

Identificación de aminoácidos libres por cromatografía de capa fina en la pulpa de guayaba (*Psidium guajava* L.) tipo "criolla roja"

Identification of free amino acids in "criolla roja" guava (*Psidium guajava* L.) pulp by thin layer chromatography

M.L. Medina¹, M.A. Gallo y F. Pagano

¹Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA), Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Caracas.

Resumen

Los aminoácidos libres influyen en las propiedades sensoriales y nutritivas del fruto. Se propuso identificarlos en la pulpa de un lote de 20 kg de guayaba (*Psidium guajava* L.) "criolla roja" por cromatografía bidireccional en capa fina de sílica gel 60. Se seleccionaron los frutos maduros para consumo fresco, y sanos. Se homogeneizó casco y pulpa central, sin semillas, en agua (1:1). Se tamizó y centrifugó a 960 g/15 min, y el sobrenadante a 900 g/15 min. Este sobrenadante se filtró, se ajustó a pH 1,7. Se pasó 25 ml del filtrado acondicionado por una columna Dowex 50 W x 4-200R (1,7 cm x 6 cm), activada. Se revelaron e identificaron en 10 µl del eluato, cisteína, serina, treonina, alanina y leucina. Dos de ellos esenciales. El tamaño y la intensidad de la reacción a la ninhidrina entre los aminoácidos, son muy similares.

Palabras clave: aminoácidos libres, guayaba, cromatografía, *Psidium guajava*

Abstract

Free amino acids are important components of nutritive value and flavors of fruits. They affect the acceptability of the fruits products, because they develop off-flavors and objectionable colors. Free amino acids were determined in the edible portion of a group (20 kg) of commercial mature "criolla roja" guava (*Psidium guajava* L.) using two-dimensional thin layer chromatography on silica

Recibido el 6-7-2004 ● Aceptado el 15-9-2004

Autor para correspondencia correos electrónicos: mmedina@strix.ciens.ucv.ve; medinabml@hotmail.com; mlmedina@reacciun.ve

gel 60. Fruits were peeled and seeds removed. Pulp was homogenized in water (1:1), screened and centrifuged to 960 g/15 min. The supernatant was centrifuged to 900 g/15 min. The serum was filtered and its pH was adjusted to 1.7. Dowex 50 W x 4-200R [H⁺] resin column (1,7 x 6-cm) was used for ion exchanging to separate amino acids in 25 ml of serum. Five free amino acids were developed and identified: cysteine, serine, threonine, alanine and leucine. Two of them are essential. The spots size and intensity of ninhidrin reaction were similar.

Key words: amino acids, thin layer chromatography, guava, *Psidium guajava*.

Introducción

Los aminoácidos libres en el metabolismo celular de los seres vivos son considerados el equilibrio entre los procesos de síntesis y degradación de las proteínas. Estos influyen en el flavor de las frutas frescas y procesadas. En éstas intervienen, en las reacciones de oscurecimiento no enzimático, que ocurren durante el almacenamiento de las mismas, en las cuales se ha identificado aminoazúcares asociados al oscurecimiento (3); y en las de condensación entre aminoácidos y el furfural, producto de degradación del ácido ascórbico, en medio ácido (11).

Algunas frutas tropicales aportan entre 10 y 26% de los requerimientos mínimos diarios de muchos de los aminoácidos esenciales/100 g de fruta fresca (8). También se ha encontrado que en determinadas condiciones fisiológicas o patológicas algunos aminoácidos se hacen esenciales, denominándoseles condicionalmente esenciales. Cisteína y tirosina en los bebés prematuros (7); glutamina y arginina, como compuestos fisiológicamente activos en la protección gastrointestinal (6,16); y glutamina, durante el ayuno y en enfermedades como sepsis, traumas, cirugías, que-

maduras, diabetes no controlada (2,17).

La guayaba (*Psidium guajava* L.) es una de las frutas tropicales más importantes, de amplio consumo en el mundo, contribuyendo con la dieta de centenares de millones de personas. Aproximadamente el 13% de la producción nacional es para consumo fresco, 80% va a la agroindustria para su transformación, principalmente en pulpa concentrada para obtener jugos y néctares; y en pastas de guayabas para elaborar conservas como los "bocadillos"; el 7% restante se exporta, en estado fresco a Colombia, y transformada en pulpa concentrada y en derivados, a Holanda, Alemania, Inglaterra, Estados Unidos (Miami), Aruba y Curaçao (11).

Se han identificado, por cromatografía gas-líquido, 18 aminoácidos en el hidrolizado ácido de la pulpa homogeneizada de la guayaba (*Psidium littorale* Raddi, var. *lucidum* (Deg.) Fosberg) Cattley de piel amarilla, 7 de ellos esenciales. Aventajan, ácido glutámico, leucina, ácido aspártico, glicina, alanina, lisina, treonina, isoleucina y valina. Señalan, además, cisteína y tirosina (8). El contenido del ácido glutámico

podría representar la suma del aminoácido libre y el liberado al hidrolizarse la glutamina, si esta amina está presente. Esto, y la presencia de cisteína, tirosina; y la arginina representado el 4% de los aminoácidos totales, podría agregar a la guayaba propiedades nutraceuticas adicionales a la asociada al contenido de pectina (15). Otros aminoácidos inestables a la hidrólisis, son asparagina y el triptofano (8).

Se han identificado cinco aminoácidos comunes (glicina,

treonina, serina, tirosina y metionina) en las etapas verde-maduro, maduro y sobremaduro del fruto del guayabo en Egipto. Histidina y lisina, solo en los frutos verdes-maduros (12).

Como una contribución al conocimiento de las bondades de una fruta tropical tan apetecida por su aroma y sabor como la guayaba, se planteó: Identificar los aminoácidos libres en pulpa de guayaba "criolla roja", aplicando el método de cromatografía de capa fina descrito para cítricos (1) con algunas modificaciones.

Materiales y métodos

Las guayabas tipo «criolla roja», maduras para consumo fresco y sanas, de un lote de 20 kg (4), se lavaron con agua de chorro, se pelaron y cortaron manualmente en mitades longitudinales, se inspeccionaron visualmente, desechándose aquellas con presencia o daño causado por insectos. Se homogeneizaron la pulpa central (sin semillas) y el casco con el mismo peso de agua (1:1) y se tamizó. Se centrifugó el tamizado a 960 g/15 minutos en un equipo Damon/IEC División, modelo CRU-5.000. El sobrenadante decantado se centrifugó en un equipo BHG, modelo Fixette, a 900 g/15 min. Este sobrenadante se filtró con papel Whatman # 4. Se ajustó el pH a 1,7. Veinticinco mililitros del sobrenadante acondicionado se pasaron por una resina de intercambio iónico, Dowex 50 W x 4-200R (Sigma), activada en forma de hidrógeno con 200 ml de HCl 2N, empacada en una columna de vidrio de 6 x 1,7 cm. Se eluyeron los aminoácidos retenidos en

la resina con 200 ml de NH_4OH 2N. El eluato recogido se evaporó a sequedad y vacío, a temperatura no mayor a 40°C. El residuo seco se resuspendió en 2,5 ml de metanol - agua (50 : 50) a pH 1,7. Se prepararon soluciones al 40% de catorce aminoácidos patrones todos con 99% de pureza (1 mg de aminoácido/2,5 ml de solución metanol - agua (50/50, v/v) a pH 1,7): L(+)-Acido glutámico (Fisher Scientific); L-Acido aspártico, L-Alanina, DL-Fenilalanina L(+), Lisina monoclórhidrato y L-Tirosina (Merck); L(+)-Leucina, L(-)-Treonina y L(+)-Valina (Riedel-de-Haën); L-Arginina y L-Cisteína clórhidrato anhidro (Scharlau); L-Prolina, L-Serina y DL-Triptofano (Sigma).

Se prepararon las cromatoplasmas de sílica gel 60, 20 x 20 cm (Merck), 0,25 mm de espesor, sin indicador, para la cromatografía monodireccional de 10 ml de cada solución de aminoácido patrón (3,96 mg); y para las cromatografías

bidireccionales de 10 ml cada una, de la solución del residuo seco resuspendido, del eluato del sobrenadante acondicionado, obtenido de la pulpa de guayaba, según las normas establecidas y el método descrito para cítricos con las combinaciones de solventes, I: cloroformo-metanol-amoniaco (40:40:20), y II:

fenol (Riedel-de-Haën) - agua al 80%. Los aminoácidos se revelaron con solución de ninhidrina (Riedel-de-Haën) al 0,2% (1,13,14).

Se compararon los Rf % calculados de cada una de los aminoácidos revelados con los de los aminoácidos patrones obtenidos en igualdad de condiciones.

Resultados y discusión

Con el método de Aranda *et al.* 1969 (1), se revelaron e identificaron cinco (5) aminoácidos (figura 1, cuadro 1), dos de ellos esenciales. Cisteína (1), asociada a propiedades nutraceuticas; serina (2), treonina (3), alanina (4) y leucina (5). El tamaño y

la intensidad del color desarrollado a la reacción a la ninhidrina son similares entre los cinco, e inferiores a las desarrolladas por cada uno de los patrones correspondiente; por lo cual el contenido de aminoácido en cada una de ellas podría ser muy similares en-

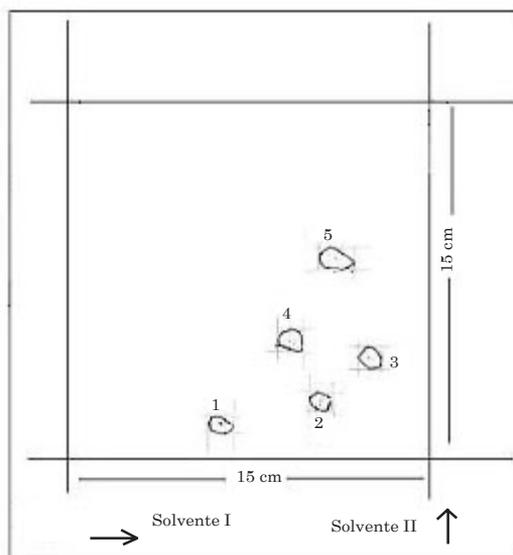


Figura 1. Cromatografía bidireccional del sobrenadante acondicionado de pulpa de guayaba "criolla roja". Primer desarrollo, combinación de solventes I: cloroformo-metanol-amoniaco (40:40:20). Segundo desarrollo, combinación de solventes II: fenol-agua (80%).

Cuadro 1. Rf % de los aminoácidos patrones y de los aminoácidos libres, revelados en la pulpa de guayaba (*Psidium guajava* L) tipo criolla roja por cromatografía bidireccional. Solventes I y II^a.

Aminoácidos patrones	Rf % solvente II	Aminoácidos pulpa	Rf % ^b
*Arginina	4,7		
*Lisina	5,0 ± 0,4		
Ac. Aspártico	7,7 ± 0,5		
Cisteína	11,3 ± 0,7	1	10
Ac. Glutámico	13,7 ± 0,5		
Serina	16,9 ± 1,0	2	16
*Treonina	26,5 ± 1,0	3	28
Alanina	33,0 ± 0,8	4	34,3
*Valina	46,0 ± 1,1		
Tirosina	50,0 ± 1,2		
*Leucina	56,7 ± 1,3	5	56,3
Prolina	59,5 ± 1,1		
*Fenilalanina	64,0 ± 2,8		
*Triptofano	66,7 ± 1,5		

^aSolvente I: cloroformo – metanol - amoníaco (40:40:20); Solvente II: Fenol - agua 80 %.

*Aminoácido esencial.

^bPromedio de dos determinaciones.

tre sí, e inferior a 3,96 mg que se estimó contenido en cada una de las manchas desarrolladas por los aminoácidos patrones revelados. Esto, considerando que el tamaño de las manchas reveladas aumenta con la cantidad del compuesto en ellas contenido, aunque no linealmente (14). Los aminoácidos revelados, menos serina, son predominantes en el hidrolizado ácido de la pulpa de la guayaba *Cattley* de piel amarilla (8); mientras que solo dos son comunes a la guayaba madura de Egipto, serina y treonina (12). Probablemente haya más aminoácidos en los 10 ml de la solución del residuo seco resuspendido

expuesto a la cromatografía bidimensional, no revelados porque sus cantidades sean muy pequeñas, inferiores a 0,1 mg (5).

El análisis de los hidrolizados de las fracciones de proteínas en algunas especies de frutas ha revelado mucho de los aminoácidos presentes en estado libre en la pulpa, lo inverso podría ser cierto (9) y si es así, sería una ventaja no requerir 24 horas de hidrólisis de proteínas ni de las consideraciones sobre la inestabilidad a esta hidrólisis del triptofano, glutamina y asparagina (8) para evaluar el aporte de aminoácidos de la fracción proteica.

Agradecimiento

Los autores agradecen al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) de la Universi-

dad Central de Venezuela, proyecto individual N° 03-32-4042-99.

Literatura citada

1. Aranda, A., A. Casas y J. Royo Iranzo. 1969. Detección de adulteraciones en zumos cítricos. XVI. Cromatogramas característicos de los aminoácidos del zumo de diversas especies y variedades de frutas cítricos. A. T. A. 9 (4): 586 -599.
2. Bergana, M., J. Holton, I. Reyzer, M. Snowden, J. Baxter y V. Pound. 2000. NMR and MS Analysis of Decomposition Compounds Produced from N-acetyl-L-glutamine at Low pH. J. Agric. Food Chem. 48 (12): 6003-6010.
3. Burroughs, L. F. 1970. Amino Acids. En: The Biochemistry of fruits and their products. Food Science and Technology. A Series of Monographs. Edited by A.C. Hulme. Academic Press. INC. London. Vol. I. p.119 - 146.
4. COVENIN. 1981. Norma Venezolana 1769. Frutas. Toma de muestras. Ministerio de Fomento. Caracas, Venezuela. p. 1 - 7.
5. Domínguez, X. A. 1982. Cromatografía en papel y en capa delgada. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, OEA. Programa regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. 2ª Edición. Washington, D. C. p. 2,3,4,36,57.
6. Duggan, C., J. Gannon y W. Walker. 2002. Protective Nutrients and Functional Foods for the gastrointestinal tracts. Am. J. Clin. Nutr. 75: 789 - 808.
7. Dutra de Oliveira, J. E. y J. Sergio Marchini. 2001. Ciências Nutricionais. 2ª reimpressão. Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda. pág.: 45, 46, 47 y 48.
8. Hall, N. T., J. M. Smoot, R. J. Knight Jr. y S. Nagy. 1980. Protein and Amino acids composition of ten tropical fruits by Gas - Liquid Chromatography. J. Agric. Food Chem. 28 (6): 1217 - 1221.
9. Hansen, E. 1970. Proteins. En: The Biochemistry of fruits and their products. Food Science and Technology. A series of monographs. Vol. I. Edited by A. C. Hulme. Academic Press. INC. London. Vol. I. p: 147 - 158.
10. Kanner, J., J. Fishbein; P. Shalom; S. Harel y I. Ben-Gera. 1982. Storage Stability of Orange Juice Concentrate Packaged Aseptically. J. Food Sci. 47 (2): 429 - 431 y 436.
11. Morales R., V. E. y M. Rodríguez G. 2001. Descripción del sistema reproductivo de la guayaba en Venezuela. En: Desarrollo Tecnológico de la guayaba en Venezuela. Seminario Internacional de Guayaba y su agroindustria. Barbosa - Colombia <http://www.pronatta.gov.co/cursos/20guayaba/mariavictoriamorales.htm>
12. Sharaf, A. y S. S. El-Saadany, 1987. Biochemical studies on guava fruits during different maturity stages. Chem. Mikro. Technol. Lebens. 10 (5 / 6): 145-149. FSTA. 1989. N° 2. J0044.
13. Smith, I. y J. G. Feinberg. 1979. Cromatografía sobre papel y capa fina. Electroforesis. Editorial Alambra. Madrid. p. 65-66, 69, 73,163-164, 208-209.
14. Stahl, E. y H. K. Mangold. 1975. Techniques of Thin Layer Chromatography. En: A Laboratory

- Handbook of Chromatography and Electrophoretic Methods. Edited by Heftmann, E. 3th Edition. Van Nostrand Reinhold Company. P. 164–188.
15. Vasconcellos, J. A. 2002. Alimentos funcionales. Conceptos y Beneficios para la Salud. The world of Food Science. IFT. <http://www.worldfoodscience.org>.
 16. Wu, G. y C. Meininger. 2000. Arginine Nutrition and Cardiovascular Function. *J. Nutr.* 130: 2626–2629.
 17. Ziegler, T. 2001. Glutamine Supplementation in Cancer patients Receiving Bone Marrow Transplantation and High dose Chemotherapy. *J. Nutr.* 131: 2578S-2584S.