

Determinación de prolina en zumos de naranja comerciales como parámetro de genuinidad

M.A. Hernández-Torres¹, R.A. Calderón-Fernández¹, J.A. Rodríguez-Arzave¹.

¹ Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Química, Av. Pedro de Alba s/n, Ciudad Universitaria, CP 66450, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. oiramalbert@gmail.com

RESUMEN: El jugo (zumo) de naranja es una bebida altamente consumida en todo el mundo. Es una bebida refrescante y constituye una fuente de nutrientes esenciales como vitamina C, ácido fólico, flavonoides, minerales y aminoácidos benéficos para la salud. Por su popularidad, los jugos de naranja son objeto de adulteración, por lo que es conveniente evaluar su calidad y genuinidad mediante perfiles bioquímicos característicos del fruto. En el zumo de naranja, la prolina es el aminoácido predominante, por ello el objetivo de este trabajo fue determinar la concentración de prolina en siete jugos de cítricos comercializados como “100% naturales” en el área metropolitana de Nuevo León y determinar su genuinidad. El contenido de prolina se determinó mediante el método espectrofotométrico con Ninhidrina-DMSO en medio ácido. Además, se evaluó la calidad de los jugos acorde a la normatividad mexicana. Algunos de los zumos de naranja comerciales cumplieron con los parámetros de calidad señalados en la legislación mientras que, el contenido de prolina fue inferior a 0.475 ± 0.016 g/L, valor no acorde a lo reportado en la literatura.

Palabras clave: Prolina, zumo de naranja, genuinidad.

ABSTRACT: Orange juice is a highly consumed around the world. It is a refreshing drink and a source of essential nutrients such as vitamin C, acid folic, flavonoids, minerals and amino acids beneficial for health. Because of his popularity, orange juices are target to adulteration, so it is convenient to evaluate their quality and authenticity by means of biochemical profiles characteristic of the citric fruits. In the orange juice, proline is the predominant amino acid, therefore the objective of this study was to determine proline content in seven citrus juices marketed as "100% natural" in the metropolitan area of Nuevo Leon and determine its authenticity. Proline content was determinate by spectrophotometry with acid Ninhydrin-DMSO. In addition, we evaluated the quality of orange juices according to Mexican Normativity. Some of commercial orange juices met the quality parameters referred to in legislation while proline content was less than 0.475 ± 0.016 g/L, value not according to what was reported in the literature.

Keywords: Proline, orange juice, authenticity.

Área: Frutas y hortalizas

INTRODUCCIÓN

La naranja, es uno de los frutos más consumido en México y junto al limón y la toronja constituye uno de los principales productos de exportación. Por su sabor agridulce y aroma fresco cítrico frutal, la naranja, además de consumirse como fruta fresca, es utilizada en la cocina nacional e internacional en la preparación de platillos, ensaladas y postres. En la gastronomía se emplea tanto el zumo como la cáscara, mientras que, en la industria agroalimentaria es insumo para la obtención de aceites esenciales y pectinas, así como para la producción de mermeladas, concentrados, néctares y jugos frescos (SAGARPA, 2017).

En el año 2016, la naranja valencia fue el cultivo perenne con la mayor superficie sembrada en México con poco más de 335 mil hectáreas y una producción de 4.60 mil millones de toneladas, de los cuales solo el 0.4 % fue exportado. Veracruz es el principal productor del fruto cítrico, seguido por los estados de Tamaulipas, San Luis Potosí y Nuevo León. Actualmente se satisface el 100 % de los requerimientos nacionales con producción interna siendo el zumo de naranja el principal producto procesado por la industria agroalimentaria (Flores, 2017; SAGARPA, 2017).

Se conoce como zumo de naranja al líquido colectado de la parte comestible de naranjas en buen estado, maduras y frescas, no diluido, no concentrado, no fermentado, y sometido a tratamiento adecuado que mantenga sus características físicas, químicas y organolépticas al envasarse; puede o no, contener pulpa de fruta y aditivos procedentes del mismo fruto, además debe estar exento de corteza, semillas y materia ajena (CODEX STAN 247-2005; NMX-F-118-1984).

El zumo de naranja es una bebida popular refrescante de agradables propiedades sensoriales; es fuente de diversos nutrimentos esenciales como ácido fólico, β -caroteno, flavonoides, vitamina C y aminoácidos; Además, posee un alto valor calórico. Se ha reportado que su ingesta trae consigo beneficios a la salud como son prevenir la obesidad, la litiasis renal, así como enfermedades relacionadas con la edad (Chiosa *et al.*, 2005; Cerqueira *et al.*, 2014 y Kim *et al.*, 2017).

El mercado del jugo de naranja es uno de los más competitivos a nivel mundial. Sin embargo, su popularidad lo convierte en blanco de adulteración y fraude. En los jugos de frutas, la dilución con agua, jugos de frutas, o la adición de jarabes de fructosa y colorantes constituyen el tipo de adulteración más común, mientras que, las formas más sofisticadas incluyen el aditamento de aminoácidos como la glicina y ácido glutámico e incluso el empleo de hidrolizados proteicos con el objetivo de aumentar el contenido de nitrógeno (Twohig *et al.*, 2011; Acevedo *et al.*, 2018).

Existen distintos perfiles químicos para evaluar la adulteración de los zumos de frutas. Los análisis cuantitativos para determinar la autenticidad de los zumos de naranja incluyen la determinación de ácidos orgánicos, carbohidratos, flavonoides y aminoácidos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía gas-líquido y espectroscopia fluorescente (Ammari, 2015; Acevedo 2018).

Algunos países de América del Sur emplean el índice de formol como parámetro de calidad para establecer la genuinidad de jugos frutales, el análisis químico determina el contenido de nitrógeno amínico, sin embargo, no es una prueba específica para determinar el contenido de aminoácidos propios del jugo debido a que cualquier grupo amino libre es causa de un resultado positivo (Bosso *et al.*, 2007; Segurondo *et al.*, 2013). Actualmente, en México los parámetros fisicoquímicos ampliamente utilizados para evaluar la calidad de los zumos de naranja son la acidez iónica y titulable, el % de sólidos disueltos y el índice de Madurez (NMX-F-118-1984). Dicho perfil fisicoquímico brinda poca información que ayude a establecer, con certeza, la autenticidad del zumo; por lo que es menester incluir otros análisis que ofrezcan un perfil bioquímico representativo del fruto, como es el contenido aminoacídico. Uno de los aminoácidos presentes en mayor proporción en los zumos de frutas, es la prolina. La prolina cumple diversas funciones fisiológicas en los vegetales, es un osmoprotector en situaciones de estrés por la presencia de metales y sales en el suelo, así como por la falta de agua (Rienth *et al.*, 2014). Por ello, esta investigación se emprendió con el objetivo de determinar el contenido de prolina en zumos de naranja comercializados en el área metropolitana de Nuevo León y como parámetro de genuinidad. Los zumos de naranja comerciales analizados en este trabajo, cumplieron con los parámetros de calidad señalados en la legislación mexicana; Sin embargo, el contenido de prolina no es concordante con lo señalado en diversas investigaciones.

MATERIALES Y METODOLOGÍA

Muestra de trabajo

Siete jugos de cítricos comercializados como “jugo 100 % natural” fueron obtenidos mediante un muestreo aleatorio en comercios localizados en la ciudad de Monterrey N.L. y su área metropolitana. Se consiguieron seis zumos de naranja: uno en presentación frasco vidrio con 413 mL designado como jugo A; tres en presentación frasco plástico, de los cuales, dos contenían 480 mL y uno 430 mL y que fueron etiquetados como jugo B, C y D respectivamente; dos zumos en presentación tetrapack de 200

mL cada uno designados como E y F. Además, se adquirió un zumo de toronja en presentación tetrapak de 1L. Las muestras fueron mantenidas bajo refrigeración a 4°C hasta el momento de su análisis.

Preparación de la Muestra

Una alícuota de 20 mL de jugo fue colocada en un tubo cónico con capacidad de 50 mL y se llevó a centrifugación durante 15 minutos a 2500 RPM con la finalidad de precipitar los detritos de tejido frutal. La muestra de trabajo fue diluida 1:50 empleando agua bidestilada como diluyente.

Cuantificación de Prolina

El contenido de prolina fue determinado espectrofotométricamente por el método Ninhidrina-DMSO en medio ácido propuesto por Rienth y colaboradores en el año 2014, empleando prolina como estándar. En un tubo de ensaye de 13 x 100 mm con tapón de rosca se añadieron 750 µL de jugo previamente centrifugado y diluido, enseguida se agregaron 750 µL de ácido fórmico concentrado. La mezcla en el tubo fue agitada en vortex durante un minuto y enseguida se añadieron 750 µL de una solución de Ninhidrina al 3 % p/v disuelta en Dimetilsulfóxido y se agitó nuevamente durante 2 minutos en vortex. El tubo se colocó en un baño de agua en ebullición durante 15 minutos. Al terminar el tiempo de reacción, el tubo fue retirado del baño de agua y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Una vez frío el tubo, la solución se transfirió a una celda para espectrofotómetro con 1 cm de paso de luz y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Spectronic Genesys 5 empleando una longitud de onda de 520 nm. El contenido de prolina fue estimado por interpolación de los datos en una curva de regresión lineal ($Y = 0.0622x - 0.0066$, $R^2 = 0.9999$) establecida con soluciones de prolina en un rango de concentración de 2.5 a 15 mg/L. Cada zumo de naranja fue analizado por quintuplicado.

Perfil fisicoquímico

Además del contenido de Prolina, a los zumos comerciales de naranja, se les realizó un perfil fisicoquímico acorde a la legislación mexicana. Para el contenido de sólidos disueltos totales (°Brix), pH y acidez total se empleó el zumo directamente del envase. La determinación de los sólidos disueltos totales se realizó conforme a lo señalado en la Norma Mexicana NMX-F-103-1982, utilizando un Refractómetro tipo Abbe. El pH se determinó de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NMX-F-317-S-1978, con la ayuda de un potenciómetro Corning Modelo 430 con electrodo combinado. La acidez total se evaluó siguiendo lo señalado en la Norma Mexicana NMX-F-011-1982, los resultados fueron expresados como gramos de ácido cítrico/100 mL de zumo. Los análisis descritos se realizaron por quintuplicado para cada jugo comercial.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El método Ninhidrina/DMSO en medio ácido permitió la determinación del contenido de prolina en los siete zumos comerciales evaluados en esta investigación. Los datos obtenidos se presentan en la figura 1. En ella se observa que, el contenido de prolina fluctuó en rango comprendido entre 0.216 ± 0.007 g/L para el zumo de toronja hasta 0.475 ± 0.016 g/L para el zumo de naranja F, ambos comercializados por el mismo proveedor.

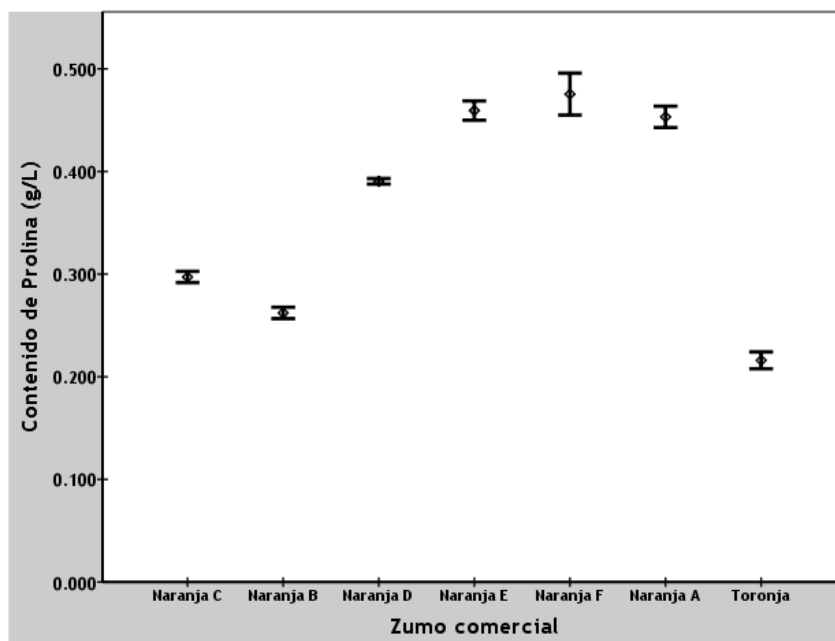


Figura 1 Contenido de prolina en zumos comerciales de naranja. Se muestra media y barras de error ($F=803.683$, $p<0.05$).

El contenido de prolina en los zumos comerciales analizados fue inferior a lo encontrado por Zeng y colaboradores en el año 2015, quienes determinaron 0.9559 ± 0.0129 gramos de prolina por litro de zumo de naranja no comercial. En el año 2013, Segurondo y colaboradores señalaron a la prolina como principal aminoácido presente en zumos de naranja en concentraciones que van desde 0.620 g/L hasta los 3.97 g/L y al igual que Rienth y colaboradores mencionan que, bajo condiciones ácidas la prolina es el único aminoácido que reacciona frente al reactivo de ninhidrina.

Por otra parte, Acevedo y colaboradores en el año 2018 analizaron mediante HPLC, el contenido aminoacídico de zumos de naranja comerciales y artesanales presentes en la ciudad de Cartagena de Indias, Colombia, así como en el zumo fresco de naranja valencia; los resultados mostraron un contenido de prolina entre 3.82 y 7.43 g/Kg en los jugos comercializados, mientras que, en el jugo fresco de naranja, el valor de prolina fue de 320 g/Kg, indicando adulteración de los zumos comerciales por dilución con agua o por la adición de jarabes dulces.

Además, la calidad del jugo de naranja comercializado fue evidenciada acorde al perfil fisicoquímico sugerido por la Norma Mexicana NMX-F-118-1984. Los resultados se muestran en la tabla I.

Tabla I. Perfil fisicoquímico evaluado a los zumos comerciales de naranja.

Zumo Comercial	Sólidos Disueltos (°Brix) ± DS	pH ± DS	Acidez Total ± DS (g de Ácido cítrico/100 mL)	Índice de Madurez
Naranja A	11.48 ± 0.04	3.47 ± 0.02	0.97 ± 0.00	11.82
Naranja B	8.30 ± 0.00	3.30 ± 0.03	0.97 ± 0.03	8.40
Naranja C	8.36 ± 0.11	3.22 ± 0.03	0.65 ± 0.00	12.91
Naranja D	12.50 ± 0.00	3.30 ± 0.03	0.87 ± 0.04	14.40
Naranja E	11.36 ± 0.26	3.22 ± 0.03	0.76 ± 0.03	14.86
Naranja F	11.88 ± 0.16	3.71 ± 0.01	0.76 ± 0.00	26.20
Toronja	11.34 ± 0.19	3.26 ± 0.00	1.63 ± 0.05	6.95
NMX-F-118-1984	10.5 - 13.5	3.00 - 4.00	0.65 -1.85	12 - 20

Los resultados revelaron que, los zumos de naranja comercializados A, D y E cumplen con lo establecido en la legislación mexicana. No obstante, para los zumos de naranja B, C y F los parámetros fisicoquímicos como sólidos disueltos (°Brix), acidez total e índice de madurez sugieren que para su elaboración se emplearon frutos con diferente grado de maduración: frutos inmaduros para los zumos B y C mientras que, un fruto muy maduro se utilizó para el zumo de naranja F. Con respecto al jugo de toronja, el contenido de ácido cítrico fue mayor al mostrado por los zumos de naranja, sin embargo, cumple con las especificaciones señaladas en la Norma Mexicana NMX-F-018-1968 para zumos de toronja.

Aunque algunos de los zumos de naranja comerciales analizados en este trabajo, cumplieron con los parámetros de calidad señalados en la normatividad, en general, el contenido de prolina no es concordante con los registros literarios obtenidos a partir de zumos de naranjas frescas, sugiriendo que, los productos comercializados podrían tratarse de néctar elaborado a partir de jugo concentrado o son “zumos” diluidos y ajustados en los parámetros relacionados al sabor y palatabilidad.

BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo, D., Montero, P. & Martelo, R. 2018. Determination of Quality in Orange Juices Marketed in the City of Cartagena de Indias-Colombia. *International Journal of Engineering and Technology*, 10(1), 336 -339.
- Ammari, F., Redjal, L. & Rutledge, D. 2015. Detection of Orange Juice Frauds Using Front-Face Fluorescence Spectroscopy and Independent Components Analysis. *Food Chemistry*, 168, 211-217.
- Bosso, S., Garbini, A., Kors, N., Ruarte, S., y Gandía, S. 1996. Genuinidad de Preparados a base de Jugos Cítricos. *Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica*, 4(4), 52-54.
- CODEX STAN 247-2005. Norma general del Codex para Zumos (jugos) y Néctares de frutas.
- Chiosa, V., Mandravel, C., Kleijans, J. & Moonen, E. 2005. Determination of B-Carotene Concentration in Orange and Apple Juice and in Vitamin Supplemented Drinks. *Chimie Anul XIV*, I-II, 253-258.
- Cerqueira, L., David, J., dos S.Q, R., Ferreira, S., David, J., dos Reis, P. & Bruns, R. 2014. Determination of Flavanones in Orange Juices Obtained from Different Sources by HPLC/DAD. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 1-5.
- Flores, D. 2017. Mexico Citrus Annual: more lime, and Slightly lees orange and grapefruit production expected. USDA.
- Kim, M., Wong, H. & Lee, K. 2017. Sensory and Instrumental Volatile Flavor Analysis of Commercial Orange Juice Prepared by Different Processing Methods. *Food Chemistry*. 267, 217-222.
- NMX-F-018-1968. Alimentos. Calidad para Jugos de Toronja. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
- NMX-F-103-1982. Alimentos. Frutos y Derivados. Determinación de Grados Brix. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
- NMX-F-118-1984. Alimentos para humanos. Bebidas No Alcohólicas Jugo de Naranja Envasado. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
- NMX-F-317-S-1978. Determinación de pH en Alimentos. Dirección General de Normas.

- NMX-FF-011-1982. Productos Alimenticios no Industrializados, Para uso Humano. Fruta Fresca, Determinación de Acidez Titulable, Método de Titulación. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
- Rienth, M., Romieu, C., Gregan, R., Walsh, C., Torregrosa, L. & Kelly, M. 2014. Validation and Application of an Improved Method for the Rapid Determination of Proline in Grape Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 3384-3389.
- SAGARPA. 2017. Planeación Agrícola Nacional 2016-2030: Cítricos Limón, Naranja y Toronja Mexicanos.
- Segurondo-Loza, R., Pantoja, M. R. & Rocha, E. 2013. Determinación de la genuinidad en jugos de naranja comercializados en los supermercados de la ciudad de La Paz. *Revista Con-Ciencia*, 1(1), 105-112.
- Twohig, M., Gledhill, A. & Burgess, J. 2011. The Determination of Fruit Juice Authenticity Using High Resolution Chromatography, UV, Time-of-Flight MS, and Multivariate Analysis. *Water The Science of What's Possible*, 1-10.
- Zeng, F., Ou, J., Huang, Y., Li, Q., Xu, G., Liu, Z. & Yang, S. 2015. Determination of 21 Free Amino Acids in Fruit Juices by HPLC Using a Modification of the 6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl Carbamate (AQC) Method. *Food Analytical Methods*, 8(2), 428-437.