

L. FERRARA<sup>1</sup>, C. SICIGNANO<sup>1</sup>,  
D. NAVIGLIO<sup>2</sup>, A. SANTINI<sup>2</sup>

## *Vanilla planifolia* Andr.: un aromatizzante naturale impiegato nel settore alimentare, farmaceutico e cosmetico

PROGRESS IN NUTRITION  
VOL. 14, N. 2, 144-151, 2012

### TITLE

*Vanilla planifolia* Andr.: a natural flavouring used in foodstuff, pharmaceuticals and cosmetics

### KEY WORDS

Flavours, vanillin, HPLC, GC, *Vanilla planifolia*

### PAROLE CHIAVE

Aromatizzanti, vaniglia, HPLC, GC, *Vanilla planifolia*

### Summary

*Vanilla planifolia* Andrews or *Vanilla fragrans* is a herbaceous liana of the Orchidaceae family and it is a plant native to Central America. The fruit, improperly called "pod", is characterized by a peculiar balsamic smell. After the collection fruits undergo fermentation and drying to obtain the tawny, flexible rods comes, that cover with a white vanillin microcrystals layer. Geographic origin influences the physical properties, the organoleptic characteristics, and the chemical composition of Vanilla fruits. Major producers are the Madagascar, the Western Comore Islands, Reunion, Indonesia, Mexico, West Indies and South America. The scope of the present study is the analysis of ethyl ether, methyl alcohol and dichlorometane extracts of commercially available Vanilla caps using different analytical methods. The main compounds identified that characterize Vanilla aroma are p-idrossibenzoic acid, the p-idrossibenzaldeide, vanillin, and vanillic acid. The ratio of these main compounds compared to vanillin in natural extracts is well defined and can be useful as quality indicator. Moreover, it can help in locating the geographical origin of the plant and to identify possible extracts counterfeits.

### Riassunto

*Vanilla planifolia* Andrews o *Vanilla fragrans* è una liana erbacea della famiglia delle *Orchidaceae* originaria dell'America centrale. Il frutto dall'odore balsamico viene impropriamente chiamato *baccello* e dopo la raccolta viene sottoposto a fermentazione ed essiccazione ottenendo dei bastoncini bruni, flessibili, che si ricoprono di una patina bianca costituita da microcristalli di vanillina. L'origine geografica influenza le proprietà fisiche, le caratteristiche organolettiche e la composizione chimica dei frutti di vaniglia: i maggiori produttori sono il Madagascar, le isole Comore e Reunion, Indonesia, Messico, Indie Occidentali e Sud America. Lo scopo del lavoro è quello di trovare le migliori condizioni estrattive per le capsule di vaniglia impiegando come solventi di estrazione etere etilico, alcol metilico e diclorometano e sottoponendo a diverse tecniche di analisi gli estratti ottenuti per l'analisi quali-quantitativa delle sostanze estratte. I componenti principali che caratterizzano l'aroma della vaniglia sono: acido p-idrossibenzoico, p-idrossibenzaldeide, vanillina e acido

<sup>1</sup>Dipartimento di Chimica Farmaceutica e Tossicologica - Facoltà di Farmacia - Università di Napoli "Federico II" Napoli  
<sup>2</sup>Dipartimento di Scienza degli Alimenti - Facoltà di Agraria - Università di Napoli "Federico II" Portici (NA)

Indirizzo per la corrispondenza:  
Dott.ssa Lydia Ferrara  
Dipartimento di Chimica Farmaceutica e Tossicologica - Facoltà di Farmacia - Università di Napoli "Federico II"  
Via Domenico Montesano 49 - 80131 Napoli  
E-mail: lyferrara@unina.it

vanillico. Le quantità relative di questi componenti principali rispetto alla vanillina nell'estratto naturale è ben definito e, oltre ad essere un indice della buona qualità, permette di identificare la provenienza della pianta e scoprire le eventuali adulterazioni.

## Introduzione

Da alcuni anni molta attenzione viene rivolta alla coltivazione ed alla conservazione dei prodotti alimentari al fine di mantenere inalterate le loro caratteristiche naturali e salutari. In particolare, sostanze come aromi, coloranti naturali o artificiali, coadiuvanti tecnologici etc., che vengono aggiunte agli alimenti al fine di prolungarne la conservazione o le caratteristiche, sono state oggetto di particolare attenzione. Tra queste sostanze, la vaniglia è il più comune aromatizzante naturale e viene impiegato da più di un secolo.

La *Vanilla planifolia Andrews* mostrata nella figura 1 è una pianta rampicante originaria del Messico che appartiene alla famiglia delle Orchidaceae. Dopo la scoperta dell'America, si diffuse con alcune varietà che vennero impiantate in Madagascar, Ceylon, Giava e in molte altre zone tropicali. Attualmente soltanto tre specie vengono coltivate per la loro importanza

Figura 1 - *Vanilla Planifolia Andrews*



economica: *Vanilla planifolia Andrews (V. fragrans)*, *Vanilla tabitensis More* e *Vanilla pompona Schede* (1-3).

Quando viene coltivata al di fuori del suo *habitat* naturale, la pianta richiede l'impollinazione artificiale, perchè la forma dei suoi fiori è adatta unicamente all'impollinazione da parte del colibrì e di alcuni specifici insetti. Il frutto, impropriamente chiamato *stecca di vaniglia*, è una capsula lunga circa 20 cm con una estremità assottigliata e ripiegata ad uncino contenente numerosi semi. I frutti, che sono raccolti al loro sviluppo completo, vengono portati a maturazione lontano dalla pianta e sottoposti ad un lungo processo di fermentazione, durante il quale sono tenuti al sole, coperti durante il giorno e sistemati in casse in legno ben isolate durante la notte. Questo trattamento è necessario per estrarre la vanillina (4-idrossi-3-metossibenzaldeide) che, nel frutto non trattato, è presente sotto forma di glucosidi. La vanillina è una aldeide aromatica dall'odore e sapore caratteristico ed è responsabile del valore commercialmente pregiato del frutto (4).

Attualmente, la vanillina viene ottenuta chimicamente per sintesi, dato che i processi di estrazione tradizionali della vanillina dai baccelli sono costosi, molto lunghi e forniscono una resa in prodotto finito pari a circa il 20%.

## Metodi di estrazione tradizionali

### *Estrazione in acqua*

Le stecche di vaniglia, raccolte ancora immature, vengono raggruppate per ordine di lunghezza e immerse in acqua alla temperatura di 80-85°, facendo attenzione ad evitare che la temperatura raggiunga quella di ebollizione. Ogni stecca viene preliminarmente immersa in acqua una sola volta per 15-20 secondi oppure due o tre volte per 5-7 secondi. Tale operazione ha lo scopo di eliminare lo sviluppo di microrganismi.

Dopo l'immersione in acqua calda, la vaniglia viene fatta sgocciolare e poi coperta con un panno di lana scura per circa un quarto d'ora; successivamente viene esposta al sole su una tavola posta a circa un metro dal suolo onde evitare il contatto con la terra umida. Prima di sera, il panno di lana che racchiude la vaniglia viene arrotolato e sistemato in una cassa rivestita di lana e chiusa ermeticamente. La esposizione al sole viene ripetuta per 2-3 giorni per le stecche più piccole e per 5-6 giorni per quelle più grandi. Alla fine i baccelli diventano flessibili, scuri e rugosi longitudinalmente. L'ultima operazione è l'essiccamento. Le stecche vengono poste su tavole di legno in un locale ben areato e soleggiato per un tempo variabile tra i 10 giorni e i 2 mesi fino a quan-

do la parte legnosa non arrivi a contenere solo tracce di umidità e in questo modo il volume sia diminuito notevolmente.

### *Estrazione in stufa*

Questa metodica viene utilizzata per preparare grandi quantità di vaniglia. Vengono impiegati barili in legno aperti riempiti di acqua alla temperatura di 80°C e rivestiti con un cono di tela con la punta rivolta in basso e che non tocca l'acqua. In questo contenitore si dispongono 50 kg di stecche di vaniglia verde e si copre con un panno di lana. Dopo circa 12 ore viene eseguito un essiccamento in stufa alla temperatura di 50°C.

### *Estrazione con impiego del forno*

Questo procedimento comunemente adottato in Messico, consiste nell'introdurre contenitori di ferro contenenti ciascuna 10 kg di vaniglia in un forno riscaldato a 65°C. Dopo circa 15 ore i contenitori vengono aperti per controllare l'andamento della essiccazione, che si conclude quando le stecche acquistano un colore grigiastro. A questo punto i contenitori vengono prelevati dal forno e avvolti in un panno di lana per evitare un raffreddamento troppo brusco. Le stecche di vaniglia vengono poi tolte dai contenitori ed esposte al sole per l'essiccamento finale.

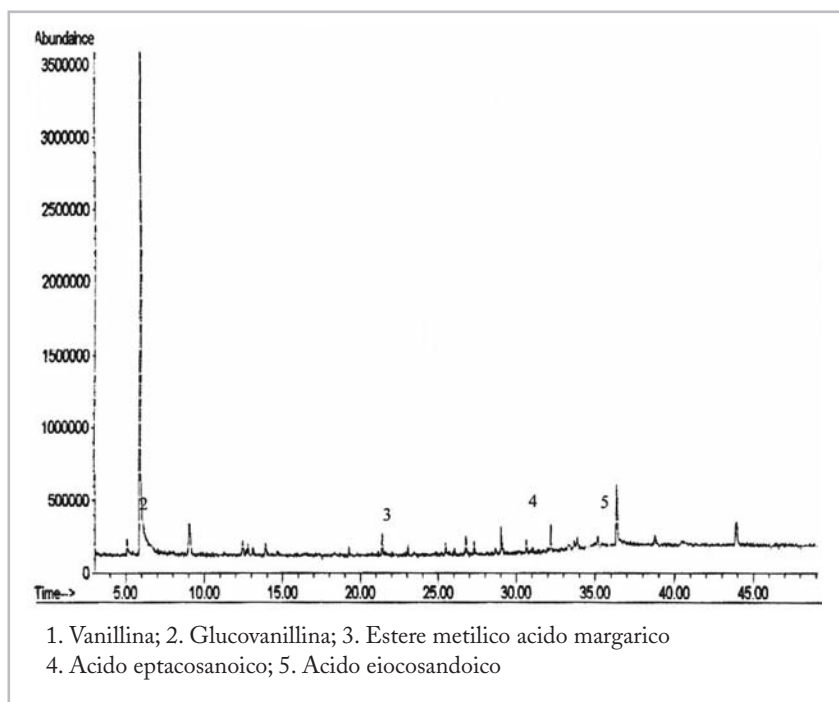
## Parte sperimentale

Capsule di *Vanilla planifolia* Andr. disponibili in commercio sono state tritate grossolanamente e 2.5 g del triturato sono stati estratti a caldo con il metodo Soxhlet impiegando rispettivamente come solvente diclorometano, alcool metilico e dietiletere. Dopo l'allontanamento del solvente mediante evaporatore rotante alla temperatura di 35°C sono stati ottenuti residui pari a 1.0453, 0.2666 e 0.2149 g, rispettivamente. I residui solubilizzati nei tre solventi menzionati sono stati analizzati mediante gas cromatografia-spettrometria di massa utilizzando un apparecchio GC-MS HP 5890 Mass 5970 con una colonna capillare ZB1, 30 m x 0.25 µm, FT.

L'analisi GC-MS della frazione in diclorometano, che è risultata più ricca di componenti, è stata eseguita con un metodo a gradiente di temperatura, partendo da 100°C con incremento di 5°C/min fino a 250°C; utilizzando elio come gas di trasporto ad un flusso di 1.4 mL/min. Dal gascromatogramma riportato in figura 2 è stato possibile identificare le seguenti sostanze: vanillina, glucovanillina, estere metilico dell'acido margarico, acido eptacosanoico e acido eicosandoico.

L'analisi HPLC è stata eseguita in modalità isocratica impiegando un apparecchio Sunicom Oy con de-

Figura 2 - Analisi GC-MS Estratto diclorometano

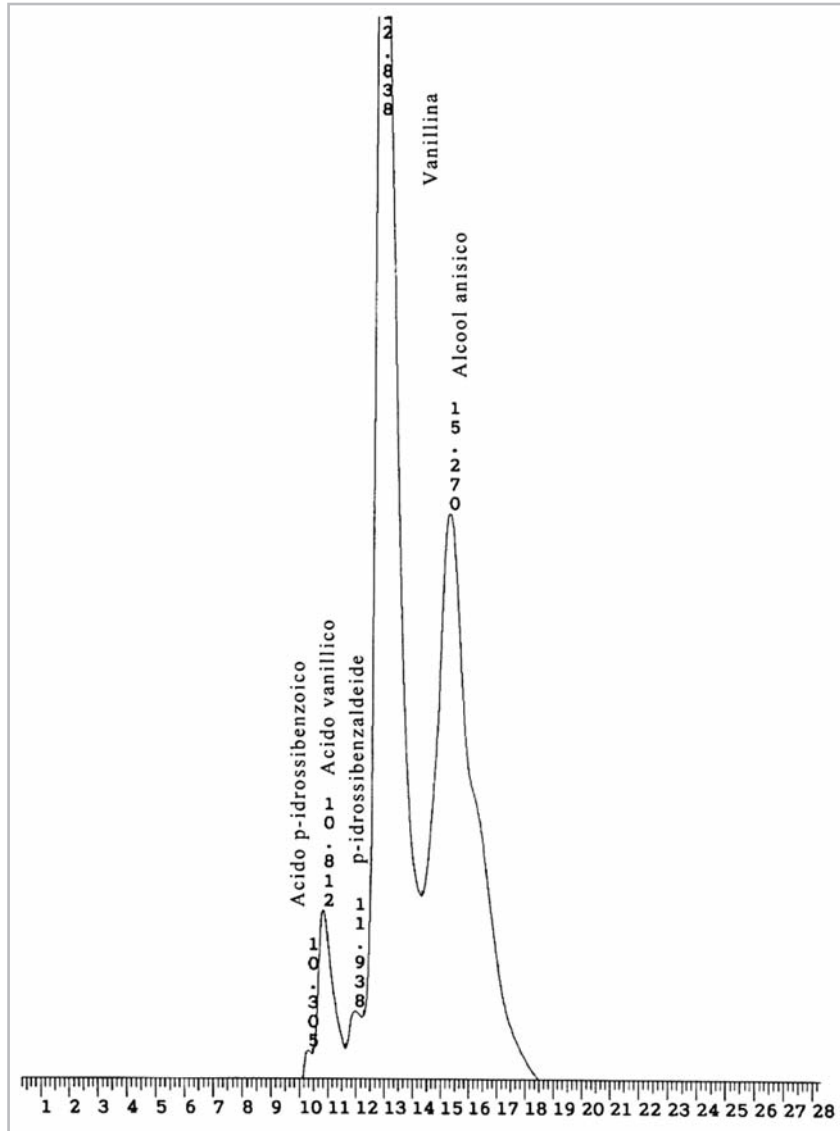


gassatore ERC 3215 e iniettando 10 µL di ciascun residuo, solubilizzato in metanolo. Come eluenti sono stati utilizzati metanolo e acido fosforico 10<sup>-3</sup> M in acqua (25:75) al flusso di 0.7 mL/min; è stata impiegata una colonna a fase inversa Ultracarb 5 ODS (20) l=250 mm; i.d.=4.6 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA) con rivelazione nell'ultravioletto alla lunghezza d'onda di 280 nm. Dai cromatogrammi ottenuti dai tre estratti mostrati nelle figure 3, 4 e 5 sono state identificate le seguenti sostanze: acido p-idrossibenzoico, acido vanillico, p-idrossibenzaldeide e alcol anisico.

Per la determinazione dei flavonoidi, 2.5 g di capsule finemente tritate sono stati trattati in acqua con acido solforico fino a pH 3 e la miscela è stata fatta bollire per 24 ore. La miscela acquosa ottenuta è stata filtrata e dibattuta per 5 volte consecutive con acetato di etile in un imbuto separatore. Le fasi organiche sono state raccolte in una unica porzione che è stata concentrata mediante evaporatore rotante fino ad ottenere l'allontanamento completo del solvente. Il residuo ottenuto, pari a 0.2144 g, è stato solubilizzato in 1mL di metanolo e 5 µL della soluzione sono stati analizzati me-



Figura 4 - Analisi HPLC estratto etere etilico



divanillidene-cicloesano, l'isovanillina e l'etilovanillina viene attribuita una importante azione coleretica evidenziata sia per somministrazione orale che parenterale. Nella serie vanillina esiste una

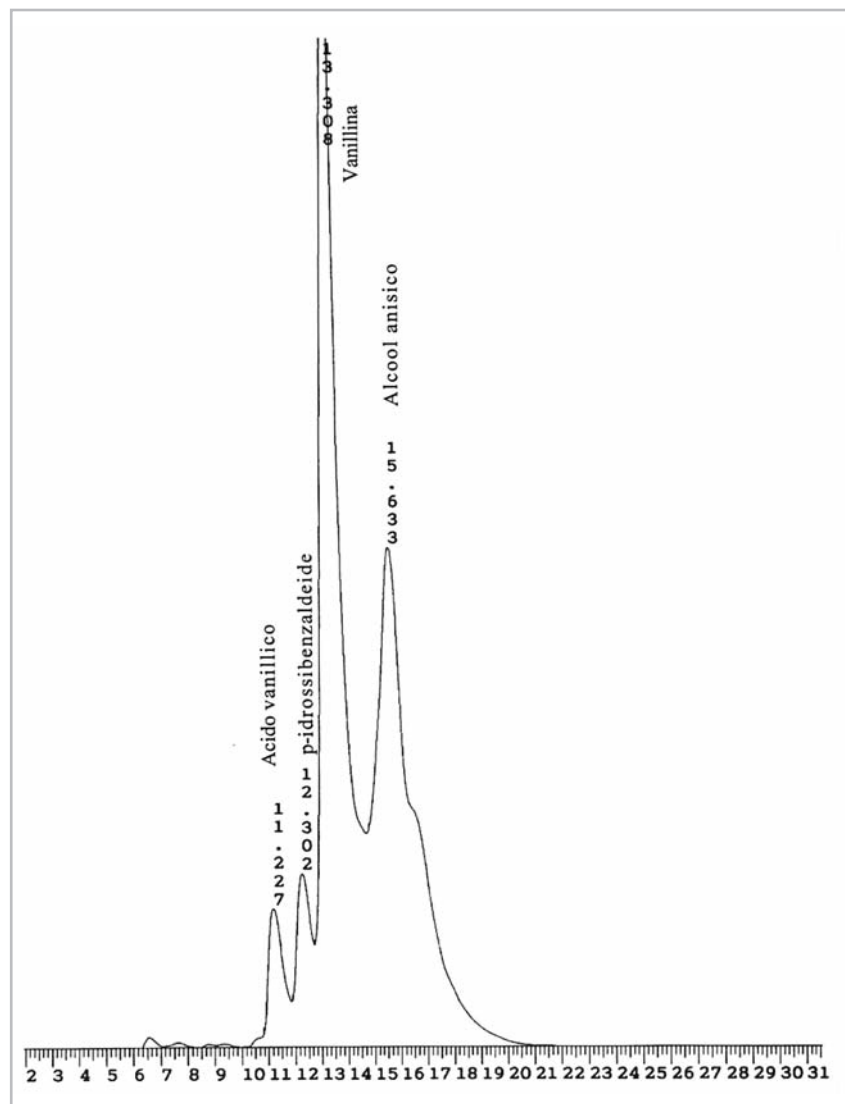
netta relazione fra struttura ed attività coleretica, tanto più elevata quando il gruppo aldeidico si trova in posizione meta rispetto al gruppo fenolico libero. Utilizzando mitocondri di fegato

di ratto è stata esaminata la capacità della vanillina naturale a proteggere le membrane dal danno ossidativo prodotto da fotosensibilizzazione alle concentrazioni normalmente in uso nelle preparazioni alimentari (6). La vanillina a concentrazione di 2.5 mmoli/L agisce evitando efficacemente nei mitocondri epatici l'ossidazione naturale delle proteine e la perossidazione dei lipidi indotta mediante esposizione alla luce ed aggiunta di blu di metilene. L'effetto inibitorio è paragonabile all'acido ascorbico secondo un meccanismo di azione che attacca il radicale ossigeno, responsabile del danno indotto durante l'esposizione alla luce.

Studi eseguiti su batteri hanno inoltre evidenziato attività antimutagena per cui si prevede in futuro un possibile impiego per impedire la proliferazione delle cellule tumorali in particolari tipi di cancro (7), al fegato (8), al colon ed alla mammella (9).

È stata inoltre dimostrata l'efficacia della vanillina come antisettico: una soluzione di vanillina all'1.5% impedisce lo sviluppo di microrganismi negli alimenti, per cui trova impiego come antibatterico naturale nei prodotti a base di cacao. Tale proprietà è da correlare alla presenza di flavonoidi quali quercetina ed apigenina (10, 11). Nella farmacopea antica la vaniglia veniva usata per eccitare il senso di

Figura 5 - Analisi HPLC estratto diclorometano



fame e quindi invogliare l'individuo a cibarsi, quando era in condizioni di apatia verso il cibo.

Pur non essendo veramente dannosa, le persone addette alla lavorazione della vaniglia sono colpite da fenomeni allergici che sono no-

ti come vanillismo dovuti alla presenza di un olio essenziale volatile, di odore pungente che si diffonde velocemente nell'aria procurando disturbi sia interni che esterni. Tra i sintomi esterni, il più comune è rappresentato da un tipo di ortica-

ria con eruzioni cutanee, rigonfiamento della pelle con forti pruriti soprattutto sul dorso delle mani e sulla fronte. Tra i sintomi interni si possono avvertire cefalee intense, vertigini che durano tre-quattro giorni e sono insensibili ai farmaci; sono frequenti anche dolori gastrici, che possono essere attenuati bevendo molto latte ed assumendo tisane emollienti.

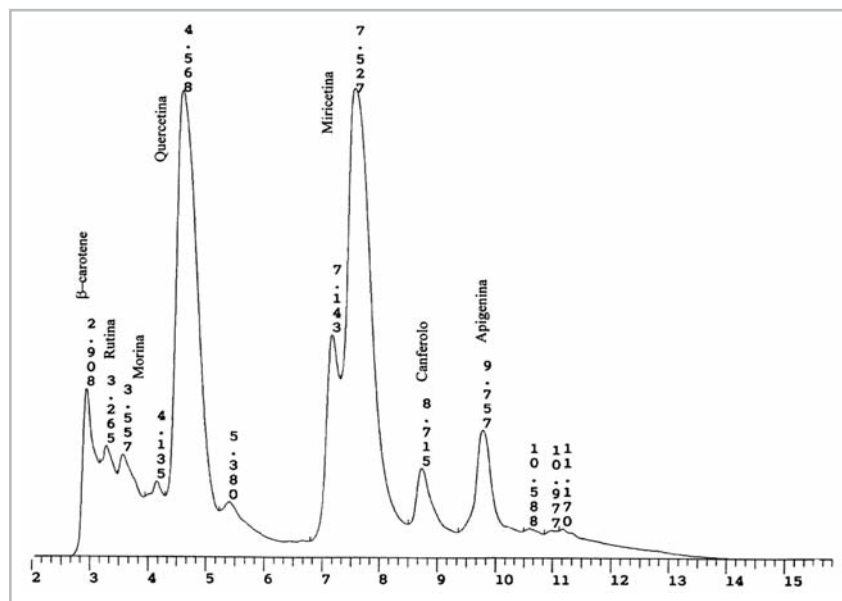
Gli estratti del fusto della pianta contengono una gran quantità di ossalato di calcio che facilmente si trasforma in acido ossalico di cui sono note le proprietà caustiche e rubefacenti, per cui molta attenzione deve essere prestata quando si raccolgono i baccelli di vaniglia. Molti estratti di vaniglia commercialmente disponibili sono miscele di vaniglia naturale e vaniglia preparata sinteticamente a partire dal glicoside che si trova nell'alburno delle conifere, dall'eugenolo, dal guaiacolo o dalla lignina.

I componenti principali che caratterizzano l'aroma della vaniglia sono l'acido p-idrossibenzoico, la p-idrossibenzaldeide, la vanillina (4-idrossi-3-metossibenzaldeide) e l'acido vanillico (acido 4-idrossi-3-metossi benzoico). I rapporti relativi tra tali composti rispetto alla vanillina nell'estratto naturale sono ben definiti ed oltre ad essere un indice di qualità, permette di identificare la provenienza della pianta e identificare potenziali adulterazioni.

Tabella 1 - Metodo-Gradiente

Tempo	A%	B%	C%	D%	Flusso	Curva
0.00	0	70	30	0	1.00	
10.00	0	10	90	0	1.00	Lineare
15.00	0	10	90	0	1.00	Lineare
25.00	0	10	90	0	1.00	Lineare
30.00	0	50	50	0	1.00	Lineare
35.00	0	70	30	0	1.00	Lineare

Figura 6 - Analisi HPCL estratto etile acetato



La vanillina può essere adulterata con l'estratto dei baccelli di vaniglia del Surinam, definiti "frutti di Tonka", che sono di scarsa qualità in quanto privi del profumo di vaniglia. Tale adulterazione è tossica a livello epatico e del sangue, per l'elevato contenuto di curarine (12). Un'altra falsificazione si può realizzare strofinando il prodotto con dell'olio o balsamo Peruviano

per renderlo più simile al prodotto naturale. Tale adulterazione è riconoscibile perchè il frutto è molto più secco ed asciutto e manca del cristallo vanigliato.

### Bibliografia

1. Ehlers D, Pfister M. Compounds of Vanillons. *J Essent Oil Res* 1997; 9: 427-31.
2. Trease GE. A. *Textbook of Pharmacognosy* Bailliere Tindall and Cox London, 1946: 188.

3. Fenaroli. *Sostanze aromatiche naturali*. Hoepli-Milano 1963; I: 961.
4. Ranadive AS. Vanillin and Related Flavor Compounds in Vanilla Extracts Made from Beans of Various Global Origins. *J Agric Food Chem* 1992; 40: 1922.
5. Walton NJ, Mayer MJ, Narbad A. Vanillin. *Phytochemistry* 2003; 63: 505-15.
6. Kamat JP, Ghosh A, Devasagayam TP. Vanillin as an antioxidant in rat liver mitochondria: inhibition of protein oxidation and lipid peroxidation induced by photosensitization. *Mol Cell Biochem* 2000; 209 (1-2): 47-53.
7. King AA, Shaughnessy DT, Mure K, et al. Antimutagenicity of cinnamaldehyde and vanillin in human cells: Global gene expression and possible role of DNA damage and repair. *Mutat Res* 2007; 616 (1-2): 60-9.
8. Liang JA, Wu SL, Lo HY, Hsiang CY, Ho TY. Vanillin inhibits matrix metalloproteinase-9 expression through down-regulation of nuclear factor-kB signaling pathway in human hepatocellular carcinoma cells. *Mol Pharmacol* 2009; 75: 151-7.
9. Akagi K, Hirose M, Hoshiya T, Mizoguchi Y, Ito N, Shirai T. Modulating effects of ellagic acid, vanillin and quercetin in a rat medium term multi-organ carcinogenesis model. *Cancer Lett* 1995; 94: 113-21.
10. Fitzgerald DJ, Stratford M, Gasson MJ, Ueckert J, Bos A, Narbad A. Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. *J Appl Microbiol* 2004; 97: 104-13.
11. Sun R, Sacalis JN, Chin C-K, Cecil C. Still Bioactive Aromatic Compounds from Leaves and Stems of Vanilla fragran sJ. *Agric.Food Chem* 2001; 49: 5161-4.
12. Thompson RD, Hoffmann TJ. Determination of coumarin as an adulterant in vanilla flavoring products by high-performance liquid chromatography *J Chromatogr* 1988; 438(2): 369-82.