2 NI (no identificados). Probablemente, 4 son esenciales, triptófano y/o fenilalanina, metionina, valina y tal vez histidina, el cual es considerado esencial o condicionalmente esencial. Probablemente 3 condicionalmente esenciales, y que están entre los predominantes, prolina, serina y quizás glicina. En general, destacaron prolina y ácido aspártico en

proporciones casi iguales, le siguieron en orden decreciente, el aminoácido VI, alanina, glicina y/o histidina, serina, triptófano y/o fenilalanina, metionina y valina.

Ambos cromatogramas coincidieron en 8 de los aminoácidos revelados, 1 de ellos no identificado (I): ácido aspártico, serina, alanina, valina, metionina, prolina y probablemente triptófano y/o fenilalanina. En ambos cromatogramas destacó prolina, le siguió el aminoácido VIII (NI) (cromatograma 1) y VI

Cuadro 2.- Rf % de los 18 aminoácidos patrones en la combinación de solventes I, cloroformo:metanol:amoníaco (40:40:20).

| Aminoácidos patrones | Rf % Solvente I |
|----------------------|-----------------|
| Arginina | 28,00 |
| Lisina | 42,80 |
| Prolina | 72,30 |
| Ácido aspártico | 73,10 |
| Glicina | 78,85 |
| Serina | 80,70 |
| Asparagina | 85,90 |
| Alanina | 86,50 |
| Ácido glutámico | 87,60 |
| Histidina | 87,70 |
| Cisteína | 88,70 |
| Treonina | 89,80 |
| Tirosina | 91,70 |
| Valina | 91,90 |
| Leucina | 92,10 |
| Metionina | 92,60 |
| Triptófano | 94,00 |
| Fenilalanina | 95,40 |

Rf %: factor de retención de los aminoácidos.

(NI) (cromatograma 2). Los Rf % de las reacciones señaladas con los números VIII y VI, ubicadas en esta experiencia entre alanina y valina, difieren en 1,97 unidades, probablemente sea el mismo analito. Se acepta para un Rf % determinado hasta 2 unidades de variabilidad (Smith y Feinberg, 1979).

Habría que evaluar la presencia de los aminoácidos ácido 2-aminobutírico, ácido γ -aminobutírico y glutamina los cuales fueron identificados por Aranda *et al.* (1969) con Rf %

muy próximos entre sí en la naranja Valencia de España y ubicados entre alanina y valina. El aminoácido glutamina, es considerado condicionalmente esencial (Dutra de Oliveira y Marchini, 1998; López y Suárez, 2002) y el ácido γ -aminobutírico (GABA) es un aminoácido no proteico, neurotransmisor, que interviene en el control de los impulsos eléctricos en células nerviosas, músculos y órganos (Nelson y Cox, 2000).

Los aminoácidos predominantes en el jugo del lote 1 en orden decreciente fueron 8: prolina, VIII, ácido glutámico, serina, lisina, asparagina, alanina, triptófano y/o fenilalanina. Mientras que los aminoácidos predominantes en el jugo del lote 2 fueron 9: prolina y ácido aspártico en proporción casi iguales, le siguen en orden decreciente, el aminoácido VI, alanina, glicina y/o histidina, serina, triptófano y/o fenilalanina, metionina y valina. Todos estos aminoácidos fueron identificados en la naranja Valencia de California, Estados Unidos, en donde además sobresalieron alanina, asparagina, los ácidos aspártico, glutámico y γ -aminobutírico, serina y arginina (Clements y Leland, 1962); en las variedades de naranjas pakistaníes, Valencia Late, Blood-Red (Sanguina), Mosambi, Sangtara y Kinnow, las cuales coinciden entre sí en 7 aminoácidos: prolina, fenilalanina, ácido aspártico, tirosina, valina, serina, DL-alanina (Elahi y Khan, 1971), y todos fueron señalados por Aranda *et al.* (1969) en el jugo de naranja variedad Valencia de España, en donde separaron 19 aminoácidos e identificaron 18.

Estos resultados coinciden con la observación de Wallrauch y Faethe (1988 cp de Oliveira *et al.*, 2002), quienes mencionan que, independientemente del tipo de fruta, son 8 los aminoácidos responsables de las peculiaridades del espectro de aminoácidos y que prolina, ácido aspártico, serina, asparagina, ácido glutámico, alanina, ácido γ -aminobutírico y arginina, junto con amonio representan del 90 al 95 % de los aminoácidos libres en la mayoría

Cuadro 3.- Rf % de los aminoácidos patrones y libres; y los Rx correspondientes de las reacciones a la ninhidrina reveladas en los lotes 1 y 2 de jugo de naranja “Valencia”, por cromatografía bidireccional.

| Aminoácidos patrones | Rf % Solvente II ^a | Aminoácido separado | Rf % (Rx) bidireccional | | Aminoácido separado |
|---------------------------|-------------------------------|---------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------|
| | | | Lote 1 | Lote 2 | |
| NI | | I | 2 | 2,66 | I |
| Lisina* | 4,66 | II | 5,33 (1,14) | nd | nd |
| Ácido aspártico | 6,66 | III | 6 (0,9) | 6,66 (1,0) | II |
| Arginina** | 7,33 | nd | nd | nd | nd |
| Cisteína | 10,00 | nd | nd | nd | nd |
| Ácido glutámico | 12,00 | IV | 12 (1,0) | nd | nd |
| Serina** | 15,66 | V | 16,66 (1,06) | 15,33 (0,97) | III |
| Glicina**/Histidina* | 20,66 | nd | nd | 20,66 (1,0) | IV |
| Treonina* | 23,33 | nd | nd | nd | nd |
| Asparagina ^b | 26,66 ^b | VI | 25,66 (0,96) ^b | nd | nd |
| Alanina | 30,66 | VII | 30,66 (1,0) | 30,66 (1,0) | V |
| NI | | VIII | 35,76 | 37,73 | VI |
| NI | | IX | 39 | nd | nd |
| Valina* | 45,33 | X | 42,33 (0,93) | 45,33 (1,0) | VII |
| Tirosina** | 48,66 | XI | 47,33 (0,97) | nd | nd |
| Metionina* | 51,33 | XII | 52 (1,01) | 52 (1,01) | VIII |
| Leucina* | 55,66 | nd | nd | nd | nd |
| Prolina** ^c | 56,66 | XIII | 55,66 (0,98) ^c | 58,66 (1,0) ^c | IX |
| Triptófano*/Fenilalanina* | 62,00 | XIV | 62 (1,0) | 65,33 (1,0) | X |

* Aminoácido esencial. ** Aminoácido condicionalmente esencial. Rf %: factor de retención de los aminoácidos. Rx: factor de retención relativo. ^a Solvente II, fenol:agua (80:20). El número romano indica la ubicación del aminoácido no identificado en el cromatograma. NI: aminoácido no identificado. ^b Color marrón. ^c Color amarillo. nd: no detectado.

de los jugos o pulpas de frutas, y con de Oliveira *et al.* (2002) quienes encontraron que los 8 aminoácidos mayoritarios en el jugo de merey (*Anacardium occidentale* L.) en orden

decreciente son: alanina, serina, leucina, fenilalanina, prolina, ácido glutámico, tirosina y ácido aspártico.

El Rf % de la reacción XIII en el lote 1

(55,66) coincidió con el Rf % de la leucina de referencia (55,66) y difirió en una unidad del Rf % de la prolina de referencia (56,66), y el Rf % de la reacción IX del lote 2 (58,66) superó en 2 unidades el Rf % de la prolina de referencia; sin embargo, la reacción XIII del lote 1 y la reacción IX del lote 2, al igual que la prolina de referencia desarrollaron el color amarillo característico frente a la ninhidrina, por lo cual las reacciones XIII (lote 1) y IX (lote 2) quedaron identificadas como prolina, y en función al tamaño de las reacciones reveladas predominaron en ambas cromatografías.

Prolina es el aminoácido común y que destaca en la mayoría de los cítricos, además de arginina y ácido aspártico. Clements y Leland (1962) lo identificaron por cromatografía de intercambio iónico y destacó en todas las naranjas (incluyendo la variedad Valencia), limones y mandarinas de California, Estados Unidos, evaluadas, menos en toronja, en donde aventajó el ácido aspártico. Prolina predomina en el jugo fresco de naranja variedad Valencia de España y es el principal en las variedades de naranjas españolas, Navelina, Washington Navel y Navelate, maduras, donde representa en ese estado de madurez aproximadamente el 50 % del contenido total de aminoácidos (Alberola y Primo, 1969; Aranda *et al.*, 1969; Tadeo *et al.*, 1988); y fue identificado en el 100 % de las muestras de jugo de naranja Valencia de Argentina junto con arginina y ácido γ -aminobutírico (GABA) (Sobrero *et al.*, 2001). Prolina, aminoácido condicionalmente esencial (Dutra de Oliveira y Marchini, 1998; López y Suárez, 2002).

Llama la atención que en el jugo del lote 2 el ácido aspártico sobresalió junto a prolina, las áreas de ambas reacciones a la ninhidrina fueron aproximadamente iguales, sin embargo, este aminoácido en el jugo del lote 1 fue uno de los que estuvo en menor proporción.

El ácido aspártico predominó sobre prolina en 4 de 5 variedades de naranjas (*Citrus aurantium*) pakistaníes (no incluye la variedad Valencia) (Elahi y Khan, 1971); y junto a serina

dominó en la variedad de naranja (*C. aurantium*) Shamouti de Israel, en donde no se mencionan prolina, asparagina ni ácido glutámico (Coussin y Samish, 1968). El ácido aspártico fue identificado en el 44,44 % de las muestras de jugo de naranja Valencia de Argentina (Sobrero *et al.*, 2001).

Metionina se identificó en ambos lotes y se encontró en menor proporción. Este aminoácido no fue señalado por Aranda *et al.* (1969) en los jugos de naranjas de las variedades, Valencia, Comuna, Cadenera y Sanguina de España, pero si fue identificado por Alberola y Primo (1969) en las mismas variedades españolas por cromatografía de gas-líquido, así como en las variedades estadounidenses Parson Brown, Pineapple, Hamli y Valencia. Elahi y Khan (1971) lo identificaron por cromatografía de papel solo en toronja (*Citrus paradisi*) de 6 variedades de cítricos pakistaníes evaluados. Sobrero *et al.* (2001) no lo mencionan en las naranjas Valencia de Argentina y tampoco de Oliveira *et al.* (2002) en el jugo de merey, sin embargo citan a Ara (1988) quien encontró metionina en cantidades mínimas en los jugos de merey (*Anacardium* sp.) y de semeruco (*Malpighia* sp.)

Lisina, ácido glutámico, asparagina y tirosina solo se identificaron en el jugo del lote 1. La reacción identificada como asparagina y la asparagina de referencia desarrollaron frente a la ninhidrina color marrón (Smith y Feinberg, 1979).

Con la combinación de solventes fenol:agua (80:20) los Rf % de los aminoácidos de referencia triptófano y fenilalanina se superponen y coinciden con el Rf % de la reacción identificada con el número XIV en la cromatografía del jugo del lote 1 (62 %), por lo cual, el Rx de la reacción XIV con respecto a ambos patrones es igual a 1. Aranda *et al.* (1969) identificaron β -fenilalanina y triptófano, ellos aplicaron como solvente II fenol:agua (75:25), y mencionan que la proporción de fenilalanina si bien es pequeña en unas

variedades de naranjas en otras es elevada. Alberola y Primo (1969) detectaron por cromatografía gas-líquido cantidades trazas en las variedades ya mencionadas y cantidades muy pequeñas en las variedades estadounidenses, salvo en la Hamlin.

Fenilalanina y triptófano son aminoácidos esenciales, y además para el consumidor fenilcetonúrico es importante conocer el aporte de fenilalanina de los alimentos de la dieta diaria. Por ello es necesario separarlos, identificarlos y cuantificarlos en el jugo de naranja Valencia producido en el país. Aranda *et al.* (1969) señalan al triptófano como probable en las variedades de naranjas españolas, mientras que Alberola y Primo (1969) no lo mencionan en esas variedades ni en las estadounidenses, tampoco Elahi y Khan (1971) en las variedades de naranjas (*Citrus aurantium*), ni en la toronja (*Citrus paradisi*) de Pakistán. Por su parte, de Oliveira *et al.* (2002) no mencionan el triptófano en el jugo de merey, sin embargo citan a Price *et al.* (1975) quienes lo encontraron en cantidades mínimas en los jugos de merey rojo y amarillo clasificados como dulce, ácido y astringente, constatando su ausencia en las muestras de jugos ácidos.

Durante esta experiencia y en las condiciones de trabajo descritas, los Rf % de los aminoácidos de referencia, glicina e histidina, se superponen, y a su vez coinciden con el Rf % de la reacción señalada con el número IV en la cromatografía del jugo del lote 2 (20,66), por lo cual habría que introducir una metodología que permita diferenciar entre glicina e histidina. Glicina fue identificada en las variedades de naranjas españolas y en las mismas variedades estadounidenses (Alberola y Primo, 1969; Aranda *et al.*, 1969), y solo fue identificada en la variedad Mosambi de Pakistán (Elahi y Khan, 1971).

Serina fue identificada en las principales variedades de naranjas españolas y en las mismas variedades estadounidenses (Alberola y Primo, 1969; Aranda *et al.*, 1969) y Elahi Khan (1971),

lo identificaron en las variedades de naranjas (*C. aurantium*) pakistaníes, Valencia Late, Blood-Red (Sanguina), Mosambi, Sangtara y Kinnow. Durante esta experiencia, serina se identificó en ambos lotes de jugo en proporción importante.

CONCLUSIONES

- Ambos cromatogramas coincidieron en 8 de los aminoácidos revelados, 1 de ellos no identificado (I): ácido aspártico, serina, alanina, valina, metionina, prolina y probablemente triptófano y/o fenilalanina.
- En ambos cromatogramas destacó prolina, coincidiendo con trabajos realizados con naranjas Valencia y otras variedades de naranjas y cítricos en general en otros países; le siguieron los aminoácidos no identificados VIII (cromatograma 1) y VI (cromatograma 2).
- Se identificó el ácido aspártico en ambos cromatogramas, predominando en proporción muy similar a la de prolina en el jugo del lote 2, el cual se caracterizó por mayor índice de madurez y de nitrógeno aminoacídico. Mientras que en el jugo del lote 1 se encontró en baja proporción.
- Se identificó metionina, la cual no es mencionada en las naranjas Valencia de Argentina, pero si por unos autores, en naranjas españolas, estadounidenses y en toronja de Pakistán.
- Lisina, ácido glutámico, asparagina y tirosina solo se identificaron en el jugo del lote 1.
- Los resultados coincidieron con la observación de Wallrauch y Faethe (1988 cp de Oliveira *et al.*, 2002), que independientemente del tipo de fruta son 8 los aminoácidos responsables de las peculiaridades del espectro de aminoácidos.

AGRADECIMIENTO

Las autoras agradecen al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela (CDCH-UCV) por el financiamiento del proyecto individual PI N° 03-32-4042-99. “Determinación de la composición de aminoácidos libres en pulpas de guayaba (*Psidium guajava* L.), mango (*Mangifera indica* L.) y naranja (*Citrus sinensis* L.) cultivadas en el país”.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, D. y Andrews, R.S. 1977. Introducción a la cromatografía. (3ra. ed.). Madrid, España: Editorial Alhambra, S. A. pp.49.
- Abdalla, M.A. and Abu-Salem, F.M. 1976. Free amino acids of Egyptian mango, guava, and orange juice. *Sudan Journal of Food Science and Technology*. 8:18-22.
- Alberola, J. and Primo, E. 1969. Detection of adulterations in citrus juices. XIII. Identification of amino acids in oranges juices and in commercial citric acids and sucroses. *Journal of Chromatographic Science*. 7(1):56-62.
- AOAC. 2005. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. (18va. ed.). Washington, USA.
- Aranda, A.; Casas, A. y Royo-Iranzo, J. 1969. Detección de adulteraciones en zumos cítricos. XVI. Cromatogramas característicos de los aminoácidos del zumo de diversas especies y variedades de frutos cítricos. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*. 9(4):586-599.
- Aular, Jesús y Aular-Rodríguez, Jesús. 2007. Calidad de la naranja proveniente de Yumare, Venezuela, y su evolución en el período de zafra. *Bioagro* 19(3):169-174.
- Avilán, L. y Rengifo, C. 1988. Los cítricos. Caracas, Venezuela: Editorial América, C. A.
- Browning, D.R. 1969. *Chromatography*. London, UK: MacGraw-Hill. pp. 42.
- Brunini, Maria Amalia; de Oliveira, Antonio Luíz. e Varanda, Daniel Barboza. 2003. Avaliação da qualidade de polpa de goiaba ‘Paluma’ armazenada a -20 °C. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 25(3):394-396.
- Cavalcante, Ítalo Herbert Lucena; Martins, Antonio Baldo Geraldo e Stuchi, Eduardo Sanches. 2006. Fruit characteristics of eighteen orange cultivars. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*. 6(2):72-77.
- Clements, Robert L. and Leland, Harry V. 1962. An ion-exchange study of the free amino acids in the juices of six varieties of citrus. *Journal Food Science*. 27(1):20-25.
- Coussin, B.R. and Samish, Zdenka. 1968. The free amino acids of Israel orange juice. *Journal of Food Science*. 33(2):196-199.
- COVENIN. 1979. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Alimentos. Determinación del pH. (acidez iónica). Norma Venezolana COVENIN 1315:79. Caracas, Venezuela.
- COVENIN. 1981. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Frutas. Tomas de muestras. Norma Venezolana COVENIN 1769-81. Caracas, Venezuela.
- COVENIN. sin fecha. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Naranjas. Anteproyecto de Norma Venezolana 1 A COVENIN 12:3-006. Caracas, Venezuela.
- de Oliveira, Maria Elisabeth Barros; de Oliveira, Gerardo Sérgio Francelino; Maia, Geraldo Arraes; Moreira, Renato de Azevedo e Monteiro, Ana Cristina de Oliveira. 2002. Aminoácidos livres majoritários no suco de caju: variação ao longo da safra. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 24(1):133-137.
- Del Castillo, M. Dolores; Corzo, Nieves; Polo, M. Carmen; Pueyo, Encarnación and Olano, Agustín. 1998. Changes in the amino acid composition of dehydrated orange juice during accelerated nonenzymatic browning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46(1):277-280.

- Del Castillo, M. Dolores; Santa María, Guillermo; Pueyo, Encarnación; Corzo, Nieves and Olano, Agustín. 1998. Differences in amino acid composition in commercial orange juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46(6):2329-2331.
- Domínguez-S., Xorge Alejandro. 1982. *Cromatografía en papel y en capa delgada*. (2da. ed.). Washington, D. C., USA: Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, Departamento de Asuntos Científicos, Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos (OEA).
- Dutra de Oliveira, José Eduardo e Marchini, Julio Sérgio. 1998. *Ciências Nutricionais*. São Paulo, Brasil: Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda.
- Elahi, Manzoor and Khan, Nawab. 1971. The free amino acids of fresh juices of Pakistani citrus fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 19(2):260-262.
- Fabiani, A.; Versari, A.; Parpinello, G.P.; Castellari, M. and Galassi, S. 2002. High-Performance Liquid Chromatographic analysis of free amino acids in fruit juices using derivatization with 9-fluorenylmethyl-chloroformate. *Journal of Chromatographic Science*. 40(1):14-18.
- FAO/WHO. 2005. Food and Agriculture Organization of the United Nations-World Health Organization. Norma general del Codex para zumos (jugos) y néctares de frutas. CODEX STAN 247-2005.
- FAO. 2012. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Frutos cítricos frescos y elaborados. Estadísticas anuales 2012. CCP:CI/ST/2012. http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Citrus/Documents/CITRUS_BULLETIN_2012.pdf
- FUSAGRI. 1983. Fundación Servicio para el Agricultor Cítricos. Serie Petróleo y Agricultura. Venezuela: Maraven. N° 1.
- Garde-Cerdán, Teresa; Arias-Gil, Margaluz; Marsellés-Fontanet, A. Robert; Ancín-Azpilicueta, Carmen and Martín-Belloso, Olga. 2007. Effects of thermal and non-thermal processing treatments on fatty acids and free amino acids of grape juice. *Food Control*. 18(5):473-479.
- Giraud, M.; Sánchez-Tuero, H.; Pavesi, R.; Markowski, I.; Guirin, G. y Montesano, J. 2004. El proceso productivo de los jugos cítricos y la determinación de los aminoácidos libres por RP-HPLC en jugos frescos y concentrados como criterio de genuidad de los mismos. *Alimentaria*. 350:97-102.
- Gómez-Ariza, J.L.; Villegas-Portero, M.J. and Bernal-Daza, V. 2005. Characterization and analysis of amino acids in orange juice by HPLC-MS/MS for authenticity assessment. *Analytica Chimica Acta*. 540(1):221-230.
- Kacem, B.; Cornell, J.A.; Marshall, M.R.; Shireman, R.B. and Matthews, R.F. 1987. Nonenzymatic browning in aseptically packaged orange drinks: effect of ascorbic acid, amino acids and oxygen. *Journal of Food Science*. 52(6):1668-1672.
- Kacem, B.; Matthews, R. F.; Crandall, P. G.; and Cornell, J. A. 1987. Nonenzymatic browning in aseptically packaged orange juice and orange drinks. Effect of amino acids, deaeration, and anaerobic storage. *Journal of Food Science*. 52(6):1665-1667.
- Koca, Nuray; Selen-Burdurlu, Hande and Karadeniz, Feryal. 2003. Kinetics of nonenzymatic browning reaction in citrus juice concentrates during storage. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 27(6): 353-360.
- López, Laura Beatriz y Suárez, Marta María 2002. *Fundamentos de Nutrición Normal*. (pp. 100). Buenos Aires, Argentina: Editorial El Ateneo.
- Lo Voi, A; Impembo, M.; Fasanaro, G. and

- Castaldo, D. 1995. Chemical characterization of apricot puree. *Journal of Food Composition and Analysis*. 8(1):78-85.
- Maireva, S.; Usai T. and Manhokwe, S. 2013. The determination of adulteration in orange based fruit juices. *International Journal of Science and Technology*. 2(5):365-372.
- Medina, M.L.; Gallo, M.A. y Pagano, F. 2004. Identificación de aminoácidos libres por cromatografía de capa fina en la pulpa de guayaba (*Psidium guajava* L.) tipo "criolla roja". *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)*. 21(Supl. 1):322-328.
- Morton, Julia F. 1987. Orange. In *Fruits of warm climates*. (pp.134-142). Miami, FL, USA: Published by Julia F. Morton. Winterville, NC, USA: Distributed by Creative Resource Systems, Inc.
- Nelson, David L. and Cox, Michael M. 2000. Lehninger. *Principles of Biochemistry*. (3rd. ed.). New York, USA: Worth Publishers. pp. 116, 118-120.
- Niederwieser, A. 1975. Chromatography of amino acids and oligopeptides. In *Chromatography. A laboratory handbook of chromatographic and electrophoretic methods*. (pp. 393-465). (3rd. Edition). New York, USA: Van Nostrand Reinhold Company.
- Ovalles, José F.; León-L., Andrés; Vielma, Rosalba y Medina, Ana L. 2002. 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. *Revista de La Facultad de Farmacia (ULA)*. 44(2):70-78.
- Piez, K.A. and Saroff, H.A. 1961. Chromatography of amino acids and peptides. In *Chromatography*. (pp. 347-377). New York, USA: Reinhold Publishing Corporation.
- Rounds, Mary Ann and Nielsen, S. Suzanne. 1998. *Basic principles of chromatography*. In *Food Analysis*. (pp. 485-508). (2nd. ed.). Gaithersburg, Maryland, USA: Aspen Publisher, Inc.
- Royo-Iranzo, J. y Cervelló, C. 1973. Detección de adulteraciones en zumos cítricos. XVIII. Contenido en nitrógeno total y nitrógeno de aminoácidos de los sueros del zumo de las naranjas españolas. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*. 13(4):578-582.
- Russián-L., Tania. 2006. Calidad del fruto en accesiones de naranja 'Criolla' y 'Valencia' en el sector Macanillas-Curimagua, Estado Falcón. *Agronomía Tropical*. 56(3):415-432.
- Silva, Branca M.; Casal, Susana; Andrade, Paula B.; Seabra, Rosa M.; Oliveira, M. Beatriz and Ferreira, Margarida A. 2003. Development and evaluation of a GC/FID method for the analysis of free amino acids in quince fruit and jam. *Analytical Sciences*. 19(9):1285-1290.
- Skoog, D.A.; Holler, F.J. y Nieman, T.A. 2001. *Principios de analítica instrumental*. (5ta. ed.). Madrid: MacGraw-Hill Interamericana de España, S. A. U. pp. 811, 824-825.
- Smith, I. y Feinberg, J.G. 1979. Cromatografía sobre papel y capa fina. *Electroforesis*. Madrid, España: Editorial Alhambra, S. A. pp. 65-66, 69, 73, 80, 163-164, 208-209.
- Šnurkovič, Petr. 2013. Quality assessment of fruit juices by NIR spectroscopy. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*. LXI(3):803-812.
- Sobrero, María Silvina; Fernández, Verónica; Muller, Diana; Perren, Martha; Rey, María Carolina y Sanchis, Juan Carlos. 2001. 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. *FABICIB*. 5:195-200.
- Stahl, E. and Mangold, H. 1975. *Techniques of thin-layer chromatography*. In

Chromatography. A laboratory handbook of chromatographic and electroforetic methods. (pp. 164-188). (3rd. ed.). New York, USA: Van Nostrand Reinhold Company.

- Tadeo, José L.; Ortiz, Jesús M.; Martín, Bernardo and Estellés, Antonio. 1988. Changes in nitrogen content and amino acids composition of navel oranges during ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 43(3):201-209.
- Vaclavik, Lukas; Schreiber, Andre; Lacina, Ondrej; Cajka, Tomas and Hajslova, Jana. 2012. Liquid chromatography-mass

spectrometry-based metabolomics for authenticity assessment of fruit juices. *Metabolomics*. 8(5):793-803.

- Voldřich, Michal; Skálová, Petra; Kvasnička, František; Cuhra, Petr; Kubík, Martin and Pyš, Petr. 2002. Authenticity of 100 % orange juice in the Czech market in 1996 - 2001. *Czech Journal of Food Sciences*. 20(2):83-88.
- Zambrano, Judith; Quintero, Ibis; Álvarez, Roger; Hortegano, Rosa y Sáenz, Malyory. 2001. Evaluación de frutos de naranjo 'Valencia' provenientes de tres pisos altitudinales del Estado Trujillo. *Agronomía Tropical*. 51(1):107-117.