

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química



**Determinación Espectrofotométrica de Vainillina y
p-Hidroxibenzaldehído a partir de extracción de *Vanilla
fragans* utilizando microondas focalizadas**

TESIS

Que para obtener el título de

Ingeniero Químico

Presenta

ARTURO LONGARES PATRÓN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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: Profa. Lilita Virginia Raquel Saldívar y Osorio
Vocal: Prof. José Luz González Chávez
Secretario: Profa. María del Pilar Cañizares Macías
Primer Suplente: Prof. Guillermo Antonio Segura Espinosa
Segundo Suplente: Prof. Julio Cesar Aguilar Cordero

LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 105 Edificio B - Análisis por Inyección de Flujo
Facultad de Química, UNAM.

Dra. María del Pilar Cañizares Macías
ASESOR

Arturo Longares Patrón
SUSTENTANTE

En este trabajo está el reflejo de una pequeña parte de todo el conocimiento que he adquirido en mi carrera. En mi persona esta el reflejo de todas las extraordinarias experiencias que he tenido con todas las personas que he conocido en mi vida. Gracias a todos hoy he logrado uno de mis grandes objetivos: Ser Ingeniero Químico. ¡Gracias!

Parte de esta investigación fue presentada en:

First International Congress on the Future of the Vanilla Business

11 y 12 de noviembre de 2003

Princeton, NJ., USA

Parte de esta investigación ha sido publicada en:

Longares-Patrón, A., Cañizares-Macías, M.P.

Focused microwaves-assisted extraction and simultaneous spectrophotometric determination of vanillin and p-hydroxybenzaldehyde from vanilla fragans

Talanta 2006, 69, 882-887

Esta investigación fue desarrollada con el apoyo de:

Subprograma 127 "Formación Básica en Investigación"

Durante Agosto 2003 a Agosto 2004, bajo la tutela de la Dra. Maria del Pilar Cañizares Macías.

Facultad de Química, UNAM

ÍNDICE

| | |
|--|------|
| <u>I. Introducción</u> | (1) |
| <u>II. Antecedentes</u> | (2) |
| II.1 Origen de la Vainilla y Situación Actual | (2) |
| II.2 Composición de la Vainilla | (3) |
| II.3 Características de la Vainillina y PHB | (4) |
| II.4 Métodos de Análisis | (4) |
| II.4.a Espectrofotometría | (5) |
| II.4.a.1 Leyes Fundamentales de la Fotometría | (5) |
| II.4.a.2 Configuración del Equipo | (8) |
| II.4.a.3 Determinación Simultánea por Aditividad de Absorbancias | (9) |
| II.4.a.4 Determinación Simultánea por Primera Derivada | (10) |
| II.5 Métodos de Extracción | (12) |
| II.5.a Extracción Asistida con Microondas Focalizadas | (13) |
| II.5.a.1 Historia de las Microondas y sus Aplicaciones | (14) |
| II.5.a.2 Principio de las Microondas | (15) |
| II.5.b Extracción de Vainilla | (16) |
| <u>III. Objetivos</u> | (18) |
| III.1 Objetivo General | (18) |
| III. 2 Objetivos Específicos | (18) |
| <u>IV. Metodología</u> | (19) |
| IV.1 Reactivos y Disoluciones | (19) |
| IV.2 Instrumentación | (20) |
| IV.3 Tratamiento de las Vainas de Vainilla | (21) |
| IV.4 Métodos de Detección | (21) |
| IV.4.a Método de Vierordt o Aditividades de Absorbancias | (22) |
| IV.4.b Método de la Primera Derivada | (22) |
| IV.5 Extracción | (22) |
| IV.5.a Método Convencional (NMX-FF-074-1996-SCFI) | (22) |
| IV.5.b Extracción Asistida con Microondas Focalizadas (EAMF) | (23) |
| IV.5.b.1 Configuración del Equipo | (23) |
| IV.5.b.2 Procedimiento para la Extracción | (24) |

| | |
|---|-------------|
| <u>V. Resultados y Discusión</u> | (25) |
| V.1 Selección del Método de Detección | (25) |
| V.2 Determinación de las Longitudes de Onda de Máxima Absorción y Evaluación de la Primera Derivada | (25) |
| V.3 Elaboración de las Curvas de Calibración | (27) |
| V.4 Curvas de Calibración Finales | (28) |
| V.4.a Características Generales | (28) |
| V.4.b Límite de Detección y Cuantificación | (29) |
| V.4.c Precisión | (31) |
| V.5 Determinación de Vainillina y PHB | (32) |
| V.5.a Método de Vierordt o Aditividades de Absorbancias | (32) |
| V.5.b Método de la Primera Derivada | (33) |
| V.6 Análisis de Mezclas de Vainillina – PHB para Seleccionar el Método De Cuantificación | (33) |
| V.7 Estudio de Optimización para el Método de Extracción Propuesto: Extracción Asistida con Microondas Focalizadas (EAMF) | (34) |
| V.7.a Experimentos Preliminares | (35) |
| V.7.b Estudio Factorial 2 ⁴ | (36) |
| V.7.c Análisis de Varianza (ANOVA) | (38) |
| V.8 Aplicación de los Métodos de Extracción a las Muestras de Vainilla | (40) |
| V.9 Adiciones de Vainillina y PHB | (41) |
| <u>VI. Conclusiones</u> | (43) |
| <u>VII. Bibliografía</u> | (44) |
| <u>VIII. Artículo</u> | (47) |

I. Introducción

En este trabajo se propone, describe y analiza un método de extracción con microondas focalizadas para mejorar la extracción de vainillina y p-hidroxibenzaldehído (PHB) de vainilla, impactando en mejoras productivas a largo plazo. Igualmente, dos métodos de detección se analizan con el fin de cuantificar vainillina y PHB en el extracto de una forma confiable y rápida.

Esta tesis se divide en seis secciones. La primera corresponde a los antecedentes y tiene la finalidad de establecer el marco teórico y práctico a partir del cual se desarrolló este trabajo. En esta sección se describe la importancia a nivel mundial de la vainilla como una de las especias más costosas y consumidas; las microondas y su evolución desde sus primeras aplicaciones en los años 70 y la espectrofotometría como uno de los métodos de detección.

El segundo capítulo presenta los objetivos generales y particulares del trabajo.

Todas las metodologías utilizadas y el detalle de cómo se elaboraron se presentan en la tercer sección del documento. Aquí se describen tanto el método propuesto para una mejor extracción como la extracción utilizada actualmente. También se explican los métodos espectrofotométricos utilizados.

La parte clave de la tesis gira alrededor del cuarto capítulo: Resultados y Discusión. Es en esta parte es donde se analizan y discuten todos los resultados obtenidos a partir de la elaboración de los procesos de extracción y detección.

El quinto y sexto capítulo corresponden a las Conclusiones y a la Bibliografía, respectivamente. En el primero se describen las principales inferencias derivadas de los resultados; mientras que el segundo corresponde a la literatura utilizada, como artículos, libros y páginas de Internet oficiales.

II. Antecedentes

II.1 Origen de la Vainilla y Situación Actual

Tlilxochitl significa vaina negra y corresponde a la palabra azteca para vainilla. En la era prehispánica, los aztecas cultivaron la vainilla y la usaron como saborizante del xocolatl, palabra usada para describir el chocolate. Después de la llegada de los españoles, estos introdujeron la vainilla en Europa, siendo México el único productor de vainilla para el consumo europeo durante los próximos 350 años. En 1754 los ingleses, específicamente Phillip Millar, clasificaron la vainilla en el “Garden’s Dictionary” al hacerla florecer en Londres. Varios esfuerzos para cultivarla en Europa se llevaron a cabo a principios del siglo XVIII, pero la falta de polinizadores naturales, hacían que las cosechas no fueran fructíferas. Los holandeses en la isla de Java plantaron vainilla, la cual creció y floreció pero el fruto nunca surgió. En el año de 1841 el Profesor Charles Morren de Liege desarrolló un método artificial para polinizar las flores de vainilla y fue el primero en producir vainilla fuera de México. Para lograrlo, analizó la anatomía de la flor y observó que era imposible que se llevara a cabo la auto polinización. También notó que el periodo de florecimiento de la orquídea es muy corto y descubrió que es una especie de pequeña abeja la única que puede polinizar la vainilla naturalmente. Cinco años después, Edmon Albins, esclavo en los plantíos de vainilla en Isla Reunión, inventó un método práctico y manual para polinizar la flor de vainilla mediante un palillo de bambú. Es a partir de este momento cuando se pudo comercializar la vainilla [1,2,3].

Actualmente la vainilla ocupa el segundo lugar, después del azafrán, como la especie más cara a nivel mundial. Su precio ha llegado a los \$500 dólares por kilogramo. El elevado precio se debe a que los procesos de cultivo, polinización y cosecha se realizan a mano pudiendo tardar hasta dos años para obtener un producto de alta calidad. Se requieren de 4 kg de vainas verdes para obtener un kilogramo de vainilla curada. Este proceso es sumamente tardado (hasta 6

meses) y laborioso, lo que contribuye al elevado precio de la vainilla. Los mayores productores son Madagascar, Indonesia, China y México, respectivamente. El mayor consumidor de los últimos 10 años es Estados Unidos [4], usándola principalmente para la elaboración de helados, refrescos, chocolates, dulces, tabacos y licores, entre otros [1].

La vainilla contiene un compuesto llamado vainillina, el cual es el más importante y representativo. Este compuesto extraído a partir de vainas de vainilla tiene un valor entre \$1200 y \$4000 dólares por kilo, en contraste con el precio de la vainillina sintética cuyo precio es menor a los \$15 dólares por kilo. De toda la vainillina utilizada a nivel mundial sólo el 1% es de origen natural. Aproximadamente el 50% de la producción mundial de vainillina sintética se utiliza como intermediario en la industria química y farmacéutica para la producción de herbicidas, agentes antiespumantes o medicinas. También, se utiliza en productos del hogar como aromatizantes y ceras de pisos [5].

II.2 Composición de la Vainilla

Primeras investigaciones de los extractos naturales de vainilla encontraron más de 170 compuestos volátiles que contribuyen al sabor del mismo. Estudios recientes muestran que son más de 250 compuestos diferentes. Entre los principales componentes de la vainilla se encuentran el 4-Hidroxi-3-metoxibenzaldehído (Vainillina), p-Hidroxibenzaldehído (PHB), ácido vanílico y p-metoxibenzaldehído. La vainillina y el PHB son los compuestos que se encuentran en mayor cantidad en los extractos naturales de vainilla. La proporción entre estos dos compuestos es del orden de 10 a 20 partes de vainillina por una de PHB [9]. La relación entre los distintos componentes la determina las condiciones del cultivo, los nutrientes que contiene la tierra, la madurez con la que se recoge la cosecha y el método de curado [1]. Por lo anterior, en 1981 Jurgens sugirió el uso del cociente vainillina-PHB para identificar la región de origen de la vainilla. Equivalentemente, pueden utilizarse

otras correlaciones entre la vainillina y los demás compuestos que se encuentran en mayor proporción en los extractos [6]. También puede utilizarse como un indicador de la calidad natural de la vainilla.

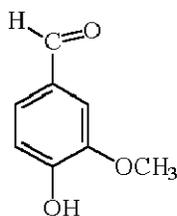
II.3 Características de la Vainillina y PHB

Tanto la vainillina como el PHB son cristales blancos de olores agradables y sensibles a la humedad y la luz. Presentan buena solubilidad en agua siendo el etanol el mejor disolvente.

Los dos compuestos son muy parecidos estructuralmente. Ambos son benzaldehidos con un grupo hidroxilo en la 4^a posición, el cual en medio alcalino se protona. Esta protonación provoca que la banda espectrofotométrica se desplace de 308 a 348 nm para la vainillina y de 283 a 329 nm para el PHB [2]. Este efecto batocrómico o de corrimiento hacia el rojo se presenta en ambos compuestos cuando se encuentran en solución en el extracto de vainilla.

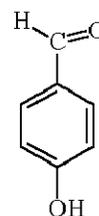
Vainillina

4-Hidroxi-3-metoxibenzaldehido



PHB

p-Hidroxibenzaldehido



II.4 Métodos de Análisis

Muchos métodos diversos se han desarrollado para caracterizar los extractos de vainilla. Cromatografía Líquida de Alta Precisión y Espectrometría Isotópica de Masas (HPLC y IRMS por sus siglas en inglés, respectivamente), Cromatografía de Gases (CG) y Cromatografía de Capa Fina (CCF) y Espectrofotometría, son

algunos de los métodos más conocidos. Todos presentan desventajas. Por ejemplo, el equipo utilizado para IRMS es muy caro y al igual que HPLC consume mucho tiempo y provoca pérdidas y degradación de las muestras. Otros métodos como la fluorimetría o la selección iónica, requieren de pretratamientos o separaciones iniciales que requieren de grandes cantidades de muestras y tiempos de reacción muy largos [7-8].

Como se puede observar existen muchos métodos, sin embargo la gran mayoría utiliza la cromatografía y la espectrofotometría. Este último es muy sencillo y rápido y tiene resultados confiables para la determinación en solución.

II.4.a Espectrofotometría

La espectrofotometría es “el conjunto de procedimientos que utilizan luz para medir concentraciones químicas” [10]. Uno de los principios en los que se basan los métodos espectrométricos es la capacidad de las moléculas para absorber luz a una determinada longitud de onda. Este principio inherente a cada compuesto se conoce como absorptividad.

II.4.a.1 Leyes Fundamentales de la Fotometría

“La potencia radiante de un haz o rayo de radiación es proporcional al número de fotones por unidad de tiempo. La absorción ocurre cuando un fotón choca con una molécula y la lleva a un estado de excitación. Puede pensarse que cada molécula tiene una área de sección transversal para captura de fotones, y éstos deben atravesar dicha área para interactuar con la molécula. La sección transversal varía con la longitud de onda y, de hecho, es una medida de la probabilidad de que los fotones sean capturados por una molécula dada. La velocidad de absorción cuando un haz de fotones pasa a través de algún medio depende del número de colisiones por unidad de tiempo, de los fotones con los átomos o las moléculas capaces de absorberlos. Si se duplica el número de

moléculas capaces de absorber fotones, ya sea duplicando la longitud del trayecto de la radiación a través del medio o la concentración de esa especie, la rapidez o tasa de absorción de fotones se duplica. De igual forma, al duplicar la potencia del haz se duplica el número de fotones que atraviesa el medio por unidad de tiempo, y se duplica también el número de colisiones por unidad de tiempo con las moléculas absorbentes de radiación, cuando el número de tales moléculas permanece constante.

Si un haz de radiación monocromática correspondiente a una onda plana de potencia radiante P_0 recorre una distancia infinitesimal dx en un medio capaz de absorber radiación, el decremento en potencia $-dP$, está dado por la siguiente ecuación, ya que el número de especies absorbentes de radiación es proporcional al espesor, pero es independiente de P :

$$-dP = k' P dx$$

La constante de proporcionalidad k' depende de la longitud de onda de la radiación. La concentración C se ha supuesto constante. Separando variables en la ecuación anterior da

$$\frac{-dP}{P} = -d(\ln P) = k' dx$$

que es un enunciado matemático del hecho de que la potencia radiante absorbida es proporcional al espesor que se atraviesa. Ahora bien, si se estipula que P_0 es la potencia radiante a $x = 0$ y que P representa la potencia radiante de la radiación transmitida (o no absorbida) que resulta del medio capaz de absorber radiación en $x = b$, la ecuación anterior puede ser integrada en todo el paso óptico:

$$-\int_{P_0}^P d(\ln P) = k' \int_0 dx$$

obteniendo así

$$\ln P_0 - \ln P = \ln\left(\frac{P_0}{P}\right) = k'b$$

La ecuación anterior se conoce como ley de Lambert y simplemente señala que la radiación monocromática proveniente de una onda plana que pasa a través de un medio capaz de absorber radiación de concentración, la potencia radiante disminuye logarítmicamente a medida que la longitud de paso óptico aumenta aritméticamente.

La dependencia de la potencia radiante respecto de la concentración de especie absorbente puede encontrarse de manera paralela si la longitud de onda y la distancia que atraviesa el rayo en la muestra permanecen constantes. En este caso el número de moléculas capaces de absorber radiación y que chocan con fotones es proporcional a su concentración C . Entonces

$$-dP = k'PdC$$

y la separación de variables seguida por la integración de $C=0$ a $C=C$ produce

$$\ln\left(\frac{P_0}{P}\right) = k''C$$

Esta relación se conoce como ley de Beer. Si tanto la concentración como el espesor son variables, la ley de Beer-Lambert combinada viene a ser

$$\ln\left(\frac{P_0}{P}\right) = kbC$$

Reemplazando los logaritmos naturales por logaritmos decimales y definiendo una nueva constante ε de acuerdo con la práctica aceptada resulta

$$\log\left(\frac{P_0}{P}\right) = \varepsilon bC$$

La absorbancia A se define como

$$A = \log\left(\frac{P_0}{P}\right) = \varepsilon bC$$

La constante de proporcionalidad ε se conoce como absorptividad.

La absorción de radiación por moléculas a longitudes de onda específicas se usa frecuentemente para el análisis cuantitativo debido a la relación directa existente entre la absorbancia y la concentración, descrita anteriormente. La sensibilidad del análisis espectrométrico depende la magnitud de la absorptividad y de la absorbancia mínima que puede ser medida con el grado de certeza” [11].

II.4.a.2 Configuración del Equipo

Los componentes principales y básicos de cualquier espectrofotómetro son una fuente de radiación o luminosa, un dispositivo selector de longitud de onda, la celda o cubeta donde se coloca la muestra en solución, un detector y un registrador. Comúnmente hay dos tipos de espectrofotómetros; el de un haz y doble haz. Los instrumentos de un solo haz de luz normalmente son más baratos ya que el haz sólo pasa a través de la muestra; mientras que en el segundo tipo

de instrumentos, la luz pasa a través de un cortador que alterna la dirección del haz de la muestra a la referencia. Además, son mucho más convenientes para realizar barridos a diferentes longitudes de onda [13].

II.4.a.3 Determinación Simultánea por Aditividad de Absorbancias

Cuando en toda la región espectral de interés ocurre el traslape de los espectros de dos compuestos el equipo va a detectar ambos compuestos ya que no puede detectar que fracción de absorbancia corresponde a qué compuesto. Sin embargo, si las distintas especies tienen absorptividades diferentes a diferentes longitudes de onda y conocemos el espectro de los componentes puros, podremos descomponer matemáticamente el espectro de la mezcla en los espectros de sus componentes [10]. La clave es saber que la absorbancia de una disolución a una longitud de onda determinada es igual a la suma de las absorbancias de cada una de las especies a esa longitud de onda. Este método lo llamamos Aditividad de Absorbancias o método de Vierordt y es ampliamente utilizado por todos los químicos analíticos que desean determinar varios compuestos simultáneamente mediante métodos espectrofotométricos. El esquema general para realizar este procedimiento inicia con la ley de Lambert y Beer.

$$A = \varepsilon C$$

Donde ε es la absorptividad molar y C la concentración del compuesto en solución. Con el principio anterior a una longitud de onda determinada y para una mezcla con n compuestos la expresión anterior se generaliza de la siguiente forma:

$$A_{mezcla} = \sum_{i=1}^n A_i = \sum_{i=1}^n \varepsilon_i C_i$$

Por lo anterior, si suponemos tener una mezcla con dos compuestos de interés la absorbancia de la mezcla se expresa de la siguiente forma:

$$A_{mezcla} = A_1 + A_2 = \varepsilon_1 C_1 + \varepsilon_2 C_2$$

La expresión anterior representa la combinación lineal de dos curvas de calibración a una longitud de onda determinada. Con el fin de minimizar los errores en la medición o maximizar la precisión de la detección, se seleccionan las longitudes de onda en las que cada compuesto absorbe al máximo. Con lo anterior se medirá la absorbancia a la longitud de onda máxima de cada compuesto, por lo que se tendrán dos ecuaciones:

$$A_{\lambda 1} = \xi_{1@ \lambda 1} C_1 + \xi_{2@ \lambda 1} C_2$$

$$A_{\lambda 2} = \xi_{1@ \lambda 2} C_1 + \xi_{2@ \lambda 2} C_2$$

Las incógnitas para este sistema son las concentraciones de los analitos de estudio. Las absorbancias a las diferentes longitudes de onda se medirán experimentalmente; mientras que las absorptividades corresponden a las pendientes de las curvas de calibración.

II.4.a.4 Determinación Simultánea por Primera Derivada

Otro método para determinar espectrofotométricamente compuestos que absorben a la misma longitud de onda es el Método de Primera Derivada. Este procedimiento se utiliza para mejorar el análisis cualitativo y cuantitativo. Las dos grandes ventajas de la espectroscopía de derivadas es que se mejoran aspectos del espectro de tal forma que se pueden diferenciar sustancias con una absorción similar dentro de una misma muestra; además como segunda ventaja se tiene la supresión de señales de ruido que puedan traslaparse en el espectro de estudio. Este tipo de análisis se empezó en los años 50's, sin embargo no

fue hasta la evolución de los microprocesadores y consecuentemente en los equipos espectrofotométricos, que se generaron espectros de derivadas.

El fundamento matemático de la espectrometría de derivadas en general se puede describir a partir de la definición de absorbancia realizada anteriormente:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot C$$

donde la absorbancia y la absortividad están determinadas por la longitud de onda (λ),

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda) \cdot b \cdot C$$

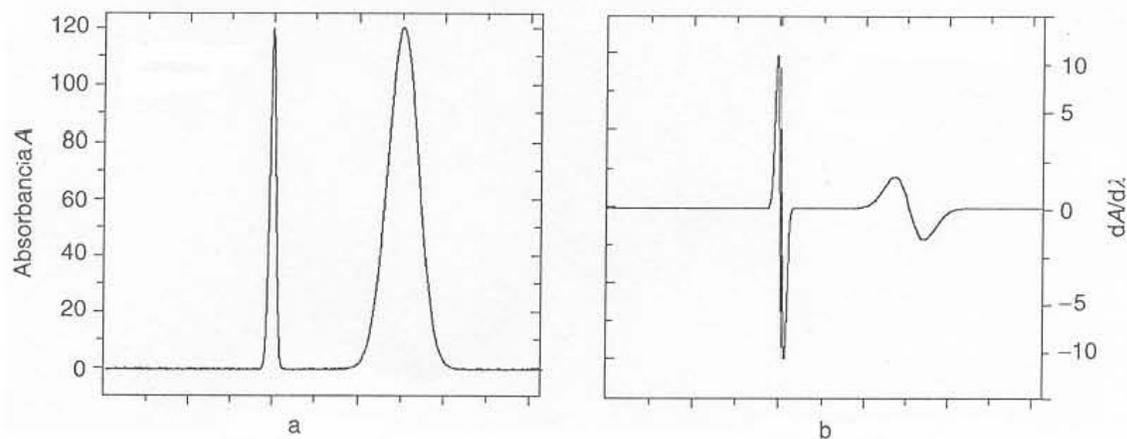
Existe una relación lineal entre la n derivada del espectro y la concentración de un analito:

$$\frac{d^n A(\lambda)}{d\lambda^n} = b \cdot \frac{d^n \varepsilon(\lambda)}{d\lambda^n} \cdot C$$

La primera derivada (Figura 1b) describe qué tanto cambia la absorbancia respecto a la longitud de onda. Es cero a longitudes de onda por arriba y debajo de las bandas de absorbancia y pasa por el cero a la máxima absorción. Es positiva a la longitud de onda menor al máximo debido a un incremento en la absorción. Para longitudes de onda mayores a la longitud de onda máxima la absorción disminuye y consecuentemente la primera derivada es negativa.

Figura 1

Espectro de Absorción (a) y Primera Derivada del Espectro de Absorción (b)



Los espectros de derivada pueden obtenerse por métodos matemáticos, electrónicos u ópticos. Matemáticamente es la forma más común ya que se puede realizar sin tener equipo adicional; únicamente se requiere un paquete de software adicional. La diferenciación electrónica ha sido propuesta pero no es aplicada ampliamente. La diferenciación óptica requiere de pasos muy elaborados; sin embargo se obtienen mejores resultados comparado con los dos métodos anteriores [11,24].

Por medio de este método se generan curvas de calibración de igual forma que si estuviéramos midiendo absorbancia y se generan tantas ecuaciones como compuestos de interés se tengan. La concentración es la incógnita en cada expresión y se determina independientemente una de la otra.

II.5 Métodos de Extracción

Las extracciones sólido-líquido consisten en extraer componentes solubles en el disolvente apropiado a través de la difusión de los mismos. Para el caso de la vainilla, al igual que el café, aromas, tes y esencias, entre otros, la forma clásica

es poner en contacto la matriz con el disolvente y dejar que la difusión se lleve a cabo. Este proceso puede acelerarse mediante agitación o renovación del disolvente o inclusive calentamiento.

II.5.a Extracción Asistida con Microondas Focalizadas

Ya sea para calentar alimentos o preparar muestras para análisis la tecnología de las microondas es considerablemente significativa en el hogar o laboratorios analíticos. Las extracciones asistidas con microondas han atraído el interés de muchos debido a que se pueden realizar extracciones rápidas con eficiencias comparables a los métodos convencionales [12,13].

Los equipos utilizados pueden clasificarse en dos grupos de acuerdo a la forma en la que la energía de microondas es aplicada a la muestra. El primer grupo son los sistemas multimodales en donde la radiación de las microondas es de forma aleatoria y dispersa en una cavidad determinada por lo que toda la zona que comprende la cavidad es uniformemente irradiada. Por otro lado existe el grupo de los sistemas focalizados donde la radiación se restringe a una zona donde la muestra está sujeta a un campo magnético mucho más intenso que en el grupo anterior [13].

Otra clasificación puede ser la de sistemas abiertos y cerrados. La presión en los sistemas abiertos equivale a la presión atmosférica, por lo que la temperatura máxima posible es la temperatura de ebullición del solvente a esa presión. La pérdida de vapores se evita colocando un refrigerante en la parte superior del contenedor del extracto. En los sistemas cerrados el solvente puede calentarse por encima de la temperatura de ebullición a presión atmosférica, incrementando la rapidez y eficiencia del proceso. Tales sistemas permiten el control de la temperatura del proceso de extracción [12].

II.5.a.1 Historia de las Microondas y sus Aplicaciones

Químicos analíticos empezaron a usar microondas en el año de 1975 para descomponer muestras biológicas. Un horno de microondas casero se utilizó para calentar rápidamente una mezcla conteniendo la muestra y los ácidos digestivos en un matraz Erlenmeyer. Desde ese día se han utilizados los métodos asistidos con microondas [13].

Sin embargo, no fue hasta 1986 que se publicó un artículo describiendo un método de extracción asistido por microondas. Este artículo presenta datos de la extracción de compuestos polares y no polares de alimentos y pesticidas en la tierra. Los datos son comparados contra métodos convencionales, teniendo mejores resultados aquellos en los que se utilizaron microondas como fuente de energía.

A través de los años procedimientos basados en hornos de microondas han remplazado algunas de las técnicas que utilizan hornos convencionales y técnicas de degradación térmica.

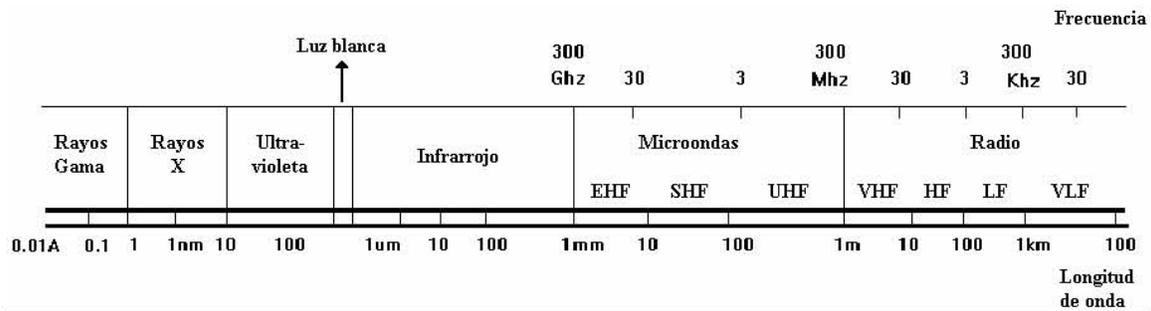
Los últimos avances en el uso de microondas en varios campos de la química analítica incluyen la degradación de muestras para análisis elemental, extracción de solvente, secado de muestras, mediciones de humedad, absorción y desorción de analitos, limpieza de muestras, elusiones, destilaciones y reacciones sintéticas, entre otros [13]. Particularmente en el campo de la extracción a principios de la década de los 90 diversos grupos de investigación europeos empezaron a usar hornos de microondas, originalmente construidos para degradación, para la extracción de aditivos. De ahí en adelante se utilizó para la extracción de pesticidas donde el solvente, la humedad, la potencia y tiempo de extracción fueron analizados como variables de estudio. En el área de alimentos se extrajeron vitaminas y diversos compuestos orgánicos cíclicos aromáticos. A partir de todos éstos y otros trabajos la Agencia Protectora del

Medio Ambiente de Estados Unidos (EPA por sus siglas en inglés) realizó investigaciones para la evaluación de nuevas técnicas basadas en microondas.

II.5.a.2 Principio de las Microondas

La región de las microondas en el espectro electromagnético (Figura 1) abarca un rango entre la radiación infrarroja y las frecuencias de radio y corresponden a longitudes de onda entre 1 mm y 1 m. Estas longitudes de onda corresponden a frecuencias de 300 GHz a 300 MHz.

Figura 1
Espectro Electromagnético



La energía de microondas es una radiación no ionizante que causa la movilidad de las moléculas por la migración de iones y la rotación de dipolos. Esta rotación se refiere a la alineación, debido a un campo eléctrico, de las moléculas en el solvente y las muestras con momento dipolar. Al disminuir el campo eléctrico se restaura el desorden térmico resultando en la liberación de energía en forma de calor. Este calor se genera mediante la alineación de las moléculas seguido de un regreso al punto de origen o desorden. Esta oscilación ocurre hasta 5×10^9 veces por segundo [12].

La forma en la que se generan las microondas en un horno de microondas convencional es mediante un magnetrón. Este dispositivo es un diodo termoiónico con un ánodo y un cátodo, el cual es calentado directamente. Al calentarse el cátodo, se liberan electrones y son atraídos hacia el ánodo, el cual está hecho de un número par de pequeñas cavidades, las cuales funcionan como circuitos sintonizados. La brecha a lo largo del final de cada cavidad se comporta como un capacitor. El ánodo es entonces una serie de circuitos que están sintonizados para oscilar a una frecuencia específica.

Un campo magnético muy fuerte es inducido axialmente a través del arreglo anódico y tiene un efecto de curvar el paso de los electrones al viajar del cátodo al ánodo. Al tiempo que los electrones curvados pasan por las cavidades huecas, éstos inducen una pequeña carga en el circuito sintonizado resultando en una oscilación de la cavidad. Cavidades alternas están unidas por dos pequeñas cintas de alambre asegurando la correcta relación de fase. Este proceso de oscilación continúa hasta que se alcance una alta amplitud. Es entonces cuando esta energía es extraída vía una antena [24].

II.5.b Extracción de Vainilla

La preparación de este extracto se sigue realizando de una forma muy artesanal. Se realiza a temperatura ambiente y por periodos de tiempo largos. La Norma Oficial Mexicana NMX-FF-074-1996-SCFI describe el proceso más utilizado a nivel mundial. Una de las muchas variantes que puede tener este proceso es el método generalmente descrito como percolación, que consiste en la circulación del disolvente, el cual es una disolución etanol/agua en diferentes proporciones, sobre y a través de las vainas de vainilla bajo presión reducida. Este proceso puede tomar de 48 a 72 horas. Otros métodos que utilizan calor directo son utilizados pero poco aceptados, tal como el método de oleorresinas que consiste en pulverizar las vainas y circular etanol sobre las vainas a baja

presión y a una temperatura de 45 °C. El exceso de alcohol se remueve por evaporación. Este proceso toma de 8 a 9 días [1].

Por lo anterior se propone un método de extracción asistido con microondas focalizadas y dos métodos de detección para la determinación simultánea de vainillina y PHB, con el fin de obtener un extracto de vainilla rápidamente y pueda evaluarse la cantidad de vainillina y PHB de una forma confiable e igualmente rápida.

III. Objetivos

III.1 Objetivo General

Proponer, desarrollar y evaluar un método para la extracción de vainillina y p-hidroxibenzaldehído de *Vanilla fragans* para su cuantificación por espectrofotometría.

III. 2 Objetivos Específicos

- Desarrollar un método de extracción de vainillina y PHB de *Vanilla fragans* utilizando microondas focalizadas.
- Optimizar los parámetros potencia, tiempo de irradiación, tiempo de no irradiación y concentración de etanol para la extracción con microondas.
- Obtener la mayor cantidad de vainillina y PHB en el menor tiempo.
- Comparar el método propuesto con el reportado en la Norma Oficial Mexicana.
- Evaluar la mejor técnica para cuantificar espectrofotométricamente de forma simultánea vainillina y PHB en los extractos de vainilla.

IV. Metodología**IV.1 Reactivos y Disoluciones**

El proceso general se divide en dos: La extracción y la detección. Para cada parte se utilizaron reactivos grado analítico y disoluciones de gran pureza y calidad. En la Tabla 1 se presentan los reactivos utilizados y la marca.

Tabla 1 - Reactivos

| Reactivo | Marca |
|--------------------|--------------|
| Vainillina | Sigma |
| PHB | Sigma |
| Hidróxido de Sodio | Baker |
| Etanol Absoluto | Baker |

Para las extracciones se utilizaron disoluciones de etanol-agua en diferentes proporciones que se prepararon en el momento de realizar la extracción.

Para la determinación de vainillina y PHB se prepararon disoluciones madre. Estas disoluciones fueron preparadas disolviendo aproximadamente 0.01 g del compuesto de interés en 5 mL de etanol absoluto y diluyendo con agua destilada hasta un aforo de 100 mL. Las disoluciones fueron refrigeradas a 4 °C y utilizadas por un periodo no mayor a una semana. Una vez superado este lapso se prepararon nuevas disoluciones.

A partir de las disoluciones madre se prepararon disoluciones estándar mediante la toma de alícuotas de diferentes volúmenes. Cada alícuota fue colocada en un matraz volumétrico de 100 mL añadiendo aproximadamente 80 mL de agua y 2 mL de disolución de hidróxido de sodio 0.1 N. Se mezcló y diluyó con agua hasta la marca.

El blanco de reactivos para ajustar a cero el espectrofotómetro se preparó mediante la adición de aproximadamente 80 mL de agua en un matraz volumétrico de 100 mL adicionando 2 mL de NAOH 0.1 N y diluyendo con agua hasta la marca.

Para la determinación de vainillina y PHB de los extractos de vainilla se utilizó el siguiente procedimiento: Se tomó una alícuota de 1 mL de extracto, se colocó en un matraz volumétrico de 100 mL y se siguió el mismo procedimiento que para los estándares.

IV.2 Instrumentación

El instrumento utilizado para la detección de los compuestos fue un Espectrofotómetro Cary 3 marca Varian con capacidad de lectura en el espectro UV-Visible desde 200 hasta 800 nm. Una celda de cuarzo de 1 cm fue parte del equipo al igual que el software Cary 3 el cual proporcionó tablas y gráficas con los resultados de las mediciones.

Para obtener los extractos utilizando energía de microondas focalizadas se utilizó un horno de microondas Maxidigest MX 350 de Prolabo con una potencia máxima de 300W.

La liofilización de las vainas de vainilla se llevó a cabo mediante un Liofilizador marca LABCONCO 4.5 junto con una bomba de vacío de ½ HP marca Precision Scientific.

Para realizar todas las pesadas se utilizó una balanza analítica Explorer Ohaus con una precisión de 0.1 mg.

IV.3 Tratamiento de las Vainas de Vainilla

Para realizar las extracciones se utilizó picadura de vainas de vainilla con un tamaño aproximado de 2 mm X 2 mm de la región de Papantla, Veracruz. Se les aplicaron diferentes tratamientos:

A) El primer grupo lo llamamos Vainilla Comercial y ningún tratamiento se les aplicó para realizar las extracciones. **B)** Corresponde a Vainilla Seca y se preparó introduciendo la picadura de vainilla en un horno de secado a una temperatura constante de 95 °C hasta llegar a peso constante. Este proceso tardó aproximadamente 2 días [15]. **C)** El tercer grupo se denomina Vainilla Liofilizada y se obtuvo colocando picadura de las vainas comerciales en un tubo de liofilización. Se adicionó nitrógeno líquido y se colocó en el liofilizador por un periodo de 4 horas. Concluido este tiempo se disminuyó la presión a 5 µm Hg.

IV.4 Métodos de Detección

Con base en el método de espectrofotometría UV-Visible conocido y descrito por la AOAC [16] como método aproximado se evaluaron dos métodos espectrofotométricos para la cuantificación de vainillina y PHB: 1) Método de Vierordt o Aditividades de Absorbancias, y 2) Método de la primera derivada. El método aproximado se utiliza para cuantificar exclusivamente vainillina y es el mismo utilizado y descrito en la Norma Oficial Mexicana (NMX-FF-074-1996-SCFI).

En todos los casos se prepararon disoluciones estándar en el intervalo deseado para ambos analitos y se determinó la absorbancia a 329 nm y 348 nm de todas las disoluciones. También, con ayuda del programa Cary 3 se calculó la primera derivada del espectro de absorción.

IV.4.a Método de Vierordt o Aditividades de Absorbancias

Con este método se generaron cuatro curvas de calibración: dos para la vainillina y dos para el PHB. Cada curva se obtuvo a partir de las mediciones de absorbancia a las dos longitudes de onda máximas para cada analito y mediante regresiones lineales utilizando el método de mínimos cuadrados.

La concentración de vainillina y PHB se calculó aplicando el principio de aditividades obteniendo un sistema de dos ecuaciones, el cual se resolvió algebraicamente por el método de sustitución.

IV.4.b Método de la Primera Derivada

El procedimiento de la Primera Derivada generó dos curvas de calibración. Éstas se obtuvieron a partir de la primera derivada del espectro de absorción de cada analito. La curva de calibración para PHB se construyó con el valor de la primera derivada a la longitud de onda de 348 nm. La curva de calibración correspondiente a la vainillina se produjo midiendo todas las disoluciones estándar a 329 nm.

IV.5 Extracción

Dos tipos de extracciones fueron evaluadas con los tres diferentes tipos de vainilla. A continuación se describen los dos métodos para la elaboración de los extractos.

IV.5.a Método Convencional (NMX-FF-074-1996-SCFI)

Se colocó aproximadamente 1 g de picadura de vainas de vainilla en un matraz de 10 mL. Se adicionaron 2 mL de etanol y 1 mL de agua, y se dejó macerar durante 12 horas. Se añadieron 2 mL de etanol, mezclando muy bien todo el

contenido y dejando macerar durante 3 días más. La disolución se filtró, compactando firmemente los sólidos y lavándolos lentamente con una disolución al 50% de etanol hasta llegar a un volumen de 10 mL.

IV.5.b Extracción Asistida con Microondas Focalizadas (EAMF)

IV.5.b.1 Configuración del Equipo

La configuración utilizada para llevar a cabo el método de extracción con microondas focalizadas consistió en un tubo externo (D = 4 cm) de vidrio conteniendo aproximadamente 25 mL de agua a temperatura ambiente. Dentro del tubo externo se colocó un tubo de vidrio de menor diámetro (3 cm aproximadamente), en el cual se colocó la disolución etanol-agua y la picadura de vainilla. Se adaptó un refrigerante al tubo interno con la finalidad de evitar pérdidas por evaporación de la disolución etanol-agua (Figura 2). El arreglo anterior se colocó dentro del horno de microondas como se muestra en la Figura 3.

Figura 2
Arreglo Primario para
Extracción con Microondas
Focalizadas

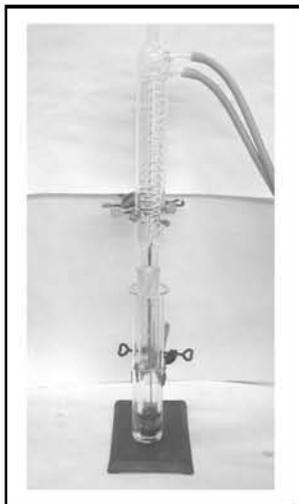


Figura 3
Configuración Final con Microondas
Focalizadas



IV.5.b.2 Procedimiento para la Extracción

Se pesaron aproximadamente 1 g de picadura de vainas de vainilla y se colocaron en el tubo interno. Se agregaron 25 mL de disolución etanol-agua. Se montó el equipo y se programaron los ciclos de irradiación y no-irradiación. Una vez terminado el proceso se tomó 1 mL de extracto y se vertió en un matraz de 100 mL. Se añadieron 2 mL de NaOH 0.1 M, mezclando y aforando hasta la marca con agua. Se midió la absorbancia a 329 y 348 nm y se obtuvo la 1ª derivada.

V. Resultados y Discusión

V.1 Selección del Método de Detección

Existen muchas técnicas para determinar vainillina y PHB en disolución tales como cromatografía líquida, cromatografía de gases, cromatografía en papel, análisis isotópico y espectrofotometría UV-Visible, entre muchos otros [8, 17].

El método de detección seleccionado en este trabajo es sencillo y rápido de elaborar, además de que produce resultados confiables para la determinación de vainillina. Contrario a lo anterior, los métodos cromatográficos presentan desventajas ya que requieren de tratamientos laboriosos y diversos reactivos para adecuar la muestra; así como de mayor tiempo de proceso.

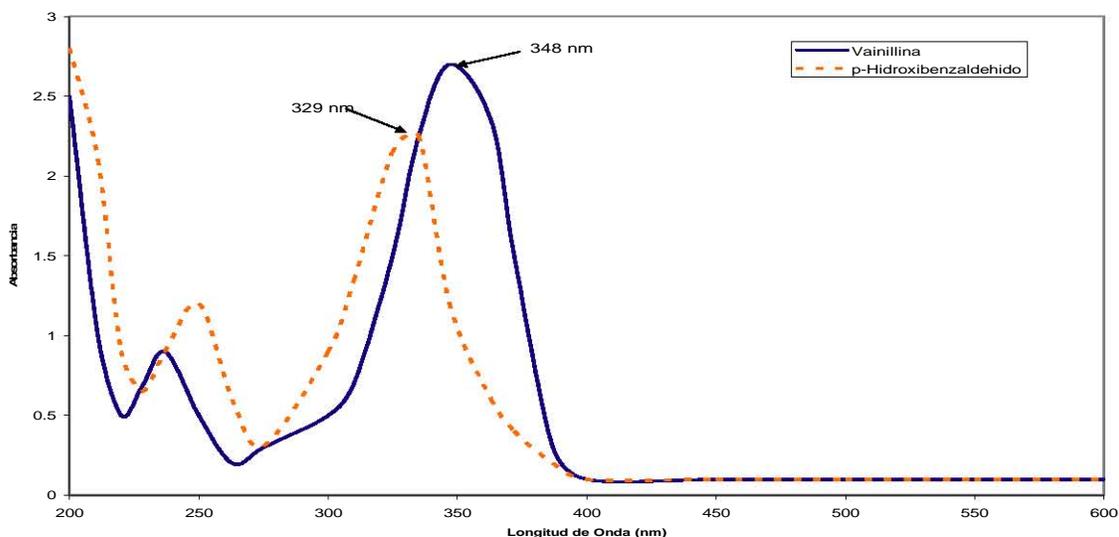
El método aproximado detallado por la AOAC describe la determinación de vainillina pero no se utiliza para PHB. En este trabajo se determinó vainillina y PHB debido a que este último es un componente que también se encuentra en los extractos de vainilla y presenta absorción a la longitud de onda máxima de absorción de la vainillina provocando interferencia en la medición de este último. Debido a esto se realizaron algunas modificaciones a la forma de detección y se decidió utilizar dos variantes para la determinación de las concentraciones: El método de Vierordt y el método de la Primera Derivada.

V.2 Determinación de las Longitudes de Onda Máximas de Absorción y Evaluación de la Primera Derivada

Mediante la investigación bibliográfica se encontró que la longitud de onda máxima para la vainillina es de 348 nm y de 329 nm para el PHB. Sin embargo, estos datos tuvieron que ser confirmados en la práctica con el espectrofotómetro utilizado durante este trabajo. La forma en la que se determinó fue mediante un

barrido a diferentes longitudes de onda de una disolución estándar. El intervalo seleccionado fue de 200 a 600 nm.

Gráfica 1
Espectro de Absorción de Vainillina y PHB

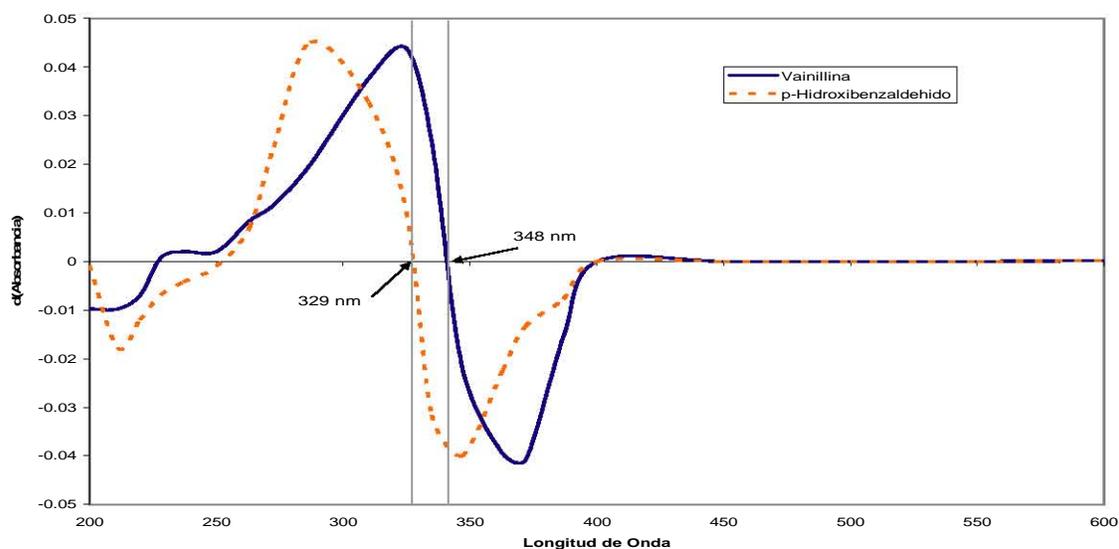


La gráfica 1 muestra los espectros de absorción de ambos analitos confirmando que 348 y 329 son las longitudes de onda a las que la vainillina y el PHB presentan la mayor absorbancia, además de que ambos espectros se solapan, lo que demuestra la interferencia de PHB al medir vainillina a 348 nm.

Conociendo los datos de longitud de onda de máxima absorción se pudo realizar el método de Vierordt; mientras que para realizar el método de primera derivada fue necesario determinar la primera derivada para los espectros de absorción. Esta tarea fue realizada mediante el software Cary 3 incluido en el espectrofotómetro. El resultado se presenta en la Gráfica 2 donde puede observarse que a las longitudes de onda 348 y 329, el valor de la primera derivada de la absorbancia es prácticamente cero para los espectros de vainillina y PHB, respectivamente. Por lo anterior, al medir la primera derivada de la absorbancia respecto a la longitud de onda ($dA / d\lambda$) a la longitud de onda

máxima de la vainillina (348 nm) nos aseguramos que estamos midiendo solo PHB, ya que para la vainillina el valor es cero. Así mismo, cuando medimos a 329 nm sólo estamos midiendo la vainillina debido a que a esta longitud de onda el valor de PHB es prácticamente cero.

Gráfica 2
Espectro de Primera Derivada Vainillina y PHB



V.3 Elaboración de las Curvas de Calibración

En la Tabla 2 se presentan las concentraciones de las disoluciones estándar utilizadas para determinar el intervalo lineal para cada curva de calibración. Este intervalo se utilizó para los dos analitos a las dos longitudes de onda estudiadas, así como para la primera derivada.

Tabla 2
Concentraciones Utilizadas para la Determinación de las Curvas de
Calibración

| Compuesto | Concentraciones en Solución [mg/L] | | | | | | | | | | |
|------------|------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| Vainillina | 13.160 | 9.400 | 7.520 | 5.640 | 3.760 | 1.880 | 1.504 | 1.128 | 0.752 | 0.376 | 0.282 |
| PHB | 13.400 | 9.380 | 6.700 | 5.360 | 4.020 | 2.680 | 1.340 | 1.072 | 0.804 | 0.536 | 0.268 |

El intervalo final se obtuvo mediante el criterio de eliminar aquellos puntos que se salían de la linealidad del conjunto de datos tanto a valores inferiores como superiores. Otro criterio fue eliminar aquellos puntos cuyo valor es muy pequeño y se encuentran por debajo del límite de detección y/o cuantificación.

V.4 Curvas de Calibración Finales

V.4.a Características Generales

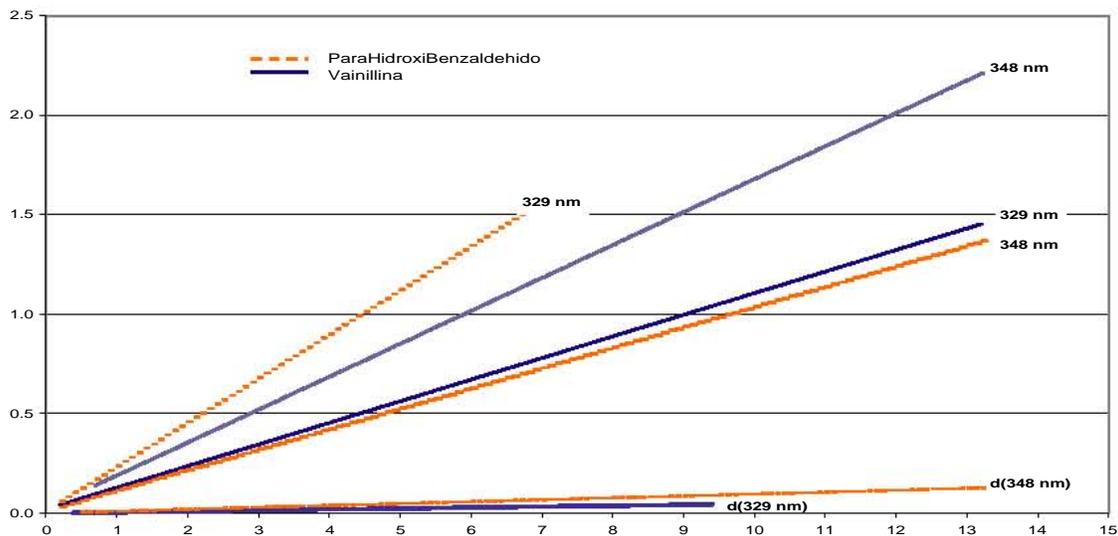
En la Tabla 3 se muestran los intervalos lineales obtenidos así como las características de las curvas de calibración (ordenada al origen, pendiente y coeficiente de correlación) para cada compuesto a las dos longitudes de onda y primera derivada. La gráfica 3 muestra la representación gráfica de estas curvas.

Todas las curvas de calibración presentan buena linealidad. Esta característica se confirma ya que todos los coeficientes de correlación (r) presentan 3 cifras significativas con valor de 9. Así mismo se observa que la vainillina a 348 nm y el PHB a 329 nm tienen la mayor pendiente. Esto significa y comprueba experimentalmente el hecho de que esas longitudes de onda corresponden a la máxima absorción de los compuestos.

Tabla 3
Parámetros Estadísticos de las Curvas de Calibración

| Compuesto | Longitud de Onda | Curva de Calibración | Rango de Concentración [mg/L] | | r | m | b | LD | LC | LC-LI | DER |
|------------|------------------|----------------------|-------------------------------|----------------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|
| | | | Limite Inf.(L) | Limite Sup.(L) | | | | [mg/L] | [mg/L] | [mg/L] | |
| Vainillina | 348 | 1 | 0.752 | 13.160 | 0.9998 | 0.1655 | 0.0235 | 0.302 | 1.005 | 0.253 | 0.588% |
| | 329 | 2 | 0.282 | 13.160 | 0.9999 | 0.1086 | 0.0189 | 0.163 | 0.545 | 0.263 | 0.492% |
| | d(329) | 3 | 0.376 | 9.400 | 0.9999 | 0.0047 | -0.0001 | 0.154 | 0.514 | 0.138 | 0.470% |
| PHB | 348 | 4 | 0.268 | 13.400 | 0.9999 | 0.1024 | 0.0137 | 0.210 | 0.699 | 0.431 | 0.724% |
| | 329 | 5 | 0.268 | 6.700 | 0.9998 | 0.2217 | 0.0149 | 0.135 | 0.448 | 0.180 | 0.470% |
| | d(348) | 6 | 0.536 | 13.400 | 0.9999 | 0.0086 | 0.0013 | 0.252 | 0.838 | 0.302 | 0.861% |

Gráfica 3
Curvas de Calibración de Absorbancia



V.4.b Límite de Detección y Cuantificación

También, en la tabla 3 se muestran los límites de detección (LD) y límites de cuantificación (LC) obtenidos para cada intervalo lineal. Estos valores se obtuvieron a partir de las curvas de calibración correspondientes de acuerdo al siguiente procedimiento [18]:

En términos generales, se puede describir el límite de detección de un analito como aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento

significativamente diferente de la señal de una muestra en “blanco” o “señal de fondo”. Recientes recomendaciones de organismos públicos sugieren que el criterio debería de ser:

$$y - y_B = 3S_B \quad (A)$$

El término y corresponde a la respuesta calculada para determinar el límite de detección; y_B es la ordenada al origen y el dato estadístico S_B corresponde a la desviación estándar de los residuos de y , el cual se calcula de la siguiente forma:

$$S_B = S_{y/x} = \left\{ \frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2} \right\}^{1/2} \quad (B)$$

Se comprueba que esta ecuación utiliza los residuos de y , $y_i - \hat{y}_i$ donde los valores \hat{y}_i son los puntos sobre la recta de regresión calculada, correspondientes a los valores individuales de x es decir, los valores de y “ajustados”. El valor de \hat{y} para un valor de x dado se calcula rápidamente a partir de la ecuación de regresión. La forma de la ecuación es similar a la de la ecuación de la desviación estándar de una serie de mediciones repetidas pero difiere en que las desviaciones $(y_i - \tilde{y})$ son sustituidas por los residuos $(y_i - \hat{y}_i)$ y el denominador contiene el término $(n-2)$ en vez de $(n-1)$. En un cálculo de regresión lineal el número de grados de libertad es $(n-2)$. Esto refleja el hecho obvio de que para representar una línea recta sólo se necesitan dos puntos.

Una vez despejado y calculado el valor para el término y a partir de la ecuación A se utiliza la recta de regresión para calcular la concentración (x) correspondiente al límite de detección.

Para el cálculo del Límite de Cuantificación (LC) se realiza el mismo procedimiento antes descrito con la única variante que se utiliza 10 veces el valor de S_B en lugar de 3 veces.

Los valores obtenidos de Límite de Detección para cada curva de calibración determinan el punto a partir del cual se puede realizar una medición con la certeza de que no se está midiendo el blanco; sin embargo todos estos puntos se encuentran por debajo del límite inferior de cada curva.

El valor LC-LI descrito en la tabla representa la diferencia entre el primer punto de la curva y el límite de cuantificación. Así, para poder tener una confiabilidad mayor al 95 % en las concentraciones de cada analito estudiado es necesario medir disoluciones cuyas concentraciones se encuentren por encima del límite de cuantificación (LC). En el caso de los extractos de vainilla las concentraciones de los dos analitos son muy grandes, por lo que la dilución se realizó de tal forma que la concentración a medir estuviera por encima del valor del LC y lo más próxima al nivel central de la curva de calibración para tener la mayor precisión.

V.4.c Precisión

De igual forma en la Tabla 3 se presenta la precisión (expresada como desviación estándar relativa: $DER = s/X * 100$; donde s es la desviación estándar de las concentraciones de las siete mediciones y X es la media aritmética de esas mediciones). El cálculo de la precisión para cada curva de calibración consistió en la preparación de siete disoluciones estándar con el analito de interés con una concentración similar a la media del intervalo de concentraciones de la curva de calibración correspondiente. Por ejemplo, para el caso de la vainillina a 348 nm el intervalo de concentración es de 0.75 a 13.16 mg/L; por lo tanto la concentración utilizada fue aproximadamente de 6 ppm. Cada una de las siete disoluciones se midió por triplicado a la longitud de onda correspondiente

para obtener el valor de absorbancia o 1ª derivada según corresponda. El promedio de cada triplete se utilizó para determinar la concentración mediante la adecuada curva de calibración. Estos resultados se presentan en la Tabla 3 donde la DER es menor al 1 % en todos los casos, lo que indica una muy buena precisión para la medición independiente de cada analito aun con la primera derivada a pesar de tener la menor sensibilidad; cualidad que puede observarse por el valor tan pequeño de la pendiente.

V.5 Determinación de Vainillina y PHB

V.5.a Método de Vierordt o Aditividades de Absorbancias

Como se describe en el capítulo de Metodología con este método se generaron cuatro curvas de calibración. Con estas expresiones se generó un sistema de dos ecuaciones con dos incógnitas mediante la combinación lineal de las curvas de calibración de los compuestos de estudio a la misma longitud de onda, tal como se explicó en los antecedentes. El sistema de ecuaciones obtenido es el siguiente:

$$A_{348} = \xi_{PHB @ 348} C_{PHB} + \xi_{V @ 348} C_V$$

$$A_{329} = \xi_{PHB @ 329} C_{PHB} + \xi_{V @ 329} C_V$$

Los valores de las absorptividades (ξ) se reflejan en la Tabla 3 y corresponden a las pendientes (m) de cada curva de calibración. Así las ecuaciones finales fueron para la cuantificación de vainillina y PHB fueron:

$$A_{348} = 0.1024C_{PHB} + 0.1655 C_V$$

$$A_{329} = 0.2216C_{PHB} + 0.1086C_V$$

donde A_{348} y A_{329} son las absorbancias medidas a 348 y 329 nm, respectivamente.

Se puede observar que en este caso tratamos con un sistema de ecuaciones por lo que para conocer las concentraciones de los analitos es necesario determinar las absorbancias de ambos analitos a las dos longitudes de onda.

V.5.b Método de la Primera Derivada

La concentración de un analito por este método se determina mediante la medición de la primera derivada a la longitud de onda correspondiente y sustituyendo en la respectiva curva de calibración. En la Tabla 3 se muestran las curvas de calibración obtenidas para cada analito. Así, para determinar la concentración de PHB se utiliza la curva de la primera derivada obtenida a 348 nm y para cuantificar vainillina la curva de la derivada a 329 nm.

V.6 Análisis de Mezclas de Vainillina – PHB para Seleccionar el Método de Cuantificación

En los extractos de vainilla se encuentran tanto la vainillina como el PHB en disolución por lo que se determinó el grado de confiabilidad y precisión con la que se pueden cuantificar los analitos con cada uno de los métodos de cuantificación analizados. Con este fin, fue necesario preparar disoluciones estándar con ambos compuestos y se utilizaron diferentes proporciones vainillina / PHB. En la Tabla 5 se muestran los resultados para las diferentes proporciones.

Tabla 5
Mezclas Sintéticas

| Vainillina/PHB | Aditividad Absorptividades | | | | Primera Derivada | | | |
|----------------|----------------------------|-------|------------------|-------|-------------------------|-------|------------------|--------|
| | Valores Teóricos [mg/L] | | Recuperación [%] | | Valores Teóricos [mg/L] | | Recuperación [%] | |
| | Vainillina | PHB | Vainillina | PHB | Vainillina | PHB | Vainillina | PHB |
| 2/1 | 1.990 | 1.100 | 102.5% | 96.2% | 1.990 | 1.100 | 100.7% | 96.1% |
| 5/1 | 5.970 | 1.100 | 102.1% | 93.9% | 5.970 | 1.100 | 103.0% | 123.8% |
| 6/1 | 5.970 | 0.960 | 102.4% | 91.6% | 5.970 | 0.960 | 103.0% | 125.4% |
| 10/1 | 9.950 | 0.960 | 99.4% | 94.6% | 9.950 | 0.960 | 98.7% | 74.2% |
| 20/1 | 9.950 | 0.550 | 101.3% | 48.3% | 9.950 | 0.550 | 100.5% | 154.2% |

El método de Vierordt es mucho más preciso para determinar ambos compuestos ya que los errores son menores al 9% hasta proporciones de vainillina/PHB de 10 a 1 siendo esta última la que mejores resultados proporciona. En los extractos de vainilla natural esta relación es la que se encuentra aproximadamente, pudiendo variar hasta una proporción de 14 a 1, según la especie de vainilla utilizada. Con esta información se realizó la medición por el método de Vierordt para una proporción 15:1 donde los resultados mostraron un error menor al 5 % para PHB y del 2 % para vainillina.

Con el método de la 1ª derivada el error en la medición de PHB es mayor al 20% en casi todos los casos. Esto nos dice que en presencia de vainillina la determinación de PHB tiene muy poca precisión.

Por lo tanto entre los dos métodos el método de Vierordt es mejor para cuantificar disoluciones en donde se encuentren los 2 analitos. Así mismo, este método es una excelente opción para usarse en la determinación de vainillina y PHB en extractos naturales o para determinar exclusivamente vainillina en disolución. Por lo tanto, se utilizó este método para la cuantificación de vainillina y PHB de los extractos obtenidos por maceración y por microondas focalizadas.

V.7 Estudio de Optimización para el Método de Extracción Propuesto: Extracción Asistida con Microondas Focalizadas (EAMF)

La optimización de este proceso se llevó a cabo utilizando vainilla comercial y se realizó mediante un diseño factorial 2^4 con el fin de optimizar el tiempo de irradiación, tiempo de no irradiación, potencia y concentración de etanol como parámetros de estudio. El propósito principal fue obtener la mayor cantidad de vainillina en los extractos de vainilla. Para la optimización de estas variables se utilizó la vainillina como parámetro de medición para simplificar el estudio y debido a que es el compuesto que se encuentra en mayor concentración en los extractos de vainilla. Para su medición se utilizó el método descrito por la AOAC.

V.7.a Experimentos Preliminares

Para realizar el ensayo factorial fue necesario determinar el intervalo de estudio mediante la realización de experimentos previos. Con esto se logró establecer el valor superior e inferior para cada una de las variables de estudio. La metodología utilizada consistió en fijar tres de los parámetros y variar el cuarto. Aproximadamente 10 extractos diferentes se utilizaron para este paso de la optimización.

Tabla 6
Experimentos Preliminares para la Optimización de EAMF

| Variable | Unidades | Intervalo de Estudio | | Intervalo Optimo Cualitativo | |
|---------------------------|--------------|----------------------|-------------|------------------------------|-------------|
| | | Limite Inf. | Limite Sup. | Limite Inf. | Limite Sup. |
| Potencia | [%] | 20 | 70 | 20 | 50 |
| Tiempo Irradiación | [1min/ciclo] | 5 | 20 | 5 | 20 |
| Tiempo Descanso | [min] | 0 | 5 | 3 | 5 |
| Concentracion EtOH | [%V/V] | 40 | 80 | 50 | 70 |

Los resultados generales se muestran en la Tabla 6 donde se ve que hubo cambios en los límites superiores para la potencia y la concentración de EtOH. Cuando se utilizaba más del 50% de la potencia se observaba ebullición del extracto y en algunos casos proyecciones del mismo. A pesar de tener un refrigerante adaptado, estas proyecciones provocaban que se quedaran trozos de vainilla adheridos a las paredes del tubo, por lo que la cantidad introducida originalmente en el sistema variaba. Para el caso de la concentración de EtOH se decidió fijar el límite superior en 70% debido a que no existía diferencia aparente en la extracción de vainillina con el uso de un 10% más de alcohol. También se observó que a concentraciones mayores a 70% precipitaban ceras y resinas, las cuales se observaban como una capa blanca y nebulosa. Por otra parte, con tiempos de irradiación por arriba de 20 ciclos no existía un cambio significativo en la concentración de vainillina. Contrariamente, para tiempos de descanso altos había una disminución en la concentración de vainillina ya que el

intervalo entre los ciclos de irradiación era muy largo. El único límite inferior que cambio significativamente es el tiempo de descanso y se debe a que se presentan proyecciones en el sistema cuando el descanso es muy corto. El fenómeno de proyección también se presentó cuando el tiempo de irradiación era mayor a un minuto, razón por la cual se estableció esta variable como ciclos de 1 minuto de irradiación.

V.7.b Estudio Factorial 2⁴

Con los resultados anteriores se realizó el estudio factorial. Se utilizó Statgraphics Plus 2.1 para Windows como herramienta estadística para elaborar este estudio y posteriormente el análisis de varianza. El modelo experimental consistió de cuatro factores de entrada y uno de salida. Los cuatro factores corresponden a las variables antes descritas y el factor de salida es la absorbancia o la concentración calculada. Se eligieron cuatro puntos centrales con el fin de determinar la precisión del método vía un análisis de varianza.

Al introducir los parámetros, el programa determinó 20 experimentos definiendo los 4 parámetros de entrada para cada experimento y el orden en el que deben llevarse a cabo aleatoriamente. En la siguiente tabla se muestra el orden en el que Statgraphics definió los experimentos. De los 20 experimentos, 16 corresponden al estudio de los máximos y los mínimos y los otros cuatro, experimentos 11, 15, 16 y 17 a los puntos centrales del sistema. Estos experimentos se llevaron a cabo en un periodo de dos días con el fin de tener un ambiente relativamente constante en las condiciones de experimentación.

Tabla 7
Experimentos Diseño Factorial

| Experimento | Potencia | Concentración EtOH | Ciclos Irradiación | Tiempo Descanso |
|-------------|----------|--------------------|--------------------|-----------------|
| | [W] | [% V/V] | [1min/ciclo] | [min] |
| 1 | 150 | 50 | 20 | 3 |
| 2 | 60 | 70 | 20 | 5 |
| 3 | 60 | 50 | 5 | 5 |
| 4 | 150 | 70 | 5 | 3 |
| 5 | 150 | 50 | 5 | 3 |
| 6 | 60 | 50 | 20 | 5 |
| 7 | 150 | 70 | 5 | 5 |
| 8 | 150 | 70 | 20 | 5 |
| 9 | 150 | 50 | 5 | 5 |
| 10 | 60 | 50 | 20 | 3 |
| 11 | 105 | 60 | 13 | 4 |
| 12 | 60 | 70 | 20 | 3 |
| 13 | 60 | 50 | 5 | 3 |
| 14 | 60 | 70 | 5 | 3 |
| 15 | 105 | 60 | 13 | 4 |
| 16 | 105 | 60 | 13 | 4 |
| 17 | 105 | 60 | 13 | 4 |
| 18 | 150 | 70 | 20 | 3 |
| 19 | 150 | 50 | 20 | 5 |
| 20 | 60 | 70 | 5 | 5 |

En la tabla 8 se presentan los 16 experimentos necesarios para encontrar los parámetros que maximizan el % de recuperación de vainillina respecto al peso de las vainas de vainilla. La mayor recuperación fue de 2.38% y se dio cuando 150 W, 70%, 20 ciclos y 3 min se utilizaron para los parámetros de Potencia, Concentración EtOH, Ciclos Irradiación y tiempo de no irradiación, respectivamente. Estos parámetros corresponden al 18^{vo} experimento de la Tabla 7,

Tabla 8
Resultados del Diseño Factorial expresado en % de Recuperación de Vainillina

| | 60 W | | | | 150 W | | | |
|-------|----------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|
| | 50% | | 70% | | 50% | | 70% | |
| | 5 ciclos | 20 ciclos |
| 3 min | 0.65 | 1.54 | 0.20 | 1.58 | 1.12 | 1.80 | 1.07 | 2.38 |
| 5 min | 0.49 | 1.34 | 0.41 | 1.29 | 1.21 | 2.29 | 1.26 | 1.30 |

V.7.c Análisis de Varianza (ANOVA)

Con el fin de determinar la confiabilidad y la influencia de los parámetros de estudio sobre el diseño experimental se realizó el análisis de varianza. En la Tabla 9 se muestran los resultados para realizar el ANOVA. En nuestro caso para determinar el error del diseño experimental se utilizan 9 experimentos que corresponden a las interacciones de tercer y cuarto orden, y los cuatro puntos centrales. Con lo anterior se obtiene el valor F para un grado de confianza del 5 % igual a 5.12. Este valor determina el limite en el cual podemos establecer con un 95% de confianza que una variable es significativa en el diseño experimental. El tiempo de irradiación y la potencia son las únicas variables significativas en el proceso de extracción. De estas dos variables el tiempo de irradiación es la variable más influyente en el proceso.

Tabla 9
Análisis de Varianza

| Variable | Suma Cuadrados | GL | F-Ratio | P-Value |
|------------------------------|----------------|-----------|---------|---------|
| A: Potencia | 0.71225 | 1 | 7.57 | 0.0224 |
| B: Conc. EtOH | 0.02462 | 1 | 0.26 | 0.6213 |
| C: Tiempo Irradiacion | 1.58143 | 1 | 16.81 | 0.0027 |
| D: Tiempo Descanso | 0.01667 | 1 | 0.18 | 0.6837 |
| AB | 0.00010 | 1 | 0.00 | 0.9743 |
| AC | 0.01980 | 1 | 0.21 | 0.6573 |
| AD | 0.00001 | 1 | 0.00 | 0.9903 |
| BC | 0.00107 | 1 | 0.01 | 0.9173 |
| BD | 0.03683 | 1 | 0.39 | 0.5471 |
| CD | 0.05753 | 1 | 0.61 | 0.4543 |
| Total Error | 0.84670 | 9 | | |
| Total (corr.) | 3.29701 | 19 | | |

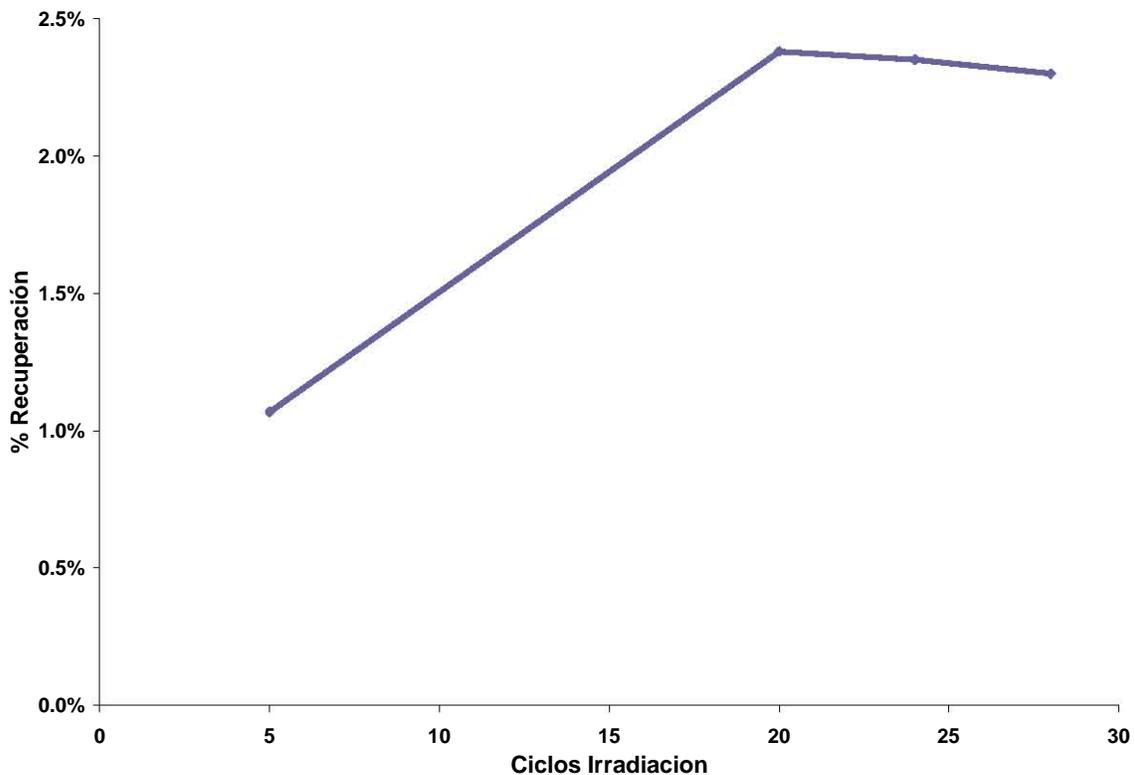
$$F_{0.05, 1,9} = 5.12$$

La concentración de EtOH y el tiempo de descanso no representan, estadísticamente, influencia alguna en el intervalo de estudio. Sin embargo, la concentración de vainillina extraída aumentó al utilizar el máximo valor de

concentración de etanol y el menor tiempo de descanso. Por lo tanto, para subsecuentes experimentos se utilizaron como constantes.

Una vez teniendo los parámetros óptimos se realizaron dos experimentos adicionales variando únicamente el número ciclos de irradiación. Sobre el parámetro de potencia no se realizó ningún experimento adicional debido a que en los experimentos previos se presentó proyección en el sistema a valores mayores. En la gráfica 4 se representan los experimentos 4, 18 y los adicionales, observándose que al aumentar significativamente el número de ciclos no se aprecia un aumento en el porcentaje de recuperación de vainillina.

Gráfica 4
% de Recuperación de vainillina respecto al número de Ciclos de Irradiación



Por todo lo anterior los parámetros óptimos para el proceso de Extracción Asistida con Microondas Focalizadas (EAMF) son: Número de ciclos: 20 ciclos (20 minutos de tiempo de irradiación), Potencia al 50%, EtOH al 70% y tiempo de no irradiación entre cada ciclo de 3 minutos. El tiempo total de extracción fue de 80 minutos.

V.8 Aplicación de los Métodos de Extracción a las Muestras de Vainilla

El objetivo primordial de este estudio fue obtener la mayor cantidad de vainillina y PHB y los valores óptimos de los parámetros de estudio que cumplan con este propósito. Por lo anterior se trataron las vainas de vainilla por dos métodos diferentes con el fin de determinar si la humedad contenida en las mismas influye en la extracción. La Tabla 10 muestra los resultados para cada tipo de vainilla utilizado en las extracciones por maceración y EAMF.

Tabla 10
Diferentes tipos de vainilla

| Metodo Extraccion | Tipo Vainilla | mg vainillina /kg vainilla | mg PHB /kg vainilla |
|---------------------------------------|----------------------|---------------------------------------|--------------------------------|
| <i>EAMF</i> | Comercial | 23,056 | 2,815 |
| | Seca | 18,650 | 2,685 |
| | Liofilizada | 22,114 | 3,094 |
| <i>Método Convencional</i> | Comercial | 11,481 | 1,278 |
| | Seca | 7,032 | 1,025 |
| | Liofilizada | 10,993 | 1,254 |

Para ambos métodos de extracción se observa que la extracción de vainillina es considerablemente más baja para la vainilla seca. Esto se debe a la posible degradación de compuestos o pérdida de compuestos volátiles debido a las altas temperaturas. Al comparar los resultados de la vainilla liofilizada contra la estándar no se encuentran diferencias significativas por lo que se puede concluir que la humedad contenida en las vainas no es un factor que afecte el proceso de

extracción. En esta tabla también se observa con claridad que la concentración de vainillina y PHB en los extractos obtenidos por microondas focalizadas es mucho mayor que cuando se hace solo por maceración. Hay un aumento de la eficiencia de extracción entre 50-65 % para todas las muestras analizadas independientemente del tratamiento de las vainas.

V.9 Adiciones de Vainillina y PHB

Con el fin de comprobar la ausencia de interferencias en la detección y en los procesos de extracción se añadieron concentraciones conocidas de vainillina y PHB al inicio del proceso de extracción. El procedimiento que se realizó fue preparar una solución de vainillina y otra de PHB lo suficientemente concentradas, de tal forma que el volumen agregado fuera muy pequeño y no afectara el volumen total de extracto. La solución de vainillina se preparó disolviendo aproximadamente 1 g de compuesto en 50 mL de EtOH y diluyendo con agua hasta un volumen final de 100 mL (10,000 mg/L). De forma similar, la solución de PHB se preparó con 0.1 g de PHB, diluyendo en 5 mL de EtOH y diluyendo con agua hasta un aforo de 100 mL (1000 mg/L).

Se adicionó aproximadamente entre un 15 y 25 % de vainillina y PHB en exceso para el método convencional y entre un 8 y 12 % para el método propuesto. La base para el cálculo de estos valores fueron los resultados obtenidos para ambas extracciones a partir de vainilla comercial y mediante el método de Vierordt. Se realizaron 4 ensayos por cada método. A dos ensayos se les agregó 200 µL de cada solución y a las otras dos 300 µL.

En la Tabla 11 se muestran los resultados para cada proceso de extracción donde puede verse que en general el EAMF tiene resultados más precisos que el método propuesto a pesar de que la cantidad de vainillina y PHB añadida es mayor para este último.

Tabla 11
Adiciones Estándar

| Metodo Extraccion | Adición (µL) | Teorico (mg compuesto) | | Solución | Recuperación (%) | | | |
|-----------------------|--------------|------------------------|------|----------|------------------|--------|------|--------|
| | | Vainillina | PHB | | Vainillina | | PHB | |
| | | | | | (mg) | (%) | (mg) | (%) |
| <i>EAMF</i> | 200 | 25.07 | 3.02 | A | 24.75 | 98.7% | 3.55 | 117.3% |
| | | | | B | 25.24 | 100.7% | 3.13 | 103.6% |
| | 300 | 26.08 | 3.13 | C | 25.53 | 97.9% | 3.03 | 96.8% |
| | | | | D | 22.47 | 86.2% | 2.86 | 91.3% |
| <i>Metodo Oficial</i> | 200 | 13.50 | 1.49 | A | 12.65 | 93.7% | 1.40 | 93.8% |
| | | | | B | 11.60 | 86.0% | 1.32 | 88.5% |
| | 300 | 14.50 | 1.60 | C | 12.25 | 84.4% | 1.35 | 84.4% |
| | | | | D | 13.27 | 91.5% | 1.61 | 100.6% |

Los resultados muestran que se tienen más problemas de cuantificación en el método oficial debido probablemente a que existe mayor tiempo de extracción y a que se requiere mayor manipulación de la muestra, lo que ocasiona pérdida de los analitos [28].

VI. Conclusiones

- El método de Vierordt o aditividades de absorbancia permite la cuantificación precisa, rápida y simultánea de vainillina y PHB en extractos naturales de vainilla utilizando una hidrólisis alcalina muy simple. Por otra parte el método de primera derivada no permitió la cuantificación precisa de estos analitos de manera simultánea.
- Los resultados obtenidos prueban que el uso de energía en forma de microondas focalizadas aplicadas de forma apropiada a las vainas de vainilla, acelera el proceso de extracción de vainillina y PHB. El tiempo de proceso se redujo substancialmente de 3 ½ días a 80 minutos.
- Adicionalmente los pasos a seguir para el método de extracción propuesto son mucho más sencillos y no requiere de adiciones intermedias de reactivos. También, el proceso de EAMF es mucho más preciso, de 8.67% a 14.72% obtenido por el método presentado en la Norma Oficial.
- Los resultados también muestran que la extracción EAMF es una alternativa excelente para obtener un extracto de vainilla natural en un tiempo mucho más corto que los procesos actuales y oficiales. Este proceso acoplado con el método de detección seleccionado otorga un proceso fácil de realizar y de gran precisión para la determinación de vainillina y PHB en los extractos de vainilla natural.

VII. Bibliografía

- [1] Rao, S.R., Ravishanar, G.A.
Vanilla Flavour: production by conventional biotechnological routes.
J. Sci Food Agric 2000, 80, 289-304
- [2] Zepeda Pérez Maria Virginia Cleopatra,
Valoración de Vainillina en el extracto de vainilla por el método alcalino.
UNAM, 1980.
- [3] Merory, Joseph, Food Flavorings Composition, Manufacture and Use
The Avi Publishing Co.,Inc, Westport, Connecticut, 1960.
- [4] FAOSTAT, 2005
- [5] Walton, N.J., Mayer, M.J.; Narbad A.
Vanillin
Phytochemistry 2003, 63, 505-515.
- [6] Hartman, T.G., et all
Determination of Vanillin, Other Phenolic Compounds, and Flavors in Vanilla Beans
Am. Chem. Soc. Ser. 1992, 506, 61-76.
- [7] Ranadive, A.S.
Vanillin and Related Flavor Compounds in Vanilla Extracts Made from Beans of Various Global Origins.
J Agric. Food Chem 1992, 40, 1922-1924
- [8] Sostaric, T., Boyce,M.C., Spicket, E.E.
Analysis of the Volatile Components in Vanilla Extracts and Flavorings by Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography
J. Agric Food Chem 2000, 48, 5802-5807
- [9] Bacheet, E.Y.
Micro Determination of Eugenol, Thymol and Vanillin in Volatile Oils and Plants
Phytochemical Analysis 1998, 9, 134-140
- [10] Harris D.C., Análisis Químico Cuantitativo
Editorial Reverte, 2ª Edición, Barcelona 2001.
- [11] Hobart, W.H. et all, Métodos Instrumentales de Análisis,
Grupo Editorial Iberoamérica, 7ª Edición, México1988.

- [12] Boyce M.C., Haddad P.R., Sostaric T.
Determination of flavour components in natural vanilla extracts and synthetic flavourings by mixed micellar electrokinetic capillary chromatography.
Analytica Chimica Acta 2003, 485, 179-186
- [13] *Encyclopedia of Analytical Science*, Second Edition, 2005, Volumes 2 & 8
- [14] Kingston H.M., Haswell S.J., *Microwave Enhanced Chemistry*,
American Chemical Society, Washington DC, 1997.
- [15] Camel, V.
Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples.
Trends in Analytical Chem. 2000, 19-4, 229-248
- [16] Luque-García, J.L., Luque de Castro, M.D.
Where is microwave-based analytical equipment for solid sample pre-treatment going?
Trends in Analytical Chem. 2003, 22-2, 90-98
- [17] Bensaid, F.F., et al
Authentication of Natural Vanilla Flavorings: Isotopic Characterization Using Degradation of Vanillin into Guaiacol
J. Agric Food Chem. 2002, 50, 6271-6275
- [18] Miller, J.C., Miller, J.N.
Estadística para Química Analítica,
Segunda edición, Addison-Wesley Iberoamericana, 1993, capítulo 5.
- [19] Sparr E.C., Björklund, E.
Analytical-scale microwave-assisted extraction
J. Chromatogr. A, 2000, 902, 227-250
- [20] AOAC Official Method 7.003 Moisture in Animal Feed
- [21] AOAC Official Method 36.2.07 Vanillin in Vanilla Extract – Approximate Method
- [22] Anderson R.L., *Practical Statistics for Analytical Chemists*,
Van Nostrand Reinhold, New York 1987
- [23] Charalambous G., *Spices, Herbs and Edible Fungi*,
Elsevier Science, London, 1994,

[24] Herrmann, A., Stöckli, M.
Rapid Control of vanilla-containing products using high-performance liquid chromatography
J. Chromatogr. 1982, 246, 313-316

[25] Carnero-Ruiz C.
Derivative Spectrophotometric Determination of Vanillin and p-Hydroxybenzaldehyde in Vanilla Bean Extracts.
J. Agric Food Chem 1990, 38, 178-181

[26] The Merck Index
Thirteenth Edition, Merck & Co, WhiteHouse Station NJ, 2001

Artículo



Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Talanta 69 (2006) 882–887

Talanta

www.elsevier.com/locate/talanta

Focused microwaves-assisted extraction and simultaneous spectrophotometric determination of vanillin and *p*-hydroxybenzaldehyde from vanilla fragans

Arturo Longares-Patrón, M.P. Cañizares-Macías*

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM),
04510 México D.F., Mexico

Received 26 August 2005; received in revised form 9 November 2005; accepted 13 November 2005
Available online 13 December 2005

Abstract

A new method to quick extraction of vanillin and *p*-hydroxybenzaldehyde (PHB) of vanilla beans from vanilla fragans is proposed. Samples were irradiated with microwaves energy to accelerate the extraction process and photometric monitoring was performed at 348 and 329 nm (vanillin and PHB, respectively). The simultaneous determination of vanillin and PHB from extracts was performed using the Vierordt's method, which showed a precision, expressed as relative standard deviation, smaller 2.5% for both analytes. Conditions such as microwaves irradiation power, number of irradiation and non-irradiation cycles, irradiation time and ethanol concentration were optimized by means of multivariate screening that showed that irradiation power and number of irradiation cycles are the most significant condition in the vanilla extraction process. The focused microwave-assisted extraction (FMAE) was applied to commercial (dried vanilla beans from fresh green vanilla beans), lyophilised and dried (commercial vanilla dried at 135 °C in oven) vanilla beans samples. The results showed that the extraction of vanillin and PHB in the commercial vanilla samples were higher than in dried and lyophilised samples. With the proposed FMAE a decrease in the extraction time of 62 times and an increase in the vanillin and PHB concentrations between 40 and 50% with respect to the official Mexican extraction method, were obtained.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Focused-microwave extraction; Vanillin and *p*-hydroxybenzaldehyde; Spectrophotometric determination

1. Introduction

Vanilla plant is an orchid of Mexican origin. Aztecs of Mexico cultivated Vanilla, which was carried to Europe by the Spaniards after 1521 and is now cultivated in a several tropical countries: Mexico, Madagascar, Tahiti and Indonesia are the major producers. Vanillin, in fact, appears in trace amounts in other plants, including commercial products such as tobacco. However, the beans of the Vanilla orchid still remain the only commercial source of natural vanillin [1].

Numerous procedures of nurturing, harvesting and drying to produce vanilla beans are needed. From pollination, which is hand made, it can take up to two years to obtain a great quality product: 4 kg of fresh beans are necessary to obtain 1 kg of dried commercial beans. The source and cost of the vanilla varies

from expensive natural extracts from beans harvested from the vanilla orchid to relatively cheap synthetically produced vanillin. The natural extracts tend to be a complex mixture of 100–200 flavour components, many of which are present in trace amounts [2–4].

Nowadays, laboratories involved in vanilla analysis call for faster methods to analyze a large number of samples in a time as short as possible. Auxiliary energies such as microwaves can accelerate the extraction, thus shortening the analysis time. In fact, microwaves reduce substantially the required time for several process [5,6]. The use of microwaves in analysis includes the sample preparation for the analysis of flavours and off flavours in fish, cheese and olive oil [7] and sample digestion for elemental analysis [8], among others. So, microwaves-assisted extraction, which is known as more environmental-friendly process with economic advantages than the current extraction methods, has also been used for the extraction of biologically active compounds from different matrices [9–11]. The vanillin/*p*-hydroxybenzaldehyde ratio is a quality parameter of

* Corresponding author. Tel.: +52 55 56 22 37 88; fax: +52 55 56 22 37 23.
E-mail address: pilarm@servidor.unam.mx (M.P. Cañizares-Macías).

the vanilla extract and many methods have been used to determine both parameters: HPLC [12], capillary electrophoresis [13], micellar electrokinetic capillary chromatography [14], gas chromatography [15], etc. These methods are adequate when the aim is to determine several components from vanilla beans but for the analysis of only two components are very expensive and longer. So, Ruíz et al. [16] have developed a spectrophotometric method for the determination of vanillin and *p*-hydroxybenzaldehyde using derivative spectroscopy based on the interference-free character derivative amplitudes measured from an isodifferential point because the absorptions spectra are overlapped.

A extraction method assisted by microwaves energy to obtain a natural vanilla extract from vanilla beans for the determination of *p*-hydroxybenzaldehyde and vanillin was developed. The method was compared with the official Mexican method [17]. For both extraction method the determination of the analytes by absorption spectrophotometry using the Vierordt's method [18] was carried out. This method is based in the absorbencies measurement at maximum wavelength for each analyte and their quantification using a two equations system.

2. Experimental

2.1. Instrumentation

A Cary 3 UV–vis spectrophotometer (Sydney, Australia) equipped with a 1 cm quartz cell and a software to measure the hydrolysis of vanillin and PHB were used. A Microdigest 301 focused-microwave device of 300 W from Prolabo, France, as energy source to accelerate the extraction of vanillin and PHB from vanilla beans was used. An Explorer Ohaus balance with precision of 0.1 mg was also used. A LABCONCO Freeze Dryer 4.5 and a Precision Scientific Vacuum Pump with 1/2 HP for the samples lyophilization were used.

2.2. Reagents and solutions

Vanillin and *p*-hydroxybenzaldehyde were obtained from Sigma and stock solutions (100 µg/ml) were prepared by dissolving 0.01 g in 5 ml of absolute ethanol (Baker) and diluted with distilled water to a volume of 100 ml. Stock solutions were stored at 4 °C and used for a period of 1 week.

Standard solutions were obtained by taking suitable volumes of the stock solution, expected to contain between 0.2 and 20 µg/ml of vanillin or PHB or their binary mixture, were transferred into 100 ml volumetric flasks. Approximately 80 ml of water and 2 ml 0.1N NaOH (Baker) were added, mixing and diluting with water to the mark. Several mixtures of both compounds in that concentrations range were prepared.

2.3. Vanilla samples

Chopped commercial vanilla (*vanilla fragans*) beans (2 mm × 2 mm, approximately) from the region of Papantla, Veracruz, Mexico, to obtain vanilla extracts were used.

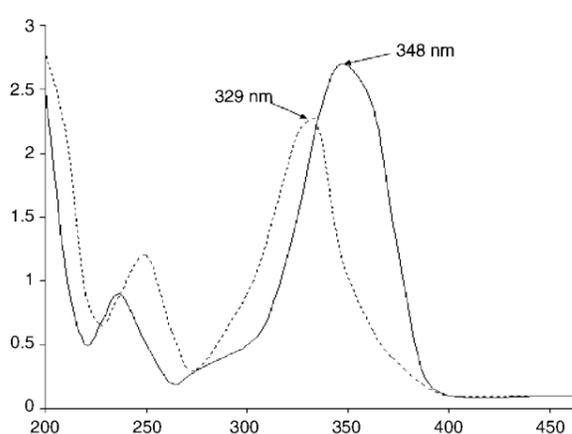


Fig. 1. Absorptions spectra of vanillin: 348 nm (—) and PHB, 329 nm (---).

2.4. Procedure

2.4.1. Spectrophotometric determination of vanillin and PHB

The vanillin and PHB were monitored in accordance with the maximum wavelengths for each compound, 348 and 329 nm, respectively. As the absorptions spectra of these compounds are overlapped, as is shown in Fig. 1, the Vierordt's method was evaluated for the quantification of vanillin and PHB from vanilla beans.

2.4.2. Vierordt's method

For the two studied compounds four calibration graphs were obtained. These graphs were done for each compound at 348 and 329 nm by varying the concentration of the analytes separately. The slope for each standard curve represents the molar absorptivity of the study compound at the fixed measurement wavelength. The vanillin and *p*-hydroxybenzaldehyde concentrations from vanilla beans by applying the additive principle yields two simultaneous equations, which were solved algebraically by substitution method.

2.4.3. AOAC method

The official method to determine vanillin is based in the hydrolysis of vanillin with NaOH and their measurement at 348 nm only. At this wavelength the PHB is interference and its value is not removed, so both analytes are measured. To compare the obtained results by the Vierordt's method the extracts were also measured using the AOAC method.

2.4.4. Vanilla beans samples treatment

The vanilla extracts were obtained using vanilla beans, which were treated in different ways: (a) *Dried vanilla beans*: stock commercial beans were dried following the next procedure: the oven was regulated at 135 ± 2 °C; 10 g of vanilla beans were weighted into each dish and shaken until contents were evenly distributed with covers removed, dishes were placed and covered in the oven as quickly as possible and the samples were dried for 2 h. The covers of the dishes were placed and transferred to the desiccator to cool. The sample was weighted and calcu-

Table 1
Statistical analysis of calibration curves for the determination of vanillin and PHB at 348 and 329 nm by Vierordt's method

| Compound | Wavelength | Linear range ($\mu\text{g ml}^{-1}$) | Regression coefficient | R.S.D. (%) | Slope |
|----------|------------|--|------------------------|------------|--------|
| Vanillin | 348 | 0.75–13.2 | 0.9998 | 0.58 | 0.1655 |
| | 329 | 0.3–13.2 | 0.9999 | 0.49 | 0.1086 |
| PHB | 348 | 0.3–13.4 | 0.9998 | 0.70 | 0.1024 |
| | 329 | 0.3–6.7 | 0.9998 | 0.44 | 0.2216 |

lated the loss in weigh as water. (b) *Lyophilized vanilla beans*: 10 g of vanilla beans were placed in a lyophilization tube; liquid nitrogen was added and the tube placed in the freeze dryer for a period of 4 h at pressure of 5 μmHg . (c) *Commercial beans*: these beans were not treated and were analyzed directly using the different extraction methods.

2.5. Extraction from vanilla beans

Two kinds of extraction were evaluated to extract vanillin and PHB from vanilla beans:

- (1) *Mexican official method*: This method was carried out in accordance with the Mexican Official Norm (NMX-FF-074-1996-SCFI). One gram of vanilla beans was poured in a 10 ml volumetric flask covered with 2 ml of ethanol and 1 ml of water. The solution was macerated for 12 h. Two milliliters of ethanol were added mixing well all the content. Maceration continued for 3 days. The solution was drained funnel dry, packing solids firmly and percolating slowly with a 50% ethanol solution until reaching a final volume of 10 ml.
- (2) *Proposed focused microwave procedure*: One gram of vanilla beans was poured into a 10-cm test tube, which was placed into a water bath. Twenty-five milliliters of a 70% (v/v) ethanol–water solution were added to the sample. A refrigerant was adapted to the test tube to avoid loss of the extractant and a 150 W microwaves irradiation power was applied to the sample. Monitoring of vanillin and PHB was carried out after application of twenty cycles of 1 min irradiation each one with a delay time between them of 3 min.

2.5.1. Treatment of the *Vanilla fragans* extracts to measure vanillin and PHB

One milliliter of vanilla extract was poured into 100 ml volumetric flask. 80 ml of water and 2 ml 0.1N NaOH were added, mixing and diluting to the mark with distilled water. The extracts were monitored at 348 and 329 nm.

3. Results and discussion

3.1. Determination of molar absorptivities of vanillin and PHB at 329 and 348 nm

The Vierordt's method allows to calculate the concentration of two analytes when their absorption spectras exhibit overlap-

ping of the spectral bands. Fig. 1 shows the absorption spectras of vanillin and PHB. At 348 and 329 nm is showed that the spectral bands are overlapped.

To calculate molar absorptivities, standards of each compound were prepared in a range of 0.2–20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and they were monitored at 329 and 348 nm and thus the calibration graphs were constructed where the slope of each graph is equivalent to molar absorptivity for each studied wavelength. The linear ranges for each compound at studied wavelengths are shown in Table 1.

In accordance with the obtained graphs the equations system used for the quantification of vanillin and PBH in vanilla samples was the next:

$$A_{348} = 0.1024C_{\text{PHB}} + 0.1655C_{\text{V}} \quad (1)$$

$$A_{329} = 0.2216C_{\text{PHB}} + 0.1086C_{\text{V}} \quad (2)$$

where A_{348} and A_{329} are measured absorbances at 348 and 329 nm. C_{PHB} and C_{V} are PHB and vanillin concentrations, respectively.

This equation system was solved algebraically by substitution of the Eq. (1) in Eq. (2) of C_{V} or C_{PHB} . The precision, expressed as relative standard deviation, was evaluated for both analytes to the studied wavelengths with excellent results (less than 1%). These results are also shown in Table 1.

3.2. Analysis of vanillin and PHB mixtures using Vierordt's method

Working mixtures were prepared by dissolving the appropriate amounts of the vanillin and PHB standards. The different concentrations were selected considering the real ratio between both analytes in the vanilla beans (10:1) as well as higher and smaller ratios. The concentrations were calculated using the Eqs. (1) and (2). The mean recovery percentage expressed as percentage of the contents resulting from average of three determinations for each synthetic mixtures are shown in Table 2. The obtained recoveries are up to 96% when the vanillin/PHB ratio is lower than 20:1 but when the vanillin/PHB ratio is 20:1 the error in the PHB concentration value is up to 50%, although this ratio is not normal in vanilla beans. So, to determine vanillin and PHB from natural vanilla extracts (obtained from focused-microwave energy and official method) was decided to use the Vierordt's method because generally the ratio between vanillin and PHB is 10:1 and the selected method has an excellent recovery for both analytes to this ratio.

Table 2
Resolution of synthetic mixtures vanillin and PHB by using the Vierordt's method

| Ratio (vanillin/PHB) | Theoretical ($\mu\text{g ml}^{-1}$) | | Vierordt's method | | | |
|----------------------|---------------------------------------|------|---------------------------------|-------------------|---------------------------------|-------------------|
| | Vanillin | PHB | Vanillin | | PHB | |
| | | | Found ($\mu\text{g ml}^{-1}$) | Recovery (%) | Found ($\mu\text{g ml}^{-1}$) | Recovery (%) |
| 2/1 | 1.99 | 1.1 | 2.04 | 102.51 \pm 0.65 | 1.06 | 97.36 \pm 0.58 |
| 5/1 | 5.97 | 1.1 | 6.10 | 102.17 \pm 0.43 | 1.07 | 97.27 \pm 0.66 |
| 10/1 | 9.95 | 0.96 | 9.89 | 99.40 \pm 0.65 | 0.93 | 96.87 \pm 0.61 |
| 15/1 | 10.0 | 0.66 | 9.84 | 98.40 \pm 0.50 | 0.69 | 104.50 \pm 0.48 |
| 20/1 | 9.95 | 0.55 | 10.08 | 101.31 \pm 0.42 | 0.27 | 49.09 \pm 0.50 |

3.3. Optimization of the focused microwave-assisted extraction (FMAE)

3.3.1. Multivariate optimization

Commercial vanilla beans were used to optimize the variables affecting the process of extraction by focused-microwave. The studied variables were: microwave irradiation power, non-irradiation time, ethanol concentration and microwave irradiation time, which is directly connected with the number of cycles. For the optimization of the microwaves parameters was only measured the vanillin concentration at 348 nm to simplify the calculation.

A screening study of the behaviour of the main variables affecting the extraction efficiency was performed by means of the experimental design methodology [Statgraphics Plus for Windows v 2.1, Rockville, MD, 1992]. A central design based on a two-level-full-factorial design was selected, on the basis of the low number of variable to be studied. A full factorial design was built for the screening study to determine the behaviour of the main variables which affect the microwaves-assisted acceleration of extraction power. Table 3 shows the upper and lower values given to each factor. Such values were selected from the available data and experience gathered in the preliminary experiments. The irradiation time was established at 1 min/cycle because higher time of continuous irradiation caused overheating in the ethanol solution and so ethanol and water spray as result. Thus the screening study was carried out considering 1 min of irradiation time per cycle, so that the studied parameter was number of cycles instead of irradiation time.

Analysis of variance (ANOVA) and the estimated effects on the extraction were performed on the design to assess the significance of the model. The conclusion was that the number of cycles (total irradiation time) and irradiation power were the most influential factors on the extraction efficiency. The ethanol

concentration and non-irradiation time were not statistically significant factors under the tested ranges. However, the vanillin concentrations improved when the value of the ethanol concentration was highest and the non-irradiation time was the lowest. Thus, for subsequent experiments values of 70% ethanol and 3 min non-irradiation time were used. The number of cycles and irradiation power had a positive effect, so higher values should also be tested. The increase in the irradiation power (upper at 150 W) caused water spray from water bath and a higher number of cycles (upper at 20 cycles) did not increase the extraction of vanillin from vanilla beans significantly. So the optimal values for these two parameters were: irradiation power; 150 W and number of cycles, 20 of one min. With these conditions the total extraction time was of 70 min.

3.3.2. Application of focused microwaves-assisted extraction in vanilla beans

A comparative study was performed between the proposed extraction method and Mexican Official method using different samples of vanilla beans: dried, lyophilized and commercial. All samples were extracted for both methods and the vanillin and PHB concentrations were calculated using the Vierordt's method. The extractions were done in triplicate for each kind of sample. In the same way these samples were analyzed by the AOAC method for the determination of vanillin [19] to probe the advantages of using the Vierordt's method. In AOAC method the measurement is carried out at 348 nm only, so the PHB is a positive interference and is not possible to quantificate it. The mean results are summarized in Table 4 and they show that the obtained values for vanillin by the AOAC method are higher than those obtained using the Vierordt's method, it is because the PHB increases the absorbance value at 348 nm.

To compare the obtained results between the AOAC method and the Vierordt's method a *t*-test analysis was carried out. H_0 is

Table 3
Experimental values tested for the optimisation of the FMAE process

| | Irradiation power (W) | Number of cycles ^a | Non-irradiation time (min) | Ethanol concentration (%) |
|------------------|-----------------------|-------------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Screening design | | | | |
| Upper value | 150 | 20 | 6 | 70 |
| Lowest value | 60 | 5 | 3 | 40 |
| Optimal values | 150 | 20 | 3 | 70 |

^a The irradiation time was 1 min/cycle.

Table 4
Obtained concentration of vanillin and PHB in vanilla beans extracts obtained using the proposed FMAE and the Mexican official method extraction

| Extraction method ^a | Vanilla sample | Vanillin (mg g ⁻¹ vanilla beans) | | PHB (mg g ⁻¹ vanilla beans) |
|--------------------------------|--------------------|---|--------------|--|
| | | A | B | |
| FMAE | Dried ^b | 18.65 ± 0.45 | 21.36 ± 0.42 | 2.68 ± 0.067 |
| | Lyophilized | 22.11 ± 0.71 | 25.36 ± 0.63 | 2.81 ± 0.073 |
| | Commercial | 23.06 ± 0.46 | 25.96 ± 0.60 | 3.09 ± 0.071 |
| Official method | Dried ^b | 7.03 ± 0.25 | 8.10 ± 0.16 | 1.02 ± 0.032 |
| | Lyophilized | 10.99 ± 0.26 | 12.00 ± 0.36 | 1.25 ± 0.041 |
| | Commercial | 11.48 ± 0.31 | 12.82 ± 0.32 | 1.28 ± 0.038 |

^a Test in triplicate.

^b Commercial beans dried at 135 °C; A = Vierordt's method; B = AOAC method.

the obtained vanillin concentration by AOAC method is the same that the obtained by the sum of the concentrations of vanillin and PHB using the Vierordt's method, so $\mu_d = 0$. The *t*-statistic calculated was: $t = d(n)^{1/2}/s_d$, where *d* and *s_d* are the media and standard deviation respectively of *d*, which is the difference between the values of each couple, and *n* = 6. The number of liberty grades of *t* is *n* - 1.

The obtained *t_{experimental}* was 0.254 and the *t_{theoretical}* is 2.57 for a *P* = 0.05, so it is possible to conclude that the two methods are similar. Therefore the PHB interference has been effectively avoided by the application of the Vierordt's method and has been possible to quantificate both analytes.

The results also show that from dried vanilla, the extraction of vanillin and PHB is considerably smaller than from lyophilized and commercial vanilla, possibly because the temperature of dried caused the elimination of volatile compounds as vanillin and PHB. In this case, the loss of water was 16.8% with a precision, expressed as relative standard deviation, of 5.3%. The difference between the lyophilized and commercial vanilla is not significantly but the values are higher for the commercial one.

Table 4 also shows the excellent obtained results with the proposed method extraction (FMAE): an increase of 50 and 41% in the vanillin and PHB concentrations, respectively, with regard to official method were obtained. On the other hand, using the focused microwave energy the extraction time is only of 70 min and with the official method delays for 3 days.

3.3.3. Recovery assays

To evaluate the FMAE extraction procedure, a simulated natural vanilla mixed vanillin and PHB in a ratio 10/1, yellow-brown vegetal color (to obtain a similar color to the natural vanilla color), vanillic acid and *p*-hydroxybenzoic acid with concentration 10 times less at PHB concentration was prepared. Three aliquots were separately submitted to the FMAE extraction and analyzed by Vierordt's method. The results showed that a recovery percentage of 98.4 ± 3.2% for vanillin and of 97.5 ± 3.6% of PHB were obtained.

To assure that did not exist interferences by matrix effect, the FMAE extraction method was carried out adding known amounts of vanillin and PHB to the vanilla sample at the beginning of each extraction. Approximately a 10 and 20% of vanillin and PHB were added taking as a basis the concentration determined in the vanilla beans with Vierordt's method. The results

shown recoveries between 96.2 and 100.4% for vanillin and between 95.4 and 101.6% for PHB.

4. Conclusions

The obtained results prove that the application of focused-microwave energy to vanilla beans is appropriated for accelerating the extraction of vanillin and PHB from vanilla beans. The necessary time to obtain the vanilla extracts for the analysis of vanillin is substantially shorter (62 times) than the required by Mexican official method currently used in most laboratories for this analysis. In addition, the Vierordt's method allows the spectrophotometric determination of vanillin and PHB simultaneously from vanilla extracts with an excellent precision. With the proposed FMAE is possible to obtain a vanilla extract in shorter time to analyze vanillin and PHB, since these extracts had higher vanillin and PHB concentrations than that obtained by official method so the quality of the obtained extracts from FMAE is better. The results show that the proposed focused microwaves-assisted extraction method can be an excellent alternative to obtain a natural vanilla extract from vanilla beans in a shorter time than actually.

Acknowledgments

The Faculty of Chemistry of Autonomous National University of Mexico and the "Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, PAPIIT" (grant no. IN219401) of the Dirección General de Asuntos del Personal Académico are gratefully acknowledged for financial support.

References

- [1] H.P.S. Makkar, K.J. Beeker, *Agric. Food Chem.* 42 (1994) 731.
- [2] A.S. Renadive, in: G. Charalambous (Ed.), *Spices, Herbs and Edible Fungi*, Elsevier Science, London, 1994, pp. 14–28.
- [3] T.G. Hartman, K. Karmas, J. Chen, A. Shevade, M. Deagro, H.-I. Hwang, *Am. Chem. Soc. Ser.* 506 (1992) 61–76.
- [4] N.J. Walton, M.J. Mayer, A. Narbad, *Phytochemistry* 63 (2003) 505.
- [5] M. Erisson, A. Colmsjo, *J. Chromatogr. A* 877 (2000) 141.
- [6] J.L. Luque García, M.D. Luque de Castro, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 90.
- [7] J.L. Luque García, J. Velasco, M.D. Luque de Castro, *Food Chem.* 76 (2002) 241.
- [8] K.J. Lamble, S.J. Hill, *Analyst* 123 (1998) 103R.

- [9] K. Ganzler, A. Salgó, K. Valkó, *J. Chromatogr.* 371 (1986) 299.
- [10] C.S. Eskilsson, E. Bjöklund, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 227.
- [11] X. Pan, G. Niu, H. Liu, *Biochem. Eng. J.* 12 (2002) 71.
- [12] A.S. Renadive, *J. Agric. Food Chem.* 40 (1992) 1922.
- [13] U. Butehorn, J.U. Pyell, *Chromatogr. A* 736 (1996) 321.
- [14] M.C. Boyce, P.R. Haddad, T. Sostaric, *Anal. Chim. Acta* 485 (2003) 179.
- [15] T. Sostaric, M.C. Boyce, E.E.J. Spickett, *Agric. Food Chem.* 48 (2000) 5802.
- [16] C.C. Ruíz, A.H. Bayona, F.J. García Sánchez, *Agric. Food Chem.* 38 (1990) 178.
- [17] Norma Mexicana, NMX-FF-074-1996, Non industrialized products for human consumption – spices and condiment whole and fough – vanilla (*Vanilla fragans* Salisbury Ames or *Vanilla planifolia* Andrews) Specifications (1996) Secretaria de Comercio y Fomento Industrial.
- [18] S. Altinoz, S. Toptan, *J. Food Comp. Anal.* 16 (2003) 517.
- [19] AOAC Official Methods of Analysis, Chapter 36, 1995.