



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

**Métodos analíticos para la determinación de
vitamina C en alimentos**

Autor: Zhongwei Fang

Tutor: Prof. Dra. Ana Isabel Olives Barba

Convocatoria: Junio 2017

Índice

Resumen

1. Introducción	4
2. Objetivos	7
3. Metodología	7
4. Resultados y discusión	7
5. Conclusiones	18
6. Bibliografía	19

Resumen

La vitamina C o ácido ascórbico (AA) es un nutriente esencial en la dieta humana. Por su importancia para la vida, es importante desarrollar metodologías analíticas para su determinación. Estos métodos pueden ser:

Enzimáticos: Este método utiliza una enzima peroxidasa que cataliza la hidroperoxidación de la p-fenilendiamina (PPDA) a través de una forma semiquinoide reversible a un producto de condensación coloreado. El AA interrumpe la formación del producto coloreado por la reducción del semiquinoide.

Químicos: Están basados en la medida de la capacidad reductora del AA, entre ellas, la valoración iodimétrica y el método del indofenol, que se basa en la reducción del 2,6-diclorofenolindofenol.

Electroquímicos: (voltamperométricos) Basados en la determinación del potencial de oxidación del AA en soluciones ácidas. Se están desarrollando sensores electroquímicos que ofrecen una mayor especificidad.

Espectroscópicos: (espectrofotométricos y fluorimétricos) Los métodos espectrofotométricos pueden ser directos ya que el AA presenta un máximo de absorción a 260 nm, o bien con indirectos basados en la reacción del AA con 4-metoxi-2-nitro anilina, y el producto obtenido tiene un máximo de absorción a 570 nm. Este método es altamente específico y presenta menos interferencias. También se puede utilizar otros reactivos como 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) o 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). **Fluorimétricos:** El AA se oxida a ADA y reacciona con un marcador fluorogénico (o-fenilenediamina (PDA)), formando un complejo fluorescente.

Cromatográficos: Se utiliza el método de la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con distintos detectores. Es un principal método analítico utilizado los detectores UV-VIS/DAD, fluorimétrico y MS para la determinación de vitamina C.

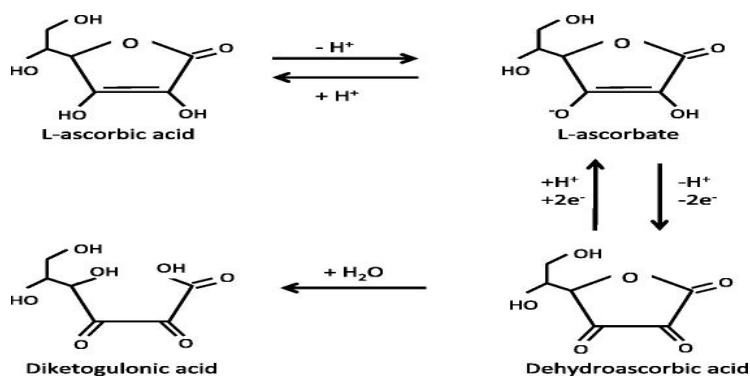
1. Introducción

La vitamina C o ácido L-ascórbico (AA), es una vitamina hidrosoluble que actúa como cofactor en diversas reacciones enzimáticas que tienen lugar en el organismo. Es sintetizada internamente por casi todos los organismos de los animales y plantas, excepto el hombre. Por ello es un nutriente esencial para el ser humano. El hombre carece de la enzima L-gulonolactona oxidasa debido a un defecto genético, esta enzima cataliza la etapa terminal de la síntesis de ácido ascórbico que convierte la glucosa en ácido ascórbico, por lo que debe adquirirlo a través de la alimentación.

1.1. Características químicas

La vitamina C puede presentarse en dos formas químicas interconvertibles: ácido ascórbico(2,3-enediol-L-gulona-1,4-lactona)(AA) y ácido dehidroascórbico (2,3-dicetogluonato)(ADA), siendo ambas formas funcionales biológicamente y manteniéndose en equilibrio fisiológico. Si el ácido dehidroascórbico sufre hidrólisis se transforma en ácido dicetogulónico, no activo biológicamente, siendo esta transformación irreversible (Figura 1). La hidrólisis ocurre espontáneamente en disolución neutra o alcalina.

Figura 1: Reacciones de oxidación e hidrólisis del AA.



La vitamina C es un compuesto inestable, debido a la facilidad con la que se oxida e hidroliza. Se descompone con facilidad en el procesamiento y conservación de los alimentos, por lo que se utiliza como indicador de la pérdida vitamínica de un alimento durante su procesamiento y almacenamiento. Por otra parte, el calor y los cationes metálicos degradan la vitamina C.

1.2. Importancia de la vitamina C en el ser humano

El ácido ascórbico es esencial para la síntesis del colágeno, en concreto actúa como coenzima en la síntesis del pro-colágeno favoreciendo la hidroxilación de los residuos de prolina y lisina. En este sentido, la vitamina C es importante para el mantenimiento del tejido conjuntivo normal, para la curación de heridas y para la formación del hueso, ya que el tejido óseo contiene una matriz orgánica con colágeno. También interviene en la síntesis de lípidos, proteínas, norepinefrina, serotonina, y en el metabolismo de tirosina y fenilalanina, etc.

En su condición de agente reductor, el ácido ascórbico participa en los sistemas redox del organismo; ayuda a la absorción del catión hierro(II) a través de las mucosas gástrica y duodenal; protege la vitamina A, vitamina E y algunas vitaminas B de la oxidación; también favorece la utilización del ácido fólico ayudando a la conversión del folato en tetrahidrofolato o mediante la formación de derivados poliglutamato del tetrahidrofolato. Finalmente, la vitamina C es un antioxidante biológico que protege al organismo del estrés oxidativo provocado por las especies reactivas del oxígeno.

La vitamina C es ampliamente utilizado en el tratamiento de ciertas enfermedades, como el escorbuto, el resfriado común, la anemia, los trastornos hemorrágicos, trastornos de la cicatrización de heridas e infertilidad. Además, previene las cataratas y glaucoma.

1.3. Enfermedades relacionadas con la ingesta de vitamina C

La deficiencia de la vitamina C causa el escorbuto. Se observan heridas, hemorragias, osteoporosis y anemia, debido a que impide la formación de colágeno en el endotelio de los vasos sanguíneos y se incrementa la fragilidad de los capilares y disminuye el contenido de colágeno en la matriz orgánica del tejido óseo.

La ingesta prolongada de esta vitamina puede producir la formación de cálculos de oxalato en el tracto urinario.

1.4. Fuentes de vitamina C

La vitamina C se encuentra principalmente en alimentos frescos de origen vegetal (frutas y hortalizas) y, en menor medida, alimentos de origen animal. Entre los alimentos de origen vegetal como los cítricos (naranjas, limones, limas y pomelos), kiwi, fresas, brócoli y lechuga etc, que son fuente natural de vitamina C, y de origen animal como hígado, leche y productos lácteos, etc.

Ingesta Dietética (Diaria) Recomendada o recommended Dietary Allowances (RDA) de vitamina C: la RDA de vitamina C para niños 45 mg/día; para adultos 60 mg/día y para embarazadas 70 mg/día (Guía de alimentación y salud de UNED). En la tabla 1 se recogen los principales alimentos con un contenido mayor de vitamina C.

Tabla 1: Contenido de vitamina C en alimentos.

Grupo de alimento		Alimentos	[Vitamina C]*
Verduras y hortalizas	Verduras frescas	Brécol	100
		Pimiento rojo	139
		Pimiento verde	107
	Conservas	Pimiento morrón	81
	Algas y derivados	Alga laver cruda	39
Frutas	Frutas frescas	Fresa y fresón	54,9
		Grosella negra	177
		Guayaba	273
		Limón	51
		Naranja	50,6
	Derivados de frutas	Mermelada de fresa	49,2
	Zumos naturales	Zumo de naranja	39
Lácteos y derivados	Leche	Leche de oveja	4,3
		Leche entera en polvo	11
Carnes y derivados	Visceras	Hígado de vaca	32
		Pulmón de ternera	38,5
Bebidas	Zumos y néctares comerciales	Zumo de naranja	30,5
		Zumo de pomelo	36
Aperitivos		Aceituna negra	20
Condimentos y salsas	Condimentos	Guindilla picante	144
		Perejil	161
	Salsas	Mostaza	52,5

*Contenido de vitamina C por 100 gramos de porción comestible (mg/100 g)

2. Objetivos

- 2.1 Conocer el papel fisiológico de la vitamina C en el ser humano.
- 2.2 Revisión de los métodos analíticos para la determinación de vitamina C.

3. Metodología

Se ha realizado una búsqueda bibliográfica en distintas bases de datos (Med-line, Google-Scholar,etc), y otros medios (biblioteca de la Facultad de Farmacia, biblioteca de los Departamentos de Química Analítica y Nutrición y Bromatología II).

4. Resultados y discusión

A continuación se describen los distintos métodos analíticos para la determinación de vitamina C.

4.1. Métodos cualitativos o semicuantitativos

4.1.1. Determinación iodimétrica

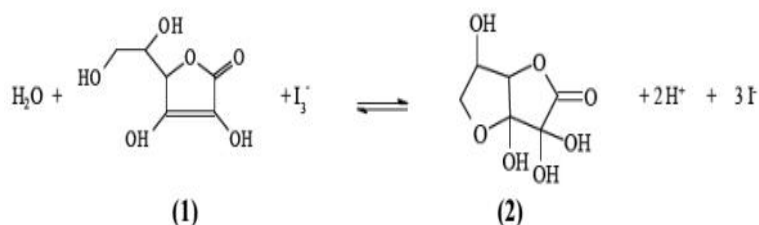
Se basa en la oxidación del AA con I_3^- (triioduro) en presencia de almidón (indicador). El yodo forma un complejo azul con el almidón, al reaccionar el I_2 con el AA se observa una disminución en la intensidad del color en la disolución.

Cuando el yodo se disuelve en una disolución de yoduro de potasio, se forman iones polinucleares I_3^- que se introducen en la hélice de amilosa formando un complejo coloreado(azul-negro). Al reaccionar el complejo yodo-amilosa con ácido ascórbico, la disolución indicadora pierde el color. Esto se debe a que ácido ascórbico (1) es oxidado por un oxidante suave como la disolución de yodo para dar lugar a ácido dehidroascórbico (2) y a iones yoduro (Figura 2).

Cuanto menor es la intensidad del color, significa que mayor será el contenido de vitamina C. Se preparan distintos patrones de vitamina C en un intervalo de concentración a los que se le añade la misma cantidad de I_3^- y almidón. La muestra a analizar se prepara de igual forma que los patrones y se compara la intensidad del color

con la de los patrones, determinando su concentración de forma aproximada (determinación semicuantitativa).

Figura 2: Reacción de oxidación de AA con I_3^-



4.1.2. Determinación basada en azul de metileno

Este método se fundamenta en que el AA reduce al azul de metileno, volviéndose incoloro.

4.1.3. Espectrofotometría cualitativa

La espectrofotometría directa se basa en que el AA presenta un máximo de absorción a 260 nm, utilizando este procedimiento para la determinación de la vitamina C en zumo de limón y naranja.

La espectrofotometría indirecta se utiliza para la determinación del ácido ascórbico que mediante un compuesto coloreado formado por ácido ascórbico.

Se utiliza el reactivo amino (reactivo 4-metoxi-2-nitro anilina) que reacciona con el AA formando un compuesto coloreado. Luego utilizamos el espectrofotómetro con una longitud de onda de 570 nm para medir la absorbancia de este compuesto.

Si la lectura de absorbancia tiene un valor positivo, significa que existe la vitamina C. También podemos comparar los resultados de absorbancia de distintas marcas de zumo, cuando mayor absorbancia sea, mayor cantidad de vitamina C tiene.

4.2 Métodos cuantitativos

4.2.1. Enzimáticos

Este método utiliza un enzima peroxidasa. La peroxidasa cataliza la hidroperoxidación de la p-fenilendiamina (PPDA) a través de una forma semiquinoide reversible a un producto de condensación coloreado. El AA interrumpe la formación del producto coloreado por la reducción del semiquinoide. Después de que todo el AA se oxida, se forma el producto coloreado por la oxidación de semiquinoide catalizada por peroxidasa. Se mide el intervalo de tiempo desde el inicio de la reacción hasta la aparición del producto coloreado mediante un espectrofotómetro o colorímetro. El intervalo de tiempo necesario para el desarrollo de color es proporcional a la concentración de AA e inversamente proporcional a la actividad enzimática en la mezcla de reacción. Es un método sencillo utilizado para cuantificar los niveles de AA en zumos de cítricos.

4.2.2. Espectroscópicos

4.2.2.1. Espectrofotométricos indirectos

La espectrofotometría indirecta sirve para la determinación de vitamina C en los alimentos, un método adecuado es el de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). Este método se basa en dos reacciones:

1) Ácido ascórbico se oxida al ácido dehidroascórbico por la acción de solución de bromo

2) Ácido L-dehidroascórbico reacciona con DNPH y produce una osazona que en tratamiento con 85% ácido sulfúrico forma una disolución coloreada roja. La coloración de DNPH depende de la concentración de AA añadida.

Se determinan las absorbancias de los distintos patrones y de la muestra problema a 521 nm. Con dichas absorbancias se construye una recta de calibrado. Esta recta de calibrado cumple la ley de Lambert-Beer ($A = \epsilon \cdot b \cdot c$). (Figura 3.1)

Figura 3.1: Recta de calibrado

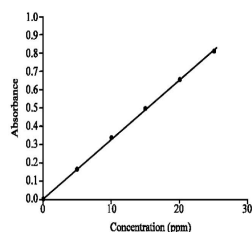
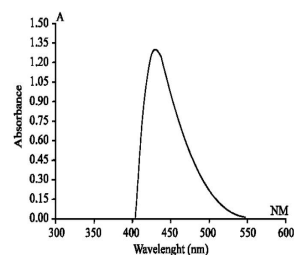


Figura 3.2: Espectro de DNPH-glucosa



Por tanto, conociendo la absorbancia de la muestra problema, se puede calcular la concentración de osazona que es proporcional a la concentración de ácido ascórbico. En este método existen interferencias. Por ejemplo, las interferencias de ácido dicetogulónico y glucosa extraída. El ácido dicetogulónico es un producto de la hidrólisis del ácido dehidroascórbico. Como el ácido dicetogulónico tiene un grupo cetona, puede reaccionar con DNPH formando osazona. Por eso, se produce un error en la determinación, pero actualmente no afecta los resultados de ácido ascórbico. Por otro lado, la glucosa también se puede extraer con ácido metafosfórico, y tiene estructura similar al ácido ascórbico pudiendo reaccionar con DNPH. En figura 3.2, la glucosa no interfiere mucho los resultados, ya que a 521 nm el complejo de DNPH-glucosa no absorbe.

También existen otros reactivos, como 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). Se basa en la reducción del radical DPPH por los antioxidantes de la muestra. Se puede cuantificar la solución del AA. El radical DPPH es estable y tiene una coloración púrpura que se pierde progresivamente cuando se añade los antioxidantes. Se absorbe a 515 nm. En general, la reacción se puede medir a algunos minutos del inicio mediante el espectrofotómetro, ya que en este intervalo, la mayoría de sustancias reacciona con el DPPH. Es un método rápido y sencillo, pero sólo puede disolverse en medio orgánico.

4.2.2.2. Fluorimétrico

El método fluorimétrico se aplica en la determinación cuantitativa de vitamina C. Tiene mayor sensibilidad que otros métodos. Además, este método es adecuado para la determinación de vitamina C en muestras coloreadas, por ejemplo, tomate.

La determinación del AA requiere su oxidación a ADA, luego se añade o-fenilenediamina (PDA) (marcador fluorogénico) a la solución de muestra para producir un derivado de quinoxalina fluorescente que presenta $\lambda_{exc} = 360$ nm y $\lambda_{em} = 430$ nm. Se mide la intensidad de fluorescencia formada mediante un fluorímetro, obteniendo la relación entre la intensidad de fluorescencia y la concentración de vitamina C. Este proceso puede evaluar AA y ADA simultáneamente en la muestra. Ambos procesos, conjunto con un método fluorimétrico semiautomatizado basado en la reacción fluorescente de vitamina C y PDA en un sistema de inyección de flujo, son métodos de AOAC de referencia. La preparación de muestra requiere la maceración o extracción de vitamina C de muestras y su estabilización con ácido metafosforico o ácido trifluoroacético.

4.2.3. Cromatografía líquida de alta eficacia(HPLC) en fase inversa

La cromatografía líquida de alta eficacia es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la fase estacionaria y la fase móvil empleadas. Se emplea para la determinación de vitamina C en distintos alimento. Se utiliza columna C_{18} y una precolumna RP-18 para la fase estacionaria, y la fase móvil se utiliza ácido sulfúrico para llevar un pH 2,2. La velocidad de flujo es 0,4 mL/min, y detector de UV-VIS a 225 nm para vitamina C. También se puede utilizar otros detectores, por ejemplo, el detector de DAD (Diode Array Detector); la detección fluorimétrico y espectrométrico de masas (MS).

La detección de HPLC-UV-VIS / DAD es utilizada para la determinación del AA y vitamina C total (AA+ADA). Por ejemplo, después de la reducción de ADA con ditiotreitol (reductor) en judías verdes.

La detección fluorimétrica es más sensible, específica y presenta mayor rango lineal.

La detección espectrométrica de masas está basada en la obtención de iones a partir de moléculas en fase gaseosa, una vez obtenidos estos iones, se separan en función su relación masa/carga (m/z). Esta detección mejora la sensibilidad y la

selectividad del análisis acoplada HPLC. El modo de ionización en MS es ionización por electrospray (ESI) a presión atmosférica.

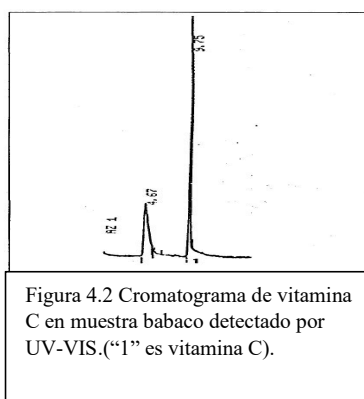
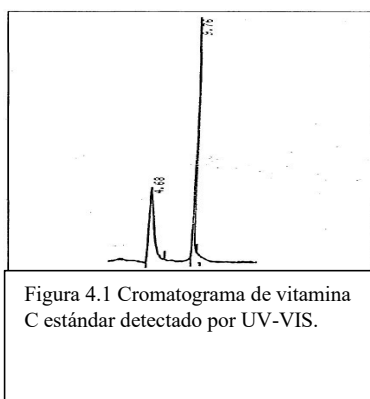
Tiene en cuenta los parámetros importantes en HPLC.

1-Factor de retención: es la relación entre el tiempo que permanece un soluto en la fase estacionaria y en la fase móvil. La fórmula es $k' = \frac{t_R - t_m}{t_m}$ donde t_R es tiempo de retención, t_m es tiempo muerto o tiempo que tarda en recorrer el sistema cromatográfico una sustancia que no interacciones con la fase estacionaria.

2- Selectividad: es un parámetro de la retención relativa entre dos solutos de la muestra problema. La fórmula es $\alpha = \frac{t_{R2} - t_m}{t_{R1} - t_m}$

3- Resolución: es uno de lo más importantes al ser la cromatografía una técnica de separación. La fórmula es $R = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{(W_2 + W_1)/2}$ donde w es anchura de pico.

4- Eficacia: es el término utilizado para describir la capacidad potencial de separación de la columna.



En la figura 4 se muestran los cromatogramas de las muestras patrón y problema, Del cromatograma se obtienen los t_R y t_m de muestra patrón, además medimos altura y anchura de los picos 1 para calcular área de los picos.

Se identifica la vitamina C comparando el t_R del patrón con el t_R de la muestra problema.

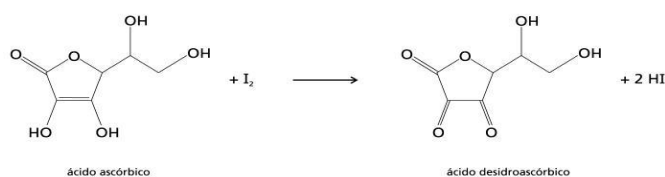
En el análisis cuantitativo se calcula el área de los picos 1, conociendo la concentración de muestra estándar, se puede calcular la concentración de vitamina C de la muestra problema. Según la fórmula:
$$\frac{A_e - C_e}{A_p - C_p} \rightarrow C_p = \frac{A_p \times C_e}{A_e} \quad (A = \frac{1}{2} \times w \times h,$$
 h: altura de pico, w: anchura de pico) donde A_e es área de pico 1 de muestra patrón, C_e es la concentración de muestra patrón, A_p es área de muestra problema. Así se conoce la cantidad de vitamina en nuestra muestra.

Además se puede calcular el factor de retención de vitamina C, a partir de t_R y t_m de muestra patrón de vitamina C, a través de la fórmula $k' = \frac{t_R - t_m}{t_m}$, se sale el valor de k' , con el fin de optimizar la separación.

4.2.4.1. Determinación iodimétrica cuantitativa

El fundamento de este método es el yodo reacciona con suspensión de almidón que presenta el AA, hasta dando el color azul-negro. Cuando existe el AA que es un antioxidante, se oxida por el yodo (I_2) formando el ácido dehidroascórbico. Por lo tanto, una mezcla de almidón y ácido ascórbico se titula con solución de lugol (I_2), cambiando el color a azul-negro que significa ya no existe ácido ascórbico. Se realiza por titulación con solución de lugol según la siguiente reacción:

Figura 5: Reacción de AA con yodo.



Se anota el volumen gastado de yodo para calcular la concentración de AA. Y en esta titulación, se determina sustancias reductoras totales en la solución. Por tanto, tenemos en cuenta que las muestras pueden existir otras sustancias reductoras, que afectan los resultados. Cuando existe otras sustancias reductoras, se aumenta el gasto de yodo, pues el resultado de ácido ascórbico sobrestimado. Además el almidón se hidroliza con facilidad y uno de los productos de la hidrólisis es la glucosa, la cual tiene carácter reductor, pues, una disolución de almidón parcialmente hidroliza puede ser una

fuente de error en una titulación redox. Y la vitamina C es una sustancia oxidada fácilmente por el aire, por eso, las soluciones que contienen vitamina C deben ser preparadas inmediatamente antes de ser tituladas, con el fin de obtener resultados fiables. Por otro lado, la detección del punto final no es sencilla, porque se interviene con la coloración de las muestras utilizados. Por lo tanto, se puede corregir repitiendo las titulaciones y cuidado con los ojos.

4.2.4.2. Método del indofenol

Este método volumétrico sirve para la determinación de vitamina C en zumos, utilizando el reactivo 2,6-diclorofenolindofenol. El ácido ascórbico se determina por valoración con el colorante 2,6-diclorofenolindofenol que es reducido por el ácido ascórbico a una forma incolora en medio ácido. La forma oxidada del reactivo es rojo en medio ácido y la reducida incolora.

Figura 6: Reacción de AA con 2,6-diclorofenolindofenol



Este método no se puede aplicar para las preparaciones que contienen iones como Fe(II); Sn(II); Cu(I) y SO_3^{2-} , etc y las preparaciones de hígado. Por eso, se aplica este método para los extractos incoloros o débilmente coloreados de las frutas cítricas que no contienen los minerales. Pero se puede añadir EDTA para eliminar la interferencia del hierro II.

4.2.5. Electroforesis capilar

La electroforesis capilar es una técnica analítica que utiliza capilares de sílice fundida junto con altos campos eléctricos (1-30 kv), proporcionando separaciones rápidas y con eficacias elevadas. Pero su poca sensibilidad es una de las mayores limitaciones, ya que, se requieren métodos que permitan alcanzar bajos límites de detección. La causa principal de esta baja sensibilidad es el pequeño volumen de

muestra introducido en el capilar. Debe concentrar la muestra antes de analizar por electroforesis capilar. Se detecta por UV-VIS, fluorimétrico o MS.

Es una técnica más compleja y precisa utilizada para la determinación de AA juntos con otros ácidos orgánicos, como ácido oxálico, malico y cítrico etc.

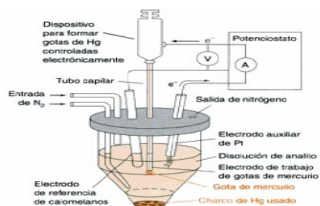
4.2.6. Voltamperometrías

El método electroquímica de determinación de la vitamina C se basa en la reacción redox que produce una transferencia de electrones entre moléculas, y provoca una diferencia de potencial eléctrica. El AA actúa como agente reductor, y en soluciones tienden a ser fácilmente oxidado sobre la superficie de un electrodo. Se mide esta diferencia de potencial eléctrica mediante los instrumentos potenciométricos, voltamétricos y amperométricos.

4.2.6.1. Polarografía

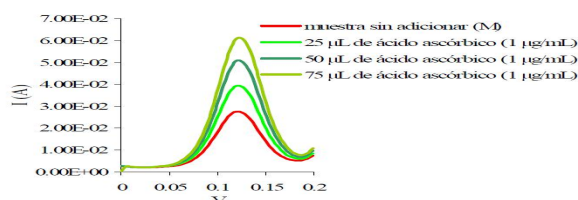
La polarografía es una medida voltamperométrica cuya respuesta está determinada por el transporte combinado de masa difusión/convección. Es el método en el cual se utiliza el electrodo de gota de mercurio como indicador. La representación gráfica de la intensidad de corriente en función del potencial aplicado a una celda electrolítica se denomina polarograma. En este método se mide la corriente que circula en la celda en función del potencial del electrodo de trabajo, ya que esta corriente suele ser proporcional a la concentración del analito. Se necesita tres electrodos en una disolución que contiene el analito, siendo el electrodo de trabajo una gota de mercurio suspendida del extremo de un tubo capilar de vidrio y en cuya superficie (gota de mercurio) el analito puede ser oxidado o reducido. La determinación del ácido ascórbico por polarografía tiene las ventajas de rapidez, sensibilidad y bajo coste. Pero tiene en cuenta el mercurio que es tóxico.

Figura 7: Aparato de polarografía que presenta un electrodo de trabajo de gota de mercurio.



La siguiente figura es el polarograma de una muestra de zumo mezcla de naranja-zanahoria con sus respectivas adiciones.

Figura 8: Polarograma de zumo mezcla de naranja-zanahoria



Luego hace una curva de calibrado que relaciona las concentraciones de ácido ascórbico(C) con la intensidad de corriente eléctrica (I) para determinar la concentración de ácido ascórbico de la muestra problema.

4.2.6.2. Sensores electroquímicos

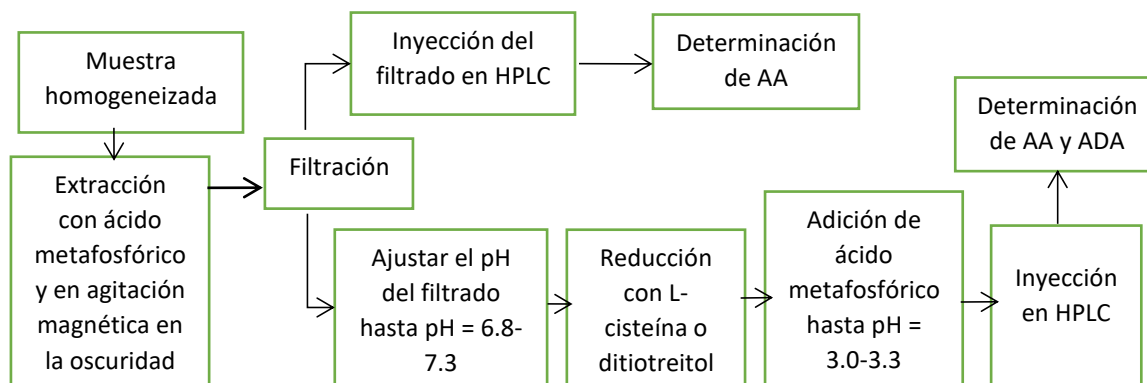
Se están desarrollando sensores electroquímicos para la determinación de vitamina C. Por ejemplo:

Un sensor electroquímico utiliza un electrodo de carbono vítreo (GCE) modificado con nanopartículas Mn-SnO₂. Es un sensor electroquímico altamente sensible y selectivo basado en nanopartículas de SnO₂ dopadas con Mn. El Mn-SnO₂/GCE presenta una actividad electrocatalítica excelente hacia la oxidación de AA en solución tampón fosfato (pH=6,0) y la señal electroquímica correspondiente ha aparecido un pico de oxidación bien resuelto.

Otro sensor electroquímico se utiliza un nanocompuesto de nanotubo de carbono de NiO-multipared (NiO/MWCNTs (electrodos de carbono vítreo modificados con nanotubos de carbono)) y 1-butil-3-metilimidazolio tetrafluoroborato (Bmim BF₄) en la matriz de pasta de carbono. Es un sensor de alta sensibilidad para voltametría de la determinación de vitamina C.

Una vez he revisado los principales métodos analíticos de determinación de contenido de vitamina C previo a su utilización, se debe realizar una extracción de este analito para su adecuación a la técnica escogida. A modo del ejemplo en la figura 9, se muestra un esquema de pre-tratamiento, limpieza y purificación de vitamina C, para su análisis espectrofotométrico o cromatográfico.

Figura 9: Pre-tratamiento, limpieza y purificación para la extracción de vitamina C



La tabla 2 resume los distintos métodos recogidos en esta memoria y en la tabla 3 se muestran algunas aplicaciones de determinación de vitamina C en alimentos.

Tabla 2. Los métodos analíticos para la determinación de vitamina C

Tipos de métodos	Métodos	Descripción
Enzimáticos	Enzimático	Peroxidasa cataliza la hidroxidación reversible de la forma semiquinona de p-fenilendiamina (PPDA), formando un producto coloreado. Y el AA interrumpe la formación del producto coloreado.
Químicos	Iodimétrico	AA reacciona con yodo en presencia de almidón.
	Método de indofenol	La reducción del 2,6-diclorofenolindofenol por AA.
	Solución de azul de metileno	Por la actividad reductora de AA.
Electroquímicos	Voltamperométrico	Sensores electroquímicos.
Electroforesis capilar	Electroforesis capilar	Detector UV-VIS, fluorimétrico o MS.
Espectroscópicos	Espectrofotométrico directo	A λ_{max} 260 nm.
	Espectrofotométrico indirecto	Formación de un compuesto coloreado, o con DNPH ó DPPH.
	Fluorimétrico	Derivatización fluorogénica con PDA
Cromatográficos	HPLC	HPLC- UV-VIS/DAD
		HPLC- fluorimétrico
		HPLC- MS

Tabla 3: Las aplicaciones de los métodos analíticos para la determinación de vitamina C en alimentos.

Métodos analíticos		Analitos	Tipos de alimentos	Referencias
Enzimático		AA	Zumo cítricos.	28.
Iodimétrico		AA	Zumo o bebida de frutas frescas.	19.23.
Método de indofenol		AA	Extractos incoloros o débilmente coloreados de las frutas no contienen los minerales.	1.5.10.16. 20.
Solución de azul de metileno		AA	Alimentos que contienen vitamina C.	27.
Voltamperométrico o potenciométrico		AA	Alimentos sólidos y líquidos. Algunas frutas frescas o procesadas.	3.4.9.14.20.
Electroforesis capilar		AA	Alimentos que contiene alta proporción de vitamina C.	1.12.
Espectrofotométrico directo		AA	Alimentos que contienen vitamina C.	27.
Espectrofotométrico indirecto		AA,ADA	Alimentos que contienen vitamina C.	1.2.13.15. 20.
Fluorimétrico		AA,ADA	Alimentos que contienen vitamina C.	1.17.20.22. 27.
HPLC	HPLC- UV-VIS/DAD	AA,ADA	Judía verde, frutas y vegetales frescas, bebidas de frutas, leche de humano, vinos.	1.6.7.8.11. 16.20.25.
	HPLC- fluorimétrico.	AA,ADA	Leche, zumo de frutas, frutas y vegetales.	1.6.
	HPLC- MS	AA,ADA	Frutas y vegetales.	1.6.

5. Conclusión

La vitamina C es una sustancia imprescindible en la vida. Por un lado, es esencial para mantener la función normal del organismo. Se utiliza para tratar y prevenir el escorbuto, gripe e infecciones agudas o crónicas, etc. Además el ácido ascórbico es importante para la cicatrización de los tejidos y la formación de colágeno. Por otro lado, la vitamina C es un aditivo alimentario actúa como antioxidante. Por tanto, la vitamina C es necesaria para salud humana, y que mayor utilizado en la industria alimentaria y farmacéutica.

Por la importancia de la vitamina C, desarrollando las técnicas para su determinación. En la realidad, depende de cada caso, utilizamos distintos métodos adecuadamente. Los más utilizados son la cromatografía líquida de alta eficacia y la titulación volumétrica de óxido-reducción. Estos métodos utilizados para cuantificar el contenido de vitamina C de alimentos. La HPLC tiene su ventaja por ofrecer una gran precisión de los resultados, pero la técnica es cara. Sin embargo, la titulación volumétrica de óxido-reducción es más sencilla, rápida y barata. Pero no es muy precisa.

6. Bibliografía

1. A. I. Olives Barba, M. M. Cámara Hurtado, M. C. Sánchez Mata, V. F. Ruiz, M. L. Sáenz de Tejada. Application of a UV-vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and b-carotene in vegetables, *Food Chemistry*, 95 (2006), 328-336.
2. B. L. Fernandez Montoya. Evaluación de la concentración de ácido ascórbico en cocona (*Solanum sessiliflorum dunna*), por fotometría. (2016), Perú.
3. N.Lavanya, E. Fazio, F. Neri, A. Bonavita, S. G. Leonardi, G. Neri, C. Sekar. Electrochemical sensor for simultaneous determination of ascorbic acid, uric acid and folic acid based on Mn-SnO₂ nanoparticles modified glassy carbon electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 770 (2016), 23-32.
4. F. Khaleghi, Z. Arab, V. K.Gupta, M.R. Ganjali, P. Norouzi, N. Atar, M. L. Yola. Fabrication of novel electrochemical sensor for determination of vitamin C in the presence of vitamin B9 in food and pharmaceutical samples. *Journal of molecular liquids* 221 (2016), 666-672.
5. P. Glorio Paulet, D. Cámara Soto, T. Olortegui Pajuelo. Determinación de ácido ascórbico por titulación visual con 2,6-diclorofenolindofenol. (2015), Perú.
6. V. Spínola, E. J. Llorent-Martínez, P. C. Castilho. Determination of vitamin C in foods: Current state of method validation. *Journal of Chromatography A*, 1369 (2014), 2-17.
7. J. C. Castro Gomez, F. Gutiérrez Rodríguez, C. Acuña Amaral, L. A. Cerdeira, A. Tapullima Pacaya, M. Cobos Ruiz, S. A. Imán Correa. Variación del contenido de vitamina C y antocianinas en *Myrciaria dubia* "camu camu". *Rev. Soc. Quím. Perú* vol. 79(4) (2013).
8. S. I. Correea, L. B. Zamudio, V. S. Solís, C. O. Cruz. Contenido de vitamina C en frutos de camu camu *Myrciaria dubia*(H.B.K) Mc Vaugh, en cuatro estados de maduración, procedentes de la Colección de Germoplasma del INIA Loreto, Perú. *Scientia Agropecuaria* 2 (2011), 123-130.
9. D. A. Flores Maltos, J. S. Cortés, B. Valdivia Urdiales, C. N. Aguilar González. Uso de técnicas electroquímicas para evaluar el poder antioxidante en alimentos. *Investigación y Ciencia*, vol. 18. Núm. 49 (2010), 20-25.
10. K. I. Zago G, M. Y. García F, M. L. Di Bernardo, P. Vit, J. R. Luna, M. Gualtieri. Determinación del contenido de vitamina C en miel de abejas venezolanas por volumetría de óxido-reducción. *INHRR* vol. 41(1)(2010).
11. Y. Rodríguez Hernández; Y. Suárez Pérez; A. Izquierdo Castro. Validación del método por cromatografía líquida de alta resolución para ácido ascórbico en tabletas de producción nacional. *Rev Cubana Farm* vol 43(3)(2009).
12. L. L. Escalante. Determinación y cuantificación de vitaminas hidrosolubles en fármacos de uso veterinario y suplementos alimenticios por el electroforesis capilar. (2008), México.

13. A. Lacalle. Antioxidantes en alimentación: diferentes formas de expresar su actividad antioxidante. Tipos de unidades y métodos de análisis. (2007), Spain.
14. R. Ortíz, Y. Martínez, R. Hernández. Técnicas electroanalíticas Parte II voltamperometría. (2006), Mérida.
15. M.M. Rahman Khan, M.M. Rahman, M.S. Islam, S.A. Begum. A Simple UV-spectrophotometric Method for the Determination of Vitamin C Content in Various Fruits and Vegetables at Sylhet Area in Bangladesh. Journal of Biological Sciences 6 (2)(2006), 388-392.
16. Y. Hernández. M. Gloria Lobo, M. González. Determination of vitamin C in tropical fruits: a comparative evaluation of methods. ResearchGate, Food Chemistry, (2006), Spain.
17. L.Wang, L.Zhang, S.She, F. Gao. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. Vol 61(11-12)(2005), 2737-2740.
18. J. R. De Xammar Oro y M.C. Donnamaría. Acción farmacológica, biofísicoquímica y estructura dinámica de la vitamina C. Acta Farm. Bonaerense 25(1)(2006), 145-154.
19. Rebollo, C.; Hernández, V.; Carrieri, R.; Viera, M.; Salhá,B.; Sansone, S. y Rostani,S. Vitamina C : Una estrategia didáctica polifuncional. Enseñanza de la ciencias(Uruguay), 23(1) (2005), 133-140.
20. F. T.Verdú. Determinación de vitamina C y carotenoides en zumos de frutas y hortalizas frescos, tratados por calor o por pulsos eléctricos de alta intensidad(PEAI). (2005), Edita: Universidad de Valencia, Servicio de Publicaciones, Spain.
21. R. M. Ortega Anta, A. M. López Sobaler, A. M. Requejo Marcos, P. Andrés Carvajales. La composición de los alimentos herramienta básica para la valoración nutricional. Editorial Complutense. (2004), 16-47.
22. X.Wu, Y. Diao, C. Sun, J. Yang, Y. Wang, S. Sun. Talanta. Vol. 59(1)(2003), 95-99.
23. P.Ciancaglini, H. L. Santos, K. R.P. Daghasanli, G. Thedei Jr. Using a classical method of vitamin C quantification as a tool for discussion of its role in the body. Biochem. Mol. Biol. Edu, 29(2001), 110-114.
24. Harris DC. Análisis químico cuantitativo. 2ª edición. Editorial Reverté S.A. (2001).
25. M.A.Romero Rodriguez, M.L.Vazquez Oderiz, J.L.Hernandez, J.S.Lozano. Determination of vitamin C and organic acids in various fruits by HPLC. Journal of Chromatographic Science, vol, 30 (1992).
26. RDA de vitamina C: http://www2.uned.es/pea-nutricion-y-dietetica-I/guia/guia_nutricion/recom_vitaminas.htm
27. P. Cea Diez; J. Palacios Remondo. Vitamina C (ácido ascórbico y dehidroascórbico), azúcares y proteínas en zumo natural de uvas de variedades autóctonas de La Rioja.(1981).
28. B. Roe, J. H. Bruemmer. Estimation of ascorbic acid in orange juice by a chromometric method.(1974).