

Trabajo de fin de grado

Métodos analíticos para la determinación de vitamina C

Autor: Cynthia Campos Mangas
Tutor: Oscar Miguel Hernández Torres

Curso: 2020-2021

Índice

Resumen	3
Abstract	3
1. Introducción	4
1.1 La vitamina C	4
1.2 Funciones de la vitamina C en el organismo	6
1.3 Fuentes de Vitamina C	8
2. Objetivos	10
3. Metodología	11
4. Métodos de análisis de la vitamina C	12
4.1 Método volumétrico/ Método del indofenol	12
4.2 Método yodométrico	14
4.3 Espectrofotometría indirecta	16
4.4 Cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa	17
4.5 Polarografía	19
5. Conclusión	23
6. Bibliografía	24

Resumen

La vitamina C, también conocida como ácido ascórbico, es indispensable para la vida, debido a sus múltiples funciones en nuestro organismo, por lo que surge la necesidad de identificar y cuantificar su presencia tanto en alimentos como en complejos vitamínicos.

Este trabajo es una revisión bibliográfica de algunos de los métodos utilizados para la determinación de la vitamina C, haciendo uso de diversas bases de datos como el Punto Q o el Google-Scholar. Los métodos revisados en este trabajo de fin de grado son: el método volumétrico con 2,6-diclorofenolindofenol, la yodometría, la espectrofotometría indirecta, la cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa y la polarografía.

Palabras clave: vitamina C, ácido ascórbico, 2,6-diclorofenolindofenol, yodometría, espectrofotometría, cromatografía, polarografía.

Abstract

Vitamin C, also known as ascorbic acid, is essential for life, due to its multiple functions in our organism, leading to the need to identify and quantify its presence both in food and in vitamin complex.

This writing is a bibliographic review of some of the methods used for the determination of vitamin C, making use of different databases such as Punto Q or Google-Scholar. The methods reviewed in this final degree project are: the volumetric method with 2,6-dichlorophenolindophenol, the iodometry, the indirect spectrophotometry, the high performance liquid chromatography in reverse phase and the polarography.

Key words: vitamin C, ascorbic acid, 2,6-dichlorophenolindophenol, iodometry, spectrophotometry, chromatography, polarography.

Acrónimos:

- Vit C: vitamina C
- DNPH: 2,4-dinitrofenilhidracina
- HPLC: high performance liquid chromatography / cromatografía líquida de alta resolución
- UNE-EN : Una Norma Española - European Norm

1. Introducción

Para entender la importancia de la determinación de vitamina C, tanto en alimentos como en muestras biológicas, es fundamental entender el papel que desarrollan las vitaminas en nuestro organismo. Me parece adecuada la explicación que da José Enrique Campillo en su libro “Comer sano para vivir más y mejor”: *El concepto de vitamina surgió hace un par de siglos para referirse a unas sustancias indispensables para la vida, que el organismo humano no puede fabricar y que si no se ingieren durante meses, se produce una enfermedad carencial que sólo se alivia ingiriendo alimentos que la contienen.*

Hoy en día estamos rodeados de anuncios de alimentos fortificados con vitaminas, complejos vitamínicos e incluso cosmética rica en vitaminas, que nos recuerdan la importancia de estos compuestos en nuestra vida.

Por lo tanto, conocer los métodos de análisis más adecuados para cada vitamina y tipo de muestra es esencial para asegurarnos una medición lo más precisa posible. En este trabajo nos centraremos en los métodos más utilizados para la determinación de Vitamina C.

1.1 La vitamina C

Aunque desde 1720 se haya observado una relación entre el escorbuto y la falta de consumo de alimentos vegetales frescos, la Vit C permaneció desconocida hasta 1927, año en el que fue descubierta por Albert Szent-Györgyi.

Está compuesta por 6 átomos de carbono de los cuales 4 forman un anillo con estructura de lactona. Es una vitamina hidrosoluble que se sintetiza a partir de la glucosa en la mayoría de las plantas y animales. El ser humano es incapaz de sintetizar la Vit C por la falta de una enzima llamada L-gluconolactona oxidasa que cataliza el último paso de la glucosa a la Vit C. Esto obliga a incorporar la vitamina a la dieta.

La Vit C, también conocida como ácido ascórbico, se oxida de forma reversible a nivel hepático a ácido dehidroascórbico. Ambas formas son activas en el organismo. Parte del ácido ascórbico se metaboliza a compuestos inactivos. Su naturaleza hidrosoluble hace que se excrete con facilidad a través de la orina y no se pueda acumular, por lo que es necesario incluirla en la dieta de forma habitual. De esta manera se hace imprescindible contar con métodos analíticos que nos permitan medir las cantidades de esta vitamina.

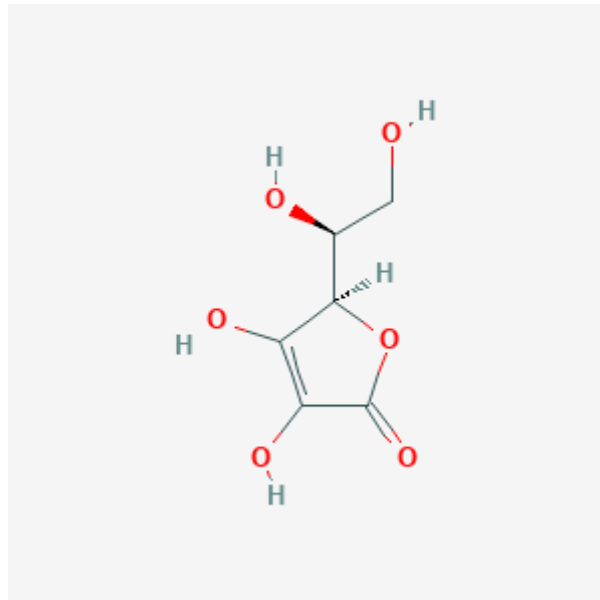


Figura 1.1 Estructura de la vitamina C (National Library of medicine - NCBI)

1.2 Funciones de la vitamina C en el organismo

Dentro del organismo cumple con múltiples funciones que lo convierten en un compuesto esencial para la vida. Es un antioxidante muy efectivo por su capacidad de donar electrones, esto protege moléculas importantes que componen nuestro organismo como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, pero además protege de la oxidación a otras vitaminas como la vitamina A, E y algunas de las vitaminas B. Además mantiene el estado reducido de los iones de hierro y cobre. También potencia la absorción intestinal de hierro no ligado al grupo hemo.

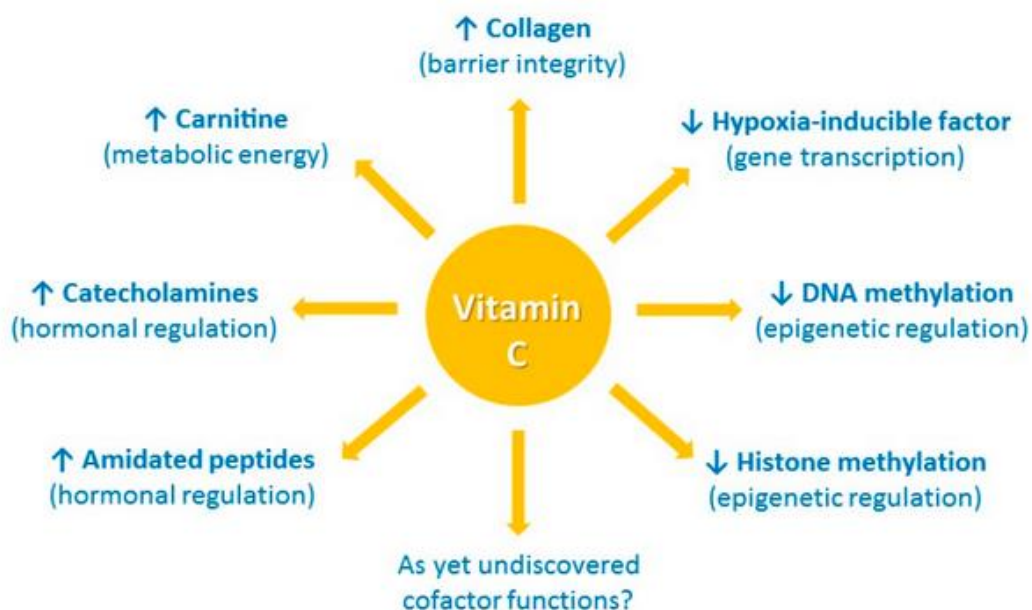
La deficiencia de esta vitamina se relaciona principalmente con la carencia de tejido conectivo, que en su mayor grado se refleja con el escorbuto.

Los síntomas del escorbuto como el sangrado de la piel, nasal y de encías, la anemia y la demora en la cicatrización de heridas nos demuestra la importancia de la Vit C en el ser humano. Aparte es el cofactor de diversas enzimas como las hidroxilasas necesarias para la biosíntesis de la carnitina que es una moléculas encargada de transportar los ácidos grasos a la mitocondria para su metabolismo, y de la enzima hidroxilasa encargada de la síntesis de las catecolaminas. También sabemos que influye en el sistema inmune de diferentes formas:

- Integridad del efecto barrera de la piel y mucosas: La Vit C actúa como cofactor para la enzima prolil y lisil hidroxilasa que estabiliza la estructura terciaria del colágeno. Este es importante para mantener la estructura de la piel y por lo tanto es fundamental para reparar las heridas que rompen la barrera que la forman. Aparte, hay estudios que demuestran que la Vit C influye en el aumento de la expresión del gen del colágeno en los fibroblastos. Esto afecta no solo a la piel sino a estructuras como los vasos sanguíneos, encías y huesos. Por último, hay estudios que afirman que la ingesta de Vit C mejora la

capacidad antioxidante de la piel lo que la protege no solo del estrés oxidativo sino de contaminantes ambientales.

- Función de los leucocitos: Se cree que la Vit C en los neutrófilos es capaz de proteger a la célula del daño que produce el estrés oxidativo. Aparte es capaz de regenerar antioxidantes importantes como el glutatión y la vitamina E.
- Quimiotaxis de los neutrófilos: En diferentes estudios, tanto en cobayas con escorbuto como en pacientes con enfermedad granulomatosa crónica, se ha visto un aumento de la migración de los fagocitos al lugar de infección al suplementar la dieta con Vit C.
- Apoptosis de neutrófilos: Aunque se requieren más estudios para confirmar la influencia del ácido ascórbico en la apoptosis de los neutrófilos, hay estudios que sugieren que es responsable de evitar la oxidación de la enzima caspasa, que está estrechamente ligada a los procesos de la apoptosis celular.
- Mediadores proinflamatorios: La Vit C parece tener un efecto modulador sobre las citoquinas evitando la síntesis de citoquinas proinflamatorias como TNF (factor de necrosis tumoral), IL-6 (interleucina 6), IL-1beta (interleucina 1 beta)



Esquema 1.2 Resumen de las funciones de la Vitamina C (Vitamin C and Immune Function)

1.3 Fuentes de Vitamina C

Debido a la termolabilidad de la Vit C se recomienda consumir alimentos crudos o con métodos de cocción menos intensos como al vapor o microondas unos minutos. Para su conservación se recomienda mantenerlos en lugares frescos, secos y oscuros o donde no les pueda dar la luz de forma directa, ya que el AA es sensible a la luz y las radiaciones ultravioletas.

La ingesta recomendada de Vit C diaria es de 20 a 60 mg en niños y de 80 a 100 mg en adultos, aconsejando el aumento en 35 mg en caso de fumadores. En mujeres en periodo de lactancia esta recomendación aumenta a 120 mg al día.

Ya se sabía mucho antes de conocer la Vit C, que el consumo de alimentos vegetales frescos evitaba padecer la enfermedad del escorbuto, por lo que es justamente en esos alimentos donde encontraremos la mayor cantidad de esta vitamina.

Tabla 1.-Contenido de vitamina C en mg por 100g de alimento

Alimento	mg Vit C/100 g alimento
Pimiento	120
Col de Bruselas	100
Berro	87
Papaya	82
Kiwi	71
Fresas, lichi	60
Naranja, limón	50
Coliflor	50
Col	49
Caballa	47
Pomelo	40
Tomate	38
Mango	37
Espárragos	33
Mandarina	30
Espinacas	30
Cebolla, habas tiernas	28
Piña	27
Guisantes	25

2. Objetivos

- Conocer la importancia de la vitamina C en nuestro organismo.
- Describir las técnicas más usadas para la determinación de la vitamina C, así como sus ventajas e inconvenientes.
- Conocer el uso de cada técnica según el tipo de muestra.

3. Metodología

Se ha realizado una búsqueda bibliográfica en diferentes bases de datos como el PuntoQ, Google-Scholar, Medline, etc. Para ello se han buscado las palabras clave: determinación de vitamina C o ácido ascórbico. De los primeros documentos consultados se sacaron las diferentes técnicas que se volvieron a buscar por su nombre.

4. Métodos de análisis de la vitamina C

4.1 Método volumétrico/ Método del indofenol

Este método cuantitativo se basa en el poder reductor del ácido ascórbico sobre los reactivos utilizados. Se trata de utilizar una disolución a una concentración y volumen conocida de un compuesto que se reduce, mientras el ácido ascórbico se oxida.

Al añadir el colorante (2,6-diclorofenolindofenol) a la muestra, este es reducido mientras la Vit C es oxidada. Durante este proceso el colorante se vuelve incoloro. De esta forma, mientras haya Vit C en la muestra, no se verá el color del indicador. Una vez se haya oxidado toda la Vit C presente en la muestra, el colorante dejará de verse incoloro y se verá de un color rojizo. Para determinar el fin de la titulación el color rojizo debe persistir durante unos segundos. Si desaparece al agitar la muestra a analizar, significa que aún queda Vit C sin oxidarse.

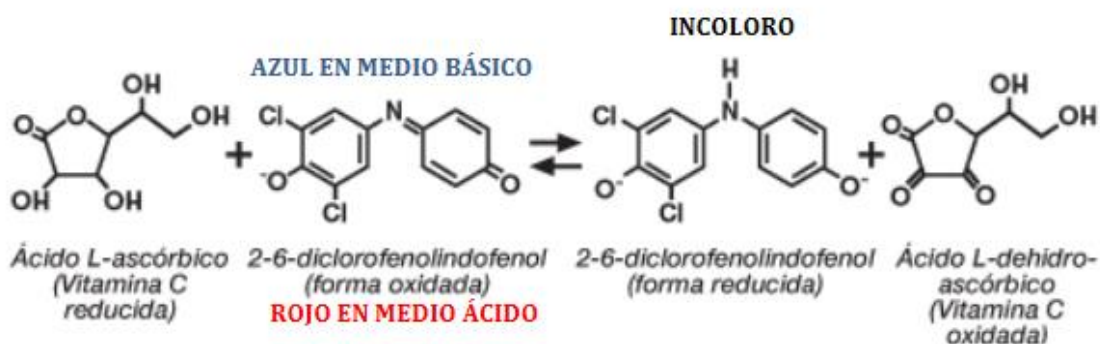


Figura 4.1 Reacción de la vitamina C con el 2,6-diclorofenolindofenol

Para calcular la concentración de Vit C primero hay que elaborar una recta de calibrado con muestras patrón de Vit C. Una vez conocida la recta de calibrado se valora la muestra de Vit C dejando caer gota a gota el colorante hasta que la muestra adquiera un color ligeramente rojizo. Para asegurarnos que el medio sea ácido, añadimos a la muestra antes de la valoración una mezcla de ácido acético y metafosfórico. Para determinar el fin de la titulación, el color rojizo debe

persistir durante unos segundos. Si desaparece al agitar la muestra a analizar significa que aún queda Vit C sin oxidarse, por lo que hay que seguir añadiendo el indofenol.

Una vez obtengamos el color rojizo, dejamos de añadir colorante y calculamos con el volumen gastado la cantidad de Vit C presente en la muestra con la siguiente fórmula:

$$C_I \cdot V_I = C_C \cdot V_C$$

Donde **C_I** y **V_I** son la concentración de la disolución de 2,6-diclorofenolindofenol y el volumen gastado de dicha disolución; y **C_C** y **V_C** son la concentración y el volumen de la muestra que contienen la Vit C.

Para calcular la cantidad de Vit C en la muestra, solo tenemos que despejar **C_C** ya que, conocemos el volumen de 2,6-diclorofenolindofenol gastado, su concentración y el volumen de la muestra de Vit C a analizar.

Las desventajas del método se relacionan con la necesidad de ver el viraje. Cualquier disolución que presente una coloración fuerte hará imposible la observación del punto final de la titulación. Para poder determinarlo se puede recurrir al uso de un espectrofotómetro, midiendo el cambio de transmitancia de la muestra a una longitud de onda de 545 nm. Aparte, el 2,6-diclorofenolindofenol reacciona con varios iones como el hierro o el cobre. Por lo tanto, el método es ideal para zumos de frutas o muestras débilmente coloreadas que no contengan esos iones.

En esta técnica las ventajas son su simplicidad al realizar el ensayo y el bajo coste.

4.2 Método yodométrico

Se basa en la reacción que se produce entre el yodo y el almidón y como la Vit C interfiere en esta.

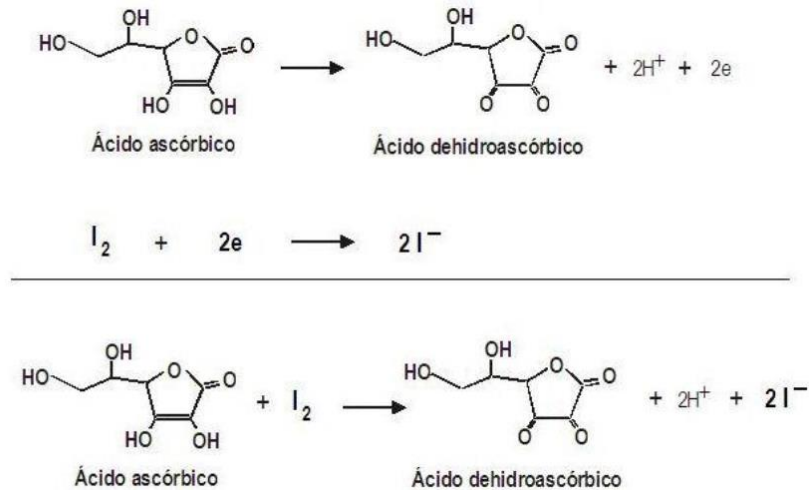


Figura 4.2.1 Reacción de la vitamina C con el yodo

En ausencia de Vit C el yodo reacciona con el almidón dando lugar a un compuesto azul oscuro, que en este caso se usa como indicador. Los iones de yodo disueltos se introducen en la hélice de amilosa formando el compuesto coloreado.

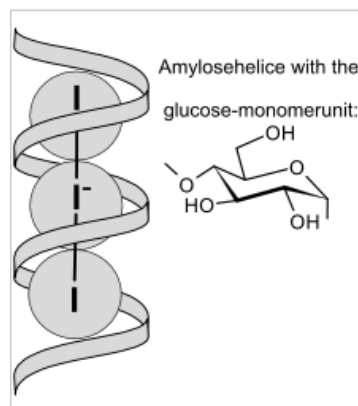
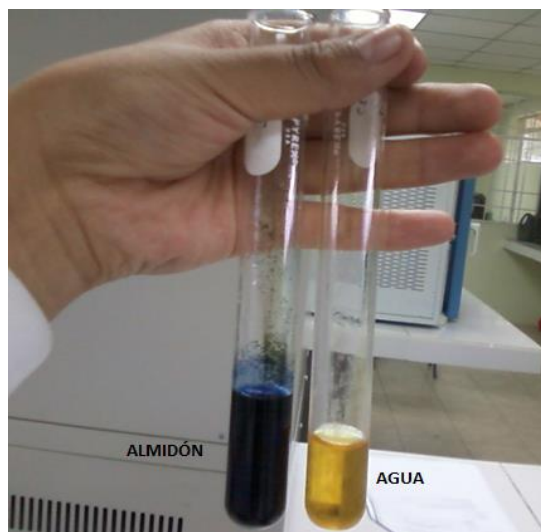


Figura 4.2.2 Estructura resultante del almidón y el yodo

En presencia de Vit C el yodo es reducido a iones de yoduro y el ácido ascórbico a ácido dehidroascórbico. Hasta que no termine de oxidarse la Vit C presente en la mezcla no se puede formar el complejo azul oscuro de yodo-almidón como lo vemos en la Figura 4.2.3.



4.2.3 Colores que se observan al añadir yodo a una disolución: a la izquierda una disolución de almidón, a la derecha solo agua

Este método se puede utilizar de forma cualitativa para determinar la presencia de Vit C en una muestra. Para ello se añade a la muestra a estudiar, almidón y se añade gota a gota solución de lugol (solución de yoduro potásico). El viraje es instantáneo con la primera gota de lugol en ausencia de Vit C. En caso contrario se confirma la presencia de Vit C.

Para utilizar esta técnica como método cuantitativo hay que realizar una titulación de la mezcla de almidón y Vit C con lugol. Sabiendo el volumen gastado de lugol, se puede calcular la concentración de Vit C de la muestra.

Este método presenta varios inconvenientes. El hecho de que se base en la capacidad reductora de la Vit C hace que la presencia de otros agentes reductores aumenten la cantidad calculada de Vit C. Otro inconveniente es la facilidad con la que se hidroliza el almidón dando lugar a la presencia de glucosa que también tiene poder reductor. Por último, hay que tener en cuenta que la Vit

C se oxida con facilidad por el aire, por lo que se aconseja preparar la solución de Vit C y almidón justo antes de realizar la titulación.

Este método es adecuado para muestras diluidas que no presenten una fuerte coloración ya que esta dificultaría la observación del viraje. Las muestras que se suelen analizar con este método son: zumos de frutas naturales, zumos comerciales y complementos vitamínicos (tipo Redoxon). Hay que tener en cuenta que el rango de Vit C que se puede medir por yodometría es de 10 a 200 mg/L.

4.3 Espectrofotometría indirecta

Este método se basa en dos reacciones. Por una parte, en la oxidación de la Vit C al ácido L-dehidroascórbico por medio de la solución de bromo, por otra parte, el ácido L-dehidroascórbico reacciona con DNPH produciendo una osazona que con ácido sulfúrico al 85% forma una disolución roja. La coloración depende de la concentración de Vit C presente en la mezcla.

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot b$$

Ecuación de Lambert Beer donde A es la absorbancia; ε el coeficiente de absorptividad molar ($M^{-1}cm^{-1}$); c es la concentración molar (M) y b es el ancho de la cubeta que contiene la muestra y que atraviesa el haz de luz (cm).

Para calcular la concentración de Vit C se mide la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 521 nm. Previamente se debe realizar una recta de calibrado que cumpla la ley de Lambert-Beer a partir de disoluciones de vitamina C a diferentes concentraciones.

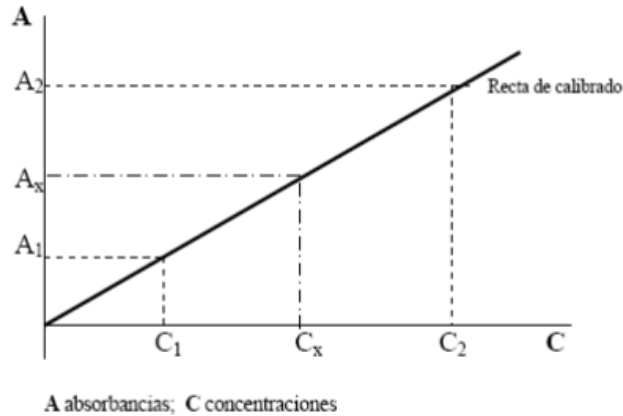


Figura 4.3 Representación de una recta de calibrado

Con la medida de la absorbancia de la muestra problema y la recta de calibrado se puede calcular la concentración de osazona obtenida que es proporcional a la concentración de Vit C.

Este método presenta interferencias por la formación del ácido dicetogulónico que se forma debido a la hidrólisis del ácido dehidroascórbico. El ácido dicetogulónico presenta una cetona que puede interactuar con el DNPH y formar la osazona que es el producto a medir. Esto puede producir una sobreestimación de la cantidad de Vit C de la muestra. La espectrofotometría presenta una sensibilidad de 10^{-4} a 10^{-5} M. Se puede aplicar a todo tipo de muestras absorbentes o muestras que al tratar con un reactivo se conviertan en absorbentes.

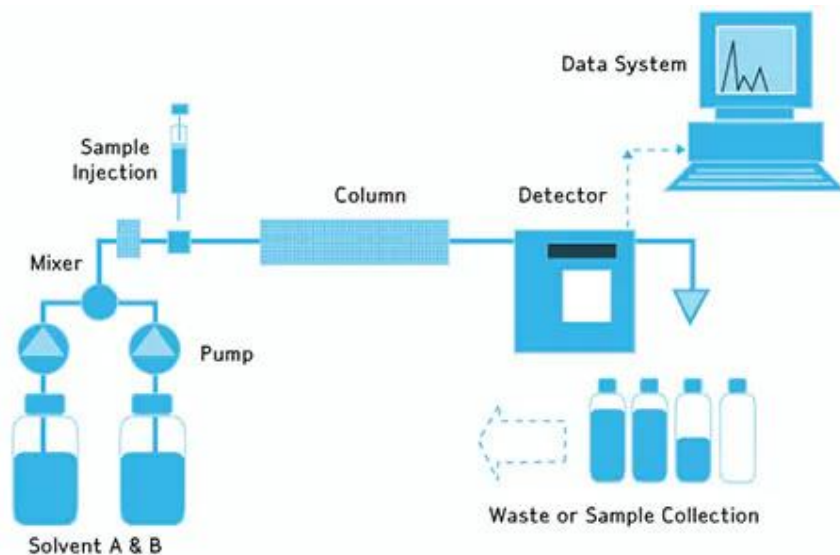
4.4 Cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa

Conocida como HPLC por su nombre en inglés “high performance liquid chromatography” se basa en la separación de componentes de una mezcla por diferentes interacciones tanto químicas como físicas entre la mezcla a analizar, la fase móvil, y la fase estacionaria. Para ello se dispone de una fase estacionaria que se coloca en una columna de cromatografía. Esta se ha de bañar previamente con la disolución de la fase móvil. Esto se hace para que la fase estacionaria se impregne bien con la fase móvil y no con la mezcla a analizar.

Preparada la columna de cromatografía y el método de detección, se puede empezar a añadir la fase móvil con el analito.

Como fase móvil se ha de usar una disolución cuyo pH esté por debajo del pKa de la vitamina C (4,17) para evitar la forma ionizada de la misma. Para conseguir este requisito se puede usar el ácido trifluoroacético, el ácido sulfúrico o el ácido fosfórico. Conviene añadir un disolvente orgánico a la fase móvil para evitar un colapso hidrofóbico de la fase estacionaria. Teniendo en cuenta que el pH ácido acelera la degradación del sílica gel, compuesto usado frecuentemente en la fase estacionaria, es aconsejable sustituir este por un compuesto híbrido de zirconia o un polímero de mayor estabilidad química.

El método de detección que se usa con mayor frecuencia es el de la espectrofotometría de UV con una absorción máxima para la Vit C entre 244 y 165 nm de longitud de onda.



Esquema 4.4 de un montaje de una cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa.

Para el análisis cualitativo se compara el tiempo de retención de la muestra analizada con el de la Vit C. Si queremos hacer un análisis cuantitativo, hemos de calcularlo a partir de los valores de absorbancia obtenidos.

Las ventajas de este método son su rapidez, la sensibilidad para detectar el analito y la alta resolución. Por otro lado, dentro de sus desventajas están: la necesidad de experiencia utilizando el instrumental y el elevado coste del mismo.

4.5 Polarografía

La polarografía es un método analítico dentro de la voltamperometría donde se utiliza un electrodo de trabajo de gota de mercurio como indicador. La voltamperometría comprende los métodos basados en la corriente que se mide al crear un cambio de potencial en presencia del analito.

En este método se utiliza el electrodo de mercurio que consta de un microelectrodo, que está formado por un capilar muy fino por el cual fluye el mercurio lentamente en forma de pequeñas gotas. Estas gotas caen sobre una superficie del mismo elemento que es más extensa y forma el otro electrodo. La formación de estas gotas hace que la superficie del electrodo se renueve cada 6 o 7 segundos, creando así una condición perfecta para la reproducción del ensayo. Al aplicar el voltaje, el electrodo de superficie extensa queda inalterado, mientras que el microelectrodo cambia de potencial. Aparte del electrodo de gota de mercurio, se necesita un electrodo de referencia y una fuente de voltaje.

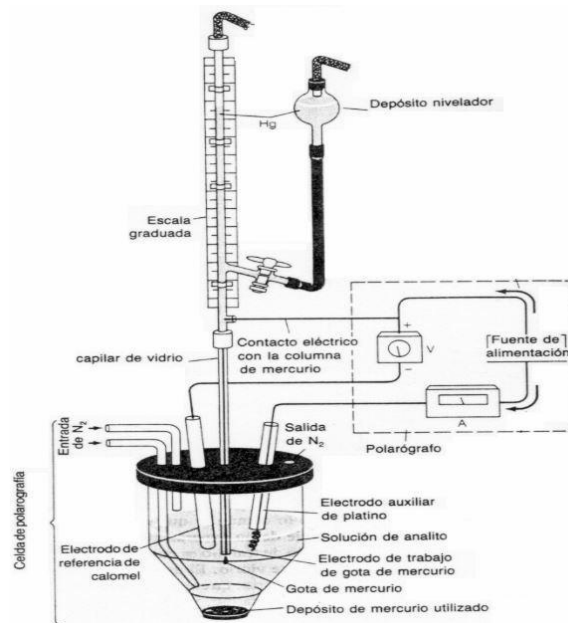


Figura 4.5.1 Electrodo de gota de mercurio

Este método se utiliza en medios reductores debido a la oxidabilidad del mercurio. Al aplicar un voltaje a la celda electroquímica producimos la oxidación de la Vit C presente en la disolución que está en contacto con la superficie del electrodo de mercurio. Se mide la corriente que circula en función del potencial del electrodo de gota de mercurio y se representa (corriente vs. potencial), obteniendo así un polarograma.

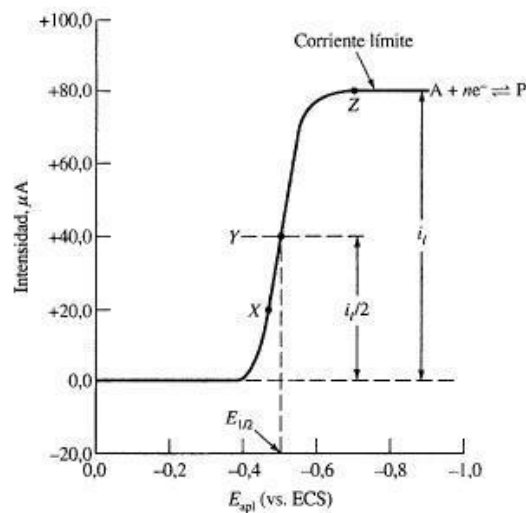


Figura 4.5.2 Representación de un polarograma

El voltaje necesario para causar un aumento de corriente es característico del analito, en nuestro caso de la Vit C. De esta forma, la polarografía nos serviría como método cualitativo.

La corriente límite depende de la velocidad de difusión de la Vit C hasta las gotas de mercurio del electrodo y su magnitud está relacionada con la concentración de la misma mediante la ecuación de Ilkovic:

$$\frac{i_d}{m^{2/3} t^{1/6} C} = 607 n D^{1/2}$$

Figura 4.5.3 Ecuación de Ilkovic

Donde D es el coeficiente de difusión en cm²/seg, m es el flujo másico de mercurio en mg/s, t es el tiempo de vida de la gota de mercurio en segundos y C es la concentración del analito que en nuestro caso es la Vit C.

Esto nos permitiría un análisis cuantitativo de la Vit C.

La polarografía se ha usado para la determinación de Vit C en muestras de frutas, verduras, tejidos vegetales y tejidos de origen animal.

Las ventajas de esta técnica para la determinación de Vit C son: la rapidez con la que se puede realizar; la sensibilidad al analito, cuyo intervalo de medición se encuentra entre el 10⁻² y 10⁻⁵ M; y el bajo coste.

Tabla 2.- Comparación de los métodos analíticos

Método analítico	Rango de detección del analito	Muestras analizadas
Método del indofenol	10 a 200 mg/L	Zumos de frutas de coloración débil, complemento vitamínico
Yodometría		Zumos de frutas de coloración débil, complemento vitamínico
Espectrofotometría indirecta	10^{-4} a 10^{-5} M	Todo tipo de muestras absorbentes
HPLC		Frutas, verduras, tejidos vegetales y animales
Polarografía	10^{-2} a 10^{-5} M	Frutas, verduras, tejidos vegetales y animales,

En la industria alimentaria se utiliza la cromatografía líquida de alta resolución para la determinación de Vit C, según dicta la norma europea del comité europeo de normalización UNE-EN14130. Este método es muy sensible y capaz de separar la Vit C de otros compuestos presentes en la muestra, por lo que es idóneo para el análisis minucioso de los alimentos.

Los métodos basados en las propiedades redox de la Vit C son métodos muy económicos y aptos para análisis rápidos tanto cualitativos como cuantitativos. Al no necesitar de instrumentos específicos, son fáciles de realizar y un recurso valioso para aplicarlos con fines didácticos.

5. Conclusión

Debido a la gran importancia que ejerce en nuestro organismo la Vit C, siendo esencial en la formación de colágeno y ejerciendo diversos papeles en nuestro sistema inmunológico, se hace imprescindible contar con métodos analíticos que nos permitan estudiar tanto muestras biológicas para una valoración nutricional, como muestras de alimentos en la industria alimentaria para asegurar el contenido de Vit C. A su vez son esenciales en la industria farmacéutica para asegurar el contenido de Vit C en los complementos alimentarios y medicamentos que contienen esta vitamina.

La diversidad de muestras a analizar obliga a disponer de diversos métodos para la determinación de Vit C.

El método adecuado para cada análisis dependerá siempre del tipo de muestra, el tiempo disponible, los recursos económicos de los que disponga el laboratorio y la sensibilidad que se necesite para dicha muestra.

6. Bibliografía

1. Campillo J.E. Comer sano para vivir más y mejor. 1ª ed. Ediciones Destino; 2012
2. De La Dureza del Agua Mediante Análisis Volumétrico Con Edta 1. Determinación. PRÁCTICA 6: DETERMINACIÓN DE VITAMINAS Y MINERALES [Internet]. Unizar.es. [citado el 7 de abril de 2020]. Disponible en:
https://ppcta.unizar.es/sites/ppcta.unizar.es/files/users/ARCHIVOS/Video_s_y_otros/Documentos/PRACTICAS_ANALISIS/practica_6_analisis_de_vitaminas_y_minerales.pdf
3. Carr A, Maggini S. Vitamin C and immune function. *Nutrients*. 2017;9(11):1211.
4. Vitamin C. [citado el 7 de abril de 2020]; Disponible en: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00126>
5. Bolet Astoviza M. Aspectos de la historia del descubrimiento de algunas vitaminas. *Rev cuba med gen integral*. 2004;20(4):0-0.
6. Efe. Una carnicería y pimientos: claves del hallazgo de la vitamina C. *El Tiempo* [Internet]. el 14 de octubre de 2017 [citado el 12 de agosto de 2020]; Disponible en: <https://www.eltiempo.com/vida/ciencia/historia-del-descubrimiento-de-la-vitamina-c-141270>
7. Administrator. Vitamina C [Internet]. *Fundaciondelcorazon.com*. [citado el 20 de agosto de 2020]. Disponible en: <https://fundaciondelcorazon.com/nutricion/nutrientes/814-vitamina-c.html>
8. Vitamina C [Internet]. *Nih.gov*. [citado el 13 marzo de 2021]. Disponible en: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminC-DatosEnEspanol/>
9. Vitamina C [Internet]. *Nutricion.org*. [citado el 13 marzo de 2021]. Disponible en: <https://nutricion.org/portfolio-item/vitamina-c/>
10. Torregrosa Verdú F. Determinación de vitamina C y carotenoides en zumos de frutas y hortalizas frescos, tratados por calor o por pulsos eléctricos de alta intensidad (PEAI). *Universitat de València*; 2005.

11. Zago G KI, García F MY, Di Bernardo ML, Vit P, Luna JR, Gualtieri M. Determinación del contenido de vitamina C en miel de abejas venezolanas por volumetría de óxido-reducción. *Rev Inst Nac Hig.* 2010;41(1):25–30.
12. Tuero BB. FUNCIONES DE LA VITAMINA C EN EL METABOLISMO DEL COLÍGENO [Internet]. Ihmc.us. 2000 [citado el 10 de septiembre de 2020]. Disponible en: <https://cmapspublic3.ihmc.us/rid=1GQ861HNG-L3S88S-LKM/VITAMINAS%20PDF.pdf>
13. Nováková L, Solich P, Solichová D. HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids. *Trends Analyt Chem.* 2008;27(10):942–58.
14. Spínola V, Llorent-Martínez EJ, Castilho PC. Determination of vitamin C in foods: current state of method validation. *J Chromatogr A.* 2014;1369:2–17.
15. Rodríguez Hernández Y, Suárez Pérez Y, Izquierdo Castro A. Validación del método por cromatografía líquida de alta resolución para ácido ascórbico en tabletas de producción nacional. *Rev cuba farm.* 2009;43(3):0–0.
16. Ula.ve. [citado el 19 de mayo de 2021]. Disponible en: http://webdelprofesor.ula.ve/ciencias/rmhr/Index_archivos/GuiAIV2.pdf
17. Rojas-Barquera D, Narváez-Cuenca C-E. Determinación de vitamina C, compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de frutas de guayaba (*Psidium guajava* L.) cultivadas en Colombia. *Quim Nova.* 2009;32(9):2336–40.
18. Universidad Estatal de Bolívar. Vista de LA DETERMINACIÓN DE VITAMINA C EN PIMIENTO (*Capsicum Annuum*) POR VOLTAMETRÍA DE BARRIDO LINEAL [Internet]. Edu.ec. [citado el 19 de mayo de 2021]. Disponible en: <https://talentos.ueb.edu.ec/index.php/talentos/article/view/8/10>
19. Edu.ec. [citado el 15 de marzo de 2021]. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/10233/1/T-UCE-0008-Q001-2016.pdf>
20. de Ingeniería Agroindustrial EP. UNIVERSIDAD NACIONAL JOSÉ MARÍA ARGUEDAS [Internet]. Edu.pe. [citado el 15 de marzo de 2021]. Disponible en:

- https://repositorio.unajma.edu.pe/bitstream/handle/123456789/274/FlorindaYavar%C3%AD_Tesis_Bachiller_2017.pdf?sequence=1&isAllowed=y
21. Página 321 - FARMACOPEA [Internet]. Gov.ar. [citado el 20 de junio de 2021]. Disponible en:
http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/flip_pages/Farmacopea_Vol_I/files/assets/basic-html/page321.html
22. Gillam WS. Polarographic determination of vitamin C in fruits and vegetables. *Ind Eng Chem Anal Ed.* 1945;17(4):217–21
23. Luis J. Determinacion de Vitamina C. [citado el 23 de junio de 2021]; Disponible en:
https://www.academia.edu/18546682/Determinacion_de_Vitamina_C
24. Análisis M, Gotas TYR-. Test Kit de [Internet]. Infoagro.com. [citado el 23 de junio de 2021]. Disponible en:
https://www.infoagro.com/instrumentos_medida/instrucciones/instruccion_es_kit_acido_ascorbico_hi3850.pdf
25. Vitaminas [Internet]. Eurofins.es. [citado el 24 de junio de 2021]. Disponible en: <https://www.eurofins.es/divisi%C3%B3n-alimentario/servicios/an%C3%A1lisis-de-calidad-comercial-y-nutricional/vitaminas/>