

Determinación del contenido de ácido ascórbico mediante espectrofotometría con ultravioleta visible (UV-VIS) y otros parámetros fisicoquímicos en cuatro estadios de maduración del Ají dulce (*Capsicum annum* L.)

Jonathan Mancini
Beatriz Soledad

Universidad Católica Andrés Bello

Resumen

Este estudio tuvo como objetivo cuantificar el contenido de vitamina C en cuatro estados de maduración de *Capsicum annum* L, obtenido directamente de plantas de un huerto residencial en Caracas. Se midieron parámetros físicos y químicos como dimensiones, densidad, acidez titulable y pH. Se utilizó el método de espectrofotometría UV-Vis en combinación con 2-nitroanilina para obtener datos sobre el contenido de vitamina C. Los resultados mostraron que, a mayor crecimiento del fruto, mayor contenido de vitamina C. El contenido promedio de vitamina C fue de $200,38 \pm 0,04$ mg/100 g de muestra. El análisis mostró linealidad y precisión menor de 0,1, y una desviación estándar menor de 0,3. El método fue efectivo y preciso para determinar el análisis primario para este tipo de estudio.

Palabras Claves: Ácido ascórbico, maduración de frutas, *Capsicum annum* L.

Determination of ascorbic acid content by ultraviolet-visible spectrophotometry (UV-VIS) and other physicochemical parameters in four stages of ripening of sweet pepper (*Capsicum annum* L.)

Abstract

This study aimed to quantify vitamin C content in four maturation stages of *Capsicum annum* L, obtained directly from plants in a residential garden in Caracas. Physical and chemical parameters such as dimensions, density, titratable acidity, and pH were measured. The UV-Vis spectrophotometry method was used in combination with 2-nitroaniline to obtain data on vitamin C content. Results showed that the longer the fruit grew, the higher its vitamin C content. The average vitamin C content was 200.38 ± 0.04 mg/100 g of sample. The analysis showed linearity and precision of 0.1, and a lower standard deviation of 0.3. The method was effective and precise for determining the primary analysis for this type of study.

Keywords: ascorbic acid, fruit ripening, *Capsicum annum* L

1.-Introducción

Los seres humanos necesitan ciertas sustancias químicas para los procesos metabólicos, como la vitamina C, también conocida como ácido ascórbico. La ingesta diaria recomendada para adultos es de 90 mg, ya que nuestro cuerpo no la produce por sí mismo, por lo que se debe asegurar su obtención mediante el consumo diario de alimentos ricos en vitamina C (Institute of Medicine, 2000).

El ají dulce es un tipo de fruto que pertenece a la familia de las Solanaceae y al género Capsicum. es una gran fuente de vitamina C, vitaminas A, E, B6, B3, B2, B1 y ácido fólico, utilizada en la cocina para preparar ensaladas, sopas y guisos (Centre for Agricultural Bioscience International, 2019)

Destacan Suarez y Morales (2018), que es importante conocer el contenido de vitamina C en las distintas etapas de maduración del ají dulce debido a su consumo frecuente y la necesidad de alimentos ricos en vitamina C. Para cuantificar el contenido de esta vitamina se utiliza la espectroscopia UV-Vis, un método ampliamente utilizado en las industrias farmacéutica, alimentaria, bioquímica y química debido a su capacidad para separar diferentes elementos naturales.

García et. al (2017) cuantificaron Vitamina C en 7 variedades de Capsicum, empleando otra metodología y García y Reyes en 2014 cuantificaron vitamina C en otro vegetal, utilizando el método de la 2-nitroanilina.

Debido a lo anteriormente expuesto, se justifica que el objetivo de esta investigación fue Cuantificar el contenido de vitamina C en los distintos estadios de maduración del ají dulce mediante espectrofotometría en UV-Vis. Se obtuvieron cuatro plantas a partir de semillas distribuidas por Miguel Márquez F.P. y compradas en un vivero de la Urb. La Trinidad, declaradas ají dulce sin variedad, ni fecha, ni lote, fueron trasplantadas el 20 de agosto de 2023 a una jardinera de tierra con drenaje y tierra abonada en el piso 6 de un edificio en el Área de Caracas, con disposición de luz solar, en distintos momentos del día

2.-Metodología

El enfoque metodológico fue de tipo cuantitativo, puesto que se ya que se realizó la extracción y cuantificación del contenido de vitamina C en ají. El trabajo fue realizado en la Universidad Católica Andrés Bello, ubicada en Caracas, Distrito Capital, Venezuela, donde fueron llevados los ejemplares de ají dulce sin refrigeración, y una vez realizados los análisis físicos y químicos fueron congelados para su posterior procesamiento por espectrofotometría.

Población

La población estuvo compuesta por los frutos de ají dulce en cuatro etapas de maduración disponibles para el momento del estudio proveniente de cuatro plantas de ají dulce.

Muestra

De cada una de las cuatro plantas se extrajeron 6 ejemplares de ají dulce por momento de maduración, los cuales se agruparon de a dos para unificar un total de tres muestras por planta y se tomaron en cuenta las siguientes variables: tiempo de brotado el fruto (se recolectaron a los 19 días de brotado, 35 días debrotado, 46 días de brotado, y 62 días de brotado), parámetros físicos (dimensiones, masa, densidad, color y dureza del fruto), parámetros químicos (pH y acidez titulable como contenido de ácido málico), contenido de vitamina C.

Técnicas y Procedimiento

Una vez se obtuvieron los ejemplares de ají dulce de cada planta, se realizaron los análisis correspondientes a: dureza, color, densidad, pH y acidez titulable. Una vez obtenidos todos los ejemplares necesarios, se procedió a analizar el contenido de vitamina C a través de espectrofotometría en luz UV-Vis.

Materiales, reactivos y equipos

Matraces aforados de distintas capacidades, cilindros graduados, tubos de ensayo, pipetas graduadas. NaOH al 10%, Solución alcohólica de fenolftaleína, Ácido acético glacial, Ácido clorhídrico al 10%, Solución acuosa de Ácido oxálico al 0,15 %, Solución acética clorhídrica de 2- nitro anilina (80 mg de 2-nitroanilina en 4 mL de ácido acético glacial, diluido en 50 mL de HCl al 10%), Solución acuosa de nitrito de sodio al 0.08%, Agua destilada libre de CO₂. Se debe hervir agua destilada, luego tapar y dejar enfriar. Así se evita que se forme ácido carbónico que aporte iones hidrógeno (H⁺). Alcohol etílico al 96%, Ácido ascórbico al 99%, Solución patrón de ácido ascórbico 0,2 mg/mL en ácido oxálico al 0,15 %. Todos los reactivos fueron grado analítico. Espectrofotómetro Thermo Scientific™ GENESYS 10S UVVis, pHmetro Hanna Instruments, Balanza analítica, Ohaus Adventure.

3.-Procesamiento de muestras

Las muestras se homogeneizaron por planta y se necesitaron 6 ejemplares por estado de maduración, estos se agruparon en pares, los cuales fueron cortados por la mitad, dos pedazos se usaron para Datos físicos y químicos, y el resto se utilizó para obtener el contenido de vitamina C.

A. Datos físicos y químicos: Una vez se obtuvieron los ejemplares de ají dulce de cada planta, se realizaron los análisis correspondientes a: dureza, color, densidad, pH y acidez titulable.

B. Datos sobre contenido de vitamina C: Una vez obtenidos todos los ejemplares necesarios, se procedió a analizar el contenido de vitamina C a través de espectrofotometría en luz UV-Vis.

En la siguiente tabla se presenta la distribución de muestras para los parámetros físicos y químicos, y para los datos de contenido de vitamina C:

Tabla 1 - Distribución de muestras para los parámetros físicos y químicos, y de contenido de vitamina C

Estados de maduración	Plantas	Mitades de ají por planta	Pares de ají por planta	Total de muestras
4	4	2	3	48

Procedimientos

Procedimiento experimental 1: Caracterización de algunas propiedades del fruto.

Se usó el siguiente protocolo: 1. Clasificar según la planta de procedencia y su estado de maduración. 2. Determinar visualmente el color del fruto. 3. Medir el alto, el ancho y la profundidad del fruto, tome como referencia el ápice de la rama con el fruto como parte superior. 4. Determinar la integridad del fruto, si este está poco firme o duro.

Procedimiento experimental 2: Medición de densidad aparente de las muestras.

Se usó el siguiente protocolo: 1. Agregar 10 mL de agua en un cilindro graduado de 25 mL. 2. Agregar al cilindro graduado 1 g de ají dulce picado. 3. Observe y registre la diferencia de volumen producido al agregar el ají dulce picado. 4. Calcular la densidad aparente.

Procedimiento experimental 2 y 3: Medición de pH según procedimiento modificado de la Norma COVENIN 1315-2021 para muestras muy densas con método indirecto y Determinación de la acidez titulable según procedimiento modificado de la Norma COVENIN 1151-1977 para frutas frescas y soluciones débilmente coloreadas.

Se usó el siguiente protocolo:

Preparación del extracto de ají dulce: 1. Triturar 3 g de muestra en un mortero con 25 mL de agua destilada libre de CO₂, evite generar burbujas. 2. Filtrar la preparación con un papel de filtro de paso medio 102. 3. Reservar para los dos siguientes procedimientos.

Medición de pH: 4. Agregar 5 mL del filtrado en un vaso de precipitado de 50 mL. 5. Agregar 25 mL de agua al vaso de precipitado y homogeneizar. 6. Medir por triplicado el pH con un pHmetro digital.

7. Calcular la media de los resultados. Medición de acidez titulable. 8. Colocar 5 mL de la disolución en un vaso de precipitado de 50 mL y agregue 25 mL de agua destilada previamente hervida. 9. Agregar dos gotas de solución alcohólica de fenolftaleína. 10. Titular con una solución de NaOH al 0.01 M, hasta

que note un ligero cambio de color hacia el rosado claro. 11. Anotar el volumen de NaOH utilizado. 12. Realizar los cálculos según concentración de ácido málico (meq = 0,067).

Procedimiento experimental 4 – Preparación de la curva de calibración del ácido ascórbico nitroanilina según metodología modificada de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales - Análisis de Alimentos 1998 (ACCEFNA-AA- 1998).

Se usó el siguiente protocolo:

Tabla 2. Diagrama de disoluciones y agregados para curva estándar de vitamina C

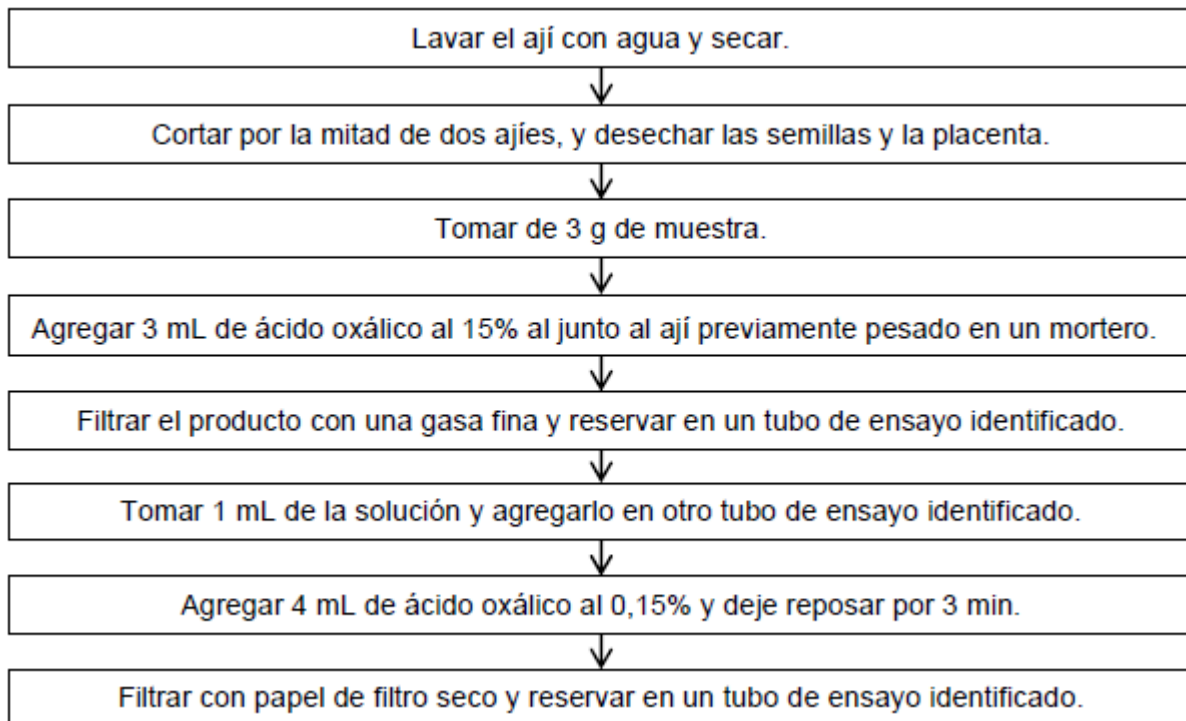
[Concentración de Ac. Ascórbico mg/mL]	0	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	0,14	0,2
Tubo	Blanco	1	2	3	4	5	6	7
2-nitroanilina (mL)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Nitrito de sodio 0,08% (mL)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Alcohol etílico 96% (mL)	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8
Solución patrón ácido ascórbico 0,2 mg/mL	0 mL	0.1 mL	0.2 mL	0.3 mL	0.4 mL	0.5 mL	0.7 mL	1 mL
Mezclar bien y esperar 5 min								
NaOH al 10%	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
Agua destilada (mL)	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8
Longitud de onda empleada	540 nm							

Procedimiento experimental 5: Determinación de contenido de ácido ascórbico por colorimetría de la 2-nitroanilina según metodología ACCEFNA-AA-1998.

Se usó el siguiente protocolo:

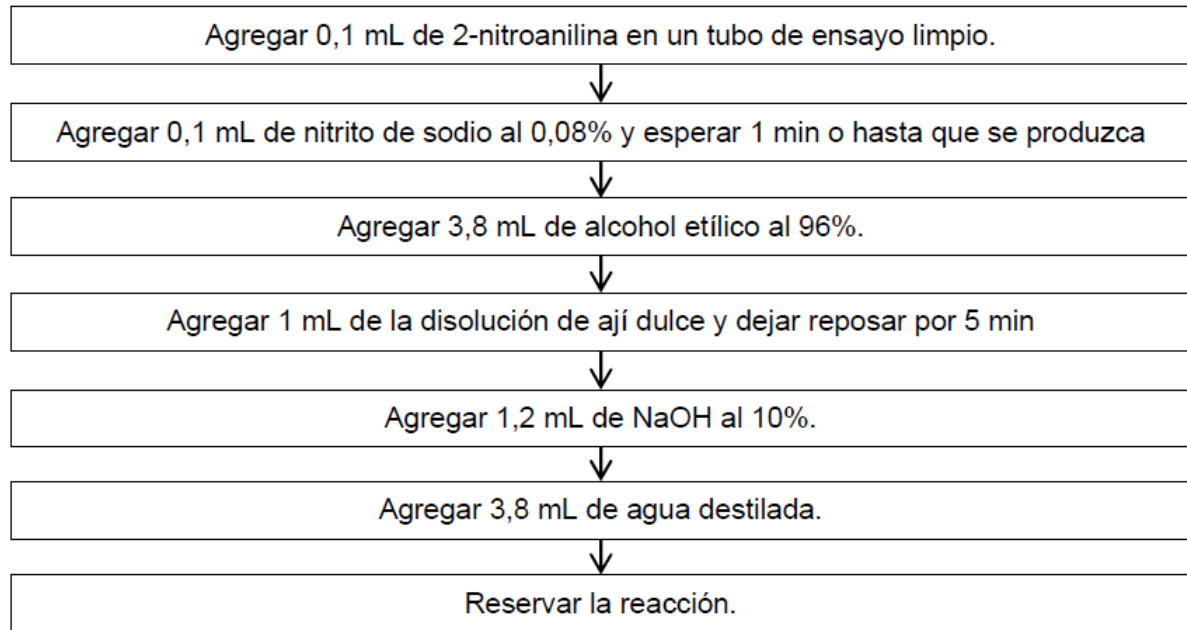
Extracción de la dilución de ají dulce

Figura 1. Proceso de extracción de la dilución de ají dulce



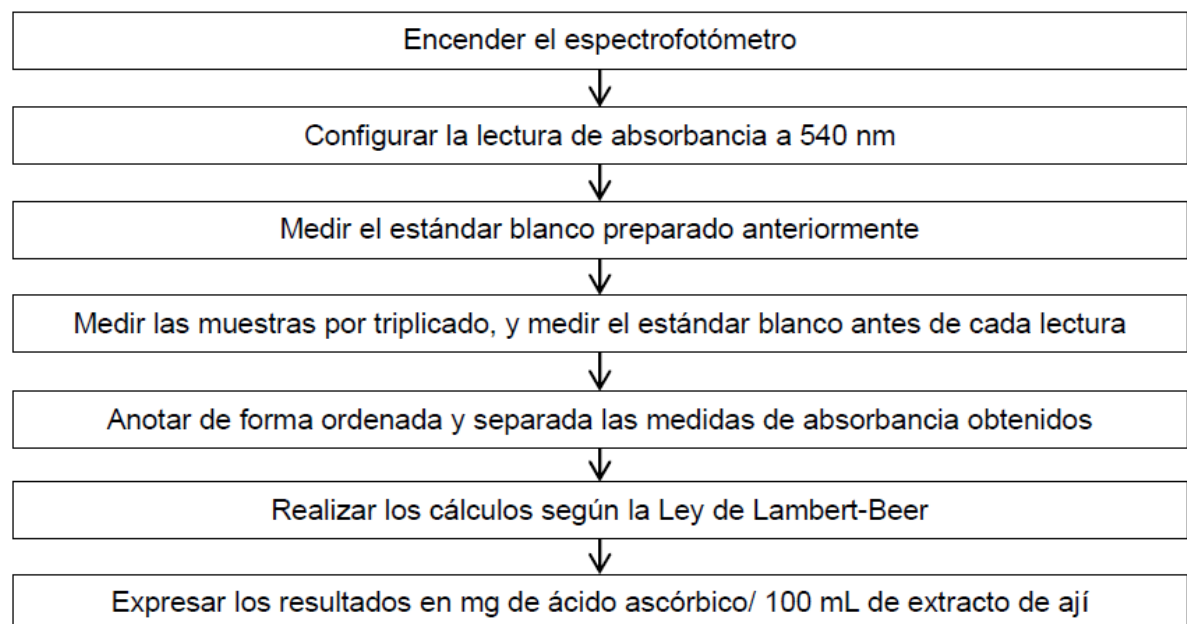
Preparación de la muestra

Figura 2. Preparación de la muestra problema



Lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro UV-Vis

Figura 3. Proceso de lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro UV-Vis



4.-Resultados y discusión

a) Características de los estados de maduración del fruto de ají dulce

Parámetros físicos

El fruto de ají dulce se clasificó en 4 etapas de maduración, correspondientes al tiempo que pasaron los frutos en la planta: Verde, Pintón, Maduro y Muy maduro, los datos se expresan en la siguiente tabla:

Tabla 3. Descripción de aspectos físicos usados para delimitar los estados de maduración del fruto de ají dulce.

Estado de maduración	Días de brotado	Color	Dureza del fruto	Foto
Verde	19	Verde	Duro	
Pintón	35	Verde/Anaranjado	Duro	
Maduro	46	Rojo	Duro	
Muy Maduro	62	Rojo Oscuro	Duro	

Densidad aparente

Los cálculos se realizaron utilizando la masa de la muestra entre el volumen desplazada por la muestra en el cilindro graduado.

La densidad aparente de las muestras procesadas de ají dulce tiende a aumentar ligeramente desde el estado Verde $0,88 \pm 0,08$ g/mL hasta el estado Maduro, cuando es Muy maduro esta desciende ligeramente, esto se puede explicar debido al crecimiento del fruto, ya que a medida que pasa el tiempo en la planta, esta va almacenando más agua y nutrientes en sus frutos.

El grado con mayor densidad es el Maduro con $1,01 \pm 0,09$ g/mL, además se puede observar que a medida que el fruto pasa más tiempo en la planta después de considerarse maduro a los 45 días, este disminuye ligeramente su densidad a $0,96 \pm 0,08$ g/mL. Este comportamiento se presenta en el gráfico 1.

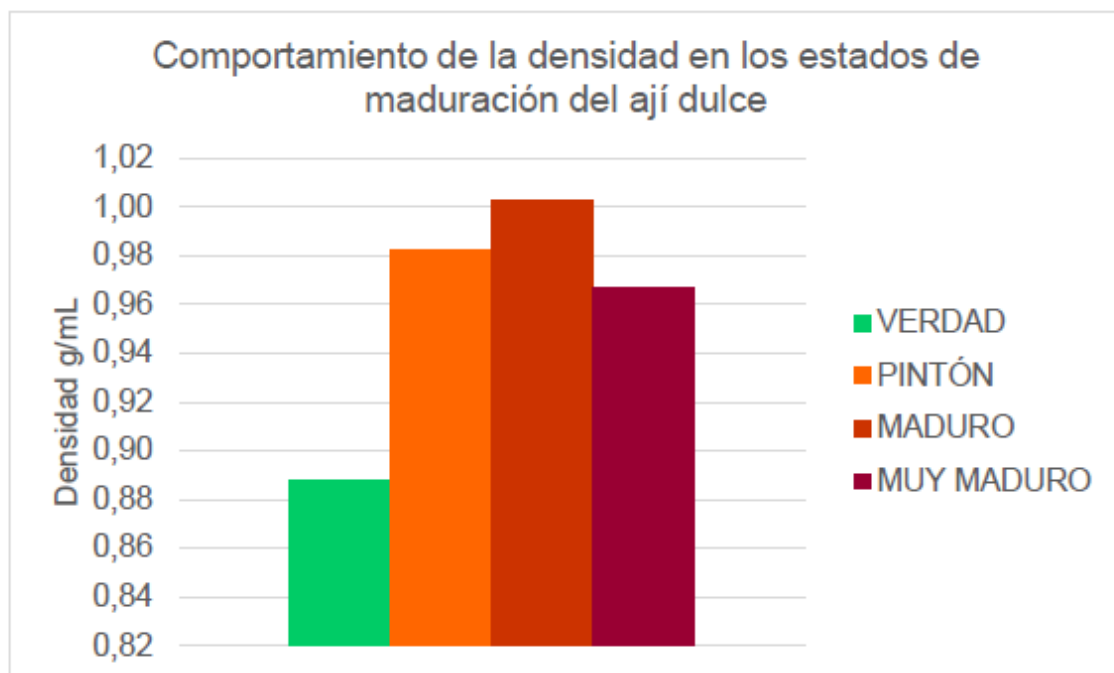


Gráfico 1 - Comportamiento de la densidad en los estados de maduración del ají dulce

Parámetros químicos

- Acidez titulable (% de ácido málico)

En el fruto del ají dulce el ácido predominante es el málico (Conesa et al., 2006), por eso la acidez titulable se calculó con base al ácido predominante en el analito, correspondiendo a la norma COVENIN 151-77. La acidez titulable fue aumentando a medida que el fruto pasaba más tiempo en la planta, partiendo en un promedio de $0,92 \pm 0,17$ % de Ac. Málico y finalizar en un promedio de $1,83 \pm 0,28$ % de Ac. Málico, observándose un ligero aumento a medida que el fruto estuvo más tiempo en la planta. Para obtener los resultados, se realizaron tres mediciones de titulación, se calculó con la multiplicación

del volumen de NaOH usado, por la normalidad de la solución de NaOH por el meq del ácido málico (0,067), todo eso entre 100 por los gramos de muestra utilizados, luego de obtenido el porcentaje de ácido málico en las muestras, se les aplico dos factores de dilución, el primero correspondiente al ácido oxálico agregado para triturar (5) y posteriormente el ácido oxálico agregado para la filtración (5). Luego se sacaron los promedios por planta, con su desviación (S) y su coeficiente de variación. Por último, se calculó el contenido promedio por estado de maduración, la desviación estándar y su coeficiente de variación. En el gráfico 2 se presenta el comportamiento del % de ácido málico en los estados de maduración del ají dulce

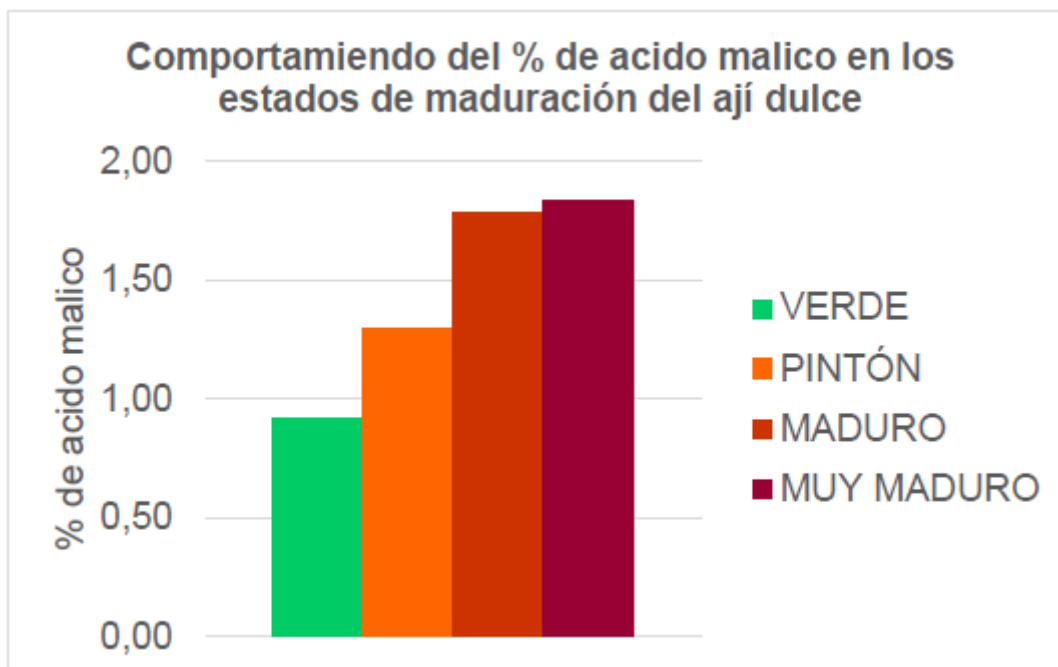


Gráfico 2 - Comportamiento del % de ácido málico en los estados de maduración del ají dulce

Comparando los resultados obtenidos sobre acidez titulable (% de ácido málico) se consigue que a mayor cantidad de ácido málico en la muestra, menor es su pH, variando ligeramente entre el estado Pintón con $5,08 \pm 0,18$ y Maduro 5,14, siendo más notorio entre el Verde 5,68 y el estado Muy Maduro 5,15. Sin embargo los resultados obtenidos se mantienen en el rango ácido de la escala de pH entre 5 y 6.

En el gráfico 3 se presenta la variación del pH en los estados de maduración del ají dulce

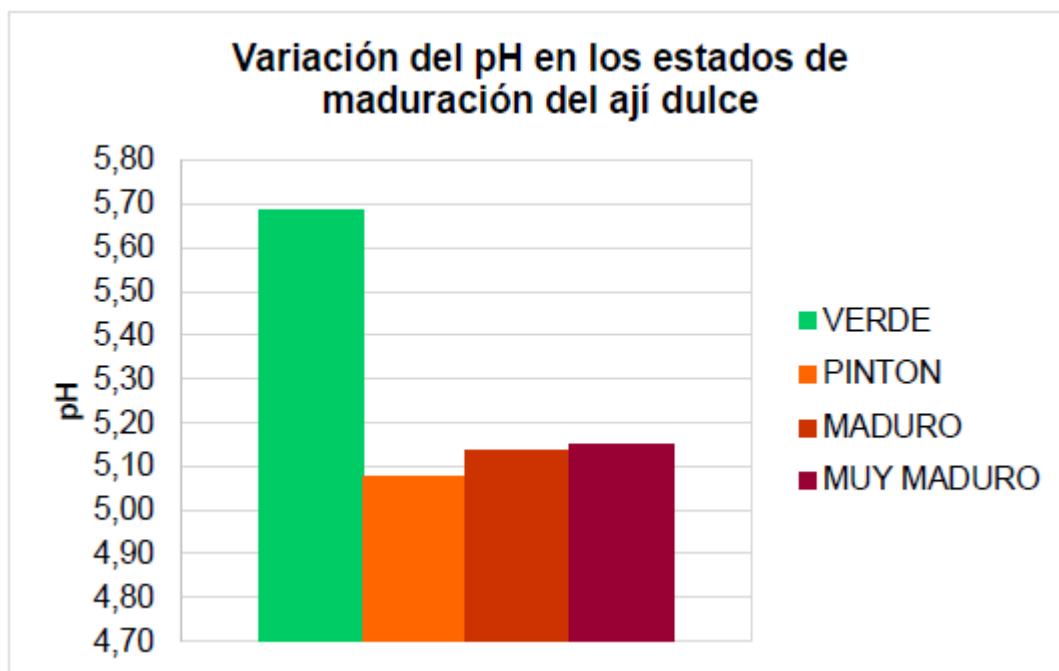


Gráfico 3 - Variación del pH en los estados de maduración del ají dulce

Curva estándar del ácido ascórbico

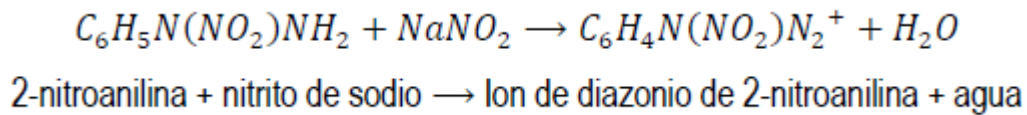
En la curva estándar de ácido ascórbico realizada según los lineamientos del método ACCEFNA-1998, se emplearon concentraciones conocidas y utilizando Microsoft 360 Excel, versión 2024, se encontró que la ecuación de la recta fue $y = 4,9158x + 0,063$ y el coeficiente de determinación fue de $R^2 = 0,9955$.

Extracción de ácido ascórbico del fruto del ají dulce

Cuantificación del contenido de ácido ascórbico del fruto de ají dulce Para la cuantificación del ácido ascórbico a través de espectrofotometría, se necesita realizar una serie de reacciones para producir un cromóforo que se va a encargar de la coloración particular para su posterior lectura y cuantificación, esta coloración responde a la cantidad de vitamina C presente, entre más vitamina C más intensa es la coloración, la serie de reacciones que ocurren en esta investigación son las siguientes:

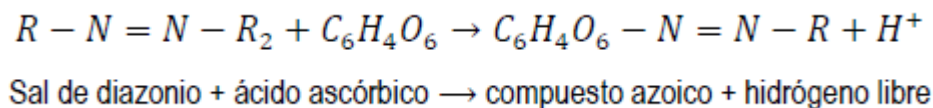
Primeramente, al mezclar la solución acética-clorhídrica de 2-nitroanilina con nitrito de sodio, se produce una reacción de diazotación, donde el grupo amino de la 2- nitroanilina reacciona con el ion nitrito (NO_2^-) de la solución, convirtiéndose en un grupo diazo ($-\text{N}_2^+$), representado en la siguiente reacción:

Reacción 1 - Formación de la sal de diazonio



Posteriormente el ácido al ascórbico reduce el grupo diazo ($-N \equiv N$) de la 2-nitroanilina diazotada. Esta reducción, gracias al medio alcalino producido por el hidróxido de sodio, lleva a la formación de producto de acoplamiento azoico coloreado, el cual es más intenso a medida que hay mayor concentración de ácido ascórbico.

Reacción 2 – Acoplamiento



En el gráfico 4 se presenta el comportamiento del contenido de vitamina C en los estados de maduración del ají dulce

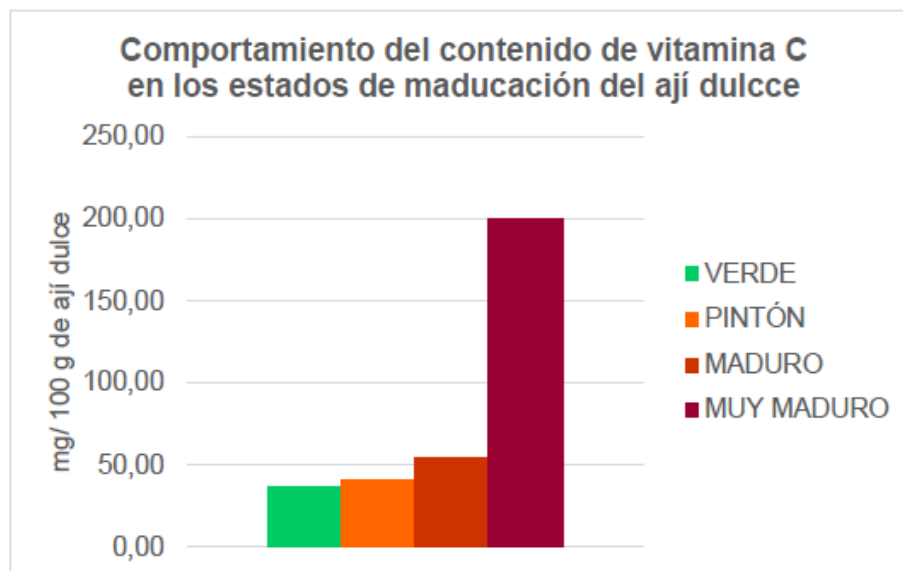


Gráfico 4. Comportamiento del contenido de vitamina C en los estados de maduración del ají dulce

Comportamiento de los parámetros físicos y químicos durante la maduración del Fruto

Durante el proceso de maduración, aumenta el contenido de Vitamina C, se observa un aumento de la acidez titulable y una disminución del pH, mientras que los valores de la densidad muestran muy poca

variación. El comportamiento de los parámetros físicos y químicos durante la maduración del ají dulce, se presenta el gráfico 5.

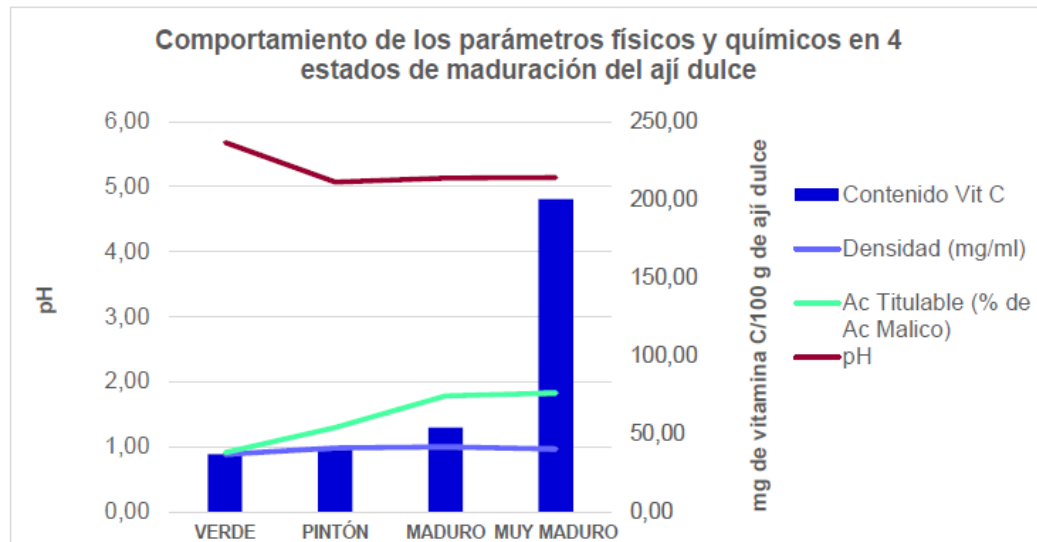


Gráfico 5. Gráfico de comportamiento promedio de parámetros físicos y químicos durante la maduración del ají dulce

b) Validación del método ACCEFNA-AA-1998

El método fue validado en cuanto a su linealidad, límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) (Food and Drugs Administration, 2015)

Linealidad

Para establecer la linealidad se realizó una curva de calibración partiendo de una solución madre de 10 mL usando 2 mg de ácido ascórbico al 99% de pureza USP, realizando las siguientes diluciones: 1/10 mL, 2/10 mL, 3/10 mL, 4/10 mL, 5/10 mL, 7/10 mL y 1 mL. Se obtuvo una línea recta recta fue $y = 4,9158x + 0,063$ con un coeficiente de determinación fue de $R^2 = 0,9955$, lo que muestra que el método es lineal en el rango de concentraciones estudiado

Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)

El promedio de las lecturas de absorbancia del blanco fue de 0.055, al aplicarle el producto de la multiplicación de tres por de la desviación estándar (0,0012) y dividirlo con la pendiente de la curva de calibración (4,9158) se obtuvo que el valor del límite de detección fue igual a $Y_{LOD} = 0,1303$.

Además, al realizar el cálculo con diez veces el valor de la desviación estándar (0,0012) y dividirlo con la pendiente de la curva de calibración (4,9158) se obtuvo que el valor del límite de cuantificación es: YLOQ= 0,2874.

Precisión

La precisión del método analítico desarrollado se ha evaluado en términos de la repetibilidad y la reproducibilidad.

- Repetibilidad

Se evaluó realizando 3 ensayos idénticos el mismo día y se han obtenidos valores del coeficiente de variación (CV) menores a 0.1, reflejando una baja variabilidad de las muestras procesadas.

- Reproducibilidad

El coeficiente de variación (CV) para cada uno de los estados de maduración, se obtuvieron valores por debajo de 0.1 para el estado Verde: 0,01, para el estado Pintón: 0,05. para el Maduro: 0,03 y Muy maduro: 0,11, reflejando una baja variabilidad en los estados de maduración estudiados.

6.-Conclusiones

Este estudio cuantificó el ácido ascórbico presente en frutos de ají dulce mediante espectroscopia UVVis y reacción de 2-nitroanilina. Se realizaron mediciones de dimensiones, masa, color, densidad, tiempo, pH y acidez titulable. Los resultados mostraron que los frutos con menor tiempo en la planta presentaron menor densidad, contenido de vitamina C, pH y acidez tártara. Los frutos con mayor tiempo en la planta presentaron mayor contenido de vitamina C, pH y acidez tártara. Los frutos con mayor tiempo en la planta fueron clasificados como Muy Maduros. Los estados Pintón y Rojo no mostraron diferencias significativas en comparación con el estado Verde. Sin embargo, el ligero aumento en el contenido de vitamina C y ácido tártaro, densidad y pH disminuyó con el tiempo. Estas diferencias se pueden atribuir a que la estructura final de almacenamiento y la estructura reproductiva del fruto favorecen la llegada de más nutrientes, agua y minerales, lo que resulta en un mayor contenido y densidad de vitamina C.

Referencias

- Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales - Análisis de Alimentos 1998 (ACCEFVN-AA- 1998). Recuperado de: <https://es.scribd.com/document/432453360/ACCEFVN-AC-spa-1998-Analisis-de-alimentos-pdf>
- Centre for Agricultural Bioscience International (2019) Capsicum annuum (bell pepper). CABI Digital Library. Recuperado de: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/cabicompendium.15784>
- Conesa, M., Artés-Hernández, F., López-Rubira, V y Artés, F (2006). Ácidos orgánicos y azúcares en pimiento cultivado bajo distintos sistemas y conservado en atmósfera modificada. Departamento de Ingeniería de Alimentos, Universidad Politécnica de Cartagena. Recuperado de: <https://repositorio.upct.es/entities/publication/6d091b1c-62ab-4d8b-9b7d-507be80f8e3b>
- Food and Drugs Administration (2015) Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. U.S. Department of Health and Human Services. Recuperado de: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Analytical-Procedures-and-Methods-Validation-for-Drugs-and-Biologics.pdf>
- García, C., Romero, H., Calderón, B., Ayala, H., Moreno, A. y Lam, A. (2017) Cuantificación de ácido ascórbico en pimientos comercializados en la zona 7 del Ecuador aplicando voltamperometría. Revista Cumbres Vol.3 N°2, Universidad de Machala. Recuperado de: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/6550759.pdf>
- García, T., Coletto, J. y Velázquez, R. (2015) Historias de las plantas II: la historia del pimiento Universidad de Extremadura. <https://www.unex.es/conocela-unex/centros/eia/archivos/iag/2015/2015-14-historias-de-plantas-ii-la-historiadel.pdf>
- García, I y Reyes, H (2014) Determinación analítica y cuantitativa de antioxidantes presentes en el tomate chonto verdura típica del Quindío. Entre Ciencia e Ingeniería, ISSN 1909-8367. Año 8. No. 15 – Primer Semestre de 2014, página 71 - 75
- Institute of Medicine. (2000) Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK225480/>
- Norma COVENIN 1315-2021. <https://sigbs.sencamer.gob.ve/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=8>

Norma COVENIN 1151-1977. <https://sigbs.sencamer.gob.ve/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=1831>

Suarez, D y Morales, Y. (2018) Principios básicos de la Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento para la separación y análisis de mezclas. Revista Semilleros: Formación Investigativa, Vol. 4. Fundación Universidad de América. Recuperado de: <https://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/7731/1/6131978-2018-1-IQ.pdf>