

COMPARACIÓN DE TÉCNICAS INSTRUMENTALES PARA LA DETERMINACIÓN DE VITAMINA C EN FRUTAS CÍTRICAS

COMPARISON OF INSTRUMENTAL TECHNIQUES FOR THE DETERMINATION OF VITAMIN C IN CITRUS FRUITS

Adrián Ayala V.^{1*}, Carolle Rohim D.¹, Nedys Ramos M.¹, Ana Luzcando G.¹, Irene Ortega L.¹

<https://doi.org/10.52109/cyp2021219>

¹ Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad Tecnológica de Panamá

* adrian.ayala1@utp.ac.pa

REGISTROS

Recibido el

08/07/2021

Aceptado el

25/07/2021

Publicado el

31/07/2021



PALABRAS CLAVE

Cromatografía,
espectrofotometría,
vitamina C.

KEYWORDS

Chromatography,
spectrophotometry,
vitamin C.

RESUMEN

La vitamina C es una de las vitaminas hidrosolubles que se le ha prestado mayor importancia y estudio a lo largo de los años, por su relación a brindar grandes beneficios a la salud. Durante la pandemia de la Covid-19 una de las mayores recomendaciones era el consumo de vitamina C para contrarrestar los efectos del virus y fortalecer el sistema inmune, por su gran efecto antioxidante. La vitamina C se encuentra en diferentes alimentos como frutas y vegetales, sin embargo, se relaciona mayormente a frutas cítricas. El consumo de frutas cítricas es muy común en países tropicales debido a su facilidad de oferta en el mercado local. Muchos han sido los estudios relacionados a la determinación del contenido de vitamina C en diferentes tipos de alimentos utilizando variedad de técnicas. Este estudio realiza una revisión documental a través de diferentes fuentes de las técnicas instrumentales para determinación de vitamina c en frutas cítricas realizada por otros autores que han mostrado interés en el tema. Se realiza una comparación de las técnicas instrumentales utilizadas para la determinación de vitamina C, dando como resultado que las técnicas cromatográficas son las más utilizadas debido a su versatilidad y variedad de presentaciones, pero también se utilizan otras técnicas de igual importancia como las técnicas espectrométricas y volumétricas.

ABSTRACT

Vitamin C is one of the water-soluble vitamins that has been given greater importance and study over the years, due to its relationship to providing great health benefits. During the Covid-19 pandemic, one of the main recommendations was the consumption of vitamin C to counteract the effects of the virus and strengthen the immune system, due to its great antioxidant effect. Vitamin C is found in different foods such as fruits and vegetables, however, it is mostly related to citrus fruits. The consumption of citrus fruits is very common in tropical countries due to its ease of supply in the local market. There have been many studies related to the determination of the vitamin C content in different types of food using a variety of techniques. This study carries out a documentary review through different sources of the instrumental techniques for the determination of vitamin C in citrus fruits carried out by other authors who have shown interest in the subject. A comparison is made of the instrumental techniques used for the determination of vitamin C, resulting in those chromatographic techniques are the most used due to their versatility and variety of presentations, but other techniques of equal importance are also used, such as spectrometric and volumetric.

INTRODUCCIÓN

Las frutas y verduras son alimentos considerados de alto valor nutricional, debido a que son ricas en micronutrientes. La alimentación saludable debe estar compuesta en gran parte de frutas y verduras, es de conocimiento científico que una alimentación rica en frutas y verduras es beneficioso para evitar la generación de enfermedades no transmisibles (Diabetes, hipertensión, dislipidemias y otras).

La interacción alimentos-medicina está siendo considerada por parte de la comunidad científica como de vital importancia para la salud, estudios epidemiológicos in vitro y clínicos indican que una dieta a base de vegetales (frutas y verduras), puede reducir a la mitad el riesgo de enfermedades crónicas, especialmente del cáncer, conforme lo demuestra la revisión de 200 estudios epidemiológicos. [1]

La Vitamina C es una de las vitaminas esenciales en el ser humano, esto significa que no es generada por el organismo, así que debe ser obtenida por medio de la alimentación. La Vitamina C también conocida como ácido ascórbico (AA), fue descubierta debido a que su deficiencia produce una enfermedad llamada escorbuto, por ello también es llamada Vitamina Antiescorbútica. Sin embargo, a medida del paso de los años se ha encontrado sus grandes beneficios a la salud del hombre en general. Su principal beneficio como antioxidante, es el más estudiado y del que más conocimiento se tiene.

A través de los años se ha logrado explorar la posibilidad de validar procedimientos de evaluación de este analito mediante técnicas instrumentales de análisis en matrices alimentarias directas o a través de reacciones indirectas, específicamente espectrofotométricas, así como técnicas cromatográficas con diferentes aplicables con la meta final de reducir los tiempos de lectura y preparaciones de muestras incrementando el volumen de análisis, su aplicación para toma de decisiones en laboratorios industriales y de la mano con el aumento de la confiabilidad del análisis a través de la comparativa con respecto a las técnicas volumétricas, técnicas muy antiguas y de alta confiabilidad y evaluadas a través de procedimientos multivariante, lo cual ha brindado una alta aceptación en la industria alimentaria, así como de la comunidad científica.

El objetivo de este documento es realizar una revisión de las técnicas instrumentales utilizadas para la determinación de vitamina c en frutas cítricas.

En este artículo encontraremos una explicación sobre la Vitamina C, desde su definición y origen, así como su importancia, beneficios y los problemas asociados en el organismo de no ser consumida según las recomendaciones nutricionales.

Seguido de la definición y explicación funcional de la Vitamina C, explicaremos las diferentes técnicas instrumentales utilizadas para la valorización o determinación del analito en estudio y su aplicación, específicamente de las técnicas

cromatográficas, espectrométricas y volumétricas. Dicho análisis se ha realizado basado en investigaciones científicas recopiladas. Seguido de esto encontraremos una tabla comparativa entre las distintas técnicas finalizando con las conclusiones de la investigación, así como las referencias utilizadas para que el lector indague los conceptos específicos de interés.

Las Vitaminas

El término vitamina se le debe al bioquímico polaco Kasimir Funk quien lo planteó en 1912, consideraba que era necesaria para la vida (vita) y la terminación amina es porque creía que todas estas sustancias poseían la función amina ($-NH_2$). [2]

Las vitaminas son sustancias orgánicas esenciales en el metabolismo y necesarias para el crecimiento y buen funcionamiento del cuerpo.[3]. Las mismas, no son sintetizables por el organismo y están presentes en pequeñas cantidades en los alimentos. Las vitaminas no producen energía y por tanto no implican calorías. Intervienen como catalizador en las reacciones bioquímicas provocando la liberación de energía. En otras palabras, la función de las vitaminas es la de facilitar la transformación que siguen los sustratos a través de las vías metabólicas. [2]

Origen de la Vitamina C y su presencia en frutas cítricas

Albert Szent-Györgyi en el año 1930, en la Universidad de Szeged de Hungría, donde fue el jefe del Instituto de Química Médica de la Universidad de Medicina. Szeged es una de las regiones más prestigiadas de Hungría en la producción del famoso "paprika" húngaro (pimentón). Analizó un pimentón crudo en su instituto: encontró un contenido muy alto de su famoso ácido hexurónico, permitiendo el aislamiento de 3 kg de éste. Identificó los efectos biológicos de esta molécula que resultó ser la mundialmente buscada vitamina C. El nombre de "ácido ascórbico" se debe al efecto de la molécula en prevenir y tratar el escorbuto. Continuó también sus observaciones en el estudio del mecanismo de la respiración celular. Por estos descubrimientos fue galardonado con el premio Nobel de Medicina en 1937. La justificación oficial fue "por su descubrimiento relacionado con los procesos de combustión biológica, con especial referencia a la vitamina C y a la catálisis de los ácidos fumáricos". [4]

El género de frutas Citrus, comúnmente llamado cítrico, son las especies de grandes arbustos de la familia de las rutáceas cuyos frutos poseen un alto contenido en vitamina C y ácido cítrico, el mismo les otorga el sabor ácido que es característico de estas frutas.

Los cítricos ocupan un lugar singular en el reino vegetal, su anatomía presenta características únicas y ocupan una posición privilegiada en la dieta humana. [1]

Los efectos beneficiosos del consumo de frutos cítricos sobre la salud humana están basados en sus propiedades antioxidantes y anti- radical de los componentes de los

frutos cítricos como el ácido ascórbico, los flavonoides, carotenoides, antocianinas, los derivados del ácido cinámico, entre otros.[1]

Importancia de la Vitamina C y sus beneficios

La vitamina C o ácido ascórbico (2,3-enediol-L-gulona-1,4-lactona) es un micronutriente esencial en la alimentación del hombre al estar asociada a la síntesis de diferentes moléculas de importancia en la salud humana, y su efecto antioxidante, como lo evidencian diferentes estudios epidemiológicos y también protege al organismo del daño causado por los radicales libres. Los humanos no podemos sintetizar ácido ascórbico al carecer de una enzima denominada gulonolactona oxidasa. Las concentraciones en el plasma y leucocitos reflejan los niveles de la dieta y los depósitos corporales respectivamente de dicha vitamina. La vitamina C es poco estable, por eso su contenido en alimentos disminuye con el almacenamiento de larga duración, resulta inestable en soluciones neutras y alcalinas cuando se expone al aire, la luz y el calor. [3]

Existen dos importantes formas biológicas de vitamina C, la forma reducida o ácido ascórbico, y la forma oxidada, DHA (ácido dehidroascórbico). La mayor concentración de vitamina C se encuentra a nivel tisular por lo que es importante su transporte. La forma reducida o ácido ascórbico se transporta a nivel intracelular a través de los transportadores SVCTs (Sodium dependent vitamin C transporters). El ácido dehidroascórbico se transporta por los GLUT (transportador de la glucosa) por la semejanza química que existe entre la glucosa ($C_6H_{12}O_6$) y la vitamina C ($C_6H_8O_6$). [5]

La forma oxidada de vitamina C (DHA), una vez que alcanza el intracelular, sufre una reversión espontánea a su forma reducida o ácido ascórbico por la acción del glutatión. Si no se diera este proceso se formarían compuestos inactivos como el ácido 2,3- diketogulónico y posterior metabolismo a oxalato. Cuando el ácido dehidroascórbico ingresa a nivel mitocondrial, es importante su reducción a ácido ascórbico porque se requiere de mecanismos antioxidantes en respuesta a la fosforilación oxidativa mitocondrial. [5]

Existen varias fuentes que recomiendan sobre la cantidad de la ingesta diaria de vitamina C para diferentes grupos etarios. La FAO indica que debe ser 100 mg en adultos para alcanzar el nivel de saturación celular. Al establecer las cantidades de ingesta diaria de un nutriente y su valor diario adecuado (VDR) (60 mg para vitamina C) se puede determinar la dosis diaria de referencia (DDR) y decidir si un alimento contiene una cantidad alta ($\geq 20\%$) o baja ($< 5\%$) de un nutriente. Es necesario un aumento en la ingesta, superior a los niveles recomendados, cuando la persona está bajo estrés, fuma o toma ciertos medicamentos. [6]

Por otro lado, se ha reportado que la vitamina C posee una acción antiinflamatoria, asociada a la reducción en la secreción de citoquinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral, la interleucina-23 y la proteína C reactiva. La relación entre vitamina C y cáncer resulta ser bastante más compleja. El consumo de

vitamina C, así como el de otros antioxidantes tiene efectos benéficos en su prevención. Por otro lado, los individuos con cáncer suelen tener bajos niveles plasmáticos de vitamina C y menor respuesta a la suplementación.

Numerosos estudios epidemiológicos han observado que los individuos con los niveles más altos de AA plasmático presentan un menor riesgo de enfermedades cardiovasculares, aunque existe una alta variabilidad en los niveles plasmáticos reportados y controversia en los resultados. Por ejemplo, un estudio realizado en Dinamarca pudo determinar que un aumento de 20 μM en los niveles de AA plasmático provoca un 20% de reducción del riesgo de mortalidad por todas las causas y una reducción relativa del 9% en el riesgo de insuficiencia cardíaca.

El AA también regula la expresión génica por al menos tres mecanismos distintos que involucran enzimas con actividad dioxigenasa: la hidroxilación del factor inducido por hipoxia (hipoxia-inducible factor, HIF α), que regula la expresión de genes relacionados con sobrevivencia celular y remodelación tisular; la hidroxilación de la 5-metil-citosina, que facilita la remoción de esta marca epigenética, provocando la descompactación de la cromatina; y la activación de desmetilasas de las histonas que, bajo un complejo código epigenético, activa o reprime genes.

Problemas Asociados e Importancia del Análisis de la Vitamina C.

La vitamina C dona electrones a 8 diferentes tipos de enzimas, de las cuales 3 participan en la hidroxilación del colágeno (adiciona grupos hidroxilo a aminoácidos prolina y lisina de la molécula del colágeno) incrementando su estabilidad. De allí que los síntomas del Escorbuto se asocian a alteraciones del tejido conectivo, como fragilidad capilar, equimosis, gingivorragias, hemorragias perifoliculares y la inadecuada cicatrización de heridas.

Otras dos enzimas que son reguladas por la vitamina C, a través de dos dioxigenasas, intervienen en la síntesis de carnitina, permitiendo el transporte de ácidos grasos para su oxidación. Tres enzimas restantes, participan en la formación de noradrenalina desde dopamina, en agregar grupos amida a hormonas peptídicas y en el metabolismo de la tirosina. [5]. Una deficiencia de Vitamina C en la persona puede causar varias afectaciones a nivel del Sistema Inmune y el Sistema Nervioso. La incidencia mundial de escorbuto en la actualidad es desconocida. La información recopilada entre los años 1960 y 2011 evidencia que el 20% de la población mundial ingiere menos vitamina C que lo recomendado, con mayor prevalencia en la población del sur y sureste asiático y con menor prevalencia en los países desarrollados con altos ingresos. [7]

Es posible que esta hipovitaminosis sea un efecto secundario de algunas terapias anticancerígenas o que se produzca debido a la mayor captación de vitamina C por parte de las células tumorales. A nivel de sistema nervioso, la vitamina C es cofactor de la enzima dopamina β -hidroxilasa, necesaria en la síntesis de norepinefrina desde dopamina y facilita la síntesis de dopamina mediante el reciclaje de

tetrahidrobiopterina, cofactor necesario para la acción de la enzima tirosina hidroxilasa. También participa en los procesos de maduración neuronal durante el desarrollo embrionario, en la neurotransmisión y en la inmunomodulación, actúa como antioxidante neuronal y como supresor de la formación del péptido beta-amiloide y de la excitotoxicidad mediada por glutamato.

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. [8]

Al ser un nutriente esencial, estos son aquellos nutrientes que el hombre no puede sintetizar y debe obtenerlo a través de su alimentación. Es importante conocer si los alimentos como las frutas y vegetales, alimentos procesados y otros contienen las cantidades de Vitamina C que se han conocido anteriormente o el mismo no ha cambiado por algunos factores como el cambio climático u otros. En los alimentos procesados y fortificados también es de suma importancia conocer las cantidades finales de Vitamina C, después de haber pasado todo el proceso de producción.

Su concentración final es considerada como indicador de calidad nutricional durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos.

Las técnicas investigadas son consideradas de gran apoyo en la medición de la Vitamina C, entre ellas tenemos:

- La Cromatografía: es la más confiable, este ensayo permite la determinación simultánea de Ácido Ascórbico (AA), y del Ácido Dehidroascórbico (DHA). Nos permite tener una medición de Vitamina C total. Es un principal método analítico utilizado para la determinación de vitamina C.
- Técnicas Espectrométricas: pueden ser directos o indirectos. Es altamente específico y presenta menos interferencias. También Es un método rápido y sencillo, pero sólo puede disolverse en medio orgánico
- Técnicas volumétricas: estas técnicas pueden tener resultados de Vitamina C sobrestimados y es la menos efectiva. Sin embargo, es la más económica.

MATERIALES Y MÉTODOS

El equipo de trabajo realizó una recopilación exhaustiva de varios trabajos de investigación referentes a las diferentes técnicas utilizadas para la determinación de vitamina C en alimentos. Las definiciones y comentarios se realizaron a base de pesquisas de trabajos indexados con miras a definir las técnicas mencionadas el párrafo anterior con el fin de condensar parte de la información en este documento.

Técnicas Instrumentales para la estimación de vitamina C en Alimentos

Los métodos analíticos más simples y populares para cuantificación de vitamina C incluyen técnicas titrimétricas y fluorimétricas. También se puede lograr mayor especificidad y sensibilidad, con estas juntas con fácil operación, usando técnicas de separación como la cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC). Recientemente, la UPLC se ha utilizado para la determinación de vitamina C, ofreciendo tiempos más cortos de análisis, incrementando la sensibilidad, separación y resolución eficiente y uso de menos solvente. (E.C.E. Cunha-Santos et al.,2018).

La cromatografía como tal es un método muy efectivo utilizado para determinar y cuantificar Vitamina C en diversas matrices, estas pueden ser sueros, jugos, zumos, o matrices sólidas donde se encuentre presente. A parte de ello a nivel de laboratorio e industrias la cromatografía es una de las más empleadas por su afinidad para realizar análisis de moléculas de alto y bajo peso molecular, pero por sobre todo lograr mantener las condiciones estables para no degradar la molécula en el procedimiento de análisis. [9]

Cromatografía líquida

La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) permite que los análisis se completen rápidamente con una separación y sensibilidad superiores en comparación con otros métodos de cromatografía líquida. Es una de las técnicas de separación analítica más utilizadas.

Se emplean cantidades pequeñas de muestras en el orden de microgramos y se usa a menudo para el análisis de mezclas, puede usarse para compuestos volátiles y no volátiles [10]. HPLC es una técnica analítica utilizada para la separación de componentes de una mezcla orgánica de compuestos cuando dichos compuestos son no volátiles, térmicamente inestables y tienen pesos moleculares relativamente altos.

La técnica ha tenido un inmenso alcance de aplicaciones tanto en laboratorios académicos como industriales que requieren identificación y cuantificación de mezclas de diferentes compuestos orgánicos.

Técnicas de separación y detección para vitaminas hidrosolubles con la técnica de HPLC

Para la determinación de las vitaminas hidrosolubles, la cromatografía líquida se lleva a cabo generalmente con varios detectores como UV, detección de matriz de diodos (DAD), fluorescencia y MS. [11]. Los detectores de HPLC se pueden combinar para obtener resultados de análisis óptimos, por ejemplo, UV con fluorescencia y DAD con detectores de fluorescencia (FLD) [12].

HPLC-UV

El detector de UV es el detector más común en HPLC con un rango de longitud de onda entre 190 y 400 nm. Sin embargo, la medición espectrofotométrica UV comienza en 205 nm más alta porque a longitudes de onda más bajas, hay una fuerte absorción de la fase móvil o solvente que interfiere con el análisis. [13]. La Vitamina C tienen una buena absorción a longitudes de onda de 254 nm [14].

HPLC-DAD

La cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) consiste en una disposición de fotodiodos activos (matriz) en cantidades muy grandes. Cada uno de los fotodiodos da una respuesta específica a la radiación con una determinada longitud de onda, de modo que la radiación electromagnética con una amplia gama de longitudes de onda (UV-visible) se puede recibir simultáneamente. Es el resultado de un escaneo rápido. La ventaja de HPLC-DAD es la capacidad de elegir la mejor longitud de onda para el análisis. [15].

HPLC-FLD

La cromatografía líquida de alta eficiencia con detectores de fluorescencia (HPLC-FLP) es típicamente tres veces más sensible que el detector UV. HPLC-FLP se utilizan de forma rutinaria en ensayos en un rango bajo de ng/ml e incluso pg/ml en concentración de analitos. [16]

HPLC-MS

El detector de MS tiene una alta selectividad y sensibilidad, puede detectar analitos con concentraciones pequeñas, requiere menos productos químicos y un análisis rápido que otros detectores. [17].

Métodos de análisis cromatográficos

La cromatografía se puede representar como un proceso de intercambio de masa que incluye adsorción de uno de los compuestos. Un rasgo característico de la cromatografía es la presencia de dos fases; dispuestas de tal manera que mientras una permanece estacionaria dentro del sistema (fase estacionaria), la otra se desplaza a lo largo de él (fase móvil). La clave de la separación en cromatografía es que la velocidad con la que se mueve cada sustancia depende de su afinidad relativa por ambas fases (equilibrio de distribución)

RP-HPLC

La HPLC de fase inversa (RP-HPLC) es la técnica más común en la separación de vitaminas solubles en agua que la HPLC de fase normal [18]. El mecanismo de separación depende de interacciones hidrofóbicas entre las moléculas de soluto en la fase móvil y el ligando hidrofóbico inmovilizado en la fase estacionaria. La naturaleza actual de las interacciones de unión hidrofóbica asume que la interacción de unión es el resultado de un efecto entrópico favorable. Las condiciones iniciales de unión de la fase móvil usadas en la cromatografía de fase

reversa son acuosas lo cual indica un grado alto de estructuras de agua organizadas alrededor de las moléculas de soluto y el ligando inmovilizado.

A medida que el soluto se une al ligando hidrofóbico inmovilizado disminuye el área hidrofóbica expuesta hacia el disolvente. Así, el grado de organización de la estructura de agua disminuye con un favorable aumento de entropía en el sistema.

HILIC

La cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC) es una variante de la cromatografía líquida en fase normal que se superpone parcialmente a otras aplicaciones cromatográficas, como la cromatografía iónica y la cromatografía líquida en fase reversa. La cromatografía líquida de interacción hidrofílica ofrece una alternativa de RP-HPLC que proporciona una buena retención de compuestos hidrofílicos [19]. Utiliza detectores de matriz de diodos acoplados, fluorescencia y coulombimétricos. Sin embargo, el ácido ascórbico no se puede identificar con un detector coulombimétrico. [20]

UPLC

El método UPLC es más sensible y más rápido y requiere menos eluyente que HPLC. La columna de microcalibre en UPLC puede reducir la interferencia de MS debido al uso de disolventes orgánicos de alta velocidad en RP-HPLC. El aumento de la resolución y el límite de detección más bajo en UPLC es muy útil para separar las vitaminas homólogas y detectar concentraciones más bajas. [21]. Sin embargo, los métodos de UPLC son limitados para el análisis de vitaminas, debido a los altos costos operativos de los instrumentos. [18]

Utilización de la técnica en la determinación de la Vitamina C

La cromatografía como tal es un método muy efectivo utilizado para determinar y cuantificar Vitamina C en diversas matrices, estas pueden ser sueros, jugos, zumos, o matrices sólidas donde se encuentre presente.

A parte de ello a nivel de laboratorio e industrias la cromatografía es una de las más empleadas por su afinidad para realizar análisis de moléculas de alto y bajo peso molecular, pero por sobre todo lograr mantener las condiciones estables para no degradar la molécula en el procedimiento de análisis. [9]

En 2018 Cueva et al. realizó un estudio para cuantificar el contenido de flavonoides totales del mesocarpo y vitamina C del zumo del fruto de *Citrus medica* (L.) "cidra" mediante el método de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) encontrándose 242,959 mg ácido ascórbico/100 g de fruto.

La cuantificación de vitamina C se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) por la comparación con los TR (tiempo de retención) de los estándares o patrones de ácido ascórbico y de los espectros correspondientes. Este método es el más utilizado para la determinación del ácido ascórbico por su sensibilidad, precisión, exactitud y reproducibilidad. [22]

La cromatografía separa en forma de elución el o los analitos, impulsando dentro de una columna por medio de una fase móvil hacia un detector. La técnica de cromatografía líquida se emplea con más frecuencia para determinar Vitamina C, esto debido a la baja estabilidad. [9]

La detección de Vitamina C se logra a través de una longitud de onda baja dentro del rango del ultra/violeta, y manteniendo a temperatura ambiente el detector. [9]

En 2019, Balseca realizó un estudio para validar un método que permite la determinación de Vitamina C (Ácido L-Ascórbico) mediante HPLC en jugos cítricos de naranja, limón y mandarina, obteniendo concentraciones de 219.98 mg Kg, 156.78 mg Kg, 155.80 mg Kg. respectivamente para cada una de las muestras. [9]

Bello et al, en su estudio "Determinación de limonina en jugo de naranja. Cuantificación y monitoreo de variedades" en el año 2020, pudo observar una disminución del contenido de limonina durante el período de cosecha en las variedades Valencia Temprana, Midnight y Roble, mientras que en la variedad Salustiana los valores se mantuvieron constantes. En los cromatogramas, el pico correspondiente a limonina era claramente identificable en el tiempo de retención coincidente con los patrones, con una línea base estable y con buena resolución con respecto a los demás picos, considerando que el método cromatográfico utilizado fue adecuado para la determinación y cuantificación de este compuesto en jugo fresco de naranjas.

Técnicas Espectrométricas

Los Métodos Espectrométricos pueden ser directos ya que el AA (ácido ascórbico) presenta un máximo de absorción a 260 nm, o bien 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.

En los métodos Fluorimétricos el AA se oxida a ADA y reacciona con un marcador fluorogénico (o-fenilenediamina) formando un complejo fluorescente. [8]

Espectrofotometría Directa

La espectrometría 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 espectrometría indirecta se utiliza para la detección del ácido ascórbico 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 distintos zumos de frutas, cuanto mayor absorbancia sea, mayor cantidad de vitamina C tiene. [8]

Espectrofotometría Indirecta

La espectrometría 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 añadido.

Se determinan las absorbancias de los distintos patrones y de la muestra problema a 521 nm. Con dichas absorbancias se construye una recta de calibración. Esta recta de calibrado cumple con la Ley de Lambert-Beer.

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 dicetoglucónico tiene un grupo cetona, puede reaccionar con DNPH. La glucosa no interfiere mucho los resultados ya que a 521 nm el complejo de DNPH-glucosa no absorbe. [8]

También existen otros reactivos, como 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). Se basa en la reducción del radical DPPH con 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 las sustancias reacciona con el DPPH. Es un método rápido y sencillo, pero solo puede disolverse en medio orgánico. [8]

Fluorimetría

La técnica fluorimétrica se aplica en la determinación cuantitativa de vitamina C. Posee mayor sensibilidad que otras técnicas. Además, es adecuada para la determinación de vitamina C en muestras coloreadas, por ejemplo, tomate.

La determinación de 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. 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 una técnica fluorimétrica semiautomatizada basada en la relación fluorescente de vitamina C y PDA en un sistema de inyección de flujo, con métodos de AOAC de referencia.

La preparación de muestra requiere la maceración o extracción de vitamina C de muestras y su estabilización con ácido meta fosfórico o ácido trifluoroacético. [8]

Técnicas volumétricas

Determinación Iodimétrica

El fundamento de este método es el yodo, reacciona con suspensión de almidón que presenta el AA, hasta dar el color azul-negro. Cuando se encuentra el AA, se oxida por el yodo formando el ácido dehidroascórbico. Una mezcla de almidón y AA se titula con lugol, cuando ocurre el cambio de color azul-negro significa que ya no existe ácido ascórbico.

Se anota el volumen gastado de yodo para calcular la concentración de AA, en esta titulación se determinan sustancias reductoras totales presentes en la solución. Por tanto, hay que tener en cuenta que en las muestras pueden existir otras sustancias reductoras que afecten los resultados, si esto sucede se aumenta el gasto de yodo por el resultado sobreestimado de ácido ascórbico.

Es importante tener presente que la vitamina C es una sustancia que se oxida fácilmente por el oxígeno que se encuentra presente en el aire, por este motivo, las soluciones que contienen esta vitamina deben ser preparadas inmediatamente antes de ser tituladas con el fin de obtener resultados fiables.

Titulación Indofenol

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

DISCUSIÓN

En base a la revisión documental realizada hemos elaborado la Tabla 1 que hace referencia a la comparación entre las técnicas instrumentales más utilizadas para la determinación de vitamina C

Tabla 1

Comparación de técnicas instrumentales para la determinación de la vitamina C

Técnicas	Métodos	Descripción	Ventaja y Desventajas	Comparación: Precisión en la Detección de Vitamina C
Cromatográficas	HPLC-UV	Utiliza un detector UV con longitudes de onda hasta 400 nm, la vitamina C obtiene buena absorción a 254 nm.	HPLC es una de las técnicas más utilizadas para la separación y cuantificación de vitaminas y posee la gran ventaja de ofrecer una gran precisión en sus resultados. Una de sus desventajas es que la técnica es muy cara.	La cromatografía como tal es un método muy efectivo utilizado para determinar y cuantificar Vitamina C en diversas matrices como en zumos de frutos cítricos. A nivel de laboratorio e industrias la cromatografía es una de las más empleadas por su afinidad para realizar análisis de moléculas de alto y bajo peso molecular, pero por sobre todo lograr mantener las condiciones estables para no degradar la molécula en el procedimiento de análisis. (Balseca, 2019).
	HPLC-DAD	Escaneo rápido a través de la utilización de una matriz de fotodiodos activos con una amplia gama de longitudes de onda (UV).	Escaneo rápido con la capacidad de elegir la mejor longitud de onda para realizar análisis.	UPLC se ha utilizado para la determinación de vitamina C, ofreciendo tiempos más cortos de análisis, incrementando la sensibilidad, separación y resolución eficiente y uso de menos solvente.
	HPLC-MS	Puede detectar analitos con concentraciones pequeñas, uso de menos productos químicos obteniendo respuestas rápidas.	Alta selectividad y sensibilidad. Respuestas rápidas en comparación con otros detectores.	
	HPLC-FLD	Se utiliza en ensayos de rango bajo	Tres veces más sensible que el detector UV.	
	RP-HPLC	Cromatografía de fase inversa, técnica más común para separar vitaminas solubles en agua.		
	HILIC	Proporciona buena retención de compuestos hidrofílicos, utilizando detectores de diodos acoplados, fluorescencia y coulumbimetría.	El ácido ascórbico no se puede identificar con detectores coulumbimétricos.	
	UPLC	Utiliza disolventes orgánicos de alta velocidad. Aumento de la resolución y límite de detección bajo que es de utilidad en la separación de vitaminas homologas.	Es más sensible y más rápido. Los métodos de UPLC son limitados para el análisis de vitaminas, debido a los altos costos operativos de los instrumentos.	

Técnicas	Métodos	Descripción	Ventaja y Desventajas	Comparación: Precisión en la Detección de Vitamina C
Espectroscópicas	Espectrofotometría Directa	Máximo de Absorción de 260 nm.	Pueden presentar interferencia por la absorbancia de otras soluciones.	Es utilizada para la identificación de vitamina C como ácido ascórbico, posee costos eficientes y es fácil de usar, también posee un alto grado de precisión.
	Espectrofotometría Indirecta	Formación de un compuesto coloreado, con DNPH o DPPH.	Es rápido y sencillo, pero solo puede disolverse en medios orgánicos.	
	Fluorimetría	Derivatización fluorogénica por DPA	Posee mayor sensibilidad que otras técnicas.	
Titulación volumétrica	Iodimétrico	AA reacciona con yodo en presencia de almidón.	Son unas de las más utilizadas debido a su gran ventaja de ser más sencilla, rápida y barata.	En comparación con HPLC, las técnicas espectrofotométricas requieren de un mayor tiempo de análisis. Aportan información rápida para la detección de vitamina C, pero debido a su falta de precisión o exactitud es recomendable recurrir a otros métodos de verificación más rigurosos.
	Indofenol	Reducción del 2,6- diclorofenolindofenol por AA.	Su desventaja es que no es muy precisa.	

CONCLUSIONES

Durante las revisiones bibliográficas efectuadas en el presente trabajo, se pudo concluir:

- Que las técnicas cromatográficas basadas en HPLC fueron las más utilizadas para la determinación de vitaminas en alimentos, incluyendo la vitamina C contenida en los zumos de frutos cítricos. Estas técnicas son extremadamente rápidas y eficientes, son reconocidas por su alta precisión y sensibilidad.
- Las técnicas espectrofotométricas fueron las menos utilizadas para la detección de vitamina C, a pesar de ser menos costosas que la HPLC. Su tiempo de proceso es más prolongado y pueden presentar interferencias respecto al analito en estudio.
- Respecto a las técnicas volumétricas basadas en titulación, estas también son ampliamente utilizadas para detección de vitamina C y demás vitaminas contenidas en los alimentos, debido a su bajo costo, pero sus resultados no son tan precisos como la HPLC.
- Existen estudios que han demostrado la versatilidad de la espectrofotometría como técnica viable para la determinación de Vitamina C, por ende, se han estado trabajando en más estudios que incrementen el coeficiente de correlación mediante calibraciones multivariantes.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Dra. Kathia Broce por sus aportes cognitivos durante el desarrollo de la clase de Técnicas Instrumentales en Análisis de Alimentos y por su guía para el desarrollo de este artículo de revisión.

De igual manera, a nuestros compañeros de la Maestría al fomentar el trabajo en equipo para el desarrollo de las diversas actividades. Por último, agradecer a todos los autores que participaron con sus ideas para este producto final.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores de este artículo de revisión declaran no tener algún conflicto de interés.

CONTRIBUCIÓN Y APROBACIÓN DE LOS AUTORES

Todos los autores afirmamos que se leyó y aprobó la versión final de este artículo.

REFERENCIAS

- [1] Domínguez, E.; Ordoñez, E. (2014). "Evaluación De La Actividad Antioxidante, Vitamina C De Zumos Cítricos De Lima Dulce (Citrus Limetta), Limón Tahití (Citrus Latifolia), Limón Rugoso (Citrus Jambhiri Lush) Y Mandarina Cleopatra (Citrus Reshni) Almacenados En Refrigeración." Perú. Revista Investigación y Amazonia (RevIA), vol.3. pp 30 – 35.
- [2] Fernández Montoya, L. (2016). "Evaluación De La Concentración De Ácido Ascórbico En Cocona (Solanum Sessili.Dorum Dunnal) Por Fotometría." Universidad Nacional Toribio Rodríguez De Mendoza De Amawnas. Perú. Available: http://repositorio.untrm.edu.pe/bitstream/handle/UNTRM/762/FIA_192.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- [3] Gavilánez Alvarez, I. M. (2017). "Variación del contenido de vitamina C en frutas. Caso de estudio: guayaba y naranja." Revista Caribeña de Ciencias Sociales. Available: <http://www.eumed.net/rev/caribe/2017/07/guayaba-naranja.html>
- [4] Berger, Z.; Berger Salinas, A.; Szánthó Pongrácz, G. (2015). "La vitamina C y algo más. Un premio Nobel poco conocido en Chile." Revista Médica de Chile. Vol. 143, pp. 1065-1069.
- [5] Castillo-Velarde, E. R. (2019). "Vitamina C en la salud y en la enfermedad." Revista de la Facultad de Medicina Humana, Universidad Ricardo Palma, Lima-Perú. Vol.9. pp 95-100.
- [6] Bastías M, J. M., & Cepero B, Y. (2016). "La vitamina C como un eficaz micronutriente en la fortificación de alimentos." Revista Chilena de Nutrición, 43(1), 81–86. doi:10.4067/s0717-75182016000100012
- [7] Villagrán, M., Muñoz, M., Díaz, F., Troncoso C. "Una mirada actual de la vitamina C en salud y enfermedad". Rev Chil Nutr; 2019. vol.46, no.6, pp. 800-808. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182019000600800>

- [8] Zhongwei Fang. 2017. "Métodos Analíticos para la determinación de Vitamina C en Alimentos. Universidad Complutense." Trabajo de fin de Grado. Facultad de Farmacia.
- [9] Balseca Granda, Alan Nikolaiv. 2019. "Determinación de parámetros de validación para valoración de vitamina c en jugos cítricos mediante HPLC para la Facultad de Ciencias-ESPOCH." Available: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/13252>
- [10] Thammana, M. 2016. "A review on high performance liquid chromatography (HPLC)." Department of Pharmacy, Vignan Institute of Pharmaceutical. RRJPA. vol 5, Jul – Sept. 2016.
- [11] Schmidt A, Pratsch H, Schreiner MG, Mayer HK. 2017. "Determination of the native forms of Vitamin B1 in bovine milk using a fast and simplified UHPLC method." Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814617302893>
- [12] Teresa M, Nardiello D, Cicco N, Candido V, Centonze D. 2018. "Simultaneous determination of water- and fat-soluble vitamins, lycopene and beta-carotene in tomato samples and pharmaceutical formulations: Double injection single run by reverse-phase liquid chromatography with UV detection." Journal of Food Composition and Analysis, vol 70, pp 9-17, <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.04.002>.
- [13] Gimenez C, Martin F. 2018. "Vitamin B12 (cyanocobalamin) in infant formula adult/pediatric nutritional formula by liquid chromatography with ultraviolet detection: Collaborative study, final action." Journal of Food Composition and Analysis, Vol. 70, pp 9-17, <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.04.002>.
- [14] Hampel D, York ER, Allen LH. 2012. "Ultra-performance liquid chromatography tandem mass-spectrometry (UPLC-MS/MS) for the rapid, simultaneous analysis of thiamin, riboflavin, flavin adenine dinucleotide, nicotinamide and pyridoxal in human milk."
- [15] Snyder LR, Kirkland JJ, Glajch JL. 2010. "Practical HPLC Method Development." New York: Wiley-Interscience. Available: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02466588>
- [16] Crotti S, Isak I, Traldi P. 2017. "Advanced spectroscopic detectors for identification and quantification: Mass spectrometry." Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012805393500018X>
- [17] Liddicoat C, Hucker B, Liang H, Vriesekoop F. 2015. Thiamin analysis in red wine by fluorescence reverse phase-HPLC. Food Chem.
- [18] Gliszczyn A, Rybicka I. 2015. "Simultaneous determination of caffeine and water-soluble vitamins in energy drinks by HPLC with photodiode array and fluorescence detection." Available: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12161-014-9880-0>
- [19] Giardinieri A, Pacetti D, Pourmohammadi K, Ferreira DS. 2019 "Water-soluble vitamins. In: Saraiva A, Cravotto G, Lorenzo JM, editors. Innovative Thermal and Non-Thermal Processing, Bioaccessibility and Bioavailability of Nutrients and Bioactive Compounds." Available: <https://www.elsevier.com/books/innovative->

thermal-and-non-thermal-processing-bioaccessibility-and-bioavailability-of-nutrients-and-bioactive-compounds/barba/978-0-12-814174-8

[20] Pascual-ahuir MN, García MJ, Alfonso EF, Martínez JM 2016. "Determination of water-soluble Vitamins in energy and sport drinks by micellar electrokinetic capillary chromatography." Food Control.

[21] Caprioli AG, Sagratini G, Vittori S, Torregiani E. 2017. "Optimization of an extraction procedure for the simultaneous quantification of riboflavin, nicotinamide and nicotinic acid in anchovies (*Engraulis engraulis*) by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry." Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0889157517302752>

[22] Cueva Vidal, Mirley Angela; Rodríguez Solano, Karent Paola. 2018. "Cuantificación de flavonoides totales del mesocarpio y vitamina C del zumo del fruto de *Citrus medica* (L.) cidra".

Available: <https://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/10244>

[23] Bello, F., Lare, V., Vázquez, D. 2020. "Determinación de limonina en jugo de naranja. Cuantificación y monitoreo de variedades." https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_concordia_determinacion_de_limoniana_en_jugo_de_naranja.pdf

[24] FAO. 2020. Frutas y verduras – esenciales en tu dieta. Año Internacional de las Frutas y Verduras, 2021. Documento de antecedentes. Roma. <https://doi.org/10.4060/cb2395es>

[25] Katsa M, Proestos C. 2019. "Vitamin analysis in juices and nonalcoholic beverages. In: Alexandru Mihai Grumezescu and Alina Maria Holban" Engineering Tools in the Beverage Industry. Vol. 3.

[26] Meidwi Ratriningrum, Suzana, Mekar Saptarini, Nyi, Abdul, Holik Holis 2019. "Chromatographic analysis of water-soluble vitamins in food: Review." Available: <https://jpr solutions.info/files/final-file-5f3238a0b123f7.15969562.pdf>

[27] Rogatsky E. 2016. Modern high performance liquid chromatography and HPLC. International Symposium. Available: <https://www.longdom.org/open-access/modern-high-performance-liquid-chromatography-and-hplc-2016international-symposium-2157-7064-1000e135.pdf>

[28] Xie L, Huang J, Han Q, Song Y, Liu P, Kang X. 2018. "Solid phase extraction with polypyrrole nanofibers for simultaneously determination of three water-soluble Vitamins in urine".

Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021967318315966>

[29] Zhang M, Liu H, Huang X, Shao L, Xie X, Wang F, et al. 2019. A novel LC-MS/MS assay for Vitamin B1, B2 and B6 determination in dried blood spots and its application in children. Avail