



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACION  
PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL**

**UNIDAD OAXACA**

**EVALUACION DEL EFECTO DE SONICACION - MICROONDAS EN EL  
BENEFICIO DE VAINILLA (*Vanilla planifolia* Andrews)**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS  
PRESENTA:**

**ISIDRO PACHECO REYES**

**Director de Tesis:**

**Dra. Luicita Lagunez Rivera**

Junio 2009



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*CARTA CESION DE DERECHOS*

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez el día **30** del mes **junio** del año **2009**, el (la) que suscribe **Pacheco Reyes Isidro** alumno (a) del Programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES** con número de registro **B071124**, adscrito al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Luicita Lagunez Rivera y cede los derechos del trabajo titulado: **“Evaluación del efecto de sonicación-microondas en el beneficio de vainilla (*Vanilla planifolia Andrews*)”** al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **Calle Hornos 1003, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca**, e-mail: [posgradoax@ipn.mx](mailto:posgradoax@ipn.mx) ó [jpr95\\_8@hotmail.com](mailto:jpr95_8@hotmail.com) Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

**Pacheco Reyes Isidro**



INSTITUTO POLITÉCNICO  
NACIONAL  
CIDIR-UNIDAD-OAXACA



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL  
SECRETARIA DE INVESTIGACION Y POSGRADO**

*ACTA DE REVISION DE TESIS*

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez siendo las 13:00 horas del día 30 del mes de Junio del 2009 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del **Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca (CIIDIR-OAXACA)** para examinar la tesis de grado titulada: "Evaluación del efecto de sonicación-microondas en el beneficio de vainilla (*Vanilla planifolia Andrews*)".

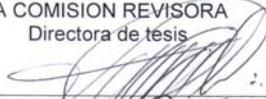
Presentada por el alumno:

<b>Pacheco</b>	<b>Reyes</b>	<b>Isidro</b>							
<small>Apellido paterno</small>	<small>materno</small>	<small>nombre(s)</small>							
Con registro: <table border="1" style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 2px 5px;">B</td> <td style="padding: 2px 5px;">0</td> <td style="padding: 2px 5px;">7</td> <td style="padding: 2px 5px;">1</td> <td style="padding: 2px 5px;">1</td> <td style="padding: 2px 5px;">2</td> <td style="padding: 2px 5px;">4</td> </tr> </table>			B	0	7	1	1	2	4
B	0	7	1	1	2	4			

aspirante al grado de: **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA  
Directora de tesis

  
Dra. Luján Laguné Rivera

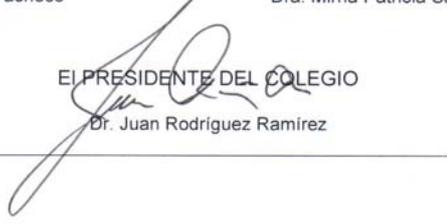
  
Dra. María del Pilar Cañizares Macías

  
Dr. Aniceto Rodolfo Solano Gómez

  
Dr. Rafael Pérez Pacheco

  
Dra. Mirna Patricia Santiago Gómez

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

  
Dr. Juan Rodríguez Ramírez



<b>ÍNDICE</b>	<b>Pág.</b>
ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
ÍNDICE DE TABLAS.....	7
RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	11
3. JUSTIFICACIÓN.....	12
4. ANTECEDENTES.....	13
5. MARCO TEORICO.....	14
5.1 Generalidades.....	14
5.2 Condiciones ambientales para el crecimiento y producción de vainilla.....	15
5.3 Fruto de vainilla y sus reacciones enzimáticas.....	15
5.4 Calidad de frutos de vainilla.....	19
5.5 Proceso de beneficiado.....	21
5.6 Vainillina sintética.....	22
5.7 Proceso tradicional.....	23
5.8 Actividad enzimática.....	25
5.8.1 $\beta$ -glucosidasa.....	25
5.8.2 Peroxidasa.....	25
5.9 Textura.....	26
5.10 Ruptura celular.....	27
5.11 Aplicación de sonicación en la extracción de compuestos fenólicos e industria alimentaria.....	28
5.12 Importancia de las microondas en la extracción de compuestos orgánicos.....	30
6. HIPOTESIS.....	31
7. OBJETIVOS.....	31
7.1 General.....	31
7.2 Específicos.....	31
8. METODOLOGÍA.....	32
8.1 Materiales y métodos.....	32
8.2 Beneficiado tradicional.....	32
8.3 Diseño de experimento periodo 1.....	33
8.3.1 Proceso desarrollado periodo 1.....	34
8.4 Diseño de experimento periodo 2.....	36
8.4. 1 Proceso desarrollado periodo 2.....	38
8.5 Técnicas de análisis.....	39
8.5.1 Prueba colorimétrica.....	39
8.5.2 Determinación de humedad.....	40
8.5.3 Análisis de pH.....	40
8.5.4 Análisis de vainillina.....	40
8.5.5 Cuantificación de la actividad enzimática $\beta$ -glucosidasa.....	41
8.5.6 Determinación de textura.....	42
8.5.7 Estimación de ruptura celular.....	42
9. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	43
9.1 Caracterización fisicoquímica de vainas para los dos periodos de cosecha.....	43
9.2 Periodo 1.....	44
9.2.1 Prueba espectrofotométrica.....	44
9.2.2 Análisis estadístico de la fuente de energía en el secado de vainilla.....	46

9.3 Periodo 2.....	48
9.3.1 Efecto de energías alternas en la textura de frutos de vainilla.....	48
9.3.2 Micrografías.....	50
9.3.3 Actividad de la $\beta$ -glucosidasa y rendimiento de vainillina.....	51
9.3.4 Análisis estadístico de energías alternas en el marchitado de vainilla.....	56
9.3.4.1 Correlaciones de la $\beta$ -glucosidasa y el rendimiento de vainillina.....	56
9.3.4.2 Análisis de varianza del rendimiento de vainillina.....	59
9.4 Aplicación de energías focalizadas en el beneficio de vainilla.....	60
10. CONCLUSIONES DE ESTUDIOS EXPERIMENTALES.....	64
10.1 Periodo 1.....	64
10.2 Periodo 2.....	65
11. PERSPECTIVAS.....	66
12. ANEXOS.....	67
12.1 Curva de calibración de vainillina.....	67
12.2 Requisitos para utilizar análisis de varianza en el rendimiento de vainillina.....	68
13. REFERENCIAS.....	71

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Fruto de vainilla plenamente desarrolladas.....	15
Figura 2. Corte transversal del fruto de vainilla que muestra su estructura interna.....	15
Figura 3.- Sección transversal del fruto de vainilla maduro.....	16
Figura 4. Separación de la vainillina y glucosa de la glucovainillina por acción de la $\beta$ -glucosidasa.....	17
Figura 5. Localización del glucósido y actividad de la $\beta$ -glucosidasa en diferentes zonas de una sección transversal de la vaina.....	17
Figura 6. Localización de compuestos fenólicos y enzimas fenólicas oxidativas (PPO, polifenol oxidasa y POD, peroxidasa) en una célula de plantas.....	18
Figura 7. Transformación de vainas verdes a extracto.....	21
Figura 8. Rutas para obtener vainillina.....	22
Figura 9. Métodos para beneficiar vainilla.....	23
Figura 10. Efecto de la peróxidasa en p-hidroxibenzaldehído y vainillina.....	26
Figura 11. Efecto de liofilizado en frutos de vainilla.....	28
Figura 12.- Modo de digestión ultrasónica y efectos involucrados.....	29
Figura 13. Proceso general para validar el beneficio con energías alternas.....	32
Figura 14. Diagrama de experimentación periodo 1.....	33
Figura 15. Marchitado de vainas.....	34
Figura 16. Diagrama de experimentación periodo 2.....	37
Figura 17. Equipo MiniScan by Hunterlab.....	39
Figura 18. Gráfica para determinar color .....	39
Figura 19. Dispositivo de penetración.....	42
Figura 20. Vainilla beneficiada.....	44
Figura 21. Rendimiento de vainillina en los diferentes tratamientos de beneficiado.....	45
Figura 22. Variabilidad del rendimiento de vainillina.....	46
Figura 23. Diagrama de árbol del rendimiento de vainillina del proceso de beneficiado.....	47
Figura 24. Porcentaje de penetración de vainas verdes y tratadas.....	48
Figura 25. Efecto de sonicación en la estructura celular de frutos de vainilla tomadas con microscopio electrónico lente X10.....	50
Figura 26. Actividad enzimática y rendimiento de vainillina durante 40 días de beneficio con marchitado T y pos-marchitado con sonicación.....	51

Figura 27. Actividad enzimática y rendimiento de vainillina durante 40 días de beneficio con marchitado en MOH <sub>2</sub> O y pos-marchitado con sonicación.....	52
Figura 28. Actividad enzimática y rendimiento de vainillina durante 40 días de beneficio con marchitado en MO y pos-marchitado con sonicación.....	53
Figura 29. Actividad enzimática y rendimiento de vainillina durante 40 días de beneficio con tratamiento S y pos-marchitado con sonicación.....	54
Figura 30. Dependencia de la actividad enzimática-vainillina de los diferentes marchitados y pos-marchitados a 0, 5, 10 y 15 minutos de sonicación en el beneficio de vainilla.....	57
Figura 31. Rendimiento de vainillina con diferente marchitado a los 20 días de beneficio....	62
Figura 32. Relación vainillina-β-glucosidasa con tratamientos de beneficio modificando la potencia de energías alternas.....	63
Figura 33. Curva de calibración de vainillina.....	67
Figura 34. Normalidad del rendimiento de vainillina. Marchitado: a) T, b) MOH <sub>2</sub> O, c) MO y d) S.....	69

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Parámetros estándar que determinan la calidad de las vainas.....	20
Tabla 2.- Ventajas y desventajas de tratamientos de destrucción de células.....	28
Tabla 3.- Experimentos del periodo 1.....	33
Tabla 4. Experimentación factorial 4 <sup>2</sup> propuesta, con cuatro variables a dos niveles.....	36
Tabla 5. Cantidad de muestra utilizada en el periodo 2.....	37
Tabla 6. Valores de calibración para determinar color.....	39
Tabla 7. Propiedades fisicoquímicas de las vainas utilizadas en los dos periodos de cosecha.....	43
Tabla 8. Relación de extractos diluidos y porcentaje de vainillina en vainas beneficiadas.....	44
Tabla 9. Porcentaje de vainillina en vainas beneficiadas en el periodo 1.....	45
Tabla 10. Medias y desviaciones estándar del rendimiento de vainillina.....	46
Tabla 11. Porcentajes de penetración de vainas verdes y vainas tratadas.....	48
Tabla 12. Correlaciones del rendimiento de vainillina y la actividad de la $\beta$ -glucosidasa de frutos de vainilla sometidas a marchitado T con pos-marchitado con sonicación.....	58
Tabla 13. Análisis ANOVA para vainillina (%) según tratamientos T.....	59
Tabla 14. Análisis ANOVA para vainillina (%) según tratamientos MOH <sub>2</sub> O.....	59
Tabla 15. Análisis ANOVA para vainillina (%) según tratamientos MO.....	59
Tabla 16. Análisis ANOVA para vainillina (%) según tratamientos S.....	60
Tabla 17. Porcentajes de vainillina con diferente marchitado a los 20 días de beneficio.....	61
Tabla 18. Concentración y absorbancia de vainillina.....	67
Tabla 19. Marchitado Tradicional.....	70
Tabla 20. Marchitado MOH <sub>2</sub> O.....	70
Tabla 21. Marchitado MO.....	70
Tabla 22. Marchitado S.....	70

## RESUMEN

El beneficiado o beneficio tradicional de vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews) es un proceso lento y delicado que se desarrolla en periodos de cuatro a seis meses, en el cual se metaboliza en promedio la mitad de vainillina de la que teóricamente se podría obtener; Waliszewski 2007, estima alcanzar del 6 al 7 % de vainillina en relación a los niveles de glucovainillina encontrada en las vainas de madurez fisiológica.

El beneficiado tradicional en general consta de cuatro etapas: marchitado, sudado, secado y acondicionado, durante las cuales se desarrolla la reacción de hidrólisis enzimática entre la glucovainillina y la  $\beta$ -glucosidasa, para producir vainillina.

Para acelerar el beneficio en frutos de vainilla, es necesario romper las paredes celulares para poner en contacto la glucovainillina y la  $\beta$ -glucosidasa principalmente. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de energías alternas de microondas-sonicación en el marchitado y secado del beneficiado de vainilla en dos periodos de cosecha.

En el periodo 1 se determinó que el secado convectivo (C) en el beneficiado de frutos de vainilla incrementa el rendimiento de vainillina y, el secado con microondas lo disminuye, en comparación al método tradicional (T).

En el periodo 2 se encontró que los máximos rendimientos de vainillina con cualquier tratamiento de marchitado T, en horno de microondas con agua (MOH<sub>2</sub>O), microondas sin agua (MO) o en baño con sonicación (S), se alcanzan a los 20 días de beneficio. En este mismo periodo se determinó que la relación  $\beta$ -glucosidasa-vainillina es inversamente proporcional de vainas verdes a vainas procesadas; sin embargo, al seguir la cinética de evolución de vainillina en todos los tratamientos no se nota claramente esta relación, que se considera muy determinante dentro de los primeros días de beneficiado de vainilla. La mejor correlación enzima-vainillina se presentó con el marchitado en S, donde no hay diferencias estadísticamente significativas en el rendimiento medio de vainillina.

Al utilizar energías focalizadas de sonicación (SF) y microondas (MF) en el marchitado de vainas, el rendimiento de vainillina incrementa, en relación al proceso T; excepto cuando se aplica exceso de microondas.

**PALABRAS CLAVE:** Energías alternas, secado, marchitado, vainillina,  $\beta$ -glucosidasa.

## ABSTRACT

The beneficiary or traditional benefit of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) is a slow and delicate process that develops in periods from four to six months, in which the half is metabolized in average of vanillin of the one that theoretically might be obtained; it is estimated to reach from 6 to 7 % of vanillin in relation to the levels of glucovanillin found in the pods of physiological maturity.

The traditional beneficiary in general consists of four stages: faded, sweated, dried and conditioned, during which the reaction develops of hydrolysis enzymatical between the glucovanillin and  $\beta$ -glucosidase, to produce vanillin.

To accelerate the benefit in fruits of vanilla, it is necessary to break the cellular walls to contact the glucovanillin and  $\beta$ -glucosidase principally. The aim of this study was to determine the effect of alternate energies of microwave-sonication in the faded one and dried of the beneficiary of vanilla in two periods of crop.

In the period 1 decided that the dried one convective (C) in the beneficiary of fruits of vanilla increases the yield of vanillin and, the dried one with microwave diminishes it, in comparison to the traditional method (T).

In the period 2 one found that the maximum yields of vanillin with any treatment of faded T, in microwave with water (MOH<sub>2</sub>O), microwave with water (MO) or in sonication (S), are reached to 20 days of benefit. In the same period one determined that the relation  $\beta$ -glucosidase-vanillin is inversely proportional from green pods to tried pods; nevertheless, on having followed the kinetic one of evolution of vanillin in all the treatments well-known clearly this relation, which is considered to be very determinant in the first days of beneficiary of vanilla. The best correlation enzyme-vanillin appeared with the faded one in S, where there are no statistically significant differences in the average yield of vanillin.

On having used energies focalizadas of sonication and microwave in the faded one of pods the yield of vanillin increases, in relation to the process T; except when excess of microwave is applied.

*Keywords:* alternate energies, dried, faded, vanillin,  $\beta$ -glucosidase.

## 1. INTRODUCCION

En este estudio se analizó el efecto que tienen energías alternas como sonicación y microondas en el rendimiento de vainillina y en la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa durante el beneficiado o curado de vainilla (*Vanilla Planifolia*).

El beneficiado de vainilla es un proceso lento y delicado, en el se desarrollan las reacciones que dan como producto principal la formación de vainillina (esencia de la vainilla); se han realizado estudios con el fin de controlar este proceso para reducir el tiempo e incrementar el rendimiento de vainillina de manera tradicional y a nivel laboratorio. El proceso de beneficiado en general consta de cuatro etapas esenciales que son marchitado, sudado, secado y acondicionado (Ramachandra y Ravishankar, 2000).

La selección de la vaina es muy importante, pues solo deben ser beneficiadas las maduras con puntos de color amarillo al café, que es un indicador de la actividad de las enzimas nativas y máximo contenido de glúcidos precursores del sabor, siendo el mas importante la glucovainillina (Waliszewski, 2006), que se divide en glucosa y vainillina por la acción catalítica de la  $\beta$ -glucosidasa y la celulasa.

En la etapa de marchitado se interrumpe totalmente el desarrollo vegetativo posterior a la cosecha y se inician las reacciones enzimáticas responsables de la producción del aroma y del sabor; esta reacción se reconoce por la aparición de manchas color café en las vainas. En esta etapa se detiene el proceso respiratorio y se rompe la pared celular y los compartimientos para que las enzimas en el interior de las vainas puedan estar en contacto con los sustratos y provoquen la liberación de compuestos aromáticos, principalmente la vainillina (Waliszewski, 2006).

En el sudado se eleva la temperatura para promover las reacciones enzimáticas y provocar un secado inicial rápido para prevenir las enfermedades dañinas. En el secado las vainas pierden dos terceras partes de su peso y en el acondicionamiento se almacenan en recipientes herméticos por varios meses, para desarrollar el aroma y sabor deseable, producto de varios constituyentes, a través de varias reacciones químicas y bioquímicas, como son la esterificación, eterificación, degradación oxidativa, etc. (Waliszewski, 2006).

El proceso de beneficiado tradicional puede tardar de tres a seis meses, mientras que los realizados a nivel laboratorio un mes y medio, obteniendo un 3% de vainillina (Rosado-Zarrabal et al., 2006) o 2.174% en 10 días de beneficio (Sreedhar et al., 2007), mientras que a nivel tradicional con un adecuado proceso de curado se obtiene el 3.66 %, esperando un máximo contenido del 6-7% de vainillina (Waliszewski, 2007).

Las energías alternas de sonicación y microondas son útiles para provocar daños y ruptura de las estructuras celulares en frutos de vainilla que favorecen el contacto entre enzimas y sustratos.

La sonicación consiste en la aplicación de ultrasonidos, dependiendo de la frecuencia, intensidad y energía aplicada se puede destruir las estructuras subcelulares, este tipo de energía se utiliza para la extracción de algunos compuestos fenólicos de plantas que mejoran el rendimiento (Hromaádkova-Ebringerová, 2003), al romper paredes celulares, incrementar la transferencia de masa (Elisandra et al., 2004), y favorecer la actividad de las enzimas.

Las microondas son útiles para extraer varias clases de compuestos, tales como, aceites esenciales, aromas, pesticidas, fenoles, dioxinas y otros compuestos orgánicos que provienen de diversas fuentes (Trejo, 2006). Valdez y Cañizares (2007) aplicaron energías alternas de sonicación y microondas para obtener extractos naturales de vainilla en periodos cortos de tiempo, en este estudio se utilizaron en el proceso de beneficiado.

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El proceso de beneficiado tradicional se desarrolla en periodos prolongados, sin embargo, se genera en promedio la mitad de vainillina de la que teóricamente se podría obtener. Este incremento se estima alcanzar mediante métodos que provoquen el rompimiento de compartimientos celulares, que propicien la aceleración de la reacción de hidrólisis enzimática entre la glucovainillina y la  $\beta$ -glucosidasa, como lo han investigado diversos autores al provocar el rompimiento de paredes celulares utilizando liofilizado (Odoux et al., 2006), marchitado con agua caliente o con soluciones ácidas (Sreedhar et al., 2007) o alcalinas (Mariezcurrena et al., 2008) y enzimas (Perera y Owen, 2008).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Con la aplicación de energías alternas de microondas y sonicación, se pretende incrementar el rendimiento de vainillina y reducir el tiempo en el beneficiado de vainilla, al romper paredes celulares de las vainas y propiciar la liberación de compuestos precursores de la vainillina sin afectar la actividad de las enzimas.

Se han realizado estudios para controlar el proceso, marchitando las vainas con soluciones de ácido acético naftalénico (Sreedhar et al., 2007) o provocando un sudado a 40 °C con humedad relativa de 85% (Rosado-Zarrabal et al., 2006), logrando reducir en un mes y medio el beneficiado. La energía de microondas se ha usado recientemente para la extracción rápida de metabolitos como son los compuestos fenólicos de diversas plantas, reduciendo el solvente y mejorando su rendimiento (Proestos & Komaitis, 2007); incluso se ha utilizado las microondas sin adición de solventes en plantas frescas y previo humedecimiento de plantas secas (Wang et al., 2006). Se ha encontrado que la extracción por sonicación (ultrasonido) de algunos compuestos fenólicos de plantas (Hromaádkova, 2003) es más eficiente que los métodos de extracción tradicionales utilizando solventes, equipo soxhlet o destilación, siendo mas económica y sencilla (Azuola y Vargas, 2007), al romper paredes celulares que actúan como barreras entre los sustratos (Priego y Luque de Castro, 2007) e incrementar la transferencia de masa (Grénman et. al., 2007) o bien al provocar cambios en la permeabilidad de los organelos internos de la célula favoreciendo la actividad de las enzimas; además remueve la humedad adherida fuertemente (Fernández, 2007) y provoca digestión biológica y bioquímica de muestras sólidas a través de hidrólisis enzimáticas, en la cual la temperatura y la actividad enzimática son factores claves.

#### 4. ANTECEDENTES

La vainillina se puede obtener de manera sintética, a partir de guayacol, lignina, biotecnologías (Walton et al., 2003), microorganismos o por biosíntesis natural de vainilla como el proceso de beneficio tradicional.

Las propiedades aromáticas de las vainas beneficiadas, dependen del tipo de proceso al que fueron sometidas (Murillo, 1995). Se han realizado estudios para controlar el proceso, en el marchitado se ha utilizado soluciones de ácido acético naftalénico a 63°C durante tres minutos con secado convectivo a 38°C (Sreedhar et al., 2007); en el sudado se a controlado la temperatura a 40 °C y la humedad relativa al 85% (Rosado-Zarrabal et al., 2006), reduciendo el beneficio a un mes y medio.

Odoux et al., 2006, en el marchitado congeló las vainas, Mariezcurrena et al., 2008 utilizó bases alcalinas, Ranadive, 1994 escaldó las muestras y Pérez-Silva, et al., 2007, en condiciones similares de beneficiado tradicional, marchitó las vainas en agua a 80°C durante 30 segundos y en un horno a 60°C de 24 a 48 horas, dejó enfriar de 24 a 48 horas y secó las muestras al sol de 2 a 4 horas en temperaturas de 50 a 55 °C.

Waliszewski (2006), han incrementado el rendimiento de vainillina en vainas beneficiadas mediante la adición de enzimas comerciales de celulasa, peptinasa y  $\beta$ -glucosidasa; Perera y Owen (2008) ha utilizado las mismas enzimas en el proceso de beneficio.

Con estas investigaciones se ha logrado determinar que el marchitado es una de las etapas mas importantes (Mariezcurrena et al., 2008), que provoca daños a las células del fruto verde de vainilla.

Por otra parte, Valdez y Caziñares, 2007, han utilizado microondas focalizadas y ultrasonido a través de una sonda para obtener extractos naturales de vainas beneficiadas en periodos cortos de tiempo.

Hromaádkova-Ebringerová, 2003, menciona que las ultrasonidos se utilizan para extraer algunos compuestos fenólicos de plantas, al romper las paredes celulares e incrementar la transferencia de masa (Elisandra et al., 2004, citado por Sandoval-Salas, 2005).

Trejo, 2006, menciona que las microondas son útiles para extraer aceites esenciales, aromas, pesticidas, fenoles, dioxinas y otros compuestos orgánicos, que provienen de diversas fuentes. Wang et al., 2006, destiló con microondas sin solvente, compuestos volátiles de plantas frescas o materiales secos previo humedecimiento y adicionó polvos carbonilos para la absorción de microondas.

## 5. MARCO TEÓRICO

### 5.1 Generalidades

La planta de vainilla (*Vanilla planifolia Andrews*) es una orquídea perenne, tropical nativa de México, de hábitos trepadores, que alcanza hasta 50 m de longitud. Sus frutos son comercializados alrededor del mundo por su apreciable aroma (Rosado-Zarrabal et al., 2006), los cuales son vainas carnosas, alargadas, de 12 a 25 cm, que contienen en su interior miles de minúsculas semillas; su maduración es gradual desde polinización hasta la cosecha, periodo que puede tardar de 8 a 9 meses, tornándose con el tiempo del color verde en su madurez fisiológica carente de olor a color negra, que despiden un fuerte aroma.

Entre las especies de orquídeas, la vainilla es la más importantes en el mercado nacional e internacional, la cual se utiliza en la elaboración de bebidas, postres, perfumes, licores, cigarrillos y medicinas (Elorza y López, 2007).

El cultivo de esta orquídea representa una importante fuente de generación de empleos, sobre todo en la polinización. A pesar de su origen mexicano, en nuestro país ha descendido su producción (Castillo y Engleman, 1993), ocupando el 4º lugar en la producción mundial (SAGARPA, 2006); en la actualidad los países que producen mayor cantidad de vainilla son Madagascar e Indonesia (Elorza y López, 2007).

Elorza y López (2007) mencionan que la vainilla es originaria de los bosques tropicales de México, Centroamérica, de la parte norte de Suramérica y Tahití; en cambio la SAGARPA (2006) dice que es una planta originaria de la parte norte de la zona costera del estado de Veracruz (Región Totonacapan) y Norte de Puebla. En México se ha extendido el cultivo a los estados de Hidalgo, Puebla, Oaxaca, San Luis Potosí, Chiapas, Tabasco y Quintana Roo (SAGARPA, 2006).

En Oaxaca, la vainilla es producida particularmente en la región de Tuxtepec y en sus alrededores, principalmente en San Juan Bautista Tuxtepec, San Juan Bautista Valle Nacional, San Felipe Usila, San Pedro Ixcatlan, Acatlán de Pérez Figueroa, Cosolapa, San José Independencia y Huatla de Jiménez (Pérez-Silva, et al., 2007).

## 5.2 Condiciones ambientales para el crecimiento y producción de vainilla

La temperatura óptima es de 21 a 32° C, con temperaturas mínimas de 5 a 7 °C por un corto tiempo, a una altitud de 0-600 m.s.n.m, con una precipitación pluvial de 1,200 a 3,000 mm anuales y una buena distribución a través del año. Es muy importante que el terreno seleccionado para plantar la vainilla cuente con buen drenaje, debe ser rico en materia orgánica y tener un pH entre 6 y 7 (PRODESIS, 2005). El cultivo de vainilla, café u otros similares, permanecen por mucho tiempo, son agrosistemas forestales en los que los árboles soporte y de sombra ayudan a mantener los ciclos biogeoquímicos mucho mejor que los cultivos de plantas anuales; preservan la biodiversidad local y la capacidad de regeneración de la selva. Sin embargo, una plantación de vainilla necesita de 3 a 4 años para empezar a producir (Elorza y López, 2007).

## 5.3 Fruto de vainilla y sus reacciones enzimáticas

Las vainas (Figura 1) tienen una sección transversal triangular, con una cavidad central que contiene miles de minúsculas semillas (Figura 2), siendo la parte carnosa la que se utiliza para elaborar el saborizante.



Figura 1. Fruto de vainilla plenamente desarrollada.

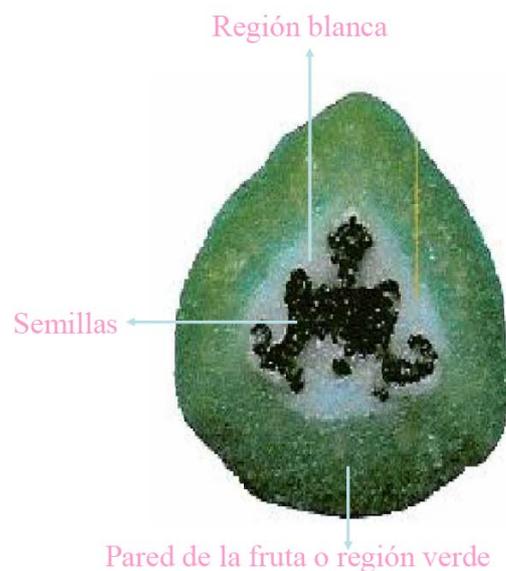


Figura 2. Corte transversal del fruto de vainilla que muestra su estructura interna.

Cada ángulo de la sección transversal está limitado por células tubulares o papilas, mientras que al lado de la cavidad se encuentran las laminas placentales (Figura 3). El epicarpio y endocarpio está formado por una o dos capas de células muy pequeñas, el mesocarpio contiene muy probablemente células vacuolizadas y el citoplasma se encuentra restringido por una capa fina alrededor de las paredes celulares (Oudou et al., 2003).

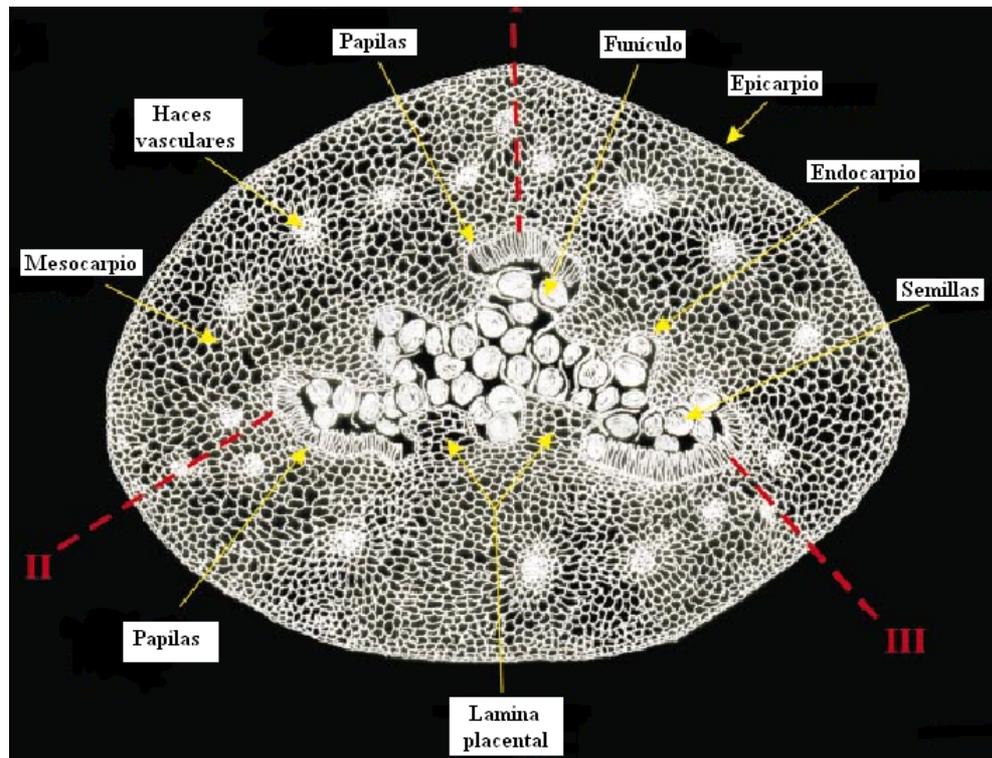


Figura 3. Sección transversal del fruto de vainilla maduro.

La vaina verde contiene compuestos glucósidos precursores del aroma, de los cuales cinco se han identificado mayoritariamente (Dignum et al., 2004), siendo el más importante la glucovainillina, acumulándose significativamente en el fruto después de la semana 15 de polinización y continuando hasta la semana 30 aproximadamente (Oudou et al., 2006). Los compuestos más importantes del aroma de la vainilla son la vainillina, el *p*-hidroxibenzaldehído, el ácido vainílico y el ácido *p*-hidroxibenzoico; de los cuales la vainillina es el compuesto principal (Pérez-Silva, et al., 2006), un aldehído fenólico, producido por hidrólisis enzimática (Figura 4) de la  $\beta$ -glucosidasa sobre la glucovainillina durante el proceso de curado.

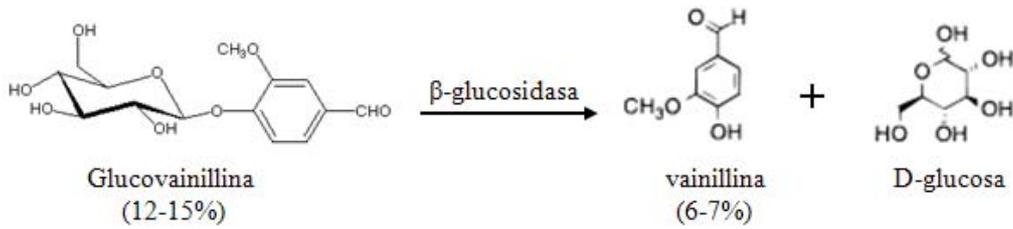


Figura 4.- Separación de la vainillina y glucosa de la glucovainillina por acción de la  $\beta$ -glucosidasa.

La localización de la glucovainillina y la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa en el tejido celular está sujeto a controversia (Havkin-Frenkel, et al., 2005). Sin embargo, Odoux 2003a, y Odoux et al., 2003b, mencionan que se encuentran en la placenta de la vaina (Figura 5).

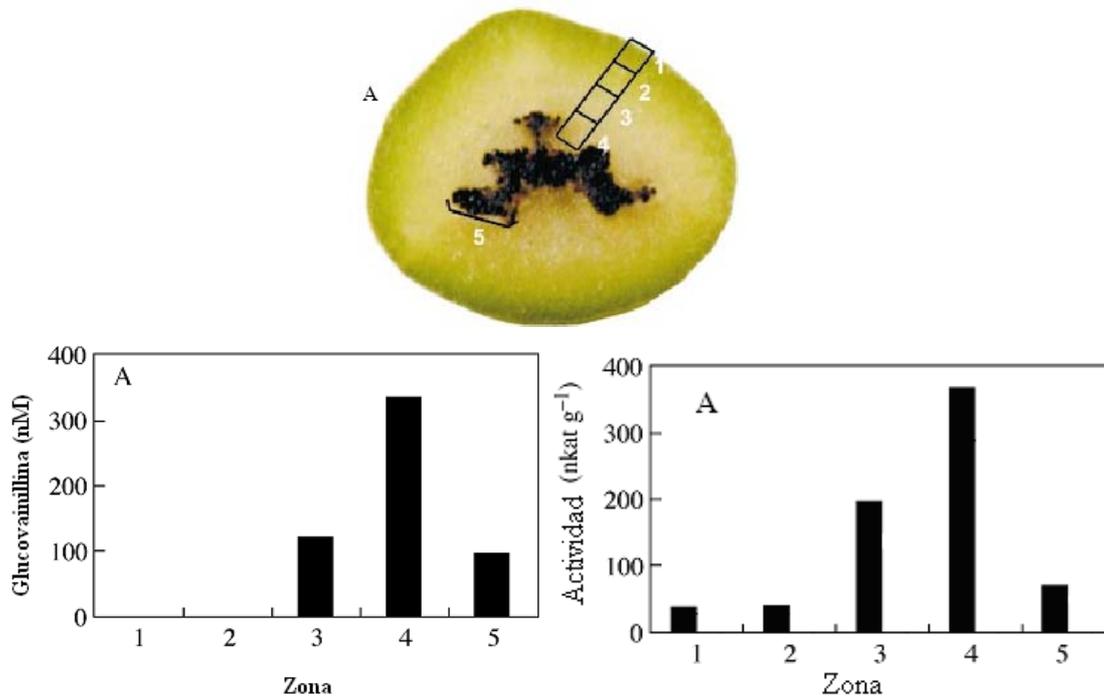


Figura 5. Localización del glucosido y actividad de la  $\beta$ -glucosidasa en diferentes zonas de una sección transversal de la vaina.

A nivel celular, la enzima y el sustrato parecen estar en diferentes compartimientos; la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa parece estar localizada en el citoplasma, exterior del mesocarpio y/o apoplasto, mientras que la glucovainillina es localizada en la vacuola (Figura 6), placenta y papilas (Odoux et al., 2003a, 2003b), la cual podría también presentarse en la zona extracelular (Joel et al., 2003). Sin embargo, esto excluiría la presencia de una enzima activa en el apoplasto antes de la maduración de la fruta (Odoux et al., 2006).

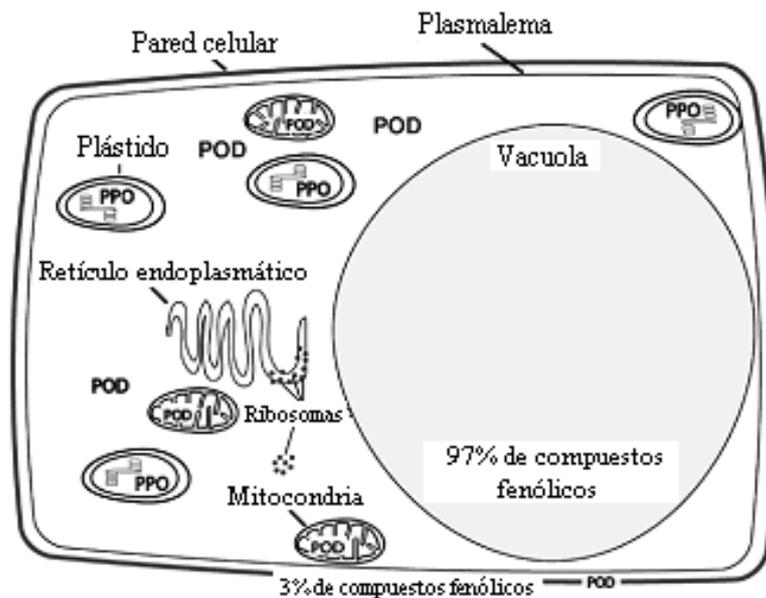


Figura 6.- Localización de compuestos fenólicos y enzimas fenólicas oxidativas (PPO, polifenol oxidasa y POD, peroxidasa) en una célula de plantas (Toivonen y Brummell. 2008).

Aunque la cantidad de glucovainillina en vainas maduras está presente en niveles del 10-15% en base a peso seco, solo un promedio cercano al 2% de vainillina resulta del proceso tradicional de curado de vainilla, pudiéndose obtener entre el 4.8 y 7.3 % de vainillina sobre la base de la proporción de peso molecular de vainillina y glucovainillina (152 de 314 g-mol) (Odoux et al., 2006; Perera y Owen, 2008).

Perera y Owen (2008) con sus estudios muestran un incremento en el rendimiento de vainillina mediante la adición de las enzimas celulasa, peptinasa y  $\beta$ -glucosidasa. Esto provoca daños a las células en vainas verdes. Las vainas verdes y maduras presentan diferencias en la actividad enzimática, las primeras tienen un bajo rendimiento de hidrólisis de glucovainillina (<5%), un alto nivel de actividad de la  $\beta$ -glucosidasa ( $\sim 1000$  nkatal  $g^{-1}$  de peso fresco) y una perfecta integridad celular; en cambio las frutas senescentes (maduras) tienen un alto nivel de hidrólisis de glucovainillina (<95%), actividad no apreciable de la  $\beta$ -glucosidasa y completa degradación celular (Odoux et al., 2006).

Durante el curado, las vainas tienen un rendimiento medio de hidrólisis de glucovainillina (<50%), con baja actividad de la  $\beta$ -glucosidasa y poca degradación celular comparada con la maduración (senescencia) o vainas descongeladas. Este mecanismo es regulado por la compartimentización celular, siendo un factor no limitante el nivel de actividad de la  $\beta$ -glucosidasa para completar la hidrólisis, ya que solo tiene un efecto en la cinética de reacción (Odoux et al., 2006).

La reacción de hidrólisis se lleva a cabo en cualquier etapa de maduración del fruto, incluyendo la senescencia, durante el tratamiento de calentamiento en el proceso de curado tradicional de vainilla o durante tratamientos de bajas temperaturas (menores a 0°C) (Odoux et al., 2006). Sin embargo, diferentes estudios muestran que estos tratamientos térmicos reducen considerablemente la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa (Dignum et al., 2002; Odoux et al., 2003a; Havkin-Frenkel et al., 2005). En contraste, Odoux (2006) indica que la hidrólisis durante cambios bruscos de temperatura no puede ser de origen enzimático y esto lo atribuye a otras reacciones endógenas.

Waliszewski (2006), rompió los compartimientos celulares de vainas beneficiadas al adicionar enzimas comerciales (Novozym 342 y Zymafilt L-300 ) en un rango de temperaturas de 25-60 °C y pH de 3.5 a 7.0; donde determinó que la mejor actividad de la  $\beta$ -glucosidasa se presentó a 40 °C y pH 5, lo cual indica que a tratamientos térmicos de 60°C existe actividad enzimática, aunque no es la óptima.

#### **5.4 Calidad de frutos de vainilla**

La excelente calidad de la vainilla mexicana permite tener presencia en el mercado *gourmet*, sin embargo los altos costos de producción y lo delicado del cultivo ha provocado una baja en la producción en México (Licona, 2008). Cuando una vaina no esta beneficiada correctamente le salen hongos, por lo cual, se considera contaminada y no pasa normas de calidad (Tabla 1), los frutos beneficiados contienen más de 200 aromas delicados y para mantener su calidad se debe conservar en envase herméticos de aluminio o madera, evitando que se volatilicen sus compuestos (Licona, 2008).

La clasificación de la calidad de las vainas se efectúa conforme a los criterios de longitud y contenido de vainillina. De acuerdo a su longitud, existen tres tipos de calidad; los frutos de primera tienen una longitud de 25 a 21 cm, los de segunda de 20 a 15 cm y los de tercera menores a 15 cm. Otras formas para determinar su calidad son: el rendimiento de vainillina del 3 % en vainas beneficiadas, su flexibilidad, brillo, aroma, color y el contenido de humedad que debe estar entre el 23% y 25% para las de primera. Después del beneficio las vainas se clasifican en piezas fisuradas y no fisuradas, otra característica para determinar su calidad. Las no fisuradas se clasifican después en 4 clases de calidad; las de primera son vainas jugosas, aceitosas, de color chocolate, sin defectos ni manchas; las de segunda son vainas más delgadas, con pequeños defectos exteriores, como manchas y cicatrices; las de tercera y cuarta, depende del grosor, color,

uniformidad, cantidad de manchas, así como el grado de humedad (Augstburge et al., 2000).

Tabla 1. Parámetros estándar que determinan la calidad de las vainas.

Determinantes de calidad	Grados mínimos y máximos
Sabor y Olor	Específico de su tipo, aromático,
Pureza	Libre de agentes externos como arena, piedrecillas, restos de fibra, insectos, etc.
Vainillina	Mínimo 2,0%
Ceniza	Máximo 7,0%
Ceniza no diluible en ácido clorhídrico	Máximo 0,5%
<b>Residuos</b>	
Pesticidas	No detectable
Bromuro y óxido de etileno	No detectable
<b>Micotoxinas</b>	
Aflatoxina B <sub>1</sub>	Máximo 2 µg/kg
Suma de las aflatoxinas B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub>	Máximo 4 µg/kg
<b>Microorganismos</b>	
Mohos	Máximo 100.000/g
Bacillus cereus	Máximo 10.000/g
Clostridias reductores sulfuricos	Máximo 10.000/g
Escherichia coli	Máximo 10.000/g
Staphylococcus aureus	Máximo 100/g
Salmonelas	No detectable en 20 g

Con el objeto de satisfacer las exigencias de calidad y de evitar la contaminación de las vainas, el procesamiento se debe efectuar en condiciones de absoluta higiene y limpieza. En el almacenaje las vainas deben envolverse en papel cera y colocarse dentro de envases sellados de lata o plástico a temperatura promedio de 5 °C, hasta por un año, para evitar absorción y pérdidas de aromas y humedad.

En México, independientemente de que se comercialice en vaina, extracto o derivados, los requisitos mínimos de calidad, de aroma, contenido de humedad y contenido de vainillina, componentes, formas de extracción, procesos de producción o elaboración del producto, y sus modos de empaque, embalaje o envasado, serán siempre los que se fijen en la Norma Oficial Mexicana NOM-139-SCFI-1999.

## 5.5 Proceso de beneficiado

El proceso de beneficiado de vainilla de manera tradicional es empírico y puede tardar de 3 a 6 meses, dependiendo de las condiciones ambientales (Pérez-Silva et al., 2007).

Las vainas verdes son insípidas pero desarrollan sus propiedades aromáticas durante el beneficio (Figura 7), el cual difiere entre las diversas regiones de producción, y esto puede tener una influencia muy importante en la variación de la calidad y perfil aromático de las vainas que se comercializan (Murillo, 1995).

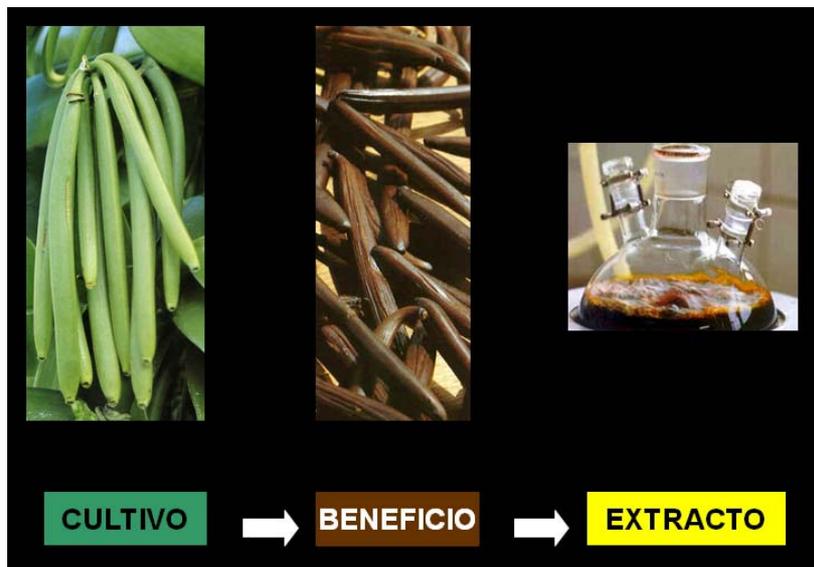
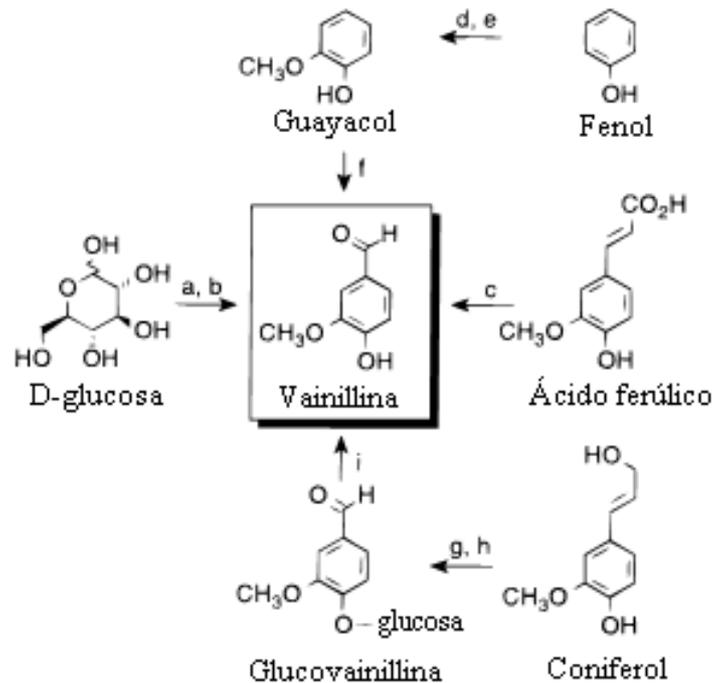


Figura 7. Transformación de vainas verdes a extracto.

El objetivo del curado es detener el proceso vegetativo natural y acelerar los cambios que llevarán a la formación de los constituyentes aromáticos del sabor, principalmente la vainillina ( $C_8H_8O_3$ ), llamada también 3-metoxi-4-hidroxibenzaldehído, la cual se puede obtener de manera sintética, por biotecnologías (Walton et al., 2003) debido a la actividad de diversos microorganismos o por biosíntesis natural de vainilla como es el proceso de beneficio tradicional (Figura 8)



- Clave:  
 (a) KL7/pKL5.26<sup>a</sup>.  
 (b) *N. crassa* aldehído dehidrogenasa aril.  
 (c) Catabolismo microbiano,  
 (d) HCO<sub>3</sub>H, HCO<sub>2</sub>H,  
 (e) Me<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.  
 (f) HCOCO<sub>2</sub>H, O<sub>2</sub>, H<sup>+</sup>.  
 (g) UDP-glucosa: Alcohol coniferil glucosiltransferasa.  
 (h) Enzimas no identificadas.  
 (i) β-glucosidasa .

Figura 8. Rutas para obtener vainillina (Kai Li y Frost, 1998).

La vainillina es un aldehído con estructura sólida, soluble en agua, alcohol y éter, cristaliza en forma de agujas y su punto de fusión es 80 °C.

### 5.6 Vainillina sintética

En 1858, se aisló por primera vez la vainillina, componente mayoritario (>98%) y principal responsable de las propiedades de los extractos naturales, debido al alto costo y a la escasez del extracto natural de vainilla, hubo un marcado interés en su síntesis, su preparación comercial empezó a realizarse a finales del siglo XIX a partir de un compuesto natural conocido como eugenol, extraído del clavo de olor; actualmente, la vainillina sintética es producida a partir de guayacol proveniente de la industria petroquímica o a partir de la lignina, un constituyente natural de la madera, la cual es un subproducto de la industria del papel. Prácticamente más del 90% del consumo mundial de saborizante y aroma de vainilla es cubierto con vainillina sintética.

El incremento en las últimas décadas de una serie de enfermedades, como el cáncer, ha sido asociado en algún grado al consumo de alimentos elaborados, provocando que se limite o sustituya el uso de aditivos alimentarios como los saborizantes. En el caso de la vainillina sintética se conoce que algunos de sus precursores como el fenol, el catecol u otros derivados lignocelulósicos de la industria del papel son sustancias nocivas para la salud. Debido al riesgo que alguna de esas sustancias pudiera ser arrastrada como trazas en el producto final, existe una marcada tendencia en los mercados de consumo, sobre todo europeos, por retomar el uso de extracto natural de vainilla. Sin embargo, se debe considerar que la producción de vainilla es insuficiente para cubrir la gran demanda y que además existe una enorme diferencia de precios entre la vainillina sintética y el extracto natural de vainilla, con un contenido equivalente de este compuesto (Asaff-Torres, 2008).

### 5.7 Proceso tradicional

Para obtener la vainillina de manera tradicional se benefician las vainas, siguiendo en general cuatro etapas esenciales (Figura 9), que se realizan de formas diferentes (tabla 2). El rendimiento depende del tiempo de curado y tipo de extracción.

En el beneficio se favorecen las reacciones químicas, bioquímicas y enzimáticas (Dignum et al., 2001), que se manifiesta a través de la flexibilidad, esplendor y color café oscuro de las vainas (Rosado et al., 2006).

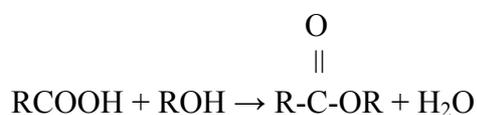


Figura 9. Métodos para beneficiar vainilla.

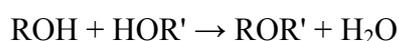
El marchitado es una de las etapas más importantes (Mariezcurrera et al., 2008), al evitar el proceso respiratorio y desarrollo vegetativo posterior a la cosecha, se rompe la pared celular e inician las reacciones enzimáticas con los sustratos, al producir compuestos aromáticos, principalmente la vainillina, responsable de la producción del aroma y del sabor (Waliszewski, 2006). Esta etapa se reconoce por la aparición de manchas color café en las vainas (Murillo, 1995), el marchitado puede realizarse por diversos tratamientos como es el horneado, liofilizado (Odoux et al., 2006), rayado o inmersión en agua caliente o en soluciones de ácido acético naftelénico (Sreedhar et al., 2007). Posterior a este tratamiento el color café se homogeniza durante el sudado (Murillo, 1995) y se promueven reacciones enzimáticas (Pérez et al., 2007)

En el secado las vainas pierden dos terceras partes de su peso por deshidratación y en el acondicionado se almacenan en recipientes herméticos para permitir el desarrollo del aroma y sabor deseable. Waliszewski (2006) menciona que en la etapa final de beneficiado se desarrollan reacciones químicas, como la eterificación, esterificación y degradación oxidativa:

a) Reacción de esterificación:



b) Reacción de eterificación:



En el beneficio, el uso de enzimas celulolíticas realiza perforaciones en la estructura más compacta de la celulosa, para permitir que procedan reacciones con los sustratos presentes en la vaina; algunos preparados celulolíticos comerciales contienen  $\beta$ -glucosidasa (Waliszewski et al., 2007), que incrementan la extracción de vainillina localizada en algunos compartimentos de la vaina donde no fue hidrolizada la glucovainillina (Waliszewski, 2006).

## **5.8 Actividad enzimática**

### **5.8.1 $\beta$ -glucosidasa**

A esta enzima se le atribuye la función celular relacionada a la maduración y degradación de celulosa, dentro de la pared celular. Se ha investigado la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa en una gran variedad de células de plantas, pero ninguna menciona los mecanismos precisos de acción (Guo-Jia Ma et al., 2006). Algunos datos de esta enzima son conocidos; sin embargo, no hay muchas investigaciones sobre la actividad enzimática en los diferentes glucósidos de las vainas (Dignum et al., 2004). Arana (1943) y Dignum (2004) mencionan que la actividad más alta de esta enzima se produce después de los seis o siete meses después de la polinización, y la mínima durante el beneficio de vainas; también indican que la formación del aroma se debe a la acción de las enzimas y a otras reacciones intrínsecas de la vaina.

Waliszewsky et al., (2007) encontró las condiciones óptimas para la mejor actividad de la  $\beta$ -glucosidasa en la extracción de vainillina en vainas; Odoux et al., (2006) menciona que la máxima actividad de la  $\beta$ -glucosidasa en vainas verdes a la madurez fisiológica es de 900 nkatal g<sup>-1</sup>, que disminuye a 26 nkatal g<sup>-1</sup> en vainas descongeladas y a 6 nkatal g<sup>-1</sup> durante la senescencia de la fruta.

Marquez y Waliszewsky (2008) analizaron el efecto de marchitado en frutos de vainilla y determinaron que en agua a pH 6.0 y 60 °C durante 3 minutos, la actividad de la enzima disminuye 51%.

### **5.8.2 Peroxidasa**

Otra enzima presente en el proceso de beneficio de vainilla es la peroxidasa, que transforma la vainillina en ácido vainillico. Esta enzima cataliza reacciones bisustrato de carácter redox en compuestos fenólicos (Leland y Jow, 1967).

Durante el proceso de beneficiado o curado, los cambios del color verde de la vainilla al marrón y café oscuro, se atribuye a la acción de la peroxidasa por medio de un sistema complejo (sustrato fenólico-peróxido-enzima) (Ranadive, 1994). Un estudio reciente para la purificación y caracterización de la peroxidasa en las paredes celulares de la vaina de vainilla, utilizó guayacol como sustrato y determinó que las condiciones

óptimas para la actividad de esta enzima son 16 °C, pH 3.8 y una concentración de sustrato de 3.8 mmol/L (Márquez et al., 2007).

La peroxidasa permite oxidar los compuestos presentes en el sabor de vainilla (Podstolski et al., 2002), transformando la vainillina y *p*-hidroxibenzaldehído en ácidos vainílicos y *p*-hidroxibenzoico respectivamente (Figura 10).

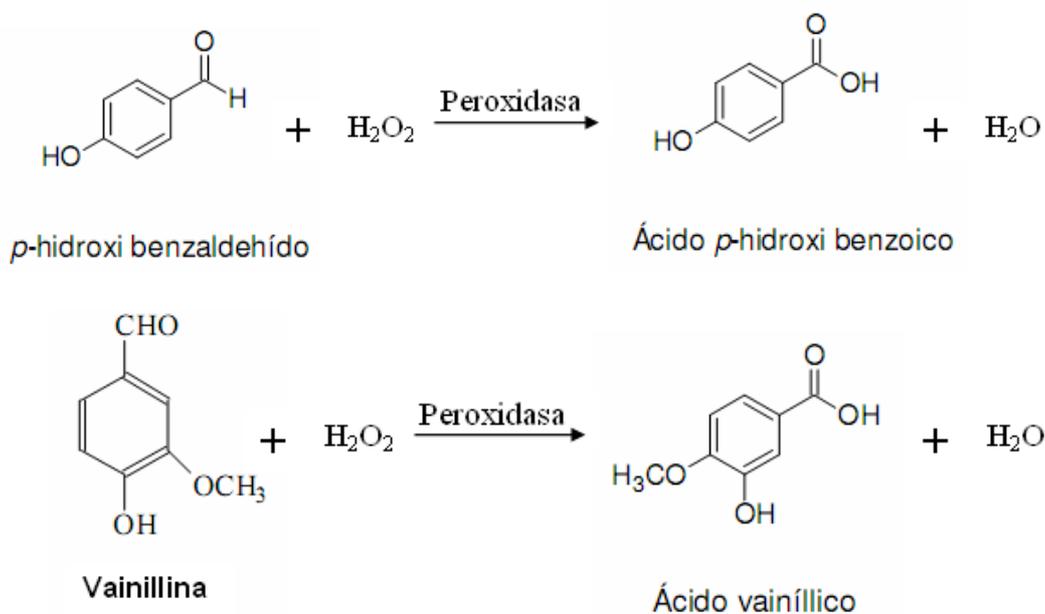


Figura 10. Efecto de la peroxidasa en *p*-hidroxibenzaldehído y vainillina.

## 5.9 Textura

Los cambios en textura producidos durante el proceso de maduración se deben a cambios bioquímicos, al igual que los ocurridos durante el almacenamiento, mientras que los cambios producidos en el procesamiento se deben, principalmente, a alteraciones en la estructura celular.

Las características mecánicas de las frutas y verduras se deben principalmente a los elementos estructurales presentes en la pared celular, que se considera como un complejo químico dinámico formada por compuestos poliméricos y no poliméricos. La mayoría de los polímeros que la constituyen son polisacáridos.

Los principales polímeros que forman las paredes celulares son: celulosa (30%), hemicelulosa (30%), peptinas (35%) y proteínas en base seca (1-5%). El componente más abundante es el agua, que ocupa dos terceras partes de la pared (Noé-Aguilar et al., 1999; Rodríguez, 2007).

## 5.10 Ruptura celular

El fraccionamiento subcelular es un conjunto de métodos y técnicas que tienen como objetivo obtener fracciones puras o enriquecidas en un determinado componente celular. Como los compuestos precursores de la vainillina se encuentran dentro de las células de la vaina, estas deben romperse para la extracción y contacto inmediato de los compuestos fenólicos.

La ruptura celular se puede realizar por métodos físicos, químicos, mecánicos o biológicos:

- a) Métodos físicos: Escaldado o congelado.
- b) Métodos químicos: Choques osmóticos, permeabilización, dilución lipídica, digestión enzimática o tratamiento alcalino.
- c) Métodos mecánicos: Agitación con abrasivos, molienda con perlas, homogenización o sonicación.
- d) Métodos biológicos: Microorganismos, células vegetales ó animales, enzimas, etc.

Los métodos drásticos rompen totalmente la célula y los suaves provocan alteración química en las cubiertas celulares, al provocar la permeabilización de la pared y la membrana celular para facilitar la difusión del producto hacia el exterior.

En los métodos físicos los daños en las estructuras celulares se deben a los tratamientos térmicos. El escaldado ordinario consiste básicamente en la inmersión del vegetal en agua caliente, por corto tiempo, con el fin de inactivar enzimas indeseables y ocasionar ablandamiento de los tejidos, lo que provoca filtración de micronutrientes por solubilización, remoción de aire y alteraciones en el color (Noé-Aguilar et al., 1999).

En los métodos mecánicos no hay agregados de compuestos ajenos al sistema, son económicos y fáciles de operar a gran escala, sus desventajas sobre los químicos (Tabla 2) es el control de temperatura, la cantidad de espuma que produce la desnaturalización y oxidación, además de la liberación de ácido desoxirribonucleico (ADN).

En el beneficio de vainilla con el fin de debilitar y romper las estructuras celulares se han utilizado soluciones ácidas (Sreedhar et al., 2007) o alcalinas (Mariezcurrera et al., 2008), escaldado (Ranadive, 1994), liofilizado (Odoux et al., 2006) (Figura 11) y enzimas comerciales (Perera y Owen, 2008).

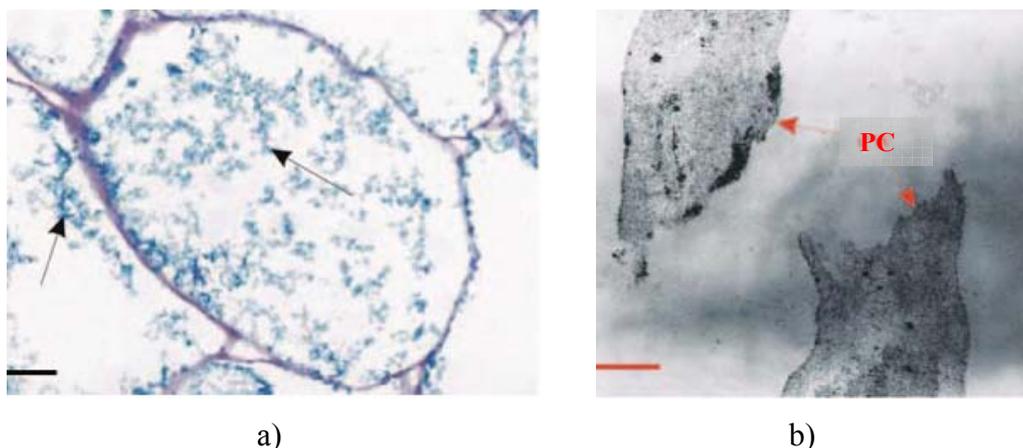


Figura 11. Efecto de liofilizado en frutos de vainilla. a) Corte transversal fino, b) Ruptura celular por congelamiento; PC, pared celular.

Tabla 2. Ventajas y desventajas de tratamientos de destrucción de células (Priego y Luque de Castro, 2007)

Método	Destrucción total (%)	Ventajas	Desventaja
Homogenización con alta presión	85	Alta eficiencia Bajos niveles de energía	Complicado
Cavitación hidrodinámica	75	Eficiencia de energía	Poca información y experiencia
Tratamiento térmico	15-60	Relativamente simple	Corrosivo, subsecuente neutralización
Molino de bolas	90	Alta eficiencia, relativamente simple	Energía intensa
Biológico	5-50	Simple operación y bajo costo	Muy baja eficiencia
Ultrasonido	100	Destrucción completa	Energía intensa

### 5.11 Aplicación de sonicación en la extracción de compuestos fenólicos e industria alimentaria

El ultrasonido se utiliza en procesos de intensificación para incrementar la velocidad de transferencia de masa, provocando mejores rendimientos e incluso cambios en los caminos de reacción (Thompson-Doraiswamy, 1999).

El ultrasonido es transmitido a través del líquido debido a la presión causada por la agitación vibracional inducida de las moléculas, que contrae y agranda la estructura molecular (Suslick, 1989), formando cavitaciones solo si la presión negativa excede la tensión local de la fuerza del líquido (Grénman et. al., 2007).

La temperatura de implosión de estas cavidades colapsantes alcanzan miles de grados Kelvin y presiones de cientos de atmósferas en pocos microsegundos, disociando las moléculas de agua en átomos de hidrógeno y radicales hidroxilos, que producen reacciones de transformaciones redox en la solución (Toy-Stringham, 1993).

La ebullición puede ser causada por la introducción de calor o por una reducción de la presión estática del ambiente líquido, en cambio, la cavitación es una vaporización local del líquido, inducido por una reducción hidrodinámica de la presión. En un sistema sólido-líquido, el colapso de una cavitación de burbuja puede tener diferentes impactos en la superficie del sólido (Riesz-Kondo, 1990), causando erosión, picaduras e incluso agrietamiento de partículas (Hagenson-Doraiswamy, 1998).

También se puede utilizar este fenómeno en descomposición química de soluciones acuosas orgánicas y para la digestión de diluciones (Figura 12).

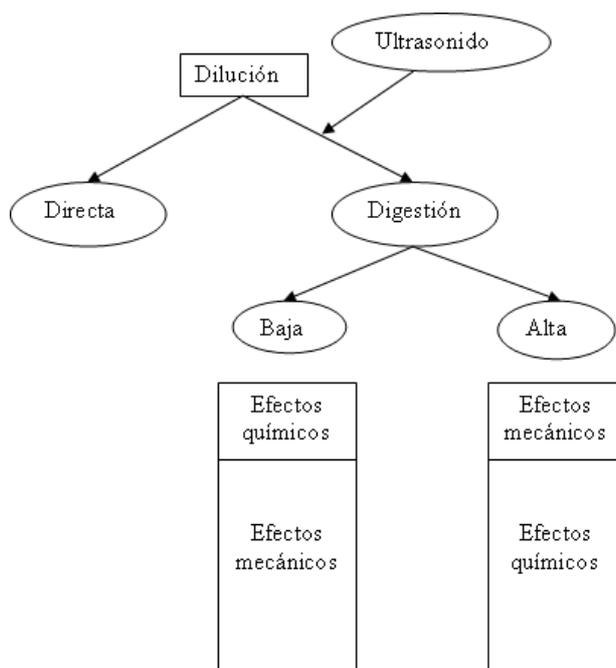


Figura 12. Modo de digestión ultrasónica y efectos involucrados (Priego-Capote, 2007).

La aplicación de ultrasonido se utiliza actualmente para la extracción de algunos compuestos fenólicos de plantas que mejoran significativamente el rendimiento (Hromaádkova-Ebringerová, 2003), mediante la ruptura de las paredes celulares y el incremento en la transferencia de masa (Elisandra et al., 2004, citado por Sandoval-Salas, 2005), o bien provocando cambios en la permeabilidad de los organelos internos de la célula e incluso el rompimiento de estas estructuras, favoreciendo la actividad de las enzimas.

En la industria alimentaria la sonicación se utiliza para la esterilización, descontaminación de vegetales crudos, ablandamiento de carnes (Herrero y Romero de Avila, 2006), oxidación del aceite de oliva virgen, extracción de compuestos del aroma del brandy añejado (Cañizares et al., 2004) y pre-tratamiento en el secado de frutas, como es el deshidratado de plátano (Fernandes y Rodrigues, 2007).

La sonicación consiste en la aplicación de ultrasonidos a una suspensión celular, dependiendo de la frecuencia, intensidad y energía aplicada se puede destruir las estructuras subcelulares o solubilizar complejos proteicos; se suele aplicar en frío para evitar el sobrecalentamiento de las muestras que podría provocar la desnaturalización de las proteínas. En la sonicación se presentan efectos mecánicos si la intensidad en la aplicación de ondas ultrasónicas es baja, y efectos químicos si es muy alta, colapsando la cavitación de la burbuja generada, formando radicales libres con otras especies (Priego-Capote y Luque de Castro, 2007).

### **5.12 Importancia de las microondas en la extracción de compuestos orgánicos**

Las microondas hacen vibrar o rotar las moléculas de agua, esta vibración crea calor, el cual calienta los alimentos, debido a que la materia está hecha esencialmente de agua, los alimentos son fácilmente cocinados de esta manera. La aplicación de calefacción por microondas en análisis químicos, reduce el tiempo, facilita la manipulación del trabajo y aumenta la purificación de los productos finales.

Estas ondas son útiles para extraer varias clases de compuestos, tales como, aceites esenciales, aromas, pesticidas, fenoles, dioxinas y otros compuestos orgánicos, que provienen de diversas fuentes (principalmente tierra, sedimentos, tejido de animales, alimentos y plantas) (Trejo, 2006).

Pocos artículos en la literatura han reportado la aceleración de extracción de aceites esenciales por irradiación de microondas. Las ventajas de usar energía de microondas es el no contacto con la fuente de calor para la extracción de aceites esenciales de diversas plantas, se aumenta la eficiencia de calor, la rápida transferencia de energía, se reducen los gradientes térmicos. Sirve para seleccionar la intensidad de calor, para la reducción del tamaño del equipo, se inicia rápidamente la reacción, se incrementa la producción y se eliminan pasos del proceso (Ferhat et al., 2005).

La combinación de calor de microondas y destilación seca es una reciente técnica desarrollada a condiciones atmosféricas sin adicionar ningún solvente o agua, provee una nueva herramienta en la extracción de compuestos volátiles desde plantas frescas o previo humedecimiento de materiales secos, haciendo la técnica más simple, rápida y económica. En este tipo de extracción sin solvente se puede adicionar algún medio sólido como son los polvos carbonilos (Wang et al., 2006) con buena estabilidad química para que la muestra absorba las microondas.

La aplicación de microondas focalizadas y ultrasonido a través de una sonda es una excelente alternativa para obtener extractos naturales de vainilla en periodos cortos de tiempo, comparado con los procedimientos que se utilizan en la actualidad (Valdez y Cañizares, 2007). En esta investigación se utilizaron las microondas y sonicación para beneficiar los frutos de vainilla.

## **6. HIPÓTESIS**

El marchitado de frutos de vainilla con inmersión en agua y aplicación de ultrasonido-microondas provoca el rompimiento de la pared celular y pone en contacto los sustratos precursores de la vainillina.

## **7. OBJETIVOS**

### **7.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto de ultrasonido-microondas en el beneficiado de vainilla

### **7.2 Objetivos específicos**

- 1.- Evaluar el efecto de microondas en el secado de la vaina.
- 2.- Evaluar el efecto de ultrasonido-microondas en el marchitado de la vaina.
- 3.- Cuantificar el contenido de vainillina durante el proceso de beneficiado.
- 4.- Determinar la relación  $\beta$ -glucosidasa-vainillina en el proceso de beneficiado.

## 8. METODOLOGÍA

### 8.1 Materiales y métodos

Los frutos de vainilla se colectaron a la madurez fisiológica, en la comunidad de Nuevo Progreso, San Juan Colorado, Oaxaca; se seleccionaron de acuerdo a criterios de calidad en tamaño uniforme, sin defectos, manchas y fisuras. Se transportaron al laboratorio de bioquímica del CIIDIR-OAX. a condiciones ambientales y se evaluaron las propiedades físicas de las vainas verdes utilizadas, como color, peso, humedad, longitud, diámetro y pH, posteriormente se procedió a realizar las pruebas y análisis correspondientes en dos periodos anuales de cosecha, 2007 y 2008.

Para la validación del método de beneficiado con el uso de energías alternas (Figura 13), en el periodo 1 se establecieron las técnicas para cuantificar vainillina, se determinó la etapa más importante a los 20 días de beneficiado y se dominó el proceso de experimentación; en el periodo 2 se cambiaron las condiciones de experimentación para hacer mas eficiente el beneficio, durante un mes y medio se analizó el porcentaje de vainillina generado y la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa. La limitante para realizar análisis del beneficio durante todo el año es la cosecha anual de vainilla.

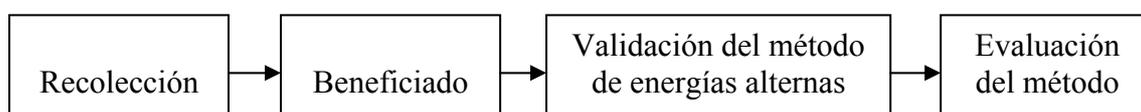


Figura 13. Proceso general para validar el beneficio con energías alternas.

### 8.2 Beneficiado tradicional

El marchitado T de vainas se realizó por sumersión en agua a 63 °C durante tres minutos, después se dejaron sudar a 38°C por 24 horas envueltas en tela de algodón y bolsas de polietileno de alta densidad, enseguida se dejan secar en un horno libre de humedad a la temperatura de sudado hasta que pierdan dos terceras partes de su peso, finalmente en el acondicionado se colocaron por un mes y medio en envases herméticos para que no cambiaran sus propiedades del fruto tratado.

### 8.3 Diseño de experimento periodo 1

En este periodo se analizaron dos lotes de producción del mismo cultivo en dos fechas diferentes de cosecha, uno del 20 de noviembre y otro del 15 de diciembre del año 2007; se analizaron las etapas de marchitado y sudado, porque son las que requieren mayor manejo y control, para que las vainas desarrollen la mayor cantidad de vainillina. Se marchitaron las vainas de forma T,  $MO_{H_2O}$ , MO, S, combinaciones  $SMO_{H_2O}$ , SMO y se secaron de manera C y con MO; se mantuvo constante el sudado y acondicionado como lo indica el beneficiado T. Para conocer los efectos provocados a las vainas en el periodo 1, se analizó el rendimiento de vainillina en vainas verdes y procesadas a los 20 días de beneficio (Figura 14 y tabla 3).

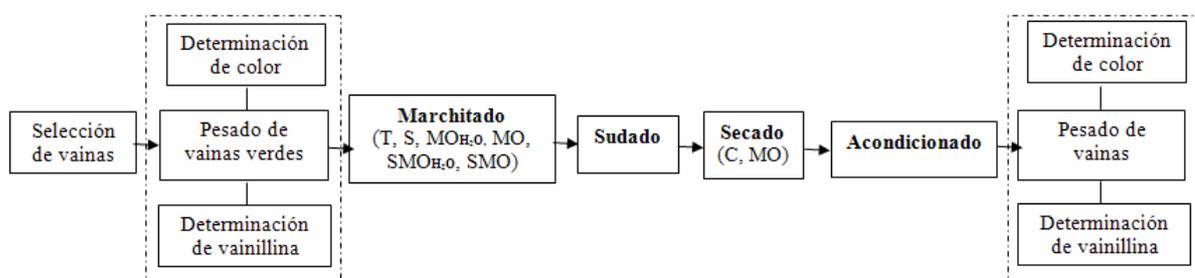


Figura14. Diagrama de experimentación periodo 1.

Tabla 3. Experimentos del periodo 1.

No.	Tratamiento de marchitado	Tratamiento de secado
1	T	C
2	S	C
3	S	MO
4	$MO_{H_2O}$	C
5	$MO_{H_2O}$	MO
6	MO	C
7	MO	MO
8	S $MO_{H_2O}$	C
9	S $MO_{H_2O}$	MO
10	SMO	C
11	SMO	MO

Para marchitar en seco con microondas se siguió el siguiente procedimiento indirecto: Se colocó dentro de un horno de microondas (Samsung MW8574W), 40 ml de agua en un matraz de 50 ml, que fue utilizado como sensor de temperatura; enseguida se introdujeron las vainas húmedas, sin sellar herméticamente el recipiente y se aplicaron radiaciones por 20 segundos, hasta alcanzar 63°C.

### 8.3.1 Proceso desarrollado periodo 1

Las vainas maduras de dos lotes de producción del mismo cultivo cosechadas en dos fechas diferentes del mismo año, se marchitaron por separado a 60 °C por tres minutos en baño de agua de manera T (Figura 15a), S (Figura 15b; baño ultrasónico de 70 W Cole-Parmer 8890, limpiador ultrasónico), MO (Figura 15c), MO<sub>H<sub>2</sub>O</sub> (Figura 15d ), combinaciones SMO<sub>H<sub>2</sub>O</sub> y SMO; posteriormente se dejaron sudar de acuerdo al beneficiado T; después se secaron de manera C en una estufa (Riossa No. 181932, serie ECML, 90 Watts, ciclos 50/60) y por microondas de 100 W de potencia a 38 °C hasta perder el 70% de su peso en ambos tratamientos. El acondicionado se mantuvo constante de acuerdo al beneficiado T.

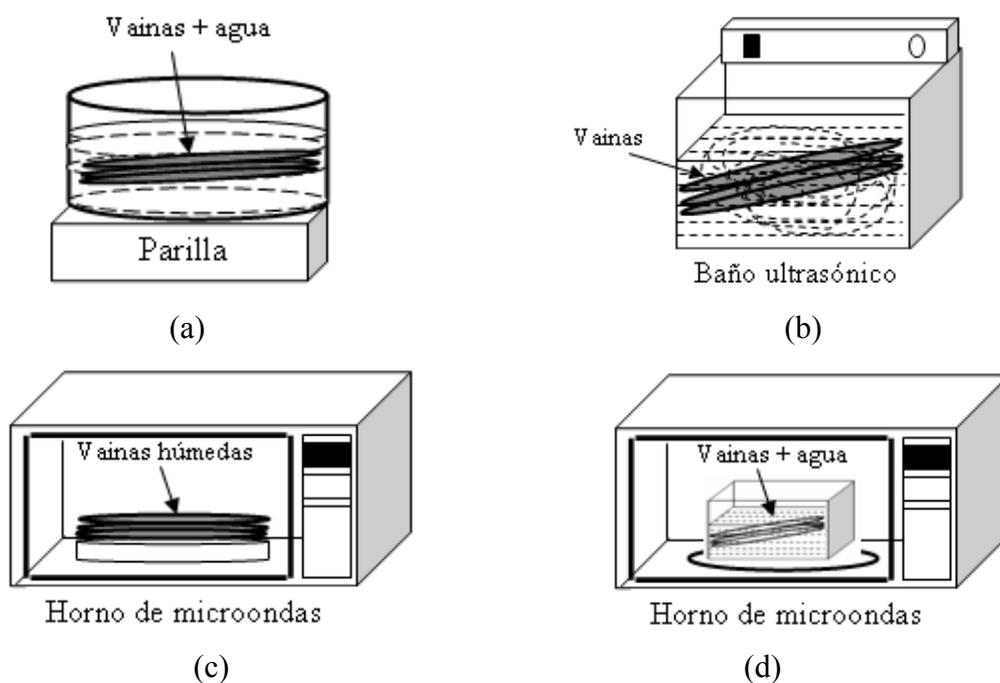


Figura 15. Marchitado de vainas.

En el marchitado con MO<sub>H<sub>2</sub>O</sub> las vainas se sumergieron en un recipiente de plástico con agua (1:10 relación peso:volumen) y, en el de MO se humedecieron las muestras y se colocaron sobre el plato del horno; se aplicaron radiaciones en ambos tratamientos hasta alcanzar 60 °C, posteriormente se dejaron reposar las muestras en su medio por tres minutos. Para el sistema MO se colocó en un vaso de precipitado una cantidad de agua similar al peso de muestra a marchitar, para monitorear la temperatura.

En la combinación de marchitado  $\text{SMOH}_2\text{O}$  y SMO se aplicó sonicación a  $25\text{ }^\circ\text{C}$  por 3 minutos y posteriormente se procedió a marchitar con las mismas condiciones de irradiación mencionadas anteriormente. Al secar las vainas con MO se aplicaron radiaciones hasta alcanzar de  $38$  a  $40\text{ }^\circ\text{C}$  y se dejó enfriar a  $30\text{ }^\circ\text{C}$ . Se realizó la misma operación hasta lograr perder el 70% de su peso. En cada tratamiento de beneficiado se usaron 3 vainas, en total, para los once experimentos realizados por triplicado se utilizaron 99 vainas con un peso aproximado de 1.32 kilogramos de muestra.

En este periodo se analizó el cambio de color, porcentaje de humedad y pH de vainas verdes a vainas beneficiadas; también se determinó el porcentaje de vainillina a los 20 días de tratamiento. Se controló la potencia, la radiación de sonicación, el tiempo de irradiación, tiempo de marchitado, temperatura de marchitado, tipo de secado, temperatura de secado y tipo de marchitado en los diferentes tratamientos.

## 8.4 Diseño de experimento periodo 2

En este periodo se estableció un diseño experimental factorial con cuatro variables a 2 niveles (tabla 4), se varió el tipo de marchitado y se dejaron constantes las demás etapas que se sustituyeron por la horneado. Las vainas se marchitaron con diferentes tratamientos T, S, MO<sub>H<sub>2</sub>O</sub> y MO, posteriormente se aplicó un posmarchitado en S a 38°C de 0, 5, 10 y 15 minutos.

Tabla 4. Experimentación factorial 4<sup>2</sup> propuesta, con cuatro variables a 2 niveles.

No.	Marchitado a 60 °C			Sonicación 3 min.	Pos-marchitado en sonicación a 38°C				Nomenclatura
	Tradicional t= 3 min.	Microondas			0	5	10	15	
		Con agua 2.5 min.	Sin agua 45 s						
1	x				x				T0
2	x					x			T5
3	x						x		T10
4	x							x	T15
5		x			x				MO <sub>H<sub>2</sub>O</sub> 0
6		x				x			MO <sub>H<sub>2</sub>O</sub> 5
7		x					x		MO <sub>H<sub>2</sub>O</sub> 10
8		x						x	MO <sub>H<sub>2</sub>O</sub> 15
9			x		x				MO0
10			x			x			MO5
11			x				x		MO10
12			x					x	MO15
13				x	x				S0
14				x		x			S5
15				x			x		S10
16				x				x	S15

**Nota:** Las etapas de sudado, secado y acondicionado se mantuvieron constantes.

Las vainas verdes y tratadas se sometieron a diferentes análisis para determinar los cambios producidos en el marchitado y posmarchitado; durante el horneado solamente se analizó la actividad de la β-glucosidasa y el rendimiento de vainillina cada diez días durante un mes y medio de beneficio (Figura 16).

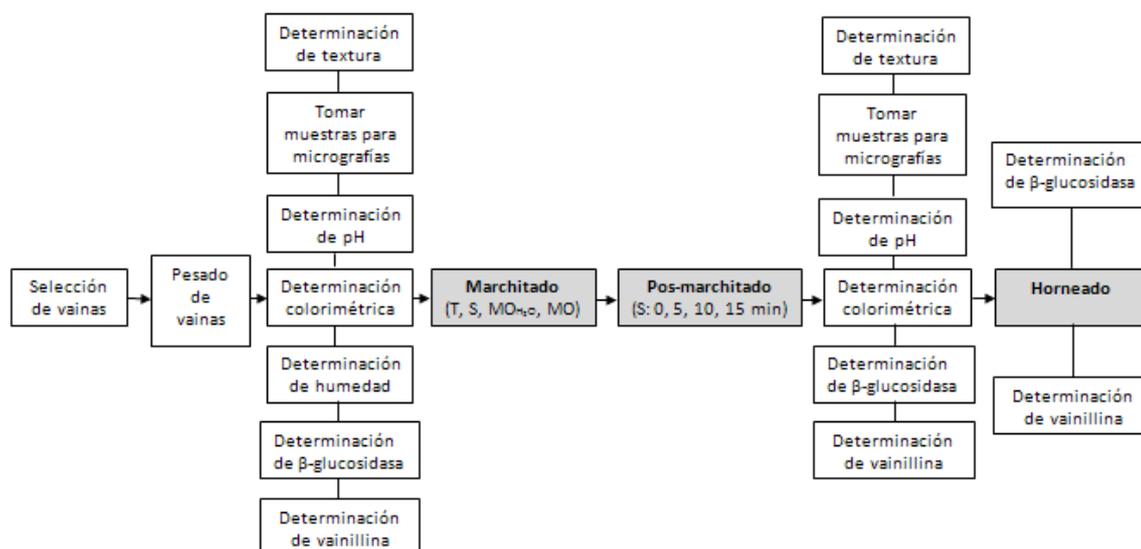


Figura 16. Diagrama de experimentación periodo 2.

Para analizar el porcentaje de vainillina y la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa, la muestra de vainas de cada experimento, se dividió en dos partes, una de ellas se utilizó para determinar vainillina y la otra para cuantificar la enzima. El número de vainas utilizadas en todos los análisis de este periodo se describen en la tabla 5.

Tabla 5. Cantidad de muestra utilizada en el periodo 2.

Concepto	Total
Vainas para cada experimento	3
Número de experimentos	16
Total de experimentos por triplicado	48
Número de extracciones	5 (Cada 10 días después del marchitado)
Extracciones totales	240 para vainillina 240 para $\beta$ -glucosidasa
Vainas totales	720
Vainas promedio por kg	75
Kg totales de vainas	9.6 + 1.4 extras: 11 kg

#### **8.4. 1 Proceso desarrollado periodo 2**

Se aplicó un marchitado y un pos marchitado a las vainas verdes de vainilla, las etapas de sudado, secado y acondicionado se redujeron a la de horneado, donde las muestras se envolvieron en bolsas de polietileno de alta densidad en una estufa a 38°C. El marchitado se realizó de manera T, MO<sub>H<sub>2</sub>O</sub>, MO y S; el pos marchitado se llevó a cabo en sonicación a 38°C por espacio de 0, 5, 10 y 15 minutos en un baño ultrasónico de 70 W. Se realizaron los análisis correspondientes durante un mes y medio, para evaluar la evolución de la β-glucosidasa y vainillina.

En el marchitado T las vainas se sumergieron en agua durante tres minutos; con MO<sub>H<sub>2</sub>O</sub> se depositaron en agua y se aplicó radiación durante dos minutos y medio, dejándolas reposar en el medio por tres minutos más; con MO las muestras se humedecieron y se aplicó radiaciones por 30 segundos, cuidando que existiera buen contacto con las microondas. En S se colocó agua a 60°C en el baño ultrasónico y después se depositaron las vainas en el interior y se aplicó radiación por tres minutos.

Para complementar el efecto de irradiación de microondas y sonicación se realizaron marchitados a 60°C y 38°C en un equipo de microondas focalizadas (MF) (Maxidigest Mx 350W) y en una sonda de sonicación (12 mm de diámetro, 400 W, Branson Digital Sonifier) a diferentes potencias. Se aplicó radiación de MF durante 2 minutos al 70% y 1 minuto al 45% con 3 minutos más al 10% en cada caso, para alcanzar y mantener los 60°C y 38°C respectivamente, se irradió 3 minutos de sonicación con la sonda al 90% y 65%, controlando manualmente los 60 °C y 38°C en las dos potencias, después las vainas se sometieron a horneado como se menciona en el periodo 2.

En este periodo se analizó la textura y ruptura celular de vainas verdes y frutos beneficiados, también se evaluó el porcentaje de vainillina y la actividad de la β-glucosidasa cada 10 días de beneficio durante un periodo de 40 días. Se controló la radiación de microondas casero y MF, la radiación de sonicación con la sonda ultrasónica, el tiempo de irradiación en el marchitado, el tiempo de sonicación en el posmarchitado, la temperatura de marchitado y posmarchitado, el tiempo de beneficio, el tipo de secado, la temperatura de secado, las etapas de beneficio y el tipo de marchitado en los diferentes tratamientos.

## 8.5 Técnicas de análisis

### 8.5.1 Prueba colorimétrica

Se analizaron vainas verdes y procesadas, con el colorímetro MiniScan by Hunterlab (Figura 17). Se calibró el equipo con una teja blanca y una trampa de luz integradas al mismo, después se hicieron las lecturas por paquetes de tres vainas para cubrir la superficie del lector del equipo. Los valores adimensionales de calibración en color, se muestran en la tabla 6; la L define la claridad, a denota el valor rojo/verde y b el valor amarillo/azul, según lo indica la figura 18.



Figura 17. Equipo MiniScan by Hunterlab.

Tabla 6. Valores de calibración para determinar color.

Valor adimensional	objeto blanco	objeto negro
L	91.57	21.32
a	-0.86	0.06
b	-0.61	-2.3

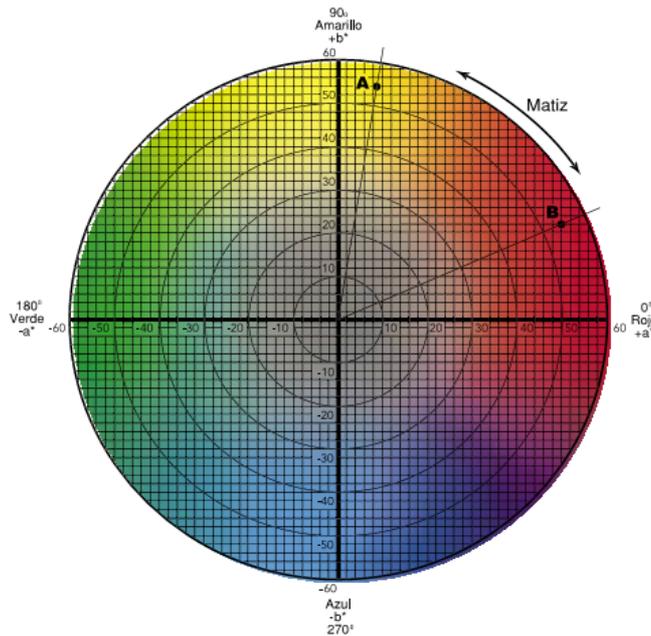


Figura 18. Gráfica para determinar color.

### 8.5.2 Determinación de humedad

El análisis se efectuó por triplicado, se colocaron las cápsulas de porcelana durante una hora en la estufa a 100°C, después se dejaron reposar por 45 minutos en el desecador, al término del enfriamiento se pesaron las cápsulas con una aproximación de 0.1 mg (m1). En la estufa a 105 °C x 5 horas se colocó la cápsula a peso constante con 5 g de muestra previamente homogeneizada (m2), después se dejó enfriar en el desecador por 45 minutos; el procedimiento de secado se repitió por una hora adicional, hasta que las variaciones de peso no excedieron de 5 mg (m3). Para determinar el porcentaje de humedad se utilizó la ecuación 1.

$$\% \text{ Humedad} = \frac{m2 - m3}{m2 - m1} \times 100 \quad (1)$$

### 8.5.3 Análisis de pH

Se lavó con agua destilada el sensor del potenciómetro y se limpió con papel desechable, después se colocó el sensor en la solución buffer pH 7 y se tomó la lectura, enseguida se sacó el sensor de la solución y se volvió a limpiar; la operación se repitió con la solución buffer pH 4, después se tomaron las lecturas correspondientes de pH en el interior de cada vaina.

### 8.5.4 Análisis de vainillina

#### Curva de calibración:

Para analizar la cantidad de vainillina generada en cada experimento se elaboró una curva de calibración, con diluciones de vainillina sintética grado farmacéutico de 0.001-0.007 g/L, obtenidas de una solución patrón de 1.0 g/L en etanol absoluto (Cañizares et al., 2004); se colocó una alícuota de la solución patrón en un matraz volumétrico de 50 mL, se adicionó 5 mL de solución buffer Britton-Robinson de pH 2.87 y 5 mL de etanol absoluto, se aforó con agua bidestilada. La absorbancia de la vainillina se midió en el espectrofotómetro Shimadzu UV-1601 UV-Visible, con respecto al blanco a una longitud de onda de 278 nm.

La solución buffer pH 2.87 Britton-Robinson, se compone de volúmenes 1:1:1 de ácido bórico 0.04 M, ácido acético 0.04 M y ácido fosfórico 0.04 M, ajustado a pH 2.87 con NaOH 0.2 M (Yungnian, et al., 2005).

#### **Extracción de vainillina de las vainas beneficiadas:**

30 g de vainas cortadas finamente se colocaron en 50 mL de etanol absoluto (u otra relación proporcional) en un recipiente de plástico con tapa rosca de 100 mL, se dejó reposar por 24 horas para después separar el líquido del sólido; 100  $\mu$ L del extracto se diluyeron en un matraz volumétrico de 50 mL con etanol absoluto, solución Britton-Robinson pH 2.87 y agua destilada mencionada en el procedimiento de la curva de calibración. Posteriormente, se midió la absorbancia del extracto.

#### **8.5.5 Cuantificación de la actividad enzimática $\beta$ -glucosidasa (Damme y Reumans, 1991; Odoux, et al., 2006).**

Se realizó una curva de calibración con diluciones de  $1 \times 10^{-4}$  a  $1 \times 10^{-6}$  M obtenidas de una solución madre de *p*-nitrofenol ( $\text{NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$ ) 0.1M, se midió la absorbancia a 400 nm en el espectrofotómetro utilizado en la determinación de vainillina. Para extraer la enzima se cortaron las vainas finamente y se agregó fosfato de sodio 0.1 M de pH 7 en relación peso:volumen (1:10), se dejó reposar por un minuto y se filtró la pulpa obtenida a través del papel filtro whatman No. 42 (125 mm  $\varnothing$ ); 50  $\mu$ L del filtrado se diluyeron en 10 mL de la misma solución de fosfato. 500  $\mu$ L de la dilución obtenida y 500  $\mu$ L del sustrato *p*-nitrofenil- $\beta$ -glucopiranosido 4 Mm se incubaron durante 20 minutos a 40 °C, la reacción se detuvo con 2.5 mL de hidróxido de sodio 0.5 M; inmediatamente se midió la absorbancia a la longitud de onda de la curva de calibración de *p*-nitrofenol. Para obtener el blanco de referencia se mezcló 4 mL del buffer de fosfato de sodio 0.1 M y 10 mL de NaOH 0.5 M. Los resultados se expresan como nkatal por gramo de vaina fresca (1 nkatal de actividad de  $\beta$ -glucosidasa es la cantidad de enzima que hidroliza 1 nmol de sustrato por segundo a pH 7 y 40 °C).

### 8.5.6 Determinación de textura (Arámbula-Villa, et al., 2004).

Con el penetrómetro Precision Scientific Cat. 73510, No. de serie BD-12, se midió la textura como porcentaje de penetración en las vainas de madurez fisiológica y las procesadas; se colocó la fruta de vainilla en el centro de la base del equipo y se dejó caer rápidamente el dispositivo de penetración en la parte media de la vaina. Se utilizó la ecuación 2 para determinar esta variable, donde: L representa la lectura del instrumento, DM el diámetro de la muestra, A la altura del penetrómetro,  $\Delta X$  la distancia penetrada y  $\Delta X/DM$  el porcentaje de penetración (Figura 19).

$$\Delta X = L + DM - A \quad (2)$$

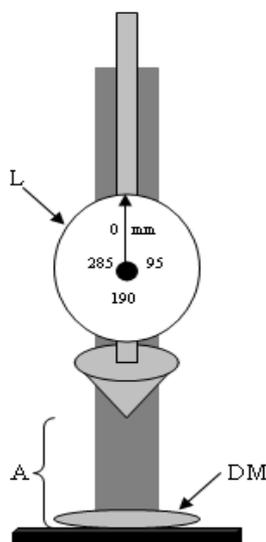


Figura 19. Dispositivo de penetración.

### 8.5.7 Estimación de ruptura celular

Se usó un microscopio electrónico Axiolab de Carl Zeiss para campo claro con cámara fotográfica. Cortes finos transversales de las vainas más representativas de los diferentes experimentos, se depositaron entre un cubre y un porta objetos con agua destilada ó aceite de inmersión. Las micrografías tomadas con diferentes acercamientos de objetivos, se utilizaron para determinar de manera cualitativa los daños celulares.

Para comparar los daños provocados a las estructuras celulares por los diferentes métodos de beneficio, se tomaron como referencia las micrografías de las vainas verdes y las procesadas con S0 y S15, que son los tratamientos más representativos para observar los efectos de sonicación en los frutos de vainilla.

## 9. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 9.1 Caracterización fisicoquímica de vainas para los dos periodos de cosecha

En los dos periodos de cosecha, para los diferentes tratamientos, las vainas se seleccionaron de acuerdo a las características de calidad como grosor, color, uniformidad, tamaño, madurez, sin manchas y sin fisuras; se midieron las propiedades fisicoquímicas en vainas de madurez fisiológica y en vainas procesadas (tabla 7).

En el periodo 1 de cosecha, como no se tenía dominado el proceso, solo se determinó la etapa mas importante en el beneficiado de vainilla; en el periodo 2 se aplicaron diferentes formas de marchitado con variación en el tiempo de pos-marchitado y se determinó la textura, relación vainillina- $\beta$ -glucosidasa y el mejor tratamiento de beneficio propuesto.

Tabla 7. Propiedades fisicoquímicas de las vainas utilizadas en los dos periodos de cosecha.

<b>Característica</b>	<b>Verde</b>	<b>Beneficiada</b>
Color:		
L	35.67 $\pm$ 4.62	15.32 $\pm$ 2.9
a	-5.70 $\pm$ 0.84	0.42 $\pm$ 0.09
b	17.14 $\pm$ 2.90	7.34 $\pm$ 0.89
Peso (g)	17.61 $\pm$ 2.70	5.98 $\pm$ 0.09
Humedad (%)	84.11 $\pm$ 1.53	16.05 $\pm$ 0.48
Longitud (cm)	16.71 $\pm$ 2.86	16.05 $\pm$ 2.01
Diámetro (cm)	0.9682 $\pm$ 0.22	0.82 $\pm$ 0.19
pH	5.12 $\pm$ 0.19	5.08 $\pm$ 0.24

Las vainas beneficiadas perdieron el 66 % de su peso en humedad y disminuyeron su claridad en un 57.05%. La variación en color y pH en las vainas tratadas fueron mínimos en todos los tratamientos, por lo que no fue necesario aplicar un estudio estadístico para determinar el efecto de los mismos sobre el rendimiento de vainillina.

## 9.2 Periodo 1

### 9.2.1 Prueba espectrofotométrica

En el periodo 1, se estableció la relación entre concentración de extractos obtenidos en los diferentes tratamientos y el porcentaje de vainillina en frutos de vainilla beneficiadas. Se tomó como base teórica el rendimiento promedio del 3% en el rendimiento de vainillina por cada cien gramos de vaina beneficiada (Waliszewski et al., 2007); lo cual indica que se necesitan 600 g de vaina tratada (Figura 20) por cada litro de etanol absoluto para obtener una concentración patrón aproximada de 18g/L y realizar diluciones en el rango de la curva de calibración, como lo indica la técnica de Yungnian, et al., (2005) y Caziñares et al., (2004).



Figura 20. Vainilla beneficiada

De la curva de calibración se obtuvo una relación directamente proporcional entre la concentración de extractos diluidos y el porcentaje de vainillina por cada 100 gramos de vaina beneficiada. Del extracto concentrado de 18 g/L se realizó la dilución de 0.0036 g/L, como lo indica la técnica para determinar vainillina; la solución obtenida se tomó como base para calcular el porcentaje de vainillina de las demás diluciones (tabla 8).

Tabla 8. Relación de extractos diluidos y porcentaje de vainillina en vainas beneficiadas.

<b>Concentración de vainillina de las diluciones g/L</b>	<b>% de vainillina en 100 g de vaina beneficiada</b>
0.001	0.83
0.002	1.66
0.003	2.5
0.0036	3.0
0.004	3.3
0.005	4.16
0.006	5.0
0.007	5.83

Con los valores de absorbancia, se obtuvo la concentración en g/L y porcentaje de vainillina en 100 g de vainas beneficiadas (Tabla 9), con la guía de las tablas 8 y 18 del anexo 12.1.

Tabla 9. Porcentaje de vainillina en vainas beneficiadas en el periodo 1.

Experimento	Absorbancia de vainillina promedio	Concentración de vainillina en las diluciones (g/L)	vainillina (%)
T	0.265±0.012	0.0025	2.05
S-C	0.298±0.011	0.0030	2.46
S-MO	0.226±0.018	0.0020	1.59
MO <sub>H<sub>2</sub>O</sub> -C	0.297±0.031	0.0030	2.45
MO <sub>H<sub>2</sub>O</sub> -MO	0.201±0.006	0.0015	1.28
MO-C	0.276±0.030	0.0026	2.18
MO-MO	0.245±0.046	0.0022	1.82
SMO <sub>H<sub>2</sub>O</sub> -C	0.294±0.023	0.0030	2.4
SMO <sub>H<sub>2</sub>O</sub> -MO	0.215±0.011	0.0018	1.46
SMO-C	0.272±0.051	0.0026	2.14
SMO-MO	0.219±0.021	0.0018	1.51

**Nota:** En el nombre de experimento el guión separa el marchitado y el secado.

En comparación con el método T, los rendimientos más altos de vainillina se obtuvieron con todos los tratamientos de secado convectivo y los más bajos con secado en microondas (Figura 21). Se considera que esta disminución en el secado se debe a la pérdida de compuestos volátiles, como lo menciona Trejo, 2006, debido al contacto directo entre las ondas de microondas y las vainas húmedas.

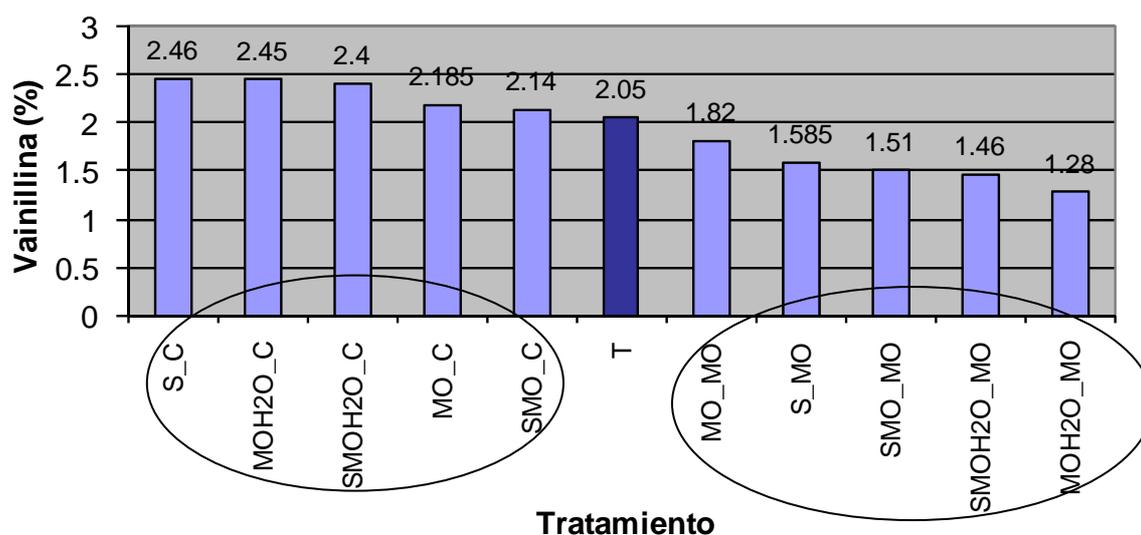


Figura 21. Rendimiento de vainillina en los diferentes tratamientos de beneficiado.

## 9.2.2 Análisis estadístico de la fuente de energía en el secado de vainilla

Se realizó un estudio estadístico para determinar la variabilidad de los rendimientos de vainillina obtenidos con los diferentes métodos de beneficiado. Los tratamientos que presentan mayor variabilidad son MO<sub>H<sub>2</sub>O</sub>-C, MO-C, MO-MO, y SMO-C, como lo muestran los valores de las desviaciones estándar en la Tabla 10 (Figura 22).

Tabla 10. Medias y desviaciones estándar del rendimiento de vainillina.

### Número y tipo de experimento

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<b>Lotes</b>	T	S_C	S_MO	MO <sub>H<sub>2</sub>O</sub> _C	MO <sub>H<sub>2</sub>O</sub> _MO	MO_C	MO_MO	SMO <sub>H<sub>2</sub>O</sub> _C	SMO <sub>H<sub>2</sub>O</sub> _MO	SMO_C	SMO_MO
<b>1</b>	2.53	2.58	1.38	2.8	1.22	3.5	2.3	3.43	1.56	3.69	1.71
<b>2</b>	2.26	2.34	1.79	2.1	1.34	2.87	1.34	3.37	1.36	2.59	1.31
<b>Medias</b>	2.395	2.46	1.585	2.45	1.28	3.185	1.82	3.4	1.46	3.14	1.51
<b>Des. Est.</b>	0.099	0.17	0.29	0.354	0.085	0.445	0.396	0.297	0.141	0.354	0.283

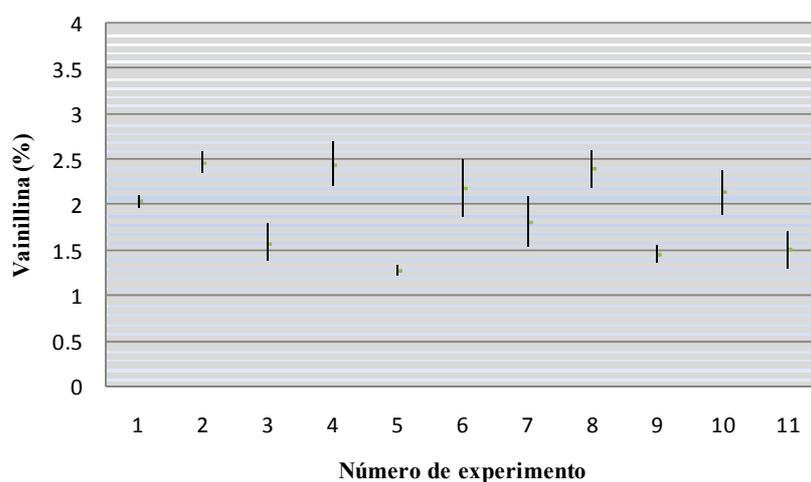


Figura 22. Variabilidad del rendimiento de vainillina (g/100 g de vaina beneficiada).

Para comprobar el efecto de las radiaciones de MO en el secado de frutos de vainilla, se utilizó el programa estadístico STATISTICA y se realizó el análisis de árbol del rendimiento de vainillina en los diferentes tratamientos de beneficio en los dos lotes de experimentación, del periodo 1 (Figura 23).

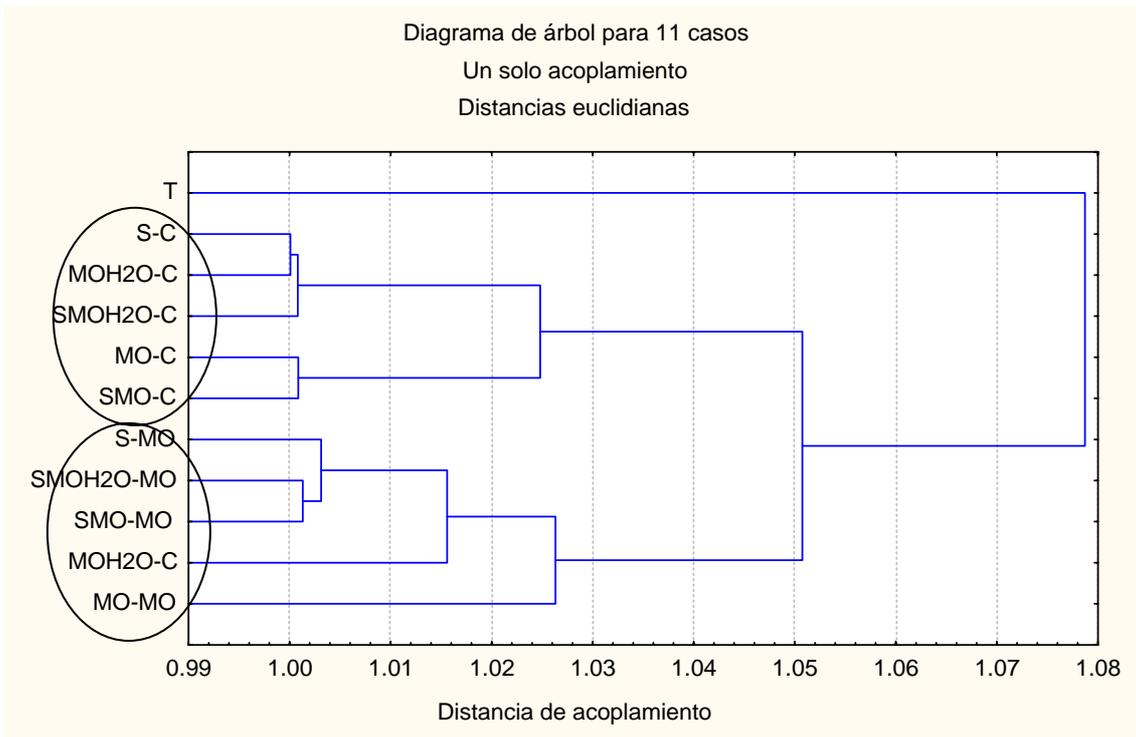


Figura 23. Diagrama de árbol del rendimiento de vainillina del proceso de beneficiado.

En la figura 23 se observan dos grupos de secado uno con tratamientos C y otro con MO, excepto el tratamiento MOH<sub>2</sub>O-C. Se puede considerar que el tipo de secado es determinante en la producción de vainillina de frutos de vainilla, en el periodo 1, el mejor tratamiento de secado para incrementar el rendimiento de vainillina fue de manera convectiva a 40°C.

## 9.3 Periodo 2

### 9.3.1 Efecto de energías alternas en la textura de frutos de vainilla.

Los porcentajes de penetración de las vainas verdes de madurez fisiológicas y de las sometidas a los diferentes tratamientos de marchitado a 60°C y pos-marchitado a 38°C se muestran en la figura 24.

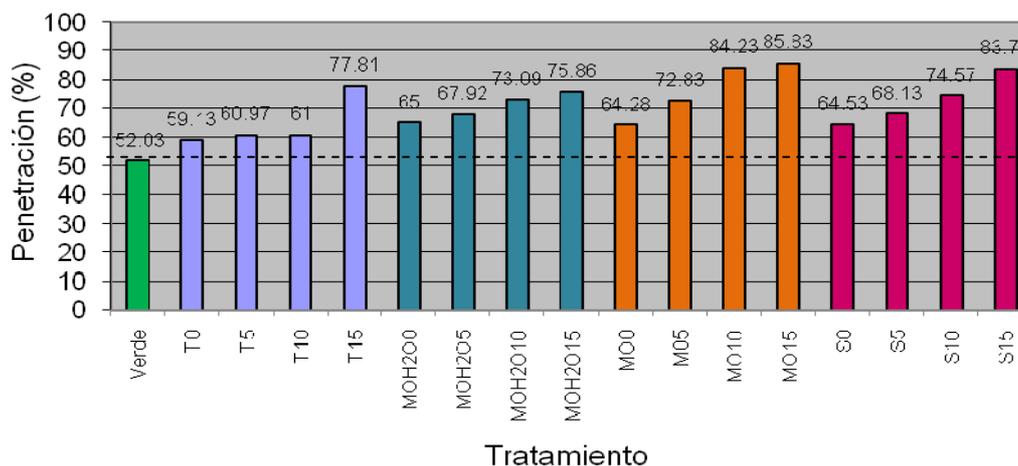


Figura 24. Porcentaje de penetración de vainas verdes y tratadas.

En la figura 24 se observa que el porcentaje de penetración de las vainas marchitadas con todos los tratamientos es mayor al de las vainas verdes y al método T, como se muestra en la tabla 11.

Tabla 11. Porcentajes de penetración de vainas verdes y vainas tratadas.

Tratamiento	Porcentaje de penetración ( $\Delta X/DM$ )	Penetración en relación a vainas verdes (%)	Penetración en relación a T0 (%)
Verde	52.03	-----	-----
T0	59.13	13.65	-----
T5	60.97	17.18	3.11
T10	61	17.24	3.16
T15	77.81	49.55	31.60
MOH200	65	24.93	9.93
MOH205	67.92	30.54	14.87
MOH2010	73.09	40.48	23.61
MOH2015	75.86	45.80	28.30
MO0	64.28	23.54	8.71
MO5	72.83	39.98	23.17
MO10	84.23	61.89	42.45
MO15	85.83	64.96	45.15
S0	64.53	24.02	9.13
S5	68.13	30.94	15.22
S10	74.57	43.32	26.11
S15	83.72	60.91	41.59

Los mayores porcentajes de penetración en las vainas tratadas se alcanzó con MO15, M15, S15 y T15, respectivamente, superiores en un 33.80%, 32.20%, 31.69% y 25.78% al valor alcanzado en las vainas verdes; las menores penetraciones se presentaron en las vainas beneficiadas con T0, T5, T10, MO0, S0 y MO<sub>H<sub>2</sub>O</sub>0, correspondientemente, que representa el 7.10%, 8.94%, 8.97%, 12.50% y 12.97% mayor a la penetración de vainas no tratadas.

De manera general los porcentajes de penetración con MO<sub>H<sub>2</sub>O</sub>, MO y S son mayores que los de marchitado T; se puede considerar que este fenómeno se debe a los daños celulares provocados por la incidencia de ondas de microondas y ultrasonido.

Bourne (1989) indica que el escaldado a temperatura baja por tiempos largos conserva la firmeza del vegetal y Aguilar, et. al., (2000) mencionan que los procesos de escaldado ordinarios a altas temperaturas y corto tiempo provocan mayor pérdida de firmeza en los tejidos vegetales que los realizados por microondas, aunque no menciona las condiciones de experimentación. En los porcentajes de penetración de las vainas mostrados en la figura 24 y tabla 10 no se observa claramente esta relación, se considera que se debe a las condiciones a las que se sometieron las vainas; como tipo, medio y tiempo de permanencia en el marchitado.

Con el marchitado en MO se observó ruptura por explosión de algunas vainas y en todos los tratamientos cuando se aplicó pos-marchitado, se apreciaron diluciones de sustancias derivadas de la vaina, por lo que se estima que los daños producidos a las estructuras celulares provocaron los cambios en la textura de las vainas, de acuerdo a lo que mencionan Hagenson-Doraiswamy, 1998 y Elisandra et al., 2004, citado por Sandoval-Salas, 2005, quienes indican que la sonicación causa erosión, picaduras, agrietamiento de partículas mediante la ruptura de las paredes celulares, incrementa la transferencia de masa, provoca cambios en la permeabilidad de los organelos internos de la célula e incluso favorece la actividad de las enzimas.

### 9.3.2 Micrografías

Se tomaron micrografías de vainas verdes y vainas sometidas a marchitado en baño ultrasónico con 0 y 15 minutos de sonicación en el posmarchitado, para comparar claramente los daños inducidos por las irradiaciones en los tratamientos extremos (Figura 25).

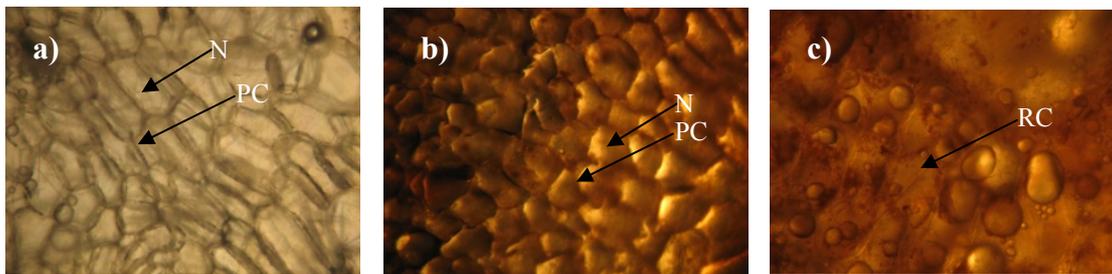


Figura 25. Efecto de sonicación en la estructura celular de frutos de vainilla tomadas con microscopio electrónico lente X10. a) Vaina verde, b) Tratadas con S0 y c) sometidas a S15. PC, Pared celular. RC, Ruptura celular.

En las micrografías podemos observar las estructuras celulares bien definidas de las vainas verdes (Figura 25a) y los daños provocados cuando son sometidas a tratamientos de marchitado en S a 60°C y pos-marchitado a 0 (Figura 25b) y 15 minutos de sonicación (Figura 25c) a 38°C. En las vainas tratadas con S0 no se observan daños intercelulares importantes, mientras que en las sometidas a S15 se nota claramente la desintegración celular provocada por los efectos de irradiación de ultrasonido.

En la guía “Guía 003 Organización Subcelular -Biología Celular”, de la Universidad Andres Bello, (2008), se menciona que la sonicación rompe muchas de las membranas de la célula, incluyendo la membrana plasmática y el retículo endoplásmico, permaneciendo el resto de los componentes celulares intactos; por lo que se estima que al marchitar las vainas se debilitan y fracturan las paredes celulares, y con la aplicación de sonicación se provoca la ruptura del conglomerado celular (Figura 25c) y se ponen en contacto las enzimas y sustratos precursores de vainillina, debido a los daños intracelulares provocados por las ondas de ultrasonido.

### 9.3.3 Actividad de la $\beta$ -glucosidasa y rendimiento de vainillina

La evolución del rendimiento de vainillina y la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa en los diferentes tratamientos con respecto al tiempo se muestran en las figuras 26, 27, 28 y 29.

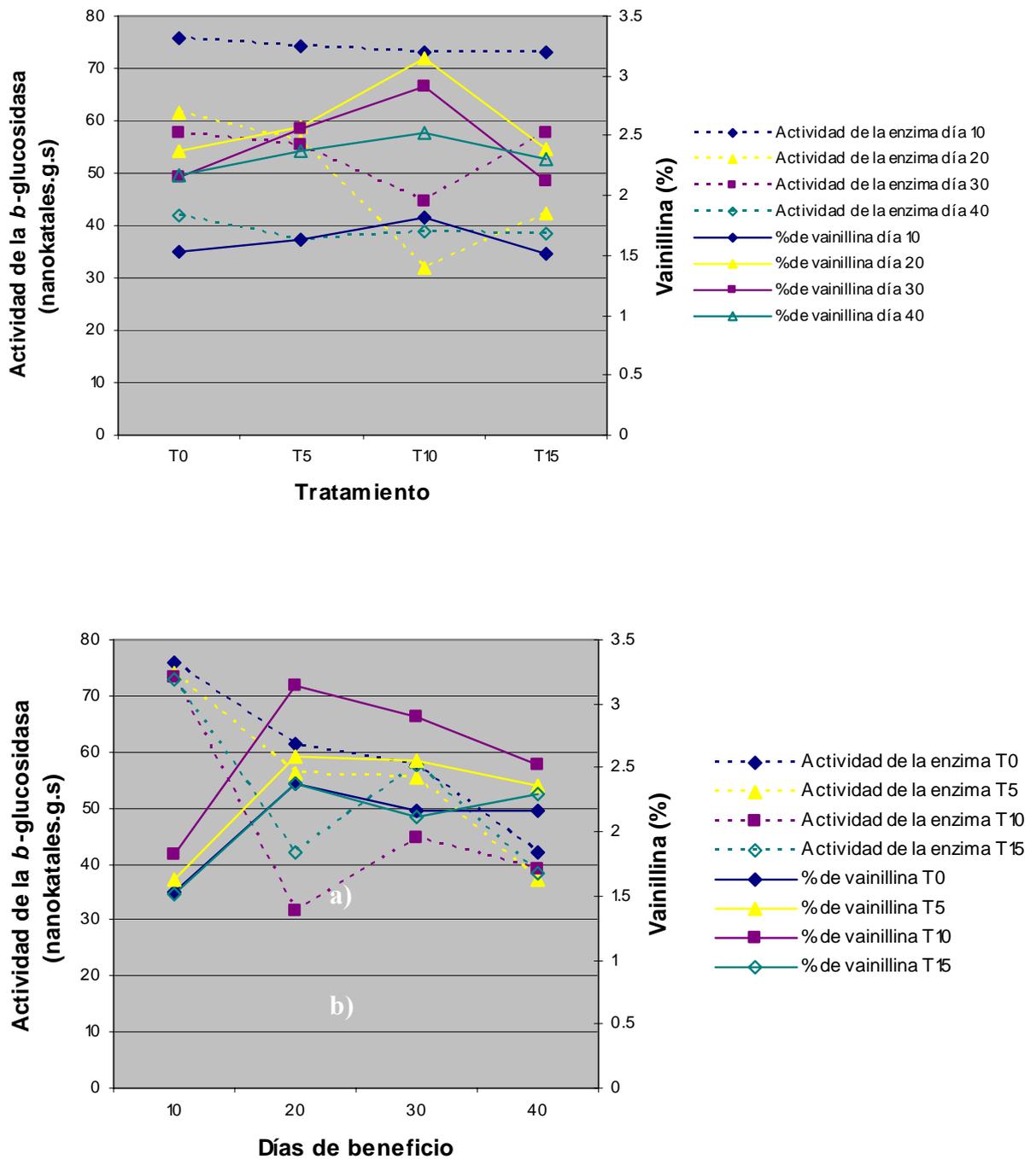


Figura 26. Actividad enzimática y rendimiento de vainillina durante 40 días de beneficio con marchitado T y pos-marchitado con sonicación.

- a) Evolución con respecto al tipo de tratamiento.
- b) Evolución con respecto a los días de beneficio.

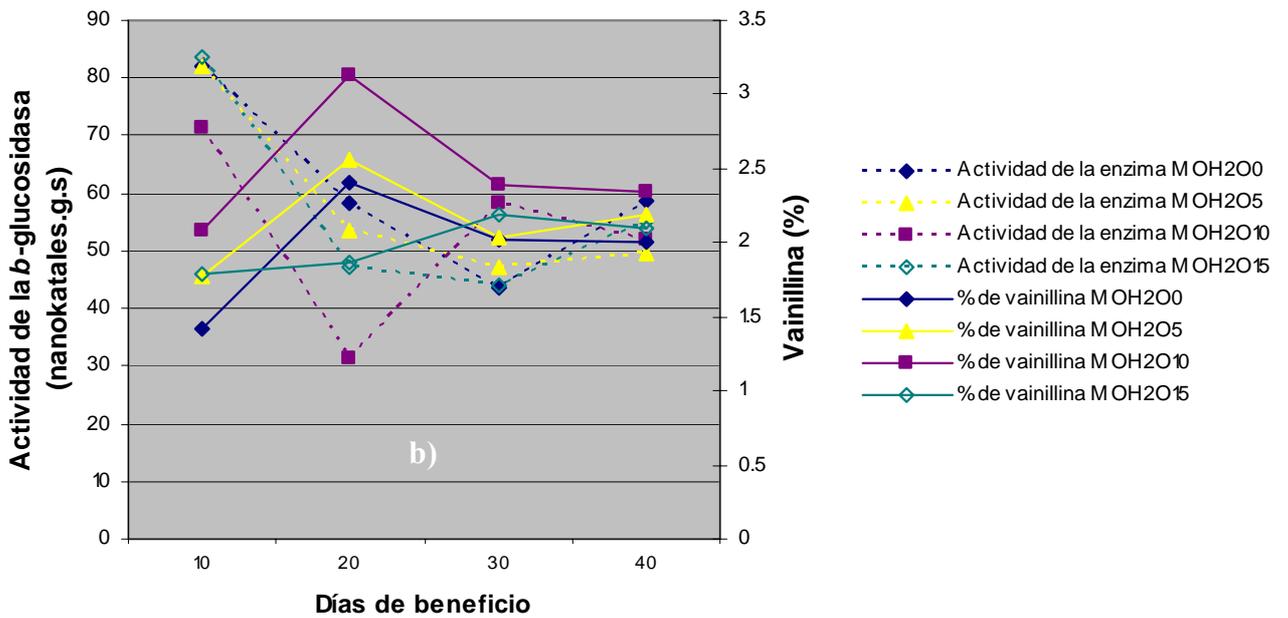
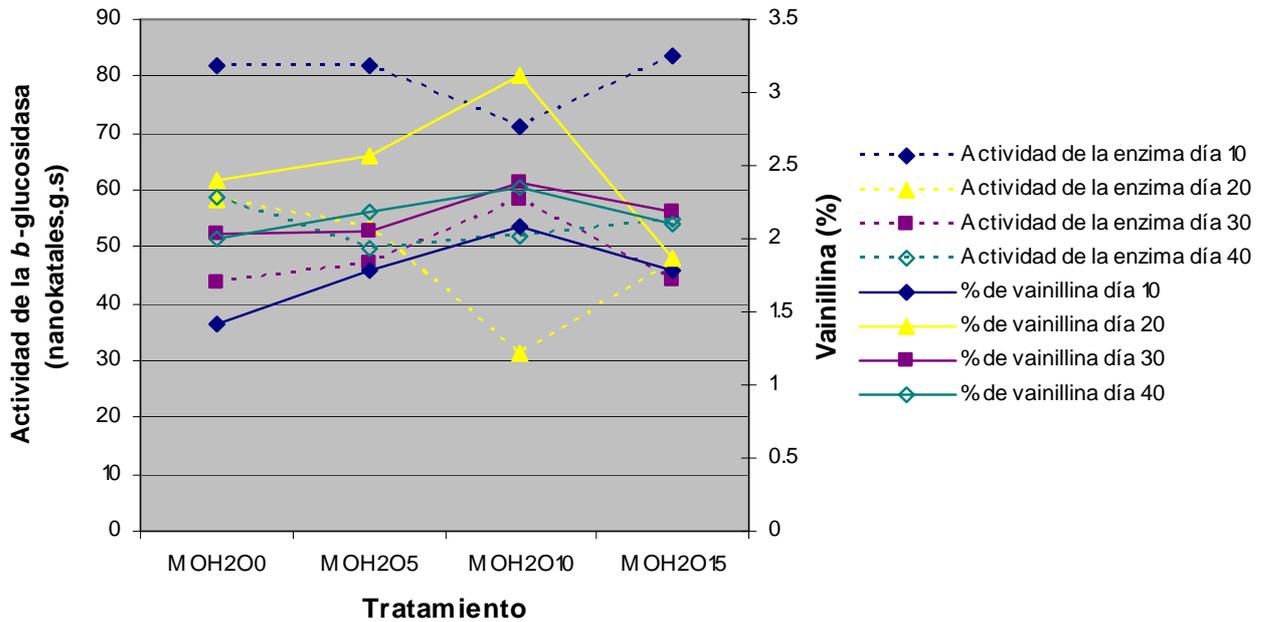


Figura 27. Actividad enzimática y rendimiento de vainillina durante 40 días de beneficio con marchitado en MOH<sub>2</sub>O y pos-marchitado con sonicación.  
 a) Evolución con respecto al tipo de tratamiento.  
 b) Evolución con respecto a los días de beneficio.

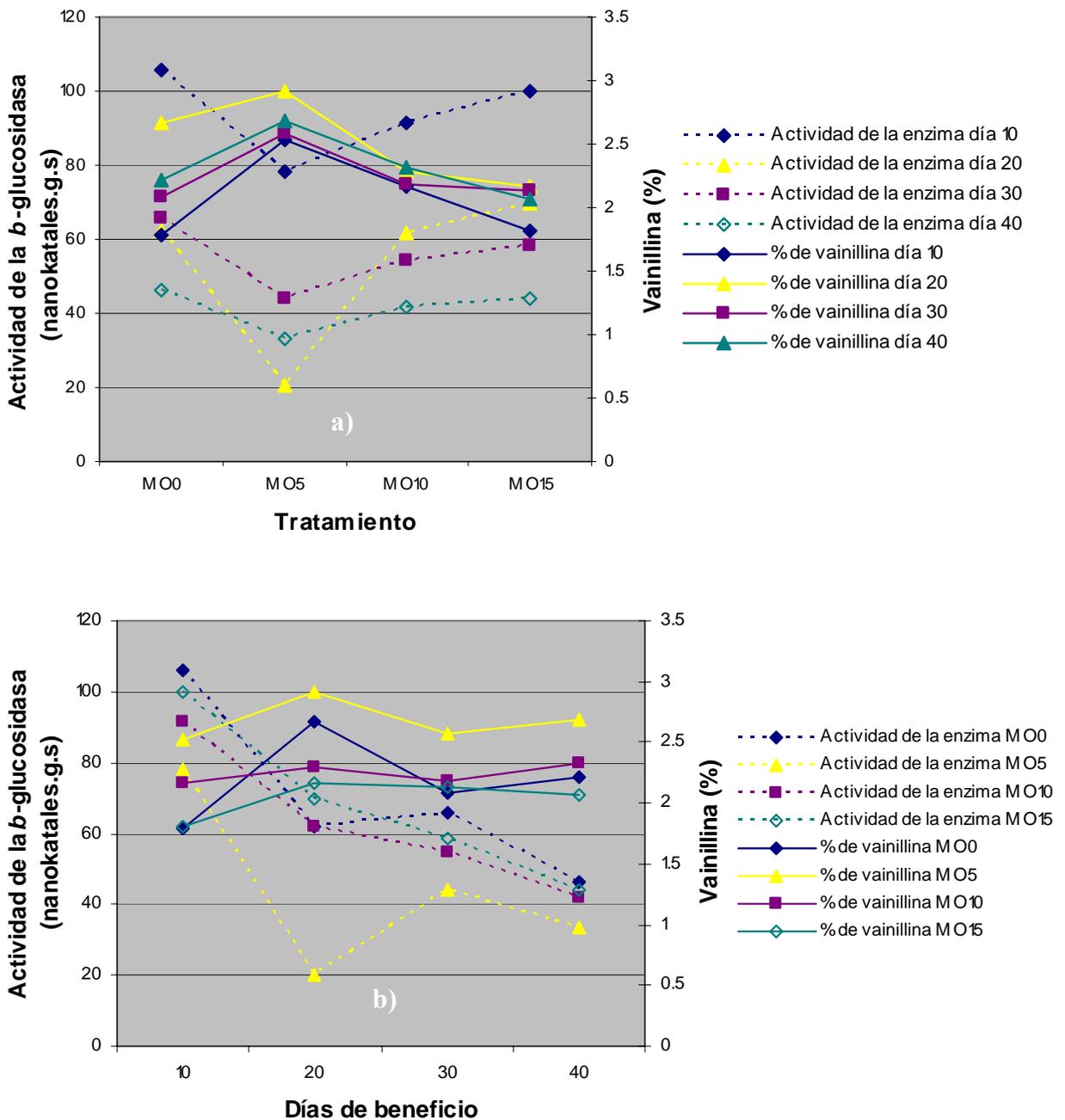


Figura 28. Actividad enzimática y rendimiento de vainillina durante 40 días de beneficio con marchitado en MO y pos-marchitado con sonicación.  
 a) Evolución con respecto al tipo de tratamiento.  
 b) Evolución con respecto a los días de beneficio.

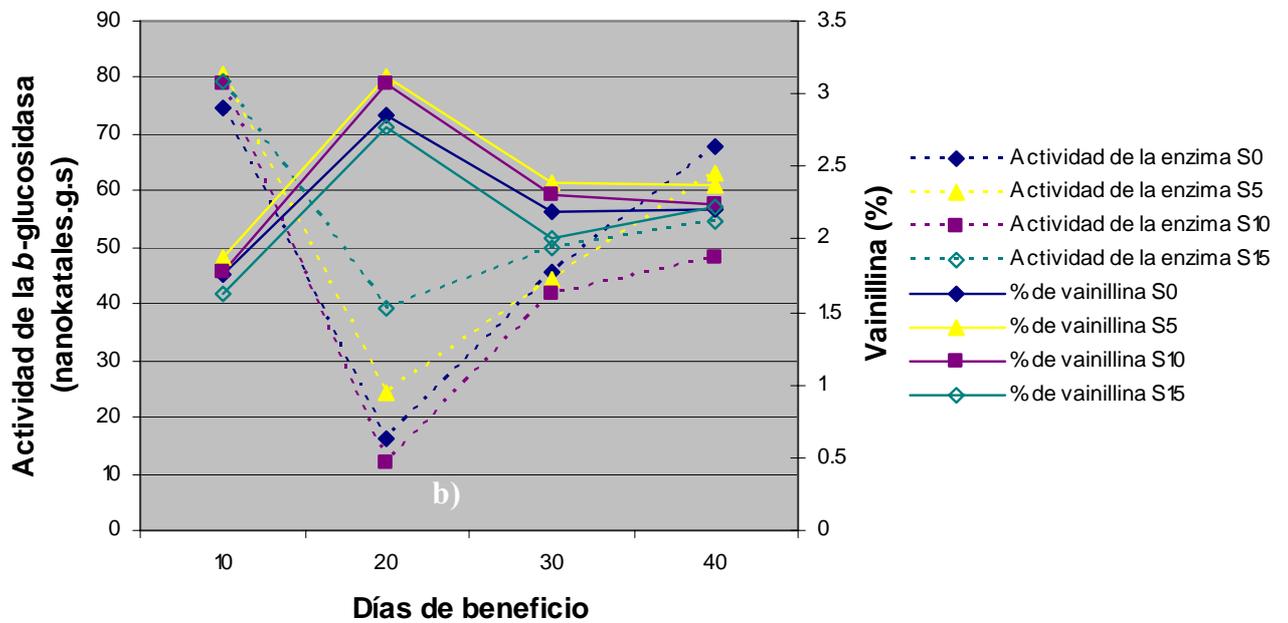
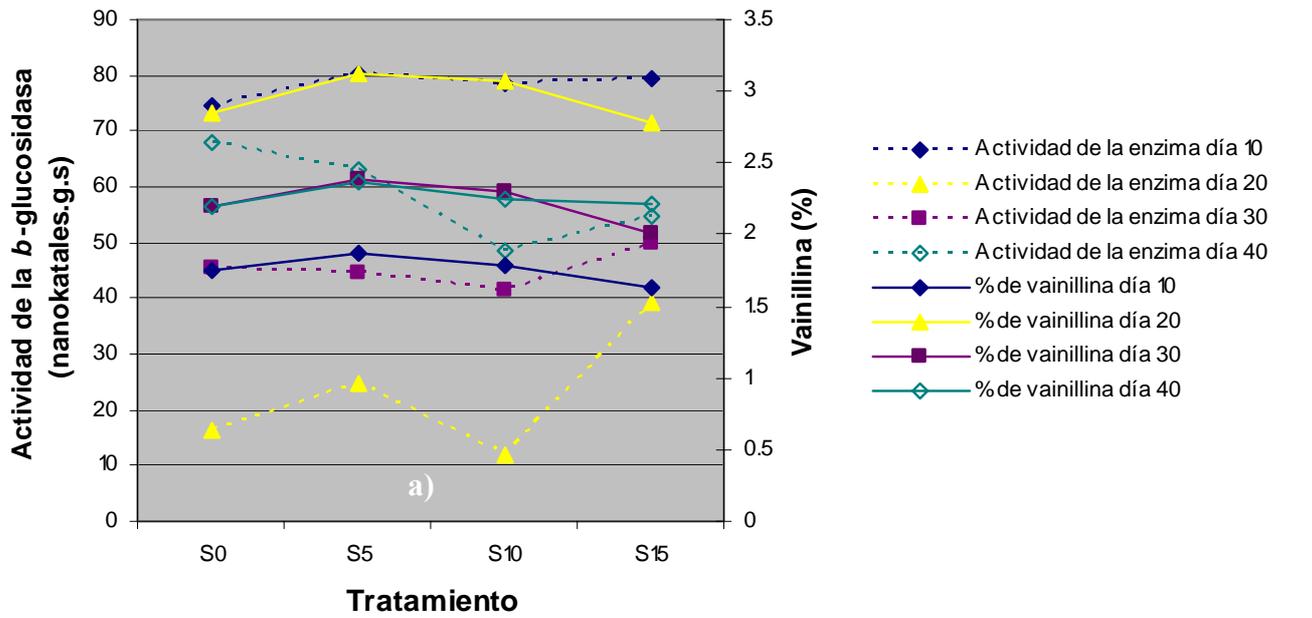


Figura 29. Actividad enzimática y rendimiento de vainillina durante 40 días de beneficio con marchitado en S y pos-marchitado con sonicación.  
 a) Evolución con respecto al tipo de tratamiento.  
 b) Evolución con respecto a los días de beneficio.

En las figuras 26a, 27a, 28a y 29a, se observa el máximo rendimiento de vainillina en todos los tratamientos se obtienen a los 20 días de beneficio con T10, MOH2O10, MO5 y S5; sin embargo, decrece a los 30 y 40 días de beneficio. Viveros (2007) menciona que el decremento en el porcentaje de vainillina se debe a la pérdida de humedad por no estar almacenados en recipientes herméticos y a la volatilidad de alcoholes formados (Pérez-Silva, et al., 2006) con la vainillina presente en las vainas; de igual manera Rosado-Zarrabal, et al., (2007) y Sreedhar, et al., (2007) determinaron que al marchitar las vainas con diferentes tratamientos el porcentaje de humedad, glucovainillina y vainillina disminuyen conforme pasa el tiempo de beneficio.

En las figuras 26b, 27b, 28b y 29b, se observa que al aplicar radiación de sonicación en el pos-marchitado el rendimiento de vainillina aumenta con los tratamientos T10, MOH2O10, MO5 y S5, con respecto a todos los tipos de marchitados con nula sonicación; sin embargo, decrece al aplicar un excedente en el tiempo de sonicación. Arroyo y Flores (2001) mencionan que la sonicación provoca oxidación y la formación de radicales libres, por lo cual se estima que al irradiar más energía de ultrasonido se provocan mayores daños intracelulares que propician otras reacciones bioquímicas indeseables.

Se evaluó la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa y se encontró que es de 1186.11 nanokatales.g.s en vainas verdes y de 11.73 a 125.8 nanokatales.g.s en frutos de vainilla del periodo 2 sometidas a los tratamientos de marchitado y pos-marchitado; similar a los valores reportados por Odoux et al., (2006) y a los estimados por Arana (1943), quien menciona que la actividad más alta de esta enzima se presenta después de los seis o siete meses después de la polinización.

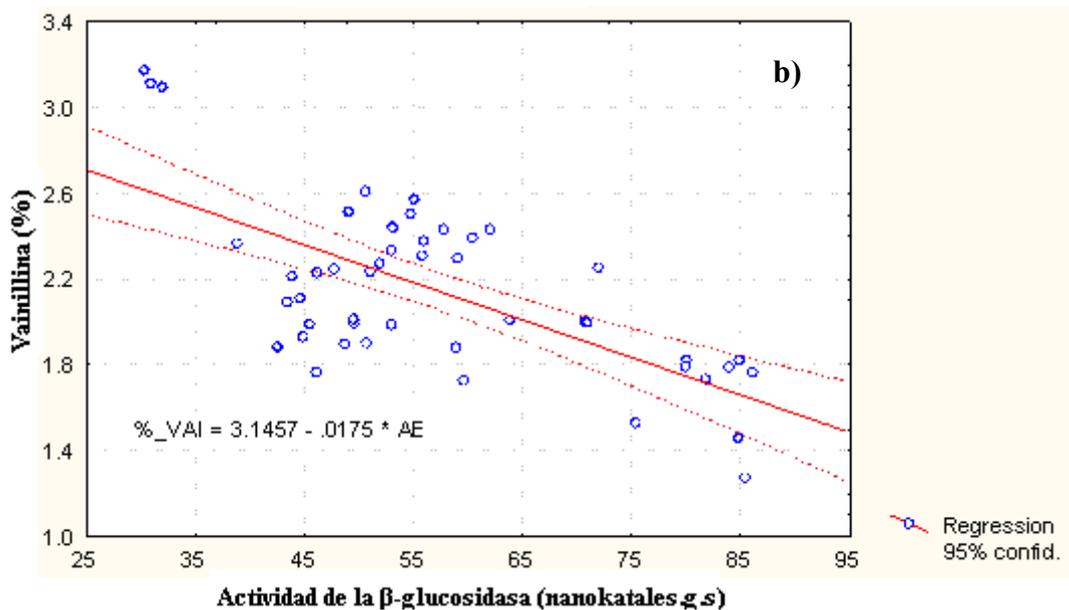
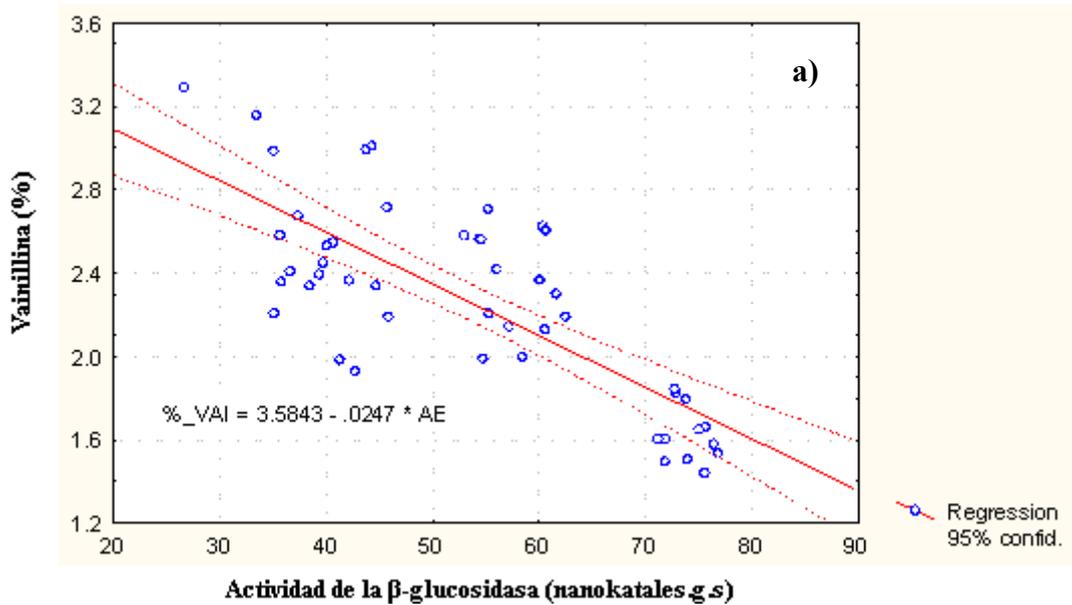
Dignum (2004), Marquez y Waliszewsky (2008), Sreedhar (2007) y Odoux et al., (2006) han estudiado que la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa en frutos de vainilla disminuye después de haberlas sometido a escaldado, escarificado con soluciones ácidas y liofilizado.

Se estima que hay una relación inversa del porcentaje de vainillina y la  $\beta$ -glucosidasa al someter a diversos tratamientos las vainas verdes de madurez fisiológica, sin embargo, al seguir la cinética de evolución de vainillina en todos los tratamientos con respecto al tiempo no se nota claramente esta relación, que se considera es muy determinante dentro de los primeros días de beneficiado de vainilla. Sreedhar (2007) realizó una cinética de  $\beta$ -glucosidasa en frutos de vainilla sometidas a diferentes tratamientos de beneficio, pero no explica la relación enzima-vainillina.

### 9.3.4 Análisis estadístico de energías alternas en el marchitado de vainilla

#### 9.3.4.1 Correlaciones de la $\beta$ -glucosidasa y el rendimiento de vainillina

Para determinar la relación entre la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa y la producción de vainillina en todos los tratamientos con respecto a los días de beneficio, se realizó un estudio estadístico de correlaciones, utilizando el programa STATISTICA, con el que se obtuvieron las figuras 30 y la tabla 12.



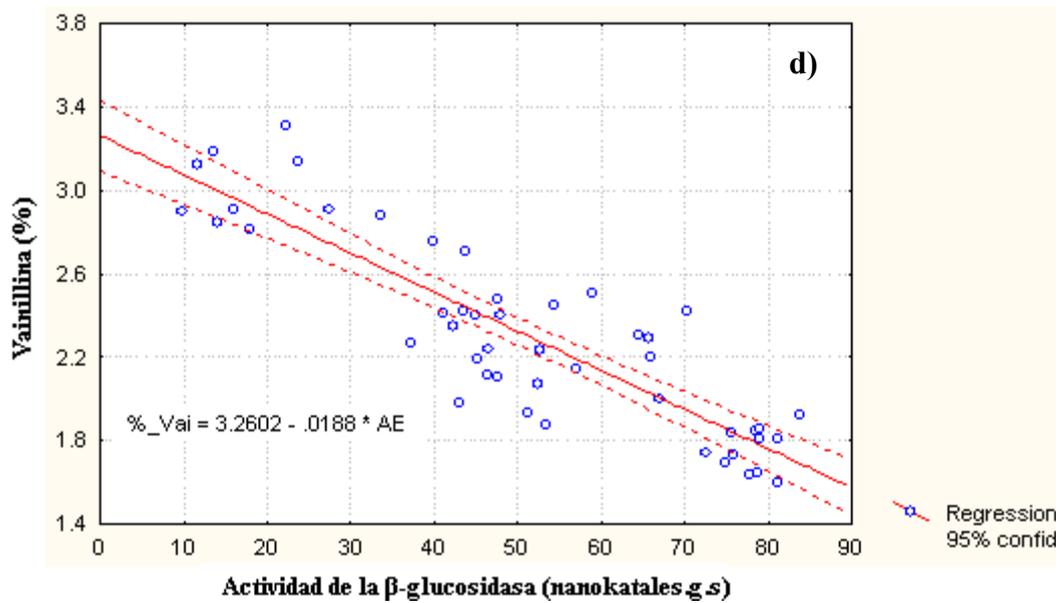
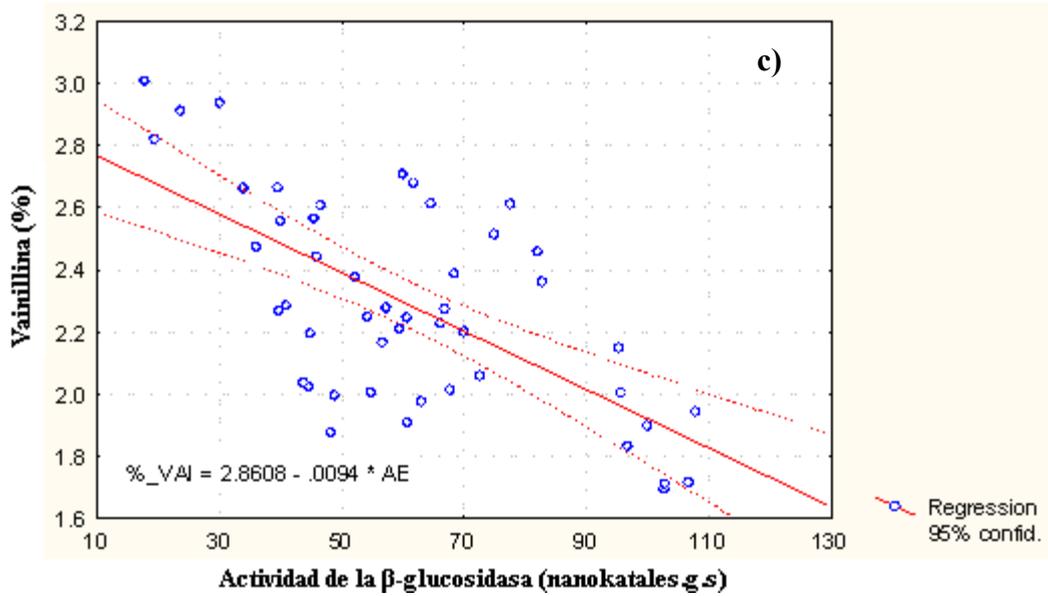


Figura 30. Dependencia de la actividad enzimática-vainillina de los diferentes marchitados y pos-marchitados a 0, 5, 10 y 15 minutos de sonicación en el beneficio de vainilla. Tratamientos: a) T, b) MOH<sub>2</sub>O, c) MO y d) S.

Tabla 12. Correlaciones del rendimiento de vainillina y la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa de frutos de vainilla sometidos a marchitado T con pos-marchitado en sonicación.

Tratamientos	Variable	Media	Desviación estándar	Coefficiente de correlación	Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>
T	Actividad enzimática (AE)	53.73	14.73		
	Vainillina (%)	2.25	0.47	-0.7747	0.6002
MOH <sub>2</sub> O	Actividad enzimática (AE)	57.32	15.13		
	Vainillina (%)	2.14	0.3957	-0.6683	0.4466
MO	Actividad enzimática (AE)	61.09	23.44		
	Vainillina (%)	2.29	0.3359	-0.656	0.4302
S	Actividad enzimática (AE)	51.24	21.58		
	Vainillina (%)	2.29	0.4616	-0.8775	0.77

En las figuras 30a, 30b, 30c y 30d, y en la tabla 12 se muestra que la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa se asocia en forma inversa en un 77.47%, 66.83%, 65.6% y 87.75%, correspondientemente, con el rendimiento de vainillina en vainas sometidas a marchitado T, MOH<sub>2</sub>O, MO y S con sus respectivos pos-marchitados en sonicación; el 60.02%, 44.66%, 43.66% y 77.0% de los diferentes tratamientos pueden ser explicados por la actividad enzimática y la producción de vainillina, respectivamente.

Los rendimientos de vainillina para los tratamientos de marchitado y pos-marchitado de manera T, en MOH<sub>2</sub>O, MO y S se puede estimar por las ecuaciones 3, 4, 5 y 6 derivadas del análisis de correlación.

Tratamientos:

a) T

$$\%\_VAI = 3.5843 - 0.0247 * AE \quad (3)$$

b) MOH<sub>2</sub>O

$$\%\_VAI = 3.1457 - 0.0175 * AE \quad (4)$$

c) MO

$$\%\_VAI = 2.8608 - 0.0094 * AE \quad (5)$$

d) S

$$\%\_VAI = 3.2602 - 0.0188 * AE \quad (6)$$

Donde: %\_VAI = Rendimiento de vainillina.

AE = Actividad de la  $\beta$ -glucosidasa.

### 9.3.4.2 Análisis de varianza del rendimiento de vainillina

Para determinar el estudio estadístico a emplear, se evaluó la independencia, normalidad y homogeneidad de los porcentajes de vainillina generado en cada tratamiento (anexo 2). Al aplicar análisis de varianza para los tratamientos de marchitado T, MOH<sub>2</sub>O, MO y S, con sus respectivos tiempos de pos-marchitado, se utilizó el programa estadístico Statgraphics 5.1 y se obtuvieron las tablas 13, 14, 15 y 16.

#### a) Tratamientos T

Tabla 13. Análisis ANOVA para vainillina (%) según tratamientos T.

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	2.27148	3	0.75716	4.10	0.0119
Intra grupos	8.11877	44	0.184517		
Total (Corr.)	10.3902	47			

#### b) Tratamientos con MOH<sub>2</sub>O

Tabla 14. Análisis ANOVA para vainillina (%) según tratamientos con MOH<sub>2</sub>O.

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	2.10488	3	0.701628	5.88	0.0018
Intra grupos	5.25463	44	0.119423		
Total (Corr.)	7.35952	47			

#### c) Tratamientos con MO.

Tabla 15. Análisis ANOVA para vainillina (%) según tratamientos con MO.

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	2.67751	3	0.892503	14.96	0.0000
Intra grupos	2.62422	44	0.0596415		
Total (Corr.)	5.30173	47			

#### d) Tratamientos con S.

Tabla 16. Análisis ANOVA para vainillina (%) según tratamientos con S.

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0.534292	3	0.178097	0.83	0.4863
Intra grupos	9.47963	44	0.215446		
Total (Corr.)	10.0139	47			

En las tablas 13, 14 y 15, se observa que el p-valor del test F es inferior a 0.05, lo que indica que si hay diferencia estadísticamente significativa entre los porcentajes medios de vainillina, de un nivel de tratamiento a otro, para un nivel de confianza del 95.0%.

En la tabla 16, se observa que el p-valor del test F es superior a 0.05, lo que indica que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los porcentajes medios de vainillina, de un nivel de tratamiento a otro, para un nivel de confianza del 95.0%.

En los tratamientos de marchitado T, MOH<sub>2</sub>O y MO, con sus respectivos tiempos de pos-marchitado, si hay diferencias estadísticamente significativas. Estas diferencias en el rendimiento de vainillina, se considera que se debe a los daños provocados a las células en el marchitado, al debilitar las paredes celulares sin lograr un alto porcentaje de ruptura y que al aplicar un pos-marchitado con sonicación se incrementa la ruptura celular, para poner en contacto la  $\beta$ -glucosidasa y glucovainillina.

Se considera que hay un tiempo y potencia idóneos para incrementar el porcentaje de vainillina; un exceso de sonicación disminuye el rendimiento.

Se considera que con los tratamientos de S no hay diferencias estadísticamente significativas en los rendimientos de vainillina, porque al marchitar las vainas a 60°C por tres minutos en sonicación se dañan y rompen las estructuras celulares de las vainas, y se pone rápidamente en contacto la  $\beta$ -glucosidasa y glucovainillina.

#### 9.4 Aplicación de energías focalizadas en el beneficio de vainilla

Para complementar los análisis experimentales del periodo 2, se realizaron diversos tratamientos de beneficio, en la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de México (UNAM); se varió el porcentaje de radiación en sonicación y microondas a temperaturas cercanas de marchitado y 40 °C en la que presenta mayor actividad la  $\beta$ -glucosidasa. A los 20 días de beneficio se evaluó el porcentaje de vainillina y se comparó con los obtenidos por los métodos de marchitado y pos-marchitado T, MOH<sub>2</sub>O, MO y S en el mismo periodo de tiempo, donde se alcanzaron los máximos rendimientos (Tabla 17 y Figura 31).

Tabla 17. Porcentajes de vainillina con diferente marchitado a los 20 días de beneficio.

<b>Tratamiento</b>	<b>Vainillina (%)</b>
T0	2.37
T5	2.58
T10	3.14
T15	2.38
S0	2.86
S5	3.12
S10	3.07
S15	2.78
MO <sub>H<sub>2</sub>O</sub> 0	2.40
MO <sub>H<sub>2</sub>O</sub> 5	2.56
MO <sub>H<sub>2</sub>O</sub> 10	3.12
MO <sub>H<sub>2</sub>O</sub> 15	1.86
MO0	2.67
MO5	2.91
MO10	2.30
MO15	2.10
S90% 38°C 3 min	2.75
S65% 38°C 3 min	2.66
S65% 60°C 3min	2.73
MF70% 2min 10% 3min 60°C dos veces	2.32
MF70% 2min 10% 3min 61°C una vez	2.61
MF45% 1min 10% 3min 40°C	2.96

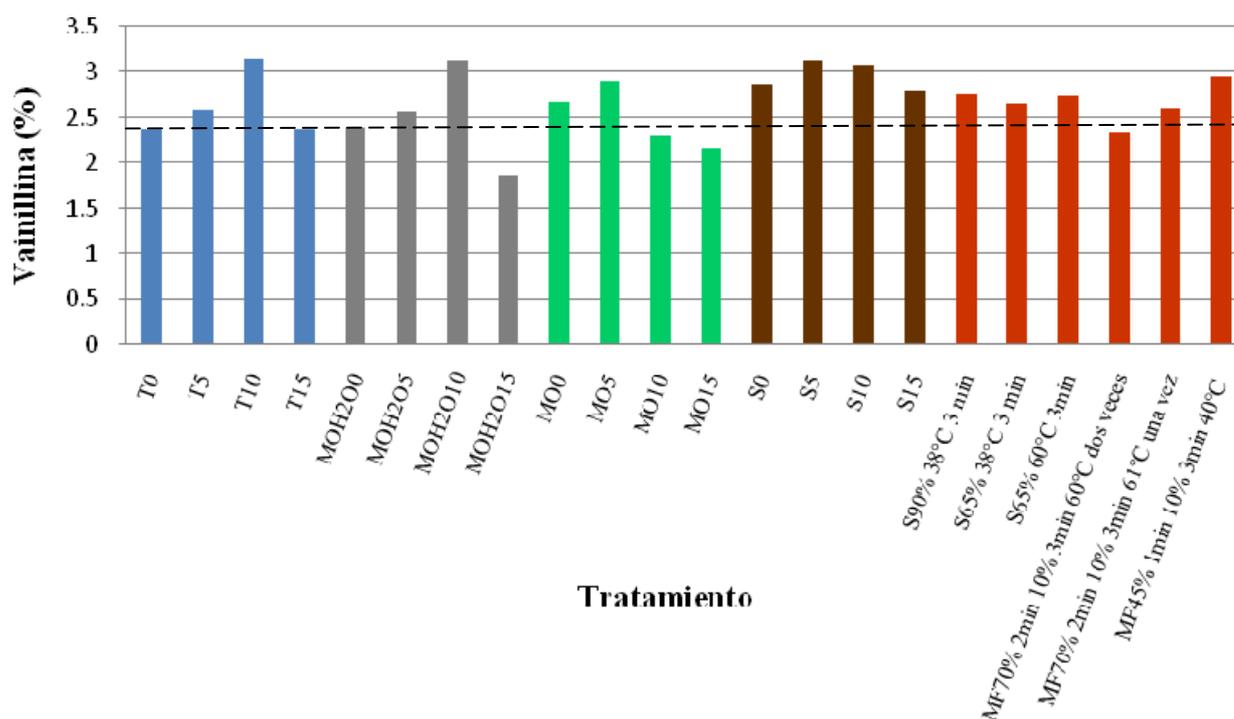


Figura 31. Rendimiento de vainillina con diferente marchitado a los 20 días de beneficio.

En la figura 30 a los 20 días de beneficio, se observa que los mejores rendimientos de vainillina en comparación con el marchitado tradicional se obtienen al aplicar T10, MOH2O10, MO5 y S5, al igual que con los demás tratamientos a diferentes potencias de sonicación y microondas focalizadas; excepto cuando se aplica exceso de microondas. Los menores porcentajes de vainillina se obtienen en cada grupo de tratamiento cuando se aplica 15 minutos de sonicación en el pos-marchitado.

Para visualizar la relación vainillina- $\beta$ -glucosidasa, se graficó el rendimiento de vainillina y la actividad de la enzima en vainas verdes y beneficiadas a los 20 días de tratamiento, con marchitado en sonicación, que fueron los valores de estas variables que presentaron mayor correlación. a temperaturas cercanas de 60°C y 40°C, modificando la potencia de sonicación y microondas focalizadas (Figura 32). A los 20 días de proceso se evaluó el rendimiento y actividad enzimática.

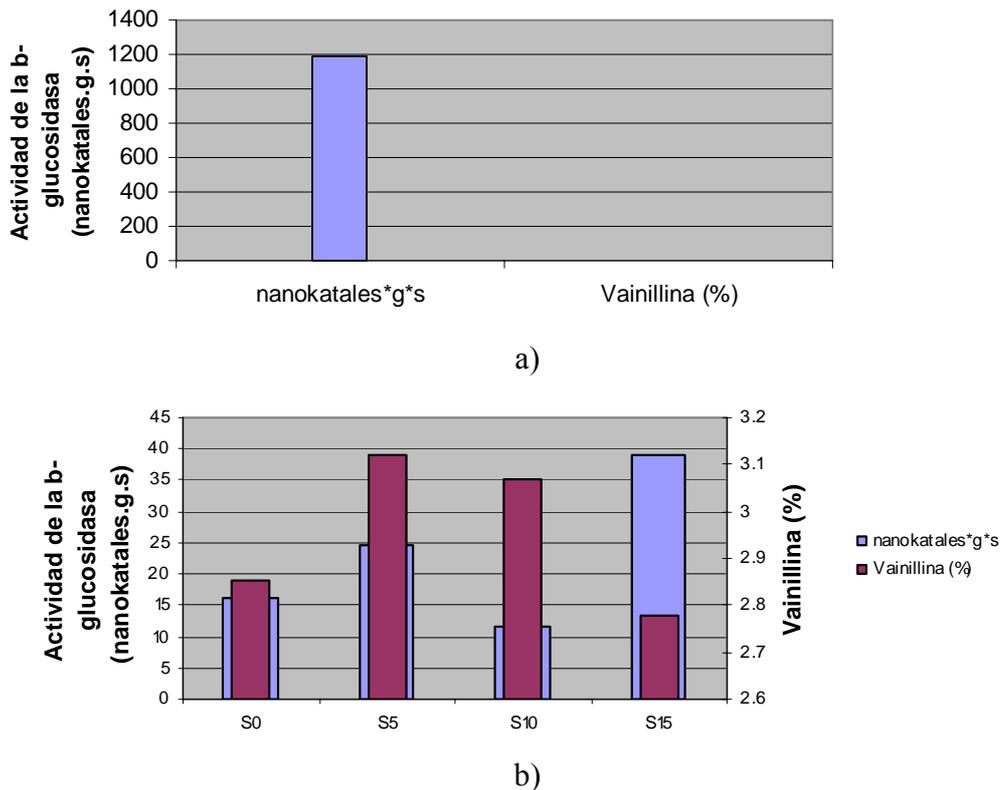


Figura 32. Relación vainillina- $\beta$ -glucosidasa con tratamientos de beneficio modificando la potencia de energías alternas. a) Vainas verdes; b) Vainas beneficiadas

En la figura 31 se observa que la actividad de la enzima disminuye de 1186.11 nkatales.s.g en las vainas verdes a valores que oscilan entre 15.43 y 37.80 nanokatales.g.s para tratamientos marchitados en S. Odoux et al., (2006), mencionan que la actividad mas alta de esta enzima se produce después de los seis o siete meses después de la polinización, y la mínima durante el beneficio de vainas; a pesar de que la actividad en vainas de madurez fisiológica es mayor, no cataliza la glucovainillina por estar en compartimientos celulares diferentes.

En los resultados de la figura 32 la enzima disminuyó su actividad mas del 90%, después de 20 días de beneficio en los frutos de vainilla; Marquez y Waliszewsky (2008), mencionan que el marchitado de frutos de vainilla en agua a 60 °C, pH 6.0, durante 3 minutos, disminuye la actividad de la enzima en 50%, por lo que se estima que la relación vainillina- $\beta$ -glucosidasa es determinante dentro de los primeros días de beneficio.

## 10. CONCLUSIONES DE ESTUDIOS EXPERIMENTALES

### 10.1 Periodo 1

Con un adecuado proceso de beneficio se espera un rendimiento del 3% de vainillina en vainas beneficiadas y un extracto de concentración de 18g/L por cada 600 g de vaina beneficiada, como lo indica la técnica espectrofotométrica de análisis de vainillina de Yungnian, et al., (2005).

Con los resultados obtenidos en este periodo, en relación al método tradicional: La concentración de vainillina aumenta en 20.00, 19,51, 17.07, 6.34 y 4.39% al combinar S-C, MO<sub>H<sub>2</sub>O</sub>-C, SMO<sub>H<sub>2</sub>O</sub>-C, MO-C y SMO-C respectivamente; disminuye en 11.22, 22.44, 26.34, 28.78 y 37.56 % al combinar MO-MO, S-MO, SMO-MO, SMO<sub>H<sub>2</sub>O</sub>-MO, y MO<sub>H<sub>2</sub>O</sub>-MO, correspondientemente. Por lo tanto, se concluye que si hay efecto de las radiaciones de sonicación y microondas en el beneficiado de vainilla, al disminuir el rendimiento con secado en MO; en el marchitado no se determina claramente los efectos de la aplicación microondas-sonicación, por lo que el periodo 2 permanece constante el secado convectivo y se varían las condiciones de marchitado, para determinar la influencia de las energías alternas en esta etapa de beneficio.

Se puede considerar que con el uso de microondas en el secado el rendimiento de vainillina decrece por la velocidad en la pérdida de humedad y otros compuestos aromáticos, debido a los daños provocados en las paredes celulares. Se estima que la concentración de vainillina aumenta al marchitar las vainas con microondas sin agua en relación a las microondas con agua, debido al contacto directo entre las ondas y las vainas, como lo mencionan Wang Z, et al., (2006) que el uso de microondas sin solvente ayuda a reducir el tiempo en la extracción de aceites esenciales en muestras frescas, previo humedecimiento.

Se propone beneficiar las vainas con marchitado en S a 25°C, seguido de marchitado en MO<sub>H<sub>2</sub>O</sub> y secado C, ya que el rendimiento de vainillina fue mayor.

## 10.2 Periodo 2

Los mayores porcentajes de penetración en las vainas tratadas se alcanzaron cuando se aplicó 15 minutos de sonicación en todos los tratamientos, en general, los porcentajes de penetración con MOH<sub>2</sub>O, MO y S son mayores que los de marchitado T; se considera que la pérdida de firmeza en los tejidos vegetales de las vainas, se debe principalmente a la sonicación aplicada en el pos-marchitado, que aumenta la ruptura de las estructuras celulares que fueron debilitadas o dañadas en el marchitado.

El máximo rendimiento de vainillina se obtienen a los 20 días posteriores al marchitado y pos-marchitado de las vainas, con los tratamientos T10, MOH<sub>2</sub>O10, MO5 y S5; sin embargo, decrece al transcurrir el tiempo y al aplicar un exceso de sonicación, debido a la pérdida de humedad, oxidación, formación de radicales libres y a la volatilidad de alcoholes formados en el interior del fruto de vainilla.

Los rendimientos de vainillina con tratamientos a diferentes potencias de sonicación y microondas focalizadas, son mayores que el proceso T, excepto cuando se aplica exceso de microondas.

La máxima actividad de  $\beta$ -glucosidasa se presentó en frutos de vainilla en madurez fisiológica y la mínima durante el proceso de curado, se estima una relación inversa del porcentaje de vainillina y la  $\beta$ -glucosidasa dentro de los primeros días de beneficiado, pero al transcurrir el tiempo no se nota claramente esta relación. La mejor correlación enzima-vainillina se presentó con el marchitado en S y pos-marchitado correspondiente, donde no hay diferencias estadísticamente significativas en el rendimiento medio de vainillina.

Al acelerar la ruptura de compartimientos celulares, se considera que la relación enzima-vainillina es determinante dentro de los primeros días de beneficiado de vainilla, al poner en contacto la glucovainillina con la  $\beta$ -glucosidasa en su máxima actividad y generar el máximo rendimiento de vainillina. Se considera que el rendimiento de vainillina no depende totalmente de los daños provocados a las estructuras celulares, sino de otras reacciones intrínsecas en el interior de la vaina y por el tiempo e intensidad de sonicación, que provocan variación en los efectos químicos y mecánicos, al interior de las vainas y se reflejan en su cambio de textura.

Se recomienda aplicar en el beneficio de frutos de vainilla marchitado T para debilitar las paredes celulares y 10 minutos de sonicación para poner en contacto las enzimas y sustratos precursores de la vainillina y evitar otras reacciones indeseables con mayor tiempo de radiación ultrasónica.

## **11. PERSPECTIVAS**

Con el diseño experimental del periodo 2, se debe realizar una cinética de la evolución de la vainillina y la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa dentro de los 10 primeros días para determinar su relación.

Utilizar diferentes métodos de ruptura celular a 40°C en frutos de vainilla, como enzimas, molienda, sonicación, microondas, etc., para aprovechar la máxima actividad de la  $\beta$ -glucosidasa a dicha temperatura; después colocarlas en un horno a la misma temperatura, envueltas en bolsas de polietileno de alta densidad para evaluar su cinética de rendimiento de vainillina y actividad enzimática.

## 12. ANEXOS

### 12.1 Curva de calibración de vainillina

Los datos obtenidos para elaborar la curva de calibración de vainillina 99.9% de pureza en cristales (Figura 33) se muestran en la tabla 18.

Tabla 18. Concentración y absorbancia de vainillina.

Concentración (g/L)	Absorbancia
0.001	0.146
0.002	0.235
0.003	0.310
0.004	0.39
0.005	0.462
0.006	0.521
0.007	0.557

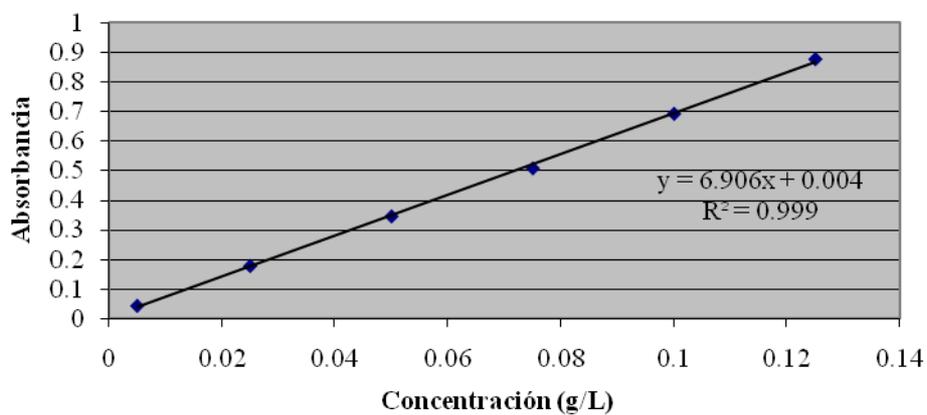
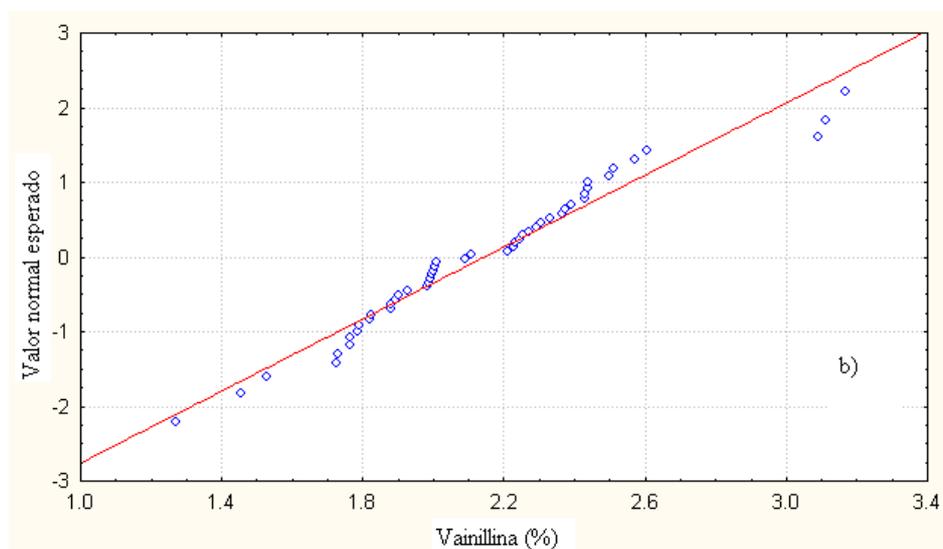
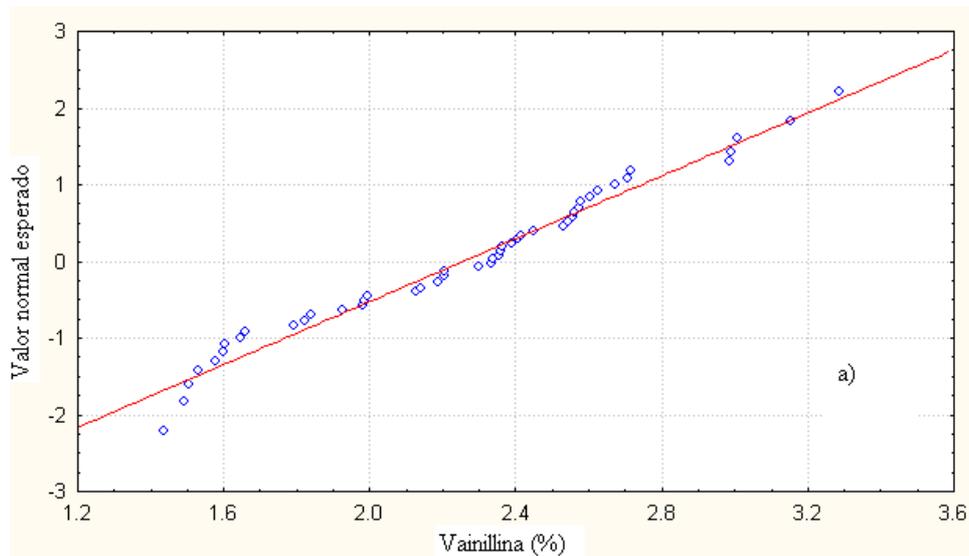


Figura 33. Curva de calibración de vainillina.

## 12.2 Requisitos para utilizar análisis de varianza en el rendimiento de vainillina

- a) Independencia: Para cada análisis de vainillina se utilizó una vaina diferente.
- b) Normalidad: Para cumplir con este requisito se realizaron los gráficos de probabilidad normal para cada grupo de tratamientos (Figura 34), donde las medias de las poblaciones deben provenir de una población aproximadamente normal.
- c) Homogeneidad: Se utilizó la prueba de homogeneidad de varianza de Levene, para todos los tratamientos de marchitado y posmarchitado; en este requerimiento, la varianza alrededor de cada media debe ser igual.



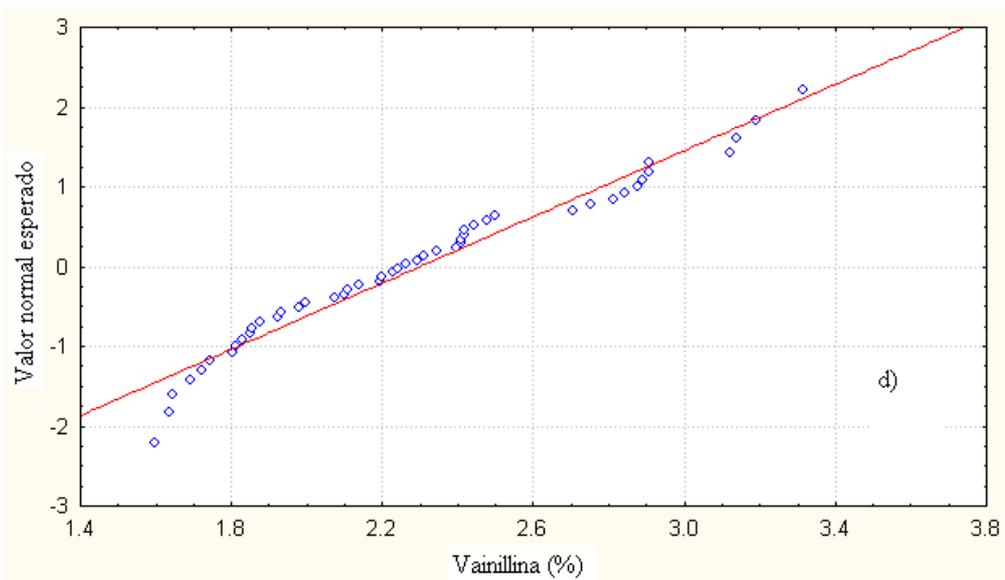
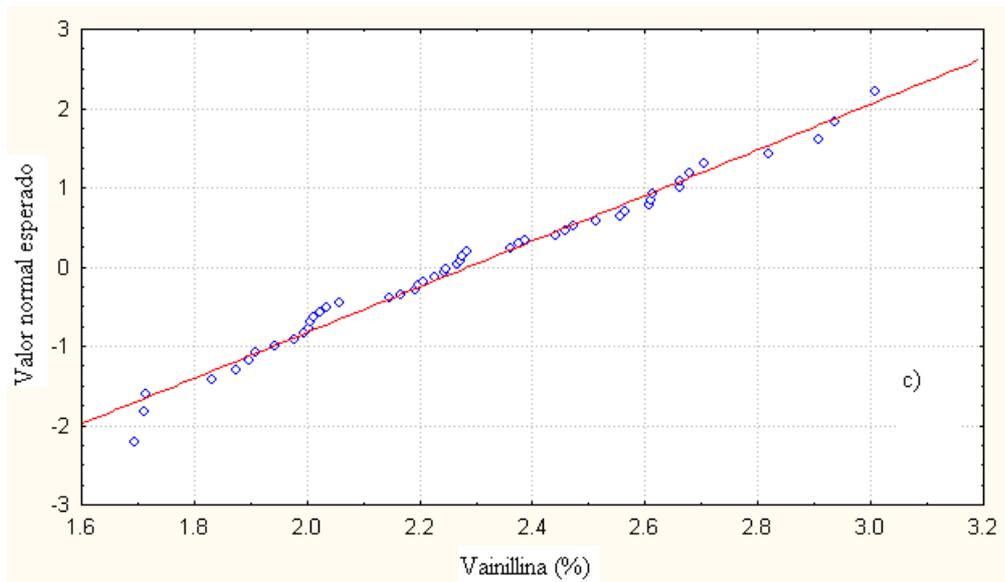


Figura 34. Normalidad del rendimiento de vainillina. Marchitado: a) T, b)  $\text{MOH}_2\text{O}$ , c) MO y d) S.

Tabla 19. Marchitado tradicional.

Variable	Efecto SS	Efecto df	Efecto MS	Error SS	Error df	Error MS	F	P
Tratamiento	3.075	2	1.54	12.07	45	0.268	5.73	0.006

Tabla 20. Marchitado MOH<sub>2</sub>O.

Variable	Efecto SS	Efecto df	Efecto MS	Error SS	Error df	Error MS	F	P
Tratamiento	3.75	2	1.868	10.33	45	0.230	8.14	0.00096

Tabla 21. Marchitado MO.

Variable	Efecto SS	Efecto df	Efecto MS	Error SS	Error df	Error MS	F	P
Tratamiento	4.045	2	2.023	8.72	45	0.194	10.44	0.00019

Tabla 22. Marchitado S.

Variable	Efecto SS	Efecto df	Efecto MS	Error SS	Error df	Error MS	F	P
Tratamiento	1.25	2	0.625	10.75	45	0.24	2.62	0.084

Se considera realizar el análisis de varianza a los valores del rendimiento de vainillina, porque, en los gráficos de la figura 34 se acepta la linealidad de los datos, aunque hay valores que forman una cola en cada uno de los grupos de tratamientos, que se considera mínima su desviación en comparación a la mayoría de los valores de rendimiento de vainillina; en las tablas 19, 20 y 21 se observa que  $p < 0.05$ , lo que indica que no hay diferencias estadísticamente significativas en estos tratamientos, a diferencia de los valores obtenidos con el marchitado en S.

### 13. REFERENCIAS

- Aguilar, et al., (2000). Aspectos químicos y de procesos del escaldado TB\_TL y la textura de vegetales procesados ( parte II). *La Alimentación Latinoamericana*. 234:64 -69.
- Arámbula-Villa, et al., (2004). Evaluación de una metodología para determinar características de textura de tortilla de maíz (*Zea mays L.*). *alanrevista*. 54-2.
- Arana. (1943). Action of  $\beta$ -glucosidase in the curing of vanilla. *Food Research*. 8: 343–351.
- Arroyo y Flores. (2001). Degradación ultrasónica de contaminantes orgánicos. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*. 4-2: 3-14.
- Asaff-Torres. (2008). De México al mundo, el sabor de la vainilla. *Hypatia - Revista de Divulgación Científico - Tecnológica del Estado de Morelos*. 12:43.
- Augstburge et al., 2000. Agricultura Orgánica en el Trópico y Subtrópico. Guía de los 18 cultivos. Vainilla. *Naturland e.V.* 1:15-18.
- Azuola y Vargas. (2007). Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EUA). *Tecnología en Marcha*. 20-4: 30-40.
- Balls y Arana, F. (1941). The curing of vanilla. *Industrial and Engineering Chemistry*. 33: 1073–1075.
- Bourne. (1989). Applications of chemical kinetics theory to the rate of thermal softening of vegetable tissue. In *Quality factors of fruits and vegetables. Chemistry and Technology*. J.American Chemical Society. Washington, D.C. 1989.
- Cañizares et al., (2004). Fast ultrasound-assited method for determination of the oxidative stability of virgin olive oil. *Analytica Chimica Acta*, 502: 161-166.
- Castillo, R. y Engleman, E. 1993. Caracterización de dos tipos de *vanilla planifolia*. *Acta Botánica Mexicana*. 25:49-59.
- Dignum y Verpoorte. (2002). Vanilla curing under laboratoryc conditions. *Food Chemistry*, 79: 165-171.
- Dignum et al., (2004). Identification of glucosides in green beans of *Vanilla planifolia* Andrews and kinetics of vanilla  $\beta$ -glucosidase. *Food Chemistry*, 85: 199–205.
- Elorza, P. y López, M. 2007. Efecto del tipo de tutor sobre el contenido de vainillina y clorofila en vainas de vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews) en Tuxpan, Veracruz, México. *Revista Científica UDO Agrícola*. 7-1: 228-236.
- Ferhat, et al., (2005). An Improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange pell. *Journal of Chromatography A*. 1112 (1-2): 121-126.

- Fernandes y Rodrigues. (2007). Ultrasound as pre-treatment for drying of fruits: Dehydration of banana. *Journal of Food Engineering*. 82: 261–267.
- Gréman, et.al. (2007). Enhancement of solid dissolution by ultrasound. *Chemical Engineering and Processin*. 46: 862–869.
- Guo-Jia Ma, et al., (2006). Cloning and characterization of cotton GhBG gene encoding *b*-glucosidase. *DNA Sequence*, 17(5): 355–362.
- Hagenson y Doraiswamy. (1998). Comparison of the effect of ultrasound and mechanical agitation on a reacting solid-liquid system. *Chemical Engineering Science*. 53:131–148.
- Havkin-Frenkel, et al., (2005). Inside vanilla: Vanilla planifolia's botany, curing options and future market prospects. *Perfumer and Flavorist*. 30:36–55.
- Herrero y Romero de Avila. (2006). Innovaciones en el procesado de alimentos: Tecnologías no térmicas. *Revista de Medicina de la Universidad de Navarra*. 50-4: 71-74.
- Hromádkova y Ebringerová. (2003). Ultrasonic extraction of plant materials- investigation of hemicellulose release from buckwhheat hulls. *Ultrasonics Sonochemistry*. 10: 127-133.
- Havkin-Frenkel D. (2003) A hairy tissue produces vanillin. *Israel Journal of Plant Sciences*. 51, 157–159.
- Kirk R.S, et al., (1999). Composición y análisis de alimentos de Pearson. Ed. CECSA. México D.F.
- Lew, et al., (2002). Increasing Rates of Reaction: Microwave-Assisted Organic Synthesis for Combinatorial Chemistry. *Journal of Combinatorial Chemistry*. 4-2: 95- 105.
- Licona. (2008). Vainilla mexicana, otra posibilidad de negocio. *Agronegocios*. 1:29 de junio.
- Longares Patrón. (2007). Determinación de PHB y vainillina de *Vanilla Fragans* por espectrofotometría UV-visible y extracción asistida con microondas focalizadas. Departamento de Química Analítica, UNAM, México.
- Márquez, O. et al., (2007), Purification and characterization of cell wall-bound peroxidase from vanilla bean. *LWT. Food Science and Technology* doi: 10.1016/j.lwt.2007.08.017.
- Marquez y Waliszewski. (2008). The effect of thermal treatment on  $\beta$ -glucosidase inactivation in vanilla bean (*Vanilla planifolia* Andrews). *International Journal of*

- Food Science and Technology*. 43:1993–1999.
- Murillo (1995). Ficha Técnica de Industrialización de Vainilla. Dirección de Mercadeo y Agroindustria Área Desarrollo de Producto, Costa Rica.
- Mariezcurrena, et al., (2008). The effect of killing conditions on the structural changes in vanilla (*Vanilla planifolia*, Andrews) pods during the curing process. *International Journal of Food Science and Technology*.doi:10.1111/j.1365-2621.2007.01691.x.
- Noé-Aguilar et al., (1999). Aspectos bioquímicos de la relación entre el escaldado TB-TL y la textura de vegetales procesados. *Journal of the Mexican Chemical Society*. 43-2:54-62.
- Odoux, et al., (2003a). Purification and characterization of vanilla bean (*Vanilla planifolia* Andrews) b-D-glucosidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3168–3173.
- Odoux, et al., (2003b). Localization of  $\beta$ -D-glucosidase Activity and Glucovanillin in Vanilla Bean (*Vanilla planifolia* Andrew). *Annals of Botany*. 92: 1-8.
- Odoux, et al., (2006). The relation between glucovanillin, b-D-glucosidase activity and cellular compartmentation during the senescence, freezing and traditional curing of vanilla beans. *Annals of Applied Biology*. 149: 43–52.
- Perera y Owen (2008). Effect of Tissue Disruption by Different Methods Followed by Incubation with Hydrolyzing Enzymes on the Production of Vanillin from Tongan Vanilla Beans. *Food Bioprocess Technology*. DOI 10.1007/s11947-007-0048-4.
- Pérez-Silva, et al., (2006). GC–MS and GC–olfactometry analysis of aroma compounds in a representative organic aroma extract from cured vanilla (*Vanilla planifolia* G. Jackson) beans. *Food Chemistry*. 99: 728–735.
- Pérez-Silva, et al., (2007). Producción, beneficio y perfil aromático de la Vainilla de la región de Tuxtepec. *Agroproduce*. 19-2:19-25.
- Ping Xu, et al., (2007). Microbial transformation of propenylbenzenes for natural flavour Production. *TRENDS in Biotechnology*. 25:12-1.
- Podstolski et al., (2002). Unusual 4-hidroxibenzaldehyde synthase activity from tissue cultures of the vanilla orchid *Vanilla planifolia*. *Phytochemistry*, 61: 611–620.
- Priego y Luque. (2007). Ultrasound-assisted digestion: A useful alternative in sample preparation. *Journal of Biochemical Biophysical Methods*. 70: 299–310.
- PRODESIS. Gobierno del Estado de Chiapas. 2005. Manual de asistencia técnica para la Producción de vainilla en parcela agroforestal y acahuals en Chiapas, México. *Vainilla de la Lacandona S.A de C.V.*

- Proestos, C., y Komaitis, M. (2007). Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds. *LWT - Food Science and Technology*, doi:10.1016/j.lwt.2007.04.013. En prensa.
- Ranadive, A. (1994). Vanilla-cultivation, curing, chemistry, technology and commercial products. In G. Charalambous (Ed.), *Spices, herbs and edible fungi*. pp. 517–577. Amsterdam, Holland: Elsevier Science BV.
- Ramachandra y Ravishankar, (2000). Vanilla flavour: production by conventional and biotechnological routes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80:289-304.
- Riesz, P., Kondo, T. and Murali Krishna, C. M. (1990). Sonochemistry of volatile and non-volatile solutes in aqueous solutions: e.p.r. and spin trapping studies, *Ultrasonics*, Sep;28(5): 295–303.
- Rodríguez. 2007. Análisis de los polisacáridos y la textura de la pared celular en cultivos en suspensión de *Beta vulgaris* L. Centro de Desarrollo de Estudios Bióticos. Departamento de Biotecnología. IPN. Tesis de Maestría.
- Rosado-Zarrabal, et al., (2006). Diseño de un proceso de beneficio de vainilla (*vainilla planifolia*) bajo condiciones controladas. Premio Nacional en Ciencia y Tecnología. de los Alimentos 2006, en proceso de patentar.
- Rosado-Zarrabal, et al., (2007). Efecto del tipo de marchitamiento en la evolución de los compuestos aromaticos en un beneficio controlado de vainilla (*Vanilla planifolia*). V Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones. 1072-1080.
- Sandoval-Salas. 2005. Caracterisation de la production et optimisation du processus d'extraction des colorants de la plante de añil (*indigofera suffruticosa* mill). Tesis de Doctorado. Instituto Politécnico de Toulouse. Francia.
- SAGARPA. 2006. Sistema producto vainilla 2006. Logros y perspectivas de la vainilla en México. <http://www.sagarpa.gob.mx/agricultura/info/sp/csp/vainilla.swf>
- Sreedhar, et al., (2007). Specific Pretreatments Reduce Curing Periodo of Vanilla (*Vanilla planifolia*) Beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55:2947-2955.
- Suslick, K. S (1989). The chemical effect of ultrasound, *Science Am.* 260 (2): 62–68.
- Thompson, L.H, Doraiswamy (1999). L. K. Sonochemistry: science and engineering, *Ind. Eng. Chem. Res.* 38: 1215–1249.
- Toivonen-Brummell (2008). Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 48: 2

- Toy M.S-Stringham, R. S. (1993). Redox transformation of some aqueous organic compounds under static sonolysis. *Inter. J. Environ. Anal. Chem.*, 53: 157 – 164.
- Trejo. (2006). Catalizadores de arcillas pilareadas con complejos mixtos de Al-La: Síntesis por irradiación de microondas, caracterización y evaluación en la obtención del TAME. SEPI-ESIQIE-IPN: Tesis de Maestría.
- Turner, et al., (2007). A novel variant of *Thermotoga neapolitana* b-glucosidase B is an efficient catalyst for the synthesis of alkyl glucosides by transglycosylation. *Journal of Biotechnology*. 130: 67–74.
- Universidad Andres Bello. (2008). Guía003\_Organización Subcelular\_Biología Celular Lab Oratorio. Cargado 14-10-2008.  
[http://www.scribd.com/docinfo/6626002?access\\_key=key-233b160wbtqx5tsjsu1s](http://www.scribd.com/docinfo/6626002?access_key=key-233b160wbtqx5tsjsu1s)
- Valdez y Caziñares. (2007). On-line dilution and detection of vanillin in vanilla extracts obtained by ultrasound. *Food chemistry*, 105: 1201-1208.
- Viveros (2007). Evaluación de la extracción de vainilla, mediante la adaptación de un dispositivo Soxhlet. Universidad de las Américas Puebla. Escuela de Ingeniería y Ciencias. Departamento de Ingeniería Química y Alimentos. Tesis de licenciatura.
- Waliszewski (2006). A simple and rapid HPLC technique for vanillin determination in alcohol extract. *Food Chemistry*. 101: 1059–1062.
- Waliszewski (2006). Problemática de beneficiado de la vaina de vainilla y su efecto sobre la calidad del extracto de vainilla. V Congreso de Productores de vainilla. INVADER. Veracruz, México.
- Waliszewski, et al., (2007). Effect of hydration and enzymatic pretreatment of vanilla beans on the kinetics of vanillin extraction. *Journal of Food Engineering*, 78: 1267-1273.
- Wang Z, et al., (2006). Improved solvent-free microwave extraction of essential oil from dried *Cuminum cyminum* L. and *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. *Journal of Chromatography A*. 1102: 11-12.
- Workman y Day. (1982). Purification and properties of b-glucosidase from *Aspergillus terreus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 44 (6): 1289-1295.
- Yongnian Ni, et al., (2005). Simultaneous spectrophotometric determination of maltol, ethyl maltol, vanillin and ethyl vanillin in foods by multivariate calibration and artificial neural networks. *Food Chemistry*, 89: 465–468.