



Universidad Nacional del Nordeste



Facultad de Ciencias Agrarias

Trabajo Final de Graduación

Modalidad Pasantía

**Adiestramiento en técnicas de laboratorio para la determinación del contenido de Vitamina
C en frutos Cítricos**

Alumno: Leiva, Daniel Oscar

Asesora: Ing. Agr. (Mgter.) María de las M. Yfran Elvira

2015

Adiestramiento en técnicas de laboratorio para la determinación del contenido de vitamina C en frutos Cítricos

INTRODUCCIÓN

La vitamina C es un micronutriente esencial necesario para el normal funcionamiento metabólico del cuerpo. Está implicada en la síntesis de colágeno y en varias funciones inmunológicas y antibacterianas. El ácido ascórbico se describe como un polvo blanco, cristalino, muy soluble en agua, con un sabor muy similar al del zumo de naranja cuando se encuentra en solución. Es una de las vitaminas de estructura más sencilla, pues se trata de la lactona de un azúcar-ácido. El ácido ascórbico sólo se precisa en la dieta de unos pocos vertebrados: el hombre, los monos, el cobaya, el murciélago frugívoro de la India y en algunos peces. Algunos insectos y otros invertebrados necesitan también ácido ascórbico, pero la mayor parte de los demás animales superiores y de los vegetales pueden sintetizar el ácido ascórbico a partir de la glucosa y de otros precursores sencillos. El ácido ascórbico no está presente en los microorganismos y por tanto, no parece serles necesario. En las últimas décadas, las sustancias antioxidantes (vitaminas y otras) han adquirido una relevancia notoria ya que, en muchos casos, ha sido demostrada su participación en la prevención de enfermedades degenerativas tales como las cardiovasculares y neurológicas, diferentes tipos de cánceres y otras disfunciones relacionadas con el estrés oxidativo (Laso *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2000; Russo *et al.*, 2003; Aruoma, 2002).

El ácido ascórbico tiene una estructura química análoga a los carbohidratos, con seis átomos de carbono, es hidrosoluble, termolábil y sensible frente a la oxidación y a los álcalis e iones metálicos.

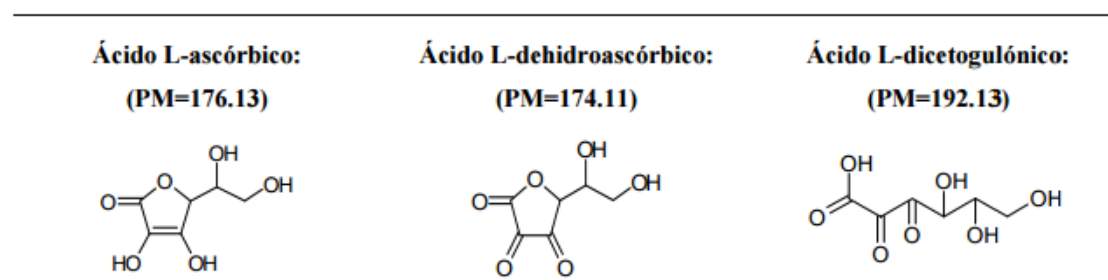


Figura 3. Estructura del ácido ascórbico y sus derivados.

La vitamina C se reduce o destruye fácilmente por exposición al calor o al oxígeno o durante el procesamiento, el empaquetado y el almacenamiento de los alimentos, por ello su determinación en los alimentos es importante porque, aparte de permitir inferir sobre el valor nutritivo del

alimento, es un indicador de la bondad del tratamiento térmico ya que, siendo la vitamina C la más sensible de las vitaminas, la conservación de ella después de un tratamiento indica que el resto de las vitaminas no ha sufrido deterioro.

El ácido ascórbico es un potente reductor, pierde con facilidad átomos de hidrógeno, cuyo proceso es reversible y se transforma en ácido dehidroascórbico, que también posee actividad de vitamina C. Sin embargo, la actividad vitamínica se pierde cuando el anillo lactónico del ácido dehidroascórbico se hidroliza para formar ácido dicetogulónico (Figura 3).

La vitamina C se considera uno de los antioxidantes naturales más eficaces y menos tóxicos. Un antioxidante se puede definir como aquella sustancia natural o artificial con capacidad para neutralizar y proteger a un sistema biológico frente a radicales libres, tales como los radicales de oxígeno, los de nitrógeno y los radicales lipídicos. Se encuentra a elevada concentración en numerosos tejidos, si se compara con los contenidos plasmáticos (AOAC, 2000; Slater & Block, 1991; Halliwell *et al.*, 1995).

Los cítricos son una fuente importante de vitamina C en la dieta humana, conteniendo entre 30 y 35 mg de vitamina C por cada 100 g de porción comestible. Una naranja con un peso bruto de 180 g proporciona 67 mg de vitamina C, lo cual supera la necesidad diaria de un adulto (50 mg) (Sancho Barrantes y Barahona Cockrell, 2000). La naranja es la que contiene mayor porcentaje de ácido ascórbico en relación con los otros cítricos, un nutriente que además de su acción vitamínica, es apreciado por su efecto antioxidante, por la estimulación del sistema inmunitario y por otros beneficios para la salud que están siendo activamente investigados (Sancho Barrantes y Barahona Cockrell, 2000).

Entre los zumos de frutas el de naranja es el de mayor elaboración y consumo. Alrededor del 70% de la producción citrícola Argentina, está dirigida al mercado de frutas frescas (Federcitrus, 2012). Los cítricos (naranjas, limones, limas y pomelos) son excelentes proveedores de vitamina C, si bien otras frutas y verduras como el kiwi, mango, melón, sandía, pimiento, brócoli, repollo, coliflor, espárragos, perejil y el té verde, son también ampliamente conocidos por su elevado contenido (Agusti, 2010).

El procesado térmico es uno de los métodos por los que los alimentos son conservados y se hacen accesibles al consumidor. Durante el tratamiento térmico, además de la inactivación de microorganismos, constituyentes deseables como nutrientes, color, aroma y textura se destruyen en distintos porcentajes (Chen & Chen, 1993; Lessin *et al.*, 1997; Rodrigo *et al.*, 1997; Parish, 1998; Bezman *et al.*, 2001; Manso *et al.*, 2001; Alwazeer *et al.*, 2002; Lee & Coates, 2003; Polydera *et al.*, 2004). La vitamina C es termolábil y por consiguiente en frutas y vegetales es indicativa de la pérdida de otras vitaminas y se utiliza como parámetro de calidad para otros componentes organolépticos o nutritivos, tales como los pigmentos naturales y

sustancias aromáticas. Su concentración disminuye durante el almacenamiento, dependiendo de las condiciones del mismo, tales como la temperatura, el contenido en oxígeno, la luz y el tiempo (Esteve *et al.*, 1995a; Murata *et al.*, 2002; Alwazeer *et al.*, 2003; Polydera *et al.*, 2003; Zerdin *et al.*, 2003; Blasco *et al.*, 2004).

OBJETIVO

Adquirir destreza en la técnica para la determinación de vitamina C en frutos cítricos.

METODOLOGÍA DE TRABAJO

Preparación de la solución de 2,6-diclorofenolindofenol (dcip)

Para realizar la determinación por volumetría de óxido-reducción de Vitamina C se utilizó como agente valorante una solución de 2,6-diclorofenolindofenol, previamente estandarizada. Todos los reactivos empleados (Ácido Ascórbico y/o Vitamina C, el 2,6-diclorofenolindofenol, Acido oxálico) fueron de grado analítico (Cicarelli[®]).

Se pesaron 62,5 mg de 2,6-diclorofenolindofenol y se disolvieron en 50 ml de agua destilada con 52,5 mg de NaHCO₃ (bicarbonato de sodio), se agitó hasta disolución y se enrasó con agua destilada hasta 250 ml. La normalización de la solución de 2,6-diclorofenolindofenol se realizó utilizando una solución patrón de ácido ascórbico (Vit C), preparada con 50 mg de ácido ascórbico disueltos en 50 ml de una solución de ácido oxálico 1g/100ml, enrasando con agua destilada hasta 100 ml. La estandarización se llevo a cabo tomando 10 ml del patrón de Vitamina C y titulándolo con la solución de 2,6-diclorofenolindofenol, hasta que un color ligeramente rosado persistiera por 20 segundos.

Preparación de las muestras

Se trabajó con frutas sanas de Tangor Murcott (*C. reticulata* x *C. sinensis*) y naranja Valencia late (*Citrus sinensis* L) provistas por el grupo de trabajo Citrus (PI 13CA02) de la Facultad de Ciencias Agrarias procedentes de Santa Rosa, Dpto. Concepción, y San Lorenzo, Dpto. Saladas, provincia de Corrientes; y corresponden a plantaciones comerciales de 18 años de implantadas, portainjerto: lima de Rangpur (*Citrus limonia* Osbeck).

Las mismas fueron inmediatamente procesadas en el laboratorio de Física y Química para la obtención de jugo. Para determinar los caracteres de calidad de los frutos se tomaron muestras de 10 frutos, en los que se determinaron las siguientes variables:

Vitamina C (mg/100mL)

Las muestras de jugo se prepararon por dilución de 1 ml de jugo cítrico y se llevó a un volumen de 100 ml con agua destilada y posterior agitación. Se tomó 10 ml de esta solución y se añaden 10 ml de la solución extractora de ácido metafosfórico al 3% y ácido acético al 8%, luego se enrasó a 100 ml con agua destilada y se agitó.

Inmediatamente se titula con la solución del indicador redox de 2,6 diclorofenolindofenol hasta color rosado débil persistente por 15 segundos.

El análisis implica la oxidación del ácido ascórbico con un colorante redox, como el 2,6-diclorofenolindofenol (azul en medio básico y rojo en medio ácido), el cual se reduce en presencia del ácido. El contenido de ácido ascórbico es directamente proporcional a la capacidad de un extracto de la muestra para reducir una solución estándar determinada por titulación. La cuantificación de vitamina C, por el método del 2,6-diclorofenolindofenol, es un método rutinario de titulación, en el cual sólo se determina la forma reducida; sin embargo, rinde buenos resultados en el análisis de frutas e incluso en el extracto de vegetales no sometidos a tratamientos térmicos, porque toda la vitamina C presente en ellos se encuentra en la forma reducida (AOAC, 2000).

El contenido de ácido ascórbico se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{mg de ác. ascórbico}/100 \text{ ml} = (V \times (V_f / D) \times f_c) \times 10/100$$

Donde:

V = mL 2,6 diclorofenolindofenol gastados en la titulación.

V_f = volumen final que se titula 100ml (1 ml de la dil +99 ml de agua destilada) y

D = dilución 0,1 ml (se tomó 10 ml de jugo exprimido y le llevó a 100 ml con agua destilada)

F_c = factor de corrección (1,06).

10/100= para pasar de g de vit C en 10 ml de jugo a g de vitamina C en 100 ml de jugo.

Contenido de sólidos solubles (SST) expresados en °Brix

Se usa un refractómetro previamente calibrado con agua destilada. Para la determinación se tomaron unas gotas del jugo haciendo uso de un gotero y colocadas en el refractómetro para su lectura. Un grado Brix es la densidad que tiene a 20° C una solución de sacarosa al 1%, y a esta densidad corresponde también un determinado índice de refracción. Como los sólidos disueltos no son solo sacarosas sino que hay otros azúcares ácidos y sales en el jugo, un grado Brix no equivale a una concentración de sólidos disueltos de 1g/100 mL. Por lo tanto es un índice comercial que se acepta convencionalmente como si todos los sólidos disueltos fueran sacarosa.

Acidez total por volumetría de neutralización (expresado en % de ácido cítrico)

El método se basa en la neutralización de los ácidos de los jugos de las frutas con un álcali valorado, NaOH 0,1N, usando como indicador fenolftaleína cuyo punto final se visualiza cuando la solución toma un color rosado-naranja intenso.

Procedimiento:

Se extrae el jugo de las frutas, se toma 10 mL de jugo con una pipeta graduada y se vertió en un erlenmeyer de 250 mL, luego se agrega 100 mL de agua destilada y las gotas de fenolftaleína

como indicador. A posterior se titula con una solución de NaOH de 0,1 N, hasta la aparición de una coloración rosada-naranja intensa. Al finalizar se lee el volumen gastado de NaOH en la bureta, el cual se reemplaza en la siguiente ecuación para la obtención del índice de acidez total.

$$\text{Índice de Acidez (100 mL de jugo)} = \text{mL de NaOH } 0,1 \text{ N} * Fc * 0,064$$

Fc= Factor de corrección del álcali

0,064= 64 gr / eq. gr. (Peso equivalente del ácido cítrico)

Índice de madurez -IM - (Ratios)

Indica el grado de madurez de la fruta analizada. Para establecer esta relación se dividen los ° Brix que indica el refractómetro por la acidez.

$$IM = \text{° Brix} / \text{acidez valorable}$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el gráfico N°1 se presentan los resultados comparativos del análisis del contenido de vitamina C en las muestras de Naranja Valencia late y tangor Murcott.

Se puede observar que los valores de vitamina C referidos a 100 ml de jugo variaron entre 37,74 y 59,43 mg de vitamina C/100 mL de jugo en tangor Murcott (Tabla 1) y 31,13 y 52,83 mg de Vit C/100 mL en naranja Valencia (Tabla 2). Según los resultados 58 % de las muestras de tangor Murcott presentaron valores superiores de vitamina C respecto de las muestras de naranja Valencia.

Desde el punto de vista dietético, con un vaso (de 200 cc aproximadamente) de jugo de naranja o mandarina, se satisface la dosis diaria de ácido ascórbico recomendada que es 50 mg/100 mL (Sancho Barrantes y Barahona Cockrell, 2000) asumiendo que el jugo fuera la única fuente de vitamina C en la dieta.

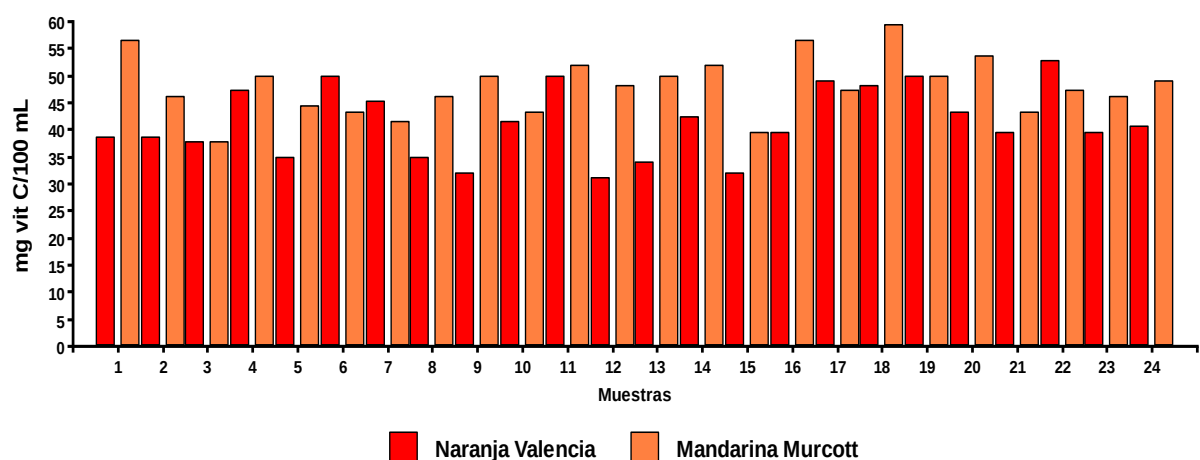


Figura N° 1: Contenido de Vitamina C en jugos de Naranja Valencia y tangor Murcott

Los parámetros, contenido de sólidos solubles (SST) expresados en °Brix variaron entre 9,80 y 11,80, acidez total (expresado en % de ácido cítrico) entre 0,74 y 1,16 % y el índice de madurez o ratio (relación= SST/ acidez) que indica el grado de madurez del fruto se encontró entre 9,33 y 14,42. Estos resultados se encuentran por encima de los valores mínimos para la comercialización de frutos frescos, tanto para mercado interno y exportación (Tabla 1).

Tabla Nº 1: Contenido Promedio de sólidos solubles (SST) expresados en °Brix, ACIDEZ total por volumetría de neutralización (expresado en % de ácido cítrico) e índice de madurez o RATIO (relación= SST/ acidez) que indica el grado de madurez del fruto y Vitamina C (mg/100 mL) en jugo de tangor Murcott

Variable	Valor Promedio	Mínimo	Máximo
° Brix	10,79	9,80	11,80
Acidez	0,90	0,74	1,16
Ratio	12,12	9,33	14,42
Vitamina C	48,07	37,74	59,43

En la Figura 2 se compara los resultados obtenidos de vitamina C y acidez en jugo de tangor Murcott para cada muestra evaluada. Se observa que las muestras 8, 9 y 15 presentaron mínimos valores (que rondaron entre 0,74 % -0,75 %) de acidez, mientras que las muestras 4, 6, 10, 17 y 22 los mayores valores. Los resultados no evidencian relación entre contenidos de vitamina C y acidez del jugo. Contrariamente Van der Laat (1954) afirma que existe casi una razón inversa entre vitamina C y acidez, es decir, que las frutas más ácidas son las que contienen menor cantidad de vitamina C.

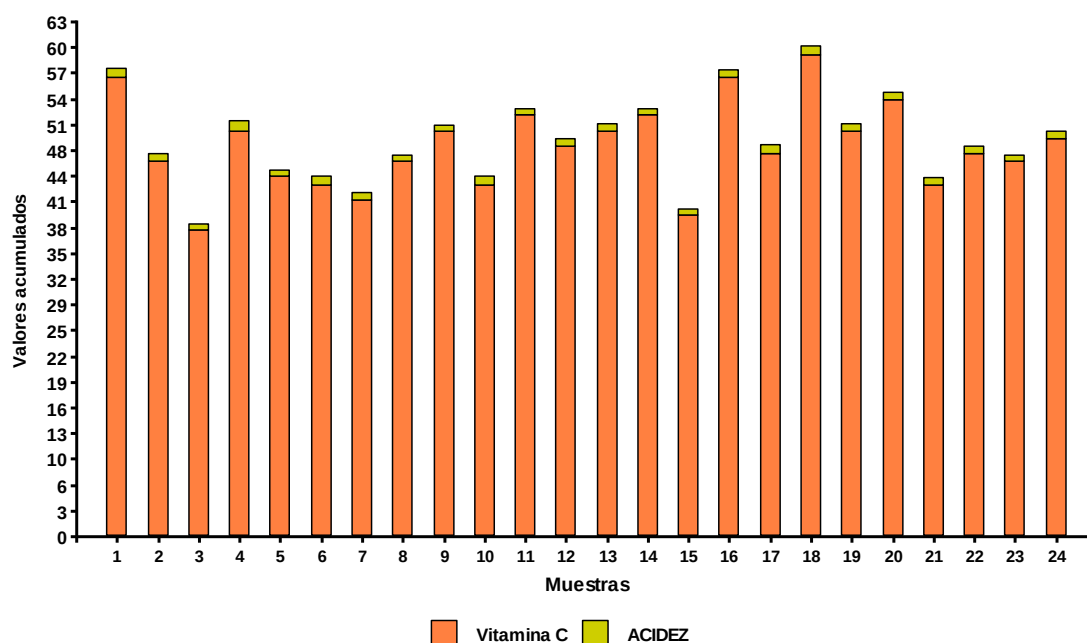


Figura Nº 2: Contenidos de vitamina C (en mg/100 mL) y ACIDEZ total (expresado en % de ácido cítrico) en jugo de tangor Murcott.

El contenido de vitamina C en jugo de naranja Valencia (41,39 mg/100 mL) (Tabla 2) fue superior a lo encontrado por Cano y Arnao (2004) quienes hallaron valores de vitamina C en jugo natural de naranja y en jugos refrigerados procedentes de exprimido de 31,2 mg/100 mL y 42,2 mg/100 mL respectivamente. Los parámetros sólidos solubles (SST) expresados en °Brix, ACIDEZ e índice de madurez o RATIO no presentaron mayores diferencias entre muestras y todos con valores superiores a los establecidos para la comercialización de los frutos según Agustí (2010). Nuestros resultados no difirieron de lo encontrado por Alayon Luaces *et al.*, (2014) para los °Brix, acidez y relación sólidos solubles/acidez los cuales presentan valores dentro del rango normal esperado para la variedad.

Tabla Nº 2: Contenido Promedio de sólidos solubles (SST) expresados en °Brix, ACIDEZ total por volumetría de neutralización (expresado en % de ácido cítrico) e índice de madurez o RATIO (relación= SST/ acidez) que indica el grado de madurez del fruto y Vitamina C (mg/100 mL) en jugo de naranja Valencia.

Variable	Valor Promedio	Mínimo	Máximo
° Brix	11,37	9,80	12,60
Acidez	0,86	0,76	1,04
Ratio	13,24	10,93	15,35
Vitamina C	41,39	31,13	52,83

Las muestras 6, 11 y 22 presentaron valores superiores a 50 mg/100 mL de vitamina C y acidez alrededor de 0,9 %, encontrándose todos los resultados de acidez muy similares entre sí (Figura 3).

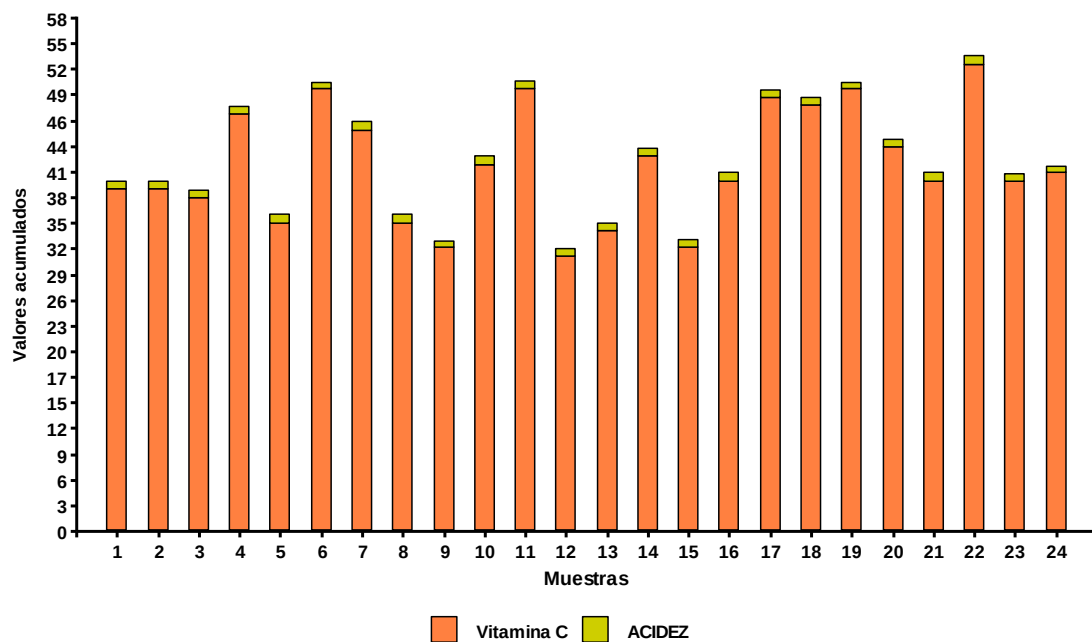


Figura Nº 3: Contenidos de vitamina C (en mg/100 mL) y ACIDEZ total (expresado en % de ácido cítrico) en jugo de naranja Valencia.

Si comparamos los contenidos de vitamina C y $^{\circ}$ Brix encontrados en las muestras de naranja se puede observar que las muestras 6, 11, 17, 18, 19 y 22 presentaron los mayores valores de vitamina C (alrededor de 49 mg/100 mL), mientras que los menores valores de $^{\circ}$ Brix se halló en las muestras 9 y 17, y las muestras 9, 12, 13, y 15 con menores contenidos de vitamina C (32 mg/100 mL) (Figura 4).

Desde el punto de vista dietético, tanto el jugo de naranja y tangor, satisface los contenidos de ácido ascórbico recomendado para consumo de una persona adulta (que es 50 mg/100 mL diario). A diferencia de otras vitaminas el humano no sintetiza vitamina C y debe incorporarla de frutas y verduras principalmente.

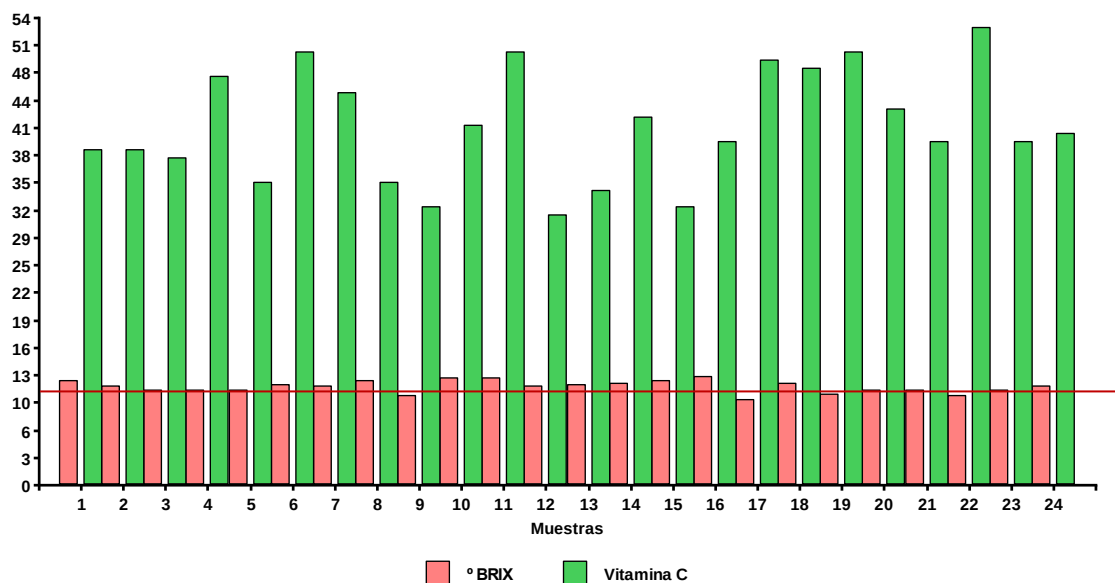


Figura Nº 3: Contenidos de vitamina C (en mg/100 mL) y Contenido de sólidos solubles (SST) expresados en °Brix en jugo de naranja Valencia.

COMENTARIOS FINALES

El trabajo de laboratorio es de suma importancia, siguiendo los protocolos en cuanto a acondicionamiento de las muestras para su análisis, las determinaciones que en la teoría se resaltan y que en la práctica se evidencian, más en los métodos donde se debe destacar la habilidad de la persona que realiza la práctica y también la del profesional a cargo que instruye, en las titulaciones donde se tiene que prestar mucha atención en el viraje de los colores de los indicadores, donde mínimas distracciones o la propia humanidad juegan un papel importante en no cometer errores y que el análisis se realice de la forma más precisa posible y arribar a resultados fidedignos.

El método por titulación visual con 2,6 diclorofenolindofenol es un método rápido y seguro para determinar el contenido de ácido ascórbico, parámetro muy adecuado para medir el valor nutritivo del alimento.

Tanto las muestras de naranja Valencia como las de tangor Murcott constituyen una buena fuente de vitamina C, que satisface las demandas diarias recomendadas para la nutrición.

BIBLIOGRAFÍA

- Agustí, M. (2010) Fruticultura. Segunda Edición. Madrid España. Ediciones Mundi Prensa. 507 pp. ISBN: 8484765296
- Alayón Luaces, P.; Rodríguez, V.A.; Piccoli, A.B.; Chabbal, M.D.; Giménez, L.I.; Martínez, G.C. Fertilización foliar con macronutrientes a plantas de naranja Valencia late (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) y tangor Murcott (*Citrus reticulata* Blanco x *Citrus sinensis* (L.) Osbeck). Rev. FCA UNCUYO. 2014. 46(1): 87-96. ISSN impreso 0370-4661. ISSN (en línea) 1853-8665.
- AOAC, Association of Official Analytical Chemist. Official Methods of Analysis. 2000. 15th Ed. Washington D.C.
- Alwazeer D., Cachon R., Divies C., 2002, "Behavior of *Lactobacillus plantarum* and *Saccharomyces cerevisiae* in fresh and thermally processed orange juice". Journal of Food Protection, 65, 1586-1589.
- Alwazeer D., Delbeau C., Divies C., Cachon R., 2003, "Use of redox potential modification by gas improves microbial quality, color retention, and ascorbic acid stability of pasteurized orange juice". International Journal of Food Microbiology, 89, 21-29.
- Agustí, M. 2003. Citricultura 2ª Edición revisada y ampliada Ediciones Mundi Prensa. Madrid. España. 422 pp.
- Bezman Y., Rouseff R. L., Naim M., 2001, "2-methyl-3-furanthiol and methional are possible offflavours in stored orange juice: aroma-similarity, NIF/SNIF GC-O, and GC analyses". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49 (1), 5425-5432.
- Blasco R., Esteve M. J., Frígola A., Rodrigo M., 2004, "Ascorbic acid degradation kinetics in mushrooms in a high-temperature short-time process controlled by a thermoresistometer". Lebensmittel Wissenschaft und Technologie, 37, 171-175.
- Cano, A.; Arnao, M. B. Actividad antioxidante hidrofílica y lipofílica y contenido en vitamina C de zumos de naranja comerciales: Relación con sus características organolépticas *Cienc. Tecnol. Aliment.* Vol. 4, No. 3, pp 185-189, 2004 www.altaga.org; Copyright 2004 Asociación de Licenciados en Ciencia y Tecnología de los Alimentos de Galicia (ALTAGA). ISSN 1135-8122.
- Chen B. H. & Chen Y. Y., 1993, "Stability of chlorophylls and carotenoids in sweet potato leaves during microwave cooking". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 41 (8), 1315-1320.
- Esteve M. J., Farré R., Frígola A., 1995a, "Changes in ascorbic acid content of green asparagus during the harvesting period and storage". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43, 2058-2061.
- Federcitrus. 2011. La actividad Citrícola Argentina. www.federcitrus.org.ar

- Halliwell B., Murcia M. A., Chirico S., Aruoma O. I., 1995, "Free radicals and antioxidants in food and "in vivo": What they do and how they work". CRC-Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 35, 7-20.
- Lee H. S. & Coates G. A., 2003, "Effect of thermal pasteurization on Valencia orange juice color and pigments". Lebensmittel Wissenschaft und Technologie, 36, 153-156.
- Lessin W. J., Catigani G. L., Schwartz S. J., 1997, "Quantification of cis-trans isomers of provitamin A carotenoids in fresh and processed fruits and vegetables". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 3728-3732.
- Manso, M. C., Oliveira F. A. R., Oliveira J. C., Frias J. M., 2001, "Modelling ascorbic acid thermal degradation and browning in orange juice: kinetics of pectinmethylesterase inactivation". Journal of Food Science, 66 (2), 328-331.
- Murata M., Shinoda Y., Homma S., 2002, "Browning of model orange juice solution and changes in the components". International Congress Series, 1245, 459-460.
- Nielsen, S. 2003. Análisis de los alimentos. Manual de laboratorio. Editorial Acribia Zaragoza. Tercera edición. España
- Palacios, J. Citricultura, Buenos Aires: Editorial Hemisferio Sur, 2005, 518 pp., ISBN 987-43-8326-7.
- Parish M. E., 1998, "Orange Juice Quality After Treatment by Thermal Pasteurization or Isostatic High Pressure". Lebensmittel Wissenschaft und Technologie, 31, 439-442.
- Polydera A. C., Galanou E., Stoforos, N. G., Taoukis P. S., 2004, "Inactivation kinetics of pectin methylesterase of greek Navel orange juice as a function of high hydrostatic pressure and temperature process conditions". Journal of Food Engineering, 62, 291-298.
- Polydera A. C., Stoforos N. G., Taoukis P. S., 2003, "Comparative shelf life study and vitamin C loss kinetics in pasteurised and high pressure processed reconstituted orange juice". Journal of Food Engineering, 60, 21-29.
- Rodrigo C., Rodrigo M., Fiszman S. M., 1997, "The impact of high temperature, short time thermal treatment on texture and weigh loss of green asparagus". Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung A., 205 (1), 53-58.
- Sancho Barrantes, E. & Baraona Cockrell, M. 2000. Fruticultura Especial 1. Cítricos. Fruticultura Especial, ISBN: 9789977645766.
- Slater T. F. & Block G., 1991, "Antioxidant vitamins and β -carotene in disease prevention". American Journal of Clinical Nutrition, 53 (5), 189-196.
- Van Der Laat S., J.E. Estudio comparativo del contenido de ácido cítrico y vitamina C en el jugo de algunas variedades de Citrus de uso popular. Revista de Biología Tropical, disponible en: <http://www.ots.ac.cr/rbt/attachments/volumes/vol2-1/04-VanDerLaat-Citrus.pdf>

- Zerdin K., Rooney M. L., Vermuë J. 2003, "The vitamin C content of orange juice packed in an oxygen scavenger material". Food Chemistry, 82, 387-395.

.....
Sr. Leiva, Daniel Oscar.

L.U. N°

Doy en conformidad el presente plan de trabajo.

.....
Ing. Agr. (Mgter.) María de las M. Yfran Elvira