



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA  
Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**“Determinación de vainillina en extractos obtenidos con microondas focalizadas y ultrasonidos acoplando la dilución y detección en línea”**

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

**Q. CLAUDIA VALDEZ FLORES**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Este proyecto de investigación fue reconocido con mención honorífica en la Categoría Profesional de Tecnología de Alimentos en la 30ª. Edición del Premio Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos otorgado por la empresa Coca-Cola y la realización del mismo fue posible gracias a la infraestructura del Laboratorio 105 del Edificio B de la Facultad de Química, así como al financiamiento concedido a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP).

## ÍNDICE

Resumen.....	4
Introducción.....	6

### I. ANTECEDENTES

A. Sinopsis histórica sobre la vainilla.....	8
B. Producción agronómica de la vainilla.....	12
C. Análisis químico de la vainilla.....	15
D. Análisis por Inyección en Flujo.....	21
E. Métodos de extracción de vainilla.....	28
a. Método Oficial Mexicano.....	31
b. Extracción Convencional Soxhlet.....	32
c. Extracción Asistida con Microondas.....	33
d. Extracción Asistida con Irradiación Ultrasónica.....	37

### II. DESARROLLO DEL TRABAJO

A. Equipos y aditamentos.....	40
B. Instrumental de laboratorio.....	40
C. Reactivos.....	40
D. Muestras de vainilla.....	41
E. Metodología experimental.....	41
a. Disolución de vainillina.....	41
b. Disolución de hidróxido de sodio.....	41
c. Disolución de verde de bromocresol.....	42
d. Configuración de análisis por inyección en flujo.....	42
e. Obtención de extractos naturales de vainilla.....	44

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Determinación del espectro de absorbanza de vainillina.....	46
B. Optimización de la configuración de análisis por inyección en flujo.....	47
a. Sistema de detección.....	47
b. Sistema de dilución.....	49
C. Elaboración de la curva de calibración de vainillina.....	52
D. Evaluación de la configuración de análisis por inyección en flujo.....	54
E. Control de datos analíticos de vainillina.....	56
F. Optimización de los procesos de extracción.....	58
a. Extracción Convencional Soxhlet ( <i>ECS</i> ).....	58
b. Extracción Asistida con Ultrasonidos ( <i>EAUS</i> ).....	59
c. Influencia de microondas y ultrasonidos sobre vainillina.....	62
d. Comparación entre procedimientos de extracción.....	63
e. Ensayos de recobro de vainillina.....	65
f. Ensayos de significancia entre procedimientos de extracción.....	67
G. Importancia y aplicaciones tecnológicas.....	69
IV. CONCLUSIONES.....	71
V. BIBLIOGRAFÍA.....	72
Anexos.....	85

## RESUMEN

La *Vanilla planifolia*, nativa de México, como legado agrícola mesoamericano es el único producto de importancia económica de la gran familia de las orquídeas; su autenticidad aromática proviene de la extracción de vainas curadas y la producción se destina sobre todo a la industria de alimentos, perfumería y farmacéutica, entre otras.

En el presente trabajo, se estableció una configuración de análisis por inyección en flujo (FIA) que acopla la dilución y detección en línea, para la cuantificación rápida y económica de la vainillina proveniente de extractos de vainas de vainilla comercial; a partir de los procedimientos óptimos de la aplicación de microondas focalizadas y ultrasonidos. Los resultados de extracción se compararon con los datos obtenidos por los métodos convencionales: Soxhlet y maceración de la Norma Mexicana (NMX-FF-074-1996-SCFI).

El desarrollo metodológico incluyó la elaboración de la curva de calibración de vainillina a 347 nm, empleando disoluciones estándar en un intervalo de concentración de 200 a 2000 mg/L. El límite de detección fue de 66.5 mg/L, el de cuantificación de 221.5 mg/L y el coeficiente de regresión de 0.9995 para la ecuación  $A = (0.00108 \pm 0.000038) c + (0.1072 \pm 0.04695)$ ; donde A es la absorbancia medida y c la concentración de vainillina. Los ensayos sobre repetibilidad ( $s_r$ ) y reproducibilidad ( $s_{WR}$ ) de la configuración FIA mediante el análisis de varianza (ANOVA) permitieron establecer que la precisión dentro del laboratorio fue de 3.79 y 3.03%, respectivamente, para un estándar de 1200 mg/L; en tanto que para un estándar de 300 mg/L fue de 9.06 y 9.14%, respectivamente.

La evaluación correspondiente de los extractos de vainas de vainilla obtenidos mediante diferentes métodos de extracción, permitió concluir que la concentración más alta de vainillina se registró aplicando microondas focalizadas ( $30.75 \pm 1.57$  mg/g); mientras que con ultrasonidos ( $25.92 \pm 0.78$  mg/g) se obtuvo una diferencia

de 16% en el mismo periodo de extracción (80 minutos). Cuando se empleo Soxhlet, el tiempo de extracción es 83% más largo y la concentración de vainillina disminuyó (hasta 32%) considerando que el extractante es 100% etanol. Por otro lado, la concentración de vainillina en los extractos al 70% de etanol, usando microondas focalizadas y ultrasonidos, son dos veces mayores además de que se redujo el tiempo (98%) respecto al método oficial mexicano (*NMX*).

## INTRODUCCIÓN

En todo el mundo es bien apreciado el proceso de producción de la vainilla, puesto que después del mantenimiento especializado y la polinización sofisticada, la obtención de un fruto con propiedades organolépticas incomparables representa una recompensa. En distintas fuentes, este producto tan importante, ha recibido extensas discusiones de orden económico (origen, clasificación, cultivo, calidad y uso); además de la atención de algunos investigadores, en el afán de descubrir desde los procesos de la biología floral y elucidación de la composición química hasta la variación genética en distintas plantaciones.

Dado que el factor determinante es la utilidad que ha adquirido en diferentes ramos industriales, ha existido la preocupación por establecer índices de calidad que enmarcan aspectos de textura final y el contenido del componente químico mayoritario: la vainillina. Para determinar la cantidad relativa de vainillina sobre otras especies fenólicas, en el trabajo analítico las aportaciones metodológicas involucran pasos previos de extracción combinados con algún tipo de separación y detección; lo cual implica gran consumo de tiempo, aislamientos laboriosos e instrumentación costosa.

En la actualidad existe una tendencia hacia la propuesta de protocolos con amplio soporte técnico; además del compromiso particular basado en la sencillez y reducción de costos. No obstante, es imprescindible no perder de vista que estos rasgos son aplicables, cuando se pretende emitir resultados sobre un analito de interés para un gran número de muestras. De ahí que el desarrollo de una configuración empleando el análisis por inyección en flujo (FIA) sea útil para la determinación de vainillina en extractos de vainas de vainilla.

En México, el manejo de todo el proceso para la obtención de extractos naturales de vainilla es una tradición que está bien establecida por la Secretaría de Comercio y Fomento Industrial (NMX-FF-074-1996-SCFI) y considerando que

la extracción Soxhlet a lo largo del tiempo se ha señalado como guía de referencia en cuanto a matrices sólidas; la implementación de energías alternativas como microondas focalizadas e irradiación ultrasónica requieren la evaluación correspondiente.

## I. ANTECEDENTES

### A. Sinopsis histórica sobre la vainilla

La vainilla es una especie rara que con frecuencia se le cita como una planta dispersa en áreas tropicales, aunque se desconoce cuándo se empezó a cultivar. Su origen está íntimamente ligado a los pueblos autóctonos de Mesoamérica, donde además de una valoración estética por adjudicarle propiedades rituales y curativas; los aromas, saborizantes y perfumes eran tenidos en gran estima (Bruman, 1948).

Torquemada en 1723, entre otros autores, afirman que la vainilla era parte del tributo que los totonacos y otros pueblos indígenas ofrecían a los aztecas ya en los reinados de Izcóatl (1427-1440), Moctezuma Ilhuicamina (1440-1469) y Moctezuma Axacayatl (1469-1482); pero en realidad no existen registros bien documentados de su uso hasta después de la conquista (Hágsater et al, 2005).

La tradición terapéutica prehispánica se refleja en el manuscrito del médico azteca Martín de la Cruz, que en 1552 creó la primera herbolaria azteca. Posteriormente traducida al latín "*Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*" por el estudiante Juan Badiano, donde la vainilla fue ilustrada y registrada con su nombre náhuatl: *tlixochitl*, en referencia al color del fruto. Este escrito – el códice de la Cruz-Badiano – menciona que las flores, o más bien los frutos, se molían con otros componentes aromáticos y se usaban como amuleto alrededor del cuello (Mancilla, 1997).

En la *Historia General de las Cosas de la Nueva España*, el fraile Bernardino de Sahagún menciona que la corte azteca consumía grandes cantidades de chocolate y como era la única bebida consumida por Moctezuma (Lawler, 1984; Pérez-Silva et al, 2006), se usó la vainilla en la receta de preparación de cacao (Havkin y Dorn, 1997). Existen algunos indicios de haber sido cultivada en el jardín

botánico de Oaxtepec, adonde llegó procedente de Cuetlaxtlan – actualmente Cotaxtla, Veracruz – (Hágsater et al, 2005).

El uso medicinal de la vainilla durante el periodo de la conquista también está documentado en las crónicas de la época y en el *“Rerum Medicarum Novae Hispaniae Thesaurus seu Plantarum, Animalium, Mineralium Mexicanorum Historia”* de Francisco Hernández (1651) que describe: “...en el mercado de Tenochtitlán, o tal vez en Tlaltelolco, había un sitio especialmente designado a los vendedores de chocolate y sus saborizantes, incluida la vainilla” (Mancilla, 1997; Hágsater et al, 2005).

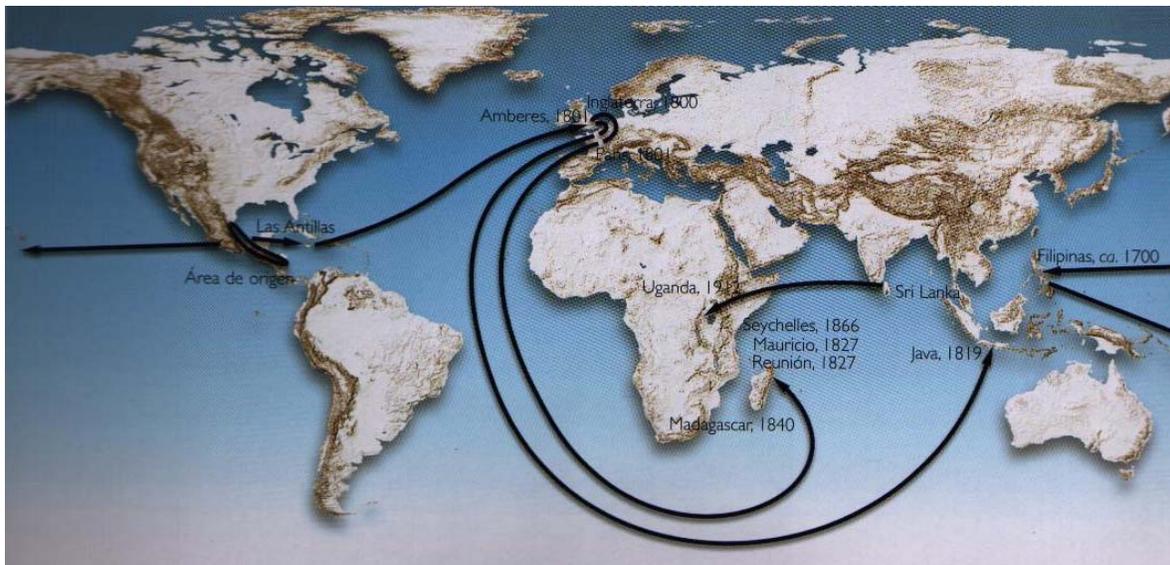
Durante el periodo colonial la demanda de vainilla se incrementó, porque el consumo de chocolate se popularizó en Europa. España monopolizó en un principio el uso de la vainilla exportada y se sabe que en la segunda mitad del siglo XVI algunas fábricas de la península ibérica ya preparaban chocolate aromatizado con vainilla y canela (Lawler, 1984).

Hacia el final del periodo virreinal, Humboldt (1811, 1812) preparó un informe detallado del comercio de vainilla, en el que mencionaba que Misantla, seguida de Teutila, Papantla, Acayucan y San Andres Tuxtla eran, en orden de importancia las zonas productoras. La vainilla de Teutila, en Oaxaca, era muy apreciada y se menciona ya en documentos mercantiles de 1738 (Bruman, 1948). Papantla, y en general el Totonacapan, fueron posteriormente la zona productora de vainilla por excelencia. De hecho su cultivo en plantaciones se menciona a partir de 1767, aunque su comercio, tal vez con frutos colectados de plantas silvestres, está archivado desde 1743 (Hágsater et al, 2005).

Por más de tres siglos, México fue el único país productor de vainilla en el mundo. Muchos esfuerzos fueron hechos en otros países tropicales pero fallaron ya que los vainillales crecían y florecían, pero los frutos no eran producidos (Havkin y Dorn, 1997); debido a que la polinización en su estado natural es llevada

a cabo por una pequeña abeja euglosina de la familia melipona, o una variedad de colibrí oriundo de la región (Williams, 1982; Hågsater et al, 2005).

La migración o expansión del cultivo de la vainilla por el mundo está relativamente bien documentada (**Figura 1**). En 1739, Phillip Millar, el “Hortulanum Princeps” y su superintendente del jardín de los farmacéuticos de Chelsea, escribió en *The Second Volume of the Gardeners Dictionary* que una planta de vainilla recolectada en Campeche por Robert Millar le fue enviada y, aunque creció por un tiempo, murió posteriormente (Bruman, 1948; Hågsater et al, 2005).



**Figura 1.** Propagación botánica de la vainilla por el mundo.

En 1800 fue introducida a Inglaterra por el marqués de Blandford una nueva planta que floreció en 1807 en la colección de Charles Greville, espécimen de donde botánicamente esta especie adquirió el nombre de *Vanilla planifolia*. De esta planta se mandaron esquejes a los jardines botánicos de París, Amberes y luego a las colonias holandesas y francesas en los trópicos (Hågsater et al, 2005).

Hacia 1830, el jardinero Neumann que trabajaba en los invernaderos del Museo de Paris consigue desarrollar el procedimiento de polinización artificial;

aunque en la Isla de Reunión según cuenta la leyenda, en 1841, un esclavo de doce años llamado Edmond Albius encontró el secreto de la reproducción asistida (Havkin y Dorn, 1997). Debido a la estructura de la flor, sin la mano del hombre la flor no puede ser fecundada, pues en la morfología hay una pequeña lengüeta (rostelo) que impide la comunicación entre los órganos masculino y femenino, por ello el plantador debe manipular las flores una por una, con la ayuda bien de un palito de bambú, vara de limonero o una aguja, levanta el rostelo liberando el polen en el estigma y después se presiona la flor para que se efectúe la fecundación (Williams, 1982). Este método de polinización que es aún usado comercialmente, permitió la fundación de la industria de la vainilla e infringió el monopolio de México.

Usando la técnica descrita, los franceses iniciaron el cultivo de la vainilla en muchas de las islas del Océano Índico. Las plantaciones de vainilla fueron establecidas en Reunión, Mauricio, Madagascar, Comores, Thafila, Brasil, Jamaica y otras islas en el oeste de India (Havkin y Dorn, 1997). Sin embargo, la vainilla parece haber tenido también una ruta migratoria de México a Filipinas, durante el periodo en que ambos países eran regidos por la Corona española y existía la Nao de Manila. Los datos históricos sugieren que su progreso no fue posible, pero algún esqueje se llevó a la isla de Tahití y aún se cultiva (Hágsater et al, 2005).

La agronomía de la vainilla presenta particularidades muy notables, pues exige ciertos factores de adaptación climática, además de las características propias del cultivo que trascienden en la calidad del producto con el proceso de curado o beneficiado (**ANEXO A**). Pero también estos sistemas agroforestales presentan muchas ventajas ambientales; debido a que son cultivos perennes y longevos que mantienen el paisaje forestal, la biodiversidad local y la capacidad de regeneración del bosque, además como requieren mucha mano de obra es una actividad que se convierte en una vocación productiva de enorme valor (Hágsater et al, 2005).

## B. Producción agronómica de la vainilla

Aunque la vainilla inició en México, se han presentado importantes variaciones a lo largo del tiempo y la producción no es significativa en el contexto mundial; pero continúa siendo un negocio lucrativo cuando se respetan las estrictas necesidades de la planta. En la actualidad de 80 a 90% de la producción se encuentra en manos de campesinos cuyos vainillales son menores de 1 ha, con alrededor de 50 mil personas involucradas en su cultivo y manejo (Havkin y Dorn, 1997; Mancilla, 1997; Hágsater et al, 2005).

La recopilación de los datos más recientes en la **Tabla 1** ilustra la evolución de las exportaciones mexicanas de vainilla de los últimos años por país destino (INEGI, 2001 – 2005); encontrando a E. U. A. como el comprador más importante.

**Tabla 1.** Comercio exterior de vainilla de México definida por fracción país.

PAÍS	2000		2001		2002*		2003		2004	
	Kg	Miles US\$	Kg	Miles US\$	Kg	Miles US\$	Kg	Miles US\$	Kg	Miles US\$
Alemania	3,314	181	-	-	-	-	3,007	442	2,305	907
Australia	13	1	12	2	-	-	50	3	-	-
Brasil	150	10	150	24	-	-	100	30	-	-
Canadá	50	3	-	-	-	-	1,072	162	-	-
Cuba	-	-	-	-	-	-	2,330	8	15,207	35
España	78	4	95	15	-	-	120	25	100	45
E. U. A.	102,508	311	131,113	696	34,838	59	124,299	807	86,906	211
Francia	799	53	5,647	771	201	29	4,592	828	1,156	343
Países no declarados	30,265	60	15,491	52	3,200	19	4,737	21	19,539	65
<b>TOTAL</b>	<b>137,177</b>	<b>623</b>	<b>152,508</b>	<b>1,560</b>	<b>38,239</b>	<b>107</b>	<b>140,307</b>	<b>2,326</b>	<b>125,213</b>	<b>1,606</b>

\* Enero – Marzo

La zona vainillera en el país, está localizada entre los municipios de Coatzintla, Tecolutla, Papantla, Cosquihui, Gutiérrez Zamora, Nautla, Martínez de la Torre y

Misantla, en el Estado de Veracruz que es el centro de distribución. El 70% de la producción de Veracruz es originaria de Papantla, ya que cuenta con 152 comunidades y 1500 productores de vainilla. Otros estados donde también se cultiva la vainilla pero en menor proporción son: Puebla, San Luis Potosí, Chiapas, Tabasco y Oaxaca (Rosas, 1984; Hernández, 1997; Mancilla, 1997).

En el océano Índico las principales regiones de cultivo son Madagascar, Comores y Reunión, las vainas de esta área son llamadas Borbón. Indonesia es otra región que cada vez incrementa la producción y la calidad de vainilla. Las vainas de vainilla de Tahití, representan otra variedad y son cultivadas principalmente en la isla francesa de Polinesia. En Tonga y muchos otros países con climas adecuados también está siendo cultivada, pero aún son regiones de producción minoritarias (Havkin y Dorn, 1997; Rakotoarisoa y Shapouri, 2001).

Se estima una producción mundial de vainas de vainilla en el intervalo de 900 a 2000 toneladas anuales (Hartman et al, 1992; Havkin y Dorn, 1997; Podstolski et al, 2002), de las cuales aproximadamente el 75% se constituye por vainilla Borbón (Hartman et al, 1992). En 1997 Estados Unidos importó el 50% de la producción mundial de vainilla; mientras Francia y Alemania importaron 10 y 7%, respectivamente (Rakotoarisoa y Shapouri, 2001). La producción de vainilla genera a los países exportadores divisas alrededor de 80 millones de dólares anuales, pues el precio en el mercado de las vainas de vainilla ha variado en el intervalo de US\$ 70 a 90 por kilogramo (Ramachandra y Ravishankar, 2000) que tal vez ha incrementado en los últimos años.

Únicamente un tercio de la cosecha anual se vende al por menor, el resto sirve para obtener extractos naturales de vainilla y otros derivados (Mancilla, 1997). En el mercado cada vez se recurre más a la vainilla como el saborizante más popular del mundo (Havkin y Dorn, 1997). Además de las aplicaciones tecnológicas en cosméticos, perfumes y farmacéuticos (Anklam et al, 1997; Rong et al, 1998; Luque et al, 2000; Walton et al, 2003; Bettazzi et al, 2006).

La producción de vainillina natural y su contraparte sintética excede grandemente cualquier otro condimento (Hartman et al, 1992). La fuente y costo de la vainillina varía de extractos naturales caros de vainas de la orquídea a vainillina sintética y relativamente barata (Boyce et al, 2003). El valor de la vainillina extraída de vainas de vainilla se calcula entre US\$ 1200 a 4000 por kilogramo, tal costo se debe a que para producir 1 Kg de vainillina es necesario cosechar 500 Kg de vainas de vainilla, lo cual implica la polinización de cerca de 40 000 flores (Ramachandra y Ravishankar, 2000); en contraste al precio del sustituto sintético que es menor a US\$ 15 por kilogramo (Walton et al, 2003).

Así pues, como los requerimientos agro-climáticos, el cultivo intenso, el curioso manejo de polinización, la recolección y el curado de las vainas limita la producción mundial y encarece los precios notablemente; la creación de imitaciones y productos adulterados han sido promovidos. Por lo tanto, es común que la composición de los saborizantes sintéticos se simplifique a etil vainillina y vainillina (Boyce et al, 2003; Bettazzi et al, 2006).

En el mundo el consumo anual promedio de vainillina es de 12000 toneladas, pero menos del 1% proviene de vainilla natural. Por lo tanto, el resto de la demanda de vainillina es sintetizada económicamente por métodos químicos usando materiales tales como coniferina, guayacol, eugenol y lignina, o más recientemente a partir de procesos biotecnológicos o bioquímicos con precursores como ácido felúrico, isoeugenol, eugenol o fenil pronanoide (Havkin y Dorn, 1997; Yoshida et al, 1997; Luque et al, 2000; Ramachandra y Ravishankar, 2000; Walton et al, 2003; Bettazzi et al, 2006).

### C. Análisis químico de la vainilla

El laborioso proceso de curado de las vainas verdes, donde la ruta de biosíntesis aún no es bien entendida (Dignum et al, 2004); pero cuya diversidad de reacciones genera un perfil heterogéneo de compuestos, ha motivado el estudio de la vainilla en todo el mundo.

En este contexto, la importancia de la composición química se ve reflejada en el hecho de que las diferentes variedades de vainilla presenten una composición con diferencias significativas en relación al origen (Mancilla, 1997). Estas determinaciones son limitadas porque las variaciones geográficas, estacionales, agrícolas y de especie afectan la química resultante de las vainas de vainilla (Hartman et al, 1996).

Generalmente, las vainas curadas contienen proteínas, azúcares, celulosa, ácidos orgánicos, vainillina (**ANEXO B**) y otros fenoles monohidratados, aceites fijos, ceras, resinas, gomas, pigmentos, minerales, aromáticos volátiles y aceites esenciales. Los mayores constituyentes responsables del aroma y sabor de la vainilla son volátiles como carbonilos, alcoholes aromáticos, ácidos aromáticos, esterres aromáticos, fenoles, alcoholes alifáticos, lactosas, hidrocarburos aromáticos y alifáticos, terpenoides, heterociclos, etc. Los constituyentes no volátiles que imparten el sabor característico de la vainilla son taninos, polifenoles, resinas y amino ácidos libres. Todos estos constituyentes dan un delicado, rico y dulce aroma con rasgos balsámicos. El contenido de ácidos grasos de vainilla es de 45 a 150 g/Kg, de donde el ácido oleico y el ácido palmítico son mayoritarios. El contenido de azúcar en vainas curadas está en el rango de 70 a 200 g/Kg, principalmente constituido por glucosa y fructuosa, con trazas de sucrosa (Ramachandra y Ravishankar, 2000).

Rutinariamente las investigaciones analíticas, son llevadas a cabo sobre las vainas de vainilla para identificar los componentes responsables de desarrollar su

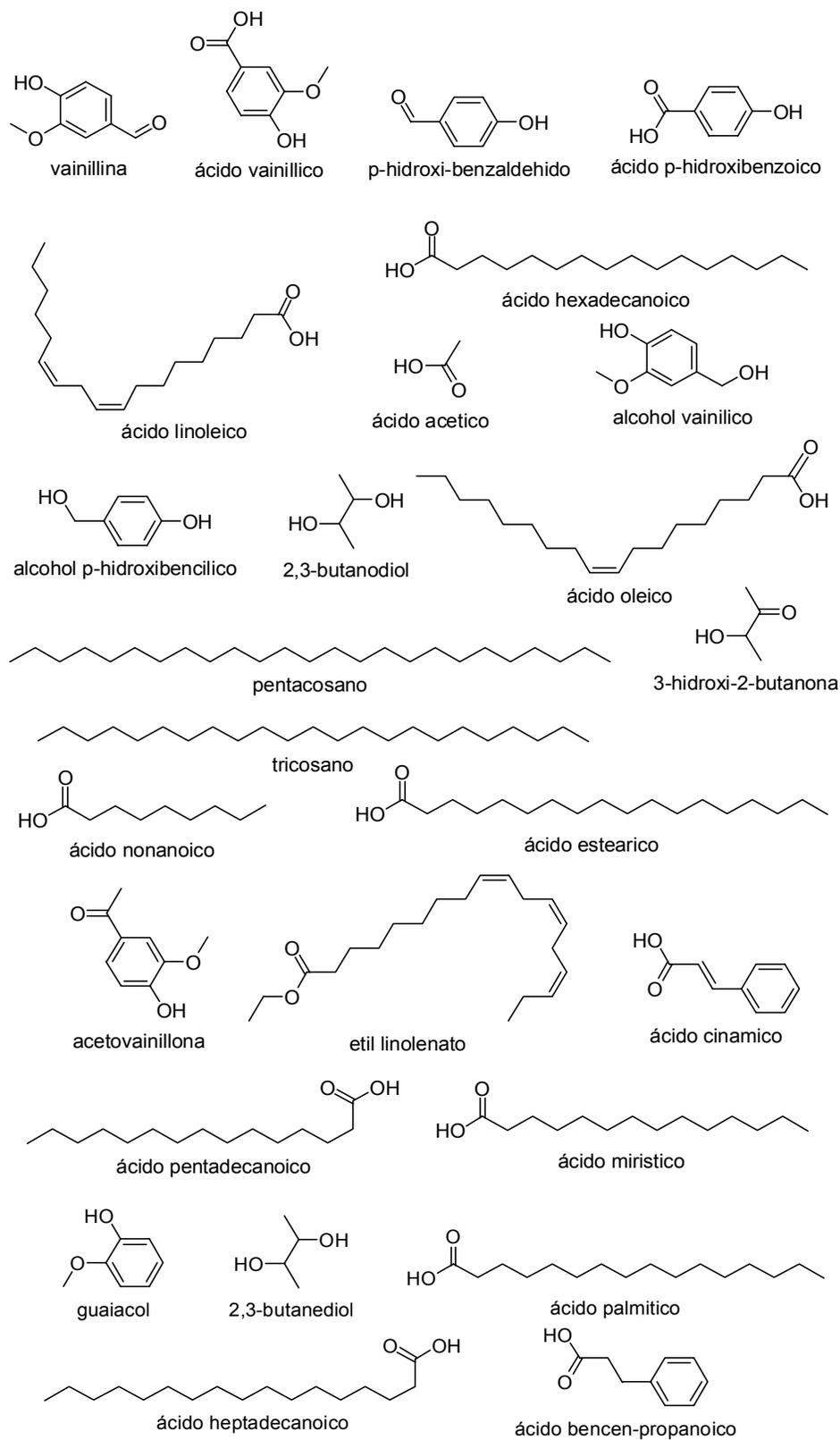
delicado aroma y sabor único (Luque et al, 2000). De acuerdo a la revisión reciente, se reportan entre 100 hasta 250 compuestos en los extractos naturales de vainilla según el tipo de análisis químico y la procedencia de las vainas. Sin embargo, solamente 26 se presentan en concentraciones mayores a 1 mg/Kg y muchos otros están presentes en cantidades traza (**Figura 2**). Los cinco constituyentes más importantes son: vainillina (2 - 2.8%); p-hidroxibenzaldehído (0.2%); ácido vainillico (0.2%); ácido p-hidroxibenzoico (0.02%) y ácido acético (0.02%) (Anklam et al, 1997).

Al respecto se cuenta con datos generados por muestras de vainas de vainilla de varias fuentes geográficas: Madagascar, Reunión, Tonga, Comores y Tahití. En la **Tabla 2** se resume el análisis evaluado para la definición de criterios analíticos y diferenciación de calidad de producción (Fayet et al, 1987).

**Tabla 2.** Porcentaje calculado sobre vainas de vainilla de varios lugares geográficos.

<b>Origen</b>	<b>Vainillina</b>	<b>p-hidroxibenzaldehído</b>
Madagascar	1.85 – 2.25	0.125 – 0.163
Reunión	1.38 – 3.26	0.095 – 0.201
Tonga	1.58 – 2.75	0.072 – 0.149
Comores	2.09	0.152
Tahití	0.62-1.52	0.085 – 0.120

Varios factores tal como especie de la planta, condiciones de crecimiento, nutrimentos del suelo, madurez de cosecha y método de curado tienen que ser tomados en consideración para determinar la concentración relativa de los constituyentes de la vainilla (Ramachandra y Ravishankar, 2000). La proporción de vainillina/p-hidroxibenzaldehído, que es frecuentemente usada como indicativo para autenticar extractos naturales debe guardar una relación entre 10.9 y 18.4 (Boyce et al, 2003; Longares y Cañizares, 2006).



**Figura 2.** Compuestos químicos principales presentes en extractos naturales de vainilla.

Cuantitativamente la vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído) es el componente mayoritario presente en las vainas, pero análisis detallados envuelven la determinación de las proporciones relativas de vainillina y especies fenólicas adicionales tal como ácido vainillico, p-hidroxibenzaldehído, ácido p-hidroxibenzoico u otros (Fraisse et al, 1984; Fayet et al, 1987; Carnero et al, 1990). Típicamente, la vainillina esta presente en concentraciones relativas muy altas a los otros componentes (de 10 a 100 veces); y debido a que es el material saborizante más importante y ampliamente usado en el mundo (Bettazzi et al, 2006) para propósitos comerciales, es un indicador de calidad de la vaina de vainilla. De acuerdo a estudios realizados por diferentes grupos de investigación, la vainillina representó el 50% en vainilla de Bourbon y 85% en vainilla de México, del total de volátiles cuantificados (Pérez-Silva et al, 2006).

Los criterios analíticos se refieren a la caracterización y/o a la dosis de constituyentes presentes en las vainas de vainilla, extractos naturales y todo tipo de muestras alimenticias que contengan este aditivo.

Para análisis de rutina de los extractos de vainilla la estrategia analítica envuelve la separación usando cromatografía de líquidos de alta resolución con detección ultravioleta (Herrmann y Stöckli, 1982; Fraisse et al, 1984; Thompson y Hoffmann, 1988; Osamu y Tetsuo, 1996; Anklam et al, 1997; Boyce et al, 2003). Otros utilizan cromatografía de gases con detección por ionización de flama, espectrometría de masas u olfatometría (Fraisse et al, 1984; Fayet et al, 1987; Sostaric et al, 2000; Pérez-Silva et al, 2006). También existen protocolos de análisis para las vainas de vainilla basados en la desorción térmica (Hartman et al, 1992) y microextracción en fase sólida (Sostaric et al, 2000) acoplado de manera directa a cromatografía de gases – ionización de flama o espectrometría de masas, para proporcionar información valiosa acerca del perfil aromático de la vainilla.

La identificación de estos compuestos se dirige hacia la detección de la adulteración en vainilla natural por sustitutos sintéticos, pues se considera que el más difícil objetivo químico es proteger la integridad y por lo tanto la calidad de este producto porque existe una relación directa sobre la salud del consumidor.

La evidencia más definida para la adulteración es obtenida en espectrometría de masas por la proporción del isótopo  $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$  o análisis de deuterio por RMN. La técnica de análisis de isótopo estable está basada en el hecho de que la proporción entre carbono 13 y carbono 12 es menor en vainillina sintética que en vainillina natural. En estos términos el valor de carbón fósil denotado por  $\delta_{\text{PDB}}^{13}\text{C}$  (delta Pee Dee Belemnite) para vainillina natural es de  $-16$  a  $-21$ ; mientras que para vainillina sintética adquiere valores de  $-27$  a  $-31$  (Fayet et al, 1987; Sostaric et al, 2000; Walton et al, 2003). Sin embargo, el problema de adulteración es principalmente confinado al análisis de extractos de vainilla y no a las vainas de vainilla (Hartman et al, 1996).

En un intento de identificar los compuestos primarios de los extractos de vainilla con respecto a imitaciones, se han emitido metodologías tal como electroforesis capilar (Bütehorn y Pyell, 1996; Pyell et al, 2002; Boyce et al, 2003) como elemento confirmativo en menor tiempo, respecto a cromatografía de líquidos. Además como la vainillina es un compuesto electroactivo, los procedimientos basados en métodos electroanalíticos (amperometría, voltametría de pulso diferencial o voltametría de onda cuadrada) para la detección de vainillina en muestras alimenticias ha sido reportada en literatura a través del estudio de su oxidación (Rong et al, 1998; Luque et al, 2000; Hardcastle et al, 2001; Bettazzi et al, 2006).

Un enfoque adicional sobre diferentes aditivos de alimentos, ha sido definido por métodos quimiométricos ya que propone analizar simultáneamente varios analitos con espectros UV traslapados. A partir de una serie de datos de la absorción de espectros de un grupo de muestras de calibración con composición

conocida se procesa por modelos matemáticos de arreglo ortogonal y subsecuentemente, estos modelos son usados para la predicción de muestras desconocidas bajo las mismas condiciones experimentales (Yongnian et al, 2005).

Así se puede observar que todos estos estudios son dirigidos hacia la identificación de volátiles naturales, caracterización de compuestos principales y/o específicamente cuantificar vainillina en muestras alimenticias de distinta naturaleza. No obstante, estas metodologías implican previos pasos de extracción combinados con algún tipo de separación y detección, lo cual implica gran consumo de tiempo, aislamientos laboriosos, instrumentación costosa e incluso no disponible en muchos laboratorios.

De este modo, los métodos oficiales de análisis en la industria de saborizantes especifican el uso de un medidor de absorción UV para determinar vainillina a 348 nm, basándose en la hidrólisis de los extractos; aunque debe considerarse que el p-hidroxibenzaldehído es un interferente común pero a baja concentración respecto a la vainillina (AOAC, 1990; Luque et al, 2000; Longares y Cañizares, 2006).

La ventaja de determinar vainillina en medio alcalino por espectrofotometría UV se resume en que como método de rutina resulta ser rápido, eficaz, exacto, preciso y práctico; sin embargo como en la actualidad existe una tendencia hacia la propuesta de protocolos automáticos con amplio soporte técnico, el desarrollo de una configuración empleando el análisis por inyección en flujo (FIA) donde se conjuga la dilución y detección en línea se coloca también como una alternativa.

## D. ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO

La necesidad de mejorar o ampliar los métodos analíticos adaptándolos a las demandas crecientes, ha impulsado el crecimiento y la creación de los métodos automáticos de análisis.

El análisis por inyección en flujo constituye una importante innovación metodológica en Química Analítica que se caracteriza por un fundamento simple, un manejo sencillo y una gran capacidad para lograr resultados que son sorprendentes dadas sus características: rapidez, exactitud y precisión.

La denominación de esta modalidad de métodos de análisis continuo como **Análisis por Inyección en Flujo** fue propuesta en 1975 por Ruzicka y Hansen; por lo que puede afirmarse que está ya definitivamente aceptada por la comunidad científica.

La inclusión del término **inyección** en el nombre de la técnica responde más a un aspecto histórico que actual, ya que en los primeros sistemas de análisis en flujo se usaba una jeringa hipodérmica para inyectar la muestra en el flujo de reactivo. El uso de válvulas rotatorias, que se ha impuesto actualmente, hace que se trate más de una inserción que de una inyección propiamente dicha.

La abreviatura con que se designa esta técnica en español, FIA, corresponde a las siglas de la versión anglosajona (**Flow Injection Analysis**), no usándose las que realmente le corresponderían en nuestro idioma, AIF.

Los rasgos esenciales del Análisis por Inyección en Flujo son los siguientes:

1. El flujo no está segmentado por burbujas de aire, lo que constituye la diferencia fundamental con los métodos clásicos de análisis en flujo continuo.

2. La muestra líquida es inyectada o insertada directamente en el flujo en lugar de ser aspirada en el mismo.
3. Se realiza un transporte del “trozo” inyectado a través del sistema. Puede también tener lugar un proceso fisicoquímico (reacción química, diálisis, extracción líquido-líquido, etc.) adicional al transporte.
4. La dispersión o dilución parcial del analito en este transporte puede ser perfectamente manipulada mediante un control de las características geométricas e hidrodinámicas del sistema.
5. Un sistema de detección continua proporciona una señal transitoria, que es convenientemente registrada.
6. En el momento de la detección de la señal no se ha alcanzado el equilibrio físico (que supondría la homogeneización de una porción del flujo) ni el equilibrio químico (reacción completa). Por ello las técnicas FIA pueden considerarse dentro de los métodos cinéticos de análisis y en su modalidad de medida a tiempo fijo.
7. El tiempo de operación debe ser muy reproducible pues las medidas se realizan en condiciones de no estabilidad y por tanto pequeñas variaciones del mismo pueden producir graves alteraciones de los resultados.

Además la metodología FIA ocurre bajo cuatro aspectos clave: a) flujo no segmentado, b) inyección directa, c) dispersión parcial controlada y d) tiempo de operación reproducible. En general, los elementos esenciales de un montaje, consta de las siguientes partes:

- a) Una *unidad de propulsión*, que establece un flujo de caudal lo más constante posible de una disolución (o de varias) que lleva disuelto un reactivo o hace de simple portador. Puede ser una bomba peristáltica, un sistema de presión gaseosa, o bien la simple fuerza de la gravedad.
- b) Un *sistema de inyección*, que permita insertar o introducir en el flujo un volumen exactamente medido de la muestra con gran reproducibilidad de operación y sin interrumpir el mismo.

- c) Una *zona de tubo o reactor*, donde tiene lugar el transporte con o sin proceso adicional. Puede ser un tubo recto, en forma de serpentín, relleno o no de bolitas inertes, o bien tener una cámara de mezcla, un tubo relleno de material inerte o activo químicamente.
- d) Una *celda de flujo*, incorporada a un instrumento de medida (colorímetro, fotómetro, fluorímetro, potenciómetro, etc.) que transduce la señal continua a un registrador y/o un microprocesador.

La respuesta de la unidad de detección de un sistema FIA es una señal transitoria, típica de muchas técnicas analíticas. Estas señales transitorias únicas por sistema o muestra son el resultado de dos procesos consecutivos, uno de los cuales está afectado por el factor tiempo de manera significativa.

En la **Figura 3** se muestra una representación esquemática de los registros obtenidos en FIA, denominados **fiagramas**. Se trata de una representación de la señal analítica en función del tiempo. En el fiagrama las características esenciales son (Valcárcel y Luque de Castro, 1984):

- a) La altura de pico,  $h$ , que se relaciona con la concentración del componente de la muestra inyectada que se determina.
- b) El tiempo de residencia,  $T$ , que se define como el transcurrido desde la inyección hasta que se alcanza la máxima señal. No debe confundirse con el tiempo de aparición,  $t_a$ , que coincide con el tiempo que pasa desde la inyección hasta que se inicia la <<salida>> de la línea de base de la señal (aumento del 1-2%). La diferencia entre ambos es  $t'$ ,

$$t' = T - t_a$$

que normalmente es muy pequeño, dadas las características de las curvas FIA.

- c) El tiempo de retorno,  $T'$ , que es el tiempo comprendido entre el momento en que se alcanza la máxima señal y el instante en que la señal vuelve a la línea de base.

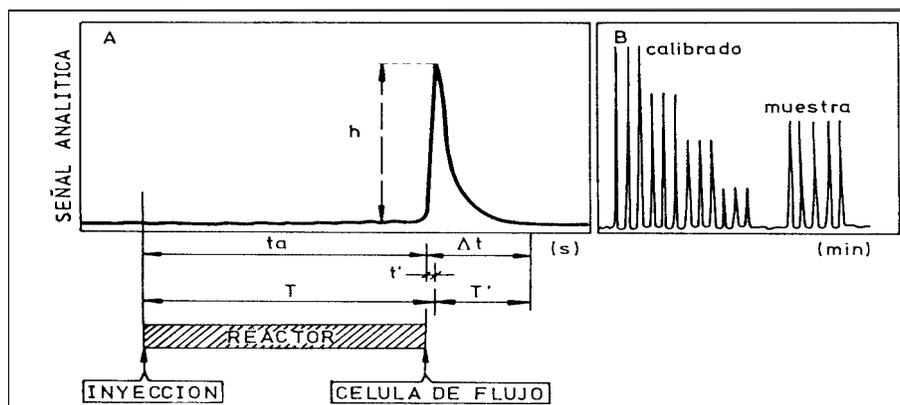
- d) El tiempo durante el cual aparece la señal,  $\Delta t$ , que se define como el período en el cual la señal sale y vuelve de nuevo a la línea de base, y que es una manera de definir la dispersión o dilución del analito.

De estas definiciones se deduce que se cumplen las siguientes expresiones:

$$T + T' = t_a + \Delta t$$

$$\Delta t = t' + T'$$

Para que un fiagrama quede definido, al menos de manera semicuantitativa, es preciso conocer el tiempo de arranque,  $t_a$ , las coordenadas del máximo de la curva ( $T$ ,  $h$ ) y el tiempo en que pasa la muestra por el detector,  $\Delta t$ . De ellos se deduce fácilmente  $t'$  y  $T'$ .



**Figura 3.** Fiagrama: (A) Definición de los parámetros más importantes, (B) Registro ordinario de estándares de calibrado y muestra desconocida.

Se debe considerar que los diagramas no responden en absoluto a un modelo gaussiano de curvas; y por lo tanto estos parámetros no definen de manera completa el trazado del mismo, en especial la segunda parte o “cola” que es peculiar de estos registros y que los distingue de las señales transitorias que se originan en otras técnicas analíticas.

A pesar de que en los primeros trabajos sobre el FIA se consideraba la existencia de un flujo turbulento para explicar la ausencia de contaminación mutua de dos muestras sucesivamente insertadas en el flujo, se comprobó que el número de Reynolds, es casi siempre notablemente inferior a dos mil ( $Re \ll 2000$ ), por lo que se puede asegurar que existe un régimen laminar en el transporte de materia de tubos.

La existencia de un régimen de flujo laminar proporciona importantes ventajas al FIA, tales como: a) zona o “trozo” de muestra bien definido, b) pequeño consumo de reactivo y c) caudales reducidos, lo que simplifica el montaje al no ser necesaria una presión elevada ni burbujas separadoras de aire para evitar la contaminación mutua entre muestras sucesivamente inyectadas.

En la **Figura 4** se representan los mecanismos que contribuyen a la dispersión del “trozo” de muestra inyectado, en función a los términos:

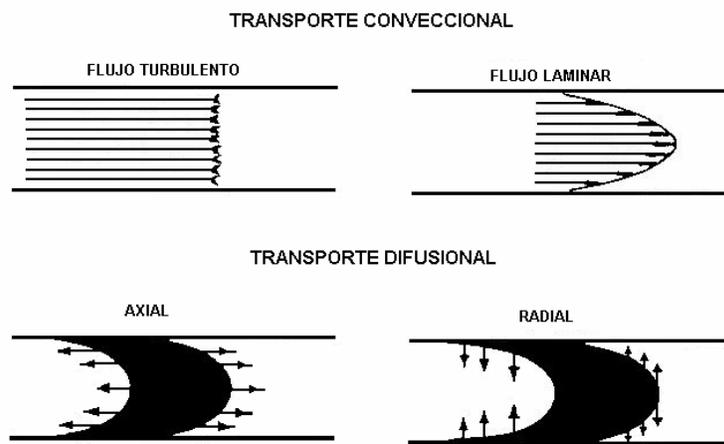
a) *Transporte por convección* desarrollado en condiciones de flujo laminar. Este origina un perfil parabólico de velocidades: las moléculas en las paredes del tubo tienen una velocidad lineal de cero, mientras que las moléculas que discurren por el centro del tubo tienen una velocidad doble de la velocidad media.

b) *Transporte por difusión* debido a la existencia de gradientes de concentración en diferentes momentos del transporte anterior, que a su vez se divide en dos posibilidades:

- **Difusión axial** debida a gradientes horizontales de concentración tanto en la “punta” del trozo de muestra inyectada, como en la “cola” del mismo; aunque su contribución a la dispersión global no es muy significativa.

- **Difusión radial** debido a las diferencias de concentración entre dos puntos situados perpendicularmente a la dirección del flujo. La contribución de la difusión radial es muy importante. Si se considera el flujo compuesto de gran número de

cilindros de fluido superpuestos que viajan a diferente velocidad por convección, la difusión radial tiende a igualar las concentraciones entre ellos, para lo cual las moléculas que están en las paredes del tubo tienden a desplazarse hacia el centro mientras que las del centro se desplazan en dirección contraria. Este mecanismo es trascendental para explicar el mantenimiento de la identidad de cada muestra inyectada, ya que mediante este movimiento se “retrasa” el transporte por convección y por tanto la dilución en el flujo del trozo, que sería cada vez más acusada.



**Figura 4.** Tipos generales de transporte en tubos cerrados.

La metodología FIA tiene numerosas aplicaciones dedicadas a problemas de contaminación (Benson et al, 1990), análisis clínicos (Themelis et al, 2004), farmacéuticos (Ruedas et al, 2004) y agrícolas (van Staden y Tlowana, 2002); además el número de trabajos dedicados a determinaciones industriales (Forman et al, 1991; Costin et al, 2003; Alves et al, 2006) y de alimentos (Ogbomo et al, 1991; Moreno e Yebra, 2002; Caballo-López y Luque de Castro, 2003) ha aumentado.

En la actualidad, la tendencia en la técnica de análisis por inyección en flujo (FIA) se dirige hacia el acoplamiento del pre-tratamiento de la muestra, con el objeto de incrementar la calidad de los resultados analíticos (Cañizares et al, 2001).

Una modalidad muy útil que resuelve este problema, esta dado por versiones automáticas de dilución en línea porque permite que una amplia variedad de muestras líquidas sean directamente analizadas en sistemas de flujo continuo.

Solamente, un número limitado de sistemas de dilución en línea han sido reportados bajo la idea de crear un gradiente de concentración en el sistema de flujo. El desarrollo de una unidad de flujo para dilución automática de estándares o muestras tiene como clave introducir un volumen adecuado de una solución estándar o muestra dentro de un volumen fijo de diluyente (Agudo et al, 1992).

En consecuencia, el uso de un sistema cerrado proporciona un volumen final constante como medio de dilución automática; donde la dispersión de la muestra insertada en el flujo en el momento de la detección, viene definida por la situación y forma de la banda del diagrama (Cañizares et al, 2001).

La aplicación de adaptaciones de dilución en línea resuelve el inconveniente de comprometer la precisión y exactitud en la medición de concentraciones muy altas, que requieren diluciones manuales como pre-tratamiento de la muestra, y al mismo tiempo soluciona los estrechos rangos de calibración lineal que muchos métodos instrumentales en lote presentan en la determinación de algún analito (Themelis et al, 2004).

## E. Métodos de extracción de vainilla

La extracción de los analitos de interés a partir de una matriz sólida es uno de los pasos analíticos más críticos y los problemas aumentan de la posibilidad de pérdida o contaminación durante la preparación de la muestra, el largo tiempo requerido, y el gran consumo de solventes (Luque-García y Luque de Castro, 2004).

Los estudios reportados sobre determinación de analitos de vainilla, también dedican un espacio al estudio de la naturaleza de los solventes para verificar la capacidad de extracción en un amplio rango de polaridades; de donde ha sido posible elucidar la composición química de las vainas.

Sin embargo, si el enfoque es el rendimiento de extracción de vainillina y debido a que posee propiedades volátiles, inestables e insolubles en agua (Rong et al, 1998), se han reportado a los alcoholes como solventes de preferencia (**Tabla 3**). En un intento de unificar criterios analíticos para el estudio de las vainas de vainilla, se recomienda usar alcohol a 96° (Fayet et al, 1987) o alcohol anhidro (Longares y Cañizares, 2006).

**Tabla 3.** Porcentaje de vainillina y p-hidroxibenzaldehído de acuerdo a solvente de extracción.

<b>Solvente de extracción</b>	<b>Vainillina</b>	<b>p-hidroxibenzaldehído</b>
Hexano	1.91	0.128
Éter etílico	1.44	0.098
Benceno	1.34	0.092
Diclorometano	2.15	0.151
Éter / Pentano (7:3)	1.85	0.120
Propanol	2.62	0.179
Metanol	2.66	0.188
Etanol 70	2.44	0.167
Etanol 96	2.69	0.186

Otros estudios muestran los efectos de mezclas de solventes sobre la extracción de los compuestos principales de las vainas y establecen que el agua favorece la extracción de volátiles, siempre y cuando la cantidad de agua sea controlada; ya que algunos compuestos tal como ácidos y compuestos fenólicos, son solubles en agua y permanecen en la fase acuosa, reduciendo su concentración en la fase orgánica (Pérez-Silva et al, 2006).

Existe también información para extraer vainillina a través de reacciones de inclusión empleando  $\beta$ -ciclodextrina; ya que la cavidad hidrofóbica del dímero (7.5 ángstrom) actúa selectivamente con el grupo aromático benzaldehído. Pero como los enlaces de hidrógeno entre el soluto y los grupos hidroxilo secundarios de la ciclodextrina, interacciones de van der Waals y/o interacciones hidrofóbicas son importantes para la fuerza del enlace, la vainillina es incluida con dificultad y por lo tanto su complejo es inestable (Rong et al, 1998).

En cuanto a sistemas en flujo, se ha planteado la extracción de vainillina proveniente de muestras alimenticias (azúcar avainillada, chocolate vainillinado y galletas cubiertas de chocolate vainillinado) empleando la técnica de membranas de PTFE con soporte líquido de di-*n*-hexil éter. Esta membrana porosa se sumerge por 15 minutos en el soporte líquido y entonces es colocada entre los bloques de la cámara de separación. El montaje de la sección superior de la cámara tiene un orificio para colocar una jeringa que contiene la muestra (1.0 g en 1 mL de 0.2 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y después de un periodo de 5 min de contacto, la vainillina es extraída por la membrana; entonces, una bomba peristáltica se pone en marcha a un flujo de 1.1 mL/min empleando NaOH-KCl a pH 13 como disolución receptora del analito, y en último lugar se lleva a cabo la medición amperométrica por detección de la señal a 850 mV (Luque et al, 2000).

A pesar de las alternativas expuestas, se debe considerar que la denominación de extracto natural de vainilla corresponde a una disolución en etanol acuosa de los principales compuestos extractables de las vainas (Pyell et al, 2002). La

vainillina natural es uno de los compuestos más comunes que se encuentra en las vainas de vainilla (en peso seco) a un nivel de 20 g/Kg y está asociado con muchos otros compuestos. Los auténticos extractos de vainilla provienen de un mínimo de aproximadamente 13.35 oz (378.5 g) de vainas por galón (3.8 L), con ningún otro ingrediente a excepción de un contenido de etanol no menor a 350 mL por litro y/o glicerol, azúcar y agua (Ramachandra y Ravishankar, 2000).

Los métodos clásicos de análisis para propósitos de control de calidad de los extractos de vainilla incluyen la determinación de cantidad de vainillina presente, el número de plomo y la cantidad de cenizas, entre otros parámetros (AOAC, 1990). En la **Tabla 4**, se muestran los valores analíticos de Winton, frecuentemente usados como estándar para detectar adulteración de extractos comerciales (Ramachandra y Ravishankar, 2000).

**Tabla 4.** Composición de extractos naturales de vainilla.

<b>Parámetro (g/L de extracto)</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Promedio</b>
Vainillina	1.10	3.50	1.90
Cenizas	2.20	4.32	3.19
Cenizas solubles	1.79	3.57	2.65
Número de plomo *	4.00	7.40	5.40
Alcalinidad de cenizas totales (0.1 M ácido mL/L de extracto)	300.00	540.00	-----
Alcalinidad de cenizas solubles (0.1 M ácido mL/L de extracto)	220.00	400.00	300.00
Acidez total (0.1 M alcalino mL/L de extracto)	300.00	520	420.00
Acidez diferente a vainillina (0.1 M alcalino mL/L de extracto)	140.00	420.00	300.00

\* Esta es una medida del contenido de ácidos orgánicos en el extracto, determinado por precipitación con acetato de plomo, donde las sales de plomo insolubles son removidas y el exceso de plomo es determinado por titulación con Na<sub>2</sub>EDTA. A partir de esta titulación quelométrica y titulación de un blanco se calcula el número de plomo de Wichmann (AOAC 1990).

Está claro que la madurez en la cosecha de las vainas de vainilla y la manera en que son curadas o beneficiadas, tienen efectos considerables sobre el contenido de vainillina. Al respecto, una publicación establece la preparación en laboratorio de extractos de vainilla de varios orígenes con el objeto de obtener información generada en condiciones iguales de tratamiento. Esta investigación emplea el método UV para emitir los siguientes resultados del contenido de vainillina en muestras de: Indonesia, 1.31 g/L; Madagascar, 1.84 g/L; Tonga, 3.20 g/L; Tahití, 1.20 g/L; México, 1.00 g/L; Costa Rica, 1.61 g/L y Jamaica, 2.65 g/L (Ranadive, 1992).

Otra información relacionada a la vainillina naturalmente encontrada en vainilla, puede visualizarse a través del estudio sobre la determinación de los componentes saborizantes en extractos comerciales de vainilla mediante electroforesis capilar que muestra las siguientes concentraciones de vainillina para muestras de: Indonesia A, 2.04 g/L; Indonesia B, 2.62 g/L; Madagascar, 3.62 g/L; Tonga, 1.76 g/L; Tahití, 1.16 g/L y México, 1.23 g/L (Boyce et al, 2003).

Tales valores indican que en el mercado internacional se pueden adquirir extractos de vainilla cuyo contenido depende del método usado para su obtención.

#### **a. Método Oficial Mexicano**

La Secretaría de Comercio y Fomento Industrial cuenta con la norma NMX-FF-074-1996-SCFI: PRODUCTOS ALIMENTICIOS NO INDUSTRIALIZADOS PARA CONSUMO HUMANO - ESPECIAS Y CONDIMENTOS - ENTERA Y EN ESTADO SECO - VAINILLA (*Vanilla fragans* Salisbury Ames o *Vanilla planifolia* Andrews) – ESPECIFICACIONES; cuyo objetivo es establecer las especificaciones mínimas de calidad que debe cumplir la vainilla, para ser comercializada y consumida en el territorio nacional, después de su beneficiado (deshidratación, sudado y secado) y envasado; pero cuyo campo de aplicación la excluye para procesamiento industrial.

Conforme a la sección 7.3.3.1.2.1 referente a la preparación del extracto de vainilla, plantea a la letra el procedimiento siguiente:

- Determinar la masa (peso) de 100 g de vainas de vainilla, colocar la muestra dentro de un matraz Erlenmeyer, adicionar 200 mL de alcohol etílico absoluto y diluir con 100 mL de agua, tapar el matraz y macerar dejando reposar a temperatura ambiente durante 12 h.
- Posteriormente adicionar 200 mL de alcohol etílico absoluto, mezclar perfectamente y continuar el proceso de maceración durante tres días.
- Filtrar la solución obtenida con papel filtro de poro fino obteniendo el filtrado en un matraz de 250 mL, compactar firmemente los sólidos y lavar lentamente con alcohol (1+1) hasta obtener un volumen total de un litro (solución original diluida).

#### **b. Extracción Convencional Soxhlet**

La extracción convencional Soxhlet permanece como una de las técnicas de extracción más relevantes para remover especies químicas de muestras sólidas. Además, debido a que es un modelo bien establecido se considera una referencia de comparación para nuevas alternativas de extracción (García-Ayuso y Luque de Castro, 1999).

En el montaje Soxhlet, la muestra es colocada en un cartucho de celulosa y durante la operación gradualmente se llena con solvente fresco y condensado desde un matraz de destilación. Cuando el líquido alcanza un nivel determinado, un sifón aspira el contenido del cartucho de celulosa y regresa el solvente hacia el matraz de destilación, arrastrando los analitos extraídos en el líquido. Esta operación es repetida hasta que la extracción es conseguida. Por lo tanto, es una técnica continua – discontinua porque aunque el solvente está recirculando a través de la muestra, el ensamble puede considerarse como un sistema en lote (Luque-García y Luque de Castro, 2004).

Las ventajas más sobresalientes del sistema Soxhlet son las siguientes:

- La muestra es repetidamente puesta en contacto con porciones frescas de solvente, y por tal razón se logra el desplazamiento del analito de interés.
- La temperatura del sistema es más alta que la ambiental ya que el calor aplicado al matraz de destilación alcanza la cavidad hasta cierto punto.
- Se obtiene un extracto que no requiere filtración.

Aunque la extracción convencional Soxhlet es confiable y barata, también tiene inconvenientes significativos como: el uso de volúmenes considerables de solventes orgánicos y el largo tiempo requerido para asegurar extracciones completas, en consecuencia se convierte en un proceso tedioso.

### **c. Extracción Asistida con Microondas**

En la última década, ha crecido la demanda de nuevas técnicas de extracción capaces de ser automatizadas, efectuadas en cortos periodos de tiempo y con la particularidad de reducir el consumo de solventes orgánicos (Sterbová et al, 2004). Los avances en la preparación de muestras sólidas han tenido como resultado la implementación de numerosas técnicas, tal como la extracción asistida con microondas focalizadas (García-Ayuso y Luque de Castro, 1999; Luque-García et al, 2002; Stashenko et al, 2004; Luque-García y Luque de Castro, 2003) que aceleran el proceso con respecto a los métodos de calentamiento clásicos por conducción, radiación o convección (Burguera y Burguera, 1998).

La extracción asistida con microondas es un proceso donde se emplea energía microondas generada por un magnetrón, para separar los analitos de una muestra matriz por contacto directo del calentamiento de solventes. Una de las principales ventajas de usar este proceso es la reducción del tiempo de extracción. En el calentamiento convencional un periodo finito de tiempo es necesario para calentar los contenedores antes de que el calor sea transferido a la solución, mientras que

usando microondas la solución es directamente calentada. Esto mantiene el gradiente de temperatura a un mínimo y acelera la velocidad de calentamiento (Sparr y Björklund, 2000).

Los principales parámetros en la operación son: potencia del magnetrón, elección del solvente, volumen de solvente, temperatura, tiempo y características de la matriz, incluyendo el contenido de agua (Paré y Bélanger, 1994; Luque-García y Luque de Castro, 2003).

El principio de calentamiento usando energía microondas está basado en el efecto directo de las microondas sobre las moléculas por conducción iónica y rotación bipolar. En muchas aplicaciones estos dos mecanismos toman lugar simultáneamente: (a) la conducción iónica es la migración electroforética de los iones cuando un campo electromagnético es aplicado, por lo que la resistencia de la solución a este flujo de iones produce fricción y así el calentamiento de la solución; (b) la rotación bipolar sucede por el alineamiento de los dipolos con la aplicación del campo, de donde la frecuencia de 2450 MHz usada en los sistemas comerciales induce al alineamiento de dipolos y movimientos al azar de  $4.9 \times 10^9$  veces por segundo que ocasionan desplazamientos moleculares y en consecuencia un calentamiento muy rápido (Sparr y Björklund, 2000).

De este modo, la habilidad de un solvente para absorber energía microondas y transferirla en forma de calor a otras moléculas parcialmente dependerá del factor de disipación ( $\tan \delta$ ), dado por la siguiente ecuación:

$$\tan \delta = \frac{\varepsilon''}{\varepsilon'}$$

donde  $\varepsilon''$  es la pérdida dieléctrica (una medida de la eficiencia de conversión de energía microondas en calor) y  $\varepsilon'$  es la constante dieléctrica (una medida de la polarizabilidad de una molécula en un campo eléctrico). Las moléculas polares y soluciones iónicas absorben energía microondas fuertemente porque tienen un momento bipolar permanente que es afectado por las microondas. Sin embargo

los solventes no polares no son calentados cuando se exponen a las microondas (Sparr y Björklund, 2000).

Un estimado de la habilidad de las microondas a polarizar cualquier molécula puede ser considerando los valores de la constante dieléctrica,  $\epsilon'$  (**Tabla 5**). Por lo tanto, no es sorprendente encontrar que los solventes polares, tales como: agua, acetona y metanol, fácilmente absorben la energía microondas y por eso son calentados cuando son sometidos a esta irradiación; mientras que los solventes no polares, tal como: hexano y tolueno, no son calentados. Además, ya que el proceso de extracción toma lugar en recipientes cerrados, el solvente elegido puede ser calentado por arriba de su punto de ebullición normal; lo cual reduce el tiempo requerido para el proceso de extracción (Jassie et al, 1997).

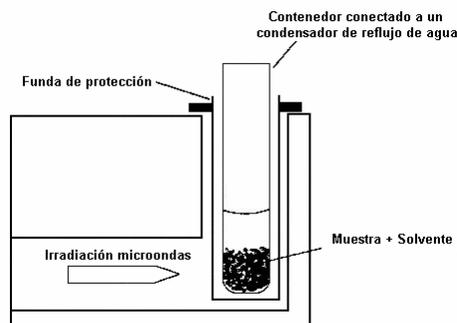
**Tabla 5.** Propiedades de los solventes para extracción asistida con microondas.

Solvente	$\epsilon'$	Momento dipolar	$\tan \delta$ (x 10 <sup>4</sup> )	p. eb. °C	Temperatura °C a 1207 kPa (sistema cerrado)
Hexano	1.89			68.7	No calentado
Diclorometano				39.8	140
Acetona	20.70			56.2	164
Etanol	24.30	1.96	2500	78.0	164
Metanol	32.63	2.87	6400	64.7	151
2-Propanol	19.90	1.66	6700	82.0	145
Agua	78.30	2.30	1570	100	
Acetonitrilo	37.50			81.6	194
Acetona:Hexano (1:1 v/v)				52.0	156

En el comercio se dispone de dos tipos de sistemas de calentamiento por microondas, distinguidos por las siguientes características:

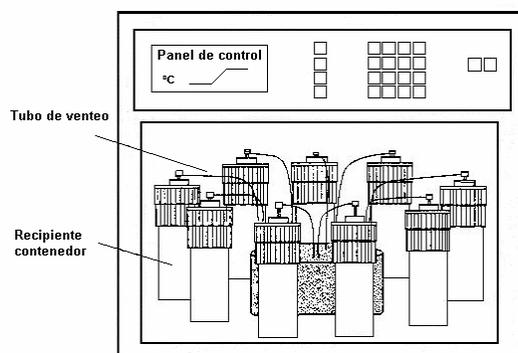
- Sistema abierto: El calentamiento de esta modalidad ocurre a presión atmosférica y la irradiación de microondas es focalizada, posee solo un recipiente

de extracción de borosilicato o cuarzo con capacidad máxima de 10 g de muestra, opera con incrementos de potencia de 0 a 100% por etapas o intervalos de tiempo hasta un máximo de 300 W, pero requiere la adaptación de un refrigerante para evitar la pérdida de disolvente y de analitos volátiles (**Figura 5**).



**Figura 5.** Diagrama esquemático de un sistema de microondas abierto.

- Sistema cerrado: La operación ocurre bajo condiciones presurizadas (200 psi máximo); donde se monitorea tanto la irradiación con opción de programarse en incrementos de 1% hasta 950 W para el 100% de energía microondas, como la temperatura seleccionada desde 20 hasta 200 °C. Además 12 recipientes de extracción con capacidad de 100 mL pueden ser irradiados simultáneamente, posicionados en un carrusel con giros de 180°. Estos aparatos tienen características de seguridad para detectar fugas de solventes y evitar accidentes (**Figura 6**).

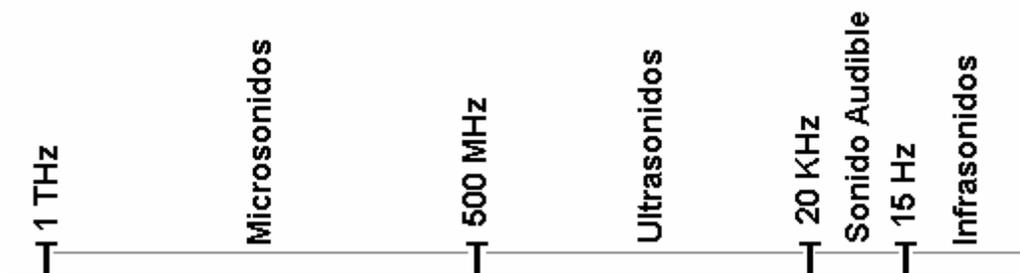


**Figura 6.** Diagrama esquemático de un sistema de microondas cerrado.

Las modalidades de este método se han colocado como una alternativa atractiva a las técnicas convencionales, ya que extiende su campo de aplicación sobre matrices de carácter clínico, alimenticio y ambiental (Luque de Castro y da Silva, 1997); donde los analitos de interés principal son especies tanto orgánicas (Luque de Castro et al, 1999; Ericsson y Colmsjö, 2000; Luque-García et al, 2002; Xuejun et al, 2002; Caballo-López y Luque de Castro, 2003) como inorgánicas (Carbonell et al, 1990; Bryce et al, 1996; Burguera y Burguera, 1998).

#### d. Extracción Asistida con Irradiación Ultrasónica

Las ondas de sonido son vibraciones mecánicas en un sólido, líquido o gas. El espectro de vibraciones acústicas de un cuerpo elástico está constituido por una gama de frecuencias que delimitan el intervalo audible al género humano (20 kHz – 15 Hz), respecto al infrasonido, ultrasonido y microsonido (**Figura 7**).



**Figura 7.** Espectro de vibraciones acústicas

La principal diferencia entre las ondas de sonido y las ondas electromagnéticas (ondas de radio, infrarrojo, visible, luz ultravioleta, rayos X, rayos gama) es que mientras las últimas pueden pasar a través del vacío, las ondas de sonido pueden viajar a través de la materia, provocando ciclos de expansión-compresión (Luque-García y Luque de Castro, 2003).

El ultrasonido se define como un tren de ondas mecánicas, generalmente longitudinales, originadas por la vibración de un cuerpo elástico y la propagación por un medio material; cuya frecuencia supera la del sonido audible por el género

humano: 20.000 ciclos/s (20 kHz). Estas ondas sonoras corresponden básicamente a rarefacción y compresión periódica del medio en el que se desplazan (Kharisov y Ortíz, 1999).

La cavitación acústica es la principal responsable del suceso sonoquímico, provocado por la creación, expansión y destrucción de burbujas pequeñas generadas por una onda sonora en un líquido que comprime y descomprime continuamente. Los resultados son temperatura y presiones extremas generadas en el líquido a un micronivel, así como termólisis, formación de radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno (Sanz et al, 2005).

El líquido circundante enfría rápidamente el medio, de forma que una “gruta” del tamaño de unas micras desaparece en menos de  $10^{-6}$  s; por lo que la temperatura de cavitación varía desde 1000 hasta 10000 °K, aunque es más frecuente el rango de 4500 a 5500 °K. La radiación acústica es la energía mecánica que se transforma en energía térmica (Kharisov y Ortiz, 1999).

Como consecuencia, cuando un sólido está presente en un medio acuoso, el analito presente en el sólido debe ser parcialmente o totalmente extraído en el medio líquido más rápido que otros métodos clásicos (Sanz et al, 2005).

A nivel de laboratorio existen dos tipos de equipos (Sandoval-Salas, 2005):

- a) Las *sondas de ultrasonido* son poco voluminosas y emiten una energía muy concentrada dentro de una superficie del orden de un centímetro cuadrado alrededor del sitio de la emisión que puede deteriorar ciertas moléculas a extraer. Como opciones para facilitar las operaciones de extracción se ha propuesto el uso de amplificadores y celdas de circulación.
- b) Los recipientes equipados de un *transductor ultrasónico* incluyen las tinajas de limpieza utilizadas como sistemas de extracción y las tinajas equipadas, diseñadas y dimensionadas con el único fin de utilizarse para la extracción.

En este contexto, la sonoquímica ha emergido como una potente herramienta para acelerar varios pasos en procedimientos analíticos, como el pre-tratamiento de muestras, debido a que facilita y acelera las operaciones de extracción de compuestos orgánicos e inorgánicos de matrices vegetales o alimenticias (Lázaro et al, 1991; Moreno e Yebra, 2002; Luque-García y Luque de Castro, 2003; Romdhane y Gourdon, 2002; Ruiz-Jiménez et al, 2003; Sanz et al, 2005).

Esta tecnología también ha sido útil para algunos procesos de emulsificación y desactivación de enzimas (Chemat et al, 2004), extracción de compuestos con actividad biológica (Vinatoru et al, 1997; Vinatoru, 2001; Valachovic et al, 2001; Hromádkova y Ebringerová, 2003; Zuo et al, 2004) o triglicéridos de semillas oleaginosas (Luque-García y Luque de Castro, 2004). Así como para acelerar el proceso de oxidación de aceite de oliva virgen (Cañizares et al, 2004) o para extraer los compuestos aromáticos en vino blanco (Herranz-Vila et al, 1999) y brandies añejos (Caldeira et al, 2004).

El aspecto más importante para la aplicación de irradiación ultrasónica es establecer valores adecuados a los parámetros de extracción; los cuales están relacionados con las propiedades (ruptura celular y efectos de capilaridad) del material estudiado (Toma et al, 2001).

En conclusión, el uso del ultrasonido en el procesamiento de alimentos es una alternativa potencial frente a los métodos convencionales, porque la transferencia de este tipo de energía es inmediata, el tiempo total del proceso es reducido y el consumo de energía es menor (Cañizares et al, 2004). Para mantener la eficiencia de extracción se debe evitar que haya pérdidas de la energía dentro del medio de extracción o bien que la materia no obstaculice la extracción, ya que puede absorber la totalidad de la energía emitida (Sandoval-Salas, 2005).

## II. DESARROLLO DEL TRABAJO

### A. Equipos y aditamentos

- Espectrofotómetro UV – visible: Varian modelo Cary 3 (Sydney, Australia).
- Celda de cuarzo: Hellman con volumen interno de 18  $\mu$ L (California, USA).
- Bomba peristáltica: Gilson Miniplus – 3 de 4 canales (Villiers-le Bel, Francia).
- Válvulas de inyección: Rheodyne 5041 (Rohnert Park, USA).
- Configuración hidrodinámica: Tubos de PTFE con 1.5 mm de diámetro interno.
- Balanza Analítica: Explorer E12140 Ohaus con precisión  $\pm 0.1$ mg (Suiza).
- Parrilla de calentamiento: Thermolyne Cimarec 2 (Iowa, USA).
- Microondas Focalizado: Prolabo Microdigest 301 de 300 W (Francia).
- Ultrasonido: Sonicador digital Branson 450 de 20 kHz y 400 W (Danbury, USA).
  - Punta cilíndrica de aleación de titanio con 13 mm de diámetro externo.

### B. Instrumental de laboratorio

- Módulo de vidrio para Soxhlet.
- Matraces volumétricos de 10, 25, 50, 100 y 1000 mL.
- Pipetas volumétricas de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 y 25 mL.
- Vasos de precipitados de 25, 50, 100 y 500 mL.
- Botellas de vidrio color ámbar con tapa de teflón de 10 a 500 mL.
- Botella de plástico con tapa de teflón de 500 y 1000 mL.
- Tubos interno y externo de borosilicato para microondas.
- Refrigerante de vidrio.
- Tubería de hule latex.

### C. Reactivos

- Vainillina 99% de pureza (Sigma, México; Lote: 013K3682).
- Hidróxido de sodio 100% pureza (J. T. Baker, México; Lote: 39798).

- Alcohol etílico absoluto anhidro (J. T. Baker, México; Lote: 9014-03).
- Verde de bromocresol (Técnica Química S. A., México; Lote: S/N).
- Borato de sodio decahidratado (J. T. Baker, México; Lote: E46729).
- Agua destilada.

#### **D. Muestras de vainilla**

Un total de 50 vainas beneficiadas de vainilla comercial (*Vanilla fragans*) con 15 cm de longitud y 1 cm de ancho de la región de Papantla, Veracruz, fueron cortadas manualmente (< 3 mm) y una masa aproximada de 1.0 g se utilizó para obtener los extractos de vainilla. Se eligió esta cantidad ya que es suficiente para obtener una concentración adecuada de vainillina para ser cuantificada con el sistema de flujo propuesto.

#### **E. Metodología experimental**

##### **a. Disolución de vainillina**

Se pesó una masa aproximada de 0.5 g de vainillina (Sigma, México) en un matraz volumétrico de 100 mL, se disolvió con 10 mL de etanol anhidro absoluto (J. T. Baker, México) y después se llevó a aforo con agua destilada. La disolución madre se almacenó a 4 °C y fue usada durante una semana para preparar las disoluciones estándar a las concentraciones requeridas, tomando las alícuotas adecuadas y aforando con agua destilada.

##### **b. Disolución de hidróxido de sodio**

Se pesó una masa aproximada de 0.4 g de hidróxido de sodio (J. T. Baker, México) en un matraz volumétrico de 1 L, ésta se disolvió y se aforó con agua destilada. La disolución se almacenó en un frasco de plástico a 4 °C, para su posterior empleo en la configuración FIA como disolución acarreadora y medio de hidrólisis.

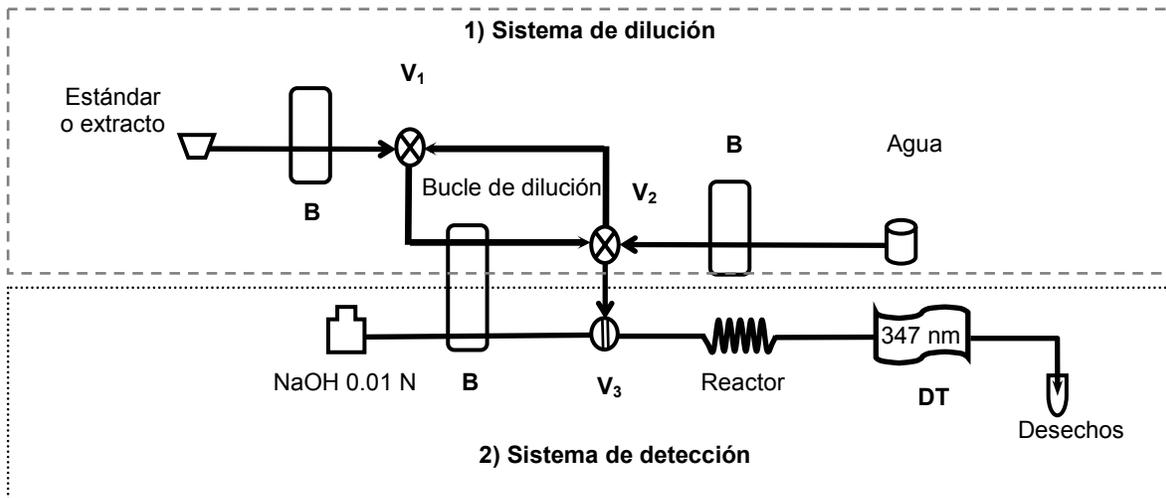
### c. Disolución de verde de bromocresol

Se pesó una masa aproximada de 0.01 g de verde de bromocresol (Técnica Química S. A., México) en matraz volumétrico de 1 L y se aforó con una disolución de bórax 0.01 M. Esta disolución amortiguadora de bórax se preparó pesando una masa aproximada de 3.8 g y disolviendo en 1 L de agua destilada. La disolución colorante de concentración 10 mg/L se almacenó a temperatura ambiente y se utilizó en la determinación del factor de dilución –  $f_d$  – del sistema propuesto.

### d. Configuración de análisis por inyección en flujo

La **Figura 8** muestra la configuración general del sistema de inyección en flujo usado para la dilución y detección de vainillina. El bucle de dilución automático es la clave de esta configuración, debido a que efectúa un mezclado automático, la homogenización y la dilución del estándar o extracto antes de la inyección en el sistema FIA. El bucle de dilución está formado por un sistema abierto-cerrado (Cañizares et al, 2001) con las válvulas de inyección  $V_1$  y  $V_2$ . De acuerdo a la **Figura 9A** el diluyente (agua destilada) se aspira en el bucle de dilución por medio de la válvula  $V_2$ . Cuando el bucle está completamente lleno, la válvula  $V_2$  se cierra y la válvula  $V_1$  se cambia de posición y entonces 117  $\mu\text{L}$  de la disolución estándar o del extracto se introducen al bucle (**Figura 9B**). Después, la válvula  $V_1$  se cambia de posición y el sistema es cerrado para mezclar, homogenizar y diluir el estándar o el extracto con el diluyente (**Figura 9C**). Después de un tiempo de dilución adecuado (4 min), la válvula  $V_2$  se cambia de posición (**Figura 9D**) y el bucle de la válvula  $V_3$  se llena con estándar o extracto diluido. A continuación, un volumen de 100  $\mu\text{L}$  de  $V_3$  se inyecta en un portador de NaOH 0.01 N, para llegar al reactor donde la vainillina es hidrolizada. Finalmente, el producto de reacción pasa a través de la celda de flujo localizada en el espectrofotómetro UV-visible, donde el producto se mide a 347 nm.

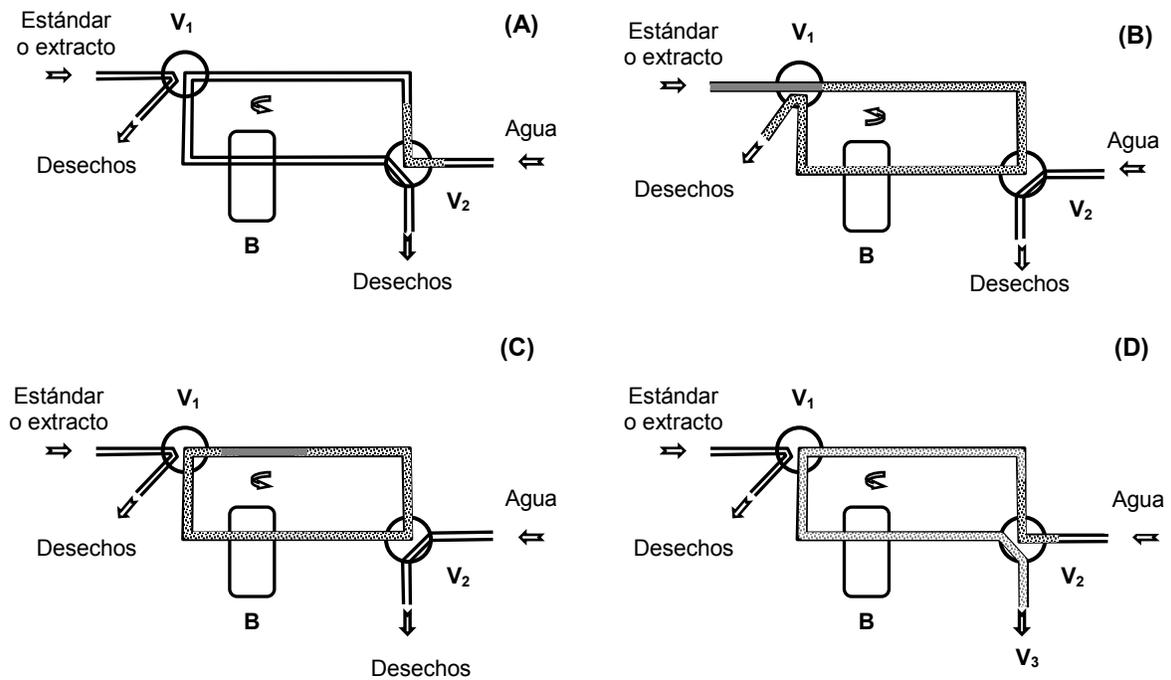
**Figura 8.** Configuración general del sistema por inyección.



**B:** Bomba peristáltica, **V:** Válvula de inyección, **DT:** Detector UV-visible

**Figura 9.** Diagrama esquemático del bucle de dilución automático.

(Ver texto para detalles)



**(A)** Introducción del diluyente; **(B)** Aspiración del estándar o extracto;  
**(C)** Homogenización de estándar o extracto; **(D)** Inyección de la mezcla diluida.

### e. Obtención de extractos naturales de vainilla

Se evaluaron cuatro procedimientos de extracción sobre las vainas de vainilla:

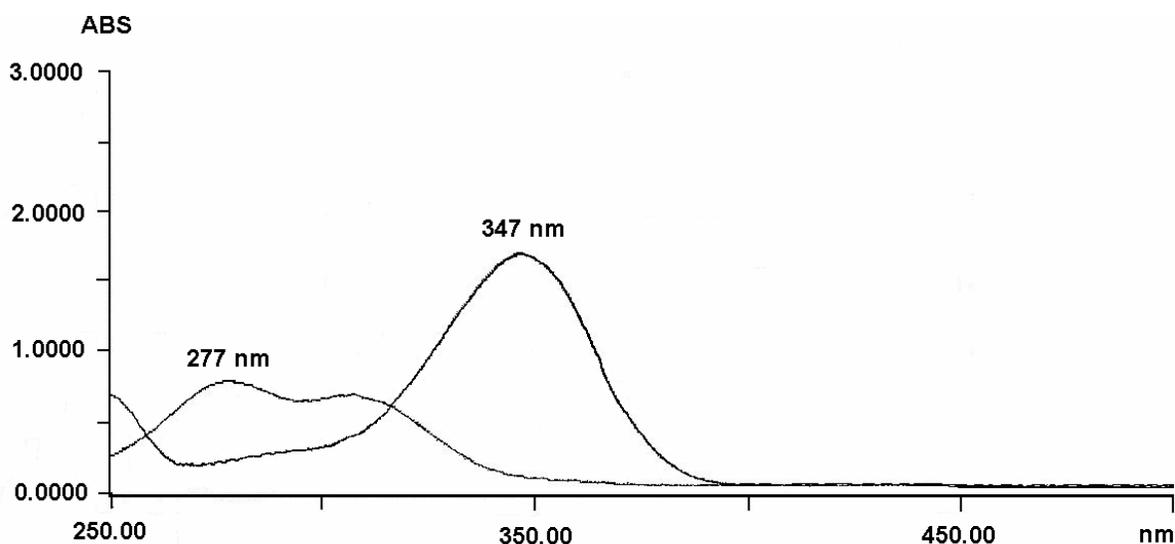
- (1) *Método Oficial Mexicano (NMX)*: Este método se llevó a cabo de acuerdo con la norma oficial mexicana (NMX-FF-074-1996-SCFI). Las vainas de vainilla fueron sumergidas en un contenedor de vidrio y se cubrieron con 2 mL de etanol y 1 mL de agua. Después de macerar por 12 h a temperatura ambiente, se adicionó 2 mL de etanol y se mezcló bien todo el contenido para continuar con la maceración por 3 días. La disolución se filtró y las vainas se lavaron con etanol-agua (1:1 v/v) hasta obtener un volumen de 10 mL que finalmente se analiza.
  
- (2) *Extracción Convencional Soxhlet (ECS)*: Las vainas de vainilla se colocaron en un cartucho de papel filtro (10 x 10 cm). La vidriería del Soxhlet se ajustó a un matraz de destilación conteniendo 100 mL de etanol y 2 ó 3 piedras de ebullición. Después de 8 h de extracción, se permitió que el extracto alcanzara la temperatura ambiente para ser analizado.
  
- (3) *Extracción Asistida con Microondas Focalizadas (EAMF)*: Este método se llevó a cabo de acuerdo con lo reportado por Longares y Cañizares (2006). Las vainas de vainilla empacadas en un papel filtro (9 x 6 cm) se colocaron dentro del tubo de ensayo sumergido en un baño de agua. 50 mL de una disolución al 70% (v/v) etanol-agua fueron adicionados a la muestra. Un refrigerante se adaptó al tubo de ensayo para evitar la pérdida del extracto. Veinte ciclos de 1 min de irradiación microondas (150 W) con intervalos de 3 minutos de no irradiación entre cada ciclo se aplicaron a la muestra. Después se dejó que el extracto alcanzara la temperatura ambiente para ser analizado.

(4) *Extracción Asistida con Ultrasonidos (EAUS)*: Las vainas de vainilla fueron colocadas en un vaso de vidrio cubriéndolas con 50 mL de etanol. La punta del sonicador fue situada dentro del vaso a 25 mm de la superficie del solvente y a 15 mm del fondo para permitir una interacción directa con la muestra. Se aplicaron a la muestra cuarenta ciclos de 59.9 s de irradiación ultrasónica (200 W) con intervalos de 59.9 s de no irradiación entre cada ciclo. El extracto obtenido fue turbio por lo que requirió un periodo de estabilización para obtener una disolución ámbar translúcida para ser analizada.

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### A. Determinación del espectro de absorción de vainillina

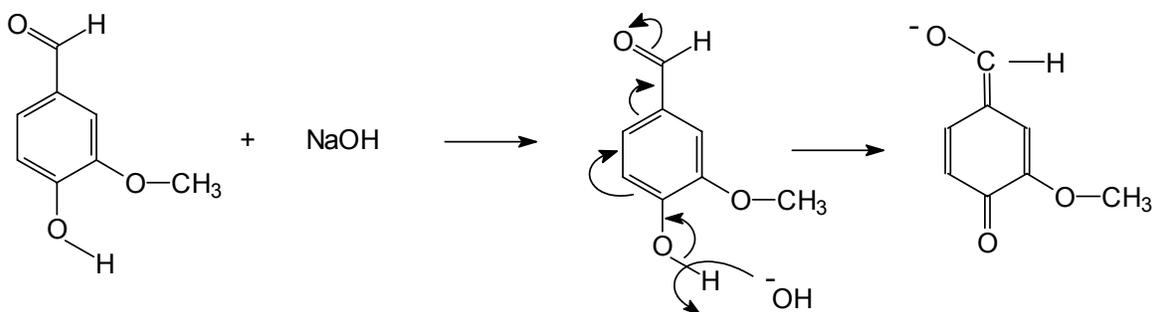
El espectro experimental de absorción UV-visible de la vainillina que se muestra en la **Figura 10** se obtuvo mediante el barrido desde 250 hasta 500 nm, utilizando disoluciones estándar de vainillina hidrolizada (AOAC, 1990) y sin hidrolizar a una concentración de 10 mg/L.



**Figura 10.** Espectro de absorción de vainillina hidrolizada (347 nm) y no hidrolizada (277 nm).

La razón para estas variaciones de absorción envuelve los grupos hidroxilo en la estructura molecular del analito; pues la señal de vainillina empieza a incrementar con el aumento de pH. Cuando el pH es mayor a 6, la vainillina alcanza un pico máximo situado a 347 nm y existe como sal de fenilo, porque el OH es desprotonado; mientras que en el rango de pH 2 a 6, el OH es protonado dando origen a la forma neutra de la molécula (Yongnian et al, 2005).

El mecanismo de reacción que presenta la vainillina es el siguiente:



En resumen, este comportamiento se debe a que la molécula de interés presenta una estructura quinoide más estable en medio alcalino que en medio neutro, debido a que la resonancia electrónica es mayor (Zepeda, 1980).

A esta longitud de onda el *p*-hidroxibenzaldehído se considera interferencia positiva, ya que su espectro tiene un máximo de absorción a 329 nm; aunque ambos analitos son medidos la contribución de éste es mínima y también está incluido en el procedimiento de la AOAC (1990) y SECOFI (1996) para la determinación de vainillina. Esta interferencia ha sido efectivamente eliminada aplicando el método de derivatización reportado por Longares (2006).

## B. Optimización de la configuración de análisis por inyección en flujo

Para la optimización de los parámetros del sistema de flujo, en la determinación de vainillina, el estudio se realizó en dos partes:

### a. Sistema de detección

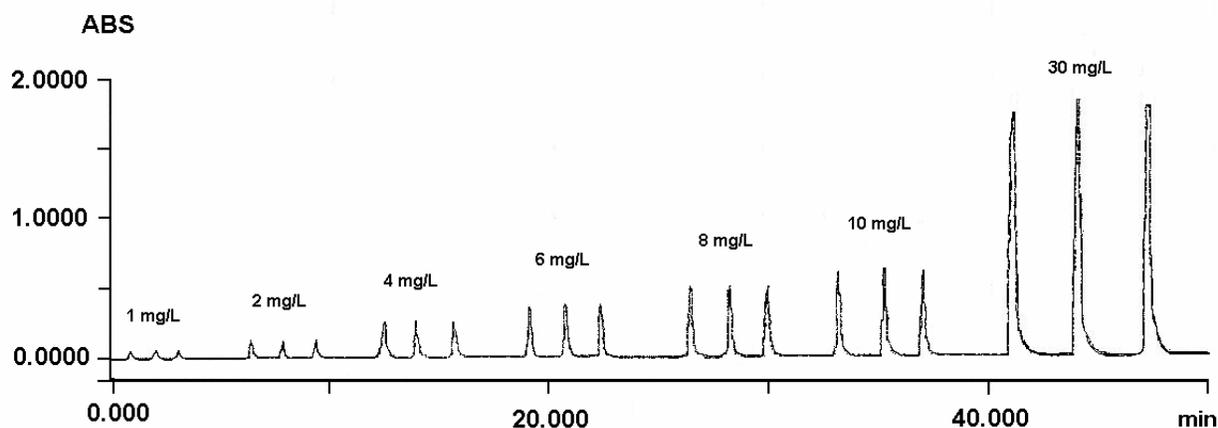
La configuración inicial consistió del sistema de detección de la figura 8 y a partir de ésta se estudiaron las variables hidrodinámicas y químicas en los intervalos presentados en la **Tabla 7** para la optimización de la medición de vainillina. Los valores óptimos de flujo continuo, se seleccionaron considerando que la mejor señal en FIA debe ser un pico de altura máxima y trazo fino.

**Tabla 7.** Optimización de las variables para el sistema de flujo continuo.

Variable	Intervalo estudiado	Valor óptimo
Caudal (mL/min)	0.5 – 2.0	1.0
Volumen de inyección (μL)	50 – 200	100
Longitud del reactor (cm)	100 – 200	100
Concentración de NaOH (N)	0.01 – 0.5	0.01

En la **Figura 11** se muestra el diagrama para el intervalo lineal de 1 a 30 mg/L de vainillina que se consiguió bajo los parámetros óptimos señalados. De los datos se obtuvo la ecuación:  $A = (0.05881 \pm 0.00322) c - (0.01612 \pm 0.03997)$ , donde **A** corresponde a la absorbancia medida y **c** a la concentración de vainillina; con el coeficiente de correlación de 0.99870, límite de detección de 1.71 mg/L y límite de cuantificación de 5.69 mg/L.

El criterio sobre límite de detección en la curva de calibración se refiere a la concentración de analito que proporciona la señal del blanco, más tres veces la desviación estándar del blanco; en cambio las mediciones por encima de la señal del blanco más diez veces la desviación estándar del blanco para tener una confiabilidad mayor al 95% corresponde al límite de cuantificación, como ésta especificado por el procedimiento matemático de Miller y Miller (1993).



**Figura 11.** Diagrama de estándares de vainillina obtenido con la configuración simple.

Sin embargo, considerando que los extractos naturales de vainilla tienen concentraciones de vainillina hasta de 3000 mg/L (Ramachandra y Ravishankar, 2000; Boyce et al, 2003) esta situación representó una restricción. En el procedimiento AOAC (1990), la medición de vainillina exige una dilución de la muestra analizada (estándar o extracto) de aproximadamente 100 veces e incluso otras publicaciones especifican diluciones a un volumen apropiado antes de la determinación por el método analítico reportado (Thompson y Hoffmann, 1988; Pyell et al, 2002).

Ante tal experiencia, esta investigación propone incorporar el sistema de dilución en línea a la detección por FIA (**Figura 9**), con el objetivo de eliminar el tratamiento externo y así cuantificar la vainillina proveniente de extractos de vainilla.

#### **b. Sistema de dilución**

Con el propósito de asegurar la precisión de los resultados del acoplamiento de dilución automática se realizó la optimización de los parámetros: bucle de dilución (volumen y caudal), tiempo de aspiración de la muestra (estándar o extracto), tiempo de dilución y factor de dilución –  $f_d$  –.

- **Bucle de dilución y Tiempo de aspiración de la muestra**

En la configuración hidrodinámica se evaluaron diferentes volúmenes del bucle de dilución con el propósito de obtener la mejor dilución a un caudal óptimo de 1 mL/min. La elección de este caudal se debe a que caudales más altos provocan burbujas en el bucle de dilución, puesto que las muestras a analizar se encuentran en disolución alcohólica; mientras que caudales más bajos alcanzan la homogenización en tiempos más largos.

Experimentalmente, el volumen de la muestra tiene una relación directa con el tiempo de aspiración; de manera que se estudió un intervalo de 60 a 600  $\mu\text{L}$  (3 a 36 s de aspiración) de acuerdo con las concentraciones de vainillina en muestras reales.

En estas condiciones, los valores óptimos fueron: 7 s de tiempo de aspiración (117  $\mu\text{L}$ ) y 1.2 mL de bucle de dilución. La aspiración de volúmenes más pequeños proporcionó diluciones muy altas y volúmenes de aspiración mayores aportaban diluciones muy bajas con señales fuera del intervalo lineal para ambos casos.

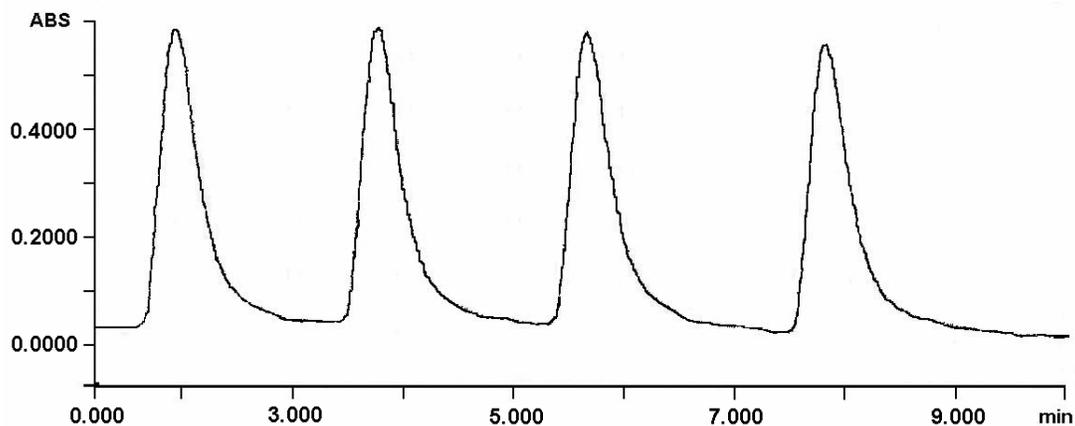
- **Tiempo de dilución**

Para determinar el tiempo de homogenización de la muestra, se aspiraron 117  $\mu\text{L}$  de una disolución de vainillina estándar en el bucle de dilución y a diferentes tiempos la muestra se dirigió hacia la tercera válvula donde 100  $\mu\text{L}$  se inyectaron en el modulo de reacción. El tiempo mínimo requerido para la homogenización total fue de 4.0 minutos a una velocidad de flujo de 1 mL/min; debido a que la medición de la absorbancia fue constante a partir de este periodo.

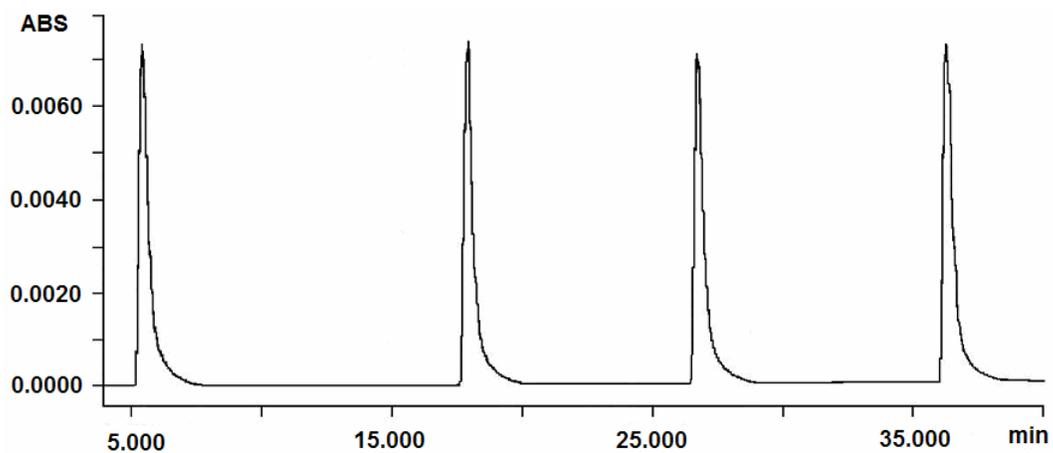
- **Factor de dilución –  $f_d$  –**

Una vez seleccionados los valores óptimos de estos parámetros, se calculó el factor de dilución –  $f_d$  – usando una disolución de verde de bromocresol que opera como estándar o extracto y disolución de bórax como diluyente y portador. En este caso se consideró la relación entre el valor de absorbancia (0.5942,  $n = 4$ ) de la disolución de verde de bromocresol sin pasar por el bucle de dilución (**Figura 12**), pero inyectado en el módulo de reacción (sistema de detección), y el valor de la absorbancia (0.0075,  $n = 4$ ) obtenido después de pasar por el sistema de dilución (**Figura 13**), fijando una longitud de onda de 616 nm para realizar la medición.

Al respecto se puede concluir que el cálculo del  $f_d$  igual a 79 describe el grado de dilución como el proceso físico de la muestra antes y después de que haya tenido lugar el transporte en el sistema FIA. Por lo tanto, la cuantificación directa de vainillina empleando la configuración propuesta permite una apropiada dilución del “trozo” de muestra insertado.



**Figura 12.** Señales de verde de bromocresol inyectado sin pasar por el bucle de dilución.



**Figura 13.** Señales de verde de bromocresol inyectado en la configuración de dilución en línea.

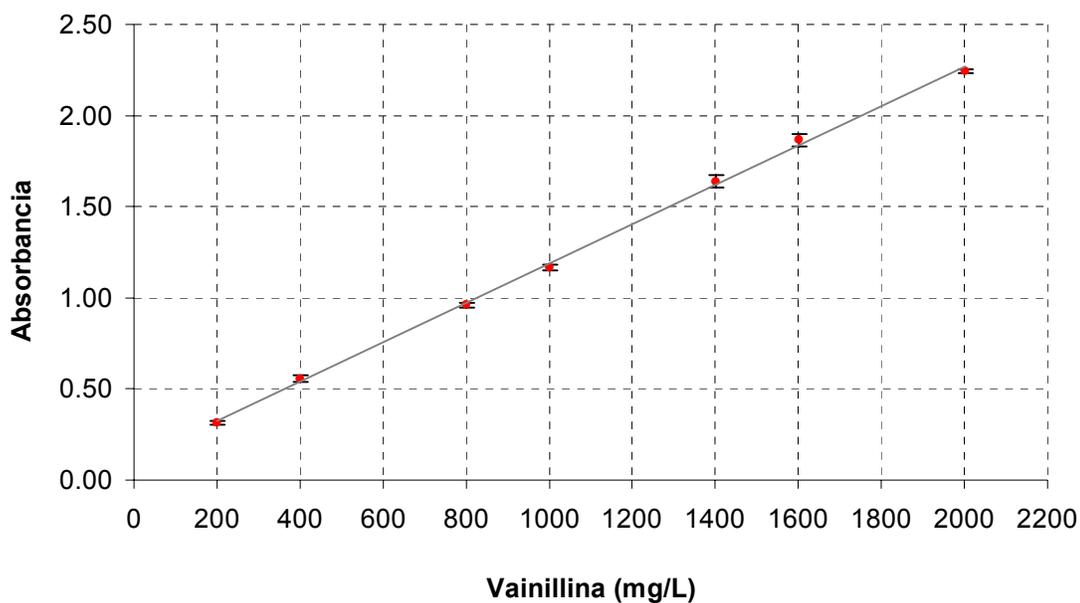
### C. Elaboración de la curva de calibración de vainillina

A partir de una disolución madre de vainillina cuya concentración aproximada fue de 5000 mg/L, se prepararon disoluciones estándar y se inyectaron en el sistema de flujo continuo en series de cuatro, para llevar a cabo la dilución automática y la medición del analito a 347 nm. En la **Figura 14** se presenta la construcción de la curva de calibración para el intervalo lineal de 200 a 2000 mg/L de vainillina describiendo un coeficiente de regresión de 0.9995 y la ecuación:

$$A = (0.00108 \pm 0.000038) c + (0.1072 \pm 0.04695)$$

donde **A** corresponde a la absorbancia medida y **c** a la concentración de vainillina.

En este contexto se obtuvo un límite de detección de 66.5 mg/L y un límite de cuantificación de 221.5 mg/L; a través del cálculo matemático señalado en la página 49 (Miller y Miller, 1993).



**Figura 14.** Curva de calibración de vainillina obtenida con el sistema de dilución/detección FIA.

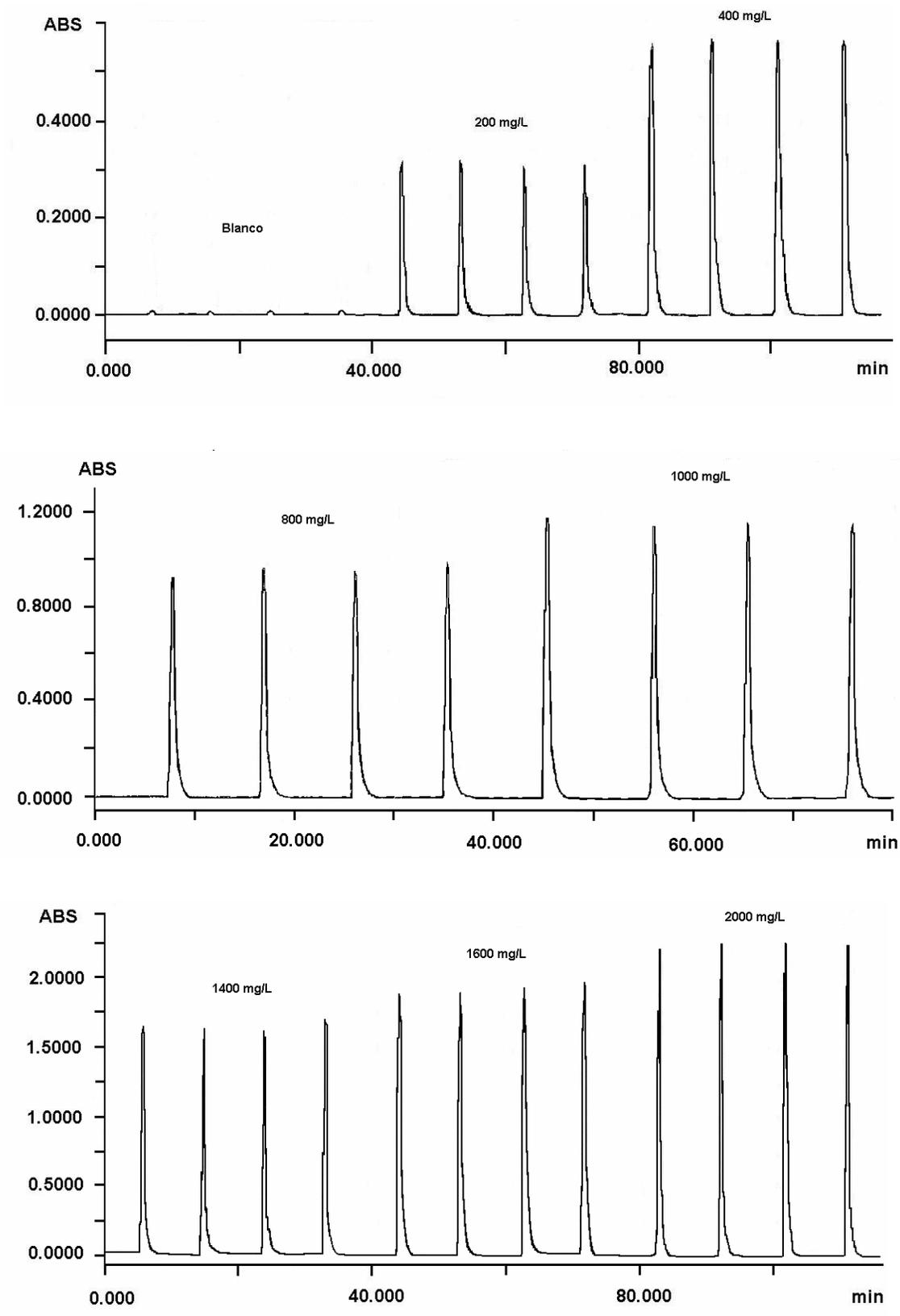


Figura 15. Diagramas de vainillina obtenidos con la configuración de dilución y detección en línea.

Los diagramas de la **Figura 15** obtenidos con el módulo de dilución y detección en línea, logró incrementar el intervalo lineal cubriendo la concentración de vainillina de extractos naturales de vainilla y a través de la medición directa elimina el tratamiento externo de las disoluciones de alta concentración; en contraste a la configuración sencilla (**Figura 11**).

#### D. Evaluación de la configuración de análisis por inyección en flujo

Para evaluar la precisión del método propuesto, se llevó a cabo un estudio interno de laboratorio (Massart et al, 1997) sobre repetibilidad ( $s_r$ ) y reproducibilidad ( $s_{WR}$ ) a dos concentraciones de vainillina estándar durante 7 días, por triplicado; debido a que no se cuenta con un estándar certificado para efectuar esta prueba. En la **Tabla 8** se muestran los datos que se obtuvieron de cada réplica por estándar de vainillina.

**Tabla 8.** Resultados experimentales para la evaluación de la precisión del método FIA propuesto.

Día	Medición de vainillina (300 mg/L)		Medición de vainillina (1200 mg/L)	
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2
	n = 3	n = 3	n = 3	n = 3
1	300.86	286.31	1211.66	1211.85
2	360.43	359.63	1154.73	1227.71
3	329.79	329.79	1123.76	1131.54
4	364.95	323.88	1241.21	1241.21
5	351.00	352.39	1225.42	1112.02
6	326.28	333.15	1194.99	1202.45
7	324.91	326.74	1223.76	1220.16

Considerando los valores del ensayo dentro del laboratorio, se efectuó el cálculo estadístico de análisis de varianza (ANOVA); cuyos resultados presentados en la **Tabla 9** proporcionaron en términos de desviación estándar relativa (DER):  $s_r = 9.06$  y  $s_{WR} = 9.14\%$ , para un estándar de vainillina a 300 mg/L y de  $s_r = 3.03$  y  $s_{WR} = 3.79\%$ , cuando el estándar de vainillina fue de 1200 mg/L.

**Tabla 9.** Resultados de ANOVA para obtener repetibilidad y reproducibilidad.

Concentración	Fuente de variación	SC <sup>a</sup>	GL <sup>b</sup>	CM <sup>c</sup>
300 mg/L	Entre días	5668.30	6	944.72
	Dentro de días	6399.43	7	914.20
	Total	12067.73	13	---
1200 mg/L	Entre días	16790.11	6	2798.35
	Dentro de días	9158.33	7	1308.33
	Total	25948.44	13	---

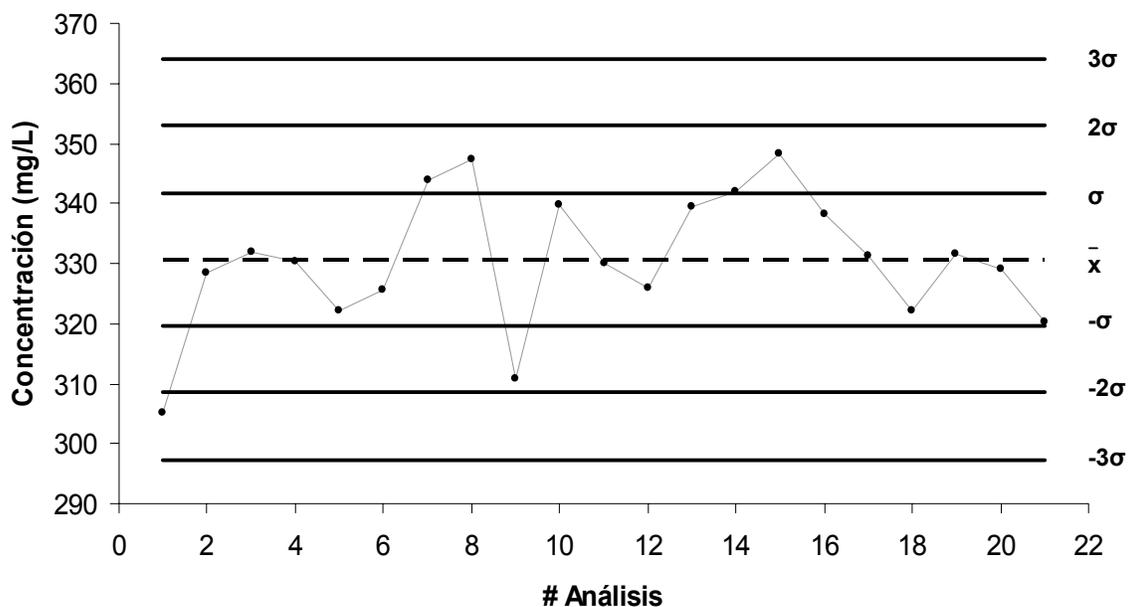
<sup>a</sup> Suma de cuadrados, <sup>b</sup> Grados de libertad, <sup>c</sup> Cuadrados medios

Estos resultados indicaron que la configuración de FIA es adecuada para determinar vainillina con excelente precisión cuando las muestras contienen concentraciones cercanas a los valores centrales de la curva de calibración. La afirmación anterior proviene del hecho de que a valores bajos de concentración los límites de confianza son mayores, mientras que a concentraciones cercanas al centro de gravedad de la recta de regresión la precisión es mejor ya que los límites de confianza son bastante más pequeños. Por otro lado, el error en los valores cercanos al primer punto de la curva (200 mg/L) es menor al 10%, por lo que se consideró adecuado para este estudio.

## E. Control de datos analíticos de vainillina

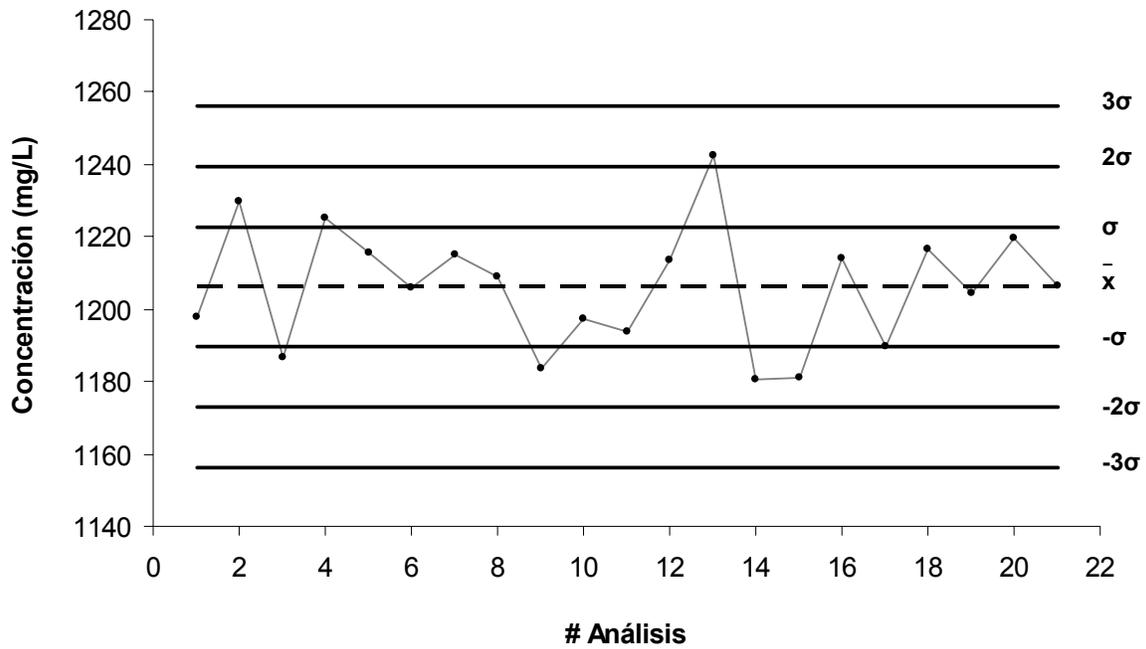
Durante todo el estudio se monitoreo por día de análisis, disoluciones estándar de 300 mg/L y 1200 mg/L para asegurar el control de calidad de la cuantificación de vainillina en las extracciones por los diferentes procedimientos.

En la **Figura 16** se presentan las mediciones de vainillina obtenidas usando el sistema FIA de dilución y detección en línea. Cada punto representa la concentración promedio de tres réplicas por día de análisis, considerando una disolución de referencia aproximada de 300 mg/L. En este caso se presentó una tendencia sobre el valor promedio, que no excede a  $\pm 3\sigma$ .



**Figura 16.** Gráfico de concentración de vainillina estándar a 300 mg/L para el control de calidad.

Así mismo para una disolución de referencia aproximada de 1200 mg/L, la **Figura 17** presenta las mediciones de vainillina obtenidas para la concentración promedio de tres réplicas por día de análisis. Los datos obtenidos también son cercanos a la concentración promedio del estándar analizado con una variación menor a  $\pm 3\sigma$ , además de una dispersión marcadamente aleatoria.



**Figura 17.** Gráfico de concentración de vainillina estándar a 1200 mg/L para el control de calidad.

Por lo tanto, los resultados anteriores demuestran la confiabilidad del análisis cuantitativo de vainillina bajo las condiciones establecidas en la configuración de dilución y detección en línea.

## F. Optimización de los procesos de extracción

Los extractos de vainilla se obtuvieron usando diferentes métodos de extracción y los resultados fueron comparados entre ellos. La *EAMF* se llevó a cabo de acuerdo a lo reportado por Longares (2006) en estudios previamente establecidos y el *NMX* reportado por la Secretaría de Comercio y Fomento Industrial (1996).

La *ECS* y la *EAUS* fueron estudiadas y optimizadas con el objeto de extraer la máxima cantidad de vainillina. Una vez establecidas los parámetros óptimos de extracción, de forma adicional se planteó usar dos disoluciones de etanol a diferente concentración como extractantes cuando se utilizó *EAMF* y *EAUS*.

### a. Extracción Convencional Soxhlet (*ECS*)

Este método se utilizó porque representa la referencia para llevar a cabo extracciones de muestras sólidas. El parámetro variable en el estudio fue el tiempo de extracción: 2, 4, 6 y 8 horas, cada uno medido por triplicado. En la **Tabla 10** se muestran los resultados obtenidos empleando la configuración propuesta.

**Tabla 10.** Concentración de vainillina obtenida a diferentes tiempos por *ECS*.

Tiempo de extracción (h)	Vainillina (mg/g)*
2	10.82 ± 0.12
4	14.01 ± 0.13
6	18.51 ± 0.15
8	22.41 ± 0.21

\* Tres mediciones FIA

En la literatura se describe que la vainillina es sujeta a extracción Soxhlet con etanol desde 2 h (Carnero et al, 1990), 6 h (Fayet et al, 1987) y hasta 16 h (Pérez-Silva et al, 2006), para verificar la capacidad de otras técnicas o mezclas de

solventes. Herrman y Stöckli (1982) encontraron un contenido de vainillina de 14.5 a 19.2 mg/g de vainilla beneficiada, mientras Ramachandra y Ravishankar (2000) reportan un nivel de 20 g/Kg como el contenido de vainillina en vainilla beneficiada. En este estudio la eficiencia de extracción aumenta en función al tiempo; por lo que se consideró que tiempos mayores a 8 horas representan periodos muy largos y como la concentración de vainillina por gramo de vainilla corresponde al contenido que se podría esperar de la extracción de las vainas, entonces este tiempo fue suficiente.

#### **b. Extracción Asistida con Ultrasonido (EAUS)**

La altura de la punta de la sonda de ultrasonido se fijó a 15 mm del fondo del vaso de extracción debido a que de esta forma la irradiación fue directa y se evitaron tanto burbujas como turbulencia. Un volumen de 50 mL de etanol se seleccionó para obtener extractos en el intervalo de cuantificación de vainillina cuando se utiliza 1.0 g de vainas de vainilla.

Para optimizar el proceso de extracción por irradiación de ultrasonido, se realizó un estudio factorial sobre el comportamiento de las principales variables que afectan la extracción por medio de la metodología de diseño experimental, utilizando el programa estadístico Statgraphics Plus para Windows versión 2.1, Rockville, MD, 1992.

Se seleccionó un diseño de dos niveles y un punto central, para estudiar la extracción con un mínimo de experimentos. En la **Tabla 11** se establecen los valores mínimo y máximo de cada variable del diseño factorial en estudio: potencia (80 y 200 W), tiempo de irradiación (10 y 59.9 s), tiempo de no irradiación (0.1 y 59.9 s) y número de ciclos de irradiación – no irradiación (5 y 20).

El monitoreo de la concentración de vainillina se llevó a cabo usando la configuración FIA antes descrita y el nivel de respuesta de la concentración (mg/L)

de vainillina en extractos naturales de vainilla se empleó como medio comparativo de eficiencia de extracción para cada condición ensayada.

**Tabla 11.** Diseño factorial  $2^4$  para la optimización de EAUS.

<b>Ensayo</b>	<b>Ciclos (#)</b>	<b>Irradiación (s)</b>	<b>No irradiación (s)</b>	<b>Potencia (W)</b>	<b>Respuesta (mg/L)</b>
A	20	59.9	59.9	80	258.76
B	5	59.9	0.1	80	151.11
C	20	10	59.9	200	332.79
D	5	10	0.1	200	76.09
E	20	10	0.1	80	66.24
F	5	59.9	0.1	200	67.56
G	12.5	34.95	30	140	110.26
H	20	10	0.1	200	241.38
I	5	10	0.1	80	34.16
J	20	10	59.9	80	94.49
K	5	10	59.9	200	68.52
L	20	59.9	59.9	200	208.63
M	20	59.9	0.1	200	159.64
N	5	10	59.9	80	23.04
O	5	59.9	59.9	200	103.24
P	5	59.9	59.9	80	65.99
Q	20	59.9	0.1	80	49.88

Con los resultados generados se realizó la prueba de ANOVA y sobre los efectos estimados en la extracción fue posible establecer el modelo de significancia del diseño (Statgraphics Plus para Windows versión 2.1, Rockville, MD, 1992).

A partir de la **Tabla 12** se concluyó que los factores más importantes sobre la eficiencia de extracción fueron el número de ciclos y la potencia, debido a que sus **valores p** fueron menores a 0.05 para un ensayo al 95% de confianza; mientras que el tiempo de irradiación y no irradiación no fueron factores estadísticamente

significativos. Por otro lado, los efectos estimados sobre la extracción en el modelo muestran una relación directa entre: (a) *ciclos - tiempo de no irradiación*, (b) *ciclos - potencia*, (c) *tiempo de irradiación - potencia*; así como una relación inversa entre: (a) *ciclos - tiempo de irradiación* y (b) *tiempo de no irradiación - potencia*. Por consiguiente, los resultados mostraron que las mejores respuestas se presentan cuando la potencia y el número de ciclos son los máximos, a pesar de que este último incrementa el tiempo de análisis.

**Tabla 12.** Resultados de ANOVA para el diseño factorial 2<sup>4</sup> de EAUS.

Fuente de variación	SC <sup>a</sup>	GL <sup>b</sup>	CM <sup>c</sup>	Relación F	valor p
Ciclos (A)	42240.5	1	42240.5	15.83	0.0073
Irradiación (B)	1025.6	1	1025.6	0.38	0.5581
No irradiación (C)	5983.02	1	5983.02	2.24	0.1849
Potencia (D)	16523.8	1	16523.8	6.19	0.0473
AB	3723.44	1	3723.44	1.40	0.2822
AC	12413.3	1	12413.3	4.65	0.0744
AD	11661.8	1	11661.8	4.37	0.0815
BC	721.728	1	721.728	0.27	0.6216
BD	14854.7	1	14854.7	5.57	0.0563
CD	47.679	1	47.679	0.02	0.8980
Error total	16011.2	6	2668.54		
Correlación total	125207.0	16			

<sup>a</sup> Suma de cuadrados, <sup>b</sup> Grados de libertad, <sup>c</sup> Cuadrados medios

A partir de estos resultados se llevaron a cabo otros ensayos, seleccionando los valores óptimos de no irradiación e irradiación (59.9 s en ambos casos) porque intervalos menores provocan pérdidas del extracto y sobrecalentamiento de la punta, el mismo caso se presentó si la potencia era mayor a 200 W. Una vez establecido 59.9 s como tiempo de irradiación y no irradiación con 200 W de potencia, se obtuvieron extractos de vainilla cambiando el número de ciclos a 40 y 50; de donde los datos obtenidos mostraron que después de 40 ciclos la concentración de vainillina fue prácticamente la misma pero con un incremento del

20% en tiempo; por eso se seleccionó 40 ciclos como un compromiso entre la concentración de vainillina y el tiempo de extracción.

Las condiciones óptimas para la extracción de vainillina de vainas de vainilla usando *EAUS*, bajo un tiempo absoluto de 80 minutos fueron: 40 ciclos; 59.9 s de irradiación; 59.9 s de no irradiación y 200 W de potencia.

### c. Influencia de microondas y ultrasonidos sobre vainillina

A pesar de que la influencia de energía microondas ha sido previamente estudiada (Longares, 2006) la concentración de vainillina se determinó usando la configuración FIA de dilución y detección en línea, y los resultados fueron comparados con los obtenidos por *EAUS*.

Para evaluar ambos procedimientos de extracción, se prepararon dos disoluciones alcohólicas de aproximadamente 1200 mg/L de vainillina estándar. Tres alícuotas por separado se sometieron a las condiciones de *EAMF* o *EAUS*, y enseguida se analizaron por triplicado en la configuración FIA propuesta.

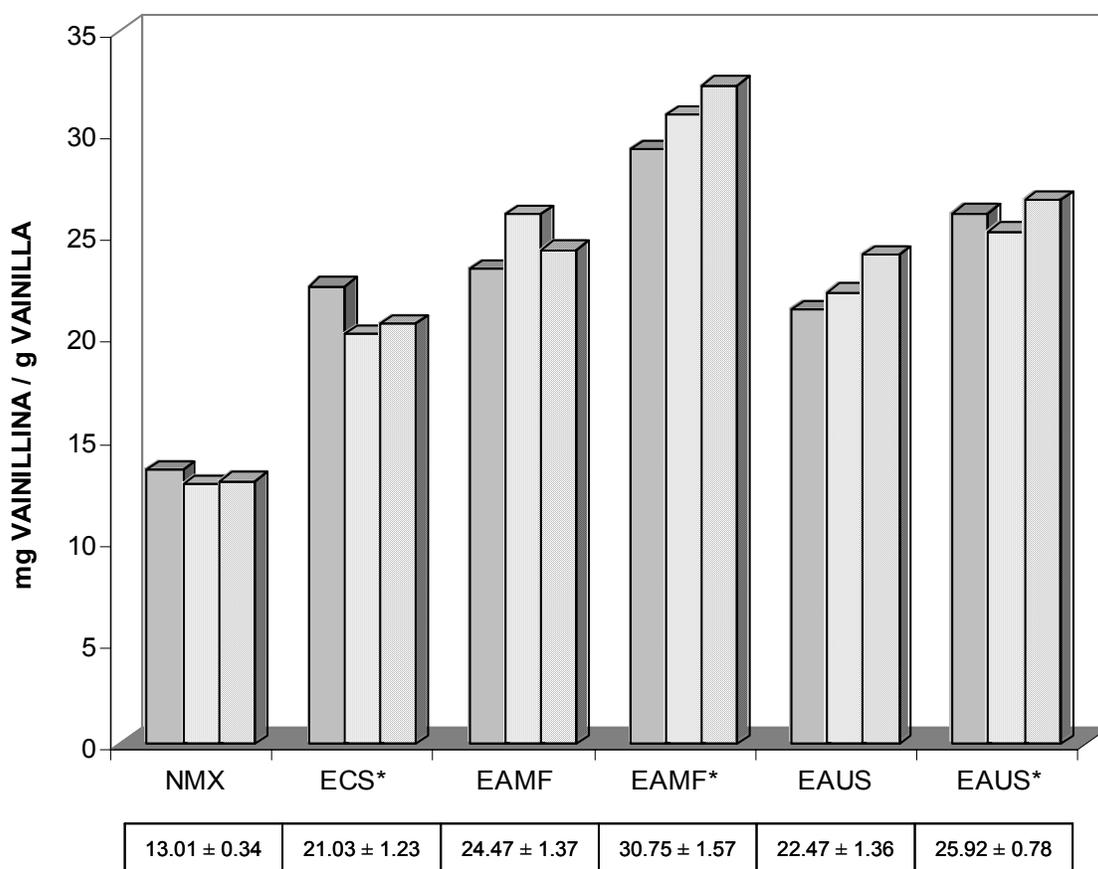
**Tabla 13.** Concentración de disoluciones de vainillina estándar sometida a *EAMF* y *EAUS*.

Procedimiento	Vainillina (mg/L)			
	Estándar	A	B	C
<i>EAMF</i>	1203	1118.74 ± 14.14	1191.18 ± 4.30	1172.65 ± 10.26
<i>EAUS</i>	1208	1202.46 ± 13.33	1215.28 ± 5.40	1201.97 ± 6.56

Los resultados muestran recuperaciones promedio de  $96.5 \pm 3.23\%$  para la *EAMF*; mientras que para la *EAUS* el promedio fue de  $99.9 \pm 0.62\%$ , respecto a las disoluciones estándar. Por lo tanto, se comprueba que la concentración de vainillina no se afecta por la aplicación de energías de microondas o ultrasonidos.

#### d. Comparación entre procedimientos de extracción

Para la evaluación comparativa de los diferentes métodos de extracción, tres réplicas bajo las condiciones de extracción óptimas se llevaron a cabo, con su respectiva cuantificación por triplicado. En la **Figura 18** se resumen los resultados de los extractos obtenidos por cada procedimiento (anexos C – H) y se puede observar que existe un incremento en el contenido de vainillina empleando *EAMF* o *EAUS* con etanol al 100% como extractante.



*NMX*: Extracción por maceración (Norma Mexicana), *ECS*: Extracción Convencional Soxhlet,

*EAMF*: Extracción Asistida con Microondas Focalizadas, *EAUS*: Extracción Asistida con Ultrasonidos. \*Etanol al 100%.

**Figura 18.** Contenido de vainillina (mg/g de vainilla) según el procedimiento de extracción.

Por otro lado, cuando la extracción se llevó a cabo usando 70% de etanol con aplicación de microondas o ultrasonido (*EAMF* o *EAUS*), la concentración de vainillina disminuyó. Entre ambos extractos hay solo una diferencia de 8.19%, el contenido de vainillina es dos veces mayor y además existe una reducción radical en el tiempo de extracción (98%) con respecto a los extractos de vainilla empleando el método oficial mexicano (*NMX*). Estos resultados son interesantes porque los extractos naturales son obtenidos con disoluciones a diferentes relaciones de etanol-agua, además de que el método oficial para cuantificar vainillina procede de los extractos naturales de vainilla en una proporción de 70:30 (etanol-agua). En consecuencia, es posible asegurar las ventajas de la aplicación de energías tal como microondas y ultrasonido con respecto al proceso de maceración usada en la *NMX*.

Los datos muestran que la concentración promedio (mg/g) de vainillina en el extracto obtenido por *EAMF*\* es superior a todos, enseguida se ubicó la *EAUS*\* con aproximadamente 15.7% de diferencia entre ambos. Cuando se usó el método de *ECS*\* el tiempo de extracción es 83% más largo y la concentración de vainillina disminuyó (32% menos cuando se emplea *EAMF*\* y 19% menos con el uso de *EAUS*\*) considerando que el extractante es 100% etanol.

Longares y Cañizares (2006) consiguieron un promedio de vainillina en vainilla de 12.82 mg/g por el método clásico de extracción marcado por la Secretaría de Comercio y Fomento Industrial; en tanto Ruiz-Terán et al (2001) obtuvo 1.14 g de vainillina en 100 g de vainas secas empleando 150 mL de una disolución al 47.5% de etanol por aplicación del mecanismo Soxhlet durante 2 horas, lo cual corresponde a los resultados obtenidos en este trabajo con protocolos similares.

En cuanto a los datos generados por microondas focalizadas o ultrasonido se prueba que el contenido de vainillina en la vainilla nacional, están por encima de los valores (15.60 mg/g ó 19118 mg/Kg, respectivamente) antes reportados por Thompson y Hoffmann (1988) o Pérez-Silva et al (2006); y a su vez se relacionan

a los informes de Waliszewski et al (2006), donde es necesario un proceso de hidratación con etanol al 5% durante 48 h y pre-tratamiento enzimático hasta por 12 h para producir extractos con un contenido de vainillina en vainilla de 20.9 mg/g (Zymafilt L-300), 22.6 mg/g (Novozym 342) y 25.6 mg/g (Crystalzyme PML-MX).

Por lo antes expuesto se debe considerar que las vainas mexicanas además del carácter organoléptico conservan el adjetivo de “calidad extra” en el contexto internacional (SECOFI, 1996), teniendo como referencia que la industria considera en la extracción de vainilla un contenido máximo de vainillina de 30 mg/g en peso seco (Waliszewski et al, 2006).

#### e. Ensayos de recobro de vainillina

Para asegurar que no existen interferencias por efecto matriz, se obtuvieron por triplicado extractos naturales de vainilla aplicando los métodos de *EAMF* y *EAUS*, en los cuales se cuantificó la concentración de vainillina empleando la configuración FIA propuesta. Posteriormente, se prepararon disoluciones con alícuotas conocidas del extracto natural (60 – 184 mg/L) y estándar de vainillina (600 y 1600 mg/L) para determinar el contenido de vainillina por referencia.

**Tabla 14.** Recobros de extractos de vainilla por *EAMF* fortificados con vainillina.

Fortificación	Concentración de referencia	Concentración encontrada	Recobro
	mg/L	mg/L	(%)
600 mg/L	774.29	867.60 ± 11.42	112.05
	784.35	854.43 ± 15.68	108.93
	785.31	789.54 ± 21.08	100.54
1600 mg/L	1787.71	1768.91 ± 11.18	99.56
	1786.75	1736.20 ± 11.33	97.17
	1774.69	1712.90 ± 14.06	95.82

En el caso de *EAMF*, los resultados de la **Tabla 14** muestran recobros promedio de  $107.2 \pm 5.95\%$  para los extractos con fortificación de 600 mg/L y de  $97.5 \pm 1.89\%$  para los extractos con fortificación de 1600 mg/L. Asimismo, en la **Tabla 15** los recobros promedio empleando *EAUS* fueron de  $100.4 \pm 3.11\%$  y  $99.6 \pm 2.17\%$  para los extractos de vainilla fortificados con 600 mg/L y 1600 mg/L, respectivamente.

**Tabla 15.** Recobros de extractos de vainilla por *EAUS* fortificados con vainillina.

Fortificación	Concentración de referencia mg/L	Concentración encontrada mg/L	Recobro (%)
600 mg/L	665.818	$648.34 \pm 13.24$	97.37
	663.759	$687.53 \pm 4.28$	103.58
	667.014	$669.68 \pm 9.01$	100.40
1600 mg/L	1738.26	$1772.13 \pm 7.75$	101.95
	1731.75	$1720.83 \pm 6.52$	99.37
	1735.87	$1694.89 \pm 6.16$	97.64

Por lo tanto, la aplicación de microondas o ultrasonido para la obtención de extractos de vainilla aunado al procedimiento espectrofotométrico UV-visible por FIA con dilución y detección en línea aseguraron la medición de vainillina a lo largo del estudio debido a su buena fiabilidad, simplicidad y reproducibilidad.

## f. Ensayos de significancia entre procedimientos de extracción

En la **Tabla 16** se presentan los valores del ensayo F sobre comparación de desviaciones estándar entre procedimientos de extracción y también los resultados obtenidos del ensayo t, como mejor método comparativo de los datos del contenido promedio (mg/g) de vainillina.

**Tabla 16.** Valores de los ensayos F y t sobre significancia entre procedimientos de extracción.

Comparación	Ensayo F	Ensayo t
<i>EAMF*</i> – <i>EAUS*</i>	4.06	4.79
<i>EAMF*</i> – <i>ECS*</i>	1.63	8.47
<i>ECS*</i> – <i>EAUS*</i>	2.49	5.83
<i>EAMF</i> – <i>EAUS</i>	1.01	1.79
<i>EAMF</i> – <i>NMX</i>	16.09	14.03
<i>EAUS</i> – <i>NMX</i>	15.87	11.65

\* Etanol al 100%

Estadísticamente se obtuvo F a partir del calculo:  $\frac{s_1^2}{s_2^2}$ , donde  $s_1$  y  $s_2$  son las desviaciones estándar de los resultados obtenidos para cada par de métodos estudiados (Miller y Miller, 2002).

En todos los casos aplica dos grados de libertad y por lo tanto el valor crítico  $F_{2, 2} = 39$ , obtenido de tablas para un estudio de dos colas al 95% de confianza y valor  $p = 0.05$ ; permitió establecer que las desviaciones estándar no son significativamente diferentes entre los métodos de extracción.

A partir de lo anterior, se estableció como hipótesis nula que las medias de los resultados obtenidos para cada par de métodos en estudio son iguales; por lo que, la comparación de medias experimentales se calculó usando la siguiente ecuación:

$$|t| = \frac{x_1 - x_2}{s \sqrt{\left(\frac{1}{n_1}\right) + \left(\frac{1}{n_2}\right)}}$$

donde  $s$  esta calculada a partir de:

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)}$$

y toda  $|t|$  con  $n_1 + n_2 - 2$  grados de libertad,  $x_1$  y  $x_2$  como las medias de los métodos evaluados.

Los resultados de la extracción aplicando microondas y ultrasonidos aceptan la hipótesis nula solo para el caso comparativo entre *EAMF* – *EAUS*; ya que con cuatro grados de libertad el valor crítico  $t_4 = 2.78$  ( $p = 0.05$ ). Sin embargo, como el valor de  $t$  es mayor al valor crítico en los otros planteamientos; entonces existe una diferencia significativa entre los métodos y esto obliga a rechazar la hipótesis nula. Por lo tanto, la concentración de vainillina es significativamente diferente según el procedimiento aplicado y a su vez las eficiencias de extracción están dadas en el siguiente orden: *EAMF\** > *EAUS\** > *EAMF* = *EAUS* > *ECS\** > *NMX*.

## G. Importancia y aplicaciones tecnológicas

En México la realidad de la vainilla se refleja económica y socialmente, puesto que en la producción se presentan variaciones y en particular porque el manejo de la polinización de la orquídea, unido al curado de las vainas es una tradición en la zona del Totonacapan. No obstante el principal problema es que no se cuentan con datos sobre la calidad de las vainas y por tal motivo destacan otras regiones del mundo, estableciendo el precio en el mercado.

El protocolo de los nuevos métodos de extracción con mejorías de tiempo y concentración de vainillina sobre los procedimientos que comúnmente se practican, amplían el estudio sobre la vainilla mexicana y abre la oportunidad de obtener extractos naturales preferidos por el consumidor final a diferencia de su contraparte sintética. De ahí que el factor de aplicación se extiende hacia productos alimenticios, bebidas, cosméticos o farmacéuticos ya que es posible obtener mayor cantidad de vainillina en extractos naturales lo que en términos de costos representa una prioridad.

Como se mencionó antes la norma oficial NMX-FF- 074- 1996- SCFI establece la determinación de vainillina en la modalidad de lotes, por lo que contar con una técnica en flujo que reúne el mismo fundamento pero con la ventaja de eliminación del tratamiento del extracto, reducción de tiempo de análisis y bajo costo es atractivo al control de calidad de la vainilla. Considerando además los alcances analíticos reflejados en esta investigación, la metodología integral se coloca como una alternativa en contraste a otros procedimientos (**Tabla 17**) con la viabilidad de automatizar (extracción/cuantificación) el monitoreo continuo de vainillina.

**Tabla 17.** Contraste de procedimientos empleados en la cuantificación de vainillina proveniente de extractos de vainilla.

<b>TÉCNICA</b>	<b>HPLC <sup>1</sup></b>	<b>EC <sup>2</sup></b>	<b>CG <sup>3</sup></b>	<b>FIA <sup>4</sup></b>
<b>ADITAMENTOS</b>	Columna C8 Guarda columna Sistema de alta presión	Fuente de alto voltaje Recipiente de plexiglás Capilar de sílice fundida	Columna DB-Wax Pre-columna Hidrógeno Helio	Bomba peristáltica Válvulas de inyección Celda de cuarzo Hellman Tubos de PTFE (0.5 mm DI)
<b>REACTIVOS</b>	Metanol grado HPLC Agua grado HPLC Ácido acético glacial Etanol absoluto Vainillina	Dodecil sulfato de sodio Tetraborato de sodio Ácido bórico Urea Vainillina	Pentano Éter n-hexanol Sulfato de sodio anhidro Vainillina	Hidróxido de sodio Etanol absoluto Agua destilada Vainillina
<b>EXTRACCIÓN</b>	Maceración 48 horas	Maceración 3 días	Extracción líquido-líquido 2 minutos	Microondas focalizadas * Ultrasonidos ** 80 minutos
<b>TRATAMIENTO</b>	Dilución 1:10 con etanol 40% Filtración por membrana de 0.45 µm, nylon 66	Dilución 1:10 con agua Filtración por membrana de 0.2 µm	Concentración a 1 mL Almacenamiento a - 18 °C	Dilución en línea 4 minutos
<b>DETECCIÓN</b>	Ultravioleta: 254 nm 25 minutos Estándar de referencia: 1200 mg/L	Ultravioleta: 230 nm 12 minutos Rango lineal: 5 – 20 mg/L	Ionización de flama 250 °C Espectrometría de masas 90 minutos	Ultravioleta: 347 nm 4 minutos Rango lineal: 200 – 2000 mg/L
<b>VAINILLINA <sup>a</sup></b>	9.0 mg/g	12.10 mg/g	19.11 mg/g	30.75 ± 1.57 mg/g * 25.92 ± 0.78 mg/g **
<b>REFERENCIA</b>	Ranadive, 1992	Pyell et al, 2002	Pérez-Silva et al, 2006	-----

1) Cromatografía de líquidos de alta resolución; 2) Electroforesis capilar; 3) Cromatografía de gases; 4) Análisis por inyección en flujo; a) Concentración en vainilla mexicana.

## V. CONCLUSIONES

- La configuración de análisis por inyección en flujo permitió determinar vainillina proveniente de los extractos de vainilla con alta precisión y debido a que incluye la dilución de la muestra en línea antes de la detección, se eliminan errores de tratamiento.
- A partir de esta técnica, fue posible cuantificar vainillina para evaluar la eficiencia de extracción de los diferentes procedimientos ensayados sobre las vainas de vainilla; de donde los resultados muestran que la aplicación de energía microondas y ultrasonido, no solo incrementan la eficiencia de extracción sino que disminuyen el tiempo de extracción en comparación con los procedimientos por maceración (Norma Mexicana) o Soxhlet.
- El empleo de microondas y ultrasonido demostró que son una excelente alternativa para obtener extractos naturales de vainilla, el punto clave para la elección de alguna de estas energías implica circunstancias de orden económico, puesto que las eficiencias de extracción son similares y los procedimientos tienen igual duración.
- El acoplamiento de dilución en el análisis por inyección en flujo crea la posibilidad de automatizar desde la extracción hasta la detección de vainillina, como un procedimiento de control y monitoreo en función al tiempo del contenido del componente principal en los extractos de vainilla.

## VI. BIBLIOGRAFÍA

Agudo M.; Ríos A and Valcárcel M. **Automatic calibration and dilution in unsegmented flow systems.** *Analytica Chimica Acta.* 264 (1992) 265 – 273.

Alves E. R.; Fortes P. R.; Borges E. P. and Zagatto E. A. G. **Spectrophotometric flow-injection determination of total reducing sugars exploiting their alkaline degradation.** *Analytica Chimica Acta.* 564 (2006) 231 – 235.

Anklam Elke; Gaglione Silvia and Müller Anne. **Oxidation behaviour of vanillin in dairy products.** *Food Chemistry.* 60 (1997) 43 – 51.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1990. Flavors. 15th Edition; Official Methods of Analysis; Arlington, VA. Vol. 2, Chapter 36. pp. 891.

Benson Richard L.; Worsfold Paul J. and Sweeting Frank W. **On-line determination of residual aluminium in potable and treated waters by flow-injection analysis.** *Analytica Chimica Acta.* 238 (1990) 177 – 182.

Bettazzi F.; Palchetti I.; Sisalli S. and Mascini M. **A disposable electrochemical sensor for vanillin detection.** *Analytica Chimica Acta.* 555 (2006) 134 -138.

Boyce Mary C.; Haddad Paul R. and Sostaric Tomislav. **Determination of flavour components in natural vanilla extracts and synthetic flavourings by mixed micellar electrokinetic capillary chromatography.** *Analytica Chimica Acta.* 485 (2003) 179 – 186.

Bruman H. **The culture history of Mexican vanilla.** *Hispanic American Historical Review.* 28:3 (1948) 360 – 376.

Bryce D. W.; Izquierdo A. and Luque de Castro M. D. **Continuous microwave assisted pervaporation/atomic fluorescent detection: An approach for speciation in solid samples.** *Analytica Chimica Acta.* 324 (1996) 69 – 75.

Burguera M. and Burguera J. L. **Microwave-assisted sample decomposition in flow analysis.** *Analytica Chimica Acta.* 366 (1998) 63 – 80.

Bütehorn Ulf and Pyell Ute. **Micellar electrokinetic chromatography as a screening method for the analysis of vanilla flavorings and vanilla extracts.** *Journal of Chromatography A.* 736 (1996) 321 – 332.

Caballo-López A. and Luque de Castro M. D. **Fast microwave-assisted free sugars washing and hydrolysis pre-treatment for the flow injection determination of starch in food.** *Talanta.* 59 (2003) 837 – 843.

Caldeira I.; Pereira R.; Clímaco M. C.; Belchior A. P. and Bruno de Sousa R. **Improved method of aroma compounds in aged brandies and aqueous alcoholic wood extracts using ultrasound.** *Analytica Chimica Acta.* 513 (2004) 125 – 134.

Cañizares-Macías M. P.; García-Mesa J. A. and Luque de Castro M. D. **Fast ultrasound-assisted method for the determination of the oxidative stability of virgin olive oil.** *Analytica Chimica Acta.* 502 (2004) 161 – 166.

Cañizares-Macías M. P.; Hernández-Garciadiego L. and Gómez-Ruiz H. **An automated flow injection analysis procedure for the determination of reducing sugars by DNSA method.** *Journal of Food Science.* 66 (2001) 407 – 411.

Carbonell V.; de la Guardia M.; Salvador A.; Burguera J. L. and Burguera M. **On-line microwave oven digestion flame atomic absorption analysis of solid samples.** *Analytica Chimica Acta.* 238 (1990) 417 – 421.

Carnero Ruiz C.; Heredia Bayona A. and García Sánchez F. **Derivative spectrophotometric determination of vanillin and *p*-hydroxybenzaldehyde in vanilla bean extracts.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 38 (1990) 178 – 181.

Chemat F.; Grondin I.; Shum Cheong Sing A. and Smadja J. **Deterioration of edible oils during food processing by ultrasound.** *Ultrasonics Sonochemistry.* 11 (2004) 13 – 15.

Costin J. W.; Barnett N. W.; Lewis S. W. and McGillivery D. J. **Monitoring the total phenolic/antioxidant levels in wine using flow injection analysis with acidic potassium permanganate chemiluminescence detection.** *Analytica Chimica Acta.* 499 (2003) 47 – 56.

Dignum J. W. M.; van der Heijden R.; Kerler J.; Winkel C. and Verpoorte R. **Identification of glucosides in green beans of *Vanilla planifolia* Andrews and kinetics of vanilla  $\beta$ -glucosidase.** *Food Chemistry.* 85 (2004) 199 – 205.

Ericsson Magnus and Colmsjö Anders. **Dynamic microwave-assisted extraction.** *Journal of Chromatography A.* 877 (2000) 141 – 151.

Fayet B.; Tisse C.; Guerere M. et Estienne J. **Nouveaux critères analytiques dans l'étude des gousses de vanille.** *Analisis.* 15 (1987) 217 – 226.

Forman L. W.; Thomas B. D. and Jacobson F. S. **On-line monitoring and control of fermentation process by flow injection analysis.** *Analytica Chimica Acta.* 249 (1991) 101 – 111.

Fraisse D.; Maquin F.; Stahl D.; Suon K. et Tabet J. C. **Analise d'extraits de vanille par chromatographie en phase liquide, couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse et spectrométrie de masse-spectrométrie de masse.** *Analisis*. 12 (1984) 63 – 71.

García-Ayuso L. E. and Luque de Castro M. D. **A multivariate study of the performance of a microwave-assisted Soxhlet extractor for olive seeds.** *Analytica Chimica Acta*. 382 (1999) 309 – 316.

Hágsater E.; Soto Arenas M. Á.; Salazar Chávez G. A.; Jiménez Machorro R.; López Rosas M. A. y Dressler R. L. 2005. *Las orquídeas de México*. Instituto Chinoín. México. 304 pp.

Hardcastle J. L.; Paterson C. J. and Compton R. G. **Biphasic sonoelectroanalysis: Simultaneous extraction from, and determination of vanillin in food flavoring.** *Electroanalysis*. 13 (2001) 899 – 905.

Hartman Thomas G.; Karmas Karl, Chen Judy; Shevade Aparna; Deagro Maria and Hui-Ing Hwang. 1992. **Determination of vanillin, other phenolic compounds, and flavors in vanilla beans. Direct thermal desorption-Gas Chromatography and – Gas Chromatography-Mass spectrometric analysis.** In Chi-Tang Ho, Chang Y. Lee and Mou-Tuan Huang (Eds.) *Phenolic compounds in food and their effects on health I. Analysis, Occurrence, and Chemistry*. ACS. Symposium Series No. 506 (pp. 60-76). Washington, DC: American Chemical Society.

Havkin-Frenkel Daphna and Dorn Ruth. 1997. **Vanilla.** In Chi-Tang Ho and Sara J. Risch (Eds.), *Spices. Flavor Chemistry and Antioxidant Properties*. ACS Symposium Series No. 660 (pp. 29-40). Washington, DC: American Chemical Society.

Hernández Apolinar, M. 1997. Crecimiento y reproducción en *Vanilla planifolia*. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.

Hernanz-Vila D.; Heredia-Mira F. J.; Beltrán-Lucena R. and Fernández-Racamales M. A. **Optimization of an extraction method of aroma compounds in white wine using ultrasound.** *Talanta*. 50 (1999) 413 – 421.

Herrmann A. and Stöckli M. **Rapid control of vainilla-containing products using high-performance liquid chromatography.** *Journal of Chromatography*. 246 (1982) 313 – 316.

Hromádkova Z. and Ebringerová A. **Ultrasonic extraction of plant materials investigation of hemicellulose release from buckwheat hulls.** *Ultrasonics Sonochemistry*. 10 (2003) 127 – 133.

INEGI. 2001. Anuario estadístico de comercio exterior de los Estados Unidos Mexicanos, 2000. Exportación en miles de dólares.

INEGI. 2002. Anuario estadístico de comercio exterior de los Estados Unidos Mexicanos. Exportación en miles de dólares.

INEGI. 2003. Anuario estadístico de comercio exterior de los Estados Unidos Mexicanos. Enero-Marzo 2002. Exportación en miles de dólares.

INEGI. 2004. Anuario estadístico de comercio exterior de los Estados Unidos Mexicanos, 2003. Exportación en miles de dólares.

INEGI. 2005. Anuario estadístico de comercio exterior de los Estados Unidos Mexicanos, 2004. Exportación en miles de dólares.

Jassie L.; Revesz R.; Kierstead T.; Hasty E. and Metz S. 1997. **Microwave-Enhanced Chemistry**. In Kingston H. M. and Haswell S. J. (Eds.), American Chemical Society, Washington , DC. pp. 569.

Kharisov Boris I. y Ortíz Méndez U. **Uso del ultrasonido en procesos químicos**. *Ingenierías*. 2 (1999) 13 – 21.

Lawler, L. J. 1984. Ethnobotany of the Orchidaceae. J. Arditti (ed.). *Orchid Biology: Reviews and Perspectives*. Vol. 3. Cornell University Press, Ithaca. pp. 27 – 149.

Lázaro F.; Luque de Castro M. D. and Valcárcel M. **Direct introduction of solid samples into continuous-flow systems by use of ultrasonic irradiation**. *Analytica Chimica Acta*. 242 (1991) 283 – 289.

Longares Patrón, A. 2006. Determinación espectrofotométrica de vainillina y p-hidroxibenzaldehído a partir de extracción de *Vanilla fragans* utilizando microondas focalizadas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

Longares-Patrón A. and Cañizares-Macías M. P. **Focused microwaves-assisted extraction and simultaneous spectrophotometric determination of vanillin and p-hydroxybenzaldehyde from *Vanilla fragans***. *Talanta*. 69 (2006) 882 – 887.

Luque de Castro M. D. and da Silva M. P. **Strategies for solid sample treatment**. *Trends in Analytical Chemistry*. 16 (1997) 16 – 24.

Luque de Castro M. D.; Jiménez-Carmona M. M. and Fernández-Pérez V. **Towards more rational techniques for the isolation of valuable essential oils from plants**. *Trends in Analytical Chemistry*. 18 (1999) 708 – 716.

Luque Matilde; Luque-Pérez Encarnación; Ríos Ángel and Valcárcel Miguel. **Supported liquid membranes for the determination of vanillin in food samples with amperometric detection.** *Analytica Chimica Acta*. 410 (2000) 127 – 134.

Luque-García J. L. and Luque de Castro M. D. **Focused microwave-assisted Soxhlet extraction: devices and applications.** *Talanta* 64 (2004) 571 – 577.

Luque-García J. L. and Luque de Castro M. D. **Ultrasound: a powerful tool for leaching.** *Trends in Analytical Chemistry*. 22 (2003) 41 – 47.

Luque-García J. L. and Luque de Castro M. D. **Ultrasound-assisted Soxhlet extraction: an expeditive approach for solid sample treatment. Application to the extraction of total fat from oleaginous seeds.** *Journal of Chromatography A*. 1034 (2004) 237 – 242.

Luque-García J. L. and Luque de Castro M. D. **Where is microwave-based analytical equipment for solid sample pre-treatment going?** *Trends in Analytical Chemistry*. 22 (2003) 90 – 98.

Luque-García, J. L.; Velasco, J.; Dobarganes, M. C. and Luque de Castro, M. D. **Fast quality monitoring of oil from prefried and fried foods by focused microwave-assisted Soxhlet extraction.** *Food Chemistry*. 76 (2002) 241 – 248.

Mancilla Ascencio, C. L. 1997. La vainilla un recurso mexicano: Potenciales de explotación y estrategias de aprovechamiento. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

Massart D. L.; Vandeginste B. G. M.; Buydens L. M. C.; DeJong S.; Lewi P. J. and Smeyer-Verbeke J. 1997. Handbook of chemometrics and qualimetrics: Part A. Data handling in science and technology. Elsevier, Amsterdam. pp. 388 – 390.

Miller J. C. y Miller J. N. 1993. Estadística para Química Analítica. Addison – Wesley. Wilmington; Delaware, E. U. A. pp. 87 – 119.

Miller J. N. y Miller J. C. 2002. Estadística y Quimiometría para Química Analítica. 4ª Edición. Prentice Hall. pp. 43 – 50.

Moreno-Cid A. and Yebra M. C. **Flow injection determination of copper in mussels by flame atomic absorption spectrometry after on-line continuous ultrasound-assisted extraction.** *Spectrochimica Acta Part B.* 57 (2002) 967 – 974.

Ogbomo I.; Kittsteiner-Eberle R.; Englbrecht U.; Prinzing U.; Danzer J. and Schmidt H. L. **Flow injection systems for the determination of oxidoreductase substrates: Applications in food quality control and process monitoring.** *Analytica Chimica Acta.* 249 (1991) 137 – 143.

Osamu Negishi and Tetsuo Ozawa. **Determination of hydroxycinnamic acids, hydroxybenzoic acids, hydroxybenzaldehydes, hydroxybenzyl alcohols and their glucosides by high-performance liquid chromatography.** *Journal of Chromatography A.* 756 (1996) 129 – 136.

Paré Jocelyn J. R. and Bélanger Jacqueline M. R. **Microwave-assisted process (MAP™): A new tool for the analytical laboratory.** *Trends in Analytical Chemistry.* 13 (1994). 176 – 184.

Pérez-Silva A.; Odoux E.; Brat P.; Ribeyre F.; Rodriguez-Jimenes G.; Robles-Olvera V.; García-Alvarado M. A. and Günata Z. **GC-MS and GC-olfatometry analysis of aroma compounds in a representative organic aroma extract from cured vanilla (*Vanilla planifolia* G. Jackson) beans.** *Food Chemistry.* 99 (2006) 728 – 735.

Podstolski Andrzej; Havkin-Frenkel Daphna; Malinowski Jacek; Blount Jack W.; Kourteva Galina and Dixon Richard A. **Unusual 4-hydroxybenzaldehyde synthase activity from tissue cultures of the vanilla orchid *Vanilla planifolia*.** *Phytochemistry*. 61 (2002) 611 – 620.

Pyell Ute; Pletsch-Viehmann Birgit and Ramus Ute. **Component analysis of vanilla extracts and vanilla containing commercial preparations by micellar electrokinetic chromatography or high-performance liquid chromatography – A method comparison.** *Journal of Separation Science*. 25 (2002) 1035 – 1042.

Rakotoarisoa Manitra A. and Shapouri Shahla. **Market power and the pricing of commodities imported from developing countries: the case of US vanilla bean imports.** *Agricultural Economics*. 25 (2001) 285 – 294.

Ramachandra Rao S. and Ravishankar G. A. **Review. Vanilla flavour: production by conventional and biotechnological routes.** *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80 (2000) 289 – 304.

Ranadive Arvind S. **Vanillin and related flavor compounds in vanilla extracts made from beans of various global origins.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40 (1992) 1922 – 1924.

Romdhane M. and Gourdon C. **Investigation in solid-liquid extraction: influence of ultrasound.** *Chemical Engineering Journal*. 87 (2002) 11 – 19.

Rong Li; Zitao Jiang; Luyuan Mao and Hanxi Shen. **Adsorbed resin phase spectrophotometric determination of vanillin or/and its derivatives.** *Talanta*. 47 (1998) 1121 - 1127.

Rosas Moreno, M. 1984. Vainilla: Orquídea mexicana. *Vanilla fragans* (Salisbury) Ames, sinonimia *Vanilla planifolia* (Andrews), datos sobre su morfología e

hibridación. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.

Ruedas Rama M. J.; Ruiz Medina A. and Molina Díaz A. **Bead injection spectroscopy-flow injection análisis (BIS-FIA): an interesting tool applicable to pharmaceutical analysis. Determination of promethazine and trifluoperazine.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 35 (2004) 1027 – 1034.

Ruiz-Jiménez J.; Luque-García J. L. and Luque de Castro M. D. **Dynamic ultrasound-assisted extraction of cadmium and lead from plants prior to electrothermal atomic absorption spectrometry.** *Analytica Chimica Acta.* 480 (2003) 231 – 237.

Ruiz-Terán F.; Perez-Amador I. and López-Munguia A. **Enzymatic extraction and transformation of glucovanillin to vanillin from vanilla green pods.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 49 (2001) 5207 – 5209.

Sandoval-Salas, F. 2005. Caracterisation de la production et optimisation du processus d'extraction des colorants de la plante de añil (*Indigofera suffruticosa* Mill). These pour obtenir le titre de docteur. École de sciences des agroressources. Institut National Polytechnique de Toulouse.

Sanz E.; Muñoz-Olivas R. and Cámara C. **Evaluation of a focused sonication probe for arsenic speciation in environmental and biological samples.** *Journal of Chromatography A.* 1097 (2005) 1 – 8.

Secretaria de Comercio y Fomento Industrial (SECOFI). 1996. Norma Mexicana, NMX-FF-074-1996-SCFI. Productos alimenticios no industrializados para consumo humano – especias y condimentos – entera y en estado seco – vainilla (*Vanilla*

*fragans* Salisbury Ames o *Vanilla planifolia* Andrews); especificaciones. México. 14 pp.

Sostaric Tomislav; Boyce Mary C. and Spickett Evadne E. **Analysis of the volatile components in vanilla extracts and flavorings by solid-phase microextraction and gas chromatography.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48 (2000) 5802 – 5807.

Sparr Eskilsson C. and Björklund Erland. **Review. Analytical-scale microwave-assisted extraction.** *Journal of Chromatography A*. 902 (2000) 227 – 250.

Stashenko Elena E.; Jaramillo Beatriz E. and Martínez Jairo R. **Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity.** *Journal of Chromatography A*. 1025 (2004) 93 – 103.

Statgraphics Plus para Windows versión 2.1, Rockville , M. D., 1992.

Sterbová Dagmar; Matejíček David; Vlcek Jirí and Kubán Vlastimil. **Combined microwave-assisted isolation and solid-phase purification procedures prior to the chromatographic determination of phenolic compounds in plant materials.** *Analytica Chimica Acta*. 513 (2004) 435 – 444.

Themelis D. G.; Economou A.; Tsiomlektsis A. and Tzanavaras P. D. **Direct determination of phosphate in urine by sequential-injection analysis with single on-line dilution-calibration method and photometric detection.** *Analytical Biochemistry*. 330 (2004) 193 – 198.

Thompson Richard D. and Hoffman Terry J. **Determination of cumarin as an adulterant in vanilla flavoring products by high-performance liquid chromatography.** *Journal of Chromatography.* 438 (1988) 369 – 382.

Toma Maricela; Vinatoru M.; Paniwnyk L. and Mason T. J. **Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction.** *Ultrasonics Sonochemistry.* 8 (2001) 137 – 142.

Valachovic P.; Pechova A. and Mason T. J. **Towards the industrial production of medicinal tincture by ultrasound assisted extraction.** *Ultrasonics Sonochemistry.* 8 (2001) 111 – 117.

Valcárcel M. y Luque de Castro M. D. 1984. Análisis por inyección en flujo. Departamento de Química Analítica. Universidad de Córdoba. Monte de Piedad y Caja de Ahorros de Córdoba. 449 pp.

van Staden J. F. and Tlowana S.I. **On-line separation, simultaneous dilution and spectrophotometric determination of zinc in fertilizers with a sequential injection system and xylenol orange as complexing agent.** *Talanta.* 58 (2002) 1115 – 1122.

Vinatoru Mircea. **An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs.** *Ultrasonics Sonochemistry.* 8 (2001) 303 – 313.

Vinatoru M.; Toma Maricela; Radu Otilia; Filip P. I.; Lazurca D. and Mason T. J. **The use of ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials.** *Ultrasonics Sonochemistry.* 4 (1997) 135 – 139.

Waliszewski Krzysztof N.; Ovando S. L. and Pardio V.T. **Effect of hydration and enzymatic pre-treatment of vanilla beans on the kinetics of vanillin extraction.** *Journal of Food Engineering.* (EN PRENSA).

Walton Nicholas J.; Mayer Melinda J. and Narbad Arjan. **Molecules of interest. Vanillin.** *Phytochemistry*. 63 (2003) 505 – 515.

Williams, N. H. 1982. The biology of orchids and euglossine bees. J. Arditti (ed.) *Orchid Biology: Reviews and Perspectives*. pp. 119-171. Cornell University Press, Ithaca.

Xuejun Pan; Guoguang Niu and Huizhou Liu. **Comparison of microwave-assisted extraction and conventional extraction techniques for the extraction of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza bunge*.** *Biochemical Engineering Journal*. 12 (2002) 71 – 77.

Yongnian Ni; Gouwen Zhang and Serge Kokot. **Simultaneous spectrophotometric determination of maltol, ethyl maltol, vanillin and ethyl vanillin in foods by multivariate calibration and artificial neural networks.** *Food Chemistry*. 89 (2005) 465 – 473.

Yoshida Aya; Takenaka Yasuhiro; Tamaki Hisanori; Frébort Ivo; Adachi Osao and Kumagai Hidehiko. **Vanillin formation by microbial amine oxidases from vanillylamine.** *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 84 (1997) 603 – 605.

Zepeda Pérez, M. V. C. 1980. Valoración de vainillina en el extracto de vainilla por el método alcalino. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

Zuo Y.; Zhang L.; Wu J.; Fritz J. W.; Medeiros S. and Rego C. **Ultrasonic extraction and capillary gas chromatography determination of nicotine in pharmaceutical formulations.** *Analytica Chimica Acta*. 526 (2004) 35 – 39.

## ANEXO A

### ▪ Características del cultivo de la vainilla

#### - Especies

La vainilla es una orquídea epífita, trepadora y tropical, perteneciente a una especie muy rara; ya que es uno de los miembros de las fanerógamas más abundantes y antiguas del mundo, constituida por 35 mil variedades y la única cuyo fruto es comestible (Mancilla, 1997).

De una familia con más de 110 especies que han sido descritas, solamente tres son de valor comercial: *Vanilla planifolia* Salisb Ames o *Vanilla fragans* Andrews, *Vanilla tahitiensis* Moore, y *Vanilla pompona* Schiede. El material saborizante es obtenido del fruto curado y seco llamado “vaina”; y solo son permitidas en el uso de alimentos: *Vanilla planifolia* y *Vanilla tahitiensis* (Hernández, 1997).

El nombre genérico de **Vainilla**, es derivado del español “vanillia”, un diminutivo de *vaina*; en tanto que su nombre de especie, **planifolia**, se refiere a la ancha y delgada hoja de la planta (Havkin y Dorn, 1997).

#### - Clima

La vainilla crece mejor bajo al abrigo de los vientos, intensidades de luz solar normales de 40 – 50%, necesita un clima tropical, cálido y húmedo con frecuente, pero no excesiva lluvia. El exceso provoca que los brotes tiendan a perder humedad, la planta sea atacada por hongos o enfermedades de la raíz. En condiciones de sequía, la planta de la vainilla también puede sufrir considerables daños; lo cual propiciará un número pequeño de flores, bajo rendimiento y esfuerzos de cultivo vanos. Un área sombría, precipitación pluvial anual entre

1000 – 3000 mm y una temperatura promedio de 23 a 29 °C son las condiciones preferidas (Rosas, 1984; Mancilla, 1997; Hágsater et al, 2005).

#### - **Suelo y Nutrientes**

A diferencia de otras orquídeas, la vainilla es un bejuco o enredadera que germina en el suelo de la selva y busca un árbol sobre el que crece y se fija mediante pequeñas raíces adventicias o aéreas. Se eligen árboles que crecen rápido con pequeñas ramas, que no compiten por el agua o nutrientes y que proporcionan sombra tal como: aguacate, café, naranja, pino casuarina, etc. (Havkin y Dorn, 1997).

Los terrenos con suave declive, suelo limoso fértil, estructura granular o poliédrica angular, textura media y gran capacidad para retener el agua, con un pH de 6 a 7 y una capa profunda de musgo, proporciona los nutrientes alrededor de las raíces, ayuda a mantener la humedad y a esparcir las raíces (Mancilla, 1997). Como otras plantas de la selva, la vainilla establece intrincadas relaciones con hongos micorrízicos y por ello requiere suelos ricos en materia orgánica con drenado apropiado y alta capacidad para mantener la humedad (Hágsater et al, 2005).

Aunque el nivel de calcio, nitrógeno, potasio, fósforo y micronutrientes son esenciales para el crecimiento y producción de vainilla, se presta mayor atención al tipo de musgo y a los parámetros del suelo, tal como textura y pH, porque parecen ser más importantes que los nutrientes (Havkin y Dorn, 1997).

#### - **Propagación**

Una vez que los árboles soporte tienen suficiente follaje para el sombreado, la vainilla es comúnmente propagada de cortes o esquejes vigorosos usualmente con 8 a 12 nodos (Mancilla, 1997). La forma más simple para plantar el corte es

dejarlo sobre la tierra y cubrirlo con capas gruesas de musgo (Havkin y Dorn, 1997).

Cuando se inicia una nueva plantación, se consideran las expectativas de vida de los vainillales; puesto que además de las condiciones climáticas y de suelo, es importante notar que el periodo productivo de la planta sucede después de 3 a 4 años hasta por 6 años consecutivos, con una disminución en la productividad de vainas después de 8 a 10 años (Havkin y Dorn, 1997).

Una hectárea de tierra puede soportar cerca de 4000 matas productivas con un rendimiento promedio de 1.5 a 2.0 kilos de vainas verdes por enredadera. La cosecha de cinco kilos de frutos verdes y de buena calidad, con un peso aproximado entre 15 a 30 gramos cada uno, tendrán como resultado un kilo de frutos curados (Havkin y Dorn, 1997; Hágsater et al, 2005).

#### **- Floración, Fruto, Crecimiento y Maduración**

Debido a que los bejucos de vainilla necesitan acumular los factores de crecimiento o nutrientes necesarios para alcanzar una cierta madurez antes de empezar a florear, los factores determinantes son: la sequía, la temperatura, la poda y el tamaño de los cortes originales (Havkin y Dorn, 1997).

Las plantas crecen varios metros y después de 4 a 5 años del cultivo del esqueje, cuando su follaje está expuesto a la luz del sol, producen numerosas flores en cuya base existe una pequeña bráctea persistente de color verde y de forma triangular. La florescencia está agrupada en 10 racimos cortos por planta, compuestos cada uno de 10 a 15 flores color blanco-amarillentas con un desarrollo escalonado a partir de la base (Rosas, 1984; Mancilla, 1997). Las flores dispuestas en espiga son hermafroditas, con órganos sexuales separados por una membrana llamada rostelo, sólo se desarrolla un estambre fértil y el polen forma pequeñas masas llamadas políneas (Rosas, 1984).

Durante la temporada de floración, en marzo y abril, cada día abre sólo una flor por un período muy corto (6 a 8 horas); por lo que la polinización debe tomar lugar tan pronto como la flor abre. Una característica del sistema de polinización natural es que la producción de frutos es muy pequeña, tal vez del orden de un fruto en muchos cientos o incluso miles de flores; aunque existe la posibilidad de la autopolinización, que varía de 1 a 6% (Hágsater et al, 2005).

La polinización es deseable para obtener entre 5 a 10 vainas, ya que una sobre polinización producirá pequeñas vainas y una corta vida de producción (Havkin y Dorn, 1997; Mancilla, 1997). Por lo tanto, se práctica la polinización manual donde muchas flores de vainilla son fecundadas y de las cuales se retiran varios frutos jóvenes después de un mes. La obtención de tres a cinco frutos por inflorescencia permite que la producción se incremente hasta cinco veces para convertirse en un cultivo próspero y aceptable (Hernández, 1997).

Tras la polinización, el preciado fruto alcanza su talla definitiva a través del desarrollo de la vaina que sucede con el alargamiento del ovario durante 1.5 a 2 meses (Hágsater et al, 2005). El fruto es capsular colgante de 10 a 25 cm de longitud, con un diámetro variable entre 10 y 15 mm, de color verde brillante, estrecha de tres ángulos, que contiene millares de semillas globosas muy pequeñas (Rosas, 1984).

La maduración de la vaina en la planta ocurre después de 8 a 9 meses y concluye con la cosecha escalonada en un lapso de 20 a 25 días, cuando se aprecia el cambio de color de verde brillante a verde amarillento opaco y se evita que el fruto se abra o esponga sus semillas (Mancilla, 1997).

Las semillas en el interior del fruto son extremadamente numerosas y se pueden contar por millares en una sola vaina; a simple vista aparecen de color negro, pero al microscopio son color café oscuro y café amarillento, de forma

esférica que alcanzan a medir 0.30 mm por 0.24 mm y provistas de un embrión indiferenciado muy rudimentario (Rosas, 1984).

#### - **Curado o Beneficiado**

Si la vaina continua en el bejuco, los frutos necesitarían casi un año para que por sí solos alcanzaran la maduración y despidieran su aroma. Sin embargo, en la práctica comercial, el sabor inconfundible y aroma característico desarrollados en el fruto es debido a los cambios que toman lugar durante el proceso de curado o beneficiado, que tarda de 3 a 6 meses adicionales (Hágsater et al, 2005).

En el beneficiado de la vainilla sucede un proceso de fermentación mediante el cual el fruto verde sin aroma cambia a un color marrón brillante y adquiere un olor suave y delicado para ser comercializado (Mancilla, 1997).

El proceso inicia con la “muerte de la vaina” o marchitamiento que tiene como objetivo impedir la actividad de las paredes celulares, pero reteniendo calor. Puesto que es necesario romper las membranas celulares y mezclar previamente los sustratos y enzimas. Los métodos donde la actividad enzimática juega un papel importante para el curado de las vainas, emplean agua caliente, sol, horno o congelación (Havkin y Dorn, 1997).

Una opción es colocar las vainas en una canasta y sumergirlas en agua a 65 °C por unos minutos. Otras formas de muerte por calor pueden ser hechas en un horno a 60 – 65 °C durante 24 a 48 horas o por exposición de las vainas al sol por períodos alternados de almacenamiento en un recinto cerrado y seco (Mancilla, 1997; Hágsater et al, 2005).

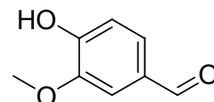
Después, mediante el endulzado se permite liberar el exceso de humedad reduciendo las bacterias y hongos; pero dejando suficiente humedad para la actividad enzimática. Este es el paso más importante porque se efectúa la

fermentación de los glucósidos, como la glucovainillina para originar la vainillina. Este es el paso en el cual las características típicas del sabor, aroma y color de las vainas de vainilla son desarrolladas. La duración del proceso de endulzado lleva de 7 a 10 días (Havkin y Dorn, 1997).

A medida que avanza el beneficiado, dentro del fruto se van formando aceites, los componentes que le dan flexibilidad, brillantez y aroma (Mancilla, 1997). Por lo que es necesario el secado de las vainas para reducir el contenido de humedad de 60 – 70% a 20 – 30%. El contenido de humedad reducida es típico para una buena calidad de vainas curadas y ayuda a eliminar cualquier actividad microbiana y asegura una larga vida de anaquel. En este paso es necesario no elevar mucho la temperatura, porque algunos de los saborizantes y componentes aromáticos pueden evaporarse o fraccionarse; de tal forma que originará una vaina de calidad inferior. El secado en el sol durante 2 a 3 horas por día o en hornos con 45 a 50 °C, toma de 7 a 10 días (Havkin y Dorn, 1997).

Finalmente el acondicionamiento o añejamiento, que puede durar un mes o varios meses, logra durante este periodo que las vainas de vainilla obtengan el típico “sabor completo” (Havkin y Dorn, 1997). Las reacciones químicas, tal como oxidación e hidrólisis son los eventos principales y como consecuencia a este largo seguimiento artesanal, la vainilla beneficiada correctamente está lista para su comercialización e industrialización (Mancilla, 1997).

## ANEXO B



### ▪ Vainillina

4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído;  $C_8H_8O_3$ ; peso molecular 152.15 g/mol. C 63.15%, H 5.30%, O 31.55%. Está presente naturalmente en una amplia variedad de alimentos y plantas como las orquídeas, la mayor fuente comercial de vainillina natural proviene del extracto de vainas de vainilla. Sintéticamente es producida en grandes cantidades a partir de lignina o guayacol.

Polvo cristalino blanco o incoloro, no higroscópico. Olor aromático agradable y sabor a vainilla. Se afecta con la luz. Densidad 1.056 g/mL. Punto de fusión 81 – 83 °C. Punto de ebullición 154 °C a 10 mmHg. Solubilidad en agua >2%; relación 1:2 de vainillina en etanol. Completamente soluble en cloroformo, éter, soluciones de hidróxidos alcalinos; soluble en glicerina y agua caliente. LD<sub>50</sub> oral en ratas, puercos de Guinea: 1580, 1400 mg/Kg.

Usos: Agente saborizante en fórmulas farmacéuticas, confitería, bebidas y alimentos. Fragancia en cosméticos. Reactivo para síntesis química.

The Merck Index. An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 13 ed. 2001. Merck & Co., Inc. N. J. pp. 1768 – 1769.

## ANEXO C

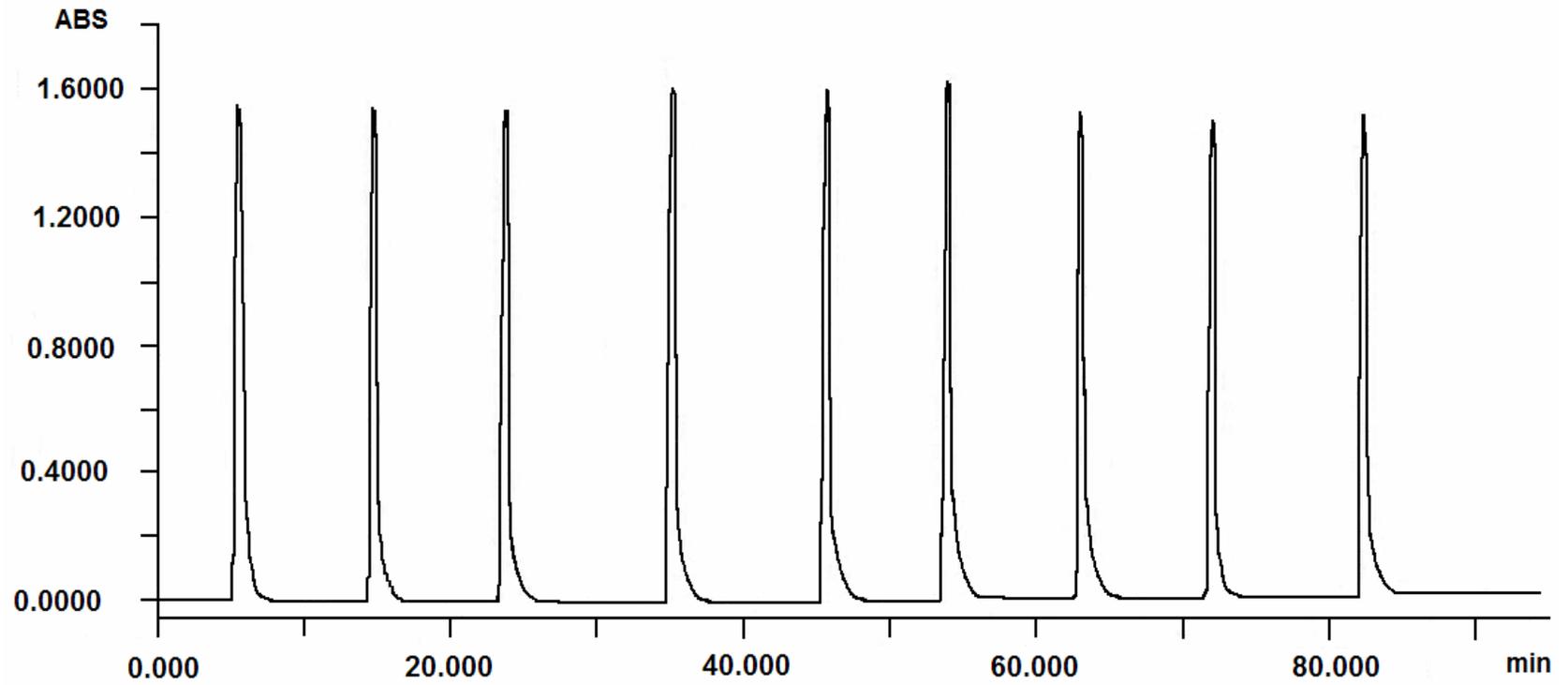


Diagrama de vainillina de los extractos de vainilla obtenidos por maceración (NMX-FF-074-1996-SCFI).

## ANEXO D

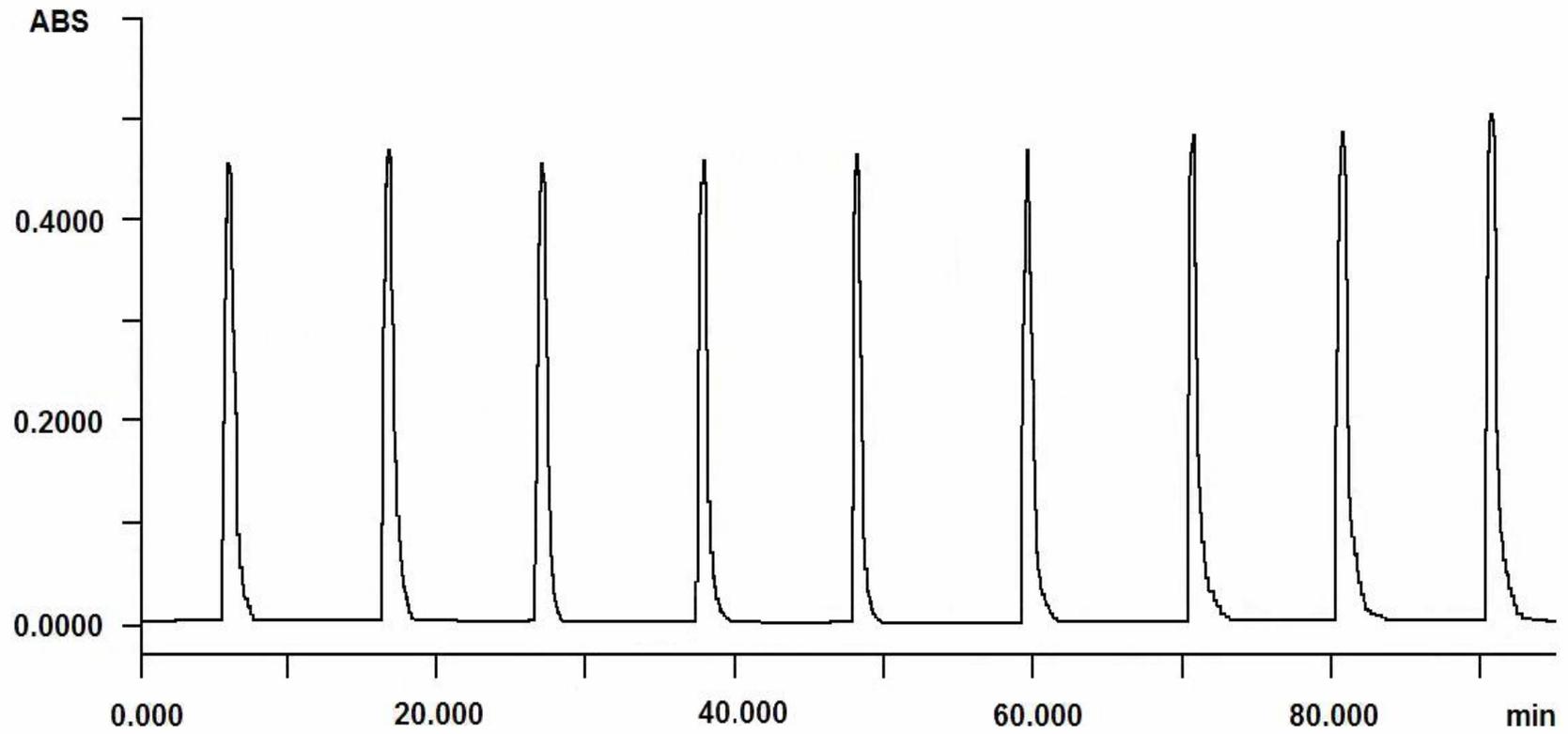
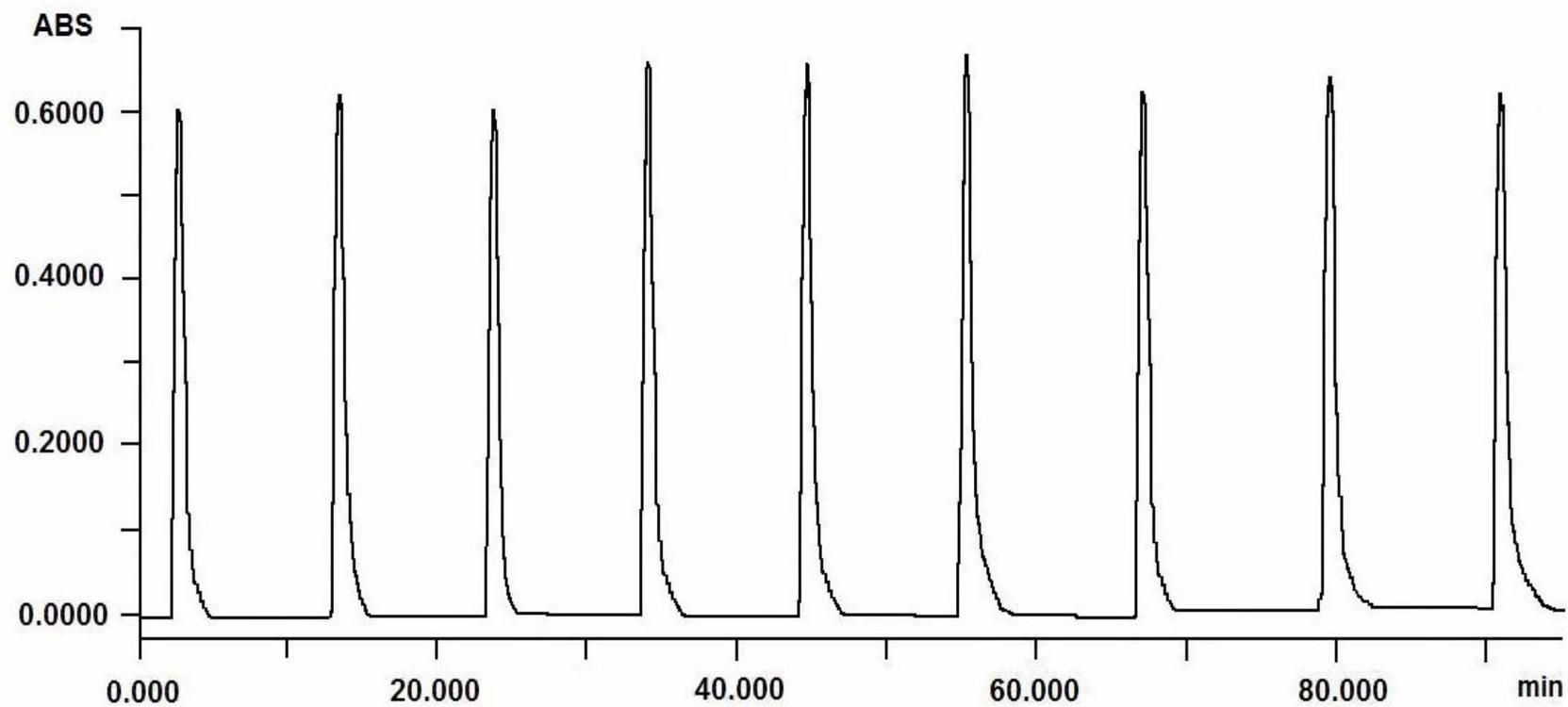


Diagrama de vainillina de los extractos de vainilla obtenidos por Soxhlet.

## ANEXO E



Figurama de vainillina de los extractos de vainilla obtenidos por microondas focalizadas al 70% de etanol.

## ANEXO F

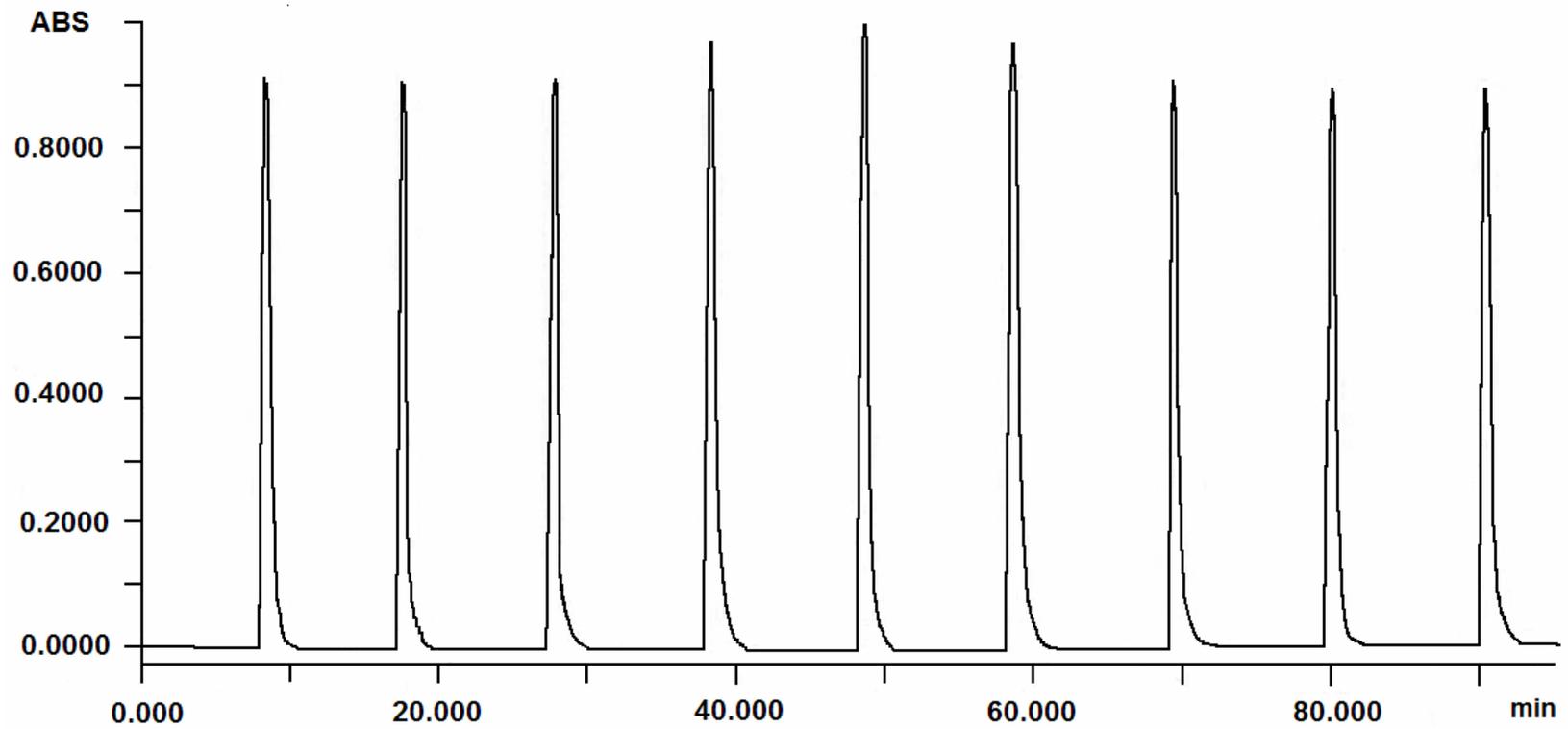


Diagrama de vainillina de los extractos de vainilla obtenidos por microondas focalizadas al 100% de etanol.

## ANEXO G

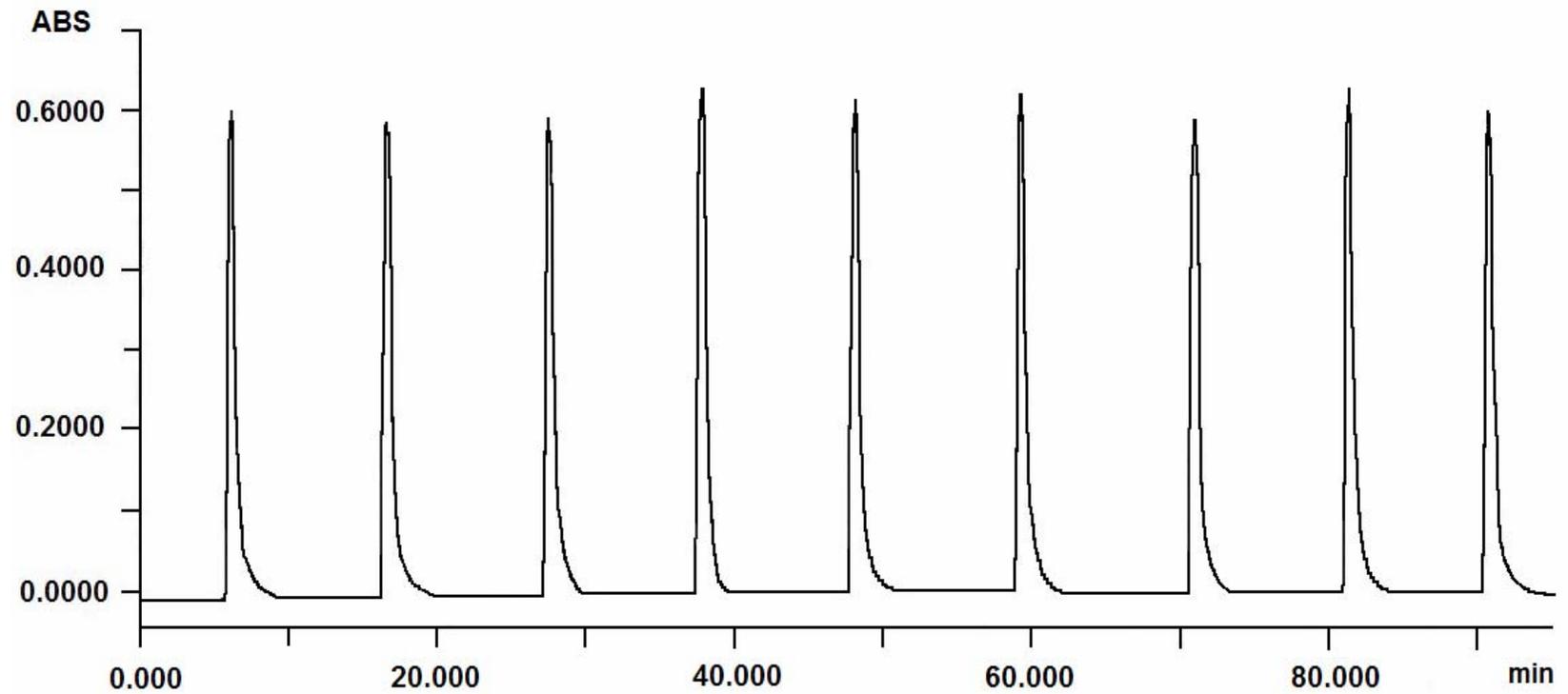


Diagrama de vainillina de los extractos de vainilla obtenidos por ultrasonidos al 70% de etanol.

## ANEXO H

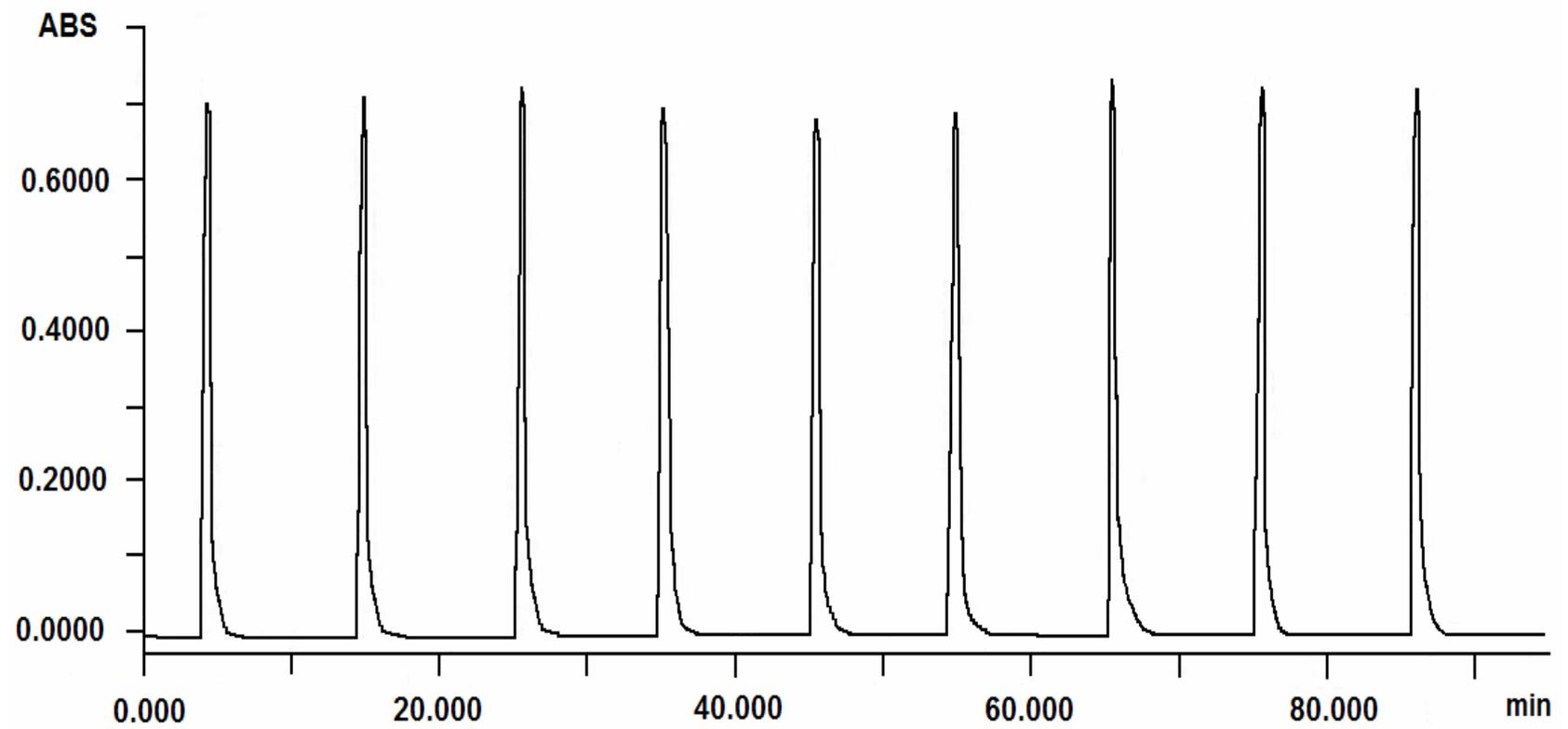


Diagrama de vainillina de los extractos de vainilla obtenidos por ultrasonidos al 100% de etanol.