

24.108



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

**DETERMINACION DE CUMARINAS COMO
ADULTERANTES EN EXTRACTOS DE
VAINILLA Y EN ALGUNOS PRODUCTOS
ALIMENTICIOS COMERCIALES**

T E S I S

MARIA GUADALUPE ROMERO BENITEZ
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO



**EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA**

1 9 8 7



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 está 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.

I N D I C E

I	OBJETIVOS	1
II	HISTORIA	2
III	GENERALIDADES	5
	3.1 Descripción	5
	3.2 Clasificación Botánica	6
	3.3 Area geográfica de producción	7
IV	CULTIVO DE LA VAINILLA	11
	4.1 Cosecha	12
	4.2 Curado	14
V	EXTRACCION DE LA VAINILLA	15
	5.1 Calidad Comercial	16
	5.2 Composición de la vaina de vainilla .	18
	5.3 Características Fisicoquímicas	20
	5.4 Usos	21
VI	ADULTERACIONES DEL SABOR VAINILLA	24
	6.1 Aspectos toxicológicos de la Cumarina	26
VII	JUSTIFICACION	30
VIII	MATERIALES Y METODOS	31
	8.1 Preparación del Extracto de Vainilla.	31
	8.2 Extracción del Principio Sápido de Productos Comerciales	33
	8.3 % de Recuperación	35
	8.4 Espectrofotometría Visible	35
	8.5 Cromatografía en Capa Fina Uni y Bi- dimensional	37
	8.6 Interacción entre Dehidrecumarina y Cumarina	39

	8.7 Espectrofotometría Infrarroja y Resonancia Magnética Nuclear	40
IX	RESULTADOS Y DISCUSION	41
	• Extracción del principio sápid de Productos comerciales	41
	• % de Recuperación	41
	• Espectrofotometría Visible	43
	• Cromatografía en Capa Fina Uni y Bidimensional	45
	• Interacción entre Dehidrecumarina y Cumarina	50
	• Espectrofotometría Infrarroja y Resonancia Magnética Nuclear	50
	ANEXO	69
X	CONCLUSIONES	70
XI	BIBLIOGRAFIA	72

I OBJETIVOS

- Desarrollar técnicas analíticas que demuestren la presencia o ausencia de cumarina, en productos con sabor vainilla, a nivel de laboratorio de control de calidad en alimentos.
- Revisar la información reportada en la literatura, para verificar la confiabilidad analítica de técnicas previas.
- Analizar el papel que juegan posibles interferencias, en las determinaciones de cumarina en alimentos.
- Verificar, si la gran aromaticidad de los extractos de vainilla mexicanos, es atribuible a el contenido de cumarina o a la incorporación del extracto de haba tonka (*Dipteryx odorata* o *D. oppositifolia*).

II HISTORIA

Aún cuando no se tienen datos precisos sobre el origen de la vainilla, se asegura que es originaria de México, Honduras Británicas y Costa Rica. Mucho antes de la llegada de los españoles al continente americano, los indios utilizaban un fruto que al madurar, fermentar y curarse en el abundante sol, se transformaba en un producto deliciosamente aromático, era el "ejete de vainilla", fruto de una orquídea tropical. Los mayas de Yucatán, llamaban a la planta "zizbic" y los Totonacas la conocían como "tlilxéchtli"; que significa tlil= negro y xéchtli= flor (26). Llegó a llamarse "vainilla" que significa pequeñas tijeras, debido sin duda a la apariencia de la fruta cuando se abre después de haber madurado en la planta (5).

Es probable que los aztecas y sus antecesores utilizaron la vainilla durante muchos siglos. Los españoles encontraron que los aztecas empleaban ejetes de vainilla, delgados y largos, en muchos alimentos, pero en particular para enriquecer su bebida favorita que era el chocolate (Xoco-latl). En algunos casos se servían de ella para pagar tributo a sus monarcas (7).

Toda la vainilla consumida en esta época, provenía de plantas silvestres, por lo que se supone que llegó un tiempo, en que los indígenas vieron la necesidad de darle ciertas atenciones, con el objeto de abastecer su con

suno. De la Isla Reunión y de París fue llevada cierta cantidad de plantas a Madagascar en donde prosperaron notablemente (6,7). Los Tetenacas precursores de las plantaciones de vainilla, cuidaron de la planta y trataron de que ésta creciera en otra parte (14).

Fue plantada en la India y Java bajo las mismas condiciones que en México, obteniendo en realidad un bajo rendimiento (14).

Al aumentar la demanda de vainilla, otros países tropicales trataron de producirla, pero aunque las plantas crecían bien, no producían frutos. Más tarde se descubrió que la razón de la que estriba esto, es que los insectos polinizadores adecuados sólo se encuentran en México. No fue hasta 1836, que un botánico francés perfeccionó el método de la polinización a mano de las flores, método que se emplea en la actualidad (18).

A partir de este momento se establecieron muchas plantaciones de ésta orquídea en Java, Brasil, las Indias Occidentales, las Seychelles y Madagascar; en este último país se obtiene en la actualidad la mayor parte de la cosecha mundial de vainilla (18).

El método de polinización artificial consiste en obligar a las polinias de la antera de una flor a adherirse al estigma de la misma flor, situada inmediatamente debajo de la antera (Figura No. 1).

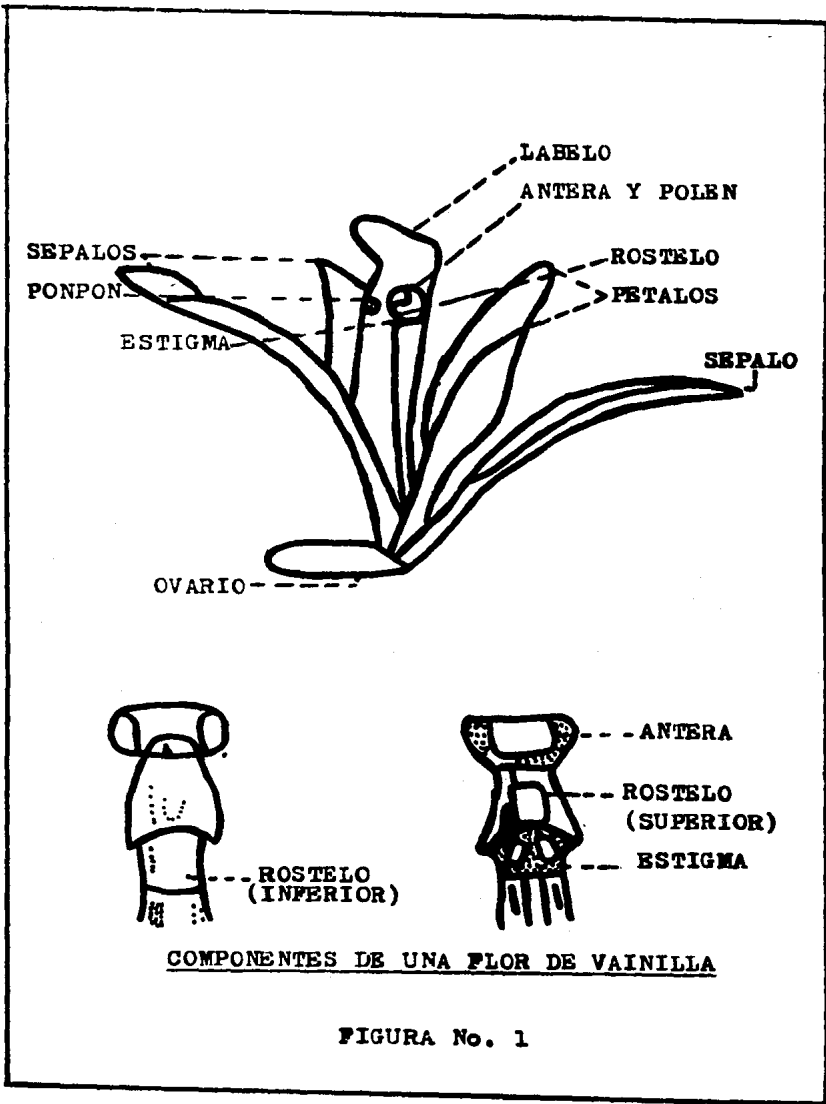


FIGURA No. 1

III GENERALIDADES

La planta de la vainilla es una orquídea trepadora exótica, de flores de color amarillo pálido y grandes hojas oblongas y carnosas. Sus delgados tallos trepan y se enrollan alrededor de los árboles. La vaina verde de la vainilla mide unos 25 cm de largo y contiene una gran cantidad de diminutas semillas. Originaria de América Central y México. Esta orquídea se cultiva actualmente en todas las regiones tropicales (18).

3.1 DESCRIPCION

La vainilla se conoce de diferentes maneras que son: Vainilla fina u officinal, vainas de vainilla, tlixóchitl (México), serimpineri (Perú). Al. Vanille. Fr. Vanille. Ing. Vanilla bean. Por. Vanilla baunilha. La vainilla se presenta en forma de cápsulas lineales, aplastadas de 12 a 35 cm de longitud y de 5 a 9 mm de anchura, con el extremo apical terminado en una cicatriz circular, adelgazándose gradualmente hacia ambos extremos, con la base muy semejante al ápice. Ocasionalmente la vainilla aparece abierta en tres partes, próximo a la punta; al exterior se presenta de color pardo oscuro o mediano, asurcada longitudinalmente, con un brillo húmedo característico; frecuentemente con marcas estrechas, elípticas o irregulares, algo arrugadas y de color pardo oscuro; ocasionalmente con una eflorescencia de cristales aciculares o prismas monoclinicos de vainillina; consistencia

coriácea blanda y flexible; unilocular, conteniendo una pulpa negra parduzca con muchas semillas diminutas, de color pardo negrusco, incrustadas en ellas. El olor es aromático característico y fragante y el sabor aromático agradable (39).

3.2 CLASIFICACION BOTANICA

Reino: Vegetal Phanerógamas
Clase: Angiospermas Monocotiledóneas
Familia: Orquidáceas
Tribu: Ofridias
Género: Vanilla

Las especies y variedades son las siguientes:

a) Vanilla planifolia Andrews.

Esta especie comprende aproximadamente el 95% de la cosecha mundial. Produce el más deliciosa aroma y saber. A esta especie corresponden las siguientes variedades:

Vainilla mansa e fina.- representativa de esta especie y la más importante.

La Mestiza.- de hojas y frutos más largos que los de la mansa.

Vainilla de Farro.- que se distingue por su fruto más delgado y más largo que el de la mansa (7).

b) Vainilla Tahitensis (Tahiti).

Es una especie de vainilla con un carácter diferente debido a la presencia de anisil derivados lo que la hace menos apreciada como extracto de vainilla.

c) Vainilla Pompona, Boba, Plátano, Vainilla Pompona Scheed.

Esta especie no tiene el aroma suave y característico de la Vainilla planifolia, teniendo más bien un olor parecido al del heliόtropa, con un sabor que recuerda al de la ciruela pasa. Se usa principalmente para per fumar tabacos (7).

d) Java Vanilla.

Es una especie de bajo grado de calidad.

e) Vanilla Silvestris Scheed.

A esta especie corresponden como más importantes las siguientes variedades:

Vainilla Cimarrona, Coniana o Bastarda.- que se distingue de la fina por tener un bejuco más delgado.

Vainilla de Cochine.- de frute más gruesa y áspera que el de la Cimarrona.

Vainilla Meno.- de fruto más largo que el de la Cimarrona.

Estas dos variedades no tienen ninguna estimación. De todas estas especies, solamente la Vanilla planifolia y sus variedades son las que se cultivan, por su importancia comercial derivada de su alto contenido de vainillina (7).

3.3 AREA GEOGRAFICA DE PRODUCCION

La cuna del cultivo de la industria vainillera es la región de Papantla, en el estado de Veracruz, que hasta la fecha es la más importante de las regiones producte -

ras de México (7).

Papantla se encuentra localizada al noroeste del estado de Veracruz y al noreste del estado de Puebla, comprendiendo como más importantes a los siguientes municipios: Papantla, Tecolutla, Coatzintla, Zozocolco y Misantla del estado de Veracruz; San José Acateno, Tenampulco, Huehuetla, Ayoxco de Guerrero y Olintla del estado de Puebla. Los principales municipios productores dispersos son: Tecpan, Tuxtla Chico, Tuzantlán y Pijijiapan, en el estado de Chiapas; Tancahuitz en San Luis Potosí y Chilchotla en Oaxaca (7).

Veracruz es el principal productor de vainilla, que aportó el 95% de la producción total del país durante el quinquenio de 1973-1978. Siguiéndole en importancia el estado de Puebla con un 5% de la producción nacional. Durante los últimos quinquenios, el área ocupada por el cultivo de la vainilla, ha ido decreciendo paulatinamente y con ello el cultivo ha ido perdiendo importancia en la economía nacional (8).

En el Cuadro No. 1, se observa que la producción en 1982 fue de 34 375 kilogramos de vainilla beneficiada, comparadas con las producidas durante el quinquenio de 1955-1959, en que se obtuvieron 255 048 kilogramos de vainilla, lo que indica un decremento elevado de producción, en nuestro país.

Actualmente, debido a dicho decremento en la producción de vainilla, el costo de la misma se ha incrementado, por lo que se emplean algunos productos artificiales para sustituir o adulterar el sabor de vainilla, tales como vainillina sintética, etil-vainillina, dehidrocumarina, heliotropina, 6-metilcumarina, cumarina, etc. Dichas sustituciones se emplean principalmente en la elaboración de extractos o concentrados de vainilla.

Cuadro No.1 PRODUCCION DE VAINILLA BENEFICIADA

QUINQUENIO	SUPERFICIE COSECHADA (ha)	RENDIMIENTO (Kg/ha)	PRODUCCION (Kg)	VALOR DE LA PRODUCCION \$
1925-1929	4550	17.779	80 893	1,158,973
1930-1934	4487	15.025	67 418	794,578
1935-1939	4327	27.500	118 992	2,259,349
1940-1944	5582	22.521	125 714	7,206,089
1945-1949	5993	26.456	158 551	10,472,870
1950-1954	5728	29.439	168 625	8,575,704
1955-1959	8368	30.479	255 048	16,205,972
1960-1964	5366	33.236	178 343	16,300,650
1965-1969	2382	30.820	73 413	7,742,994
1970-1974	1325	35.496	47 032	7,864,254
1975-1979	811	43.403	35 200	12,601,000
1980	412	50.971	21 000	68,250,000
1981	217	45.622	99 000	31,950,000
1982	220	152.250	34 375	52,229,000

(8)

IV CULTIVO DE LA VAINILLA

A pesar del uso incrementado de la vainilla por todo el mundo, la vainilla es cultivada mediante el uso de instrumentos primitivos. Los primeros nativos, limpiaban los bosques dejando sólo árboles jóvenes en los cuales anclaban las plantas de vainilla, cavando después una profunda zanja, junto a cada árbol (14).

El cultivo de la vainilla se inicia con la selección del área de plantación, y requiere de condiciones especiales, media sombra y tutores con las siguientes características: terrenos de origen calcáreo, ligeros, permeables, ricos en tierra húmida, con buen drenaje ya sea natural o artificial, lluvias distribuidas en los 12 meses del año, con precipitaciones anuales entre 2000 y 4000 mm. Las temperaturas medias requeridas para un buen desarrollo vegetativo son de 21 a 27°C. Los árboles soporte deben ser de fácil multiplicación, de buen desarrollo vegetativo, sistema radicular fuerte y que la corteza de su tallo no se desprenda fácilmente (21).

Esta planta trepadora, es cultivada a menudo sobre soportes vivos plantados el año anterior, se reproduce por medio de esquejes, que echan raíces en 10 a 12 semanas. Tiene que ser podada frecuentemente, para que no se cleve demasiado y pueda ser polinizada a mano (18).

Es práctica común en las regiones productoras de

vainilla, el hecho de polinizar artificialmente la planta, esto es así porque es muy reducido el número de plantas que logran fecundarse en forma natural y porque así se obtiene una mayor cosecha. Sin embargo, el número de flores a fecundar depende del vigor de la planta, puesto que una excesiva fecundación provoca su destrucción y se obtiene menor cantidad y calidad de la vainilla (21). La operación básica de polinización manual consiste simplemente en mover una membrana que separa las partes femenina y masculina de la flor (restelo) y llevar la masa del polen a la parte femenina de la flor (Figura No. 2).

4.1 COSECHA

Este período consiste en cortar las vainas de la planta. El corte de los racimos se hace manualmente dado que el pedúnculo unido al bejuco es muy quebradizo. Las vainas maduras se asemejan a pequeños plátanos o grandes ejotes. Si se permite que las frutas maduras permanezcan en la planta, estas empiezan a reventar para llevar a cabo la función natural de diseminar las semillas a fin de propagar la especie (21).

La primera cosecha se obtiene a los tres años, y la planta continúa produciendo frutos durante 9 años más. Una vez recogidas las vainas, pasan por un proceso de fermentación, que consiste en humidificaciones y secades alternadas. Este proceso requiere unos 5 - 6 meses; pasado este tiempo, las vainas son suaves al tacto y de un color pardo obscuro (18).

POLINIZACION ARTIFICIAL

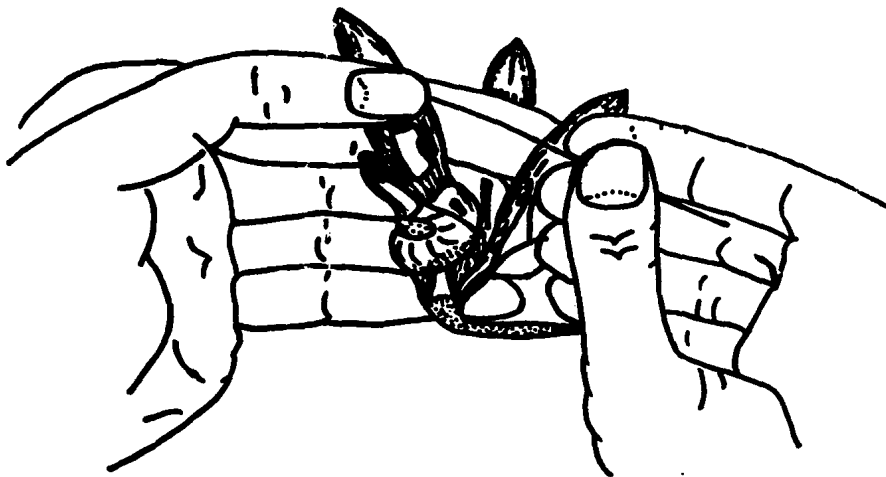


FIGURA No. 2

4.2 CURADO

Las vainas maduras no tienen sabor ni aroma. Estos deben desarrollarse por un proceso artificial de curado. En México, el procedimiento antiguo de secado al sol proporciona el calor necesario para estimular la fermentación; pero en Madagascar, los frutos se sumergen en agua caliente para estimular las reacciones enzimáticas, que finalmente desarrollan el aroma característico de la vainilla (26).

El color original amarillo y verde del fruto, rápidamente se convierte en un color pardo oscuro a café negro intenso. El jugo de los frutos se resorbe en los primeros días del curado. Las grasas exudan de las semillas y son absorbidas por las resinas, ayudando a proporcionar la base de los compuestos futuros peculiares de la vainilla y que no se encuentran en otras fuentes de la naturaleza. La vainilla se desarrolla en una etapa muy temprana y llega a ser el principal componente del aroma y el sabor de la vainilla, modificado por muchos otros compuestos orgánicos que contribuyen al sabor típico de una vainilla fina (5).

Cuando el período de secado y exposición al sol termina, lo que generalmente requiere un lapso de 9 a 12 semanas, los ejotes se colocan en un cuarto ventilado donde se dejan madurar más. Lo mismo que con otros productos fermentados, la vainilla nueva no tiene el aroma delicado y dulce que sólo se adquiere por oxidación y añejamiento (5).

V EXTRACCION DE LA VAINILLA

El sabor de la vainilla es extraído de las habas con alcohol. La destilación destruye la fragancia de los compuestos aromáticos (14). El color del extracto de vainilla es influenciada por la calidad de las habas e ejotes, la fuerza del disolvente alcohólico, la duración de la extracción y la presencia de glicerina, la cuál es adicionada para retardar la volatilización del alcohol y para retener el sabor del extracto. Los ejotes secos dan un color más oscuro que los húmedos (28).

Un disolvente tal como el alcohol etílico puede ser usado para extraer el delicado extracto de vainilla. Un antiguo método de extracción es usado en ocasiones, macerando los ejotes en alcohol y recirculando el disolvente continuamente hasta completar la extracción. El extracto de vainilla es almacenado durante aproximadamente 25 días en recipientes de vidrio o acero inoxidable, a fin de mejorar el aroma (28).

De acuerdo a las regulaciones del gobierno federal de los Estados Unidos, el extracto de vainilla final debe contener no menos del 35% en volumen de alcohol, contra un contenido no menor del 46% de extracto alcohólico reportado en el Código Latinoamericano. Por supuesto no hay normas de identidad para los sabores imitación de vainilla (4,5,14).

La calidad del extracto puede verse disminuida si es

te es almacenado en barriles de madera, de los cuáles la vainilla absorbe taninos y otras sustancias que proporcionan sabores indeseables(14).

Un contenido de alcohol del 42 - 45% acelera cambios químicos y formación de ésteres a partir de ácidos. Durante este período el contenido total de éster (acetato de etilo) es constante. No obstante, la naturaleza de los ésteres cambia constantemente, ya que liberan alcoholes por hidrólisis; los ácidos formados se unen a los alcoholes de bajo peso molecular formando ésteres volátiles. Los alcoholes de alto peso molecular se oxidan lentamente para formar aldehídos (28).

5.1 CALIDAD COMERCIAL

La vainilla se clasifica mundialmente, en los principales mercados, por orden de importancia decreciente en su calidad, de la siguiente forma:

- 1a. Vainilla México
- 2a. Vainilla Bourbon
- 3a. Vainilla Seychelles
- 4a. Vainilla Tahití
- 5a. Vainilla otras procedencias

La calidad de la vainilla mexicana, se ha visto deteriorada, debido a los cortes prematuros que realizan. Este ha sido el problema más importante de la producción vainillera, a pesar de que desde mediados del siglo pasado, tanto los gobiernos locales de las entidades productoras, co-

mo el gobierno federal de México; han dictado leyes tendientes a controlar el corte de la vainilla verde, fijando fechas a partir de las cuáles se autoriza el mismo; pero la falta de personal suficiente para cumplir estas disposiciones, así como la intervención de intereses particulares, han hecho nulos los efectos benéficos de estas disposiciones (7).

Otro factor que demerita la calidad de la vainilla, es el hecho de cargar cada racimo con un exceso de flores fecundadas, no debiendo pasar de seis, si se desean obtener vainas de buen tamaño y calidad.

La vainilla se clasifica en dos grupos: "Entera" y "Picadura", dentro de las que existen varias clases. Los exportadores acostumbran determinar diferentes calidades de acuerdo con sus intereses, sin embargo, puede decirse que en general la vainilla se clasifica en la siguiente forma:

ENTERA	México Extra
	México Superior
	México Buena
	México Mediana
	México Ordinaria
PICADURA	México Buena
	México Mediana
	México Ordinaria

Esta base de clasificación es la que se ha aceptado en la Dirección de Economía Rural de la Secretaría de Agricultura y Fomento, en el proyecto de especificaciones para la vainilla mexicana, con base en características físico-químicas, en virtud de que los caracteres físicos, son susceptibles de adulteración. Con este objeto se efectuaren análisis químicos de las muestras representativas de cada una de las calidades de la vainilla, fijando porcentajes límites para los principales elementos constitutivos.

5.2 COMPOSICION DE LA VAINA DE VAINILLA

<u>CONSTITUYENTES</u>	<u>%</u>
Humedad	25.85 - 30.93
Proteína	2.56 - 4.87
Grasa	4.68 - 6.74
Aceites volátiles	0.00 - 0.64
Extracto líquido de nitrógeno	30.50 - 32.90
Carbohidratos	7.07 - 9.12
Fibra	15.27 - 19.60
Cenizas	4.53 - 4.73
Vainillina	1.48 - 2.90
Resinas	1.47 - 2.56

En investigaciones realizadas en el extracto neutro, se identificaron los siguientes compuestos: ácido vainillínico, p-hidroxibenzil-metil-éter, guayacol, p-cresol, ácido n-caprílico, ácido n-cáprico, trazas de

rivadas de lactonas y p-hidroxibenzil-alcohol. En la fracción oleosa del extracto analizado se encontraron ésteres del ácido benzoico y del ácido cinnámico y compuestos del tipo eugenol, entre otros (28).

Compuestos del tipo anisil alcohol, anisil aldehído y ácido anísico sólo se encuentran presentes en las habas de Tahití, y no en las de México, Bourbon, y las de América del Sur (28).

5.3 CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS

La vaina de vainilla contiene diversas sustancias sápidas, que se forman por la acción enzimática llevada a cabo durante el proceso de curado, en el que se desarrolla el aroma y sabor característicos de la vainilla, teniendo como principal componente a la vainillina, la cuál posee las siguientes características:

V A I N I L L I N A

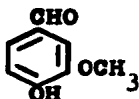
La vainillina se conoce como:

4-hidroxí-3-metoxi-benzaldehído

Aldehído metil-protocatéguico

Aldehído protocatéguico-3-metil-éter

Estructura



Fórmula empírica:



Peso molecular 152.14 g/mol

Apariencia Pelva cristalino, blanco amarillento

Punto de fusión 81-83°C

Punto de ebullición 284-285°C (con descomposición)

Gravedad específica 1.06 (líquido)

Humedad relativa 0.5% máx (pérdida por peso %)

Solubilidad 1:3 en 70% de alcohol, 1:2 en 95% de alcohol, soluble en éter, cloroforme, agua y glicerol.

Características organolépticas: Tiene fuerza característica como aromatizante y un sabor muy dulce.

(11)

5.4 USOS

VAINILLA

El valor medicinal de la vainilla ha ido decreciendo con el tiempo, sin embargo hubo una época en que se consideró estimulante digestivo (18). En América, la *Vanilla planifolia*, ha sido empleada además de estimulante, como aromática, antirreumática, emenagogo (activa la menstruación) y antipirético (baja la fiebre). Otras especies han sido empleadas como antídotos, adhesivos, purgativos y antiespasmódicos, además de los usos mencionados anteriormente (24).

La vainilla es un agente aromatizante que se emplea mucho al preparar postres, tartas, pasteles, etc. Es un ingrediente esencial del chocolate fabricado en la actualidad, también se emplea en la preparación de helados, bebidas suaves, tabacos, licores y perfumes (18).

VAINILLINA

Se sabe que se emplea en su mayoría como agente de sabor en alimentos, teniendo entre otras aplicaciones, la fijación de olor en perfumería, desodorantes y como saborizante en preparaciones farmacéuticas y vitaminas. Después de 1970, la vainillina se empleó como un intermediario químico en la producción de productos farmacéuticos. La vainillina es empleada en la síntesis de papaverina (alcaloide del opio), 1-hidroxi-fenilamina y otros derivados potencialmente útiles. Prevee la formación de espuma en los aceites lubricantes; se usa como abrillantador en los baños

galvanoplásticos de zinc; como auxiliar en la oxidación de linaza y como agente solubilizante de riboflavina (28).

En el Cuadro No. 2 se encuentran registradas los ni veles de uso de la vainilla, vainillina, extracto y elec rresina de vainilla, en algunos productos de repostería y confitería (11).

La molécula de vainillina, que está recibiendo mu cha atención de los laboratorios de investigación actual mente, deberá alcanzar una posición importante como inter mediaria equiparable a la que tiene como compuesto sa zenador. El L-depa, compuesto para combatir la enfermedad de Parkinson, se prepara a partir de la vainillina, lo mismo que el carba-depa. La vainillina se utiliza como inter mediaria para este producto. El metil-depa se ven de bajo la marca de "Aldenet" y tiene como propiedades evitar la hipertensión, así como tranquilizante (5).

Cuadro No. 2 NIVELES DE USO

VAINILLA (FEMA No. 3104)

PRODUCTO	mg/Kg
Bebidas no alcohólicas	420
Helados	600
Dulces	490
Pasteles	530
Gelatinas y Budines	630
Jarábes	10

EXTRACTO DE VAINILLA (FEMA No. 3105)

Bebidas no alcohólicas	200
Helados	3,000
Dulces	4,000
Pasteles	1,900
Jarábes	8.5- 54

OLEORRESINA DE VAINILLA (FEMA No. 3106)

Bebidas no alcohólicas	190
Helados	290
Dulces	210
Pasteles	300
Gelatinas y Budines	230
Condimentos	200

VAINILLINA (FEMA No. 3107)

Bebidas no alcohólicas	63
Helados	95
Dulces	200
Pasteles	220
Gelatinas y Budines	120
Gomas de mascar	270
Jarábes	20,000 a 330
Margarina	0.20

FEMA = Flavor and Extract Manufacturer's Association

(11)

VI ADULTERACIONES DEL SABOR VAINILLA

La vainilla se ha adulterado frecuentemente con sarrapia o haba tonka (*Dipteryx odorata* o sarrapia holandesa y de *D. oppositifolia* o sarrapia inglesa). La sarrapia tiene un principio aromático conocido con el nombre de cumarina, aceite fijo, almidón y aleurona. Su presencia puede identificarse fácilmente, mediante un examen microscópico de sus granos de almidón, los cuáles aparecen esferoidales y desgastados, con un diámetro de 4 a 8 micras, o bien mediante el examen de cristales obtenidos al sublimar una muestra de vainilla sospechosa. La cumarina funde a 54-56°C, mientras que la vainillina funde a 81-83°C (39).

El haba tonka es conocida también como haba tonga, haba tunka, haba de olor, cumarona, tonco, Al. Tonkabonen. Fr. Semina tonco. Ing. Tonka, tonka bean, Tonquin bean. Por. Fava de tonca, cumarú, cumbarú, muirapayé, árvore dos feiticeiros. *Dipteryx odorata* es nativa de las Guayanas y *D. oppositifolia* lo es del Brasil (39).

Los frutos se colectan una vez que se han caído de los árboles, se separan las semillas y se dejan secar al sol sobre rocas planas, después de lo cuál se empapan de ron, se dejan fermentar y se secan. Durante este proceso de curado se libera el principio aromático de cumarina, una parte de la cuál se cristaliza en el exterior de la cubierta de la semilla, en forma de una escarcha blanquecina. La semilla de sarrapia contiene hasta 10% de cumarina.

rina (lactona o éster interno del ácido o-cinámico) que se presenta en forma de cristales incoloros y muy aromáticos, con sabor amargo; almidón, azúcar y 25% de aceite fijo, goma, etc (39).

La sarrapia se usa junto con la vainilla en la preparación de un extracto de sabor y olor muy agradables; en la industria de perfumería y como fuente natural de cumarina. El consumo principal de la sarrapia lo hacen los manufactureros de tabaco, como agente aromatizante. Parece ser que la cumarina se encuentra en la sarrapia y en otras plantas en forma de glucósido, que se desdobra durante el proceso de curado. Se encuentra ampliamente distribuido en el reino vegetal, habiéndose encontrado en el meliloto amarillo, en la aspérula dulce, en varias orquídeas y tréboles y en otras plantas variadas. Actualmente la cumarina es preparada por vía sintética (39). Se obtiene por calentamiento continuo de salicilaldehído, acetato de sodio y anhídrido acético (25).

La vainilla natural es también sustituida por vainillina sintética, la cuál se obtiene por tres rutas distintas a partir de eugenol, guayacol y lignina respectivamente (5) o bien por etil vainillina. Esta última se emplea ya que la metil vainillina presente en el ejote de vainilla, es menos aromática que la etil vainillina, compuesto sintético conocido comercialmente como Ethavan y Vanaldol (28). Dicha sustitución está reglamentada legalmente, ya que tanto la vainillina como la etil vainilli-

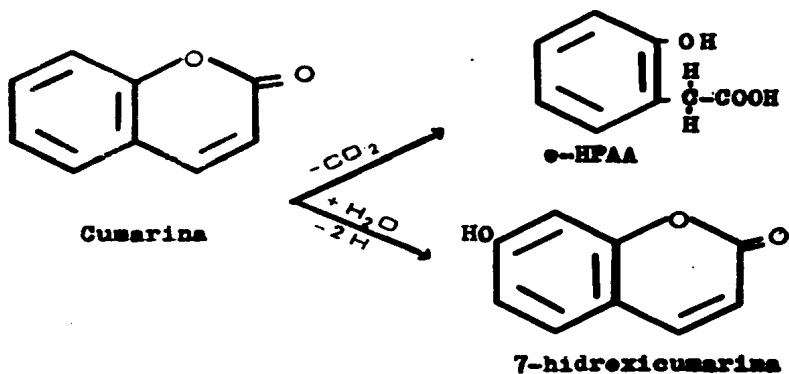
lla son consideradas sustancias GRAS, es decir Generalmente Reconocidas como Inéguas, por la FDA (Food and Drug Administration) (11).

6.1 ASPECTOS TOXICOLÓGICOS DE LA CUMARINA

En los años 50's la cumarina era considerada como aditivo en algunos productos de repostería y confitería, ya que se pensaba que no tenía efectos tóxicos en humanos, y sólo a niveles de 4 g se presentaban algunos problemas (13). Sin embargo, en 1958, se legisló la prohibición del uso de cumarina como aditivo en alimentos en México, debido a que comenzó a surgir la duda de su inocuidad (19).

Estudios realizados por Kaighen y Williams (1961), demostraron que los conejos convierten el 12% de la dosis administrada de cumarina, en 7-hidroxicumarina y aproximadamente un 20% de ácido e-hidroxifenilacético (e-HPAA); y las ratas producen menos del 1% de 7-hidroxicumarina y alrededor del 20% de e-HPAA (16).

Estos estudios se apoyan también en los trabajos de Beeth y colaboradores (1), en que es propuesto un esquema de transformaciones metabólicas de la cumarina, el cuál se presenta a continuación:



Por otro lado, Feuer y colaboradores (1966), demostraron que una reducción en la actividad de la enzima glucosa-6-fosfatasa en el hígado, es indicativa de un daño al mismo, ya que en experimentos realizados in vitro con humanos, conejos y ratas, se encontró inhibición de dicha enzima, en los microsomas del hígado, debida a la presencia de e-HPAA, pero no por cumarina, ni por 7-hidroxicumarina (10).

Se encontró, que dosis crónicas de 25, 50 y 100 mg de cumarina/Kg de peso, en dietas para perros, así como niveles de 5000 y 2500 mg/Kg en dietas para ratas, provocan una marcada disminución en el crecimiento, atrofia testicular, así como daño extensivo al hígado, que comprende: hipertrofia, metamorfosis lípida, proliferación de conductos biliares y fibrosis (3).

Shilling (1969), demostró que los productos de biotransformación de la cumarina difieren de especie a especie, mostrando que en el hombre es rápida y casi completa, ya que en experimentos realizados con voluntarios, a los que se les administraron 200 mg de cumarina, se encontró que aproximadamente el 80% de la dosis es excretada por orina, como 7-hidroxycumarina y no más del 6% como e-HPAA, lo que indica que la cumarina es rápidamente absorbida por el intestino, y que alguna circulación enterohepática de cumarina o sus metabolitos es casi improbable (29).

A pesar de que la ruta de biotransformación resultante en la excreción del e-HPAA es mayor en ratas y conejos, pero menor en el hombre, existe la duda de poder evaluar la toxicidad de cumarina en humanos a partir de resultados obtenidos en experimentos con ratas y conejos (29).

Posteriormente, se demostró que la ruta de biotransformación de la cumarina en mandriles, es la misma que en humanos (12). Basándose en esta afirmación, Evans y colaboradores (1979), establecieron que niveles de 22.5 mg de cumarina/Kg de peso/día en mandriles, no provocan efectos dañinos, por lo que extrapolando estos resultados a una persona de aproximadamente 70 Kg, se puede decir que posiblemente pueda ingerir 1575 mg de cumarina por día, sin que reciba daño al hígado (9).

Sin embargo, se considera que la cumarina es un com
puesto potencialmente tóxico, ya que la FDA (Food and
Drug Administration), no permite el uso de este compues-
te como aditivo en alimentos y sólo permite su uso en la
manufactura de tabaco, perfumes, desodorantes, etc, como
agente aromatizante únicamente.

Actualmente son bien conocidas los valores de dosis
letal media (DL_{50}) de la cumarina, administrada per vía
oral para ratas y cebayas, siendo 680 y 202 mg/Kg respec-
tivamente, sin embargo, per vía intraperitoneal en ratas
es de 62.5 mg/Kg (2,38).

La cumarina actúa también como deprimente directo en
el músculo liso del útero e intestino del conejo y en el
corazón de la rana (30).

VII JUSTIFICACION

Debido a que la legislación mexicana y otras legislaciones en donde se consumen productos con sabor vainilla, prohíben el uso de la cumarina como aditivo en alimentos, el enfoque dado al presente trabajo, es de carácter cualitativo, es decir, si este compuesto está presente en alguno de los productos analizados, este implicará una adulteración que a su vez lleva a dicho producto a estar fuera de normas, lo que en realidad debe considerarse como un fraude, ya que la cumarina está considerada un compuesto potencialmente peligroso para la salud (31-34, 36).

VIII MATERIALES Y METODOS

Se analizaron algunos productos comerciales de extractos de vainilla (muestras líquidas), así como diferentes productos con sabor vainilla: pudines, gelatinas, flanes, harinas y helado (muestras sólidas). Se emplearon como controles experimentales a: Cumarina (sólido cristalino blanco, Química Industrial Carne S.A.), Dehidrocumarina (líquido viscoso de bajo punto de fusión, 25°C, DEIMAN S.A. de C.V.) y Vainillina (polvo cristalino blanco amarillento, Química JVC) sintéticos.

Los métodos analíticos empleados fueron: Espectrofotometría Visible, Cromatografía en Capa Fina Uni y Bidimensional, Espectrofotometría Infrarroja y finalmente Resonancia Magnética Nuclear. La preparación y el análisis de las muestras se siguió mediante el diagrama propuesto en la Figura No. 3, en donde inicialmente se aplicaron dos técnicas analíticas previas, para la detección de cumarina. Posteriormente se tienen tres métodos de confirmación de la presencia o ausencia de este compuesto en las muestras analizadas.

8.1 PREPARACION DEL EXTRACTO DE VAINILLA

Para la extracción de la vainilla, se maceró 10 g de vaina natural de vainilla, en 50 ml de una mezcla de alcohol etílico-agua al 65% (v/v), reposando durante 12 horas. A los sólidos se les separa por filtración (What

**DIAGRAMA DE ANALISIS DE MUESTRAS PARA DETERMINAR
ADULTERACION CON CUMARINA**

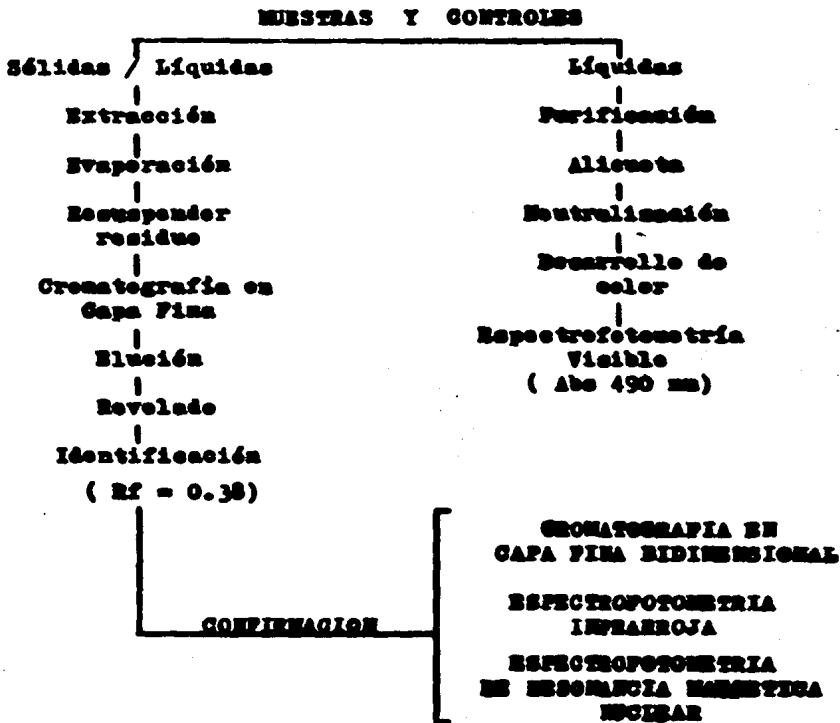


Figura No. 3

man No. 1) y se muelen en un mortero junto con 20 gramos de azúcar, hasta su completa homogenización. Finalmente se reúnen con el líquido de filtración previa y se filtra, lavando el residuo con la mezcla alcohólica, hasta su aforo de 100 ml (17).

8.2 EXTRACCION DEL PRINCIPIO SAPIDO DE PRODUCTOS COMERCIALES

La recuperación de compuestos a partir de productos comerciales, ya sean líquidos (7 marcas de extractos comerciales de vainilla) o sólidos (3 pudines, 3 gelatinas, 4 flanes, 2 harinas y un helado), se realizaron mediante una selección del mejor disolvente de extracción utilizando:

a) Éter etílico: Se disolvió 10 g de muestra en agua, aforándose a 50 ml, neutralizando con bicarbonato de sodio (pH 7). Se extrajo con tres fracciones de 25.0, 12,5 y 12,5 ml de éter etílico respectivamente, juntándose posteriormente el éter, secándolo con sulfato de sodio anhidro. Finalmente se evaporó hasta aproximadamente un mililitro (15).

b) Cloroformo: Se aplicó el mismo método del inciso (a), pero el disolvente de extracción fue cloroformo.

c) Agua: A 10 g de muestra se le adicionaron 20 ml de agua destilada, reposándose durante una hora, agitando ocasionalmente. Se calentó la mezcla a ebullición durante 10 minutos, filtrándose en caliente. Finalmente

se evaporó hasta un mililitro.

d) Alcohol etílico: A 10 g de muestra se le adicionaron 20 ml de alcohol etílico absolute, reposándose durante dos horas aproximadamente. Se calentó en parrilla directamente a ebullición durante 5 minutos, se filtró y se evaporó hasta sequedad total. Finalmente el residuo fue resuspendido en 1 - 2 ml de alcohol metílico (este método resulte ser el más adecuado).

Posteriormente estos extractos fueron aplicados en cromatoplasmas, verificándose si la mancha al revelarse era lo suficientemente intensa, como para considerar positiva la extracción.

Una vez seleccionada el disolvente de extracción (Alcohol etílico), a las muestras comerciales líquidas, se les midió 10 ml e se pesaron 50 g si la muestra era sólida. Se agregaron 40 ml de alcohol etílico y se dejaron reposar durante dos horas, agitando ocasionalmente. Se procedió a calentar la mezcla a ebullición, después de lo cual se filtró en caliente, evaporándose hasta sequedad total. Finalmente el residuo fue resuspendido en 1 - 2 ml de alcohol metílico. Para los controles experimentales de cumarina, dehidrocumarina, y vainillina se procedió de la misma manera.

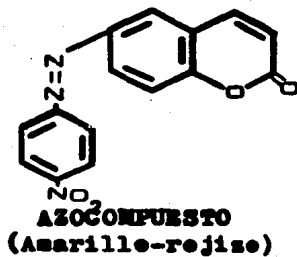
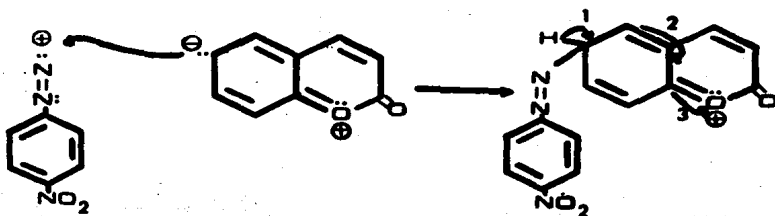
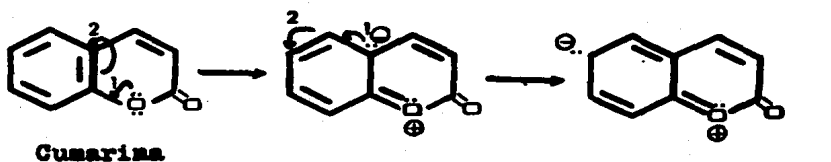
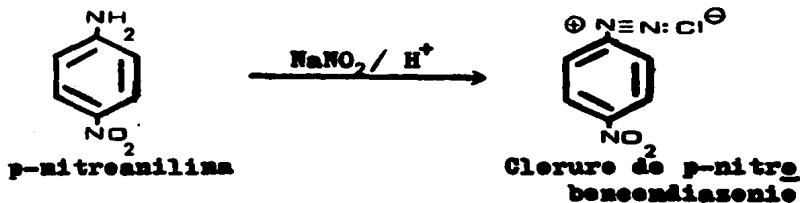
8.3 % DE RECUPERACION

Se procedió a determinar el % de recuperación de cumarina, en un modelo controlado (para muestras sólidas), compuesto por 1 g de harina a la que se le adicionó previamente una concentración conocida (0.2011 g) de cumarina. Se trató al sistema con 5 ml de alcohol etílico caliente, filtrándose y enfriando posteriormente. A el extracto frío se le analizó mediante el método espectrofotométrico propuesto por el A.O.A.C. de 1955 (22), leyendo absorbancia a 490 nanómetros. El % de recuperación de cumarina en el sistema se determinó aplicando la técnica de adición múltiple (37).

8.4 ESPECTROFOTOMETRIA VISIBLE

Los análisis para las muestras líquidas, se siguen según el método recomendado por A.O.A.C. de 1955 (22), que se fundamenta en el empleo de una sal de diazenio compuesta por nitrito de sodio y p-nitroanilina en medio ácido, la cuál reacciona con el anillo de la cumarina, formando así un compuesto azo de coloración amarillo-rojizo, medible espectrofotométricamente a 490 nm. Inicialmente la muestra es tratada con solución de acetato de plomo y con oxalato de potasio (precipita exceso de plomo), obteniendo la solución clarificada que se neutraliza con carbonato de sodio y se hace reaccionar con el reactivo de diazenio, formándose el compuesto colorido. La lectura de absorbancia se determinó en un Espeg

MECANISMO DE FORMACION DEL AZOCOMPUESTO
MEDIBLE A 490 mμ



trefetómetro Pye Unicam Modelo SP30UV, leyende contra una curva estándar que va de 0.0 hasta 5.0 mg/ml de cumarina, la cuál se disolvió primero en alcohol etílico (3 ml), para finalmente aferar a 100 ml con agua destilada. Este método se aplicó también al control experimental de dehidrecumarina.

8.5 CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA UNI Y BIDIMENSIONAL

Los principios sápidos extraídos previamente de las muestras líquidas y sólidas, fueron aplicados en placas de vidrio de 20 x 20 cm, preparadas con Sílica gel GP²⁵⁴, en donde primeramente se seleccionó el mejor sistema de disolventes y revelador, para cumarina, dehidrecumarina y vainillina, utilizándose para este tres tipos de sistemas de disolventes: a) Benceno-Metanol 97:3, b) Benceno-Acetona 9:1 y c) Hexano-Acetato de Etilo 5:2 (23, 35 y 40) y dos tipos de soluciones reveladoras: a) Acido fosfomolibáico al 10% en alcohol etílico y b) Reactivo de diazenio (NaNO_2 + p-nitroanilina en medio ácido) (22 y 23).

Las placas fueron eluidas en una cámara saturada del sistema de disolventes respectivo (el mejor fue el sistema de Hexano-Acetato de Etilo 5:2), hasta un nivel aproximado de 13 cm. Una vez eluidas las placas, se atomizaren con la solución reveladora correspondiente (la mejor fue la de ácido fosfomolibáico al 10% en alcohol etílico), dejándelas durante 15 min a 50° C. Finalmente se calcularon los valores de Rf correspondien

tes de las muestras y controles experimentales.

Los principios sápidos extraídos tanto de muestras líquidas como sólidas sospechosas de estar adulteradas fueron aplicadas individualmente, en el extremo izquierdo inferior de la placa, eluyéndolas (Hexano-Acetato de Etilo 5:2) primero en posición normal. Posteriormente tras la evaporación del disolvente, la placa se gira 90 grados, para la elución en segunda dimensión, revelando (Ac. fosfomolibdico al 10% en alcohol etílico) y calculando los valores de Rf respectivos en ambas dimensiones.

Se realizó una cromatoplaqa en la cuál se incluyeron los controles experimentales de cumarina y vainillina, así como cada una de las fracciones aisladas previamente de la vainillina, a las cuáles se les llamó V_1 (migración lenta, Rf= 0.27) y V_2 (migración rápida, Rf= 0.38). Dichas fracciones fueron aplicadas en la placa, sin adulterar y adulteradas previamente con cumarina, es decir que se obtuvieron fracciones V_1 , V_2 , $V_1 + \text{Cumarina}$ y $V_2 + \text{Cumarina}$. También se incluyó el control experimental de vainillina + Cumarina y finalmente el extracto obtenido de la vaina natural de vainilla, a fin de determinar si hay o no sobreposición de la mancha de Cumarina y la fracción V_2 contenida en el control experimental de la vainillina.

8.6 INTERACCION ENTRE DEHIDROCUMARINA Y CUMARINA

Para determinar si existe una posible interacción entre Cumarina y Dehidrecumarina en el método de espectrofotometría visible según lo recomienda el A.O.A.C. (1955,22), se procedió a la adulteración de una muestra líquida comercial (Delicia), que ha sido previamente reportada como libre de cumarina en la literatura por Sullivan (31 - 34). Además para asegurar la ausencia de cumarina se realizó previamente el análisis infrarrojo, sin encontrar bandas de lactonas (Figura No. 10). Para esto se toma como base al extracto comercial, al cual se le añadieron diferentes volúmenes (0, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 ml) de una solución acuosa de cumarina (2 mg/ml), obteniendo la siguiente serie de adulteración del extracto comercial: 0, 40, 80, 120, y 160 mg/100 ml. Una vez adulterada la muestra, se siguió la técnica descrita por el A.O.A.C. (22) para la determinación de cumarina a 490 nm.

De igual manera se preparó la serie de adulteración en el extracto comercial con Dehidrecumarina, obteniéndose se las mismas concentraciones anteriores. A esta serie también se le hizo reaccionar con p-nitroanilina y HNO_2 como en el caso de cumarina y según el A.O.A.C. (22) leyéndose absorbancia a 490 nm (Espectrofotómetro Pye Unicam Modelo SP30UV). Debido a que tanto la cumarina como la Dehidrecumarina, forman el compuesto celerido de diazonio a las absorbancias respectivas obtenidas, se le correlacionará por regresión lineal simple.

8.7 ESPECTROFOTOMETRIA INFRARROJA Y RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR

Estos métodos fueron confirmativos para los casos en que se presentó un mismo Rf y celeración sospechosa de cumarina en las cromatoplaques. Se procedió a desarrollar de 4 a 5 cromatoplaques por producto sospechoso, aplicándose el extracto en banda, através de un capilar (aproximadamente 0.5 ml por cada placa). Las muestras dudosas fueron eluidas (Hexano-Acetato de Etilo 5:2); recuperándose con cloroforme el compuesto sospechoso, según el Rf de la cumarina (control experimental) en la cromatoplaque correspondiente. Se evaporó a sequedad y el residuo se aplicó en forma de película para su análisis de Infrarrojo. Los controles experimentales se analizaron directamente como pastilla (Espectrofotómetro Infrarrojo Perkin Elmer Modelo 559B, aire).

Para el análisis por Resonancia Magnética Nuclear se procedió de la misma manera, extrayéndose el compuesto sospechoso de las placas y el espectro correspondiente de las muestras dudosas fue obtenido en un Espectrofotómetro EM - 390 90 MHz NMR.

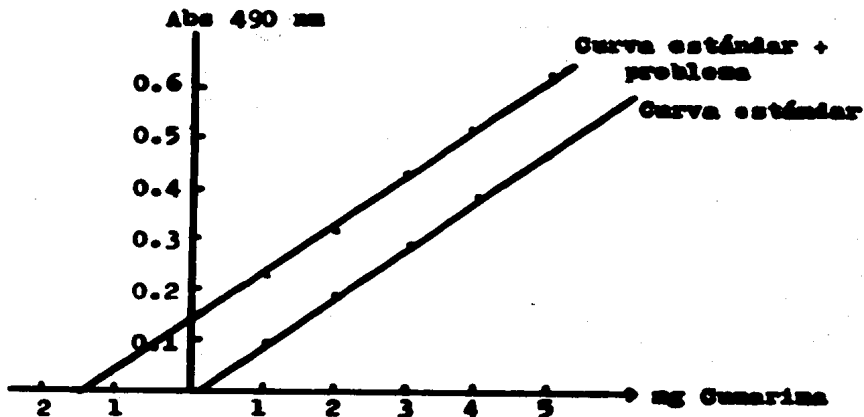
IX RESULTADOS Y DISCUSION
EXTRACCION DEL PRINCIPIO SAPIDO DE PRODUCTOS
COMERCIALES

El disolvente seleccionado para la extracción del principio sápid, a partir de muestras líquidas y sólidas, fue el alcohol etílico, ya que los principios extraídos obtenidos presentaren manchas intensas al ser aplicadas en placas, con lo que fue considerada como positiva la extracción. Sin embargo, los demás disolventes empleados (éter etílico, cloroforme y agua) presentaren manchas muy tenues, no definidas e bien no se detectó ninguna mancha, por ello fueron descartados para este fin, a pesar de que tanto la cumarina como la dehidrocumarina, son solubles en los disolventes propuestos.

% DE RECUPERACION

El % de recuperación para el alcohol etílico fue aproximadamente del 80%, al ser comparado contra la curva estándar de cumarina (control experimental) y las cantidades aplicadas, lo cuál indica que puede existir un 20% de error al utilizar el método de Espectrofotometría Visible, además de no extraer el principio sápid totalmente. Estos resultados pueden corroborarse en los datos citados a continuación:

Concentración Cumarina (mg)	Absorbancia de Curva estándar (490 nm)	Absorbancia de estándar + pro- blema (490 nm)
0	0	0
1	0.096	0.237
2	0.191	0.321
3	0.288	0.433
4	0.386	0.525
5	0.471	0.638



2.011 mg — 100%

1.6 mg — X

X = 79.56 % de recuperación

ESPECTROFOTOMETRIA VISIBLE

En el Cuadro No. 3, se observa que por el método de Espectrofotometría Visible, aplicado al análisis de extractos comerciales de vainilla, no es posible distinguir la presencia de cumarina de la de dehidrocumarina, en diferentes extractos comerciales, ni la del extracto natural, ya que a simple vista se aprecia que en todos los casos se forma un compuesto colorido similar.

Es necesario recordar que la dehidrocumarina, si está permitida en alimentos, según el Flavour and Extract Manufacturer's Association "FEMA No. 2381", mientras que la cumarina no (11, 19), esto es sin que importe que sea una concentración mínima.

También se encontró que el extracto directo de la vaina natural, da un falso positivo; diferentes fuentes bibliográficas (28, 39) indican que este componente no está presente en la vaina natural de vainilla. Probablemente este pueda explicarse por diversas interferencias capaces de reaccionar con el reactivo de diazotio, formando compuestos coloridos ante la técnica propuesta en el A.O.A.C. de 1955 (22).

Ante estos resultados y siguiendo las técnicas recomendadas, podría concluirse erróneamente, que todas las muestras líquidas, incluyendo el extracto natural, tienen cumarina.

Cuadro No. 3 Relación de la concentración encontrada de Cumarina y Dehidrocumarina, en los extractos comerciales de vainilla analizados por Espectrofotometría Visible a 490 nanómetros, según el método descrito en el A.O.A.C. 1955 (22).

MUESTRA	ESPECTROFOTOMETRIA VISIBLE	
	Cumarina mg/100 ml	Dehidrocumarina mg/100 ml
1	66.8	50.8
2	62.8	47.6
3	21.2	12.4
4	22.4	13.2
5	68.0	52.0
6	18.0	9.6
7	96.4	76.0
Extracto natural	26.0	16.8

CRONATOGRAFIA EN CAPA FINA UNI Y BIDIMENSIONAL

Puede observarse en el Cuadro No. 4, que el sistema de disolventes seleccionado, para la técnica de cromatografía en Capa Fina uni y bidimensional fue Hexano-Aceta to de Etilo 5:2, ya que los valores de Rf obtenidos experimentalmente, coinciden con los reportados en la literatura (40), para los controles experimentales empleados.

El revelador de placas seleccionado fue el ácido fog femelídico al 10% en alcohol etílico, debido a que se produce una reacción que va de amarillento a café, siendo fácilmente detectables las manchas.

En el análisis por cromatografía en capa fina unidimensional, se encontró que de las muestras líquidas comerciales, sólo tres de ellas (1, 5 y 7), estarían adulteradas con cumarina, lo que concuerda con algunos estudios (31, 33 y 34), considerando que de las tres muestras líquidas comerciales encontradas como adulteradas en el presente trabajo, dos marcas supuestamente continúan usando cumarina desde 1981 en que se realizaren estos estudios (Cuadro No. 5).

Comparando los análisis de espectrofotometría visible y cromatografía en capa fina unidimensional se observa una falta de consistencia de datos, ya que por la primera técnica, todas las muestras tienen cumarina, y por capa fina, sólo tres de ellas presentan cumarina en forma dudosa, con base en el Rf aproximado de 0.38 y el ce-

**Cuadro No. 4 Sistemas de Disolventes y Reveladores usados
en Cromatografía en Capa Fina Uni y Bidimensional.**

	SISTEMA	REVELADOR	Rf			COLOR MANCHA		
			C	DHC	V	C	DHC	V
Valores experimentales	Benceno-Metanol 97:3	Ac. fosfórico líbico 10% en etanol	0.55	0.70	0.50	Am	Ce	Cc
	Benceno-Metanol 97:3	Reactivo de diazonio	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
	Benceno-Acetona 9:1	Ac. fosfórico líbico 10% en etanol	0.65	0.79	0.44	Am	Ce	Cc
	Hexano-Acetato de Etilo 5:2	Ac. fosfórico líbico 10% en etanol	0.38	0.49	0.28	Am	Ce	Cc
Literatura	Hexano-Acetato de Etilo 5:2		0.38	0.50	0.27			

C= Cumarina, DHC= Dehidrocumarina, V= Vainillina, Nd= No detectable, Am= Amarillo, Ce= Café oscuro y Cc= Café claro.

- 49 -

Cuadro No. 5 Resultados obtenidos en el análisis de muestras líquidas, por el método de Cromatografía en Capa Fina Unidimensional.

MUESTRAS	Rf			Literatura (a)
	Cumarina	Dehidrecumarina	Vainillina	µg/100 ml
1	? 0.39	Nd	Nd	30.0
2	Nd	Nd	0.28	3.0
3	Nd	Nd	0.27	0.0
4	Nd	Nd	0.25	-
5	? 0.38	Nd	0.26	80.0
6	Nd	Nd	0.26	-
7	? 0.35	Nd	0.28	-
Extracto natural	Nd	Nd	0.27	-
CONTROLES EXPERIMENTALES				
Cumarina	0.38	-	-	-
Dehidrecumarina	-	0.49	-	-
Vainillina	-	-	0.28	-

(a) Sullivan (34) mide la concentración de cumarina por Espectrodensitometría.

Nd= No detectable ?= Valer dudoso por coloración y Rf semejante al control experimental (cumarina).

Cuadro No. 6 Resultados obtenidos en el análisis de muestras sólidas, por el método de Cromatografía en Capa Fina Unidimensional. (Rf)

CONTROLES EXPERIMENTALES		CUMARINA	DEHIDROCUMARINA	VAINILLINA
MUESTRAS		+ 0.38	+ 0.49	+ 0.28
Flan	A	- -	- -	+ 0.25
	B	- -	- -	- -
	C	- -	- -	+ 0.27
	D	- -	- -	- -
Pudín	E	? 0.39	- -	- -
	F	- -	- -	- -
	G	? 0.37	- -	- -
Helado	H	- -	- -	- -
	I	- -	- -	- -
	J	- -	- -	- -
	K	? 0.37	- -	- -
Gelatina	L	- -	- -	+ 0.27
	M	- -	- -	+ 0.29
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS (40)		+ 0.38	+ 0.50	+ 0.27

+ = Presente

- = Ausente

ler amarillo de la mancha.

En cuanto a las muestras sólidas analizadas por cromatografía en capa fina unidimensional, en el Cuadro No.6 se observa, que tres muestras son sospechosas de estar adulteradas, ya que las manchas en las cromatoplasmas, presentan valores cercanos al R_f de la cumarina; sin embargo las manchas son tenues.

Debido a la inconsistencia de datos en capa fina y espectrofotometría visible, es necesario proseguir el estudio, aplicando técnicas más sensibles, como Cromatografía en capa fina bidimensional, Espectrofotometría Infrarroja y Resonancia Magnética Nuclear (Cuadros 3, 5 y 6).

Se encontró también que la vainillina sintética utilizada como control experimental, muestra dos manchas en cromatoplasmas; una que corresponde al R_f reportado en la literatura para este compuesto ($R_f = 0.27$) y otra mancha que corresponde aproximadamente al R_f de la cumarina ($R_f = 0.38$) (Cuadro No. 7), pudiendo ocasionar esta confusión al estimarse que un producto, supuestamente contenga cumarina, mientras que en realidad presente algún isómero de la vainillina sintética, como interferencia o bien que el control experimental estuviere contaminado con cumarina, por lo que es necesario caracterizar ambas fracciones por Espectrofotometría Infrarroja y Resonancia Magnética Nuclear.

En cuanto a el análisis de muestras sospechosas por Cromatografía en Capa Fina Bidimensional, se encontró que solamente la muestra líquida l y las muestras sólidas E, G y K, siguen manteniendo la duda de estar adulteradas con cumarina (Cuadro No. 7).

En la Figura No. 5 se observa claramente la sobreposición que existe entre la mancha del control experimental de cumarina y la segunda mancha (fracción de migración rápida) de la vainillina, empleada también como control en este trabajo.

INTERACCION ENTRE DEHIDROCUMARINA Y CUMARINA

Adicionalmente a la interacción entre dehidrocumarina y cumarina, por el método de espectrofotometría visible (490 nm), se observa en la figura No. 4, que hay una relación prácticamente lineal, ya que el coeficiente de regresión es cercano a uno (0.997), es decir que si se estuviese buscando cumarina en una muestra alimenticia que contuviera dehidrocumarina, la prueba sería positiva para cumarina, por la interferencia que existe, o bien que se puede leer la concentración de dehidrocumarina, en una curva estándar de cumarina y viceversa, lo cual es absurdo.

ESPECTROPOTOMETRIA INFRARROJA Y RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR

En el análisis Infrarrojo de las muestras sospe -

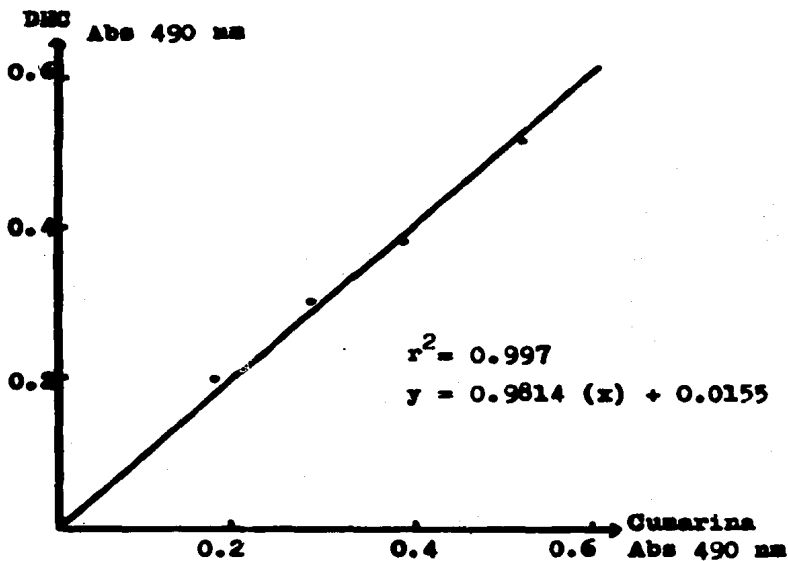


Figura No. 4 Interacción entre DHC (Dehidrecumarina) y Gumarina en el método de Espectrofotometría Visible a una longitud de onda de 490 nanómetros. Las absorbancias corresponden a cantidades equivalentes en peso de Dehidrecumarina e Gumarina.

Concentración de Gumarina e DHC (mg/100 ml)	ABSORBANCIA	
	Gumarina	DHC
0	0	0
40	0.171	0.201
80	0.277	0.299
120	0.373	0.376
160	0.514	0.512

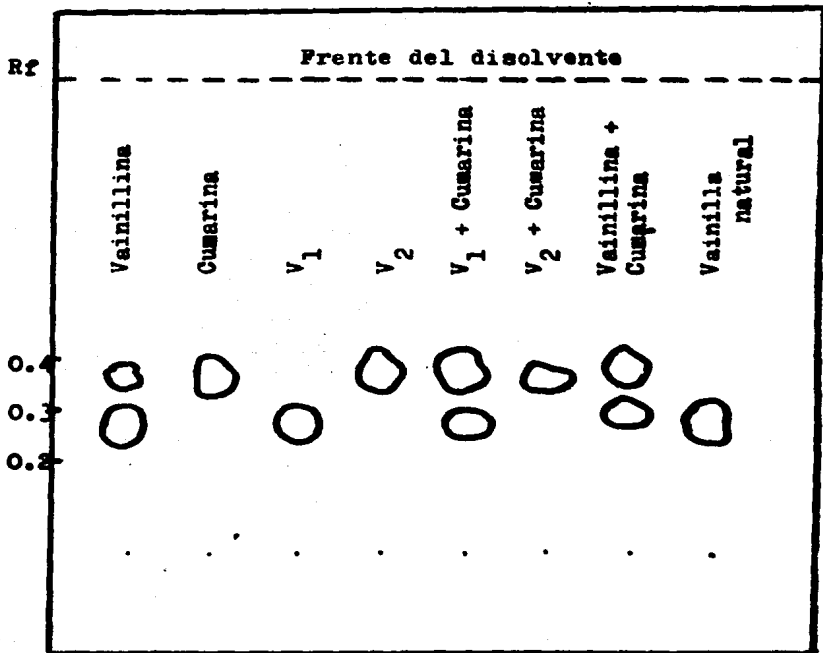


Figura No 5 Cromatoplaque que demuestra la sobre -
 posición de la Cumarina y V₂ (fracción de migración
 rápida correspondiente a la Vanillina).

Cuadro No. 7 Valores de Rf obtenidos en el análisis de muestras sospechosas, por Cromatografía en Capa Fina Bi dimensional.

		CONTROLES EXPERIMENTALES		M U E S T R A S					
		CUMARINA	VAINILINA	Líquidas			Sólidas		
		Rf	Rf	1	5	7	B	G	K
Primera	1.1	0.36	0.27	0.16	0.19	0.11	0.39	0.37	0.37
dimensión	1.2		* 0.38	0.39	0.28	0.32			
Segunda	2.1	0.33	0.25	0.09	0.23	0.11	0.34	0.37	0.37
dimensión	2.2		* 0.36	0.31	0.35	0.34			

* = Mancha que aparece como contaminante en el control experimental de Vainilina.

chesas, se encontró una gran diversidad de bandas entre Cumarina, Dehidrecumarina, Vainillina y las muestras. En el espectro de Cumarina (control experimental) se encuentran marcadas con asterisco (*), las bandas características de las alfa-pirenas, siendo: 1740-1720, 1650-1620 y 1570-1540 cm^{-1} (Figura No. 6, 20).

Comparando los espectros Infrarrojos de Cumarina (Figura No. 6) y Vainillina (Figura No. 7) utilizados como controles experimentales, se encontró que ambos compuestos presentan 6 bandas en común, siendo 1670, 1400, 1260, 1150, 1120 y 1020 cm^{-1} (Tabla No. 1), las cuáles se presentan en los espectros correspondientes a todas las muestras sospechosas ligeramente desfasadas, lo que nos deja grandes dudas para considerarle como cumarina, además resalta el hecho de que ningún espectro problema presenta las bandas características de las alfa-pirenas.

Analizando cada uno de los espectros correspondientes a las muestras (Figuras 9, 10, 11, 12 y 13), se encontró que todas presentan en común las bandas de 2850, 1600, 1520, 1300 y 600 cm^{-1} , resaltándose que ninguna de estas bandas corresponden ni a los espectros de cumarina y vainillina (controles experimentales), ni a las bandas características de las alfa-pirenas.

La mancha dudosa de vainillina sintética encontrada en cromatografía en capa fina, fue recuperada y aislada para su análisis Infrarrojo, lo cual indica que ambos es

Tabla No. 1 Relación de bandas que aparecen en los espectros de los controles experimentales y muestras sospechosas, en el análisis por Espectrofotometría Infrarroja (cm^{-1}).

CONTROLES EXPERIMENTALES		N	U	R	S	T	R	A	S
CUMARINA	VAINILLINA	1	3	E	G	K			
3400	3200	3400	3400	3400	3400	3400			
3050	2850	2980	3000	2980	3000	3000			
1990	2000	2950	2850	2950	2950	2950			
1960	1700	2850	2750	2850	2850	2850			
1930	1670	2700	1680	1740	2750	2750			
1820	1590	1740	1600	1700	1740	1700			
1790	1520	1700	1520	1660	1690	1600			
* 1730	1460	1660	1480	1600	1600	1520			
1710	1430	1600	1440	1520	1520	1500			
1670	1400	1520	1420	1450	1450	1460			
* 1620	1360	1450	1380	1400	1410	1410			
1600	1300	1400	1300	1300	1300	1300			
* 1560	1260	1380	1280	1270	1270	1280			
1480	1200	1300	1220	1160	1160	1220			
1450	1170	1260	1160	1100	1120	1170			
1400	1150	1160	1130	1040	1040	1140			
1280	1120	1120	1040	880	880	1050			
1260	1020	1040	970	800	810	880			
1230	860	870	940	740	750	840			
1180	800	820	880	700	640	810			
1150	730	800	870	630	600	760			
1120	700	740	820	600	530	740			
1110	630	630	790	500		640			
1020	580	600	740			600			
990		530	640			530			
950			600						
930			540						
890			460						
820									
750									
720									
600									
520									
490									
460									

* = Bandas características de las alfa-pirenas (Cumarina).

pectres (dos fracciones de vainillina) presentan las mismas bandas, lo que indica que se trata posiblemente de algún isómero de la vainillina, ya que los espectros son similares, pudiendo decir que no se trata de una adulteración con cumarina.

Finalmente el análisis por Resonancia Magnética Nuclear, demuestra que una de las fracciones (de migración más lenta) de la vainillina, presentó un Rf de 0.27 en capa fina, si es realmente vainillina, y la segunda fracción (de migración más rápida) es un isómero de vainillina e posiblemente etil vainillina; ya que los espectros de cada una son semejantes a excepción del grupo etoxilo (Figuras 14, 15, 16 y 17). Además este concuerda con la Figura No. 5, en que se presenta la sobreposición de la fracción V_1 y la Cumarina.

Es interesante observar que los espectros de las muestras sospechosas (Figuras 16 y 17), se comportan de manera muy similar, presentando la banda del grupo etoxilo, por lo que puede concluirse que hay una fuerte interferencia con el isómero de vainillina sintética, ya que de antemano se sabe que compuestos como la etil vainillina son utilizados individual e conjuntamente con la vainillina, para aumentar el poder saberizante de ésta última.

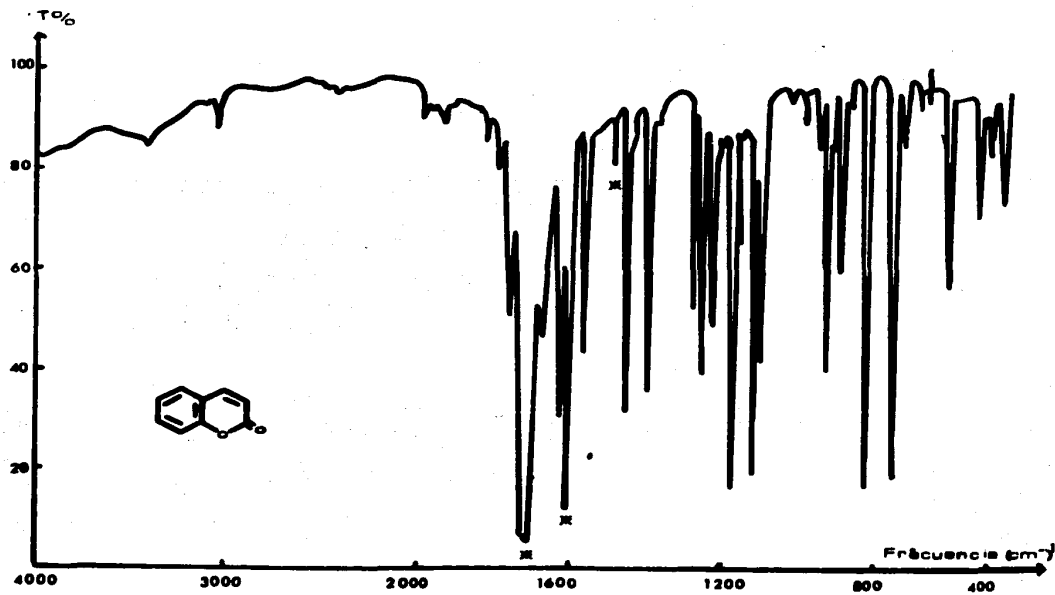


FIGURA No. 6 ESPECTRO INFRARROJO CORRESPONDIENTE A
C U M A R I N A
REALIZADO EN EL DEPTO. DE QUÍMICA ANALÍTICA. DEP. FAC. QUÍMICA. U.N.A.M.

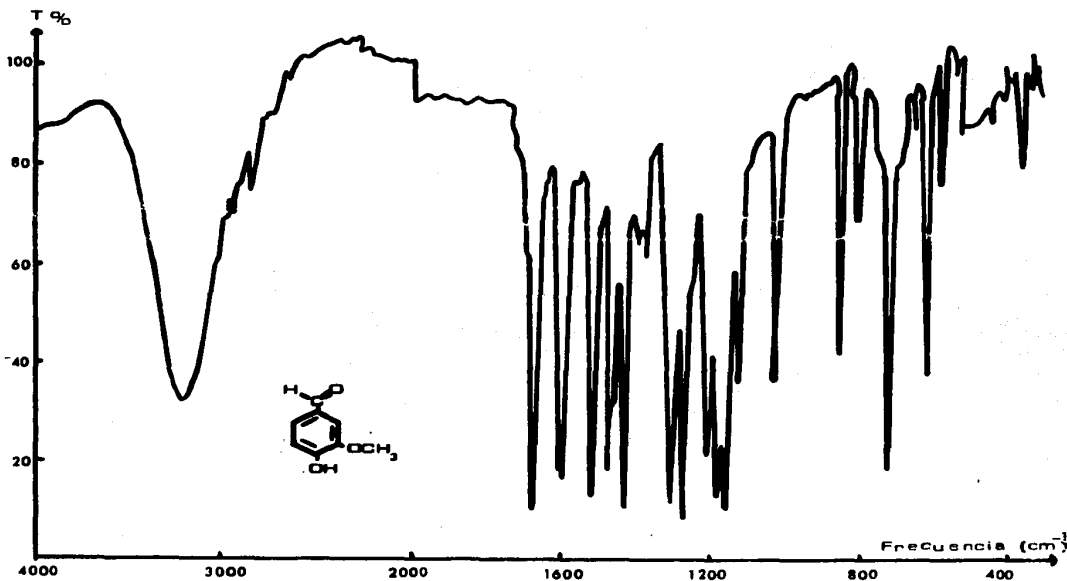


FIGURA No. 7 ESPECTRO INFRARROJO CORRESPONDIENTE A

V A I N I L L I N A

REALIZADO EN EL DEPTO. DE QUIMICA ANALITICA. DEPg. FAC. QUIMICA. U.N.A.M.

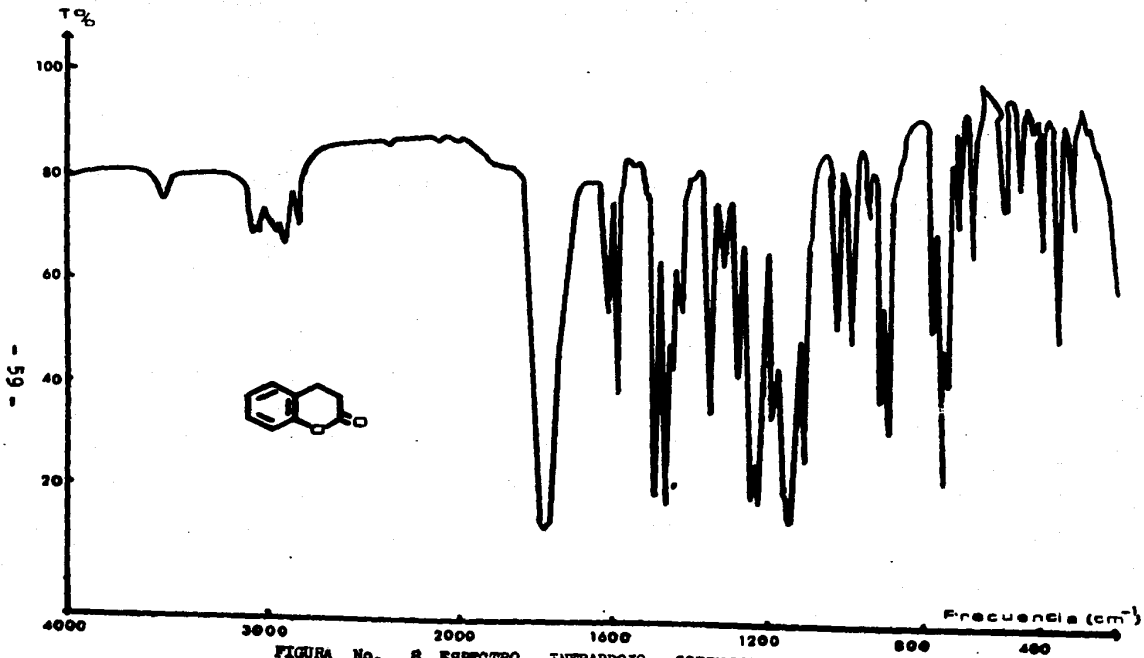


FIGURA No. 8 ESPECTRO INFRARROJO CORRESPONDIENTE A
D E H I D R O C U M A R I N A
REALIZADO EN EL DEPTO. DE QUIMICA ANALITICA, DEFg. FAC. QUIMICA. U.N.A.M.

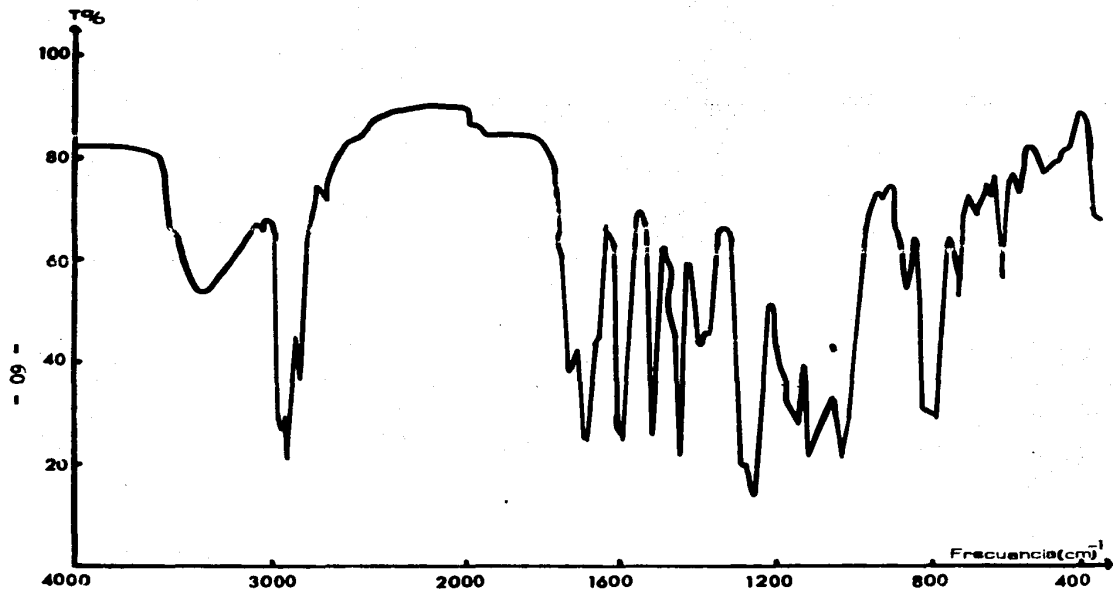


FIGURA No. 9 ESPECTRO INFRARROJO CORRESPONDIENTE A

M U E S T R A 1

REALIZADO EN EL DEPTO. DE QUÍMICA ANALÍTICA. DEPg. FAC. QUÍMICA. U.N.A.M.

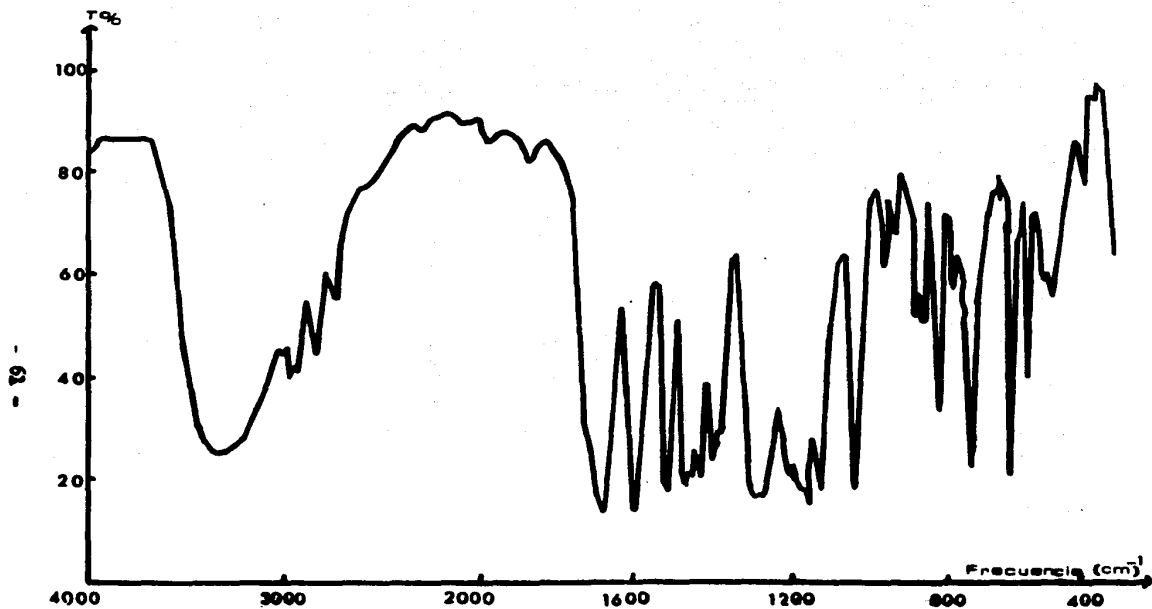


FIGURA No. 10 ESPECTRO INFRAROJO CORRESPONDIENTE A
M U E S T R A 3
REALIZADO EN EL DEPTO. DE QUIMICA ANALITICA. DESg. FAC. QUIMICA. U.N.A.M.

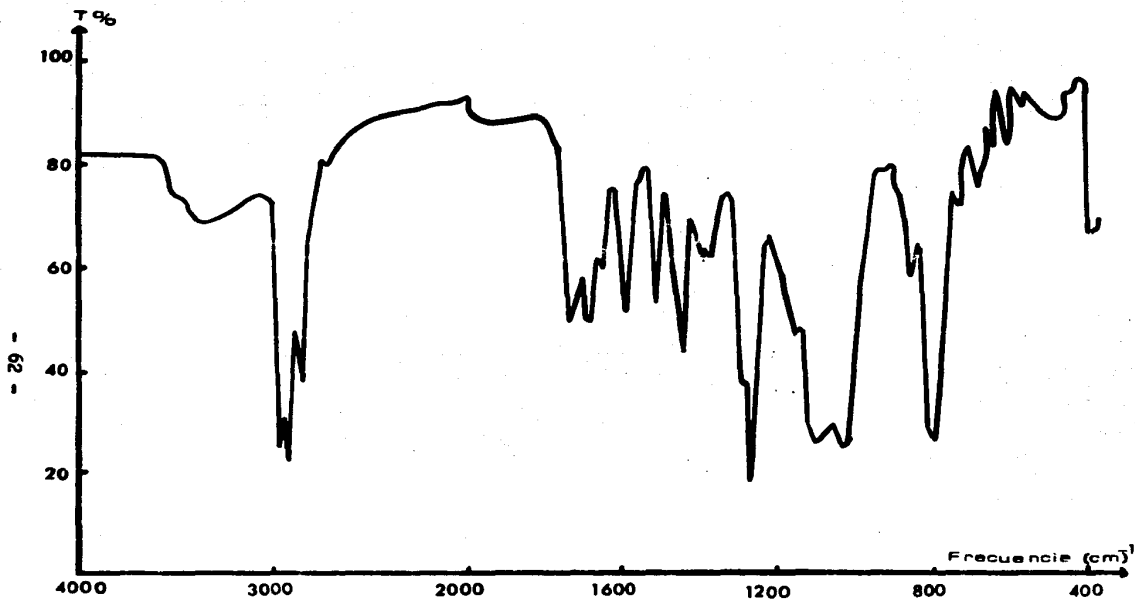


FIGURA No. 11 ESPECTRO INFRARROJO CORRESPONDIENTE A

M U E S T R A E

REALIZADO EN EL DEPTO. DE QUIMICA ANALITICA. DEPTO. FAC. QUIMICA. U.N.A.M.

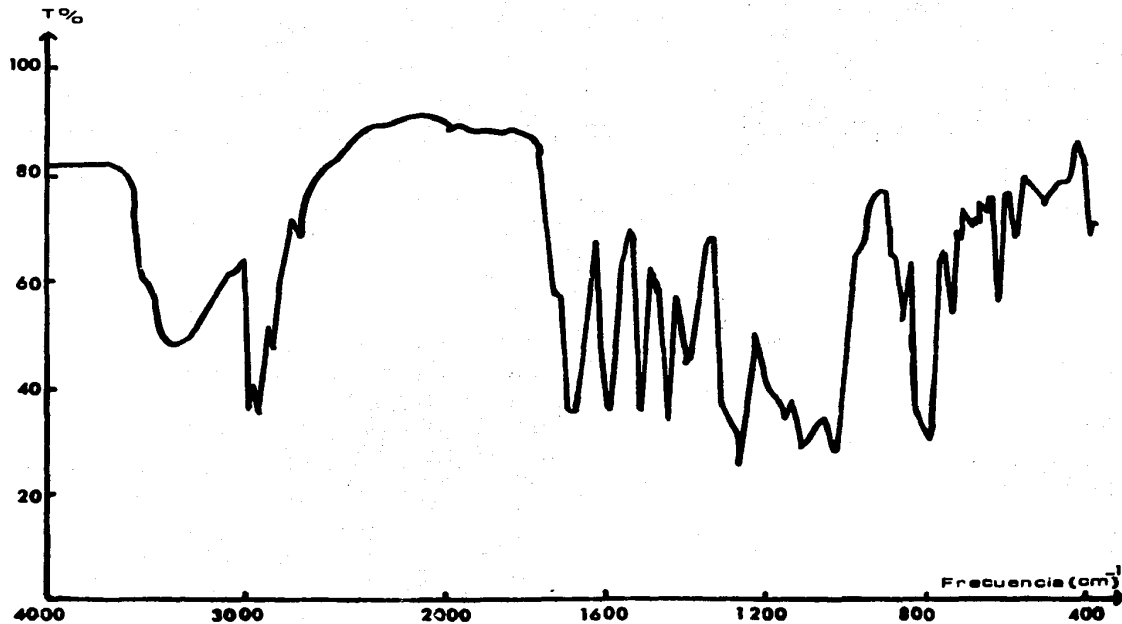


FIGURA No. 12 ESPECTRO INFRARROJO CORRESPONDIENTE A

M U E S T R A G

REALIZADO EN EL DEPTO. DE QUÍMICA ANALÍTICA. DEPTO. FAC. QUÍMICA. U.N.A.M.

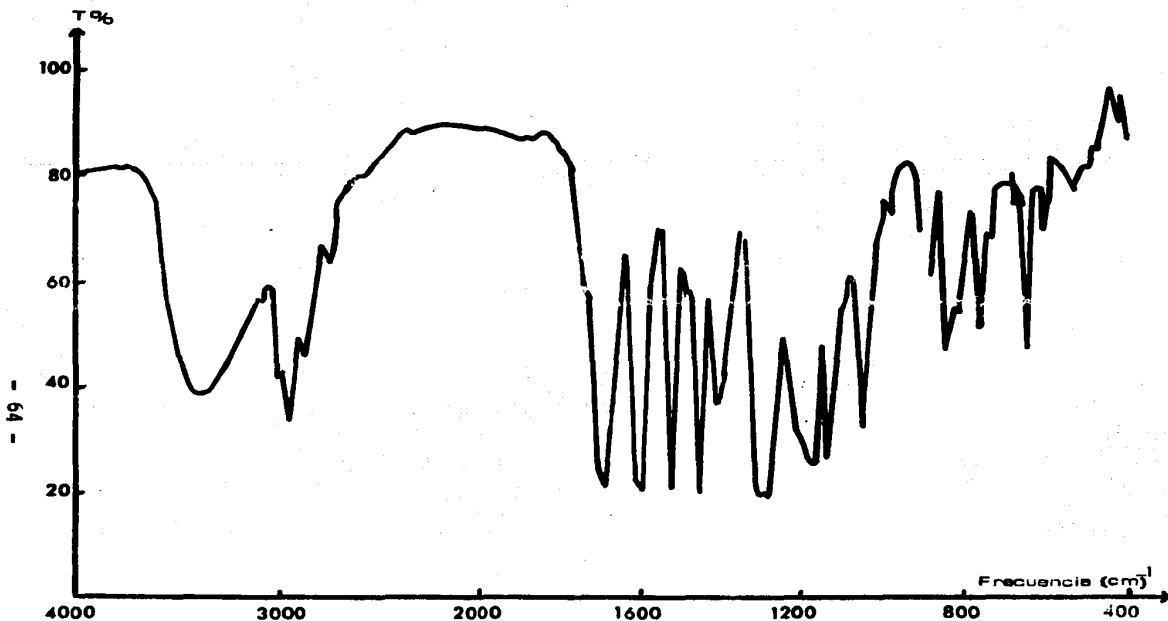


FIGURA No. 13 ESPECTRO INFRARROJO CORRESPONDIENTE A

M U E S T R A X

REALIZADO EN EL DEPTO. DE QUIMICA ANALITICA. DESP. FAC. QUIM. CA. U.N.A.M.

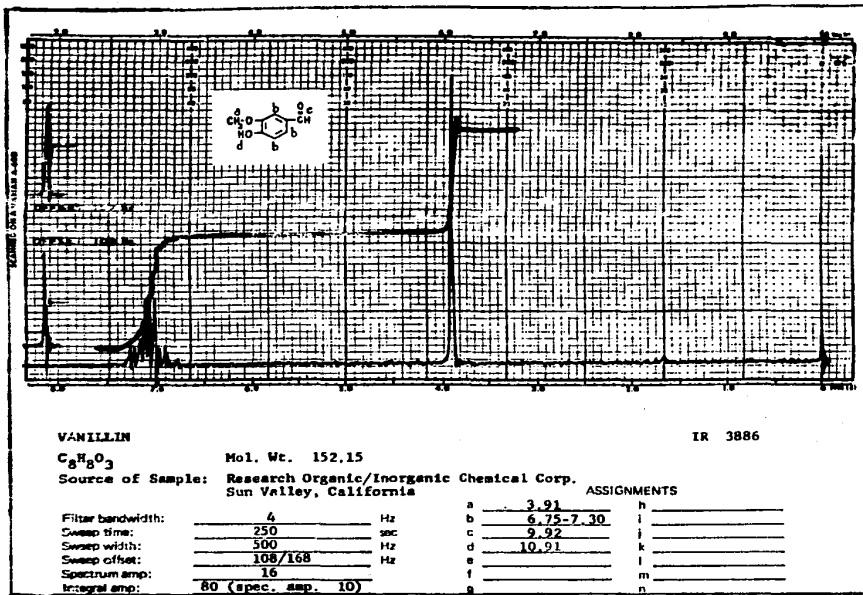


FIGURA No. 14. ESPECTRO DE RMN DE VANILINA DE REFERENCIA (27)

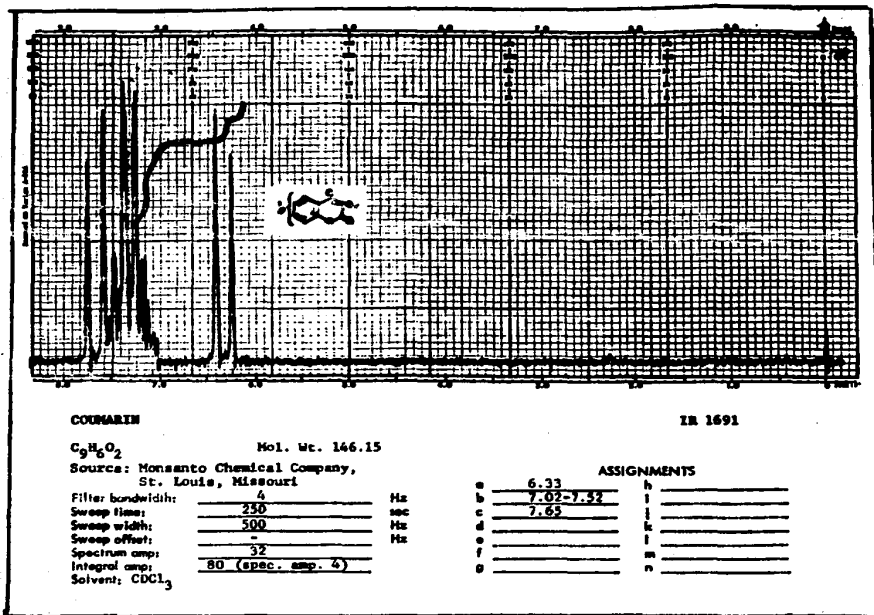


FIGURA No. 15 ESPECTRO DE RMN DE CUMARINA DE REFERENCIA (27)

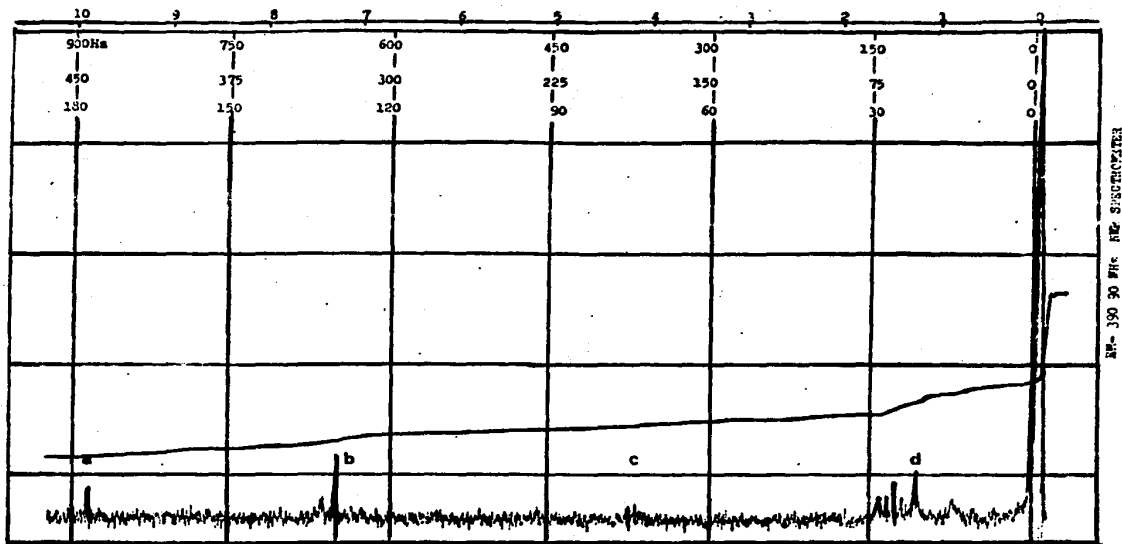


FIGURA No. 16 ESPECTRO DE RMN CORRESPONDIENTE A LA MUESTRA 1
a) Aldehído b) Aromático c) y d) Etóxilo
REALIZADO EN EL DEPTO. DE QUIMICA ORGANICA. DEFG. FAC. QUIMICA. U.N.A.M

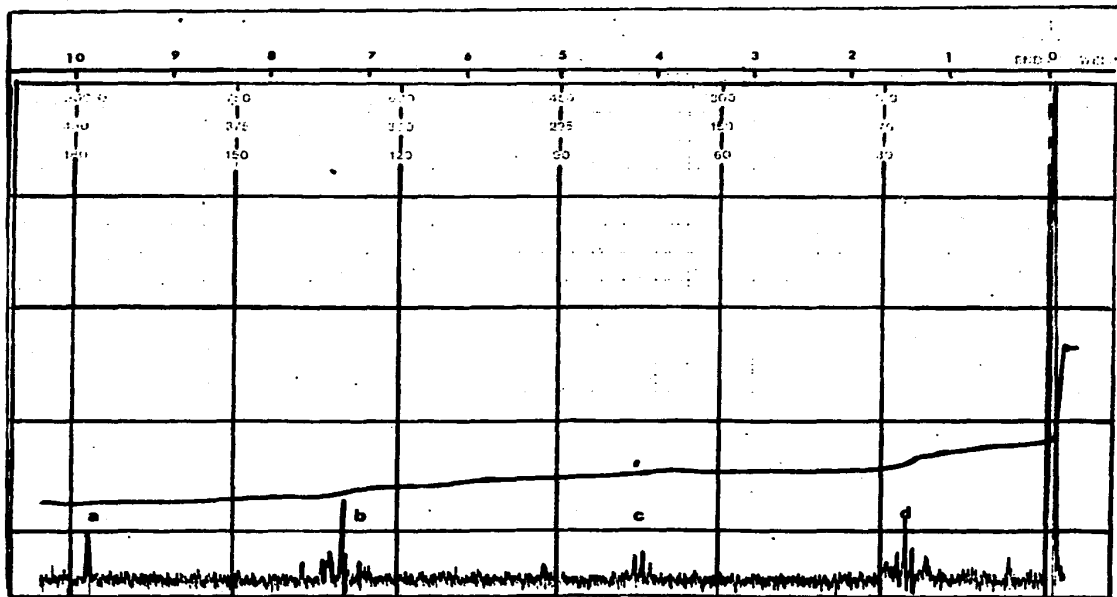


FIGURA No. 17 ESPECTRO DE RMN CORRESPONDIENTE A LA MUESTRA K

a) Aldehído b) Aromático c) y d) Etanol

REALIZADO EN EL DEPTO. DE QUIMICA ORGANICA. DEPg. FAC. QUIMICA. U.N.A.M.

A N E X O

Muestras Líquidas

- 1 La Anita
- 2 La Bandera
- 3 Delicia
- 4 La Flor de Vainilla
- 5 Melina
- 6 Pro- agre
- 7 Pasa

Muestras Sólidas

- A Flan Jell-e
- B Flan Kremel
- C Flan Gloria
- D Flan Prente
- E Pudín Royal
- F Pudín Prente
- G Pudín Kremel
- H Gelatina Gloria
- I Gelatina Rápida
- J Gelatina G-lux
- K Maizena
- L Pastel Tres Estrellas
- N Helado Royal

X**CONCLUSIONES**

- 1) De los métodos analíticos empleados en el presente trabajo, se puede decir que, la técnica de espectrofotometría visible, debe ser descartada para alcanzar los objetivos propuestos, ya que se presentan interferencias que reaccionan con el reactivo de diazotio, formándose el compuesto colorido con el que teóricamente se mediría la concentración de cumarina en los extractos comerciales de vainilla.

- 2) La técnica de cromatografía en capa fina unidimensional, no es lo suficientemente confiable como método analítico, bajo las condiciones establecidas, ya que se presentan semejanzas de valores de Rf y color de la mancha, que nos llevarían a resultados inciertos.

- 3) Es necesario aplicar técnicas más sensibles para poder confirmar la presencia o ausencia de cumarina en productos comerciales con sabor vainilla, ya que si se basara en resultados obtenidos por Espectrofotometría Visible y Cromatografía en capa fina, se correría el riesgo de obtener resultados falsos. Por ello se sugiere confirmar mediante Espectrofotometría Infrarroja y de preferencia por Resonancia Magnética Nuclear.

- 4) Adicionalmente puede concluirse que la totalidad de las muestras líquidas comerciales, presentan adulteración bajo el método de Espectrofotometría Visible, de las cuáles tres de ellas dan prueba positiva en Cromatografía en Casa Fina Unidimensional. Respecte a las tres muestras sólidas analizadas por Cromatografía Unidimensional, tres diferentes marcas presentan adulteración con cumarina.

- 5) Es probable que en la actualidad, algunos fabricantes de extractos comerciales de vainilla, hayan utilizado cumarina, e que otras marcas no analizadas en el presente trabajo, la estén utilizada en sus productos.

- 6) Por último, se puede decir que ninguna muestra de las analizadas en el presente trabajo, están adulteradas con cumarina.

XI BIBLIOGRAFIA

1. Beeth, N.A. Wasri, S.M. Robbins, J.D. Emerson, H.O. Jones, T.F. y DeEds, F. 1959. Urinary Metabolites of Coumarin and o-Coumaric Acid. J. Biol. Chem. 234: 946-948.
2. Christensen, E.H. 1972. The Toxic Substances List. U.S. Department of Health. National Institute for Occupational Safety and Health. Rockville, Maryland: 150 y 540.
3. Committee on Food Protection. 1973. Toxicants Occurring Naturally in Foods. National Academy of Sciences. National Research Council. Washington, D.C.: 453-454.
4. Congreso Latinoamericano de Química. 1960. Cédulo Latinoamericano de Alimentos. México: 260-266.
5. Desrosier, W.H. 1983. Elementos de Tecnología de Alimentos. C.E.C.S.A. México. 1a. edición: 689-695.
6. Douglas, J.S. 1971. Producing Vanilla Beans. Flavor Ind. 1971: 406-476.
7. Dirección de Economía Rural. 1934-1945. Monografías Comerciales de México. Secretaría de Agricultura y Fomento. 4 (72): 2-20.

8. Econetécnia Agrícola. Consumes aparentes de productos agrícolas. 1982. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Subsecretaría de Agricultura y Operación. Dirección General de Economía Agrícola. Vol. VII (9).
9. Evans, U.G. Gaunt, I.F. y Lake, B.G. 1979. Two-year Toxicity Study on Coumarin in the Baboon. Feed Cosmet. Toxicol. 17: 187-193.
10. Feuer, G. Gelberg, L. y Gibson, I.K. 1966. Liver Response Tests. VII. Coumarin Metabolism in relation to the inhibition of rat-liver glucose-6-phosphatase. Feed Cosmet. Toxicol. 4: 157.
11. Furia, E.T. y Bellanca, N. 1975. Penarelli's Handbook of Flavor Ingredients. CRC Press Inc. California. Vol. III : 109, 132 y 560.
12. Gangelli, S.D. Shilling, W.H. Grasse, P. y Gaunt, I.F. 1974. Studies on the Metabolism and Hepatotoxicity of Coumarin in the Baboon. Biochem. Sec. Trans. 2: 310-312.
13. Guenther, E. 1957. The Essential Oils. D. Van Nostrand Co. Inc. New York. 2: 361 y 659-667.
14. Heath, B.H. 1981. Source Book of Flavors. The AVI Publishing Co. Inc. Westport, Connecticut. U.S.A. 63-69 y 277-285.

15. International Organization of Food Flavor Indus - tries. Recommended Method 8 (1978). Coumarin in Certain Foods. Isolation by Extraction. Int. Flav. Food Add. 9 (5): 223.
16. Keighen, M. y Williams, T.R. 1961. The Metabolism of (3¹⁴-C) Coumarin. J. Med. Pharm. Chem. 3 (1): 25.
17. Leach, E.A. 1920. Food Inspection and Analysis. John Wiley and Sons. New York: 911-927.
18. Leewerfeld, C. y Back, P. 1978. Guía de las Hierbas y Especies. Ed. Omega S.A. Barcelona: 284.
19. López, M.E. 1961. Legislación Vigente en Materia de Salubridad y Disposiciones Conexas. Reglamento de Aditivos para Alimentos. Diario Oficial del 15 de febrero de 1958: 381.
20. Murray, H.D. 1982. The Natural COUMARINS. Occurrence, Chemistry and Biochemistry. John Wiley and Sons. N.Y.
21. Montoya, H.F. 1963. Tecnología en el cultivo de la Vainilla (folleto). Secretaría de Agricultura y Ganadería. Subsecretaría de Agricultura.
22. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 1955. 8a. edición: 320-321.

23. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 1984. 14. edición: 353-361.
24. Peña, M. 1986. Gaceta U.N.A.M. Organo Informativo de la Universidad Nacional Autónoma de México. 2 (45): 8-9 y 30.
25. Peucher, A.W. 1959. Perfumes, Cosmetics and Soaps. With Special Reference to Synthetics. Vol. I. D. Van Nostrand Co. Inc. Princeton, New Jersey. N.Y. 143-144 y 415-419.
26. Resenbaum, E.W. 1974. Encyclopedia of Food Technology. The AVI Publishing Co. Inc. Westport, Connecticut: 924-930.
27. Sadtler Research Laboratories. 1980. Standard Spectra Collection. Philadelphia. IR (270K y 18061K) y NMR (10407M y 21157M).
28. Shankaracharya, B.N. y Natarajan, P.C. 1973. Vanilla Chemistry, Technology and Uses. Indian Food Packer. 27 (3): 29-36.
29. Shilling, H.W. Grampton, F.R. y Lengland, C.R. 1969. Metabolism of Coumarin in Man. Nature. 221: 664-665.
30. Sellman, T. 1955. Farmacología y sus aplicaciones a la terapéutica y a la toxicología. Salvat. ed. México: 853.

31. Sullivan, G. 1981. Examination of Mexican Vanilla Extracts for Coumarin Adulteration. Part I. Vet. Hum. Toxicol. 23 (2): 89-91.
32. Sullivan, G. 1981. Examination of Mexican Vanilla Extracts for Coumarin Adulteration. Part II. Vet. Hum. Toxicol. 23 (3): 161-163.
33. Sullivan, G. 1981. Examination of Mexican Vanilla Extracts for Coumarin Adulteration. Part III. Vet. Hum. Toxicol. 23 (4): 249-251.
34. Sullivan, G. 1984. Major Aromatic Constituents in Mexican Vanilla Extracts. The Texas Journal of Sciences. 36 (1): 17-23.
35. Trkevník, M. Kules, M. Tabakevic, I. y Zecevic, M. 1976. Thin-layer chromatography of some coumarin derivatives. J. Chromatogr. 128: 227-230.
36. Valle-Vega, F. 1985. Toxicología de Alimentos. Documento Provisional del Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud (ECO), de la Organización Panamericana de la Salud (OPS)/ Organización Mundial de la Salud (OMS). Metepec, Edo. de México. México.
37. Varian Techtron Manual. Laboratory Safety. Analytical Methods for flame spectroscopy. Analytical procedures. Standard Addition Technique: 14-15.
38. Windholz, M. 1983. The Merck Index. 19 th. ed. Merck and Co. Inc. New York. U.S.A.

39. Youngken, W.H. 1959. Tratado de Farmacognosia. Ed. Atlante. México: 299-306, 570-572 y 613-614.
40. Zweig, G. y Sherma, J. 1972. Handbook of Chromatography. Vol. I. CRC Press. U.S.A.; 509.