



Facultad de Veterinaria  
**Universidad Zaragoza**



# Trabajo Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

EVALUACIÓN DE LA OXIDACIÓN DE LA VITAMINA C EN ZUMOS EN  
FUNCIÓN DEL ENVASE

Evaluation of the vitamin C oxidation in juice samples depending on the  
packaging

Autor/es

Nuria Martín Pérez

Correo electrónico: [648965@celes.unizar.es](mailto:648965@celes.unizar.es)

Director/es

Celia Domeño Recalde  
Margarita Aznar Ramos

Facultad de Veterinaria

2017

---

## INDICE

<b>1. RESUMEN</b> .....	<b>2</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b> .....	<b>4</b>
<b>3. ABREVIATURAS</b> .....	<b>5</b>
<b>4. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>6</b>
<b>4.1. LA VITAMINA C</b> .....	<b>6</b>
<b>4.2. EL ÁCIDO ASCÓRBICO Y EL ÁCIDO DEHIDROASCÓRBICO</b> .....	<b>7</b>
<b>4.3. ANÁLISIS DE LA VITAMINA C</b> .....	<b>9</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>15</b>
<b>5.1. REACTIVOS Y MUESTRAS</b> .....	<b>15</b>
<b>5.1.1. Patrones y disoluciones</b> .....	<b>15</b>
<b>5.1.2. Muestras</b> .....	<b>15</b>
<b>5.2. ANÁLISIS POR LC-MS/MS Y LC-UV</b> .....	<b>16</b>
<b>5.2.1. Instrumentación</b> .....	<b>16</b>
<b>5.2.2. Condiciones de análisis</b> .....	<b>17</b>
<b>5.2.3. Sistema de detección</b> .....	<b>17</b>
<b>5.2.4. Análisis cuantitativo</b> .....	<b>19</b>
<b>5.2.5. Linealidad de la recta de calibrado</b> .....	<b>19</b>
<b>5.3. ANÁLISIS DE LA VITAMINA C Y AA MEDIANTE UPLC-UV-MS/MS</b> .....	<b>19</b>
<b>5.3.1. Recta de calibrado</b> .....	<b>19</b>
<b>5.3.2. Preparación de las muestras</b> .....	<b>20</b>
<b>5.3.3. Análisis de las muestras</b> .....	<b>21</b>
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>23</b>
<b>6.1. ZUMOS DE NARANJA NATURALES</b> .....	<b>23</b>
<b>6.1.1. Evolución en el envase de cristal</b> .....	<b>23</b>
<b>6.1.2. Evolución en el envase de plástico</b> .....	<b>24</b>
<b>6.1.3. Evolución en el envase activo</b> .....	<b>25</b>
<b>6.2. ANÁLISIS DE ZUMOS COMERCIALES</b> .....	<b>26</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	<b>29</b>
<b>8. APORTACIONES EN MATERIA DE APRENDIZAJE</b> .....	<b>31</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>32</b>
<b>ANEXO I</b> .....	<b>35</b>
<b>A) CROMATOGRAMA DE LA RECTA DE CALIBRACIÓN CON MRM Y UV</b> .....	<b>35</b>
<b>B) RECTAS DE CALIBRADO CON DISTINTOS MÉTODOS DE DETECCIÓN</b> .....	<b>35</b>
<b>C) RESULTADOS OBTENIDOS DURANTE LOS ENSAYOS CON MRM</b> .....	<b>36</b>
<b>D) RESULTADOS OBTENIDOS DURANTE LOS ENSAYOS CON UV</b> .....	<b>36</b>
<b>E) RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS DE LOS ZUMOS COMERCIALES</b> .....	<b>37</b>
<b>F) RESULTADOS DEL ENSAYO CON EL DETECTOR UV</b> .....	<b>38</b>

## 1. RESUMEN

La vitamina C es un nutriente esencial hidrosoluble que se encuentra principalmente en frutas y verduras. El déficit de esta vitamina tiene como resultado la aparición de una enfermedad conocida como escorbuto.

La vitamina C es una mezcla de ácido ascórbico y su producto de oxidación, el ácido dehidroascórbico. La proporción final de los ácidos determinará la capacidad antioxidante de la vitamina C, ya que la capacidad antioxidante de cada uno de ellos es muy diferente. Actualmente, la capacidad antioxidante de un producto que se considera un parámetro de calidad en la elección de un alimento.

El ácido ascórbico tiene mayor capacidad antioxidante que el ácido dehidroascórbico, por lo que sería interesante poder determinar ambos compuestos individualmente y la evolución de la composición para conocer así la variación de la capacidad antioxidante.

Debido a la importancia nutricional de la vitamina C, se están buscando métodos sencillos y rápidos para evaluar de forma individual el ácido ascórbico y el ácido dehidroascórbico.

En este trabajo se busca determinar de forma precisa la concentración de vitamina C como suma de ácido ascórbico y ácido dehidroascórbico y ver la evolución de los mismos en las condiciones de estudio. Para ello se estudiará la influencia de los distintos tipos de envases y diferentes condiciones de conservación con respecto a la capacidad antioxidante de los zumos. Se comprobará como le afecta el tipo de envase desde el punto de vista del material, la incidencia de la luz, el tiempo transcurrido desde el envasado, la forma final de llenado y si los envases activos, de gran interés en la actualidad, pueden ayudar a su conservación.

Para la determinación de estos compuestos existen muchas técnicas, pero la mayoría de ellas consiguen la determinación por diferencia entre el contenido de vitamina C total y el contenido de ácido ascórbico. La determinación de la composición de la vitamina C se ha llevado a cabo por medio del UPLC con detección simultánea de MS/MS en tandem con UV. En el proyecto se han realizado diferentes ensayos y determinaciones. Se presentan los resultados del trabajo y las conclusiones que se han obtenido después de la finalización del proyecto.

## ABSTRACT

Vitamin C is a water-soluble essential nutrient that is mainly found in fruits and vegetables. A deficiency of this vitamin can cause the illness scurvy.

Vitamin C is a mixture of ascorbic acid and its oxidation product, dehydroascorbic acid. The final rate between the two compounds will determine the antioxidant capacity of Vitamin C, since they have very different antioxidant activity. Nowadays, the antioxidant capacity of a product is considered a quality parameter in the food choice.

Ascorbic acid has a higher antioxidant capacity than dehydroascorbic acid, therefore it would be interesting to be able to determine both compounds individually and its evolution overtime in order to evaluate changes in the antioxidant capacity.

Due to the nutritional value of vitamin C, the development of quick and simple methodologies for determining individually ascorbic acid and dehydroascorbic acid are being investigated.

This work is focused on the determination of vitamin C as the addition of ascorbic and dehydroascorbic acid and evaluate its evolution overtime in the study conditions. For this purpose, the influence of packaging and storage conditions on the antioxidant capacity of juices will be evaluated. It will be checked how different parameters can help to improve the juice state of conservation, such as the kind of packaging, the effect of light, storage time, the filling way or the use of active packaging.

There are several techniques for the determination of these compounds but most of them evaluates the difference between total vitamin C content and ascorbic acid content. Vitamin C determination has been carried out by UPLC coupled to MS/MS and UV. Different test and determinations have been performed. Results and conclusions of the work carried out are presented.

## 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El objetivo principal del proyecto es evaluar cómo afectan las condiciones del envase y la conservación a la capacidad antioxidante de la vitamina C. Para ello se estudiará la vitamina C en diferentes muestras, con diferentes envases y en distintas condiciones. Se trabajará con muestras de zumo de naranja natural y zumos comerciales. Teniendo en cuenta cómo varía la capacidad antioxidante, en función de la composición final, por la proporción de la mezcla de ácido ascórbico (AA) y su producto de oxidación ácido dehidroascórbico (DHAA), se hará la determinación individual de los ácidos.

Para evaluar la degradación de la vitamina C en función del envase que contiene la muestra, se estudiarán envases comerciales, envases de cristal, envases de plástico y un nuevo envase activo desarrollado con el fin de aumentar su conservación. Se estudiarán también la influencia de parámetros como la incidencia de la luz y el volumen de llenado, más concretamente si después del llenado queda espacio de cabeza en el envase.

También se estudiarán distintos zumos comerciales de distintas marcas, con diferentes envases y distintos tratamientos de conservación, para ver de qué forma afectan las diferentes condiciones a la vitamina C y a su capacidad antioxidante.

### 3. ABREVIATURAS

<b>Abreviatura</b>	<b>Nombre</b>
<b>AA</b>	Ácido ascórbico
<b>DHAA</b>	Ácido dehidroascórbico
<b>DKA</b>	Ácido 2,3- dicetogulónico
<b>DNPH</b>	2,4-Dinitrofenilhidrazina
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>AOAC</b>	Association of Official Analytical Chemist
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución
<b>UPLC</b>	Cromatografía líquida de ultra-alta resolución
<b>ED</b>	Detector electroquímico
<b>DF</b>	Detectores de fluorescencia
<b>MS</b>	Espectrometría de masas
<b>SIR</b>	Single Ion Recording
<b>MRM</b>	Multiple Reaction Monitoring
<b>DTT</b>	1,4-Dithiothreitol
<b>PET</b>	Polietilen Tereftalato

*Tabla 1: Abreviaturas utilizadas en el trabajo*

## **4. INTRODUCCIÓN**

### **4.1. LA VITAMINA C**

La vitamina C es un nutriente esencial, el cual se debe ingerir a través de la dieta, puesto que el ser humano no es capaz de sintetizarla. Esta vitamina hidrosoluble se encuentra principalmente en frutas y verduras y posee efectos beneficiosos para la salud. Se le asocian funciones como la síntesis del colágeno, aumento de la absorción del hierro vegetal a nivel gastrointestinal, mejora del sistema inmune, prevención de enfermedades coronarias y reducción de los niveles de colesterol, así como la prevención del cáncer. Además de esto, la acción antioxidante es la función por excelencia de la vitamina C y la propiedad que la mayoría de la población asocia con esta vitamina (Gómez et al., 2016; Mazurek & Jamroz, 2015; Herbig & Renard, 2017; Deutsch, 2000; Hernández et al., 2006; Nováková et al., 2008; Klimczak & Gliszczynska-Swigło, 2015; Zou et al., 2016; Garrido et al., 2005; Attia, 2016; Gioia et al., 2008; Gutiérrez et al., 2007; Fenoll et al., 2011).

Los alimentos con mayor contenido en vitamina C son la guayaba, el chile y el perejil con unas cantidades de 273mg, 225mg y 190mg por cada 100 gramos de alimento respectivamente. A pesar de sus altos contenidos en vitamina C, tanto el chile como el perejil no son la fuente principal de esta vitamina, ya que su consumo no es muy elevado. Algunas de las principales fuentes de esta vitamina en España son alimentos como el pimiento, las fresas y las naranjas, con unos contenidos de vitamina C de 88mg, 60mg y 50mg por cada 100 g de alimento respectivamente (BEDCA, 2017). Pese a los altos contenidos de vitamina C del pimiento, si este es tratado térmicamente durante el proceso de elaboración en el cocinado, debido a la termolabilidad de la vitamina, esta se degrada y deja de ser un buen aporte de vitamina C en la dieta.

El déficit de vitamina C en la alimentación da lugar a la aparición de escorbuto. El escorbuto es una enfermedad causada por una ingesta insuficiente de esta vitamina, que raramente ocurre en adultos, pero puede darse en bebés, personas alcohólicas o ancianos (Attia, 2016; Gioia et al., 2008). Esta enfermedad se detectó por primera vez en los siglos XV y XVI, cuando los marinos realizaban largos viajes y no tenían acceso a alimentos frescos. En 1747 James Lind demostró que con el consumo de cítricos se reducía la incidencia de esta enfermedad. Durante el siglo XIX, comenzó a desarrollarse esta enfermedad en niños que consumían leche enlatada, en lugar de leche materna o leche de vaca fresca. La leche contenía todos los nutrientes necesarios, pero debido al

tratamiento térmico aplicado a las latas, la vitamina C se degradaba y no era ingerida de forma activa por los niños (Latham, 2002; National Institutes of Health, 2016). El tratamiento y control de esta enfermedad consiste en administrar las cantidades necesarias de la vitamina para evitar el déficit (Gioia et al., 2008).

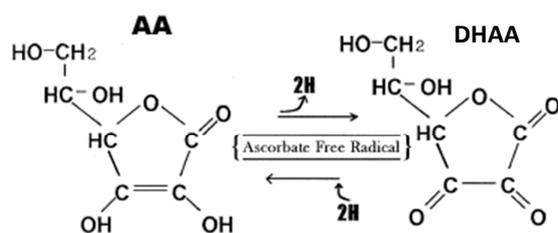
Como se ha mencionado anteriormente, la vitamina C contribuye a la formación y mantenimiento del material intracelular, principalmente del colágeno. Las personas con déficit de la vitamina presentan hemorragias, ya que las células endoteliales de los capilares son frágiles. Algo similar ocurre con la dentina y el tejido óseo ya que no se forman bien (Latham, 2002).

La vitamina C se define como la suma de dos compuestos, que son el ácido ascórbico (AA) y ácido dehidroascórbico (DHAA). Ambos tienen estructuras y propiedades físicas similares, pero no la misma capacidad antioxidante. Estos compuestos son activos biológicamente ya que son antiescorbúticos, es decir, consumir cualquiera de ellos evita la aparición de escorbuto (Boonpangrak et al., 2016; Gómez, Roux et al., 2016; Deutsch, 1998; Deutsch, 2000; Lykkesfeldt, 2000; Usaga et al., 2017). Debido a esta propiedad antiescorbútica, está incrementando cada vez más el interés de su determinación.

#### 4.2. EL ÁCIDO ASCÓRBICO Y EL ÁCIDO DEHIDROASCÓRBICO

El ácido ascórbico es el compuesto con mayor actividad antiescorbútica. Son unos cristales blancos, hidrosolubles, con sabor ácido y propiedades fuertemente reductoras, sensibles a la luz y a ciertos metales pesados.

El ácido dehidroascórbico también tiene actividad antiescorbútica pero en menor grado que el ácido ascórbico. Al igual que el AA, se presenta como unos cristales blancos solubles en agua.

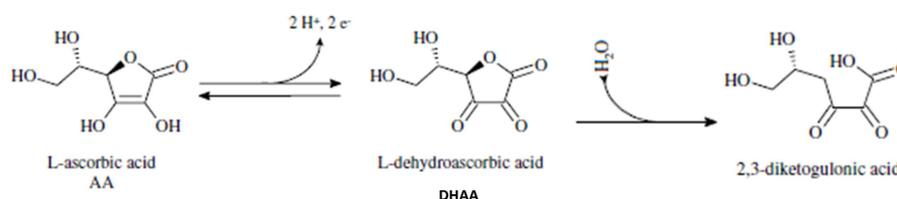


**Figura 1:** Dehydroascorbic acid. Deutsch

El ácido ascórbico y el ácido dehidroascórbico no se encuentran de forma estática, sino que están en constante cambio debido a las condiciones del medio. El ácido ascórbico se

oxidada a ácido dehidroascórbico y este a su vez puede oxidarse a ácido 2,3-dicetogulónico (DKA). El ácido dehidroascórbico también es capaz de reducirse a ácido ascórbico, de forma que se establece un equilibrio entre ambos. Tanto el AA como el DHAA tienen propiedades antioxidantes y antiescorbútics, mientras que DKA no tiene propiedades antiescorbútics (Gómez et al., 2016; Deutsch, 1998; Deutsch, 2000; Hernández et al., 2006; Odriozola et al., 2007; Fenoll et al., 2011).

Hasta la actualidad, se ha afirmado que la oxidación de DHAA a DKA es irreversible *in vivo*, pero ciertas investigaciones sugieren que los estudios se realizaron hace más de 50 años y los métodos analíticos para la determinación no eran lo suficientemente sofisticados como en la actualidad. Existen datos que sugieren que la hidrólisis de DHAA puede ser parcialmente reversible (Deutsch, 2000).



**Figura 2:** Determination of vitamin C in tropical fruits: A comparative evaluation of methods. Hernández et al., 2006

Tanto el AA como el DHAA son compuestos muy inestables en solución acuosa. Además, esta inestabilidad se potencia con distintos factores como la luz, la temperatura, el pH, etc.

El ácido ascórbico y ácido dehidroascórbico son compuestos muy susceptibles a la degradación por la luz y esto se comprobó en un estudio en el que se comparó el efecto de la luz solar y de la luz UV. El ensayo demostró que ambas luces degradaban estos compuestos, mientras que si las muestras se protegían de la acción de la luz, apenas se reducía la concentración de vitamina C (Nováková et al., 2008).

En cuanto a la temperatura, se describe como un factor clave para la estabilidad del AA y DHAA. En diversos estudios se ha demostrado que las concentraciones de estos compuestos se mantienen más altas cuando la temperatura de almacenamiento es más baja, mientras que las altas temperaturas degradan rápidamente estos compuestos (Nováková et al., 2008).

También se ha comprobado que la estabilidad es mejor en soluciones con pH bajos, ya que la formación de ascorbato (principal producto de degradación) no se ve favorecido.

La estabilidad se suele conseguir usando ácido metafosfórico como agente extractor y a veces combinado con EDTA. El EDTA también se usa como agente quelante, para mejorar la estabilidad de los compuestos frente a iones metálicos (Nováková et al., 2008).

La concentración de AA y DHAA es un factor que influye en la estabilidad de los compuestos ya que se ha demostrado que cuanto mayor es la concentración de ambos, mejor estabilidad tienen los mismos (Nováková et al., 2008).

### **4.3. ANÁLISIS DE LA VITAMINA C**

El interés por la determinación de ácido ascórbico y ácido dehidroascórbico de manera simultánea está incrementando cada vez más. Esto puede deberse a que la determinación de ambos no solo nos da como resultado la concentración de vitamina C total en el alimento, sino que permite obtener la capacidad antioxidante del mismo, conociendo las distintas concentraciones de AA (alta capacidad antioxidante) y DHAA (baja capacidad antioxidante) (Hernández et al., 2006; Nováková et al., 2008).

La determinación de ambos compuestos es un parámetro de calidad, ya que en el alimento no varía la concentración de vitamina C total, independientemente de la concentración de AA y DHAA que tenga, mientras que su capacidad antioxidante sí que varía en función de las concentraciones que tengamos de AA y DHAA. Un alimento con una determinada concentración de vitamina C y mayor concentración de AA que de DHAA tendrá mayor capacidad antioxidante que otro alimento, con la misma concentración de vitamina C total pero con menor concentración de AA y mayor concentración de DHAA (Hernández et al., 2006; Nováková et al., 2008).

La vitamina C también tiene aplicaciones tecnológicas en la industria agroalimentaria como antioxidante. La industria dispone de antioxidantes tanto naturales como sintéticos para su aplicación en los alimentos. Estos antioxidantes se consideran aditivos, ya que no se añaden con el objetivo de suplemento vitamínico, sino con una función protectora o antioxidante para el alimento. Algunos de estos aditivos son: ácido ascórbico (E-300), ascorbato de sodio, calcio o potasio (E-301, E-302 y E-303), palmitato de ascorbilo (E-304)... Estos aditivos podemos encontrarlos actuando como antioxidantes en productos de panadería, bollería, pastelería, galletas, bebidas, refrescos, salsas... Su forma de actuar consiste en oxidarse él mismo, evitando que el producto se oxide y manteniendo las cualidades del alimento intactas.

Por tanto, hay razones nutricionales y tecnológicas para el estudio del ácido ascórbico y dehidroascórbico en los alimentos. La determinación de la vitamina C se puede realizar por medio de titulaciones, fotometría, polarimetría, amperometría y cromatografía (Gómez et al., 2016).

El método oficial para la determinación de la vitamina C en zumos está descrito por la AOAC y se determina a través de una titulación. Este método es rápido, preciso y económico. El proceso consiste en oxidar el AA a DHAA, y junto a DNPH, forma un compuesto de color marrón, el cual se puede medir por medio de espectrofotometría a una longitud de onda de 540nm. La absorbancia de la muestra será directamente proporcional a la concentración de AA y DHAA en la muestra. El principal inconveniente de la determinación espectrofotométrica es que suelen presentarse múltiples interferencias causadas por distintos compuestos del alimento. Además, con este método es imposible determinar la concentración de AA y DHAA por separado (Gómez et al., 2016).

La espectrofotometría es una opción muy interesante para la cuantificación rápida y económica de AA y DHAA. La determinación de ambas debe ser por separado, ya que absorben a distintas longitudes de onda: AA absorbe a 265nm mientras que DHAA absorbe a 185-220nm. Lo más habitual es determinar la concentración de AA en la solución y, a continuación, reducir el DHAA a AA para medir de nuevo el AA total y calcular por diferencia la concentración de DHAA (Gómez et al., 2016).

Otros métodos como la electroforesis no son habituales ya que requieren invertir un tiempo y los resultados no son precisos, puesto que puede haber sobreestimaciones debido a la presencia de especies oxidables distintos a AA o no son capaces de medir DHAA (Gökmen et al, 2000).

Los métodos cromatográficos son los únicos que nos permiten conocer las concentraciones de AA y DHAA por separado. Podemos diferenciar principalmente HPLC y UPLC para este tipo de determinaciones.

Los métodos HPLC son altamente selectivos y generalmente más sensibles que los métodos espectrofotométricos o titulaciones, por esas razones suelen ser los métodos preferidos. El detector de radiación ultravioleta (UV) o el detector electroquímico (ED) son los más utilizados. Por el contrario, los detectores de fluorescencia (DF) y espectrometría de masas (MS) no son tan empleados para estas determinaciones aunque

sean más sensibles y selectivos. La razón por la que no son muy utilizados podría ser el alto gasto que implican estos métodos que hace que para análisis rutinario se prefiera otros más convencionales (Gökmen et al., 2000; Nováková et al., 2008).

La medición directa por HPLC de DHAA y AA sigue siendo aún un problema complejo ya que ambos compuestos presentan propiedades muy diferentes en cuanto a absorción en el campo ultravioleta, fluorescencia y detección electroquímica. Para poder determinarlos por separado es necesario transformar AA a DHAA o viceversa con el fin de poder determinar las concentraciones de ambos compuestos (Gökmen et al., 2000; Nováková et al., 2008).

UPLC se está convirtiendo en una técnica ampliamente utilizada ya que se sustenta en los principios cromatográficos pero presenta ventajas frente al HPLC. El motivo se debe al uso de columnas más cortas y empaquetadas con partículas más pequeñas consiguiendo unos tiempos de análisis más cortos y mejorando la eficiencia del pico (anchura) y una mejor resolución. Este método permite un menor volumen de inyección y con menor consumo de disolventes que en el HPLC. UPLC también permite la detección de compuestos en muy bajas concentraciones debido a que se mejora la relación de señal/ruido. Un inconveniente de esta técnica es que necesita instrumentación específica para UPLC (Gómez et al., 2016; Klimczak & Gliszczynska-Swigło, 2015).

Son muchos los detectores que se pueden usar tanto para UPLC como para HPLC como, por ejemplo, detector ultravioleta, detector por fluorescencia, detección electroquímica (amperométrica o coulombiométrica) y detección de espectrometría de masas (Nováková et al., 2008).

El detector ultravioleta es el más utilizado para la detección de AA. Esto se debe a que AA tiene su máximo de absorción en el rango 244-265nm. La longitud de onda más aplicada es 254nm, seguido de 245nm y 265nm. El principal problema que presenta este detector es la imposibilidad de determinar simultáneamente AA y DHAA, ya que absorben a diferentes longitudes de onda. Por tanto, primero se suele determinar el AA y, a continuación, se reduce el DHAA a AA, de forma que por diferencia podremos calcular la concentración de DHAA. El método de la diferencia es mucho más efectivo que la medida de DHAA a bajas longitudes de onda, ya que el detector no suele tener suficiente selectividad a esas longitudes de onda (Nováková et al., 2008).

La detección por fluorescencia para la determinación de AA y DHAA es compleja, ya que ninguno de los compuestos son identificables directamente para este detector y deben ser derivatizados. El proceso de derivatización es complejo y lento, y probablemente estas son las razones por las que este tipo de detector no suele ser habitual (Nováková et al., 2008).

La detección electroquímica es sensible y específica y se puede usar para la determinación de ambos compuestos. El detector es más fiable, selectivo y sensible que el detector UV y evita las interferencias con otras sustancias que no nos interesan. El problema de estos detectores es que necesitan tiempos largos de detección y es necesario conocer muy bien las condiciones y mantenerlas constantes durante el análisis, lo que hace que el método sea complejo (Nováková et al., 2008).

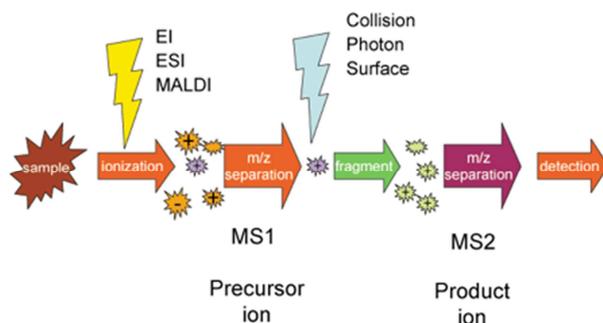
Por último, la espectrometría de masas apenas se ha empleado en estudios para la determinación de AA y DHAA, a pesar de sus ventajas de selectividad y sensibilidad. Principalmente se usan para mezclas que tienen múltiples componentes, los cuales pueden producir interferencias en las mediciones con otros tipos de métodos (Nováková et al., 2008).

La espectrometría de masas permite determinar la distribución de las moléculas de una sustancia en función de su masa. El espectrómetro de masas mide razones masa/carga de iones, calentando un haz de material del compuesto a analizar hasta vaporizarlo e ionizar los diferentes átomos. El haz de iones produce un patrón específico en el detector, que permite analizar el compuesto.

Estos iones se envían a un compartimiento de aceleración y se pasan a través de una lámina metálica. Se aplica un campo magnético a un lado del compartimiento que atrae a cada uno de los iones con la misma fuerza (suponiendo que la carga es idéntica), y se los desvía sobre un detector. Los iones más ligeros se desviarán más que los iones pesados porque la fuerza aplicada a cada ion es igual pero los iones ligeros tienen menos masa. El detector mide exactamente cómo de lejos se ha desviado cada ion, y a partir de ese dato se calcula el "cociente masa por unidad de carga". Con esta información es posible determinar con un alto nivel de certeza cuál es la composición química de la muestra original.

El detector registra la carga inducida o la corriente producida cuando un ion pasa cerca o golpea una superficie.

El uso de los métodos nombrados hasta ahora no son formas aisladas de trabajar, sino que son instrumentos que se pueden combinar para obtener mejores resultados. Hay dos ejemplos de ellos. El primero es la determinación de los compuestos por medio de un tándem MS/MS, en el que se utilizan dos espectrómetros de masas para descomponer los iones deseados en fragmentos. Esta técnica consiste en ionizar la muestra para generar una mezcla de iones los cuales se seleccionan en el primer espectrómetro de masas y, a continuación, se fragmentan y se determina con el segundo espectrómetro de masas (National High Magnetic Field Laboratory, 2015).



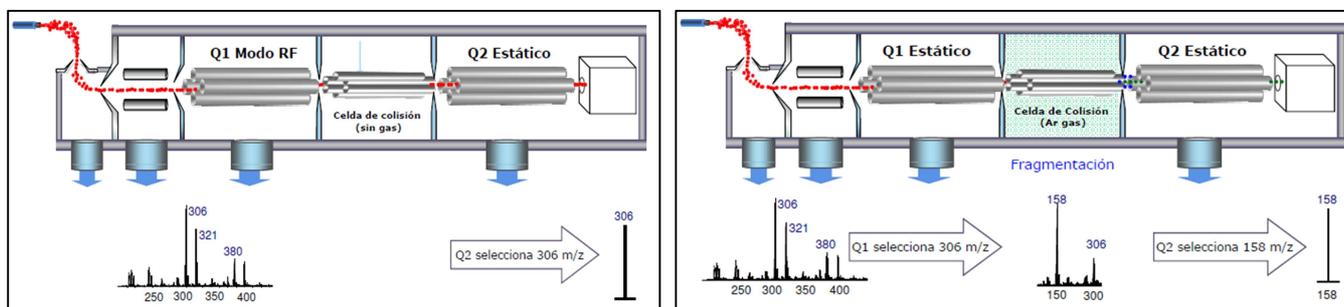
**Figura 3:** Descripción del tándem MS/MS

Otro ejemplo de ello consiste en determinar los compuestos por medio de un detector ultravioleta que cubre un amplio rango de longitudes de onda (UV- Dyode Array), el cual es capaz de dar información cualitativa además de poder conocer el tiempo de retención de los compuestos. Hay ventajas con el uso de este tipo de detectores, ya que nos permite seleccionar mejor la longitud de onda a la que se va a trabajar y, además, nos permite asegurar la pureza del pico cromatográfico (Bernal, 2015).

A pesar de disponer de todos estos equipos y métodos para poder detectar simultáneamente el AA y DHAA, sigue siendo una compleja tarea, ya que la diferencia química entre ambos compuestos es mínima. Tan solo se diferencian en 2 átomos de hidrógeno y esto hace que sean necesarios equipos muy sensibles y específicos. Por esta razón, vamos a trabajar con un detector de MS/MS, ya que es un equipo que trabaja con el peso molecular específico de los compuestos y rompe las moléculas siempre en fragmentos de tamaños determinados, haciendo que sea prácticamente imposible que otro compuesto con el mismo peso molecular se fragmente del mismo modo.

Además, trabajando con el equipo de masas del que disponemos, podemos usar dos métodos de trabajo, Single Ion Recording (SIR) y Multiple Reaction Monitoring (MRM).

En el modo SIR, el sistema está operando como un sistema de cromatografía líquida de masas de simple cuadrupolo y se monitorizan los iones con una relación  $m/z$  seleccionada. En este sistema, la celda de colisión no tiene gas (Douce et al., 2005; Pomies, 2013).



**Figura 4:** Espectrometría de masas. Pomies, 2013.

En cambio, en el sistema MRM, se está trabajando con modo selectivo y solo permite que un ion determinado llegue a la celda de colisión para su fragmentación y un fragmento específico será detectado. En la celda de colisión hay un gas que suele ser Argón. MRM se usa principalmente con fines cuantitativos ya que podemos eliminar mejor las interferencias de la matriz (Douce et al., 2005; Pomies, 2013).

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Reactivos y muestras

#### 5.1.1. Patrones y disoluciones

Los reactivos utilizados para el desarrollo del experimento se recogen en la siguiente tabla:

Reactivo	Número CAS	Casa comercial
Ácido fórmico	64-18-6	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EE.UU.)
EDTA	60-00-4	PROBUS, S.A.( Barcelona, España)
Ácido metafosfórico	37267-86-0	Alfa Aesar (Massachusetts, EE.UU.)
1,4-Dithiothreitol	3483-12-3	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EE.UU.)
L- ácido ascórbico	50-81-7	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EE.UU.)

*Tabla 2: Reactivos utilizados*

Se prepararon distintas disoluciones a lo largo del experimento: la disolución A (0,1% de ácido fórmico) como fase móvil para el UPLC; una disolución de 10% ácido metafosfórico y 0,1% EDTA (Disolución B) para el tratamiento de la muestra; y una disolución de 0,5% de DTT (Disolución C) como agente reductor.

Para la elaboración de la recta de calibrado se preparó diariamente una disolución madre de aproximadamente 1000 ppm de ácido ascórbico a partir de la cual se preparaban los distintos puntos para la recta. Su elaboración era diaria ya que el ácido ascórbico es muy susceptible a la degradación.

#### 5.1.2. Muestras

Para el desarrollo de la primera parte del experimento se compraron naranjas de la variedad Valencia/Late, que son las más usadas para los zumos de naranja. Las naranjas se exprimieron y el zumo se envasó en distintos tipos de envases, todos ellos cerrados:

- Envase de vidrio expuesto a la luz y sin espacio de cabeza
- Envase de vidrio sin exposición a la luz y sin espacio de cabeza
- Envase de vidrio expuesto a la luz y con espacio de cabeza
- Envase de vidrio sin exposición a la luz y con espacio de cabeza
- Envase de plástico sin exposición a la luz y sin espacio de cabeza
- Envase de plástico con exposición a la luz y con espacio de cabeza
- Bolsa control para el envase activo

- Envase activo con nanopartículas de selenio



*Figura 5: Muestras en diferentes envases.*

Además, se estudiaron distintos zumos comerciales (100% zumo de naranja) con el objetivo de poder comparar las diferentes concentraciones de vitamina C, AA y DHAA en zumos que han recibido diferentes tratamientos térmicos; zumos con distintas fechas de caducidad; zumos que han sido envasados con y sin pulpa; y zumos con ácido ascórbico como ingrediente, así como zumos de marca blanca.

Marca	Tratamiento térmico	Fecha de caducidad	Tipo de envase	Características	Identificación de la muestra
<b>Zumosol</b>	Pasteurización	05/09/2017	Plástico (PET)	Con pulpa	Com. 1
<b>Zumosol</b>	Pasteurización	01/10/2017	Plástico (PET)	Con pulpa	Com. 2
<b>Zumosol</b>	UHT	21/01/2018	Plástico (PET)	Con pulpa	Com. 3
<b>Don Simón</b>	UHT	10/03/2018	Tetrabrik	Con pulpa.	Com. 4
<b>Don Simón</b>	UHT	28/03/2018	Tetrabrik	Sin pulpa	Com. 5
<b>So natural</b>	Pasteurización	02/07/2017	Plástico	Con AA como ingrediente	Com. 6
<b>Marca blanca</b>	UHT	31/03/2018	Tetrabrik	Con pulpa	Com. 7

*Tabla 3: Muestras de zumo comercial utilizadas en el ensayo*

## 5.2. Análisis por LC-MS/MS y LC- UV

### 5.2.1. Instrumentación

La cromatografía se llevó a cabo en un sistema Acquity utilizando una columna Acquity UPLC BEH C18 con un tamaño de partícula de 1,7 micras (100mm x 2,1 mm), ambos de Waters. El equipo tiene instalados dos detectores en serie: Dyode Array (UV) y MRM, lo que permite la determinación de los compuestos por dos métodos diferentes.

Las condiciones del UPLC se optimizaron para conseguir una buena resolución y sensibilidad cromatográfica. Se evaluaron diferentes parámetros como por ejemplo la composición de la fase móvil. La cromatografía se llevó a cabo con un flujo de columna de 0,2 mL/min. Como fase móvil se usó al 100% una disolución de agua con 0,1% de ácido fórmico (disolución A).



*Figura 5: Equipo de UPLC-MS/MS empleado durante los ensayos*

### 5.2.2. Condiciones de análisis

Las condiciones del equipo para el análisis se recogen en el siguiente cuadro:

<b>Flujo</b>	0,2 mL/min
<b>Volumen de inyección</b>	10 $\mu$ L
<b>Voltaje capilar</b>	2,5 kV
<b>Voltaje de cono</b>	30 V
<b>Voltaje extractor</b>	3 V
<b>Voltaje RF lente</b>	0,2 V
<b>Temperatura de la fuente</b>	125°C
<b>Temperatura del gas de desolvatación</b>	450°C
<b>Flujo del gas de desolvatación</b>	650 L/h
<b>Flujo del gas de cono</b>	40 L/h

*Tabla 4: Parámetros instrumentales.*

Para la medida de MRM el tamaño de 175 m/z se fragmenta en dos de menor tamaño los cuales son 87 y 115 obtenidos con un patron de AA. El area formada por los fragmentos de 115 m/z se utiliza para confirmar y el area formada por los fragmentos de 87 m/z se utiliza para cuantificar.

En cuanto al detector UV la longitud de onda empleada para la detección de ácido ascórbico es 245 nm.

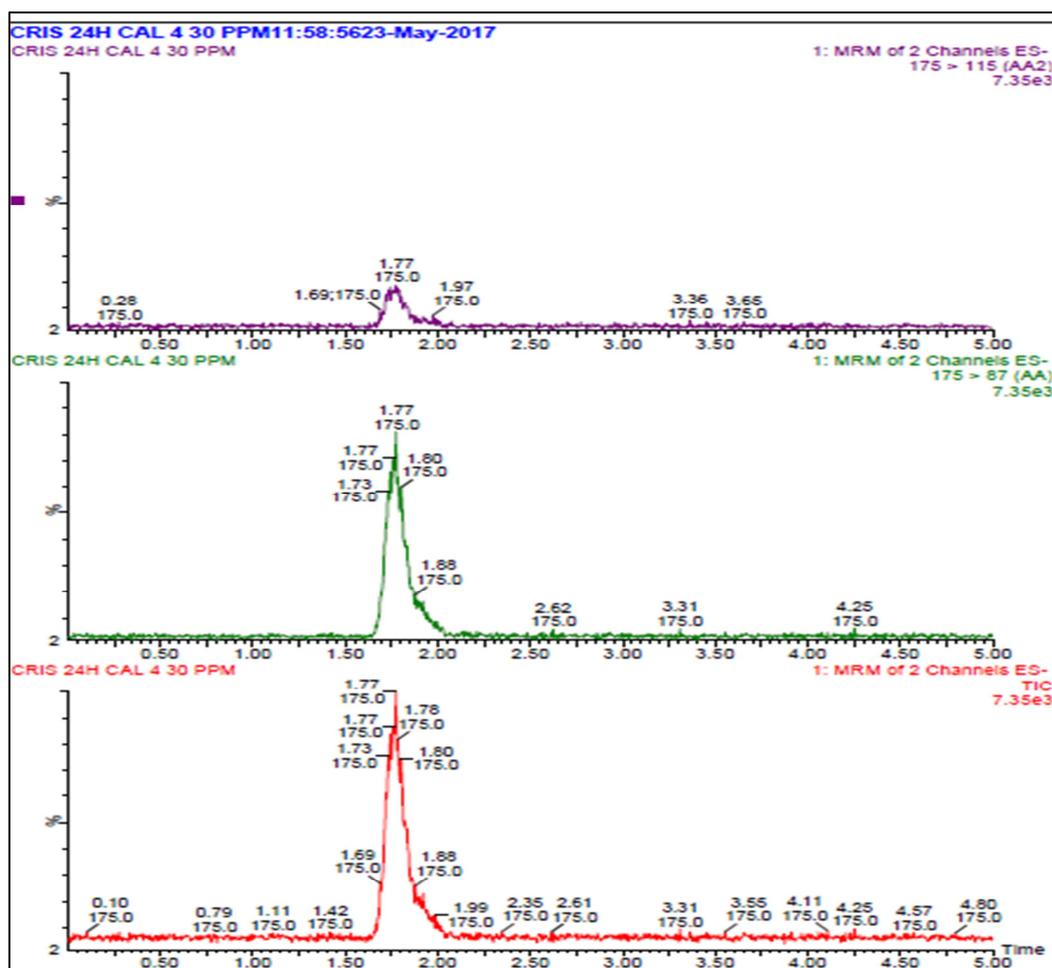
### 5.2.3. Sistema de detección

Antes de comenzar el experimento, se hicieron pruebas con diferentes métodos de detección para comprobar cuál era la mejor.

Inicialmente se hicieron pruebas con el patrón, para ver los resultados con el detector UV y el SIR y a continuación con UV y MRM.

Ambas combinaciones dieron muy buenos resultados, pero el detector UV da resultados menos precisos que el detector de masas. Los resultados menos precisos se deben a que en la muestra hay otros componentes que pueden absorber a esa misma longitud de onda y causar interferencias en la medida, mientras que el detector de masas (tanto SIR como MRM) es mucho más específico.

El sistema SIR detecta la señal masa/carga que nosotros seleccionamos, en nuestro caso es 175 m/z que corresponde al AA. Es específico porque solo nos indicará la presencia de las moléculas que respondan a esa relación. Por el contrario, el sistema MRM es aún más específico que SIR puesto que primero se ioniza la molécula (como en el sistema SIR), pero luego se fragmenta obteniendo de la misma molécula dos “hijos”. En este caso la molécula se fragmenta de 175 m/z  $\rightarrow$  87 m/z y de 175 m/z  $\rightarrow$  115 m/z y es lo que el detector recoge. La especificidad de MRM es muchísimo mayor, ya que la probabilidad de que una molécula de 175 m/z se fragmente en dos “hijos” de esos mismos tamaños es ínfima.



**Figura 6:** Cromatograma de un punto de la recta mostrando el cromatograma de MRM, y las transiciones 175 m/z  $\rightarrow$  87 m/z y de 175 m/z  $\rightarrow$  115 m/z

#### **5.2.4. Análisis cuantitativo**

Para valorar que método de detección se adaptaba mejor a nuestro equipo y nuestras necesidades, hicimos una recta de calibrado con varios puntos, y se obtuvieron las rectas de calibrado recogidas en el Anexo I.

En función de los resultados obtenidos con las rectas de calibrado, decidimos trabajar con MRM, ya que es el método más preciso y reproducible.

#### **5.2.5. Linealidad de la recta de calibrado**

De forma previa al análisis es necesario estudiar la linealidad de la respuesta del detector para poder trabajar dentro del rango lineal. Para ello se inyectan distintas concentraciones del analito y se representa la respuesta. Se inyectaron disoluciones en el rango de 5-120 ppm y se observó que para MRM la recta perdía su linealidad a partir de 80 ppm, mientras que con el detector UV, a concentraciones de 120 ppm la recta mantenía su linealidad. Esto se debe a la sensibilidad de ambos detectores. MRM es un detector muy sensible y puede saturarse a altas concentraciones por lo que es necesario trabajar a bajas concentraciones para obtener buenos resultados, mientras que el detector ultravioleta presenta menor sensibilidad, por lo que es preferible trabajar a mayores concentraciones. Trabajar fuera del rango de linealidad implicaría errores en la interpretación de los resultados.

### **5.3. Análisis de la vitamina C y AA mediante UPLC–UV–MS/MS**

#### **5.3.1. Recta de calibrado**

Las rectas de calibrado se prepararon diariamente y se inyectaron antes de las muestras para evitar el efecto de la degradación del AA.

Para hacer las rectas de calibrado se preparó diariamente una disolución madre de aproximadamente 1000 ppm con el patrón de ácido ascórbico protegido de la luz para evitar así su oxidación. A partir de la solución madre se prepararon 7 puntos de la recta con concentraciones de 10, 20, 30, 60, 90, 120 y 160 ppm de AA en viales de 20 ml. Todos los viales estaban protegidos de la luz para evitar la oxidación del AA.

En viales especiales de color ámbar de 2 mL se pone 1 mL de la disolución B y 1 mL de cada uno de los puntos de la recta de calibrado, repitiendo este proceso para todos los puntos de la recta. Añadiendo la disolución B a cada uno de los puntos, conseguimos

que no se oxide la recta patrón, pero también reducimos a la mitad la concentración, por lo que las concentraciones finales inyectadas son: 5, 10, 15, 30, 45, 60 y 80 ppm.

En el Anexo I se adjuntan los cromatogramas de la recta de calibración.

### 5.3.2. Preparación de las muestras

Para la preparación de las muestras se exprimió el zumo de varias naranjas con un exprimidor limitando el paso de parte de la pulpa. Tras la obtención del zumo, este se envasó en recipientes de distintos materiales como: cristal, plástico y un envase activo.

En cada uno de estos materiales se prepararon muestras con distinta condiciones de envasado para estudiar el efecto de la luz, del espacio de cabeza en el envase y del paso del tiempo.

Los **recipientes de cristal** eran tubos de 20 mL con tapón metálico. En este caso se envasaron 2 recipientes sin espacio de cabeza, y a uno de ellos se le protegió de la luz con papel de aluminio. Otros dos recipientes se envasaron con espacio de cabeza, llenando el recipiente de cristal con 15mL de zumo y tapándolos a continuación. Uno de estos tubos se protegió de la luz con papel de aluminio.



*Figura 7: Muestras de zumo natural en envase de cristal*

En cuanto a los **recipientes de plástico** eran tubos de 30 mL. En este caso se quiso someter al zumo a las mejores y peores condiciones teóricas de envasado. Por ello se envaso el zumo en un recipiente de plástico sin espacio de cabeza y con protección de la luz cubriéndolo con papel de aluminio. Y por otro lado se envasaron 25 mL de zumo dejando espacio de cabeza y sin protección a la luz.

Por último, se elaboraron **bolsas de envase activo**. El envase que se utilizó está desarrollado por el grupo de investigación y demostrado su funcionamiento como envase activo (Vera et al., 2016). Por un lado se elaboró el envase control, que consistía en un polímero que formaba el envase pero sin la sustancia activa; y por otro lado se

elaboró el envase a partir del mismo polímero pero con el compuesto activo en el interior, concretamente las nanopartículas de selenio. Con los materiales se formaron bolsas por termosellado para envasar el zumo. El envasado de estas bolsas se hizo sin espacio de cabeza y sin protección a la luz.

De cada una de las condiciones mencionadas, se prepararon 6 réplicas de forma que para cada análisis se tomaba una muestra, manteniendo las condiciones del resto de viales constantes.

Una vez envasado el zumo, las muestras se guardaban en refrigeración.

### **5.3.3. Análisis de las muestras**

Para el análisis se tomaba una muestra envasada desde el primer día y que por tanto no ha sido abierta en ningún momento previo al análisis. El procedimiento consiste en analizar el AA presente en la muestra, posteriormente se reduce todo el DHAA para que se transforme en AA y se vuelve a medir el AA. La diferencia entre los resultados obtenidos al inicio y al final será la cantidad de DHAA.

La muestra envasada se pasa a un tubo cónico de cristal y se centrifuga durante 8 minutos a 2000 rpm, con la finalidad de depositar el máximo de pulpa posible y los solutos de gran tamaño que obstruyen la punta de la pipeta automática para coger el volumen necesario de muestra.

Una vez centrifugado el zumo, se toma 1 mL del sobrenadante y se mezcla con 1 mL de la disolución B. La disolución B se ha añadido para evitar que el AA se oxide a DHAA.

Tras la mezcla del zumo con la disolución B, se homogeneizó la muestra y se centrifugó 6 minutos a 2000 rpm para asegurar el correcto mezclado y el depósito de los posibles sólidos que han quedado en la muestra.

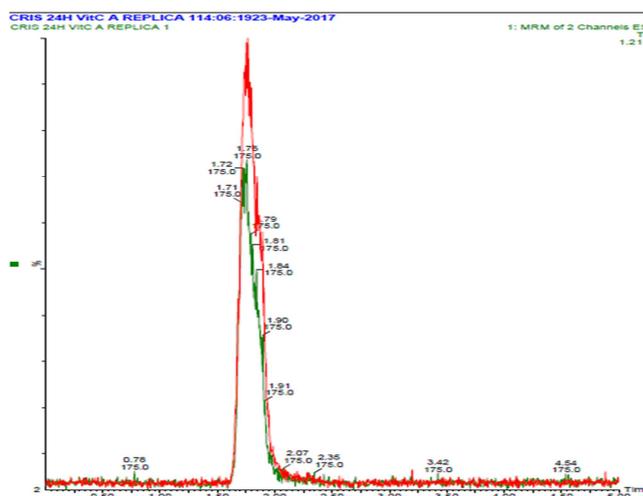
A continuación, el proceso se divide en dos partes. Por un lado, se toma 1 mL del sobrenadante y se le añade 1 mL de disolución B, se homogeneiza y se pasa a un vial color ámbar el cual se meterá al equipo para determinar la concentración de AA presente en el zumo.

Por otro lado, se toma 1 mL del sobrenadante que se mezcla con 1 mL de disolución C, se homogeneiza y se mantiene a temperatura ambiente, en oscuridad y agitación durante 60 minutos. Tras el periodo de incubación, se mete la muestra en un vial color ámbar.

La disolución C se añadió para reducir el DHAA a AA y poder medir en el equipo la concentración de AA total. La medida resultante será la vitamina C total en la muestra.

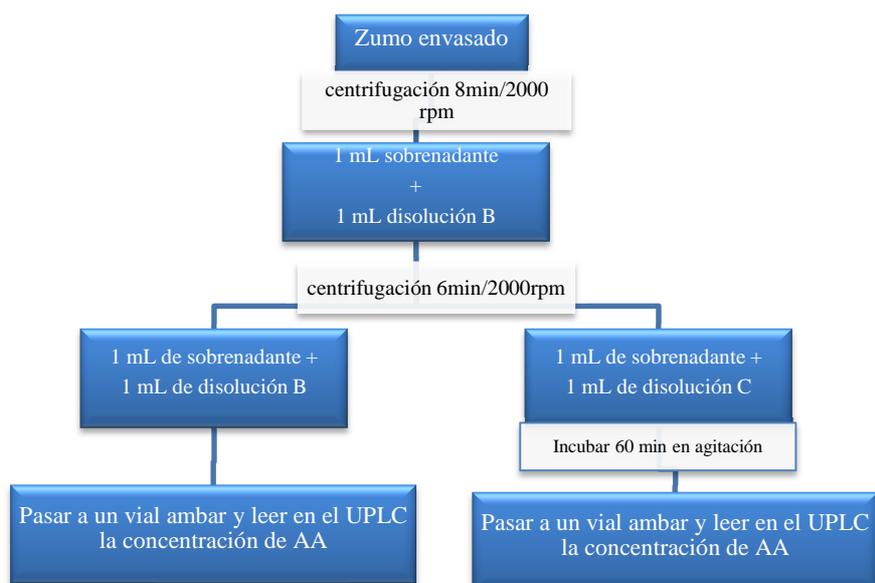
Se hacen dos replicas con cada muestra, para poder evitar posibles errores de medida. Se aplicó este procedimiento para cada una de las muestras.

Los viales color ámbar se introducen al UPLC para medir la concentración de AA y vitamina C total en la muestra.



**Figura 8:** Cromatograma de AA y vitamina C superpuestos.

A lo largo de todo el ensayo se trabajó con viales color ámbar para evitar la degradación del AA por acción de la luz.



**Figura 9:** Protocolo del análisis de las muestras.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Zumos de naranja naturales

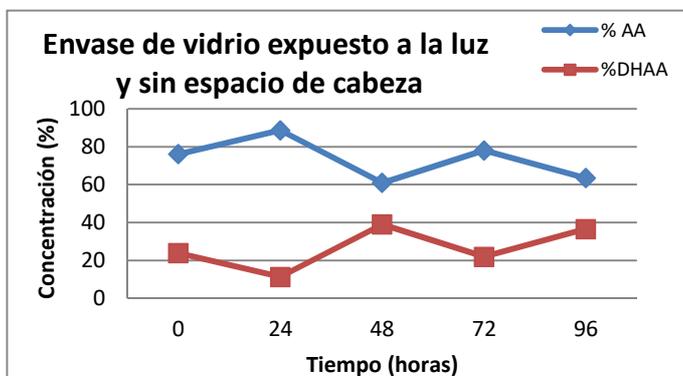
Todas las muestras se analizaron por duplicado para reducir los errores en la medida, y se midieron con el detector de MS/MS y UV. A pesar de ello, los resultados comentados son los obtenidos por MRM, ya que es más sensible y reproducible. Los datos se recogen en el Anexo I.

Los valores de vitamina C oscilan en los envases de cristal de 259,03 ppm a 176,02 ppm; en los envases de plástico de 299,85 ppm a 187,00 ppm ; y en el envase activo 314,43 ppm a 183,36 ppm.

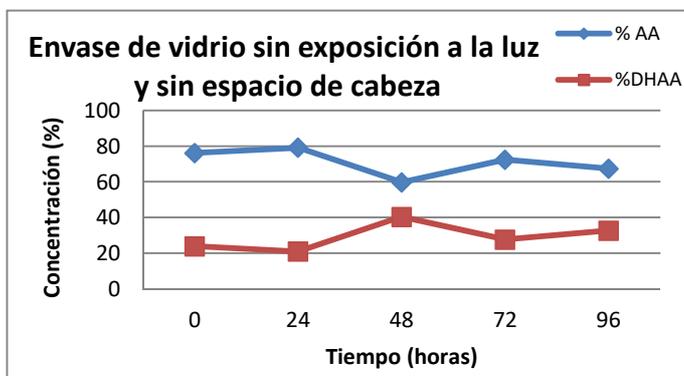
La concentración de DHAA se calculó por diferencia, por tanto no se ha tenido en cuenta que parte de la vitamina C puede estar en forma de DKA.

#### 6.1.1. Evolución en el envase de cristal

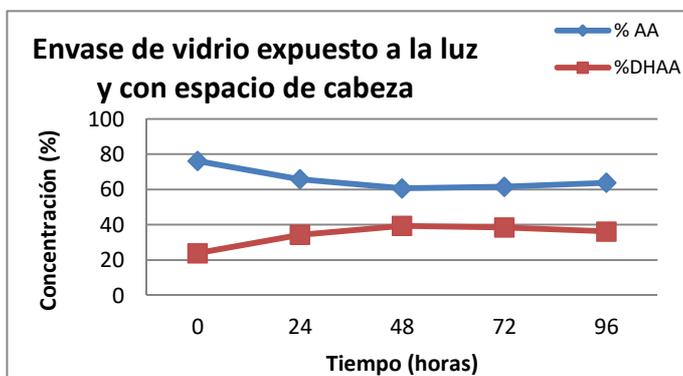
Las muestras de zumo envasadas en recipientes de cristal se sometieron a diferentes condiciones para poder evaluar de qué manera afectaban las diferentes condiciones en este tipo de envasado. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:



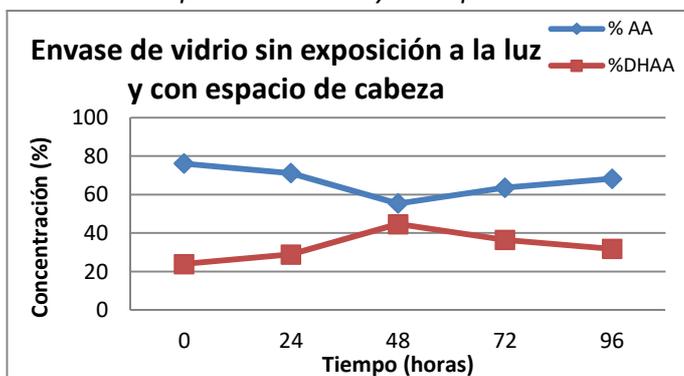
**Gráfica 1:** Concentración de AA y DHAA en envase de vidrio expuesto a la luz y sin espacio de cabeza



**Gráfica 2:** Concentración de AA y DHAA en envase de vidrio sin exposición a la luz y sin espacio de cabeza



**Gráfica 3:** Concentración de AA y DHAA en envase de vidrio expuesto a la luz y con espacio de cabeza



**Gráfica 4:** Concentración de AA y DHAA en envase de vidrio sin exposición a la luz y con espacio de cabeza

Como se puede observar en las gráficas, el contenido de AA y DHAA va cambiando con el tiempo, disminuyendo la proporción de AA.

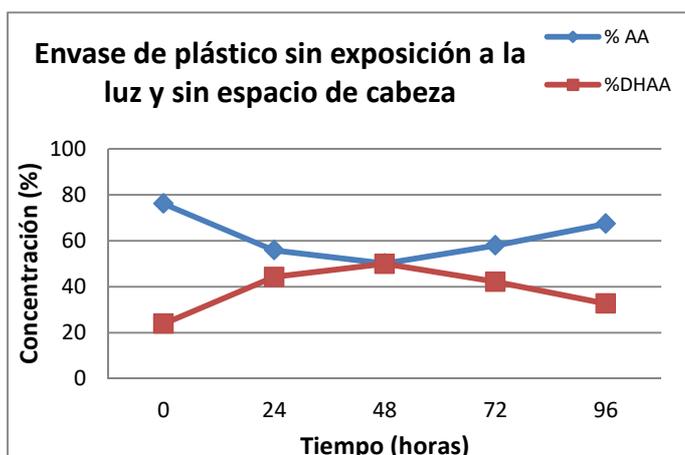
Se plantearon estas cuatro situaciones puesto que la luz y el oxígeno son factores determinantes para la degradación del AA a DHAA. Se quiso evaluar con estas situaciones cual era el factor más determinante en cuanto a la degradación del ácido ascórbico, y se ha observado:

- En los dos envases que no tienen espacio de cabeza, se observa un ligero aumento en las primeras 24 horas de la concentración de AA y a partir de este momento comienza a reducirse la concentración de AA en ambos casos. Se forma un pico en la medición de las 48 horas, lo que se desconoce si puede ser un error en la medición, o que realmente por la dinámica del equilibrio en el zumo esta concentración de AA se disminuye para aumentar nuevamente al día siguiente.
- Comparando las gráficas que corresponden a los envases con espacio de cabeza, en ambas gráficas se observa un descenso paulatino de la concentración de AA a lo largo del experimento. Esto puede ser debido a que el oxígeno del espacio de cabeza va degradando el AA, hasta que el oxígeno del espacio de cabeza desaparece. Una vez que el oxígeno del espacio de cabeza desaparece, la oxidación del AA sería más lenta.
- Si nos detenemos a valorar el efecto de la luz en los diferentes envases, no es tan importante como la presencia de oxígeno en la muestra, ya que los envases con luz tienen prácticamente la misma concentración de AA y DHAA a las 96 horas. Lo mismo ocurre con los envases que están protegidos de la luz solar, entre ellos tienen la misma concentración de AA y DHAA a las 96 horas. También hay que destacar, que las muestras se guardaron en nevera, de forma que no le daba la luz solar durante el almacenamiento, por lo que este factor no se puede valorar de forma correcta.

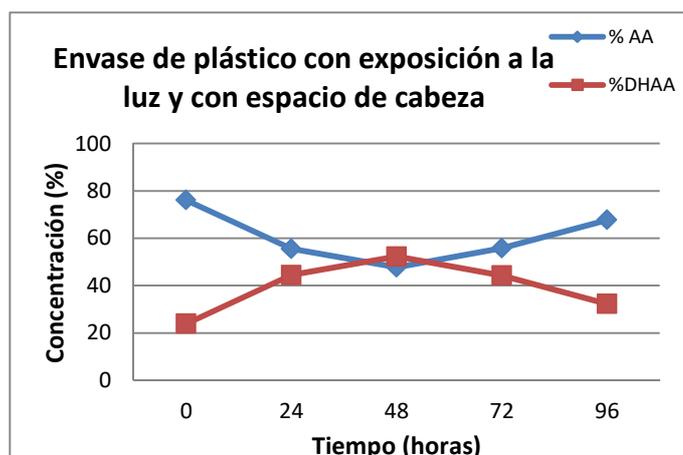
### **6.1.2. Evolución en el envase de plástico**

Para el envase de plástico, se planteó someter al zumo de naranja a las mejores y peores condiciones teóricas. La mejor condición teórica para evitar la oxidación del zumo es la protección de la luz y evitar el espacio de cabeza evitando así que el oxígeno degrade al AA. Por otro lado, se envasó un zumo sometiéndole a las condiciones teóricamente más favorables para su oxidación que serían la exposición a la luz y el contacto con el

oxígeno debido al espacio de cabeza. Los resultados obtenidos se reflejan en las siguientes gráficas:



**Gráfica 5:** Concentración de AA y DHAA en envase de plástico sin exposición a la luz y sin espacio de cabeza



**Gráfica 6:** Concentración de AA y DHAA en envase de plástico con exposición a la luz y con espacio de cabeza

En ambas gráficas se ve un descenso de la concentración de AA en las primeras 48 horas y un posterior aumento del mismo sin llegar a tener la misma concentración que al inicio pero con tendencia ascendente en ambos casos.

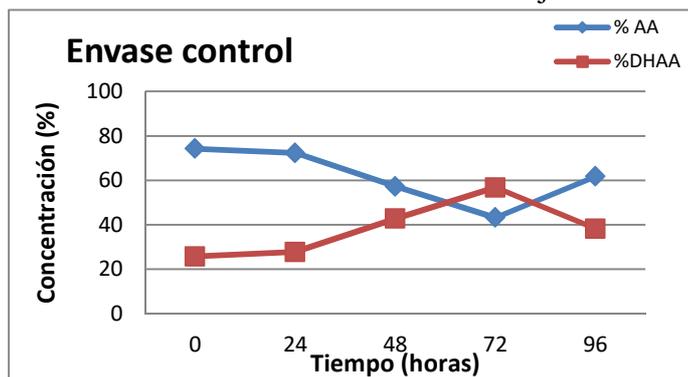
La posible causa de ese aumento de AA, podría deberse al constante equilibrio del AA y DHAA, que en algunas condiciones puede ser reversible.

### 6.1.3. Evolución en el envase activo

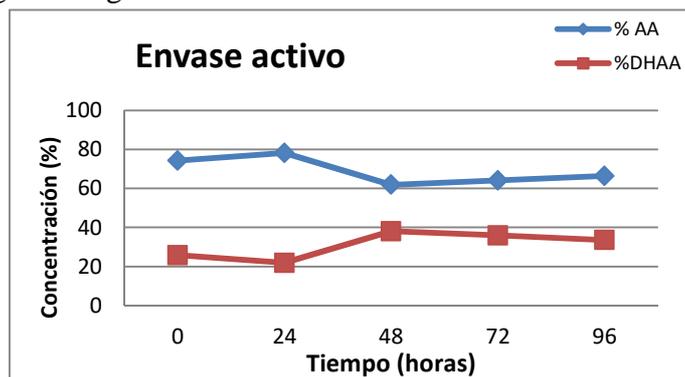
Debido al interés actual por los envases activos para la conservación de los alimentos, se ha decidido probar un envase activo con propiedades antioxidantes y ver cómo puede influir en la conservación de la vitamina C para las muestras de zumo de naranja.

En este caso se han utilizado bolsas de Polietileno con nanopartículas de selenio para comprobar si son interesantes para el zumo de naranja. Se envasaron muestras de zumo en unas bolsas con nanopartículas de selenio y otras bolsas con los mismos componentes excepto las nanopartículas de selenio (como control) para poder comparar la evolución de ambos.

Los resultados obtenidos se reflejan en las siguientes gráficas:



**Gráfica 7:** Concentración de AA y DHAA en bolsa control



**Gráfica 8:** Concentración de AA y DHAA en bolsa con nanopartículas de selenio (envase activo).

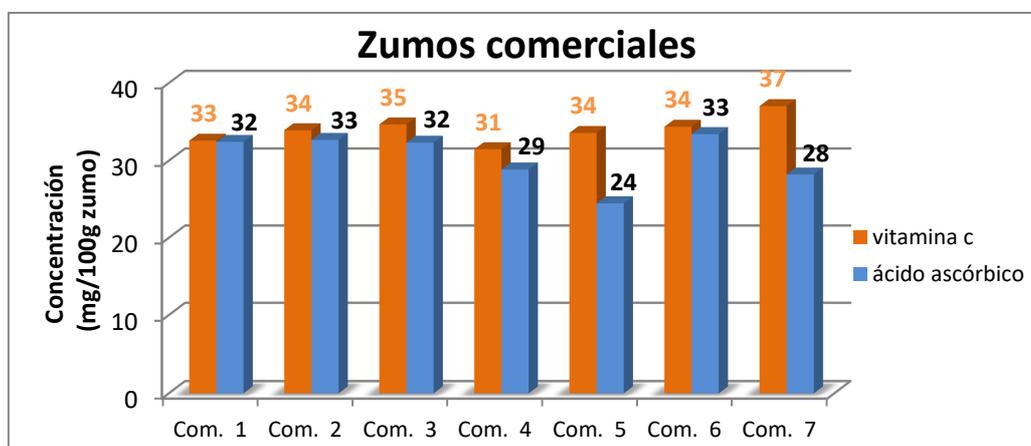
Como se observa en las gráficas, el AA en la bolsa control disminuye paulatinamente hasta las 72 horas incrementando incluso, la concentración de DHAA por encima de la concentración de AA.

Por el contrario, en el envase activo vemos que al inicio hay un ligero aumento de la concentración de AA y a las 48 horas de envasado una pequeña disminución de la concentración de AA, pero a partir de este momento se mantienen más o menos constantes las concentraciones de AA en el tiempo.

Con el mismo tiempo de almacenamiento, la concentración de AA ha disminuido más rápido en la bolsa control que en el envase activo, lo que nos indica que el envase activo da muy buenos resultados para evitar la oxidación del AA.

## 6.2. Análisis de zumos comerciales

Se compararon en un supermercado distintas marcas comerciales zumos de naranja con distintos tratamientos térmicos, envases y diferentes fechas de caducidad. Los resultados obtenidos del análisis de los zumos son los siguientes:



**Gráfica 7:** Resultado del análisis de vitamina C y AA en los zumos comerciales

Los resultados obtenidos se van a estudiar desde diferentes ángulos para poder comparar entre ellos.

- En función del **tratamiento térmico**. Los zumos de la marca ZUMOSOL (comercial 1, 2 y 3) podemos ver que tienen aproximadamente el mismo contenido total de vitamina C, a pesar de que no todos tienen la misma fecha de caducidad. Se puede observar que el zumo que ha recibido un tratamiento UHT tiene ligeramente reducida su capacidad antioxidante (90% de AA), mientras que en los zumos pasteurizados prácticamente se conserva su capacidad antioxidante al 100%.
- En función de la **fecha de caducidad**. Para evaluar este parámetro, podemos comparar los dos zumos ZUMOSOL pasteurizados, ya que tienen el mismo envase, ambos tienen pulpa y han recibido el mismo tratamiento térmico. La fecha de caducidad de los zumos varía en un mes, y podemos ver que apenas varía el contenido de vitamina C ni su capacidad antioxidante. Estos zumos tienen una vida útil corta, por lo que podría ser la razón por la que apenas se degrada su capacidad antioxidante.
- En función del **tipo de envase**. En los zumos comerciales estudiados, hay principalmente 2 tipos de envases: plástico (PET) y tetrabrik. Para la comparación utilizaremos los zumos con un mismo tratamiento térmico (UHT), con pulpa y similares fechas de caducidad. Los zumos que vamos a comparar son: ZUMOSOL y Don Simón (comercial 3 y 4). El contenido de vitamina C del envase es prácticamente idéntico y la capacidad antioxidante de ambos también, ya que en ZUMOSOL tenemos un 91% de AA y en Don Simón tenemos 94%. Por tanto podríamos decir que ambos envases son adecuados para la conservación de los zumos.
- En función de la **marca comercial**. La mayoría de los zumos estudiados en este ensayo son zumos de primeras marcas en el mercado, pero es interesante conocer hasta qué punto son mejores, en cuanto a capacidad antioxidante y vitamina C se refiere, los zumos de primeras marcas o de marcas blancas. Si comparamos dos zumos (comercial 4 y 7) con el mismo envase, tratamiento térmico, presencia de pulpa y fecha de caducidad, se puede observar que el contenido de vitamina C es muy similar, siendo ligeramente superior el de marca blanca. Pero en cuanto a capacidad antioxidante se refiere, el zumo de la marca Don Simón posee un 94% de AA mientras que el zumo de marca blanca tiene un

- contenido de 76% de AA. Por lo tanto, se podría decir que en este caso el zumo de marca blanca es de peor calidad antioxidante que la marca Don Simón. Esto podría ser debido a la calidad del proceso de producción, ya que una mala manipulación de la materia prima e incluso un tratamiento térmico excesivo o mal aplicado, podría tener consecuencias en la capacidad antioxidante del zumo.
- En función de la **presencia o ausencia de pulpa**. En este caso compararemos los zumos comerciales 4 y 5, ya que son zumos de la misma marca, con el mismo tratamiento térmico, mismo envase y misma fecha de caducidad. Podemos ver en la gráfica que el contenido de vitamina C es muy similar, pero la capacidad antioxidante se ve claramente modificada, puesto que el zumo con pulpa contiene un 94% de AA, mientras que el zumo sin pulpa tiene un contenido de AA de 71%. Estas variaciones pueden deberse al procesado que se utiliza para la eliminación de la pulpa en el zumo. Podría ser un proceso que oxide mucho al ácido ascórbico y reduzca su contenido en el producto final.
  - Por último, hay un zumo comercial que no se ha comentado hasta ahora, y es un zumo que venden como natural y con propiedades antioxidantes. Este producto contiene ácido ascórbico como ingrediente marcado en el etiquetado como se indica en el Real Decreto 781/2013 y el Reglamento 1333/2008. Los resultados de este zumo corresponden a los identificados como comercial 6. Podemos ver que su contenido de vitamina C no es superior al resto, y su capacidad antioxidante es similar al resto de zumos pasteurizados. Por lo que la necesidad de adición de AA como antioxidante podría deberse al tipo de envase (puesto que degradaría el ácido ascórbico), o de tratamiento térmico. También me parece importante destacar que es visualmente diferente al resto de zumos, lo que no podría justificar si se debe a un procesado del zumo diferente o una estrategia comercial.

## 7. CONCLUSIONES

Analizando los resultados obtenidos durante los ensayos realizados, hemos obtenido las siguientes conclusiones:

- En los zumos naturales:
  - La presencia de oxígeno en el espacio de cabeza es un parámetro que influye mucho ya que degrada rápidamente el AA y como consecuencia su capacidad antioxidante se reduce.
  - Los zumos protegidos de la luz solar y los que no se han protegido, presentan valores muy similares, tal vez provocado por la conservación en nevera no se verían muy afectados por la incidencia de la luz.
  - En el zumo envasado en recipiente de plástico se degrada más rápido el AA y por tanto la capacidad antioxidante del zumo, por lo que se puede deducir que su conservación es mejor en el envase de cristal.
  - El envase activo es muy eficaz frente a la oxidación del AA ya que se mantiene durante el tiempo de estudio de forma más estable que en el resto de los envases.
  - Los resultados obtenidos con los zumos naturales deberían estudiarse durante largos periodos de almacenamiento para observar la evolución de la vitamina C y AA. Con ello comprobaríamos si las oscilaciones de AA que se reflejan en este ensayo son debidos al equilibrio que se establece entre el AA y DHAA.
- Los zumos comerciales:
  - Los zumos comerciales que no reciben tratamientos térmicos muy intensos como sería la pasteurización, conservan mejor su capacidad antioxidante que los que reciben un tratamiento UHT.
  - La capacidad antioxidante no varía mucho en zumos pasteurizados con diferentes fechas de caducidad.
  - Tanto el envase PET como el Tetrabrik son envases adecuados puesto que se mantiene su capacidad antioxidante.
  - Las marcas blancas conservan peor la capacidad antioxidante que los zumos de primeras marcas.
  - La ausencia de pulpa implica una disminución de la capacidad antioxidante frente al zumo con pulpa.
  - Los zumos con AA como ingrediente (zumos DETOX) presentan valores muy similares a zumos pasteurizados, pero la diferencia de precio es mucho mayor.

## CONCLUSIONS

After the analysis of the results the following conclusions have been obtained:

- Natural juices
  - The presence of oxygen in the packaging with headspace is a parameters with a high influence since AA is quickly oxidized and as a consequence, the antioxidant capacity decreases
  - Juices protected from sunlight and those that were not protected showed very similar values, probably because they were stored inside a fridge and they were not very affected by light.
  - Active packaging was very effective for avoiding AA oxidation since its concentration was more stable overtime than in standard packaging.
  - Juices should be evaluated during longer storage periods in order to study the evolution of vitamin C and AA. In this way, it would be checked if the AA variations observed were due to the equilibrium between AA and DHAA.
- Commercial juices
  - Commercial juices that don't receive thermal treatments such as pasteurization keep a better antioxidants capacity.
  - Antioxidant capacity of juices with different expiration dated showed similar antioxidant capacity.
  - PET packaging as well as Tetrabrik keep the antioxidant capacity of commercial juices.
  - White label brands preserve worse the antioxidant capacity than top brands.
  - The absence of pulp in juices decrease their antioxidant capacity.
  - Juices with AA as ingredient (Detox juices) show very similar values to pasteurized juices, however they have a higher price.

## 8. APORTACIONES EN MATERIA DE APRENDIZAJE

Con la realización del presente trabajo, he podido aplicar muchos contenidos adquiridos a lo largo del grado y tomar contacto con la investigación científica tal y como se lleva a cabo día a día.

Durante el desarrollo de los ensayos he tenido total libertad en el laboratorio pudiendo adquirir destrezas y cierta seguridad. He podido solucionar problemas que se iban presentando con el transcurso del trabajo y esto me ha permitido abrir la mente e ir asociando los conceptos aprendidos durante la carrera.

Gracias a este tema de investigación he conocido un campo de trabajo en el cual no hemos profundizado durante los cuatro años del grado, ya que he usado técnicas y equipos más propios de la química analítica que apenas conocía. No obstante, el proceso de aprendizaje ha supuesto una experiencia enriquecedora.

Por otra parte, la realización del trabajo me ha permitido tener soltura a la hora de buscar bibliografía en diferentes bases de datos y potenciar el espíritu crítico sobre los artículos que buscaba para poder diferenciar aquellos que realmente eran útiles para mi trabajo. Esta búsqueda bibliográfica también me ha enseñado a estructurar un buen trabajo científico lo que me ha facilitado la redacción del trabajo.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

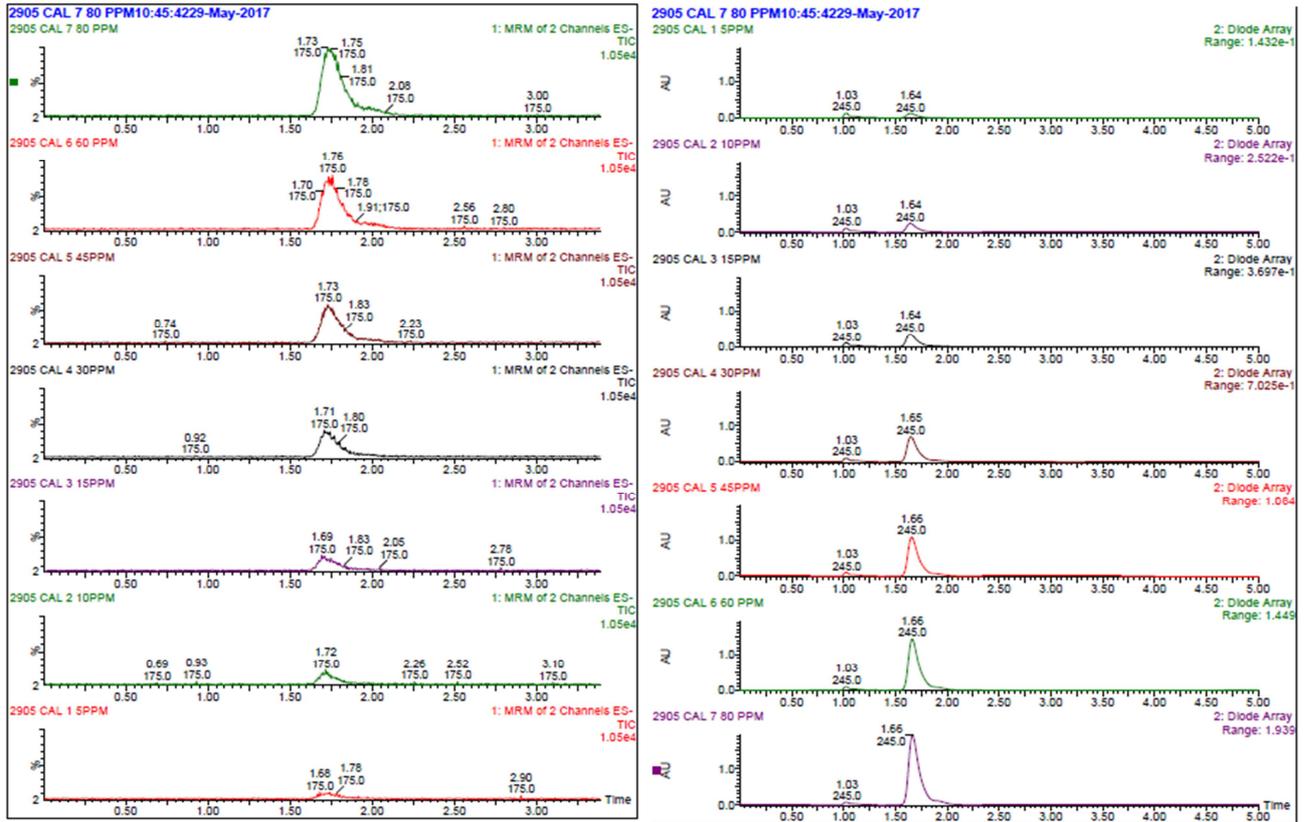
- Attia, T. (2016). Simultaneous determination of rutin and ascorbic acid mixture in their pure forms and combined dosage form. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 169, 82-86.
- Bacigalupi, C., Maurey, A., Boutroy, N., Peyron, S., Avallone, S., & Chalié, P. (2016). Changes in nutritional value of a multi-vitamins fortified juice packed in glass and standard PET bottles. *Food Control*, 60, 256-262.
- Base de Datos Española de Composición de Alimentos - BEDCA. (2007). Recuperado el 3 de Marzo de 2017, de <http://www.bedca.net/bdpub/>
- Bernal, C. (2015). Desarrollo de una Plataforma de Perfil Metabólico y su Aplicación al Estudio de Sistemas Biológicos. *Universidad de Murcia*, 17-33.
- Boonpangrak, S., Lalitmanat, S., Suwanwong, Y., Prachayasittikul, S., & Prachayasittiku, V. (2016). Analysis of Ascorbic Acid and Isoascorbic Acid in Orange and Guava Fruit Juices Distributed in Thailand by LC-IT-MS/MS. *Food Analytical Methods*, 9, 1616-1626.
- Deutsch, J. (1998). Spontaneous Hydrolysis and Dehydration of Dehydroascorbic Acid in Aqueous Solution. *Analytical Biochemistry*, 260, 223-229.
- Deutsch, J. (2000). Dehydroascorbic acid. *Journal of Chromatography A*, 881, 299-307.
- Douce, D., Hancock, P., Rhijn, H., & Bennekou, E. (2005). Comparing SIR to MRM for the quantitative confirmation of steroid growth promoters in bovine urine. *Waters Corporation*.
- Fenoll, J., Martínez, A., Hellín, P., & Flores, P. (2011). Simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in vegetables and fruits by liquid chromatography with tandem-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 127, 340-344.
- Garrido, A., Hernández, M., Belmonte, A., Martínez, J., & Plaza, P. (2005). Determination of Ascorbic Acid and Carotenoids in Food Commodities by Liquid Chromatography with Mass Spectrometry Detection. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 53, 7371-7376.
- Gioia, M., Andreatta, P., Boschetti, S., & Gatti, R. (2008). Development and validation of a liquid chromatographic method for the determination of ascorbic acid, dehydroascorbic acid and acetaminophen in pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48, 331-339.
- Gökmen, V., Kahraman, N., Demir, N., & Acar, J. (2000). Enzymatically validated liquid chromatographic method for the determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 881, 309-316.

- Gómez, B., Roux, S., Courtois, F., & Bonazzi, C. (2016). Spectrophotometric method for fast quantification of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in simple matrix for kinetics measurements. *Food Chemistry*, *211*, 583-589.
- Gutiérrez, T., Hoyos, O., & Páez, M. (Marzo de 2007). Ascorbic acid determination in gooseberry( *Physalis peruviana* L), for high-performance liquid chromatography (HPLC). *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, *5*(1), 70-79.
- Herbig, A., & Renard, C. (2017). Factors that impact the stability of vitamin C at intermediate temperatures in a food matrix. *Food Chemistry*, *220*, 444-451.
- Hernández, Y., Lobo, M., & González, M. (2006). Determination of vitamin C in tropical fruits: A comparative evaluation of methods. *Food Chemistry*, *96*, 654-664.
- Klimczak, I., & Gliszczynska-Swigło, A. (2015). Comparison of UPLC and HPLC methods for determination of vitamin C. *Food Chemistry*, *175*, 100-105.
- Latham, M. (2002). *Nutrición Humana en el Mundo en Desarrollo*. FAO.
- Lykkesfeldt, J. (2000). Determination of Ascorbic Acid and Dehydroascorbic Acid in Biological Samples by High-Performance Liquid Chromatography Using Subtraction Methods: Reliable Reduction with Tris[2-carboxyethyl]phosphine Hydrochloride. *Analytical Biochemistry*, *282*, 89-93.
- Mazurek, A., & Jamroz, J. (2015). Precision of dehydroascorbic acid quantitation with the use of the subtraction method – Validation of HPLC–DAD method for determination of total vitamin C in food. *Food Chemistry*, *173*, 543-550.
- National High Magnetic Field Laboratory. (15 de septiembre de 2015). Recuperado el 19 de abril de 2017, de <https://nationalmaglab.org/user-facilities/icr/techniques/tandem-ms>
- National Institutes of Health - NIH. (11 de Febrero de 2016). Recuperado el 3 de Marzo de 2017, de <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminC-HealthProfessional/>
- Nováková, L., Solich, P., & Solichová, D. (2008). HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids. *Trends in Analytical Chemistry*, *27*(10), 942-958.
- Odrizola, I., Hernández, T., & Martín, O. (2007). Comparative evaluation of UV-HPLC methods and reducing agents to determine vitamin C in fruits. *Food Chemistry*, *105*, 1151-1158.
- Pomies, D. (Junio de 2013). *Espectrometría de masas*. Waters- Mass Spectrometry Systems.
- Real Decreto 781/2013, de 11 de octubre, por el que se establecen normas relativas a la elaboración, composición, etiquetado, presentación y publicidad de los zumos de frutas y otros productos similares destinados a la alimentación humana.
- Reglamento 1333/2008, sobre aditivos alimentarios.
- Usaga, J., Manns, D., Moraru, C., Worobo, R., & Padilla, O. (2017). Ascorbic acid and selected preservatives influence effectiveness of UV treatment of apple juice. *LWT - Food Science and Technology*, *75*, 9-16.

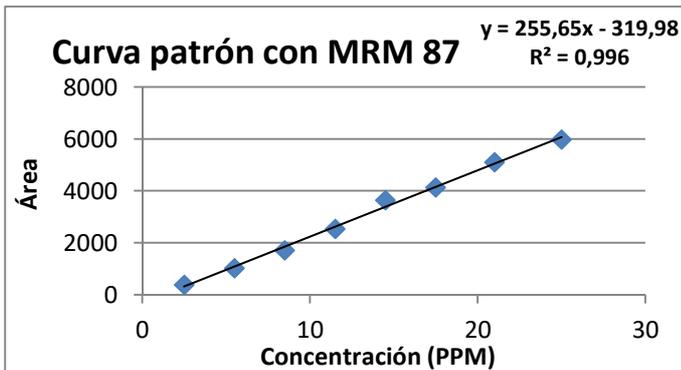
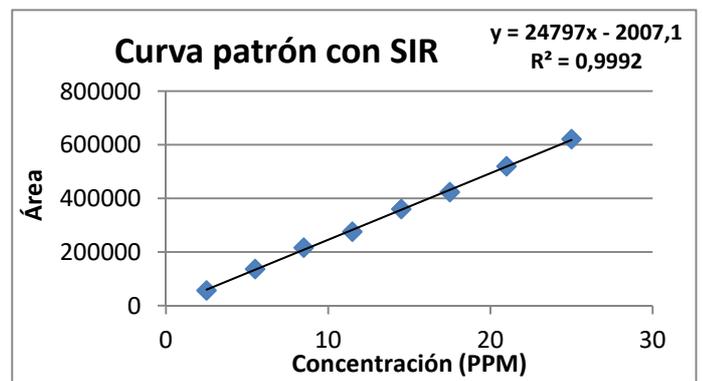
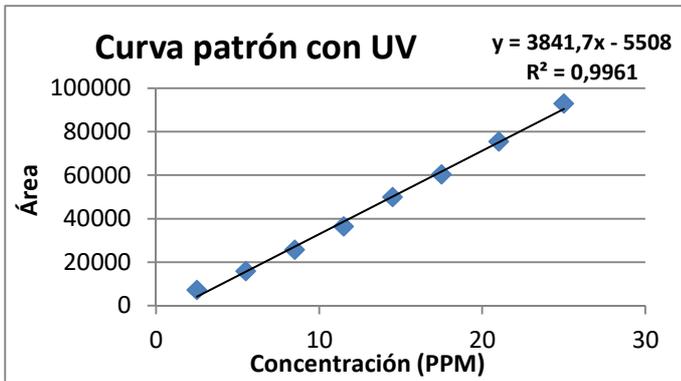
- Vera, P., Echegoyen, Y., Canellas, E., Nerín, C., Palomo, M., Madrid, Y., y otros. (2016). Nano selenium as antioxidant agent in a multilayer food packaging material. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(24), 6659-6670.
- Zou, Z., Xi, W., Hu, Y., Nie, C., & Zhou, Z. (2016). Antioxidant activity of Citrus fruits. *Food Chemistry*, 196, 885-896.
- Zulueta, A., Esteve, M., Frasquet, I., & Frígola, A. (2007). Vitamin C, vitamin A, phenolic compounds and total antioxidant capacity of new fruit juice and skim milk mixture beverages marketed in Spain. *Food Chemistry*, 103, 1365-1374.

# ANEXO I

## A) Cromatograma de la recta de calibración con MRM y UV



## B) Rectas de calibrado con distintos métodos de detección.



C) Resultados obtenidos durante los ensayos con MRM.

ZUMO SIN ESPACIO DE CABEZA Y LUZ						ZUMO SIN ESPACIO DE CABEZA Y OSCURIDAD					ZUMO CON ESPACIO DE CABEZA Y LUZ					ZUMO CON ESPACIO DE CABEZA Y OSCURIDAD				
Tiempo (h)	AA	Vitamina C	DHAA	% AA	% DHAA	AA	Vitamina C	DHAA	% AA	% DHAA	AA	Vitamina C	DHAA	% AA	% DHAA	AA	Vitamina C	DHAA	% AA	% DHAA
0	177,90	233,80	55,90	76,09	23,91	177,90	233,80	55,90	76,09	23,91	177,90	233,80	55,90	76,09	23,91	177,90	233,80	55,90	76,09	23,91
24	168,93	190,44	21,51	88,71	11,29	154,00	194,74	40,74	79,08	20,92	134,52	204,61	70,09	65,74	34,26	125,16	176,02	50,86	71,10	28,90
48	137,53	225,74	88,21	60,93	39,07	133,16	223,31	90,15	59,63	40,37	153,57	253,20	99,63	60,65	39,35	143,36	259,03	115,67	55,35	44,65
72	164,59	210,94	46,35	78,03	21,97	160,45	221,86	61,42	72,32	27,68	135,58	220,36	84,78	61,53	38,47	140,48	220,92	80,44	63,59	36,41
96	133,44	210,34	76,90	63,44	36,56	129,38	192,08	62,70	67,36	32,64	120,05	188,22	68,17	63,78	36,22	134,05	196,54	62,49	68,20	31,80
ZUMO SIN ESPACIO DE CABEZA Y OSCURIDAD						ZUMO CON ESPACIO DE CABEZA Y LUZ					BOLSA CONTROL					ENVASE ACTIVO				
Tiempo (h)	AA	Vitamina C	DHAA	% AA	% DHAA	AA	Vitamina C	DHAA	% AA	% DHAA	AA	Vitamina C	DHAA	% AA	% DHAA	AA	Vitamina C	DHAA	% AA	% DHAA
0	177,90	233,80	55,90	76,09	23,91	177,90	233,80	55,90	76,09	23,91	172,08	231,86	59,78	74,22	25,78	172,08	231,86	59,78	74,22	25,78
24	106,68	191,20	84,52	55,80	44,20	117,31	211,19	93,88	55,55	44,45	132,49	183,36	50,86	72,26	27,74	146,41	187,40	40,99	78,13	21,87
48	150,17	299,85	149,69	50,08	49,92	148,22	310,79	162,56	47,69	52,31	162,80	284,54	121,74	57,22	42,78	194,64	314,43	119,80	61,90	38,10
72	127,67	220,55	92,88	57,89	42,11	123,52	221,49	97,97	55,77	44,23	94,70	219,23	124,53	43,20	56,80	141,80	221,30	79,50	64,07	35,93
96	125,93	187,00	61,07	67,34	32,66	128,16	189,24	61,07	67,73	32,27	116,60	188,83	72,23	61,75	38,25	125,93	189,64	63,71	66,40	33,60

D) Resultados obtenidos durante los ensayos con UV.

ZUMO SIN ESPACIO DE CABEZA Y LUZ						ZUMO SIN ESPACIO DE CABEZA Y OSCURIDAD					ZUMO CON ESPACIO DE CABEZA Y LUZ					ZUMO CON ESPACIO DE CABEZA Y OSCURIDAD				
Tiempo (h)	AA	Vitamina C	DHAA	% AA	% DHAA	AA	Vitamina C	DHAA	% AA	% DHAA	AA	Vitamina C	DHAA	% AA	% DHAA	AA	Vitamina C	DHAA	% AA	% DHAA
0	282,04	278,45	-3,58	101,29	-1,29	282,04	278,45	-3,58	101,29	-1,29	282,04	278,45	-3,58	101,29	-1,29	282,04	278,45	-3,58	101,29	-1,29
24	353,73	381,84	28,11	92,64	7,36	374,12	389,32	15,20	96,10	3,90	374,86	386,35	11,49	97,03	2,97	371,17	391,29	20,12	94,86	5,14
48	309,40	322,03	12,63	96,08	3,92	300,03	327,40	27,37	91,64	8,36	345,34	320,97	-24,37	107,59	-7,59	294,93	330,73	35,81	89,17	10,83
72	312,41	350,81	38,39	89,06	10,94	316,01	366,44	50,43	86,24	13,76	322,32	362,39	40,07	88,94	11,06	322,26	352,40	30,14	91,45	8,55
96	324,73	341,44	16,71	95,10	4,90	327,17	353,99	26,82	92,42	7,58	303,73	348,01	44,28	87,28	12,72	328,10	349,08	20,98	93,99	6,01
ZUMO SIN ESPACIO DE CABEZA Y OSCURIDAD						ZUMO CON ESPACIO DE CABEZA Y LUZ					BOLSA CONTROL					ENVASE ACTIVO				
Tiempo (h)	AA	Vitamina C	DHAA	% AA	% DHAA	AA	Vitamina C	DHAA	% AA	% DHAA	AA	Vitamina C	DHAA	% AA	% DHAA	AA	Vitamina C	DHAA	% AA	% DHAA
0	282,04	278,45	-3,58	101,29	-1,29	282,04	278,45	-3,58	101,29	-1,29	327,62	332,09	4,47	98,65	1,35	327,62	332,09	4,47	98,65	1,35
24	378,31	397,68	19,37	95,13	4,87	370,38	389,24	18,87	95,15	4,85	370,87	385,74	14,88	96,14	3,86	363,42	378,68	15,26	95,97	4,03
48	313,07	324,88	11,81	96,37	3,63	298,76	318,10	19,34	93,92	6,08	283,37	315,71	32,34	89,76	10,24	318,86	327,20	8,34	97,45	2,55
72	329,41	358,42	29,01	91,91	8,09	313,22	357,33	44,11	87,66	12,34	303,54	347,76	44,22	87,28	12,72	323,89	365,04	41,16	88,72	11,28
96	334,40	347,09	12,69	96,34	3,66	332,64	346,48	13,84	96,01	3,99	312,71	329,96	17,24	94,77	5,23	337,91	347,49	9,58	97,24	2,76

*E) Resultados de los análisis de los zumos comerciales.*

	AA	Vitamina C	DHAA	%AA	%DHAA	mg/ 100 g de zumo	
						Vitamina c	AA
Comercial 1	324,19	325,69	1,50	99,54	0,46	32,57	32,42
Comercial 2	326,70	339,22	12,52	96,31	3,69	33,92	32,67
Comercial 3	323,19	346,73	23,54	93,21	6,79	34,67	32,32
Comercial 4	288,63	314,68	26,04	91,72	8,28	31,47	28,86
Comercial 5	244,05	335,71	91,66	72,70	27,30	33,57	24,41
Comercial 6	334,21	343,72	9,51	97,23	2,77	34,37	33,42
Comercial 7	282,12	370,27	88,15	76,19	23,81	37,03	28,21

F) Resultados del ensayo con el detector UV.

