

Método de Análise de Substâncias Aromáticas em Baunilhas do Brasil



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agroindústria de Alimentos
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
40**

**Método de Análise de Substâncias
Aromáticas em Baunilhas do Brasil**

*Maria de Lourdes Mendes de Souza
Rosemar Antoniassi
Manuela Cristina Pessanha de Araujo Santiago
Paola Ervatti Gama
Humberto Ribeiro Bizzo*

***Embrapa Agroindústria de Alimentos
Rio de Janeiro, RJ
2022***

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agroindústria de Alimentos

Avenida das Americas, 29501, Guaratiba

CEP: 23020-470, Rio de Janeiro, RJ

Fone: +55 (21) 3622-9600

Fax: +55 (21) 3622-9713

www.embrapa.br/agroindustria-de-alimentos

www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações e Editoração
da Embrapa Agroindústria de Alimentos

Presidente

Karina Maria Olbrich dos Santos

Secretária-executiva

Virginia Martins da Matta

Membros

André Luis do Nascimento Gomes, Celma Rivanda Machado de Araujo, Daniela De Grandi Castro Freitas de Sá, Elizabete Alves de Almeida Soares, Janice Ribeiro Lima, Leda Maria Fortes Gottschalk, Marcos de Oliveira Moulin, Melicia Cintia Galdeano e Otniel Freitas Silva

Supervisão editorial

Leda Maria Fortes Gottschalk

Revisão de texto

Marianna Ramos dos Anjos

Normalização bibliográfica

Celma Rivanda Machado de Araujo

Projeto gráfico da coleção

Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica

André Luis do Nascimento Gomes

Foto da capa

Paola Ervatti Gama

1ª edição

Publicação digital (2022): PDF

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Agroindústria de Alimentos

Método de Análise de Substâncias Aromáticas do Brasil / Maria de Lourdes Mendes de Souza ... [et al.]. – Rio de Janeiro : Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2022.

PDF 28 p. : il. color. ; 27 x 21 cm. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Agroindústria de Alimentos, ISSN 0101-630X ; 40).

1. *Vanilla planifolia*. 2. *Vanilla bahiana*. 3. *Vanilla chamissonis*. 4. *Vanilla pompona*. 5. Cromatografia líquida de alta eficiência. 4. Orchldaceae. 5. Validação. 6. Baunilha. I. Souza, Maria de Lourdes Mendes. II. Antoniassi, Rosemar. III. Santiago, Manuela Cristina Pessanha de Araujo. IV. Gama, Paola Ervatti. V. Bizzo, Humberto Ribeiro. VI. Série.

CDD (23. ed.) 664.52

© Embrapa, 2022

Celma Rivanda Machado de Araujo (CRB-07/5517)

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução.....	7
Material e Métodos	9
Resultados e Discussão	14
Conclusões.....	21
Referências	21
Anexos.....	23

Método de Análise de Substâncias Aromáticas em Baunilhas do Brasil

Maria de Lourdes Mendes de Souza¹

Rosemar Antoniassi²

Manuela Cristina Pessanha de Araujo Santiago³

Paola Ervatti Gama⁴

Humberto Ribeiro Bizzo⁵

Resumo – A baunilha é um dos aromatizantes mais utilizados no mundo e possui alto valor agregado. Os extratos de baunilha são obtidos de favas de plantas do gênero *Vanilla* (família Orchidaceae) e algumas espécies são nativas do Brasil. Os compostos aromáticos, marcadores da qualidade do extrato de baunilha, são analisados principalmente por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos. No entanto, os métodos disponíveis foram desenvolvidos para análise de *V. planifolia*, a espécie comercialmente mais importante. Outras espécies de *Vanilla* apresentam composição química bem distinta. Neste trabalho foi desenvolvido um método para a separação de substâncias fenólicas de extratos de quatro espécies de baunilhas *V. bahiana*, *V. planifolia*, *V. chamoissonis* e *V. pompona* comercializadas no Brasil. Foram avaliadas diferentes fases móveis totalizando seis métodos e duas combinações de colunas de fase reversa. O método otimizado apresenta boa resolução e permite quantificar e identificar, por comparação, os componentes associados ao padrão de qualidade para baunilha. O método é seletivo, evitando possíveis erros de identificação advindos de coeluição de outros componentes presentes com os marcadores de qualidade.

Termos para indexação: *Vanilla planifolia*, *Vanilla bahiana*, *Vanilla chamoissonis*, *Vanilla pompona*, cromatografia líquida de alta eficiência, validação.

¹ Farmacêutica, Doutora em Química de Produtos Naturais, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

² Engenheira de Alimentos, Doutora em Engenharia de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

³ Engenheira Química, Doutora em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

⁴ Química, Doutora em Química Orgânica, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

⁵ Químico Industrial, Doutor em Química Orgânica, pesquisador da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

Method of Analysis of Aromatic Compounds in Vanilla from Brazil

Abstract – Vanilla is one of the most used and high priced flavourings in the world. Vanilla extracts are obtained from the pods of plants of the genus *Vanilla* (family: Orchidaceae), and some species are native to Brazil. Aromatic compounds that are chemical markers of the quality of vanilla extracts are analysed mainly by high performance liquid chromatography with a diode array detector. However, the available methods were developed to analyze *V. planifolia*, the most important species commercially. Other *Vanilla* species have a quite distinct chemical composition. In this work, a method was developed for the separation of compounds from extracts of *vanillas* from the species *V. bahiana*, *V. planifolia*, *V. chamissonis* e *V. pompona* commercialized in Brazil. Different mobile phases were evaluated, accounting to six methods and two combinations of reversed phase columns. The optimized method presented good resolution and allowed the quantification and identification, by comparison, of the components associated with the quality standard for vanilla, being selective and preventing identification errors due to coelution of the quality standard markers with other compounds present in the extracts.

Index terms: *Vanilla planifolia*, *Vanilla bahiana*, *Vanilla chamissonis*, *Vanilla pompona*, high performance liquid chromatography, method validation.

Introdução

A baunilha é um dos aromatizantes mais utilizados no mundo (Pérez-Silva et al., 2021). O mercado internacional movimentou 971 milhões de dólares em 2021 (International Trade Center, 2022). Os extratos de baunilha natural são produzidos a partir dos frutos, também chamados de favas (*Pods*, em inglês) de plantas do gênero *Vanilla* (família Orchidaceae), originário do México. Embora haja mais de 100 espécies de *Vanilla* descritas, do ponto de vista comercial as espécies relevantes são *V. planifolia* Jacks. ex Andrews, *V. tahitensis* J.W. Moore e *V. pompona* Schiede. As principais áreas de cultivo situam-se hoje na região intertropical, a mais importante delas em Madagascar, mas também nas Ilhas Comores, Índia, Uganda, Papua Nova Guiné, Indonésia e México (Dunphy; Bala, 2011).

Segundo a base Flora e Funga do Brasil, há 41 espécies nativas de *Vanilla*, sendo 20 endêmicas, ou seja, só ocorrem dentro do território nacional (Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2022). Algumas delas, obtidas por extrativismo, são comercializadas em mercados locais nas regiões Centro-Oeste e Nordeste.

A vanilina [1] é a substância fenólica majoritária na baunilha de Madagascar (*V. planifolia*) e responsável pela nota aromática característica deste produto (Banerjee; Chattopadhyay, 2019). A metil-vanilina [2] também é encontrada nas favas de baunilha. Já a etil-vanilina [3] é um derivado sintético usado largamente como a base do aroma artificial de baunilha (Figura 1). O aroma ou *bouquet* da baunilha natural é, entretanto, bem mais complexo, contendo mais de 200 outras substâncias (Ranadive, 2006).

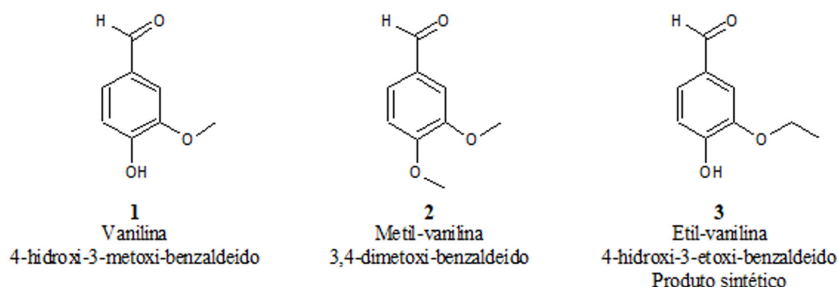


Figura 1. Fórmulas estruturais das vanilinas naturais [1,2] e sintética [3].

Grandes variações no teor de vanilina dos frutos são comuns entre plantas de espécies diferentes. Porém, tais variações também são observadas entre amostras de uma mesma espécie. Isto se deve ao estágio de maturação do fruto no momento da colheita e das técnicas de cura utilizadas no processamento da fava, bem como às condições edafoclimáticas nas quais a planta cresce (Ranadive, 2006). Muitos dos componentes do aroma, associados à qualidade olfativa desejada, são o resultado de um conjunto de reações complexas, como quebra de proteínas, oxidação lipídica, reação de Maillard, dentre outras (Odoux, 2006).

A adulteração da baunilha e seus derivados é prática recorrente, em função de seu alto valor comercial. Para a padronização da qualidade do produto, normas técnicas foram estabelecidas pela *International Organization for Standardization* (ISO). A norma ISO 5565-2 descreve os testes a serem realizados e as substâncias cujo teor deve ser monitorado, incluindo, além da própria vanilina [1], o ácido vanílico (ou ácido 4-hidroxi-3-metoxi-benzóico) [4], o 4-hidroxi-benzaldeído [5] e o ácido 4-hidroxi-benzóico [6] (International Organization For Standardization, 1999). As fórmulas estruturais são apresentadas no Anexo 1.

A técnica preconizada para a análise dos constituintes mencionados e tantos outros presentes nas favas e nos extratos de baunilha é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Diversos métodos descritos na literatura, além daquele da ISO, aplicam esta técnica para a quantificação dos constituintes responsáveis pelo aroma da baunilha. Dez substâncias foram quantificadas em extratos de *V. planifolia*: vanilina [1], ácido vanílico [4], 4-hidroxi-benzaldeído [5], ácido 4-hidroxi-benzóico [6], álcool 4-hidroxi-benzílico [7], álcool vanílico [8], 3,4-dihidroxi-benzaldeído [9], ácido *p*-cumárico [10], ácido ferúlico [11] e piperonal [12] (Sinha; Verma; Sharma, 2007). Um método foi descrito para a análise de vanilina e outros constituintes aromáticos naturais associados, mas também para determinar a presença de aditivos sintéticos, como a etil-vanilina, bem como a de cumarina, um adulterante comumente encontrado em produtos comestíveis e bebidas alcoólicas adulteradas (Jagerdeo; Passetti; Dugar, 2000). Esses protocolos de análise limitam-se, entretanto, a estudos com amostras de *V. planifolia*, a espécie mais relevante comercialmente.

As espécies nativas do Brasil, como *V. bahiana* Hoehne, por outro lado, são ainda pouco estudadas e informações sobre sua composição ainda são escassas na literatura. Um estudo sobre a espécie *V. bahiana* restringiu-se à análise de somente três substâncias fenólicas (vanilina [1], pirogalol [13] e ácido *p*-cumárico [10]), pois o foco do trabalho foi o estudo de proteínas e enzimas produtoras de vanilina (LOPES et al., 2019). Recentemente, outro trabalho com várias espécies não comerciais, incluindo *V. bahiana*, foi publicado. Porém, continha dados de material cultivado somente no continente africano e, desse modo, submetido às condições edafoclimáticas locais (Pérez-Silva et al., 2021). Estes autores apresentaram dados demonstrando um grande contraste entre a composição aromática de *V. planifolia* e as demais espécies.

O objetivo deste estudo foi desenvolver um método analítico por CLAE capaz de separar e quantificar as substâncias fenólicas presentes em extratos das espécies de baunilha *V. planifolia*, *V. chamissonis*, *V. pompona* e *V. bahiana*, colhidas de diferentes regiões do Brasil.

Material e Métodos

Amostras

As favas de quatro espécies de baunilha (*V. planifolia*, *V. bahiana*, *V. chamissonis* e *V. pompona*) foram obtidas no comércio dos Estados da Bahia e de Goiás, conforme descrito na Tabela 1. O acesso ao patrimônio genético foi cadastrado no SISGEN sob nº A19C071.

Tabela 1. Espécies, forma de obtenção e local de origem das favas de baunilha.

Espécie	Origem	Região
<i>V. planifolia</i>	Produção	Una (BA)
<i>V. chamissonis</i>	Produção	Una (BA)
<i>V. bahiana</i>	Produção	Una (BA)
<i>V. pompona</i>	Extrativismo	Alto Paraíso de Goiás (GO)

Reagentes e padrões

A acetonitrila, o metanol, o ácido fosfórico (85%), o etanol absoluto (99,5%) e o ácido acético (99,7%) foram adquiridos da Tedia (Ohio, EUA). Todos os solventes utilizados foram de grau de pureza CLAE-UV. A água ultrapura ($0,054 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) foi obtida de um sistema Milli-Q® da Millipore (Milford, EUA). O etanol usado para as extrações foi o álcool de cereais 92 °GL Pring (Duque de Caxias, Brasil).

Os padrões analíticos de vanilina (99%), álcool 4-hidroxi-benzílico (99%), ácido 4-hidroxi-benzóico (99%), ácido vanílico (97%), 4-metoxi-benzaldeído (99%), álcool 4-metoxi-benzílico (98%), ácido 4-metoxi-benzóico (97%), ácido ferúlico (99%), guaiacol (95%) e ácido siríngico (97%) foram adquiridos da Sigma Aldrich® (Milwaukee, EUA). O siringaldeído (99%) foi adquirido da Indofine Chemical Company Inc. (Hillsborough, EUA). O ácido homovanílico (97%) foi adquirido da Fluka (Viena, Áustria). O 4-hidroxi-benzaldeído (99%) foi adquirido da J&K Scientific Ltd. (Guangzhou, China). A vanilina-4-O- β -D-glucosídeo foi adquirida da Toronto Research Chemicals Inc. (Toronto, Canadá).

Preparação dos extratos para análise

A extração por maceração foi realizada com 80 g de favas de baunilhas, que foram picadas em pedaços em torno de 5 mm e transferidas para frascos de extração de 500 mL. Em cada frasco foram adicionados 400 mL de mistura etanol:água recém-preparada, na proporção 1:1. Os frascos foram tampados, acondicionados ao abrigo da luz e agitados duas vezes ao dia, durante um período de 15 dias. Ao fim do tempo determinado, a fração líquida foi filtrada.

Para a avaliação da repetitividade, a extração foi realizada utilizando-se extrator Soxhlet pesando-se cerca 5 g de favas de baunilha, em triplicata, as quais foram transferidas para cartuchos de extração. A cada sistema extrator foram adicionados 100 mL de etanol anidro. A extração foi conduzida por 16 horas sob refluxo. Ao final da extração as amostras foram transferidas para balões volumétricos de 100 mL e avolumadas com etanol anidro.

Alíquotas de 20 mL foram transferidas para frascos de vidro completamente cheios, bem fechados e armazenadas sob refrigeração (8-10 °C) e ao abrigo da luz até o momento da análise.

Análise por cromatografia líquida de alta eficiência

As análises foram realizadas por CLAE em equipamento Alliance Waters modelo 2695, com detector de arranjo de fotodiodos Waters modelo 2996 (CLAE/DAD), controlado por *software Empower*. A fase móvel foi bombeada com fluxo de 1,2 mL.min⁻¹. As amostras foram filtradas em filtro de PTFE de 0,45 µm e 10 µL foram injetados. Os testes iniciais de separação (métodos 1, 2 e 3) foram feitos em uma coluna Hypersil BDS C18 (100 mm × 4,6 mm; partículas de 2,4 µm) Thermo Scientific (Waltham, EUA) e os finais (métodos 4, 5 e 6) em duas colunas Hypersil BDS C18 ligadas em série, uma de 50 mm e uma de 100 mm, ambas com diâmetro de 4,6 mm e tamanho de partícula de 2,4 µm. Os gradientes de eluição testados são apresentados nas Tabelas 2 e 3. Os compostos presentes nas amostras foram identificados por comparação de seus tempos de retenção e espectros de ultravioleta (UV) com aqueles de padrões analíticos, injetados nas mesmas condições.

Requisitos de validação

Foram estabelecidos como requisitos para a validação do método a ser desenvolvido a realização de estudos de seletividade, linearidade das curvas de calibração com sete soluções dos padrões, faixa de trabalho e a determinação dos limites de detecção e quantificação, que foram calculados a partir da triplicata de resposta das soluções dos padrões. A repetitividade foi calculada a partir do coeficiente de variação utilizando-se os resultados em triplicata da análise das amostras de *V. planifolia*, *V. chamissonis*, *V. bahiana* e *V. pompona*, cuja extração foi realizada por Soxhlet.

Tabela 2. Composições dos gradientes utilizados nos testes com a coluna Hypersil BDS C18 100 mm x 4,6 mm (partículas de 2,4 µm).

Método	Tempo (minutos)	% Fase A (Ac. acético 0,2%)	% Fase B (ACN)	% Fase C (MeOH)
Método 1	0,01	90,0	5,0	5,0
	8,00	70,0	15,0	15,0
	15,00	50,0	25,0	25,0
	20,00	30,0	35,0	35,0
	25,00	20,0	40,0	40,0
	26,00	90,0	5,0	5,0
	31,00	90,0	5,0	5,0
Método 2	0,01	95,0	2,5	2,5
	10,00	90,0	5,0	5,0
	14,00	90,0	5,0	5,0
	20,00	70,0	15,0	15,0
	25,00	20,0	40,0	40,0
	26,00	95,0	2,5	2,5
	31,00	95,0	2,5	2,5
Método 3	0,01	95,0	----	5,0
	10,00	90,0	----	10,0
	14,00	90,0	----	10,0
	20,00	70,0	----	30,0
	25,00	20,0	----	80,0
	26,00	95,0	----	5,0
	31,00	95,0	----	5,0

Ácido acético, solução aquosa a 0,2 %; ACN: acetonitrila; MeOH: metanol.

Tabela 3. Composições dos gradientes utilizados nos testes com duas colunas Hypersil BDS C18 em série, uma de 100 mm e uma de 50 mm (4,6 mm diâmetro e partícula de 2,4 μ m).

Método	Tempo (minutos)	% Fase A (H ₃ PO ₄ 0,2%)	% Fase B (ACN)
Método 4	0,01	95,0	5,0
	6,00	95,0	5,0
	8,00	88,0	12,0
	12,00	88,0	12,0
	18,00	80,0	20,0
	22,00	70,0	30,0
	23,00	40,0	60,0
	25,00	40,0	60,0
	26,00	95,0	5,0
	30,00	95,0	5,0
Método 5	0,01	96,0	4,0
	8,00	95,0	5,0
	11,50	90,0	10,0
	19,00	90,0	10,0
	20,00	80,0	20,0
	22,00	70,0	30,0
	23,00	40,0	60,0
	25,00	40,0	60,0
	26,00	96,0	4,0
	30,00	96,0	4,0
Método 6	0,01	96,0	4,0
	9,00	95,5	4,5
	9,50	94,0	6,0
	22,00	93,0	7,0
	22,50	88,0	12,0
	30,00	80,0	20,0
	30,50	20,0	80,0
	32,50	20,0	80,0
	33,00	96,0	4,0
	36,00	96,0	4,0

H₃PO₄: ácido fosfórico, solução aquosa a 0,2 %; ACN: acetonitrila.

Resultados e Discussão

A qualidade da baunilha é caracterizada pelos teores de vanilina e de outros compostos fenólicos presentes nos extratos. Para determinar estes teores foi desenvolvido um método simples que pôde separar e quantificar o maior número de substâncias fenólicas presentes em vários extratos de baunilhas cultivadas no Brasil, com uma boa resolução de linha de base em uma única corrida por CLAE-DAD. Os nove padrões de qualidade para o sabor de baunilha incluídos no método foram: álcool 4-hidroxibenzílico, ácido 4-hidroxibenzóico, vanilina-4-O- β -D-glicose, 4-hidroxibenzaldeído, ácido vanílico, vanilina, álcool 4-metoxi-benzílico (álcool *p*-anísico), ácido ferúlico e ácido *p*-anísico. Além destes padrões, também foram incluídos outros fenólicos (siringaldeído, ácido homovanílico, ácido siringico e guaiacol).

Inicialmente foram injetados dois extratos de baunilha obtidos por maceração (*V. planifolia* e *V. bahiana*) em diferentes métodos e gradientes a fim de se obter boa resolução de linha de base. Estas amostras foram escolhidas para os testes com os gradientes por apresentarem composições distintas.

Nos cromatogramas do método 1, similar ao descrito por Sinha et al. (2007), pode ser observada a diferença no perfil cromatográfico dos extratos das duas espécies de baunilha (Figura 2). A *V. planifolia* apresenta um pico majoritário muito intenso em 5 minutos, enquanto os demais componentes apresentam tempo de retenção menor que 4,5 minutos. O extrato de *V. bahiana* apresentou dois sinais com maior intensidade, com tempo de retenção maior que 6 minutos, que não estão presentes na *V. planifolia*, da mesma maneira que outro sinal com tempo de retenção de 3,75 minutos. A corrida cromatográfica nestas condições indica a presença de vanilina no extrato de *V. bahiana*.

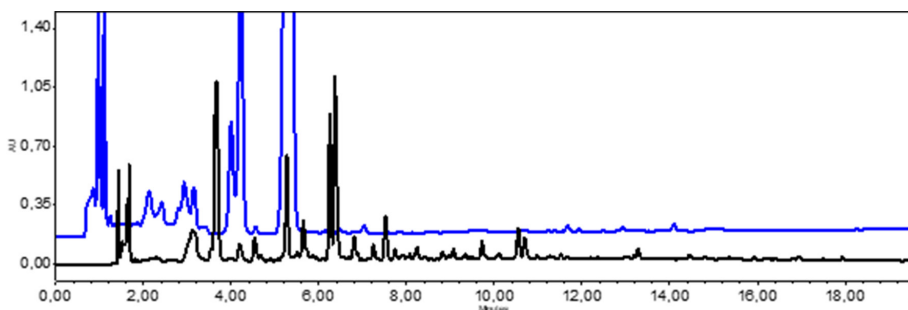


Figura 2. Cromatograma de compostos de fenólicos por CLAE em extrato de baunilha *Vanilla planifolia* (azul) e *Vanilla bahiana* (preto) no método 1.

Para aumentar a resolução entre os picos observados nestas amostras, várias fases móveis foram avaliadas e, na sequência, as proporções de metanol e de acetonitrila foram reduzidas (método 2), enquanto que no método 3 a acetonitrila foi removida (Tabela 2). No método 2 houve coincidência nos tempos de retenção do pico principal detectado em *V. planifolia* (aos 9 minutos) com um dos picos principais da amostra de *V. bahiana* (Figura 3), mas confirmou-se que o sinal com tempo de retenção (t_R) de 11 minutos não estava presente em *V. planifolia*. Observou-se que houve coeluição no sinal de tempo de retenção de 4,5 a 5 minutos no extrato de *V. bahiana*.

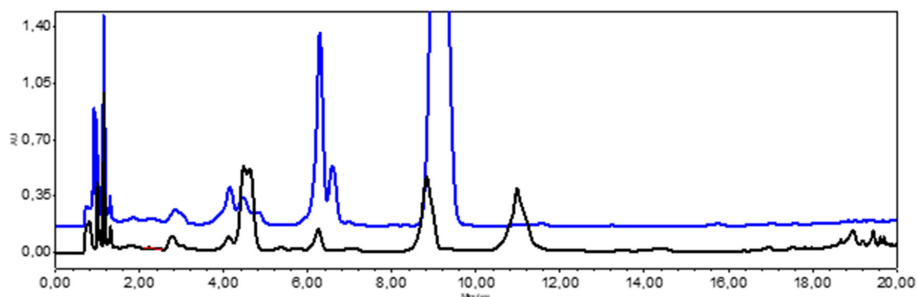


Figura 3. Cromatograma de compostos de fenólicos por CLAE em extrato de baunilha *Vanilla planifolia* (azul) e *Vanilla bahiana* (preto) no método 2.

Com as modificações efetuadas no método 3, confirmou-se que estes picos não correspondem a uma mesma substância, tendo eluído em tempos de retenção diferentes. Portanto, as substâncias correspondentes aos picos principais encontrados na amostra de *V. planifolia*, que pelo método 3 eluem em 8 e 11,5 minutos, não são as mesmas encontradas para a amostra de *V. bahiana* (com t_R 4 a 5 minutos, 9,5 e 14,5 minutos), como se poderia supor com o perfil cromatográfico obtido com o método 2 (Figura 3). Neste método cromatográfico haveria a (falsa) indicação da presença de vanilina em baixa concentração no extrato de *V. bahiana*. Este método 3 é semelhante ao citado na norma ISO, que utiliza solução de ácido fosfórico (0,01 mol/litro):metanol (75:25), indicando que este método desenvolvido para *V. planifolia* não atende a outras espécies brasileiras. Pelos resultados obtidos optou-se por excluir o metanol e realizar os demais ensaios com a acetonitrila.

O emprego de diferentes fases móveis em uma ou mais colunas cromatográficas é um dos requisitos para a comprovação de seletividade do método de análise. A seletividade é um requisito de validação importante para garantir que os compostos de interesse em um estudo sejam quantificados corretamente, mesmo na presença de outros analitos ou interferentes (INMETRO, 2020). Nas análises cromatográficas não se pode afirmar que um

pico ou sinal cromatográfico corresponda a apenas uma substância, já que pode ocorrer coeluição com outras substâncias. Existem, porém, ferramentas que auxiliam na identificação, como o espectro no ultravioleta, obtido com o detector de arranjo de diodos, incluindo-se a verificação da pureza do pico, através dos softwares utilizados nas análises cromatográficas. Os espectros dos padrões analisados são apresentados no Anexo 2. Ainda assim, para substâncias estruturalmente muito semelhantes, como é o caso de alguns fenólicos presentes em *Vanilla*, os espectros no UV podem ser muito semelhantes, não sendo suficientes para uma distinção inequívoca entre duas ou mais substâncias com o mesmo tempo de eluição. Nestes casos, a variação das condições cromatográficas, seja da composição da fase estacionária ou da fase móvel, como proposto neste trabalho, permite a resolução dos constituintes que coeluem.

Observou-se que nas condições utilizadas nos métodos 1, 2 e 3 não houve resolução de 100% para alguns picos, como para aqueles que eluíram na região entre 4 e 5 minutos no método 2 (Figura 3) e no método 3 (Figura 4), cuja separação foi estudada a seguir.

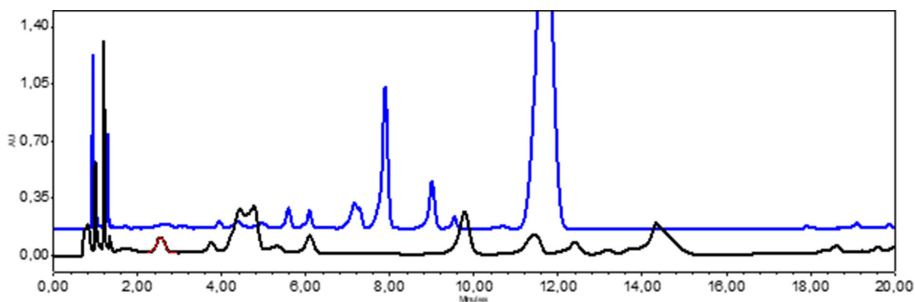


Figura 4. Cromatograma de compostos de fenólicos por CLAE em extrato de baunilha *Vanilla planifolia* (azul) e *Vanilla bahiana* (preto) no método 3.

No método 4, com a adição de uma coluna de 50 mm em série à anteriormente testada, de modo análogo ao descrito para a análise de fenólicos em frutos de *Eugenia brasiliensis* (Nascimento et al., 2017), foi observado que todos os sinais ficaram mais estreitos. Porém, também foi verificada a coeluição de alguns picos, por exemplo para o ácido vanílico (t_R 9,5 min, cromatograma de *V. planifolia*, Figura 5).

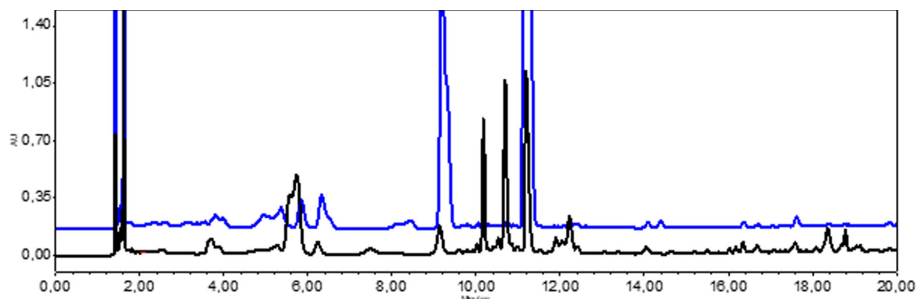


Figura 5. Cromatograma de compostos de fenólicos por CLAE em extrato de baunilha *Vanilla planifolia* (azul) e *Vanilla bahiana* (preto) no método 4.

Com a alteração inicial do gradiente no método 5, os sinais apresentaram melhor resolução. Ainda assim, quando os padrões foram injetados nesta condição, verificou-se que o ácido *p*-anísico eluiu ao final da corrida, período da análise no qual a fase móvel é ajustada para a limpeza da coluna (Figura 6). Outro problema detectado foi que alguns picos da amostra de *V. bahiana* (Figura 6), embora apresentassem tempos de retenção coincidentes com os padrões como, por exemplo, o tempo de retenção do ácido siríngico, os seus espectros de UV não correspondiam àqueles dos respectivos padrões, não confirmando, portanto, a sua identificação. A contribuição do método 5 para a seletividade foi a confirmação de que a vanilina não está presente no extrato de *V. bahiana*.

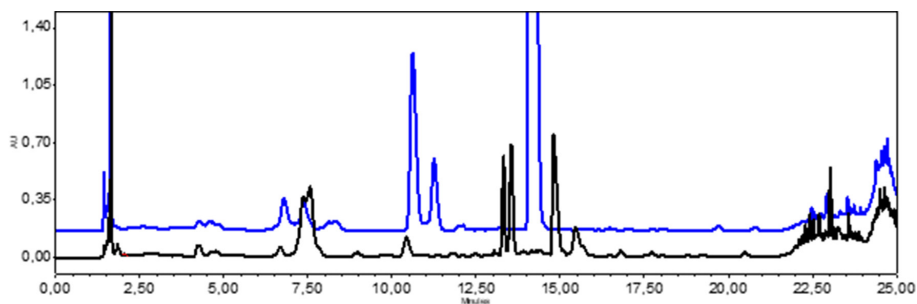


Figura 6. Cromatograma de compostos de fenólicos por CLAE em extrato de baunilha *Vanilla planifolia* (azul) e *Vanilla bahiana* (preto) no método 5.

Por fim, no método 6, o gradiente foi ajustado para incluir todos os fenólicos na região de análise e a maioria dos sinais apresentaram resolução aceitável (Figura 7) e, nestas condições, foi possível analisar os extratos das baunilhas *V. planifolia* e *V. bahiana*. Com o emprego de seis diferentes fases móveis e duas combinações de colunas, e com a comparação do espectro no ultravioleta do pico que elui em 16 minutos (Figura 7) e do padrão de vanilina,

foi possível afirmar que este sinal do extrato de *V. planifolia* corresponde à vanilina, sem a presença de interferentes. Considerando-se estes mesmos critérios, outros compostos foram identificados no extrato de *V. planifolia*, como o ácido vanílico, 4-hidroxi-benzaldeído, ácido 4-hidroxi-benzóico e ácido 4-hidroxi-benzílico. Foram detectados, em menores quantidades, os ácidos ferúlico e *p*-anísico nas duas amostras. No entanto, para a amostra de *V. bahiana*, não foi possível a identificação dos picos majoritários com os padrões disponíveis.

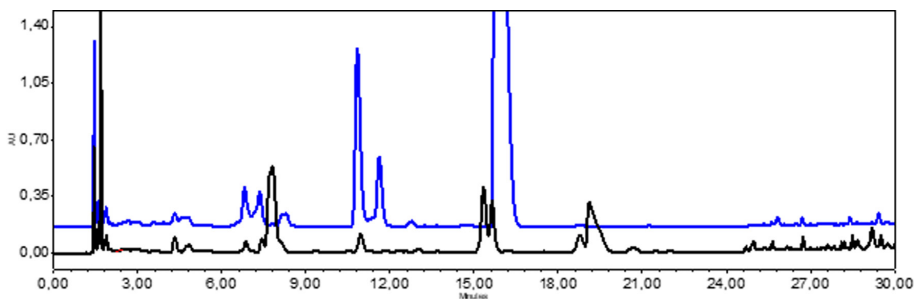


Figura 7. Cromatograma de compostos de fenólicos por CLAE em extrato de baunilha *Vanilla planifolia* (A) e *Vanilla bahiana* (B) no método 6.

Por outro lado, observou-se que aqueles compostos que em *V. planifolia* são os majoritários, estariam presentes em quantidades muito menores na amostra de *V. bahiana*. Outros compostos que inicialmente apresentaram tempos de retenção coincidentes com padrões como, por exemplo, aquele em 6,7 minutos (Figura 7), pela análise do espectro no ultravioleta, seria um derivado de vanilina. Assim, a identificação dos compostos presentes em extratos de *V. bahiana* requer uma análise adicional por outras técnicas, como cromatografia líquida acoplada a detectores de massa.

Na Figura 8 é apresentado o cromatograma dos padrões, tendo-se verificado resolução completa (linha de base). Na Tabela 4 observam-se as concentrações dos marcadores de qualidade de baunilha. Pode-se notar que o método permitiu a análise dos extratos de *V. pompona* que apresentou concentração menor de vanilina em relação a *V. planifolia*, enquanto que *V. chamissonis* apresentou teor elevado do álcool 4-metoxi-benzílico que é um precursor de vanilina, também quantificado na *V. pompona* em menor concentração.

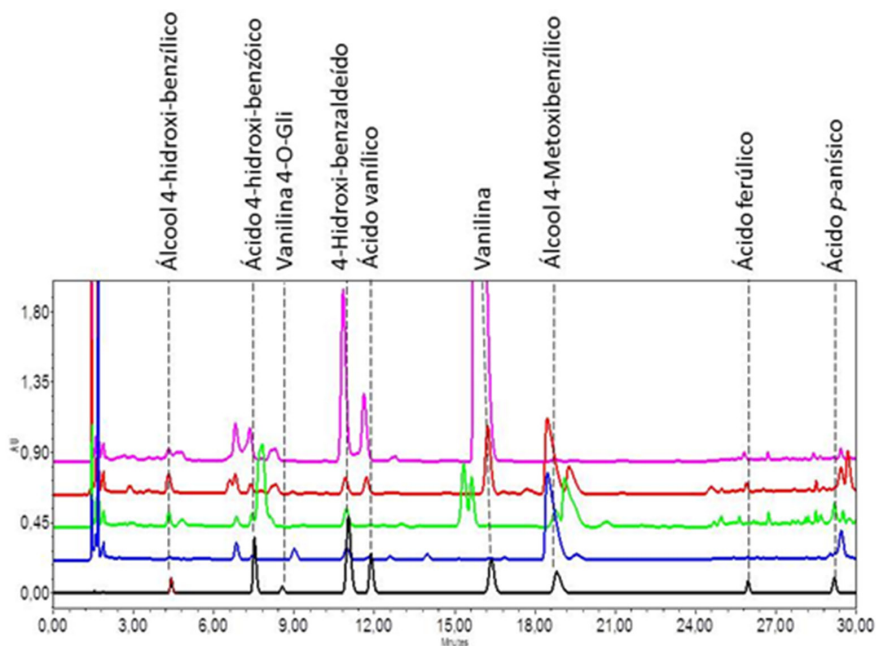


Figura 8. Padrões de compostos fenólicos analisados por CLAE. Mix de padrões (preto); *Vanilla chamissonis* (azul); *Vanilla bahiana* (verde); *Vanilla pompona* (vermelho) e *Vanilla planifolia* (rosa) no método 6.

Tabela 4. Composição de favas de espécies de baunilha (mg/100g)*

Componente	Espécies			
	<i>V. planifolia</i>	<i>V. chamissonis</i>	<i>V. bahiana</i>	<i>V. pompona</i>
Álcool 4-hidroxi-benzílico	116,0	1,2	41,4	8,4
Ácido 4-hidroxi-benzóico	285,0	7,1	111,2	22,3
Vanilina 4-O-glucosídeo	15,5	17,8	4,1	15,4
4-hidroxi-benzaldeído	81,0	0,9	0,3	5,8
Ácido vanílico	137,6	4,3	nq	22,3
Vanilina	1426,2	1,8	nq	192,4
Álcool 4-metoxi-benzílico	1,9	1388,9	195,5	968,3
Ácido ferúlico	19,6	1,9	4,71	42,9
Ácido <i>p</i> -anísico	4,6	0,8	7,6	3,4

*Média dos resultados obtidos na análise em triplicada dos extratos obtidos na extração por Soxhlet.

nq: não quantificado.

Quanto à repetitividade, foi considerado que o coeficiente de variação (CV) seria uma medida apropriada, já que não existem outros recursos para cálculo de precisão e exatidão, como o uso de materiais certificados de referência ou ensaios de proficiência (INMETRO, 2020). Para as amostras que constam na Tabela 4, os resultados de CV foram abaixo de 10% para os marcadores principais, resultado considerado como aceitável para esta análise.

Quanto à linearidade de resposta dos padrões analíticos, observou-se que os compostos marcadores de qualidade de baunilha, que foram quantificados nas amostras avaliadas, apresentaram coeficiente de determinação R^2 acima de 0,99 para uma ampla faixa de trabalho (Tabela 5). A linearidade pode ser observada também na Figura 9, para o padrão de 4-hidroxi-benzaldeído, que foi selecionado para o cálculo de limite de quantificação (LQ) e de detecção (LD), já que esta substância foi quantificada no nível mais baixo de 0,3 mg/100g (Tabela 4). A estimativa de LQ e LD para o 4-hidroxi-benzaldeído foi realizada utilizando-se a curva de calibração do padrão, que apresentou CV abaixo de 3%, para todas as soluções utilizadas. Pela técnica de observação visual da curva, as soluções mais diluídas dos padrões com concentrações mais baixas, foram consideradas como LD e LQ, com valores de 0,11 e 0,22 nanogramas, respectivamente, em virtude dos maiores desvios em relação à curva de regressão.

Tabela 5. Faixa de trabalho e coeficiente de correlação das curvas de regressão obtidas para as substâncias quantificadas em favas de espécies de baunilha

Padrão	Faixa de trabalho (µg/mL)	Equação da curva analítica	Coefficiente de correlação (R^2)
Álcool 4-hidroxi-benzílico	1,170 - 234	$y = 4617x + 4258$	0,999
Ácido 4-hidroxi-benzóico	0,990 - 198	$y = 28632x + 21063$	0,999
Vanilina 4-O-glucosídeo	0,262 - 52,4	$y = 14094x + 2017,7$	0,999
4-hidroxi-benzaldeído	1,128 - 226	$y = 50348x + 42382$	0,999
Ácido vanílico	1,069 - 213	$y = 22354x + 16830$	0,999
Vanilina	1,123 - 225	$y = 26008x + 18140$	0,999
Álcool 4-metoxi-benzílico	5,684 - 1137	$y = 3993,8x + 27210$	0,999
Ácido ferúlico	0,434 - 86,7	$y = 12206x + 3546,8$	0,999
Ácido p-anísico	0,277 - 55,5	$y = 31092x + 5190,7$	0,999

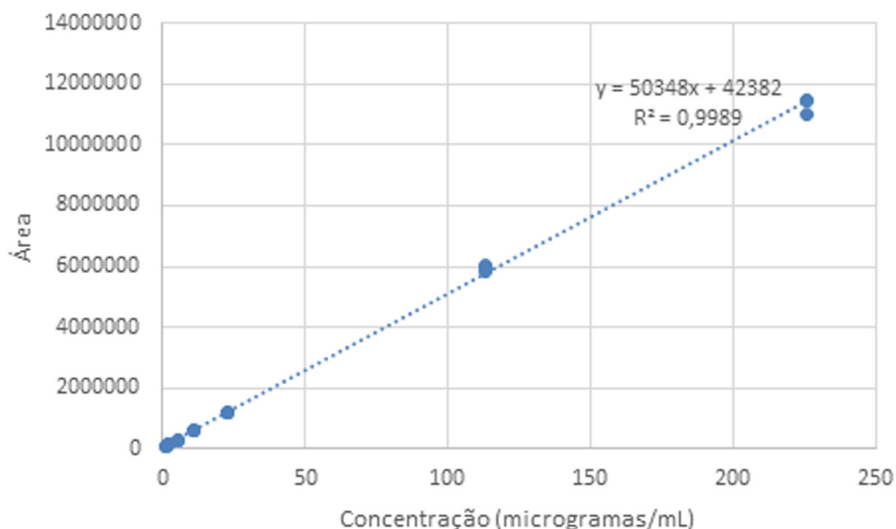


Figura 9. Curva de calibração do padrão de 4-hidroxi-benzaldeído no método 6.

Conclusão

O método de CLAE-DAD desenvolvido para análise de vanilina e outras substâncias fenólicas encontradas nas espécies de baunilhas apresenta boa resolução e permite quantificar e identificar, por comparação, os nove componentes associados ao padrão de qualidade para baunilhas. O método desenvolvido é seletivo e previne erros de identificação que ocorreriam com emprego de outros métodos de análise, nos quais ocorreria coeluição destes compostos de interesse com outros componentes presentes nas amostras.

Referências

BANERJEE, G.; CHATTOPADHYAY, P. Vanillin biotechnology: the perspectives and future. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 99, n. 2, p. 499-506, 30 jan. 2019.

DUNPHY, P.; BALA, K. Green Vanilla Bean Quality. *Perfumer & Flavorist*, v. 36, p. 38-46, 2011.

INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. DOQ-CGCRE-008. Revisão 05, ago. 2016. Rio de Janeiro: [INMETRO, 2016]. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_05.pdf. Acesso em: 17 jun. 2022.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 5565-2**: 1999. Vanilla [Vanilla fragrans (Salisbury) Ames] — Part 2: Test methods. Geneva: International Organization for Standardization, 1999. 11 p.

INTERNATIONAL TRADE CENTER. **Vanilla**. Disponível em: https://www.trademap.org/Country_SelProduct.aspx?nvpm=1%7C%7C%7C%7C%7C0905%7C%7C%7C4%7C1%7C1%7C2%7C1%7C1%7C2%7C1%7C1%7C1. Acesso em: 17 jun. 2022.

JAGERDEO, E.; PASSETTI, E.; DUGAR, S. M. Liquid Chromatographic Determination of Vanillin and Related Aromatic Compounds. **Journal of AOAC International**, v. 83, n. 1, p. 237-240, 2000.

JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. Vanilla Mill. In: **Flora e Funga do Brasil**. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB12347>. Acesso em: 17 jun. 2022.

LOPES, E. M.; LINHARES, R. G.; PIRES, L. de; CASTRO, R. N.; SOUZA, G. H. M. F.; KOBLITZ, M. G. B.; CAMERON, L. C.; MACEDO, A. F. Vanilla bahiana, a contribution from the Atlantic Forest biodiversity for the production of vanilla: A proteomic approach through high-definition nanoLC/MS. **Food Research International**, p. 148-156, jun. 2019. DOI: 10.1016/j.foodres.2019.02.038.

NASCIMENTO, L. da S. de M. do; SANTIAGO, M. C. P. DE A.; OLIVEIRA, E.M. M.; BORGUINI, R. G.; BRAGA, E. E. O.; MARTINS V. C.; PACHECO, S.; SOUZA, M.; GODOY, R. L. DE O. Characterization of Bioactive Compounds in *Eugenia brasiliensis*, Lam. (Grumixama). **Nutrition and Food Technology**, v. 3, n. 3, p. 1-7, 2017.

ODOUX, É. Glucosylated aroma precursors and glucosidase(s) in vanilla bean (*Vanilla planifolia* G. Jackson). **Fruits**, v. 61, n. 3, p. 171-184, 2006.

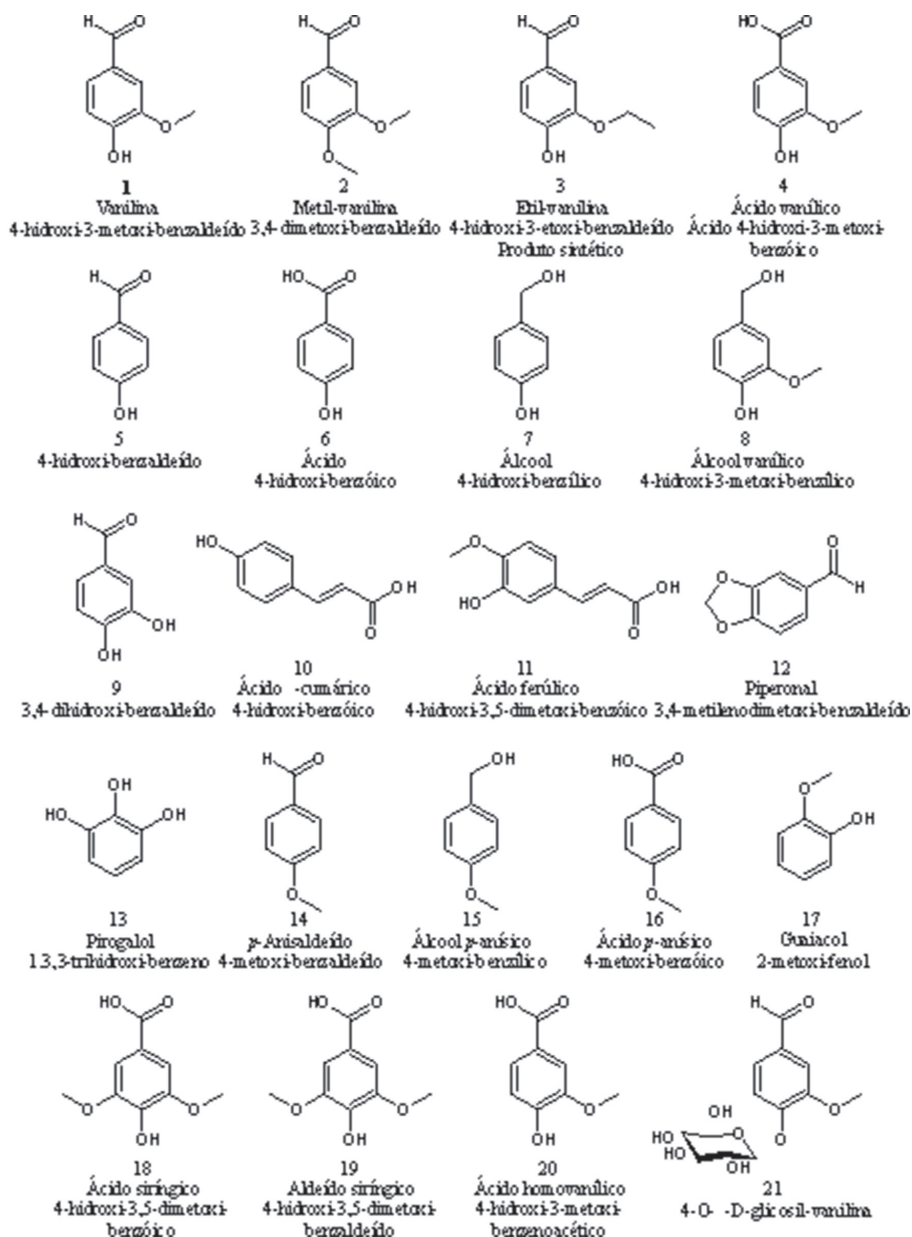
PÉREZ-SILVA, A; NICOLÁS-GARCIA, M; PETIT, T.; DIJOUX, J. B.; VIVAR-VERA, M. de los A.; PASCALE, B.; GRISONI, M. Quantification of the aromatic potential of ripe fruit of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae) and several of its closely and distantly related species and hybrids. **European Food Research and Technology**, v. 247, n. 6, p. 1489-1499, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03726-w>.

RANADIVE, A. Chemistry and Biochemistry of Vanilla Flavor. **Perfumer & Flavorist**, v. 31, p. 38-44, 2006.

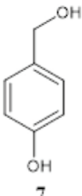
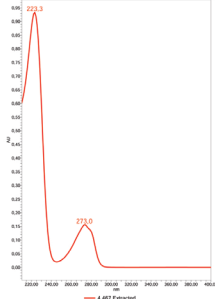
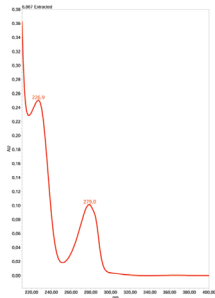
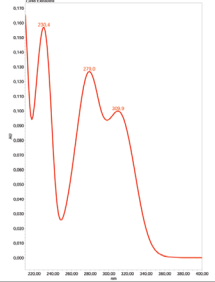
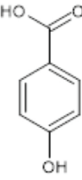
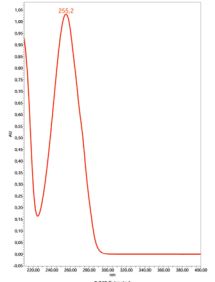
SINHA, A. K.; VERMA, S. C.; SHARMA, U. K. Development and validation of an RP-HPLC method for quantitative determination of vanillin and related phenolic compounds in *Vanilla planifolia*. **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 1, p. 15-20, 2007.

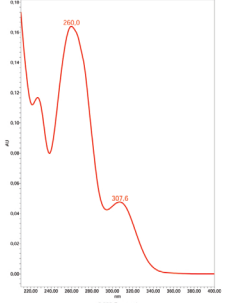
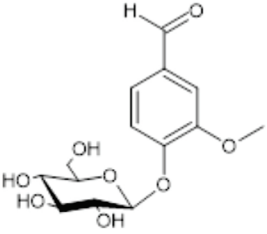
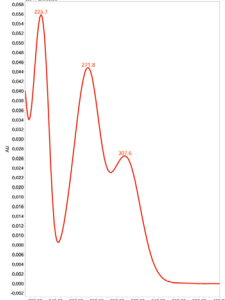
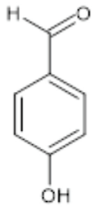
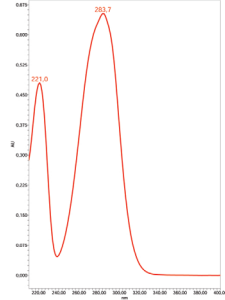
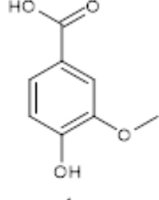
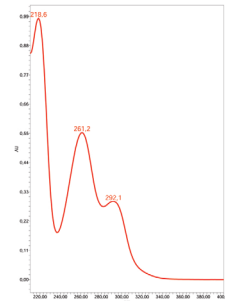
Anexos

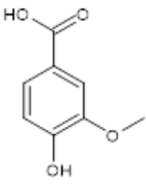
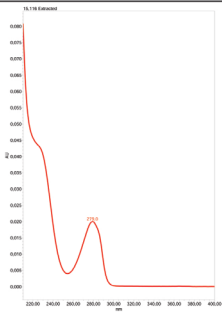
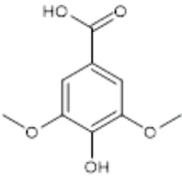
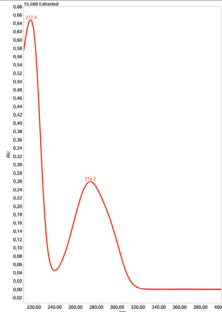
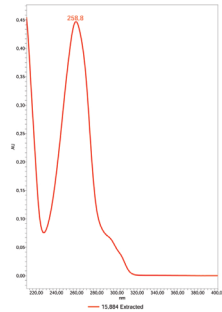
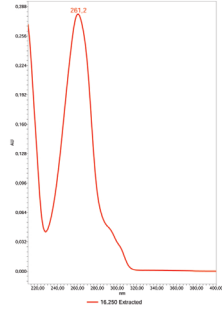
Anexo 1. Fórmulas estruturais das substâncias citadas.

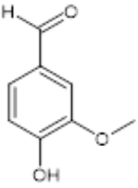
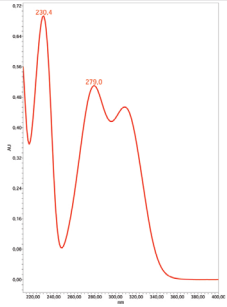
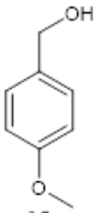
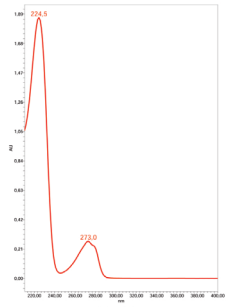
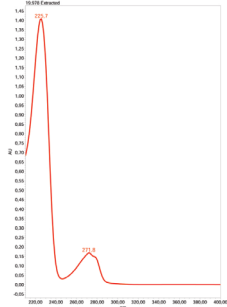
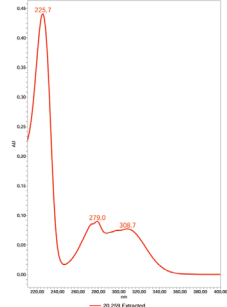


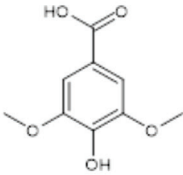
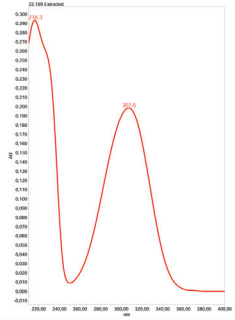
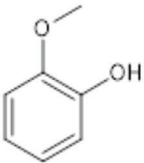
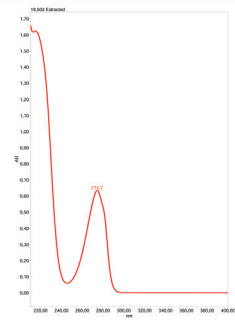
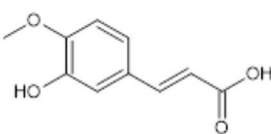
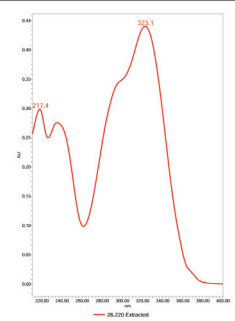
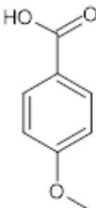
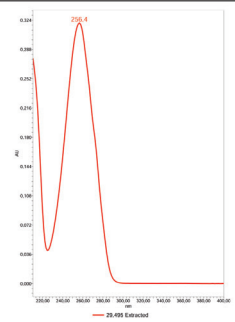
Anexo 2. Estruturas químicas, espectros de UV (na ordem de eluição do método 6) e tempo de retenção (tR) de padrões e de substâncias encontradas nas amostras

t _R (minutos)	Substâncias presentes nas amostras	Espectro de UV
4,50	 <p data-bbox="443 574 595 624">7 Álcool 4-hidroxi-benzílico</p>	
6,8	Não identificada	
7,1	Não identificada	
7,75	 <p data-bbox="434 1445 592 1516">6 Ácido 4-hidroxi-benzóico</p>	

t _R (minutos)	Substâncias presentes nas amostras	Espectro de UV
7,7	Não identificada	
8,84	 21 4-O-β-D-glicosil-vanilina	
11,55	 5 4-hidroxi-benzaldeído	
12,15	 4 Ácido vanílico Ácido 4-hidroxi-3-metoxi-benzóico	

t _R (minutos)	Substâncias presentes nas amostras	Espectro de UV
15,11	 <p data-bbox="446 469 615 558">20 Ácido homovanílico 4-hidroxi-3-metoxi- benzoacético</p>	
15,56	 <p data-bbox="434 788 632 877">18 Ácido siríngico 4-hidroxi-3,5-dimetoxi- benzoico</p>	
15,88	<p data-bbox="443 1014 611 1103">Não identificada (<i>V. bahiana</i>)</p>	
16,25	<p data-bbox="443 1333 611 1422">Não identificada (<i>V. bahiana</i>)</p>	

t _R (minutos)	Substâncias presentes nas amostras	Espectro de UV
16,93	 <p data-bbox="392 480 669 555">1 Vanilina 4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeido</p>	 <p data-bbox="852 574 916 584">16,930 Extracted</p>
19,66	 <p data-bbox="431 797 605 877">15 Álcool <i>p</i>-anisico 4-metoxi-benzílico</p>	 <p data-bbox="852 893 916 903">19,667 Extracted</p>
19,98	<p data-bbox="434 1020 605 1103">Não identificada (<i>V. bahiana</i>)</p>	 <p data-bbox="795 908 847 918">19,978 Extracted</p>
20,25	<p data-bbox="434 1339 605 1422">Não identificada (<i>V. bahiana</i>)</p>	 <p data-bbox="852 1531 916 1541">20,259 Extracted</p>

t _R (minutos)	Substâncias presentes nas amostras	Espectro de UV
22,17	 <p data-bbox="402 447 599 541">19 Aldeído síngico 4-hidroxi-3,5-dimetoxi- benzaldeído</p>	 <p data-bbox="747 249 980 566">22,168 Extracted</p>
19,50	 <p data-bbox="414 778 575 872">17 Guaiacol 2-metoxi-fenol</p>	 <p data-bbox="747 571 980 888">19,503 Extracted</p>
26,22	 <p data-bbox="382 1083 663 1158">11 Ácido ferúlico 4-hidroxi-3,5-dimetoxi-benzóico</p>	 <p data-bbox="747 893 980 1210">26,220 Extracted</p>
29,50	 <p data-bbox="422 1438 603 1521">16 Ácido <i>p</i>-anisico 4-metoxi-benzóico</p>	 <p data-bbox="747 1215 980 1534">29,499 Extracted</p>



Agroindústria de Alimentos

