

**Universidad Nacional Autónoma
de México**

////////////////////
FACULTAD DE QUIMICA



**VALORACION DE VAINILLINA EN EL EXTRACTO DE
VAINILLA POR EL METODO ALCALINO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

Q U I M I C O

P R E S E N T A :

MARIA VIRGINIA CLEOPATRA ZEPEDA PEREZ

México, D. F.

1 9 8 0 .



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado	PRESIDENTE	GUILLERMO HERNANDEZ ANGELES
originalmente	VOCAL	JOSE G. SOLORIO MUNGUIA
según el tema.	SECRETARIO	CARLOS ROMO MEDRANO
	1er. SUPLENTE	FRANCISCO SERRANO MENESES
	2o. SUPLENTE	RODOLFO SAMANO IBAÑEZ.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA: FACULTAD DE QUIMICA.

SUSTENTANTE: MARIA VIRGINIA CLEOPATRA ZEPEDA PEREZ.

ASESOR DEL TEMA: I. Q. GUILLERMO HERNANDEZ ANGELES.

A MI ESPOSO;

QUIMICO JORGE RUIZ MAGAÑA.

A MIS PADRES:

SR. RAUL ZEPEDA MENDOZA.

SRA. AMPARO PEREZ DE ZEPEDA.

A MIS HIJOS:

HUGO Y JORGE ULISES RUIZ ZEPEDA.

A MIS FAMILIARES Y AMIGOS

AL H. JURADO.

VALORACION DE VAINILLINA EN EL EXTRACTO DE VAINILLINA POR EL METODO -
ALCALINO.

I N D I C E.		PAGINA
I.-	INTRODUCCION	1
II.-	GENERALIDADES	2
A .-	Historia de la Vainilla.....	2
B .-	Evolución Histórica de la Importancia Económica	4
	de la Vainilla.	
C .-	Aspectos Generales de la Vainilla.....	7
III.-	BENEFICIO DE LA VAINILLA.....	9
A .-	Clasificación de la Vainilla.....	10
B .-	Despicado.....	10
C .-	Secado de la Vainilla.....	10
D .-	Clasificación de las Vainas Beneficiadas.....	11
E .-	Control de la Vainilla en México.....	12
F .-	Especificaciones Comerciales de la Vainilla.....	13
IV.-	ACCION DE LA BETA-GLUCOSIDASA EN EL PROCESO DEL CURADO DE - LA VAINILLA.....	15
1 .-	Distribución de la Glucovainillina en las Vainas.....	15
2 .-	Efecto de Madurez en las Vainas de Vainillina en el Conte- nido de Glucovainillina y Contenido de Vainillina.....	17
3 .-	Betaglucosidasa en Vainas de Vainilla.....	18
4 .-	Separación de Enzimas Crudas.....	18
5 .-	Distribución de Enzimas.....	19
6 .-	Efecto de Madurez en la Actividad de Enzimas.....	20
7 .-	Cambio de Actividad en Vainas Verdes Durante la Cura.....	21

V .-	PARTE EXPERIMENTAL.	
1 .-	Protocolo.....	23
a).-	Curva de Absorción Máxima de p-hidroxibenzaldehido.....	26
b).-	Curva de Absorción Máxima de Vainillina.....	27
c).-	Usos de la Vainillina.....	28
2 .-	Extracción.....	29
a).-	Influencia del Tamaño de Partícula en la Extracción.....	29
b).-	Tamaño de Corte de la Vainilla.....	29
c).-	Influencia del Agua.....	30
3 .-	Formulación de la Tintura de Vainilla.....	31
4 .-	Añejamiento de la Tintura de Vainilla.....	31
5 .-	Procedimiento de Análisis	32
6 .-	Determinación de Vainillina en el Extracto de Vainilla por el Método Alcalino.....	35
7 .-	Cálculo para la Curva Estandar de Vainillina a dos Longitudes de Onda.....	37
8 .-	Cálculos de la Curva Estandar de p-hidroxibenzaldehido.....	39
9 .-	Gráficas de las Pendientes de Vainillina y p-hidroxibenzaldehido.....	41
10.-	Determinación de la Ecuación de Concentración de Vainillina en Términos de Absorbancia.....	42
11.-	Cálculo de la Pendiente del p-hidroxibenzaldehido y Vainillina.....	44
12 .-	Cálculo de las Diferentes Concentraciones de Vainillina en Algunas muestras de Vainilla Tipo Planifolia.....	45
	CONCLUSIONES	46
	BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	48

I

INTRODUCCION

En la fabricación de productos alimenticios, el uso de los extractos de vainilla es muy amplio; dichos extractos se utilizan aplicándolos en diversas formas a productos tales como: dulces, helados, refrescos, galletas, atoles, harinas, y gelatinas. El extracto se utiliza en la industria alimentaria, puro o bien, reforzado con vainillina o etil vainillina.

La vainillina en diversos extractos de vainilla fue cuantificada por Feeny valiéndose de un espectrofotómetro, así mismo Pomerantz y colaboradores aportan un método espectrofotométrico para el cuanteo de vainillina que posee la gran ventaja de ser rápido, por otra parte Prescott propone ciertas modificaciones muy acertadas a los métodos clásicos de cuantificación de vainillina, Giral elabora un método gravimétrico muy preciso para determinar vainillina; (5).

El presente trabajo estará enfocado a determinar la vainillina en el extracto alcohólico de la vaina de vainilla por el método alcalino.

Este método alcalino consiste en desplazar la longitud de onda de absorción máxima de la vainillina de 308 nm que se presenta en un medio neutro a 348 que se presenta en medio alcalino. Este método alcalino f.é desarrollado por Feeny (20), en este trabajo analizaremos el desarrollo matemático y estableceremos los fundamentos químico-teóricos en que se basa dicho método.

II

GENERALIDADES

A.- HISTORIA DE LA VAINILLA. Tlilxochitl " Flor Negra " con este nombre, Francisco Hernández médico de cámara del rey Felipe II de España, dió a conocer al mundo la " vainilla " en su libro " Historia de las Plantas de la Nueva España ". Este libro fué publicado en latín y traducido al Español por Francisco Jimenez.

Hernández llamó a las vainas negras " Silique " lo que Jimenez tradujo como vainilla, diminutivo de vaina.

En 1658 definitivamente se le dió el nombre de vainilla, nombre hasta entonces usado solamente por los españoles.

Los ingleses en 1754 la clasificaron en el " Garder 's Dictionary " por Philipp Miller, la hicieron florecer en los jardines de Ch. Greville cerca de Londres. Salibury denominó a las flores " Myobroma Fragans ", un año más tarde Andrews la describió como Vainilla Planifolia, sin embargo ninguno de los dos reconoció la planta floreciente como la vainilla de México, corriente en el comercio.

Alejandro Von Humboldt en 1811, cuando regresó de su primer viaje de América, describió los cultivos de Vainilla en México.

Los holandeses trataron de cultivar su propia vainilla en Java; se daba bien, crecía, formaba brotes nuevos, florecía, pero el fruto nunca surgió; escogieron muchas islas con las características climáticas necesarias pero fracasaron en su intento.

El problema fué resuelto por Charles Morren, botánico de Lieja, quien polinizó a mano las flores, resultando 54 frutos de magnífico -
aroma.

Los ensayos de Morren fueron repetidos en las colonias holandesas y francesas, y en todas partes se pudo recoger vainilla aromática, -
todas ellas pertenecientes al género *Vainilla planifolia*, (12).

B.- EVOLUCION HISTORICA DE LA IMPORTANCIA ECONOMICA DE LA VAINILLA.

Las primeras noticias que se tienen de la existencia de la vainilla datan del reinado azteca de Itzcoatl (1427-1440), en que las expediciones guerreras de este nonarca mexicano resultaron victoriosas logrando la conquista del territorio ocupado por la Cultura Totonaca; obligando a los habitantes del mismo a pagar tributos diversos entre los que se encontraba el fruto de la vainilla.

Antes de la conquista del Totonacapan por los aztecas, la propiedad de la tierra era de tipo comunal y también el usufructo de la misma, a partir de la dominación azteca los totonacas presentan un modo de producción tributario el cual consiste en la existencia de comunidades autosuficientes sometidas a un poder central que organiza la producción realizando obras de infraestructura (puentes, caminos, terrazas y acueductos) y que recibe un tributo de parte de las comunidades sometidas, mismo que podía ser en especie o en trabajo, entre los totonacas, el tributo era en especie y estaba representado por diversos productos artesanales y agrícolas.

Las tierras comunales se vieron divididas en tierras para la satisfacción de las necesidades de la comunidad y tierras destinadas al cultivo del producto tributario y de gran importancia se encontraba la vainilla la cual se utilizaba como moneda.

Esta situación se mantiene hasta la llegada de los españoles quienes al conquistar el territorio organizan una encomienda, conservándose las mismas características del modo de producción tributario.

Hasta fines del siglo XVIII la zona de Papantla, Gutiérrez Zamora y Tecolutla era netamente agrícola, basada en el cultivo de maíz, frijol, chile y vainilla. En el período inmediato posterior (1800-1820) -- su importancia se localiza básicamente en el comercio al que se dedicaban en gran medida los españoles y debido al agan de acaparar la mayor cantidad posible de vainilla la compraban antes de que alcanzara su plena madurez, demeritando su calidad.

A partir de 1820 hasta 1840 encontramos que las tierras que antes eran explotadas cuando menos en parte en forma comunitaria por los indígenas, estas tierras estaban divididas en forma rústica en fincas, dedicadas principalmente a la ganadería y gran parte de ellas eran propiedad de Don Guadalupe Victoria.

La región sufre una transformación radical a partir de 1900 en que fueron descubiertos ricos yacimientos petrolíferos, el gobierno extiende concesiones petroleras a las compañías extranjeras.

En 1930 (cuando se descubrieron ricos yacimientos petrolíferos en Coatzintla Ver.) se produjo la mayor explotación petrolera en la zona.

En 1956 la producción nacional de vainilla fué de 267 toneladas con una superficie cosechada de aproximadamente 900 hectáreas.

En 1973 la producción nacional de vainilla fué de solo 128 toneladas con una superficie cosechada de 1500 hectáreas.

Como se puede observar éste decremento de la producción nacional de vainilla se debió en gran parte a la disminución de la superficie cosechada; decremento que se atenuó por la elevación de los rendimientos de vainilla beneficiada por hectárea aumentando de 30 kilogramos en 1956 a 90 kilogramos en 1973.

Otro factor que intervino en el desplome del mercado de la vainilla, fué la demanda del sustituto o sea, la vainillina sintética la cual tiene un costo de producción muy bajo y un procedimiento de fabricación muy sencillo, por lo cual ha desplazado al producto natural lo que origina una salida de divisas debido a la importación de la vainillina compensada por las entradas de divisas de las exportaciones del producto natural.

C.- ASPECTOS GENERALES DE LA VAINILLA. La vainilla es el fruto inmaduro de una orquídea. Orquídeas que den como fruto la vainilla existen 110 variedades, pero solo unas cuantas son de tipo comercial: Vainilla Aromática Swartz, Vainilla Lutescena Rich, Vainilla Pompona Scheide y Vainilla Fragans que es sinónimo de Vainilla Planifolia Andrews, - siendo esta última la única que se beneficia en México.

La vainilla es una planta trepadora originaria de la parte norte de la zona costera del Estado de Veracruz, o sea, de la zona totonaeca, misma que abarca desde el río Tuxpan al norte, hasta el río la Antigua al sur extendiéndose hacia el centro del país hasta la Sierra Madre Oriental, desde Huachinango Puebla al norte, hasta las inmediaciones del Cofre de Perote al sur. Esta región presenta en su zona centro (Papantla, Gutierrez Zamora y Tecolutla) las características de suelo y clima ideales para su cultivo ya que éste requiere de cierto grado de humedad y riquezas orgánicas.

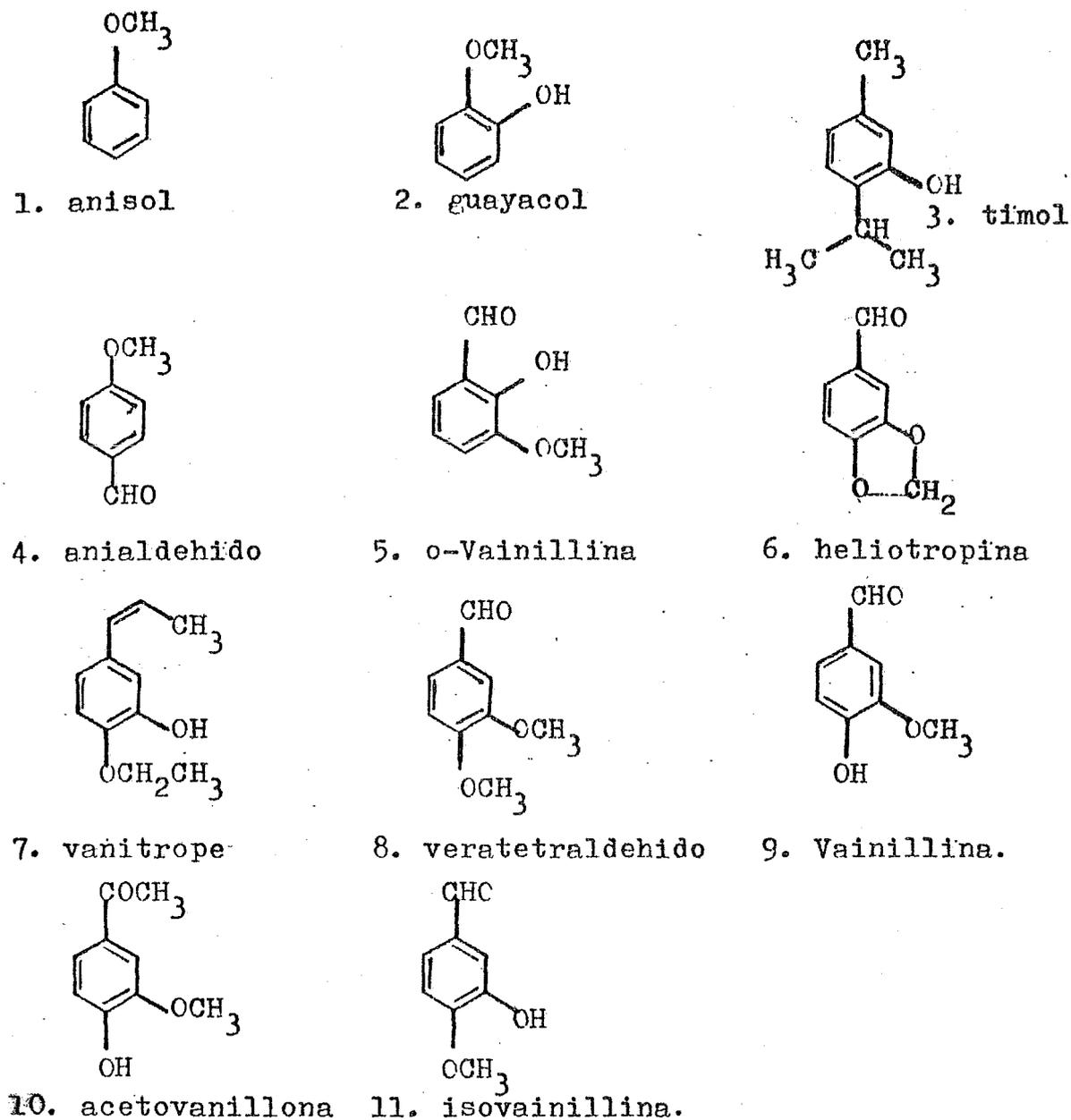
La clasificación botánica de la Vainilla Fragans es la siguiente: Reino, Vegetal; Grupo, Espermatofitas; Clase, Angiospermas Sub-clase, Monocotiledónea; Familia, Orquídeas; Sub-familia, Pleoándreas; Tribu, - Ofrideas; Género, Vainilla; Especie, Planifolia; nombre regional, Xanthath.

La vainilla se cultiva en terrenos vírgenes cuyo pH es de 7 a 7.5, el sistema de siembra más común es el del bejuco el cual se planta a una distancia de 2.5 m. con un promedio de 2000 plantas por hectárea, obteniéndose la primera floración abundante a los tres años de plantado el bejuco, la polinización de la vainilla es a mano y se calcula que una persona puede polinizar 1000 flores por día.

Se requiere unos nueve meses entre la polinización de la flor - y la cosecha; la época principal de la cosecha se encuentra comprendida entre los meses de noviembre y enero; la mejor indicación de que la fruta esta lista para su cosecha es el color amarillento que presenta en - el extremo inferior de la vaina (3).

III. BENEFICIO DE LA VAINILLA.

Se puede definir el Beneficio de la Vainilla como la serie de operaciones a que es sometida la vainilla más o menos madura, a fin de que manifieste plenamente su calidad, que consiste en el desarrollo de aceites esenciales y sustancias aromáticas como lo son:



Determinados por cromatografía de gases según la referencia número 2.

PROCEDIMIENTO DEL BENEFICIO DE LA VAINILLA.

A.- Clasificación de la vainilla. La vainilla se clasifica separando la vainilla aún verde de las vainillas perfectamente maduras y sin ningún daño, vainillas rajadas por exceso de madurez, vainillas con las puntas negras y fruto manchado, vainillas con los pezones y partes cercanas a él negras y vainillas con el pezón retorcido.

B.- Despicado. Después de clasificar la vainilla, se procede a despezonar, o sea, eliminar el pezón de la vainilla y parte de los residuos de la inflorescencia con el objeto de no entorpecer el empaque final, a esta operación se le denomina " despicado ".

C.- Secado de la vainilla. Enseguida se someten los frutos a la acción del calor ya sea al horno metiéndolas previamente empacadas, o bien, sometiéndolas a la acción del calor del sol con objeto de dar fin a la vida vegetativa y deshidratar gran parte del fruto. Se calcula que de 5 kilos de vainilla hidratada, se obtiene un kilo de vainilla beneficiada.

1.- Secado al horno. Las vainillas a deshidratar se amarran en paquetes de 100 a 500 vainas (mazona) y se envuelven en colchas colocándose en una caja y se ponen en un cuarto a 60° C. de 36 a 48 horas. La temperatura no debe ser mayor de 55-60° C. pues puede desactivar el sistema enzimático fermentativo que sigue al proceso de deshidratado de la vainilla.

2.- Secado al Sol. Después de ser sometidas a la acción del calor del horno, las vainas se ponen en cajas sudadoras por 24 horas, posteriormente son expuestas de una a tres horas diarias durante la parte-

más calurosa del día y se asolean por 15 o 20 días Cada 4 o 5 días son colocadas en cajas sudadoras por toda la noche luego se enderezan las vainas y se envuelven en mazos de 50 a 100 vainas siendo guardadas en cajas hasta que estén listas para clasificarse, (3).

Un aspecto muy importante que debe tomarse en cuenta es el control de la humedad al término del beneficio de la vainilla, la cantidad de humedad no debe ser mayor del 25 al 30 % ya que la vainilla puede ser atacada por hongos como son: *Aspergillus niger* *Penicilium lividum*, *Penicilium vanillae* y *Penicilium rugulosum*, los cuales se desarrollan en cualquier tipo de materia orgánica y máxime en un medio óptimo como es la glucosa que contiene la vainilla beneficiada; estos hongos se desarrollan en una temperatura inferior a los 27° C. por lo cual debe almacenarse en un cuarto fresco (no frío) y no húmedo evitando así el desarrollo de hongos, (1), (11).

D.- Clasificación de las vainas beneficiadas. Finalmente la vainilla se saca del almacenaje y se clasifica en tres grupos. Las vainas menos maduras tendrán más claro el color café al ser procesada; las vainas cosechadas más maduras presentaran un color más oscuro y será más gruesa, por lo tanto la vaina será de mejor calidad.

Las vainas se separan en grupos y subgrupos, de acuerdo con su tamaño y color (en la región el largo de las vainas varía de 18 a 24 cm.), luego la vainilla se amarra en mazos de aproximadamente 70 frutos (se procura que tengan un peso aproximado de una libra). Estos mazos se amarran con una cuerda encerrada en las dos puntas y en medio, todas las puntas de los tallos se colocan hacia el mismo lado. Los paquetes se colocan en papel encerrado en cajas de hojalata, se cierran -

y estan listas para distribuir las al mercado nacional o al internacional.

Dado que, la época de cosecha comienza en noviembre 15, empieza a haber vainilla lista para el mercado en abril, terminándose la época del beneficio en julio.

E.- Control de la vainilla en México. En México existe un decreto que reglamenta el corte, la explotación, comercio y beneficio de la vainilla que fué promulgado inicialmente el 23 de julio en 1941 el cual fué derogado en enero de 1943 por otro decreto que modificó en mucho al anterior y que actualmente se encuentra en vigor. El decreto de 1943 reglamenta la fecha en que los agricultores han de hacer el corte de su producto, el cual esta fijado para la vainilla pinta y rajada a partir del primero de octubre y el corte de la vainilla común se inicia el quince de noviembre y expira el 15 de mayo; además orienta a los compradores de vainilla. También les explica a los beneficiadores la manera de como han de beneficiar, comprar y exportar el producto y les indica las oficinas a las que deben acudir para registrarse como tales, así como las que se encargan de expedir los documentos respectivos para el beneficio y exportación de la vainilla, (3).

7.- ESPECIFICACIONES COMERCIALES DE LA VAINILLA.

La Vainilla debe expendirse con la indicación de su procedencia: México, Borbón, Tahití, Java. Los calificativos " Calidad superior " y " Calidad extra ", se consideran sinónimos. Las calificaciones comerciales con que se expenden corresponderán a las siguientes exigencias:

Clasificación Comercial.	Aspecto	Longitud media en cm.	Peso en g.
Calidad extra	Parda, untuosa perfectamente lisa.	20	6.2 a 6.65
Primera calidad	Idem.	19	3.5 a 4.2
Segunda calidad	Parda, untuosa, aparecen algunos elementos leñosos.	17	4.4 a 4.7
Tercera calidad	La lignificación y desecación se acentúan.	17	3.3 a 3.6
Cuarta calidad.	Idem.	19	2.9 a 2.8
calidad ordinaria común.	Un poco seca, francamente leñosa y entera.	10	1.3 a 1.5

La Vainilla debe corresponder a las siguientes condiciones:

- 1) No contener más de 30 por ciento de humedad y de 6 por ciento de cenizas totales, ni menos de 46 por ciento de extracto alcohólico y de 1.5 por ciento de vainillina natural, debiendo oscilar el monto de la materia grasa entre 6 y 10 por ciento.

- 2) No estar mal conservada, alterada, agotada, ni contener balsemo de Tolú o del Perú, ácido benzoico, vainillina artificial, azúcar ni sustancias extrañas.

Con el nombre de Extracto de Vainilla, se entiende una tintura de vainilla preparada por lo menos al 10 por ciento con alcohol de 35° a 55° G. L. Debe presentar por lo menos 0.1 por ciento de vainillina natural, una acidez no menor de 28 mililitros de alcalí normal por cien gramos; de 0.5 por ciento de cenizas. No deberá contener vainillina artificial, cumarina ni acenilida y dará precipitado con la solución de acetato de plomo (18).

ACCION DE LA BETAGLUCOSIDASA EN EL PROCESO DEL CURADO DE LA -
VAINILLA.

Las vainas maduras de vainilla tienen muy poco efecto o casi nulo aroma antes de ser curadas, la calidades aromáticas de la vainilla - se desarrollan por acción enzimática durante el proceso del curado.

Godley en 1858 de acuerdo con Chalot y Bernard, fué el primero en sugerir que la formación de la vainillina era un proceso de fermentación.

1.- Distribución de la Glucovainillina en las Vainas. La vaina de la vainilla está compuesta esencialmente de una porción central - conteniendo las semillas y rodeadas de una pequeña placenta por una parte carnosa o pared de ovario.

Chalot y Bernard (1920) estableció que Linné creyó que la vainillina se formaba en la parte central de la semilla de las vainas, - mientras que M. F. Merat y A. J de Lens pensaban contrariamente, que esta se formaba en la pulpa que rodea a las semillas.

Para checar éste punto, se midió el contenido de glucovainilli-
na; estas mediciones fueron hechas por Gortner (1938), utilizando una modificación al método biológico de Bourquelot para examinar plantas - por glucósidos. Este método consiste en agregar emulsión a un extracto de la planta y la determinación de la reducción del contenido de azúcar después del período de incubación, un cambio en el contenido indica la presencia de la betagluco-sidos y su magnitud da una somera indicación - de la cantidad. En este plano el contenido de vainillina del ejemplo antes y después de la incubación es tomada como una cantidad de gluco - vainillina presente.

Vainas de vainilla no curadas de 7 a 8 pulgadas de longitud fueron divididas en partes iguales cortadas longitudinalmente y la porción central, incluyendo semillas y parte placentar eran separadas de la parte carnosa. Cada porción era estabilizada y extractada por reflujó con 85 % de alcohol más una pequeña porción de carbonato de calcio para neutralizar la acidez de las vainas y prevenir la hidrólisis del glucósido. Después de hervirla por espacio de una hora, el líquido es removido los residuos son molidos en un mezclador con alcohol fresco y re-extractados por espacio de una hora más. Los extractos son combinados formando un volumen definitivo, y el alcohol que se evapora de las alícuotas se mantiene el volumen mediante la adición de agua. Los extractos a los que se les agrega unas gotas de tolueno para preservarlos son incubados con emulsión a 45° C. por 7 días y el contenido de vainilla se determina de acuerdo con la Asociación Oficial de Químicos de la Agricultura (1940). Las determinaciones son hechas por duplicado en cada muestra. Calculando los contenidos de glucovainillina, dependiendo de los contenidos de vainillina, muestran 1.30 y 2.07 % de glucovainillina en la muestra de la parte exterior con 90 y 85 % de humedad respectivamente y 3.66 y 2.48 % de glucovainillina en la parte central de las muestras con 51.5 y 52.5 % de humedad respectivamente. Tomando en cuenta que el porcentaje de la parte central representa un 19 % del peso de la vaina fresca, esto hace que a parezca entonces que de un 0.2 a un 0.4 del total de la glucovainillina en la vaina era de la parte central.

De forma similar la distribución de la glucovainillina a lo largo de la vaina de vainilla es determinada por el análisis de las muestras a principios del florecimiento a mediados y al final de la vaina. Los resultados fueron, en bases frescas 1.01, 1.76, 0.85 y 1.35, 0.64, -

1.00 % de glucovainillina en las muestras al final, a mediados y a principios del florecimiento, respectivamente. Estos datos muestran un gradiente definitivo de concentración del glucósido aumentando desde el - principio hasta el final del florecimiento o terminal de la vaina. Tomando en cuenta el peso de las fracciones de la vaina atravesada con el porcentaje de muestra que, el total de glucovainillina en la vaina, cerca de un 40 % es del principio del florecimiento, 40 % en la mitad y - 20 % al final de la vaina.

2.- Efecto de Madurez en las Vainas de Vainilla en el Contenido de Glucovainillina y Contenido de Vainilla. La maduración de las vainas de vainilla se indica por una coloración amarilla que se desarrolla al final de la vaina. Como un proceso de madurez, esta coloración se - esparce a través de la vaina entera y normalmente es acompañada de una separación longitudinalmente hasta que las vainas adquieren un color - achocolatado.

Para determinar el efecto de madurez sobre el contenido de glucovainillina y vainillina se hacen estudios para determinar el grado al que la glucovainillina se hidroliza durante el proceso natural de madurez. La vainillina se determina por la cantidad de reductores totales que se hallan presentes.

La vainillina se presenta solamente en pequeñas partes de la - vaina verde y en las vainas con el final de la vaina amarilla, mostrando que se ha efectuado una leve hidrólisis de la glucovainillina antes de la etapa de madurez en la punta de la vaina amarilla. El contenido de vainillina de las vainas achocolatadas es muy elevado mostrando que la betaglicosidasa estaba hidrolizando las vainas como un resultado de-

un proceso de madurez natural. El total del contenido de glucovainillina de un extracto de glucósido es de 8.8 % en bases secas y aparentemente más formadas durante la maduración de la vaina amarilla al chocolate.

3.- Betaglicosidasa en Vainas de Vainilla.

Para demostrar la presencia y acción de la betaglicosidasa en vainas de vainilla, una enzima cruda fué preparada combinando pequeñas partículas de vainas amarillas en un mezclador eléctrico por espacio de 5 minutos, se filtraron e incubaron alícuotas de los extractos de glucovainillina a 45° C. y a un pH óptimo de la betaglicosidasa de 4.2 a 4.4. Después de seis días de hechas las soluciones se definió el volumen filtrando y midiendo el valor del fenol. Los controles se efectuaron incubando alícuotas de la emulsión del glucósido sin enzima, con extracto de enzima previamente hervida por 20 minutos y con enzima cruda.

Los valores del fenol en por ciento, bases secas, son de 1.5 para la glucovainillina incubada sola, 1.4 para la incubada con enzimas de vainilla previamente hervidas y 8.7 para la incubada con enzimas activas. El hecho de que el valor del fenol de la glucovainillina incubada sola sea aproximadamente la misma que el de la glucovainillina incubada con enzimas hervidas muestran que la solución de enzimas hervidas no actúa sobre la solución del glucósido. La hidrólisis fué consecuentemente, debido a la presencia de caracteres enzimáticos de la betaglicosidasa en semillas amarillas maduras.

4.- Separación de enzimas crudas.

La betaglicosidasa se separa de semillas de vainilla no curadas y maduras, por la modificación al proceso utilizado para la extracción de emulsión de las almendras dulces por Waksman y Davison (1926). Cua

trocientos gramos de vainas fueron cortados en pequeñas partes y por espacio de 5 minutos se colocaron en un mezclador eléctrico con 800 ml. de agua. Después de una hora de reposo, el líquido fué filtrado a través de una fibra de vidrio y las impurezas de la proteína se precipitaron añadiendo 60 gotas de ácido acético. Como la mezcla resultó de carácter coloidal se usó un filtro a presión Chamberland-Pasteur. La enzima cruda fué precipitada añadiendo al filtrado cuatro volúmenes de alcohol de 95° G. L. El polvo obtenido fué disuelto en 160 ml. de agua y la actividad de la enzima fué probada incubando una alícuota de 20 ml. con un pH de 4.3 y a 45° C. con alícuotas de extracto de glucovainillina y midiendo el valor del fenol después de 5 días. Los controles se efectuaron por medio de la incubación del glucósido.

Tratamiento.	Fenol valuado en base seca.
1.- Glucósido con enzima cruda.	2.15
2.- Glucósido con enzima hervida.	1.55
3.- Glucósido solo.	1.20

La glucovainillina fué hidrolizada por la betaglicosidasa separada de las semillas de vaina no curada.

5.- Distribución de enzimas.

La distribución de la betaglicosidasa en la semilla fué medida incubando extractos de glucovainillina con extractos de enzima de la parte carnosa de afuera y la porción central, incluyendo semillas y tela placentar.

Las correcciones en los valores de porcentaje del fenol en bases secas fueron 7.65 para la porción de afuera, 1.24 para la porción central y 1.29 para la glucovainillina incubada sola. En este caso la conclusión es de que no hay actividad de betaglicosidasa en la parte central

de la semilla y en la tela placentar de las vainas y todas las enzimas se encontraron en la parte carnosa o pared delgada de las semillas.

Desde el punto de vista de la demostración de la existencia de glucovainillina en la parte central de la vaina donde no hay enzima, debe concluirse que durante la cura esta glucovainillina es difundida hacia afuera donde la enzima se localiza.

6.- Efecto de madurez en la actividad de enzimas.

Durante el curso de las investigaciones se encontraron varias etapas de madurez a lo largo de la actividad de la betaglucosidasa. El efecto de madurez a lo largo de la actividad de la betaglucosidasa fue seguida incubando extractos de enzima:

- a).- En toda la vaina verde.
- b).- En vainas con terminaciones de florecimiento amarillo.
- c).- En vainas abiertas con terminaciones de florecimiento amarillo con glucovainillina.

Los porcentajes de fenol corregido, base seca son:

- a).- 0.12 para todas las vainas verdes.
- b).- 4.30 para las vainas con terminación de florecimiento amarillo.
- c).- 6.95 para las vainas abiertas con terminación de florecimiento amarillo.

Estas cifras demuestran que:

- a).- Una pequeña cantidad de betaglucosidasa activa se presentó en las vainas verdes.

b).- Un mayor porcentaje se presentó en las vainas con terminación de florecimiento amarillo.

c).- La mayor actividad se encontró en las vainas abiertas con terminación de florecimiento amarillo.

7.- Cambio de actividad en vainas verdes durante la cura.

Un experimento para medir la actividad de la enzima durante la cura de vainas completamente verdes fué ideado. Un lote de vainas se sometió a un proceso para dar fin a la vida vegetativa por inmersión de las vainas tres veces y durante 10 segundos en agua a 80° C., mientras que un segundo lote fué sometido a congelación durante 4 horas seguidas de una exudación a temperatura ambiente.

Ambos lotes de vainas fueron exudados en un horno eléctrico a 45° C. durante 4 días.

Extractos de las enzimas crudas de las muestras por determinación del fenol.

Proceso	Valor del fenol base seca.			
	Vainas frescas.	1 hora	Después de 24 h. del pro- ceso.	Después de 96 h. de exu- dación.
Agua caliente:	0.30	0.65	0.30	0.55
Congelación:	0.30	0.95	0.50	0.85

La actividad de la betaglucosidasa fué muy lenta a través de el proceso de cura. También en estas vainas verde las enzimas no se acti-

varon por exposición a tepteratura de 45° C. comunmente los resultados- de la cura de las vainas verdes es de calidad inferior y el experimento antes mencionado indica que los pobres resultados son debido a la baja- actividad del nivel del sistema de enzimas.

Por otro lado, el hecho de que dichas vainillas sean de calidad pasable confirma las observaciones previas de Balls y Arana (1941) y- que la calidad de las vainas de vainilla no es debido completamente a - la presencia de vainillina, (7).

PARTE EXPERIMENTAL.

1.- Protocolo.

La vainilla contiene varias sustancias sapígenas, como anteriormente se vió, las cuales se forman por acción enzimica durante el curado. Una de estas sustancias sapígenas es la vainillina que se halla en proporción de 1.5 a 4 mg. por cada cien gramos de vainilla curada, junto con un 10 % de otros aceites. Aunque la vainillina es el agente sávido más potente, las demás sustancias la modifican con un rico sabor balsámico.

La vainillina se presenta en forma de cristales finos cuyo color varía desde el blanco hasta el ligeramente amarillento, de sabor picante, de olor aromático agradable; la vainillina se encuentra en la piel de las papas, en la remolacha azucarera. También es un derivado de la lignina que se obtiene en cantidades apreciables en el licor sulfítico deshechado en la fabricación de la pulpa de celulosa.

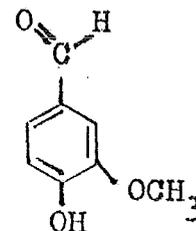
El nombre químico de la vainillina es: 3-metoxi, 4-hidroxi benzaldehído o aldehído vanílico. Su fórmula condensada es:

$C_8H_8O_3$ con un peso molecular de 152.064

Punto de fusión: de 80 a 85° C.

Punto de ebullición: 285° C.

Peso específico: 1.056.

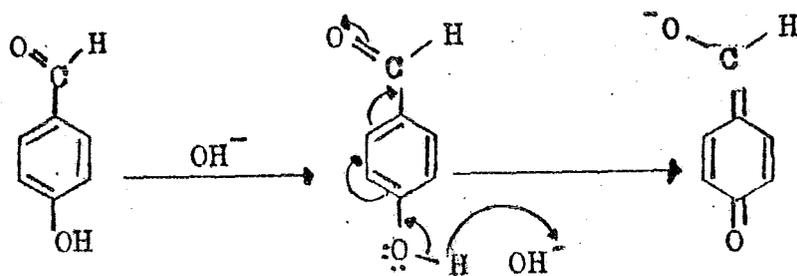


Su fórmula desarrollada es:

Es soluble en agua, en glicerol en glicolapropileno, alcohol etílico, cloroformo, eter, sulfuro de carbono; siendo el alcohol etílico donde mejor se disuelve, (4).

Espectrofotométricamente la vainillina se le puede considerar un derivado del para-hidróxibenzaldehído.

El para-hidroxibenzaldehído es un benceno disustituído con un grupo orientador en para, el OH, o grupo A y un orientador meta, el aldehído CHO, o grupo B los cuales presentan un aumento en el momento dipolar mayor que si fueran considerados los grupos A y B por separado; este efecto del aumento dipolar de la suma de los grupos A y B ha sido echacado a la interacción de resonancia y tal efecto también se manifiesta en la absorción del espectro ultravioleta de los bencenos para-sustituídos. En el estado excitado la estructura para-sustituída con un orientador meta recibe una sustancial contribución cuando son o adquieren una estructura del tipo quinoide tal como la del para-hidroxibenzaldehído cuyo mecanismo de reacción en medio alcalino es:



Específicamente en el para-hidroxibenzaldehído si A y B son los grupos interaccionantes tenemos que con la base de 203 nm. de la banda primaria A y B aumentan de:

A	B	Cambio de A en nm.	Cambio de B en nm.	Suma A + B.	Obs.
OH	CHO	7	46	53	80

Generalmente los para-hidroxibenzaldehidos en medio alcohólico se vuelven alcalinos y por lo regular en medio alcalino desplazan su banda primaria de 280 a 328-378 nm. (efecto batocrómico) además de que incrementan la intensidad de su banda (efecto hiperocrómico) en dicho medio alcalino. (8), (9).

En el caso del para-hidroxibenzaldehido en medio neutro la banda primaria en la región ultravioleta absorbe a 283 nm. y en medio alcalino absorbe a 328 nm. (teóricamente debe absorber a 336 nm).

En el caso de la vainillina o 3-metoxi 4 hidroxibenzaldehido presenta dos bandas, una primaria a 278 nm. y otra a 308 nm. en medio neutro, para el caso que nos ocupa solo consideraremos la banda que se presenta a 308 nm, la cual se desplaza en medio alcalino a 348 nm.

Ver gráficas I y II.

CURVAS DE ABSORCIÓN MÁXIMA DE PARA-HIDROXIBENZALDEHIDO.
GRABAJA I

I. - Curva I de para-hidroxibenzaldehido

Concentración $c = 1,61 \times 10^{-8}$ mol/l

$l = 1$

$A = 0,25$

$\epsilon = 1,5244 \times 10^7$

Medio: neutro.

II. - Curva II de para-hidroxibenzaldehido.

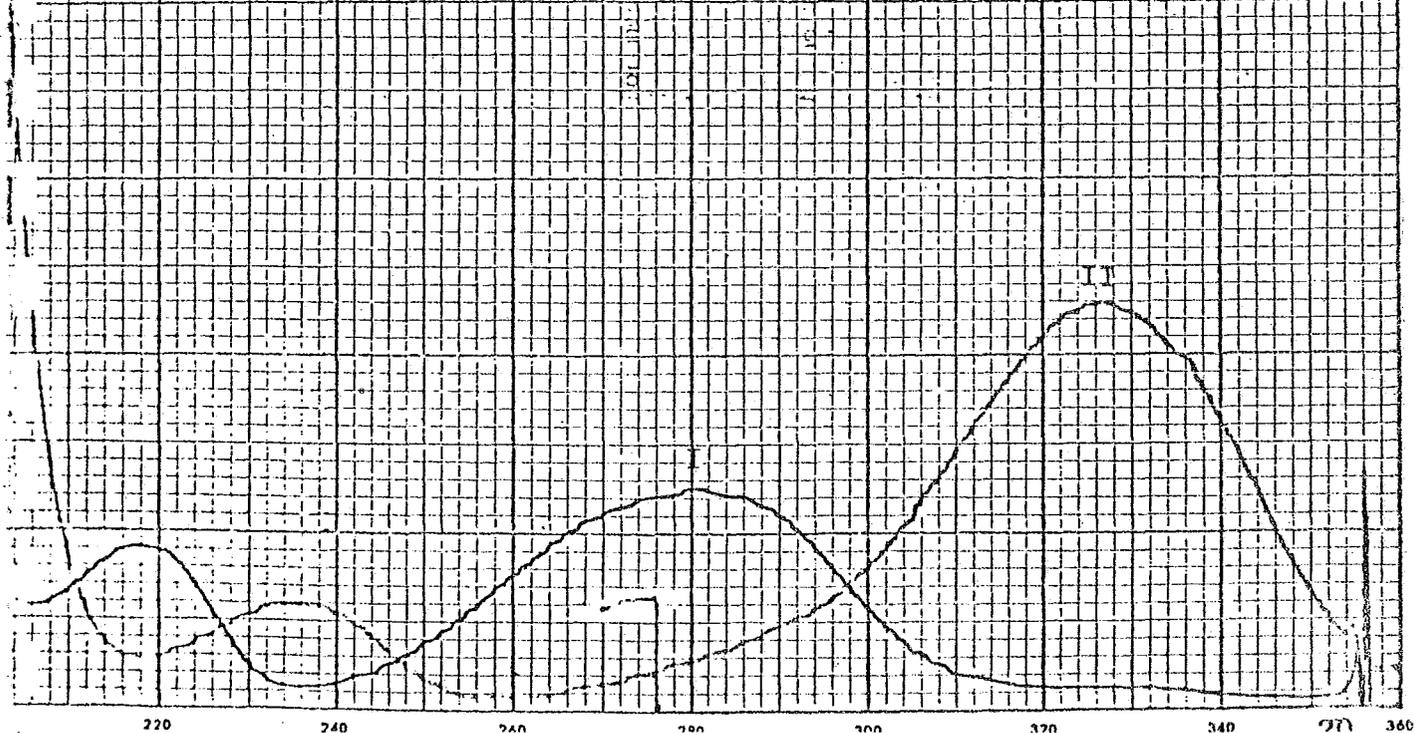
Concentración $c = 1,64 \times 10^{-8}$ mol/l

$l = 1$

$A = 0,46$

$\epsilon = 2,8048 \times 10^7$

Medio: alcalino.



220

240

260

280

300

320

340

360

CURVAS DE ABSORCIÓN MÁXIMA DE VANILINA
 GRÁFICA II.

I. - Curva I de Vanilina
 Concentración $c = 3.94 \times 10^{-8}$ mol/l
 $l = 1$
 $A = 0.28$

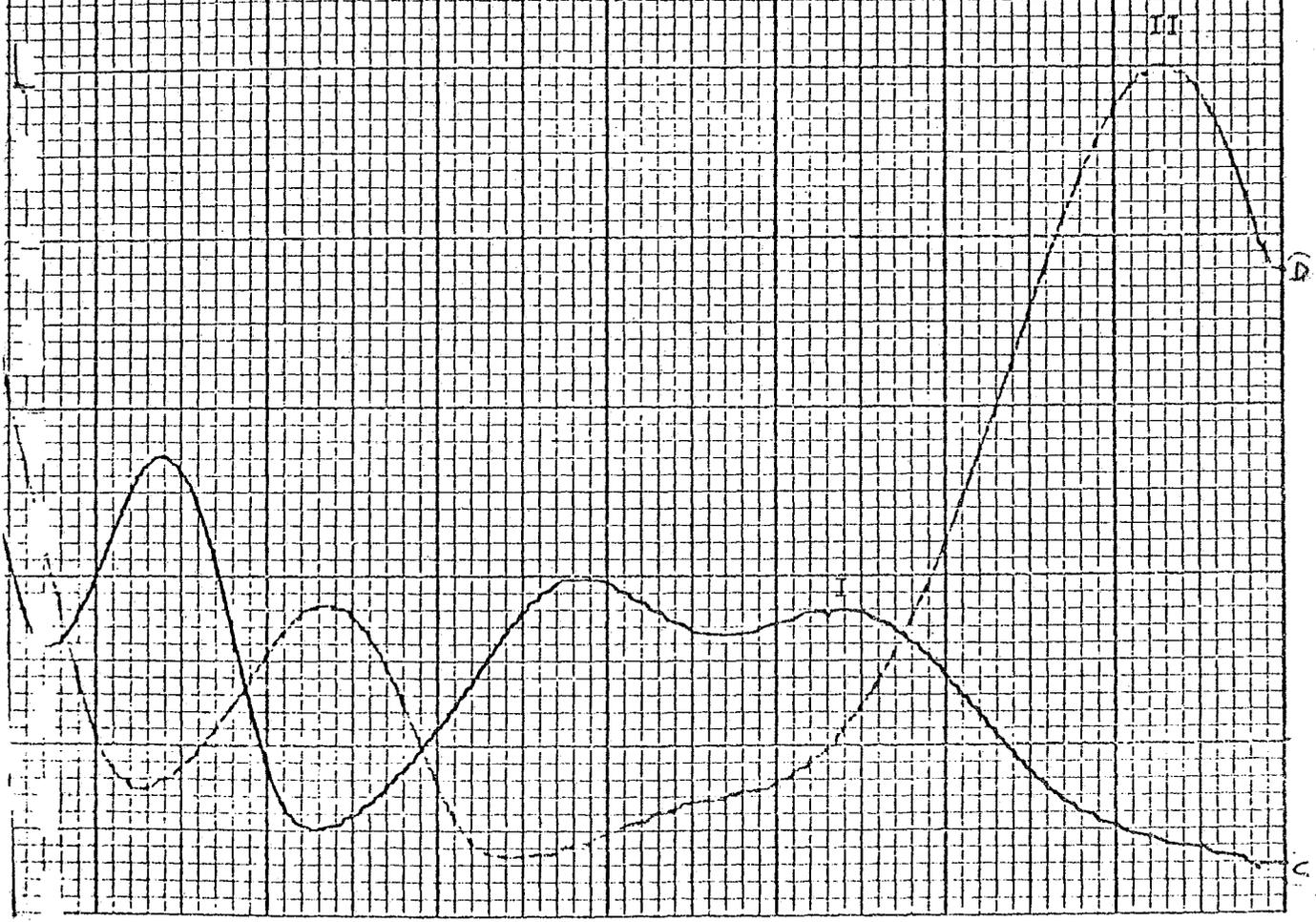
$\xi = 7.094 \times 10^6$

Medio: Neutro.

III. - Curva III de Vanilina.
 Concentración $c = 3.94 \times 10^{-8}$ mol/l
 $l = 1$
 $A = 1$

$\xi = 2.533 \times 10^7$

Medio: Alcalino.



c).- Usos de la vainillina.

La vainillina en su mayor proporción es empleada como agente de sabor y el resto se emplea principalmente para desodorantes, perfumes y usos industriales en preparaciones farmacéuticas.

En los perfumes encuentra considerable empleo como modificador y fijador; comunica suavidad a cualquier tipo de olor en tanto que su propio aroma queda cubierto. Entre otros usos industriales se halla la prevención de espuma en los aceites lubricantes, la preparación de sintanos para el curtido, como abrillantador en los baños galvanoplásticos de zinc; como auxiliar para la oxidación del aceite de linaza, como agente solubilizante de la riboflavina y en la preparación de otros derivados, es también usado como reactivo en química analítica.

Deichman y Kitmiller han encontrado que la vainillina es toxica en conejos y una dosis mortal en ellos es de 3 g. por kilo de peso, administrados oralmente, (4).

2.- EXTRACCION.

a).- Influencia del tamaño de partícula en la extracción.

El éxito de la extracción y la técnica empleada, dependerá frecuentemente de cualquier tratamiento previo que se le pueda dar al sólido. La trituración o molienda de tales sólidos acelerará grandemente la acción de extracción y de ahí que las porciones estarán más accesibles a cualquier disolvente. Esto se hace más necesario en casos de materias animales o vegetales donde el soluto se encuentra oculto en la estructura celular, en este caso la extracción ocurrirá por ósmosis, ya que el soluto tendrá que atravesar las paredes de la célula como consecuencia de estar en contacto con el disolvente. El disolvente permanecerá prácticamente estacionario dentro de los poros del sólido, por lo que la emigración del soluto hacia las zonas exteriores menos concentradas de la disolución ha de producirse por difusión.

b).- Tamaño del corte de la vainilla. El proceso de extracción no es susceptible de cálculo porque no se conoce el camino que ha de recorrer el soluto en la extracción, este dependerá del tamaño y forma de los poros, lo que a su vez está ligado con el tamaño de las partículas y la naturaleza de los sólidos inertes.

En general el proceso será favorecido cuando el sólido se encuentra en forma de partículas pequeñas y de tamaño uniforme. Cuando el soluto se encuentra en proporción importante su disolución puede afectar el tamaño y forma de los poros haciéndoles mayores; pero puede suceder que la desaparición del soluto rompa las estructuras de la fase sólida y produzca una aglomeración de partículas finas que hacen más difícil la penetración del disolvente. Cuando la sustancia solu-

ble se encuentra más o menos uniformemente distribuida a través del sólido o hasta en la solución dentro del sólido la acción de extracción puede proporcionar canales para el paso del disolvente fresco y entonces una molienda fina puede no ser necesaria.

Específicamente para el caso de la vainilla, en un corte regular todas estas partículas serán bañadas por el disolvente y para nuestros fines, solo debe tomarse en cuenta al elegir el tamaño del corte, el cual debe ser de un tamaño tal que no permita a las esferas salir de la corteza de la vaina para evitar que se apelmacen los sólidos y dificulte el paso del disolvente impidiendo que éste penetre por toda la masa demasiado compacta. De la misma manera, el tamaño del corte debe ser lo suficientemente grande para que permita la circulación del disolvente por todo el sólido. En el caso de la vainilla un corte de 1 a 2 cm. de largo es suficiente.

c).- Influencia del agua.

Se tiene como experiencia en las operaciones de extracción en general que aún cuando se presente el caso de que el agua no sea el mejor disolvente para la operación, se usa ésta en una mezcla con el disolvente más adecuado para efectuar la extracción mejorando considerablemente el rendimiento de esta operación. Este fenómeno se presenta en el caso de que nos ocupamos, pues se observa que al usar como disolvente una mezcla de alcohol etílico-agua al 50 % en peso, la concentración de vainillina en la solución final es mayor. Es probable que el agua actúe venciendo las fuerzas intermoleculares del soluto facilitando así la acción del alcohol etílico para captar las moléculas del soluto, (4).

3.- FORMULACION DE LA TINTURA DE VAINILLA.

Vainilla triturada:	100 gramos.
Azúcar:	200 gramos.
Alcohol etílico:	200 ml.
Agua:	200 ml.
Alcohol-Agua al 50 %	-- -- -- --
Aforar a:	1000 ml.

Procedimiento:

A 100 gramos de vainilla triturada se le adicionan 200 ml. de alcohol etílico de 95° G. L., 200 gramos de azúcar y 200 ml. de agua, se colocan en un matraz bola de 1000 ml. y se pone a baño maría en una parrilla de temperatura controlada a 60° - 70° C., se pone a macerar durante 12 horas por 3 días. La mezcla se filtra en un kitazato con un embudo Buchner, la vainilla triturada se lava con una mezcla de alcohol etílico-agua al 50% y el filtrado se afora a 1000 ml. con la mezcla alcohol etílico-agua al 50 %. (19)

4.- Añejamiento de la tintura de vainilla. El añejamiento tiene por objeto formar sustancias aromáticas; un contenido de alcohol del 42 a 45% acelera cambios químicos dando lugar a la formación de ésteres a partir de ácidos. Durante este período de añejamiento el contenido de acetato de etilo permanece constante en el extracto de vainilla; sin embargo el cambio natural de ésteres es considerable. Los ésteres de alcoholes superiores del extracto de vainilla descargan alcoholes superiores en la hidrólisis y los ácidos formados se unen con los alcoholes bajos formando ésteres volátiles; los alcoholes superiores se oxidan lentamente formando aldehidos y cetonas. Esta reacción se lleva a cabo durante el añejamiento y es frecuentemente llamada alcoholisis de los ésteres. (10).

5.- Procedimiento de análisis.

a).- Pipetee 2 ml. de extracto de vainilla en un matraz aforado de 100 ml. y afórese con agua destilada.

b).- En dos matraces aforados de 100 ml, pipetee 10 ml de la solución anterior.

c).- A uno de los dos matraces aforados agregue 2 ml. de NaOH 0.1N y afórese con agua destilada. Afórese el segundo matraz volumétrico (solución testigo) con agua destilada sin ninguna otra adición.

d).- Utilícese un espectrofotómetro capaz de leerse en el rango del ultravioleta, lease la absorbancia de la solución alcalina usando la solución neutra como testigo a 336 y 348 nm.

e).- De estas absorbancias y de la ecuación previamente derivada, determínese la concentración de vainillina en la solución final. Multiplíquese este valor por los factores de dilución para obtener la concentración de vainillina en mg. por 100 ml. de solución.

Ejemplo:

Dos puntos en la curva para vainillina a 348 nm. fueron:

Absorbancia	Concentración en mg/ml.
0.600	3.85
0.200	1.29

La pendiente $b_{v\ 348}$ de esta curva es:

$$\frac{0.600 - 0.200}{3.85 - 1.29} = 0.1563$$

Cuando:

A es la absorbancia a la longitud de onda indicada.

C_v es la concentración de vainillina en la solución final.

C_{phb} es la concentración de p-hidroxibenzaldehído en la solución final.

b_v es la pendiente de la vainillina a la longitud de onda indicada.

b_{phb} es la pendiente de p-hidroxibenzaldehído a la longitud de onda indicada.

Así mediante el procedimiento indicado se obtuvieron las siguientes pendientes:

$$b_{v348} = 0.1563$$

$$b_{v336} = 0.1214$$

$$b_{phb348} = 0.1012$$

$$b_{phb336} = 0.1887$$

De los resultados anteriores la concentración de vainillina se obtiene mediante las ecuaciones:

$$1.- A_{348} = (C_v) (b_{v348}) + (C_{phb}) (b_{phb348})$$

$$2.- A_{336} = (C_v) (b_{v336}) + (C_{phb}) (b_{phb336})$$

Sustituyendo los valores de las pendientes en las ecuaciones 1 y 2 tenemos:

$$1.- A_{348} = (C_V) (0.1563) + (C_{phb}) (0.1012)$$

$$2.- A_{336} = (C_V) (0.1214) + (C_{phb}) (0.1887)$$

Multiplicando la ecuación 1 por 0.1887, la ecuación 2 por 0.1012 y restando la ecuación 2 de la ecuación 1 nos dá:

$$C_V = 10.96 A_{348} - 5.88 A_{336}$$

Así 2 ml. de extracto de vainilla fueron tratados como se indicó. La absorbancia a 336 nm. fué de 0.436 y la absorbancia a 348 nm. fué de 0.537.

Con lo que la concentración de vainillina en la solución finales:

$$C_V = (10.96) (0.537) - (5.88) (0.436)$$

$$C_V = 5.886 - 2.564$$

$$C_V = 3.32 \text{ g/ml.}$$

Multiplicando por los factores de dilución tenemos:

$$C_V = \frac{3.32 \times 10^{-6} \times 10^2 \times 10^2 \times 10^2}{10 \times 2} = \frac{3.32}{20} = 0.166 \mu\text{g}/100 \text{ ml.}$$

6.- DETERMINACION DE VAINILLINA EN EL EXTRACTO DE VAINILLA POR EL METODO ALCALINO.

A).- Reactivos y soluciones;

Todos los reactivos químicos deberán ser reactivos analíticos o su equivalente.

Vainillina.

p-hidroxibenzaldehido.

Hidróxido de sodio O.IN.

Alcohol etílico de 95° G. L.

B).- Equipo y material;

Espectrofotómetro Beckman D.U. o su equivalente.

Matraces volumétricos de 100 y 250 ml.

Pipetas de 2 y 10 ml.

Bureta de 50 ml. graduada en 0.1 ml.

C).- Preparación de la curva estandar de vainillina:

1.- Pésense 100 mg. con aproximación de 0.1 mg, disuélvase en 5 ml. de alcohol etílico de 95° G.L., vacíese en un matraz volumétrico de 100 ml. y afórese con agua destilada.

2.- Colóquese una porción de esta solución en una bureta y mídase 15, 10, 5, 2.5 y 1.25 ml. respectivamente en matraces aforados de 250 ml, afórese con agua destilada. Denomínese a estas soluciones como soluciones tipo.

3.- Pipete 10 ml. de cada solución tipo en matraces volumétricos de 100 ml, agregue 2 ml. de NaOH O.IN y afórese con agua destilada.

4.- Pipetee 10 ml. de cada una de las soluciones tipo en matraces volumétricos de 100 ml. y añórese con agua destilada. Estas soluciones son para ser utilizadas como testigos.

5.- Usando un espectrofotómetro capaz de leerse en el rango - de ultravioleta, determínese la absorbancia de cada solución alcalina- usando la solución neutra como testigo a 336 y 348 nm.

6.- Grafíquese la absorbancia contra la concentración de vainillina y la solución final para cada una de las dos longitudes de onda.

7.- Cálculos para la curva estandar de vainillina en las dos longitudes de onda.

100 mg. de vainillina se disuelven en 5 ml. de alcohol etílico de 95° G. L., se ponen en un matraz aforado de 100 ml. y se afora con agua destilada, se tiene una concentración de 1 mg. por ml.

- a).- 15 ml aforados a 250 ml. da una concentración de 0.06 mg/ ml.
- b).- 10 ml aforados a 250 ml. da una concentración de 0.04 mg/ ml.
- c).- 5 ml " " " " " " " " 0.02 mg/ ml.
- d).- 2.5 ml " " " " " " " " 0.01 mg/ ml.
- e).- 1.25 ml " " " " " " " " 0.005 mg/ml.

Se toman 10 ml. de cada una de las soluciones anteriores:

- a).- 10 ml de la solución a da 0.6 mg que aforados a 100 da 6 μ g.
- b).- 10 ml de la solución b da 0.4 mg que aforados a 100 da 4 μ g.
- c).- 10 ml de la solución c da 0.2 mg que aforados a 100 da 2 μ g.
- d).- 10 ml de la solución d da 0.1 mg que aforados a 100 da 1 μ g.
- e).- 10 ml de la solución e da 0.05 mg que aforados a 100 da 0.5 μ g.

A esta solución se le denomina solución neutra y sirve como testigo.

Preparación de la solución alcalina de vainillina.

Se pipetea 10 ml. de cada solución tipo en matraces volumétricos de 100 ml. se agregan 2 ml. de NaOH y se afora con agua destilada.- Se toman 10 ml. de cada una de las soluciones anteriores:

- a).- 10 ml de la solución a da 0.6 mg que aforados a 100 da 6 μ g .
- b).- 10 ml de la solución b da 0.4 mg que aforados a 100 da 4 μ g .
- c).- 10 ml de la solución c da 0.2 mg que aforados a 100 da 2 μ g .
- d).- 10 ml de la solución d da 0.1 mg que aforados a 100 da 1 μ g .
- e).- 10 ml de la solución e da 0.05 mg que aforado a 100 da 0.5 μ g.

Datos para la curva estandar de vainillina a dos longitudes de onda.

Concentración en g. absorbanca a 348. absorbanca a 336

a).- 6 μ g	0.98	0.738
b).- 4 μ g	0.650	0.498
c).- 2 μ g	0.325	0.249
d).- 1 μ g	0.165	0.125
e).- 0.5 μ g	0.085	0.062

PREPARACION DE LA CURVA ESTADAR DE p-HIDROXIBENZALDEHIDO.

1.- Pesar 25 mg de p-hidroxibenzaldehido lo más cercano a 0.1 -- mg, disuélvase en 5 ml de alcohol élitico de 95° G.L., pásese a un ma -- traz de 100 ml y afórese con agua destilada.

2.- Pásese una porción de esta solución a una bureta y mídase -- las siguientes cantidades, 20, 10, 5, 2 y 1 ml respectivamente en matra -- ces de 250 ml y aforese con agua destilada. Denomínese a estas solucio -- nes como soluciones de tipo. Repítase los pasos 3, 4, 5 y 6 tal como -- lo hizo en la preparación de la curva estadar de vainillina.

8.- Cálculos de la curva estadar de p-hidroxibenzaldehido:

25 mg de p-hidroxibenzaldehido disueltos en 5 ml de etanol de -- 95° G. L. y aforados a 100 ml da una concentración de 0.25 mg por mili -- metro.

Soluciones tipo:

- a).- 20 x 0.25 mg aforados a 250 da una concentración de 0.02mg/ml
- b).- 10 x 0.25 mg aforados a 250 da una concentración de 0.01mg/ml
- c).- 5 x 0.25 mg aforados a 250 da una concentración de 0.005mg/ml
- d).- 2 x 0.25 mg aforados a 250 da una concentración de 0.002mg/ml
- e).- 1 x 0.25 mg aforados a 250 da una concentración de 0.001mg/ml

Se toman 10 ml de cada una de las soluciones tipo:

- a).- 10 x 0.02 mg aforados a 100 da una concentración de 2 μ g.
- b).- 10 x 0.01 mg aforados a 100 da una concentración de 1 μ g.
- c).- 10 x 0.005 mg aforados a 100 da una concentración de 0.5 μ g.
- d).- 10 x 0.002 mg aforados a 100 da una concentración de 0.2 μ g.
- e).- 10 x 0.001 mg aforados a 100 da una concentración de 0.1 μ g.

A estas soluciones se le denomina solución neutra y sirve como testigo.

Preparación de la solución alcalina del p-hidroxibenzaldehido -

Se pipetea 10 ml de las soluciones tipo en matraces volumétricos de 100 ml, se agregan 2 ml de NaOH 0.1 N y se aforan con agua destilada

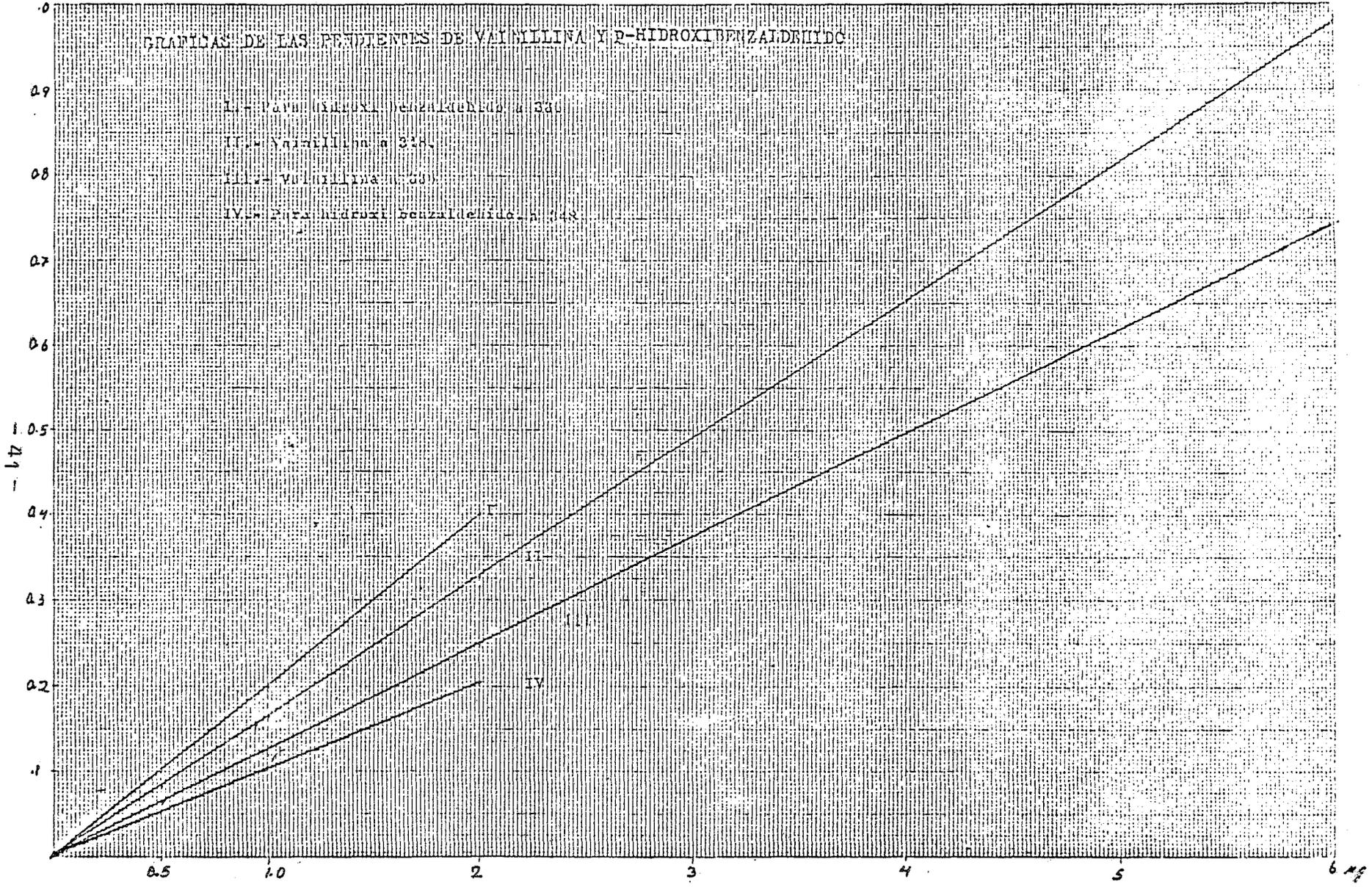
- a).- 10 x 0.02 mg = 0.2 mg aforados a 100 dan 2 μ g.
- b).- 10 x 0.01 mg = 0.1 mg aforados a 100 dan 1 μ g.
- c).- 10 x 0.005 mg = 0.05 mg aforados a 100 dan 0.5 μ g.
- d).- 10 x 0.002 mg = 0.02 mg aforados a 100 dan 0.2 μ g.
- e).- 10 x 0.001 mg = 0.01 mg aforados a 100 dan 0.1 μ g.

Datos para la curva estadar de p-hidroxibenzaldehido a dos longitudes de onda.

Concentración en μ g.	Absorbancia a 348 nm.	Absorbancia a 336 nm.
a).- 2	0.22	0.42
b).- 1	0.205	0.11
c).- 0.5	0.051	0.10
d).- 0.2	0.045	0.062
e).- 0.1	0.030	0.050

GRÁFICAS DE LAS PENDIENTES DE VANILLINA Y P-HIDROXIBENZALDEHÍDO

- I.- Para p-hidroxibenzaldehído a 330
- II.- Vanilina a 318
- III.- Vanilina a 290
- IV.- Para p-hidroxibenzaldehído a 248



10.- DETERMINACION DE LA ECUACION DE CONCENTRACION DE VAINILLINA EN TERMINOS DE ABSORBANCIA.

Siendo:

b_{v348} la pendiente de la vainillina a 348 nm.

b_{v336} la pendiente de la vainillina a 336 nm.

b_{phb348} la pendiente del p-hidroxibenzaldehido a 348 nm.

b_{phb336} la pendiente del p-hidroxibenzaldehido a 336 nm.

C_v la concentración de vainillina.

C_{phb} la concentración del para-hidroxibenzaldehido.

Deducimos una ecuación para obtener la concentración de vainillina en términos de absorbancia.

$$1.- A_{348} = C_v (b_{v348}) + C_{phb}(b_{phb348})$$

$$2.- A_{336} = C_v (b_{v336}) + C_{phb}(b_{phb336})$$

$$1.- A_{348} - C_v (b_{v348}) = C_{phb}(b_{phb348})$$

$$2.- A_{336} - C_v (b_{v336}) = C_{phb}(b_{phb336})$$

Despejando C_{phb} en ambas ecuaciones tenemos:

$$1.- C_{phb} = \frac{A_{348} - C_v(b_{v348})}{b_{phb348}}$$

$$2.- C_{phb} = \frac{A_{336} - C_v(b_{v336})}{b_{phb336}}$$

Como C_{phb} es la misma en ambas ecuaciones tenemos:

$$\frac{A_{348} - C_v(b_{v348})}{b_{phb348}} = \frac{A_{336} - C_v(b_{v336})}{b_{phb336}}$$

$$A_{348}b_{phb336} - C_v(b_{v348})(b_{phb336}) = A_{336}b_{phb348} - C_v(b_{v336})(b_{phb348})$$

$$A_{348}b_{phb336} - A_{336}b_{phb348} = C_v \left[(b_{v348})(b_{phb336}) - (b_{v336})(b_{phb348}) \right]$$

Despejando C_v de la ecuación anterior tenemos:

$$C_v = \frac{b_{phb336}A_{348} - b_{phb348}A_{336}}{(b_{v348})(b_{phb336}) - (b_{v336})(b_{phb348})}$$

Sustituyendo los valores de las pendientes:

$$b_{v348} = 0.16326$$

$$b_{v336} = 0.12500$$

$$b_{phb348} = 0.10416$$

$$b_{phb336} = 0.20408$$

$$C_v = \frac{(0.20408)A_{348} - (0.10416)A_{336}}{(0.16326)(0.20408) - (0.125)(0.10416)}$$

$$C_v = \frac{(0.20408)A_{348} - (0.10416)A_{336}}{(0.0333181) - (0.01302)}$$

$$C_v = \frac{(0.20408)A_{348} - (0.10416)A_{336}}{0.0202981}$$

$$C_v = \frac{(0.20408)A_{348}}{(0.0202981)} - \frac{(0.10416)A_{336}}{(0.0202981)}$$

Así tenemos la concentración final de vainillina en términos de absorbancia:

$$C_v = 10.054A_{348} - 5.130A_{336}$$

Los factores de dilución son los siguientes:

$$C_v = \frac{10^{-6} \times 10^2 \times 10^2 \times 10^2}{10 \times 2} = \frac{x}{20}$$

C_v está dado en mg/100 ml.

11.-CALCULO DE LA PENDIENTE DEL p-HIDROXIBENZALDEHIDO Y VAINILLINA

El proposito de obtener las pendientes de vainillina y p-hidroxi-benzaldehido es de lograr obtener una ecuación que nos de la concentración de vainillina en términos de absorbancia.

Cada una de las 4 curvas deberan ser una línea recta que pase a través del origen. Esta pendiente es encontrada por la elección de dos puntos de la absorbancia, dividiendo la diferencia de estos dos puntos entre la diferencia de concentración para estos mismos puntos en la curva.

VAI NILLINA

LONGITUD DE ONDA	LECTURA DE ABSORBANCIA	CONCENTRACION EN $\mu\text{g.}$
348	0.600	3.68
348	0.200	1.23
336	0.600	4.86
336	0.200	1.66

p-HIDROXIBENZALDEHIDO.

LONGITUD DE ONDA	LECTURA DE ABSORBANCIA	CONCENTRACION EN $\mu\text{g.}$
348	0.200	1.92
348	0.100	0.96
336	0.300	1.48
336	0.100	0.50

$$b_{v348} = \frac{0.600 - 0.200}{3.68 - 1.23} = \frac{0.400}{2.45} = 0.163265$$

$$b_{v336} = \frac{0.600 - 0.200}{4.86 - 1.66} = \frac{0.400}{3.2} = 0.12500$$

$$b_{phb348} = \frac{0.200 - 0.100}{1.92 - 0.96} = \frac{0.100}{0.96} = 0.10416$$

$$b_{phb336} = \frac{0.300 - 0.100}{1.48 - 0.50} = \frac{0.200}{0.98} = 0.20408$$

12.- CALCULO DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE VAINILLINA EN ALGUNAS MUESTRAS DE VAINILLA TIPO PLANIFOLIA.

1.- Vainilla Planifolia de Madagascar.

$$C_v = 10.054A_{348} - 5.13A_{336}$$

$$C_v = 10.054 \times 1.00 - 5.13 \times 0.771 = 10.054 - 3.955 = 6.099$$

Multiplicando C_v por los factores de dilución:

$$C_v = \frac{6.099 \text{ mg}}{20 \text{ ml}} = 0.3049 \text{ mg/100 ml} = 3.049 \text{ mg/ 1000 ml de --}$$

vainillina = 3.049 mg de vainillina en 100 gramos de vainilla.

2.- Vainilla Planifolia de México.

$$C_v = 10.054A_{348} - 5.13A_{336}$$

$$10.054 \times 1.18 - 5.13 \times 0.878 = 11.86 - 4.50 = 7.36$$

Multiplicando C_v por los factores de dilución:

$$C_v = \frac{7.36 \text{ mg}}{20 \text{ ml}} = 0.368 \text{ mg/100 ml de extracto} = 3.68 \text{ mg --}$$

por 1000 ml de extracto = 3.68 mg de vainillina en 100 gramos de vainilla.

3.- Vainilla Planifolia Tahitiensis.

$$C_v = 10.054A_{348} - 5.13A_{336}$$

$$C_v = 10.054 \times 0.530 - 5.13 \times 0.425 = 5.328 - 2.18 = 3.148$$

Multiplicando por los factores de dilución:

$$C_v = \frac{3.148 \text{ mg}}{20 \text{ ml}} = 0.1579 \text{ mg/ 100 ml de extracto de vainilla}$$

$C_v = 1.579 \text{ mg/ 1000 ml de extracto} = 1.579 \text{ mg de vainillina en 100 gramos de vainilla.}$

Las lecturas de absorbancia en los extractos de las muestras a diferentes longitudes de onda fueron:

1.- Madagascar: $A_{348} = 1.000$; $A_{336} = 0.771$

2.- México: $A_{348} = 1.18$; $A_{336} = 0.878$

3.- Tahití: $A_{348} = 0.530$; $A_{336} = 0.425$

CONCLUSIONES

Betaglucosidasa.— La acción de esta enzima se estudió encontrándose que de un 20 a un 40 % del total de la glucovainillina se localiza en la parte central y se distribuye a lo largo de la vaina aumentando desde el principio hasta el final del florecimiento y a medida que la vainilla va madurando la betaglucosidasa va hidrolizando la glucovainillina; de esto se deduce que para obtener un rendimiento óptimo de vainillina en la vainilla, el corte debe hacer cuando este presente un color ligeramente amarillento en el extremo inferior de la vaina. Esta es una de las razones bioquímicas que se tomaron para elaborar el decreto del corte y beneficio de la vainilla en 1943.

Análisis químico cuantitativo de vainillina.— En la parte experimental podemos concluir que el método espectrofotométrico para valorar la vainillina es eficiente ya que en medio alcalino la presencia de la estructura quinoide es más estable que en medio neutro debido a que la resonancia electrónica es mayor.

Los picos de las longitudes de onda de las bandas primarias tanto del para-hidroxibenzaldehído como de la vainillina en medio alcalino en efecto se desplazan a una longitud de onda mayor y aumentan su intensidad; solo se observó una ligera discrepancia entre el valor del pico de máximo de absorbancia del método propuesto que es a 336 nm en medio alcalino y en la práctica se presentó el máximo en la banda primaria del para-hidroxibenzaldehído a 328 nm; la vainillina si presentó máxima absorbancia a 348 nm como lo indica el método. Las lecturas se hicieron en un espectrofotómetro Beckman D U modelo 25 calibrado recientemente. El p-hidroxibenzaldehído en medio neutro presentó un pico de máxi-

ma absorbancia a 280 nm lo cual concuerda con los datos encontrados en la literatura, (8).

Cuando este método es aplicado se recomienda hacer una lectura previa y determinar en cada aparato el pico máxima de absorbancia, con objeto de lograr una mayor precisión en las lecturas posteriores.

En general podemos decir que se encontró que el método para determinar vainillina en medio alcalino es rápido, eficaz, exacto, preciso y practico, sobre todo cuando se tienen que valorar muchas muestras.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- BOURIQUET, GILBERT.
LE VANILLIER ET LA VANILLE.
XLVI, ENCICLOPEDIE BIOLOGIQUE.
EDITIONS PAUL LECHEVALIER.
PARIS, 1954.

- 2.- FOSTER DEE SNELL AND LESLI S.
ENCYCLOPEDIA OF INDUSTRIAL CHEMICAL ANALYSIS.
VOLUMEN 19.
INTERSCIENCE PUBLISHER.
DIVISION OF JOHN WILEY & SONS.
NEW YORK.

- 3.- VICTORIA, GOMEZ CRUZ
ESTUDIO ECONOMICO DE LA VAINILLA EN EL ESTADO DE VERACRUZ.
TESIS. UNIVERSIDAD VERACRUZANA. FACULTAD DE ECONOMIA.
XALAPA, 1977.

- 4.- ENRIQUE ARTURO MARQUEZ GARCIA Y VICTOR MANUEL GARFIAS GARCIA.
CINETICA DE LA EXTRACCION DE LA VAINILLINA DE LA VAINA DE VAINILLA
Y METODOLOGIA PARA EL DISEÑO DEL EXTRACTOR DE VAINILLINA USANDO AL-
COHOL ELITICO COMO DISOLVENTE.
TESIS. INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL. ESCUELA SUPERIOR DE INGENIE-
RIA QUIMICA E INDUSTRIAS EXTRACTIVAS.
MEXICO, 1977.

- 5.- CIURLIZZA, G. AUGUSTA. Y RUIZ C. MA. DE LOURDES.
CINETICA DE EVOLUCION DEL COLOR DEL ALCOHOL ELITICO EN PRESENCIA -
DE VAINA DE VAINILLA. REV. TECNOLOGICA DE ALIMENTOS MARZO - ABRIL-
1977.
- 6.- SHIOTA, HARUYASU. ITOGA KOJI.
THE STUDY ON THE AROMATIC COMPONENTS OF VANILLA BEANS. KORYO.
113. 65-71 (1975).
- 7.- ARANA, FRANCISCA E. ACTION OF BETAGLUCOSIDASE IN THE CURING OF VANILLA. FOOD RESEARCH. 8 343-51 (1943).
- 8.- JAFFE J. H. AND MILTON ORCHIN.
THEORY AND APPLICATIONS OF ULTRAVIOLET SPECTROSCOPY.
JOHN WILEY AND SON INC.
NEW YORK, 1962.
- 9.- KIRK R. E. AND OTHMER D. F.
ENCICLOPEDIA DE TECNOLOGIA QUIMICA.
TOMO XV.
UNION TIPOGRAFICA EDITORIAL HISPANO-AMERICANA.
MEXICO, 1965.
- 10.- MERORY, JOSEPH.
FOOD FLAVORINGS COMPOSITION, MANUFACTURE AND USE.
THE AVI PUBLISHING COMPANY, INC.
WESTPORT, 1968.

- 11.- CARPENTER, PHILIP L.
MICROBIOLOGIA.
NUEVA EDITORIAL INTERAMERICANA, S. A. DE C. V.
MEXICO, 1967.
- 12.- BERNADETTE SGOLL, GISELA
TLILXOCHITL LLAMABAN LOS AZTECAS LA VAINILLA. H & R CONTACT
11. 13-5
- 13.- MARDEN LUIS. THE EXQUISITE ORCHIDS. NATIONAL GEOGRAPHIC.
139 # 4. 500-1. 1971.
- 14.- GIVAUDAN DUEVENDORF LTD. VANILLA: WORLD'S FAVOURITE FLAVOUR.
2. 1-5. 1974.
- 15.- GUENTHER, ERNEST. VANILLA. REPORT FROM THE FAR EAST.
14. 1-3. 1968.
- 16.- DYER, JOHN R.
APLICACIONES DE ESPECTROSCOPIA DE ABSORCION DE COMPUESTOS OR-
GANICOS.
EDITORIAL PRENTICE/HALL INTERNACIONAL.
MADRID, 1965.

- 17.- CRESWELL, CLIFORD J.; RUNQUIST, OLAF; CAMPBELL, M. M.
SPECTRAL ANALYSIS OF ORGANIC COMPOUNDS.
SECOND EDITION.
BURGESS PUBLISHING COMPANY.
MINNEAPOLIS, 1972.
- 18.- OCTAVO CONGRESO LATINOAMERICANO DE QUIMICA.
CODIGO LATINOAMERICANO DE ALIMENTOS.
SEGUNDA EDICION.
BUENOS AIRES, 1964.
- 19.- HORWITZ, WILLIAM.
OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF THE ASSOCIATION OF OFFICIAL
AGRICULTURAL CHEMISTS.
ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS.
NINTH EDITION.
WASHINGTON, 1960.
- 20.- FEENY, F. J. DETERMINATION OF VANILLIN BY ULTRAVIOLET
ABSORPTION. J. ASS. OFFIC. ANAL. CHEM. 47 # 3. 555 (1964).