



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FISIOLOGÍA VEGETAL

Calidad de vainilla (*Vanilla planifolia*) empacada bajo diferentes condiciones de atmósferas modificadas

ANA LAURA ZAMORA FLORES

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2015

La presente tesis titulada **Calidad de vainilla (*Vanilla planifolia*) empacada bajo diferentes condiciones de atmósferas modificadas**, realizada por la alumna: **Ana Laura Zamora Flores** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FISIOLOGÍA VEGETAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA:



DRA. MA. DE LOURDES C. ARÉVALO GALARZA

ASESORA:



DRA. MARTHA ELVA RAMÍREZ GUZMÁN

ASESOR:



DR. SALVADOR VALLE GUADARRAMA

ASESORA:



M. C. CECILIA GARCÍA OSORIO

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Septiembre de 2015.

**CALIDAD DE VAINILLA (*VANILLA PLANIFOLIA*) EMPACADA BAJO
DIFERENTES CONDICIONES DE ATMÓSFERAS MODIFICADAS**

Ana Laura Zamora Flores M.C.

Colegio de Postgraduados, 2015

RESUMEN

El objetivo de este trabajo, fue conocer los cambios durante diferentes periodos de almacenamiento de vainilla procedente de distintas empresas beneficiadoras. Este trabajo se llevó a cabo en dos fases, en la primera se analizaron vainas procedentes de empresas beneficiadoras, ubicadas en la zona de Totonacapan en el Estado de Veracruz, México, las cuales se empacaron de forma individual en tres diferentes materiales (celofán, polietileno de baja densidad y empaques al vacío) durante 10 meses. Para la segunda fase se seleccionaron vainas procedentes de dos beneficios de la primera fase y se empacaron una y cinco vainas en cuatro tipos de empaques: celofán, celofán doble, celofán - polietileno y celofán - vacío, durante seis meses. Los resultados de la primera fase mostraron diferencias entre beneficios, principalmente en el contenido de vainillina y humedad, y sin diferencias significativas con relación a la pérdida de humedad entre los diferentes empaques. Después del segundo mes de empacado se presentó en general una pérdida de 20 % de humedad y un incremento del 1 % de vainillina. En la segunda fase, los resultados mostraron que el empaque que conservó mejor las características de calidad de la vaina fue la combinación de celofán - polietileno. Se encontraron diferencias significativas entre empaques, con relación a los cambios en la concentración de los compuestos principales entre una y cinco vainas empacadas. Los tratamientos con una vaina presentaron un aumento del contenido de vainillina, mayor pérdida de humedad y por lo consiguiente una pérdida de flexibilidad, así como mayor contenido de azúcares totales, principalmente glucosa y sacarosa. Mientras que los tratamientos con cinco vainas conservaron su flexibilidad, porcentaje de humedad y actividad de agua, pero no hubo incremento en el contenido de vainillina, ni 4-hidroxibenzaldehído.

Palabras clave: *Vanilla planifolia*, beneficios, empacado, vainillina

QUALITY OF VANILLA (*VANILLA PLANIFOLIA*) PACKAGED UNDER DIFERENT CONDITIONS OF MODIFIED ATMOSPHERES

Ana Laura Zamora Flores M.C.

Colegio de Postgraduados, 2015

ABSTRACT

The aim of this work was to search the changes during different periods of storage of vanilla from different curing companies. This work was carried out in two phases, the first one, the vanilla beans from four curing benefits, located in the Totonacapan area in the state of Veracruz, Mexico, were packed individually under three different materials (cellophane, low-density polyethylene and vacuum packaging) for 10 months. In the second phase beans from two curing benefits were packed lunch individually and in lots of five beans in four types of packaging: cellophane, double cellophane, cellophane - polyethylene and cellophane - vacuum, for six months. The results of the first phase showed differences between benefits, mainly in the vanillin content and moisture, and without significant differences related to the loss of moisture between the different packages. After the second month all the vanilla beans package loss of 20 per cent of moisture and experience an increase of one per cent of vanillin. In the second phase, the results showed that the packaging, which retained the best characteristics of quality of the beans, was the combination of cellophane - polyethylene. Significant differences were found between packaging with regard to changes in the concentration of the main compounds between one and five pods packaged. Treatments with one bean showed an increase of vanillin content, greater moisture loss and therefore a loss of flexibility, as well as higher content of total sugars, primarily glucose and sucrose. While the treatments with five beans retained their flexibility, percentage of humidity and water activity, but there was no increase in vanillin content, nor 4-hydroxybenzaldehyde.

Key words: *Vanilla planifolia*, curing houses, packaging, vanillin

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme los recursos con el apoyo de todo el pueblo Mexicano, para poder cursar la Maestría.

Al Colegio de Postgraduados - Campus Montecillo y al Programa de Fisiología Vegetal por permitirme realizar mis estudios de postgrado, y al personal docente con quienes tuve la fortuna de tomar cursos.

Al Subproyecto (SP-10): “Análisis del Efecto del Tiempo y Tipo de Almacenamiento sobre la Calidad Aromática de Vaina Beneficiada” del Macroproyecto: (2012-04-190442) “Estrategia de Investigación Aplicada para el Fortalecimiento, Innovación y Competitividad de la Producción de Vainilla en México”, del fondo SAGARPA-CONACYT por el apoyo para la realización de esta tesis.

A la Línea Prioritaria de Investigación en Inocuidad, Calidad de Alimentos y Bioseguridad (LPI-7) del Colegio de Postgraduados por el apoyo para la realización de este trabajo.

A mi Consejo Particular, ya que con su apoyo, conocimientos y profesionalismo se logró un trabajo conjunto.

A la Dra. Ma. de Lourdes C. Arévalo Galarza por su acertada dirección, enseñanza, paciencia, disponibilidad y sugerencias durante todo el trabajo de investigación.

A la M. en C. Cecilia García Osorio por su disciplina, confianza y asesoramiento en el trabajo de laboratorio.

A la Dra. Martha Elva Ramírez Guzmán por su disponibilidad, conocimientos y valiosas sugerencias para el análisis estadístico.

Al Dr. Salvador Valle Guadarrama por sus recomendaciones y asesoramiento para el análisis de los empaques empleados en el trabajo de investigación.

Mis más sinceros agradecimientos a toda la gente que tuve la fortuna de conocer a lo largo de estos dos años, y que me apoyaron durante este tiempo, ya que no sólo me aligeraron el trabajo sino que además aprendí de cada uno de ellos y me permitieron desarrollar la investigación en un agradable ambiente:

Colegio de Postgraduados - Campus Montecillo: M. en C. David Jaen, Sr. Arturo Gallegos, Sra. Isidra Arellano y al Sr. Arturo López Veloz, por todo su tiempo y apoyo en las labores realizadas en el laboratorio; y a Paty Mejía por su disponibilidad y confianza.

Colegio de Postgraduados - Campus Puebla: Dra. Adriana Delgado, Dr. Braulio Edgar Herrera, y a Reina Xochipa por su confianza y todo el apoyo brindado.

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (Facultad de Ingeniería Química – Laboratorio de Análisis de Alimentos): A la Dra. Lorena Luna por su invaluable apoyo en el análisis microbiológico realizado en esa institución y a sus alumnos Gustavo Corona, Jovita Barragán, Regina Navarrete y Carla Rosales, así como a la M. en C. Madai Gizeh Sánchez.

Departamento de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Autónoma Chapingo (Laboratorio de Análisis Físicoquímicos): Por las facilidades otorgadas para el análisis de permeabilidad, especialmente a Angélica y Nadia por su apoyo.

DEDICATORIA

A **Dios**, por absolutamente todas las bendiciones que me ha otorgado a lo largo de mi vida.

A mi **Mamá** Guadalupe Flores Ramos (✠) y a mi **Papá** Daniel Zamora Uribe (✠), por seguir acompañándome cada día.

A **mis hermanas**: Leticia, Mónica y Verónica por su constante apoyo, cariño y compañía; y por ser mis ejemplos de fuerza, paciencia y perseverancia.

A **mis sobrinos**: Daniela, Monserrat, Adrián, Sarahí y Alonso, por su amor, su alegría, por aprender de cada uno de ellos, y por permitirme ser su tía y amiga.

A mi **Tía**: Ma. Cristina Flores Ramos, por escucharme, por sus palabras de aliento y por su amistad y apoyo invaluable.

A mis **tíos y primos**: Fam. Flores Morales, Fam. Frey Flores y Fam. Zamora por estar siempre presentes, tanto en las buenas como en las malas.

“Antes de resolverme a una cosa u otra,
he de recuperar la confianza en mi propia
capacidad de cumplir mis propósitos
una vez que los he adoptado.”
(Abraham Lincoln)

CONTENIDO

	Página
LISTA DE CUADROS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
ANEXOS	xvi
CAPÍTULO I	
I. INTRODUCCIÓN GENERAL.	1
II. OBJETIVOS.	2
General.	2
Específicos.	2
III. REVISIÓN DE LITERATURA.	3
3.1 Características de la Vainilla.	3
3.2 Requerimientos Agroecológicos.	4
3.3 Diversidad.	5
3.4 Importancia Económica Nacional y Mundial.	6
3.5 Usos de la Vainilla.	8
3.6 Índices de Calidad.	9
3.7 Proceso de Beneficio de la Vainilla.	10
3.8 Composición de la Vainilla Beneficiada.	13
3.9 Empaques.	20
3.10 Aplicaciones de Atmósferas Modificadas y Películas Plásticas.	21
IV. LITERATURA CITADA.	21
CAPÍTULO II	
CARACTERÍSTICAS DE CALIDAD DE VAINILLA PROCEDENTE DE DIFERENTES BENEFICIOS Y CAMBIOS DURANTE EL ALMACENAMIENTO.	
RESUMEN.	28
I. INTRODUCCIÓN.	29
II. MATERIALES Y MÉTODOS.	30

2.1 Material Vegetal.	30
2.2 Variables.	31
Humedad.	31
Compuestos fenólicos principales.	32
pH.	32
2.3 Diseño Experimental y Análisis Estadístico.	33
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	34
3.1 Diferencias entre Beneficios.	34
3.2 Efecto del Empaque y Tiempo de Almacenamiento.	39
IV. CONCLUSIONES.	43
V. LITERATURA CITADA.	43

CAPÍTULO III

EFFECTO DE DIFERENTES EMPAQUES EN LA CONSERVACIÓN DE VAINAS DE VAINILLA BENEFICIADA.

RESUMEN.	45
I. INTRODUCCIÓN.	46
II. MATERIALES Y MÉTODOS.	47
2.1 Material vegetal.	47
2.2 Variables.	49
Humedad.	49
Compuestos fenólicos principales.	49
pH.	50
Pérdida de peso.	50
Etanol y Acetaldehído.	50
Color.	50
Firmeza.	51
Actividad de agua.	52
Actividad microbiológica.	52
Azúcares.	53
Permeabilidad.	54

2.3 Diseño experimental y Análisis estadístico.	56
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	58
3.1 Efecto del Empaque y Tiempo de Almacenamiento en el contenido de Humedad y Compuestos Fenólicos.	58
3.2 Efecto del Empaque y Número de Vainas en la Firmeza.	68
3.3 Efecto del Empaque y Número de Vainas en Actividad Microbiana.	70
3.4 Efecto del Empaque y Número de Vainas en el Contenido de Azúcares.	76
3.5 Efecto del Empaque y Número de Vainas en el Contenido de Etanol y Acetaldehído.	79
IV. CONCLUSIONES.	82
V. LITERATURA CITADA.	83
ANEXOS.	86

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Producción de vainilla a nivel mundial.	7
2	Producción de vainilla a nivel nacional.	8
3	Clasificación de vainas en base de los contenidos de humedad, vainillina y tamaño.	10
4	Promedios de los valores de los cuatro compuestos principales para los cuatro beneficios analizados.	35
5	Matriz de correlación de las variables evaluadas (correlaciones y niveles de significancia).	35
6	Condiciones del curado y características de las vainas procedentes de tres de los beneficios analizados.	38
7	Medias de los cuatro compuestos principales a los 10 meses de almacenamiento, considerando beneficio y tipo de empaque.	40
8	Condiciones de empaque de vainas beneficiadas de vainilla.	47
9	Espesor y tasa de permeabilidad al vapor de agua de las películas empleadas.	56
10	Matriz de correlación de las variables evaluadas (correlaciones y niveles de significancia).	60
11	Actividad de agua (A_w), conteo de bacterias mesófilas, coliformes totales y hongos y levaduras (UFC: unidades formadoras de colonias), inicial y a los 6 meses de almacenamiento del Beneficio 1.	71
12	Actividad de agua (A_w), conteo de bacterias mesófilas, coliformes totales y hongos y levaduras (UFC: unidades formadoras de colonias), inicial y a los 6 meses de almacenamiento del Beneficio 2.	74

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Inflorescencia de la planta de vainilla (a) y polinización manual de flores (b).	3
2	Vainas verdes de <i>Vanilla planifolia</i> . L. Andrews.	4
3	Asoleado de vainas en patio de secado.	12
4	Cuarto de secado de vainas seleccionadas.	13
5	Estructuras químicas de los cuatro compuestos mayoritarios en vainas curadas de vainilla.	14
6	Ruta biosintética de la vainillina propuesta por Zenk (1965).	17
7	Ruta propuesta por Funk y Brodelius (1990) a partir del ácido ferúlico	17
8	Ruta biosintética propuesta por Kanisawa <i>et al.</i> (1994), con relaciones entre ácido <i>p</i> -hidroxicinámico, <i>p</i> -hidroxibenzaldehído y <i>p</i> -hidroxibenzoato.	18
9	Ruta del ferulato y benzoato (Havkin-Frenkel y Belanger, 2007).	19
10	Ruta biosintética de la vainillina propuesta por Havkin-Frenkel <i>et al.</i> (1996).	19
11	Empaques empleados en la primera fase de la investigación con películas simples: (a) celofán; (b) polietileno; y (c) vacío.	31
12	Diagramas de dispersión de ácido 4-hidroxibenzóico–ácido vainillínico (A), humedad–vainillina (B), y humedad–4-hidroxibenzaldehído (C), con correlaciones de 0.83, -0.70 y -0.59, respectivamente.	36
13	Gráfica multivariada para la variable respuesta Vainillina, para los factores Beneficio, Empaque y Tiempo. (C: Celofán, P: Polietileno, V: Empaque al vacío). (■: Media de Vainillina entre beneficios de cada fecha; ◆: Media de Vainillina por cada tipo de empaque).	41
14	Gráfica multivariada para la variable respuesta Humedad, para los factores Beneficio, Empaque y Tiempo. (C: Celofán, P: Polietileno, V: Empaque al vacío). (■: Media de Humedad entre beneficios de cada fecha; ◆: Media de Humedad por cada tipo de empaque).	42
15	Empaques dobles empleados en la segunda fase de la investigación,	

	con una y cinco vainas (a) Celofán simple; (b) Celofán doble; (c) Celofán–Polietileno; y (d) Celofán–Vacío.	48
16	Análisis de color de vainas con colorímetro Hunter Lab.	51
17	Evaluación de firmeza de vainas beneficiadas de vainilla.	52
18	Análisis de actividad de agua.	52
19	Medición de espesor de las películas plásticas con micrómetro manual	55
20	Gráfica multivariada para la variable respuesta Humedad, para los factores Beneficio, Empaque, Tiempo y número de vainas por empaque. (C: Celofán, C-C: Celofán doble, C-P: Celofán-Polietileno, C-V: Celofán-Vacío). (■: Media de Humedad entre beneficios de cada fecha; ◆: Media de Humedad por cada tipo de empaque y número de vainas).	59
21	Diagramas de dispersión de humedad – 4-hidroxibenzaldehído (A), humedad – vainillina (B), y ácido 4-hidroxibenzóico – ácido vainillínico (C), y 4-hidroxibenzaldehído – vainillina (D); con correlaciones de -0.77, -0.82, 0.88 y 0.85, respectivamente.	61
22	Gráfica multivariada para la variable respuesta Vainillina, para los factores Beneficio, Empaque, Tiempo y número de vainas por empaque. (C: Celofán, C-C: Celofán doble, C-P: Celofán-Polietileno, C-V: Celofán-Vacío). (■: Media de Vainillina entre beneficios de cada fecha; ◆: Media de Vainillina por cada tipo de empaque y número de vainas).	62
23	Gráfica multivariada para el ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico, para los factores Beneficio, Empaque, Tiempo y número de vainas por empaque. (C: Celofán, C-C: Celofán doble, C-P: Celofán-Polietileno, C-V: Celofán-Vacío). (■: Media de Ac. 4-Hidroxibenzóico entre beneficios de cada fecha; ◆: Media de Ac. 4-Hidroxibenzóico por cada tipo de empaque y número de vainas).	64
24	Gráfica multivariada para el <i>p</i> -hidroxibenzaldehído, para los factores Beneficio, Empaque, Tiempo y número de vainas por empaque. (C: Celofán, C-C: Celofán doble, C-P: Celofán-Polietileno, C-V: Celofán-	

	Vacío). (■: Media de 4-Hidroxibelzaldehído entre beneficios de cada fecha; ◆: Media de 4-Hidroxibelzaldehído por cada tipo de empaque y número de vainas).	65
25	Gráfica multivariada para ácido vainillínico, para los factores Beneficio, Empaque, Tiempo y número de vainas por empaque. (C: Celofán, C-C: Celofán doble, C-P: Celofán-Polietileno, C-V: Celofán-Vacío). (■: Media de Ac. Vainillínico entre beneficios de cada fecha; ◆: Media de Ac. Vainillínico por cada tipo de empaque y número de vainas).	67
26	Diagramas de dispersión de firmeza – humedad para el beneficio 1 (A) y beneficio 2 (B); con correlaciones de -0.70 y -0.30, respectivamente.	68
27	Gráfica multivariada para Firmeza, considerando los factores Beneficio, Empaque, Tiempo y número de vainas por empaque. (C: Celofán, C-C: Celofán doble, C-P: Celofán-Polietileno, C-V: Celofán-Vacío). (■: Media de Firmeza entre beneficios de cada fecha; ◆: Media de Firmeza de los tres tiempos, por cada tipo de empaque y número de vainas).	69
28	Actividad de agua (Aw) del Beneficio 1. (C: Celofán, C-C: Celofán doble, C-P: Celofán-Polietileno, C-V: Celofán-Vacío). (■:Media de Aw entre meses por cada tipo de empaque y número de vainas; ◆: Media de la Aw de las dos cantidades de vainas).	70
29	Conteo de Bacterias Mesófilas Aerobias (BMA) (unidades formadoras de colonias (UFC)) en vainas curadas y empacadas del Beneficio 1. (F0: Analisis inicial, antes de que las vainas se empacaran; C: Celofán; C-C: Celofán doble; C-P: Celofán – Polietileno; C-V: Celofán – Vacío)	72
30	Conteo de Hongos y Levaduras (UFC: unidades formadoras de colonias) en vainas curadas y empacadas del Beneficio 1. (F0: Fecha cero, antes de ser empacadas las vainas; C: Celofán; C-C: Celofán doble; C-P: Celofán – Polietileno; C-V: Celofán – Vacío).	72
31	Actividad de agua (Aw) del Beneficio 2. (C: Celofán, C-C: Celofán doble, C-P: Celofán-Polietileno, C-V: Celofán-Vacío). (■: Media de	

	Aw entre meses por cada tipo de empaque y número de vainas; ◆: Media de la Aw de las dos cantidades de vainas).	73
32	Actividad de Bacterias Mesófilas Aerobias (BMA) en vainas curadas y empacadas del Beneficio 2. (F0: Fecha cero, antes de ser empacadas las vainas). [Nota: en F0 el recuento realizado fue de 25,000,000 UFC g ⁻¹]. (F0: Fecha cero, antes de ser empacadas las vainas; C: Celofán; C-C: Celofán doble; C-P: Celofán – Polietileno; C-V: Celofán – Vacío).	75
33	Actividad de Hongos y Levaduras (UFC: unidades formadoras de colonias) en vainas curadas y empacadas del Beneficio 2. (F0: Fecha cero, antes de ser empacadas las vainas; C: Celofán; C-C: Celofán doble; C-P: Celofán – Polietileno; C-V: Celofán – Vacío).	75
34	Contenido de azúcares en vainas del Beneficio 1, empacadas durante seis meses. (C: Celofán; C-C: Celofán doble; C-P: Celofán – Polietileno; C-V: Celofán – Vacío), con una y cinco vainas.	77
35	Contenido de Azúcares en vainas del Beneficio 2, empacadas durante seis meses. (C: Celofán; C-C: Celofán doble; C-P: Celofán – Polietileno; C-V: Celofán – Vacío), con una y cinco vainas.	78
36	Comportamiento del etanol para los tratamientos del Beneficio 1 (C: Celofán, C-C: Celofán doble, C-P: Celofán-Polietileno, C-V: Celofán-Vacío). (■: Media de Etanol entre meses por cada tipo de empaque y número de vainas; ◆: Media de Etanol de las dos cantidades de vainas)	79
37	Comportamiento del etanol para los tratamientos del Beneficio 2 (C: Celofán, C-C: Celofán doble, C-P: Celofán-Polietileno, C-V: Celofán-Vacío). (■: Media de Etanol entre meses por cada tipo de empaque y número de vainas; ◆: Media de Etanol de las dos cantidades de vainas)	80
38	Comportamiento del acetaldehído para los tratamientos del Beneficio 1 (C: Celofán, C-C: Celofán doble, C-P: Celofán-Polietileno, C-V: Celofán-Vacío). (■: Media de Acetaldehído entre meses por cada tipo de empaque y número de vainas; ◆: Media de Acetaldehído de las dos cantidades de vainas).	81

- 39 Comportamiento del acetaldehído para los tratamientos del Beneficio 2 (C: Celofán, C-C: Celofán doble, C-P: Celofán-Polietileno, C-V: Celofán-Vacío). (■: Media de Acetaldehído entre meses por cada tipo de empaque y número de vainas; ◆: Media de Acetaldehído de las dos cantidades de vainas).

81

ANEXOS

	Página	
A	Curvas estándar de calibración de los cuatro compuestos fenólicos mayoritarios de la vainilla obtenidos por HPLC (cromatografía líquida de alta resolución). [Tiempo de corrida 26 min; fase móvil H ₃ PO ₄ 0.01M : Metanol (75:25); velocidad de flujo de 1 mL min ⁻¹ a 30 °C; volumen de inyección de 10 µL; a 254 nm, detector UV/VIS; y columna Brownlee Validated Aqueous C18 5µ 250 x 4.6 mm].	86
B	Análisis de Varianza de la estructura de covarianza simétrica compuesta para la variable Vainillina (Fase I).	87
C	Análisis de Varianza de la estructura de covarianza sin estructuración para la variable Humedad (Fase I).	87
D	Análisis de Varianza para la variable Vainillina con comparación entre medias para beneficio, empaque y tiempo.	88
E	Análisis de Varianza para la variable Humedad con comparación entre medias para beneficio, empaque y tiempo.	90
F	Análisis de Varianza de la estructura de covarianza simétrica compuesta para la variable Humedad (Fase II).	92
G	Análisis de Varianza de la estructura de covarianza autorregresiva para la variable Vainillina (Fase II).	92

CAPÍTULO I

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

La vainilla (*Vanilla spp*) es considerada la segunda especia de mayor costo, después del azafrán (Bythrow, 2005). De acuerdo con el Fondo de Fomento a la Integración de Cadenas Productivas (FIDECAP), las especias son sustancias sazonadoras o aromatizantes de origen vegetal, que se emplean como condimentos o para otros fines debido a su aroma o a sus propiedades conservantes o medicinales.

La vainilla es originaria de Mesoamérica y se relaciona con la cultura Totonaca de la región norte del Estado de Veracruz, México. En la actualidad, la mayor producción de vainilla se localiza en Indonesia, Madagascar, China, Papúa Nueva Guinea y México, en orden de importancia (Domínguez, 2005, FAOSTAT, 2014).

En la última década, la demanda de vainilla ha sido mayor que la oferta, por lo que representa un cultivo de alto potencial como fuente de ingresos para los productores y beneficiadores, los cuales dan un tratamiento de curado a las vainas, que consiste en un proceso de fermentación y secado, que a través de reacciones enzimáticas, permiten el desarrollo del aroma y sabor de la vainilla (Havkin-Frenkel *et al.*, 2004).

En vainas curadas existen más de 200 compuestos volátiles, la mayoría de ellos en cantidades traza. Los principales son: la vainillina, el ácido vainillínico, el *p*-hidroxibenzaldehído y el ácido *p*-hidroxibenzóico, y su cuantificación es un criterio importante para verificar la calidad de las vainas y la autenticidad de los extractos de vainilla (Boyce *et al.*, 2003; Cicchetti y Chaintreau, 2009).

En orden de importancia, las cuatro características que definen la calidad de las vainas son: el aroma, la cantidad de vainillina, el tamaño de la vaina y el contenido de humedad. La vainilla de mejor calidad es flexible y de aspecto brillante, lo cual indica un adecuado contenido de humedad que, de acuerdo con la NMX-FF-074-SCFI-2009, oscila entre 25 y 38 %, mientras que el contenido mínimo de vainillina es del 2.0 %.

Debido a la gran demanda nacional y mundial de vainilla natural y a la falta de información relacionada con los diferentes tipos de empaque y su relación con los cambios en la calidad, el presente trabajo tuvo por objetivo evaluar diferentes tipos de empaque (accesibles a los pequeños y medianos productores-beneficiadores) y su efecto en las características organolépticas de la vainilla y cambios durante diferentes tiempos de almacenamiento.

La vainilla beneficiada que se analizó fue de la especie *Vanilla planifolia* L. Andrews calidad Extra de la cosecha de 2013 para la primer fase de la investigación y procedente de cuatro beneficios ubicados en los municipios de Papantla y San Rafael en el Estado de Veracruz, México; y de la cosecha 2014 para la segunda fase, procedente de dos beneficios del municipio de Papantla. Los empaques empleados fueron bolsas comerciales de celofán, polietileno de baja densidad, y para empacado al vacío.

II. OBJETIVOS

General

Evaluar la efectividad de diferentes materiales de empaque en vainas de vainilla procedentes de cuatro beneficios de la zona del Totonacapan, basados en el contenido de humedad y compuestos aromáticos principales.

Específicos

- Conocer la calidad organoléptica de la vainilla procedente de diferentes beneficios de la zona productora del Totonacapan, Veracruz.
- Evaluar el efecto de los diferentes empaques y tiempo de almacenamiento sobre las características organolépticas de la vainilla.
- Proponer las mejores condiciones de empaque y tiempo de almacenamiento para vainilla, evitando las pérdidas de humedad y compuestos volátiles.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Características de la Vainilla

La vainilla es una planta monocotiledónea de la familia *Orquidaceae*, la cual comprende 788 géneros y 18,500 especies. El género en sí comprende más de 100 especies, pero la *Vanilla planifolia* L. Andrews, es la única orquídea de importancia económica que produce frutos comestibles, llamadas silicuas, que son unas cápsulas que una vez beneficiadas contienen un principio aromático conocido como vainillina (Dignum *et al.*, 2001).

La planta de vainilla es perene, trepadora, de tallo cilíndrico y flexible, formado por nudos de 5 a 15 cm de longitud y de 1 a 2 cm de diámetro, dispuestos en zig-zag; tiene raíces adventicias, tanto en la parte subterránea como en la parte aérea del tallo, brotando de los entrenudos. Las hojas son flexibles, sésiles, elípticas, lanceoladas, suculentas, y se encuentran de manera alterna a lo largo del tallo.

Las inflorescencias son simples de 8 cm de longitud, con 15 o 20 botones florales blanco amarillento de un solo estambre, tres sépalos y tres pétalos, que abren en intervalos de 3 flores al mismo tiempo (Figura 1a). La flor debe fecundarse manualmente para asegurar el amarre de los frutos para la producción comercial (Domínguez, 2005; Odoux y Grisoni, 2011) (Figura 1b).

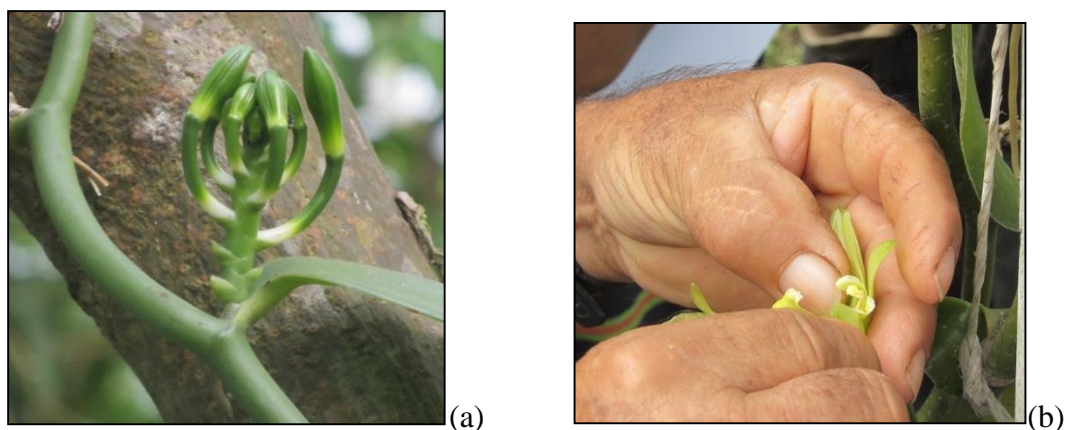


Figura 1. Inflorescencia de la planta de vainilla (a) y polinización manual de flores (b)

La planta de vainilla tiene crecimiento vegetativo durante los primeros dos años, al tercer año inicia su producción (Hernández, 2011). El fruto es una silicua dehiscente y unilocular de 15-25 cm de longitud y un peso de 10-15 g (Odoux y Grisoni, 2011). Presenta tres costados cóncavos en forma cilíndrica verde, y de color café cuando se realiza el beneficiado, que es cuando se comercializa. Las vainas se cosechan aproximadamente nueve meses después de la polinización (Domínguez, 2005; García, 1999; Naturland, 2000) (Figura 2).



Figura 2. Vainas verdes de *Vanilla planifolia*. L. Andrews.

Puesto que las semillas son muy pequeñas, presentan un embrión indiferenciado, tegumentos duros y contienen inhibidores de germinación (Azofeifa-Bolaños *et al.*, 2014), la propagación para su explotación comercial se hace en forma asexual por medio de esquejes seleccionados de plantas sanas, cuyo tamaño varía de 60 a 100 cm de longitud o bien, tramos de ocho yemas de brotes vegetativos (Domínguez, 2005; Hernández y Sánchez, 2011).

3.2 Requerimientos Agroecológicos

La vainilla es una especie que prospera en un clima tropical cálido húmedo, con temperaturas óptimas para el cultivo entre 20–30 °C con una humedad relativa mayor de 80 %. La altitud propicia oscila de 0–600 msnm con una precipitación media anual de 2000 a 3000 mm con

una distribución homogénea durante todo el año y de dos a tres meses relativamente secos para estimular la floración de la planta (Hernández, 2011).

Los suelos deben tener un pH de 5 a 7, con buen drenaje y contenido de materia orgánica mayor al 20 %. Además, necesita un sombreado de 50 % la mayor parte del año; en días nublados y con lluvia disminuye a 30 o 35 % para evitar condiciones favorables al desarrollo de enfermedades, y en época seca con sol intenso, es recomendable una sombra de 50 a 70 % que permita conservar la humedad del suelo y del aire (Domínguez, 2005; Hernández, 2011).

Para el soporte de la planta se necesitan árboles tutores que dan sostén, sombra y materia orgánica. Se usan principalmente árboles de naranjo, ya que sus ramas son resistentes y crecen lateralmente, de manera que permiten soportar una buena cantidad y distribución de bejucos, evitando el sombreado entre ellos; además su follaje proporciona buena luminosidad durante todo el año, lo que hace posible que la planta crezca rápido y produzca al segundo año de su plantación (Hernández, 2011).

3.3 Diversidad

De las 110 especies de vainilla del género *Vanilla* distribuidas en el mundo, sólo tres son las más cultivadas: *V. planifolia* Jackson ex Andrews, *V. pompona* Schiede y *V. tahitensis* J.W. Moore (Tapia-Ochoategui *et al.*, 2011).

La *V. planifolia* es la más importante desde el punto de vista económico, ecológico y social, es la única explotada para la industria y representa 95 % de la producción mundial (Azofeifa-Bolaños *et al.*, 2014). Se cultiva en México, en las islas del Océano Índico y en Indonesia. Esta especie, junto con la *V. pompona* Shiede o vainillón, tienen como centro de origen a México, Costa Rica y Belice (Domínguez, 2005, García, 1999). Dentro de la diversidad de *V. planifolia* se encuentran las denominadas: mansa o verde; rayada también conocida como de Tarro o de Acamaya; oreja de burro y la Cimarrona encontrada en la región del Totonacapan.

La *V. pompona* se cultiva en las Antillas menores, y la *V. tahitensis* se cultiva en la isla del mismo nombre y en otras islas de Polinesia (Naturland, 2000).

3.4 Importancia Económica Nacional y Mundial

Durante mucho tiempo la exportación de vainilla fue una fuente de divisas importante para México. A principios de la década de los 60's se obtuvo un rendimiento de 232 t de vainilla beneficiada colocándose en el segundo lugar a nivel mundial (FAOSTAT, 2014). Sin embargo, debido a los altos precios, la creciente producción de vainilla en África y Asia, y la introducción de vainilla sintética a bajos precios, elaborada con eugenol y guayacol, afectó la producción. Afortunadamente a principios de la década de 1980, surge en el mercado la tendencia de consumo de productos alimenticios naturales y el uso mínimo de insumos químicos, por lo que la demanda mundial de vainilla beneficiada empieza a incrementar (CAD Project, 2003; Domínguez, 2005; Naturland, 2000).

El mercado nacional no es competitivo con los mercados internacionales, ya que los volúmenes de producción son muy bajos en comparación con países productores como Madagascar e Indonesia (Dignum *et al.*, 2001; FAOSTAT, 2014). A pesar de que las referencias más fidedignas mencionan a México como uno de los centros de origen de la vainilla, que en algún momento ocupó el primer lugar en su producción y comercialización a nivel internacional, según datos de FAOSTAT (2014), para el año 2012 ocupaba el quinto lugar a nivel mundial con solo el 4 % (390 t), después de Papúa Nueva Guinea (4.1 %), China (13.7 %), Indonesia (34.5 %) y Madagascar (35.5 %) (FAOSTAT, 2012) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Producción de vainilla a nivel mundial.

País	Producción (Toneladas)						
	1061	1970	1980	1990	2000	2010	2012
Madagascar	700	1200	977	1000	880	2900	3500
Indonesia	100	250	761	1262	1681	2600	3400
China				371	650	1300	1350
Papúa Nueva Guinea						425	400
México	232	49	21	195	255	395	390
Turquía					100	270	290
Tonga		10	8	47	130	202	202
Uganda	10	10	10	7	33	250	170
Polinesia Francesa	193	15	3	15	35	44	60
Comoros	90	144	164	250	140	66	42
Malawi				14	20	20	20
Guadalupe	4	2	3	8	17	12	11
Zimbawe				20	10	16	11
Kenia			10	9	8	16	10
Reunión	45	53	23	10	25	13	8
Islas Cook	2	2	3	3			
Seychelles	4	1					

Fuente: Elaboración propia con información de <http://faostat.fao.org>

De acuerdo a los datos del Sistema de Información Agropecuaria de Consulta (SIACON, 2014), la superficie nacional cultivada con vainilla en el 2013, fue de 1,053.55 ha, con una producción de 462.8 t de vainilla verde, y un rendimiento promedio de 0.48 t ha⁻¹. El principal estado productor de vainilla es Veracruz, que aporta 71.8 % de la producción nacional; en orden de importancia siguen Puebla, Oaxaca y San Luis Potosí, que en conjunto aportan alrededor del 30 % de la producción total, y Chiapas participa con sólo 1 ha sembrada (Cuadro 2) (SIACON, 2014).

Cuadro 2. Producción de vainilla a nivel nacional.

Estado	Superficie Sembrada (ha)	Superficie Cosechada (ha)	Producción (t)	Rendimiento (t ha⁻¹)
Veracruz	740.00	676.00	332.56	0.49
Puebla	71.00	71.00	56.55	0.80
Oaxaca	145.00	145.00	51.56	0.36
San Luis Potosí	96.55	76.55	22.20	0.29
Chiapas	1.00			

Fuente: Elaboración propia con información de <http://www.siap.gob.mx/vainilla/>

La producción anual mundial está limitada y tiende a variar debido a cambios en las condiciones climáticas, enfermedades, caída prematura del fruto, nutrición deficiente, escasa transformación para la comercialización y la inestabilidad del mercado. Las causas que ocasionan la baja producción de vainilla en México son: presencia de enfermedades; manejo deficiente de los cultivos; desconocimiento de los tipos de vainilla; falta de inversión de capital en el establecimiento del vainillal y en su mantenimiento; caída prematura de fruto y el manejo de una tecnología adecuada a las características agroclimáticas de las regiones de cultivo.

3.5 Usos de la Vainilla

La vainilla es la única orquídea que se cultiva sin propósitos ornamentales. Junto con los aromas cítricos y de menta, los aromas de vainilla son los más importantes en la industria alimenticia. Es considerada a nivel mundial, el saborizante natural de mayor importancia en industrias como la refresquera, tabacalera, repostería, cosmética y perfumería, y farmacéutica; y tiene propiedades antioxidantes, antimutagénicas, antimicrobianas, anticancerígenas y afrodisiacas; y puede ser usada como tratamiento natural contra la ansiedad (Bythrow, 2005; Damirón, 2004; Dignum *et al.*, 2001; Dong *et al.*, 2014; Maskeri *et al.*, 2012; Przygodzka *et al.*, 2014; Sinha *et al.*, 2008).

Las vainas tienen un alto valor comercial y se usan completas, ya sea íntegras, rajadas o en infusiones alcohólicas. El mercado europeo demanda la vainilla como saborizante en jaleas de frutas o molida en azúcar. La industria de helados usa el extracto de vainilla a gran escala, y

también se usa en la elaboración de chocolates, confitería, alimentos horneados, bebidas alcohólicas y no alcohólicas, en la industria farmacéutica, y también en perfumería.

En México, la producción de vainilla se destina a la obtención de extracto alcohólico (35 % alcohol), el cual se emplea en la fabricación de licores, helados, refrescos, dulces, medicinas y perfumes (García, 1999; CAD Project, 2003).

Aunque sus principales usos se encuentran en la industria alimentaria, también se emplea en la industria de cosméticos y perfumería; en la industria farmacéutica para enmascarar el sabor amargo de los medicamentos y como medicamento actuando como estimulante estomacal, antídoto contra el veneno de plantas naturales, para contrarrestar la fiebre y aliviar el dolor de estómago y como diurético. Inclusive la vainilla actúa como estimulante aromático, digestivo, aperitivo y tónico cardíaco. Asimismo, se le puede emplear para aromatizar aceites que sirvan para sazonar ensaladas y pescado, y como auxiliar para el histerismo.

También se considera dentro de la industria tabacalera como aromatizante de cigarrillos y puros; e incluso se utiliza la vaina en actividades artesanales, pues tiene la propiedad de ser decorativa y aromatizante, además de terapéutica y repelente (De La Cruz *et al.*, 2009).

En cuanto a la vainilla de Tahití (*V. tahitensis*) además de contener vainillina contiene piperonal que se utiliza sobre todo en la fabricación de perfumes (Naturland, 2000; CAD Project, 2003).

3.6 Índices de Calidad

De acuerdo con la Norma NMX-FF-074-SCFI-2009 (Productos no industrializados para uso humano - Vainilla-(*Vanilla fragrans* (Salisbury) Ames - especificaciones y métodos de prueba), la calidad aromática de la vainilla en México está en función del contenido de humedad y la concentración de vainillina, y se divide en 4 grados de calidad: Extra, Categoría I, II y III (Cuadro 3).

Cuadro 3. Clasificación de vainas en base de los contenidos de humedad, vainillina y tamaño.

Especificación	Grado de calidad					
	Extra	Categoría I		Categoría II		Categoría III
	Gourmet	Gourmet	Ordinaria	Gourmet	Ordinaria	Ordinaria
% Humedad	25 – 30	25 – 30	20 – 24	25 - 30	20 – 24	15 - 20
% Vainillina	2.0 – 2.4	2.0 – 2.4	1.6 - 2.0	2.0 – 2.4	1.6 - 2.0	1.6
Tamaño (cm)	≥ 20	≥ 17.5		≥ 15		< 15

3.7 Proceso de Beneficio de la Vainilla

La vaina de vainilla carece de aroma al ser cosechada, por lo que debe someterse a un laborioso proceso artesanal que involucra numerosas manipulaciones para que adquiera los aromas deseados, brillo, color marrón, consistencia ligera, modificaciones en la textura y sea estable microbiológicamente (Odoux y Grisoni, 2011; Tapia-Ochoategui *et al.*, 2011).

El proceso de beneficiado no sólo involucra la deshidratación de la vaina sino cambios en la microestructura y reacciones enzimáticas, que llevan a la formación de aromas y sabores, siendo la enzima β -glucosidasa la más importante (Dignum *et al.*, 2002).

El proceso del beneficio difiere entre regiones o países, sin embargo generalmente consiste en cuatro pasos: escaldado o matado, soleado/sudado, secado y acondicionamiento (Dignum *et al.*, 2001; Odoux y Grisoni, 2011). El proceso de beneficiado de la vainilla verde en México se lleva a cabo por medio de dos métodos: el curado al sol, que consiste en exponer las vainas a la luz del sol para su secado parcial y el curado al horno. El objetivo de ambos es promover la actividad enzimática, aunada a una deshidratación paulatina para la formación de aromas y obtener un producto de fácil conservación. El proceso completo se lleva a cabo aproximadamente en 3 o 4 meses (García, 1999; Dignum *et al.*, 2002; Waliszewski *et al.*, 2009).

Los principales pasos del beneficiado de la vainilla son:

- Recepción de la materia prima: Al llegar la vainilla verde en madurez fisiológica se procede a pesarla y colocarla en montones.
- Despezonado: Consiste en desprender el pedúnculo floral.
- Clasificación: Se separa de acuerdo a la madurez, color, tamaño y forma de la vaina.
- Encajonado: Se coloca en cajones de madera, generalmente de 60 cm de largo por 30 cm de alto, para facilitar su manejo.
- Matado: El objetivo de este paso es detener el desarrollo vegetativo de las vainas verdes, e iniciar la desintegración del tejido de la pared, alterando la membrana celular, permitiendo el contacto entre el sustrato y enzimas. La mayoría de las veces se realiza sumergiendo las vainas en agua caliente durante 1 o 2 minutos.
- Horneado: Si se realiza el matado por este medio, se introducen los cajones en hornos, cuya temperatura inicial es de 35–40 °C, elevándola paulatinamente hasta alcanzar 60 °C, durante 24–48 h.
- Sudado: Las vainas son sacadas de los cajones y transportadas a patios de secado, donde se acomodan sobre petates u otra superficie durante las horas de mayor incidencia de rayos solares (Figura 3). Después de 10 a 22 ciclos de sudado - asoleado, se envuelven en mantas para mantener el calor y la continua fermentación permitiendo, con estas condiciones de alta humedad y temperatura, la actividad de las enzimas glucosidasa y oxidasas para el desarrollo de compuestos aromáticos y adquieran un color café oscuro y una consistencia suave y flexible.
- Selección: Las vainas se dividen en sencillas o de cuerpo. Las primeras son las que presentan una menor consistencia por haberse cortado tiernas.
- Secado: Se realiza a temperatura ambiente a no más de 45 °C, en cuartos de secado ventilados, con el fin de prevenir la formación de hongos y reducir el contenido de humedad (Figura 4). Se extiende aproximadamente un mes, hasta que las vainas hayan reducido gradualmente su humedad de 85 % a niveles finales de 25-38 % (Kumar *et al.*, 2010; Odoux y Grisoni, 2011). La culminación del secado ocurre cuando por el cambio de color en las vainas del café oscuro que presentaba al ocurrir el sudado a color marrón, obteniendo una apariencia brillante y aplanada, conservando flexibilidad. Este proceso dura aproximadamente de dos a cuatro semanas.

- **Acondicionamiento:** Las vainas secas se depositan en cajones o espigueros a temperatura ambiente, en cuartos bien ventilados en donde se revisa para detectar incidencia de plagas o enfermedades. En esta etapa, la vainilla puede durar en observación hasta 15 días y de no presentarse ninguna alteración, se deposita nuevamente en los cajones durante 30 o 45 días para una segunda revisión. Si presenta indicios de insectos u hongos, se procede a darle más sudores y asoleos. Esta etapa es la que requiere mayor cantidad de tiempo (meses), y es cuando ocurren reacciones químicas como la esterificación y degradación oxidativa.
- **Enmazado:** Una vez clasificadas en base a parámetros de calidad como tamaño, color, forma y textura, se forman mazos o rollos de un diámetro de 14 cm.
- **Envasado:** Los mazos se envasan en latas forradas con papel encerado con capacidad de 40 mazos. Se etiquetan las latas, registrando su peso y clase, se tapan y se empacan en cajas de madera. Si es para exportación, se realiza en cajas de cartón reforzadas. Si las vainas se empacan en pequeñas unidades destinadas al consumidor final, su envase debe protegerlas de la pérdida de aroma y absorción de olores y sabores indeseados, impedir tanto la pérdida como la absorción de humedad y ofrecer posibilidades de fácil apertura y cierre de modo que las vainillas en el envase se mantengan frescas (García, 1999; Havkin-Frenkel *et al.*, 2004; Odoux y Grisoni, 2011; Waliszewski *et al.*, 2009).



Figura 3. Asoleado de vainas en patio de secado.



Figura 4. Cuarto de secado de vainas seleccionadas.

3.8 Composición de la Vainilla Beneficiada

La fragancia de la vainilla surge de la vainillina la cual es su principal constituyente a nivel cualitativo y cuantitativo; sin embargo, la presencia de pequeñas cantidades de decenas de otros compuestos aromáticos menores en la vaina proporcionan las cualidades distintivas que no se pueden encontrar en los productos sintéticos de menor costo (Dong *et al.*, 2014; García, 1999; Sagrero-Nieves y Schwartz, 1988).

El aroma natural de la vainilla es una mezcla de más de 200 compuestos volátiles en *V. planifolia* incluyendo hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, lactonas, ácidos, terpenoides, éteres, y compuestos fenólicos y carbonílicos (Odoux y Grisoni, 2011). De esos compuestos volátiles, cuatro compuestos son reconocidos como indicadores de calidad comercial debido a las altas concentraciones y su participación cualitativa y cuantitativa en el aroma ya que representan el 97 % del total, siendo: (a) vainillina (3-metoxi-4-hidroxibenzaldeído) en concentraciones de 1,000 - 20,000 ppm, (b) *p*-hidroxibenzaldehído (2,000 ppm), (c) ácido vainillínico (ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzóico) (2,000 ppm) y (d) ácido *p*-hidroxibenzóico (200 ppm) (Bütehorn y Pyell, 1996; Cicchetti y Chaintreau, 2009; Kumar *et al.*, 2010; Salazar-Rojas *et al.*, 2011), los cuales se encuentran en forma de

glucósidos sin aroma en las vainas verdes, por lo que es necesaria su hidrólisis para lograr su desarrollo aromático (Odoux y Grisoni, 2011) (Figura 5).

La vainillina y el *p*-hidroxibenzaldehído son compuestos que están altamente correlacionados con la criterio de vainillina, lo cual es positivo y deseable; mientras que el ácido vainillínico y el ácido 4-hidroxibenzóico, junto con otros compuestos como el guayacol, están altamente relacionados con el criterio ahumado/fenólico, que es un factor indeseable (Odoux y Grisoni, 2011).

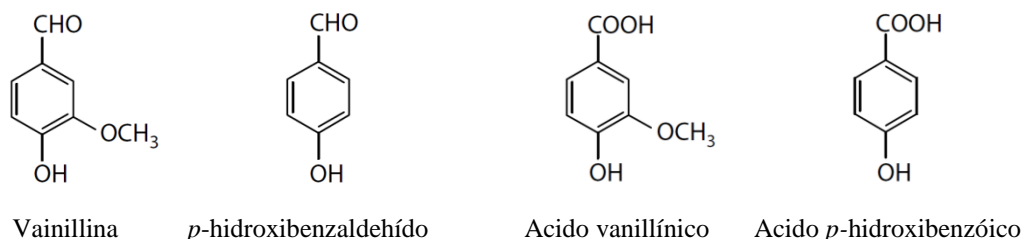


Figura 5. Estructuras químicas de los cuatro compuestos mayoritarios en vainas curadas de vainilla.

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC por sus siglas en inglés High-Performance Liquid Chromatography) es la técnica más poderosa y preferida para la cuantificación de moléculas orgánicas debido a su simplicidad, sensibilidad, precisión y selectividad. Los métodos HPLC pueden adaptarse de acuerdo al problema que se tenga usando varias estrategias tales como diferentes tipos de fases estacionarias, fases móviles y un amplio rango de detectores selectivos. Esto hace a la HPLC adecuada para análisis de componentes activos en extractos naturales.

Se han reportado varios métodos HPLC sobre separación y determinación cuantitativa de vainillina y otros compuestos fenólicos relacionados en el extracto natural y artificial de vainilla (Boyce *et al.*, 2003; Jager *et al.*, 2007; Waliszewski *et al.*, 2006). Para la separación de varios componentes de la vainilla, las condiciones cromatográficas del HPLC incluyen generalmente el uso de una columna C18 de fase reversa. Además de la columna, la eficiencia del análisis HPLC depende también de la selección de la fase móvil. Diversos reportes muestran que el tiempo de elución de vainillina llega hasta los 36 minutos a longitudes de onda que van de 254 a 340 nm, además se ha aplicado con éxito para el análisis de la

composición de diferentes especies de vainilla y para detectar la posible adulteración en saborizantes de vainilla (Sinha *et al.*, 2008).

La vainillina (3 metoxi-4hidroxibenzaldehído) es el mayor compuesto de las vainas curadas de vainilla, usada ampliamente en la industria alimenticia y no alimenticia. Este compuesto fenólico es de interés por dos razones: la primera es por su relación con la ruta del fenilpropanoide y con los mecanismos de formación de ácidos benzoicos, incluyendo el ácido 4-hidroxibenzóico y el ácido salicílico (ácido 2-hidroxibenzóico); y la segunda es por su importancia comercial y la posibilidad de producirla por biotecnología (Walton *et al.*, 2003).

Una de las características más importantes en *V. planifolia* es la actividad de la glucosidasa y su alto contenido de glucovainillina (Odoux y Grisoni, 2011), la cual es el precursor directo de la vainillina, y la calidad final depende de su contenido en la vaina verde (Dignum *et al.*, 2002; Odoux y Grisoni, 2011; Van Dyk *et al.*, 2014); lo cual indica que la calidad aromática de las vainas curadas será mayor si el proceso de beneficiado inicia con vainas maduras con alto contenido de glucovainillina (Dignum *et al.*, 2001). Sin embargo, la actividad de la β -glucosidasa es variable durante el curado, por lo que la formación del aroma aparte de ser un proceso enzimático involucra la actividad de microorganismos (Dignum *et al.*, 2004).

La hidrólisis de los glucósidos, precursores de los compuestos aromáticos, es la reacción más conocida en el desarrollo de la calidad aromática de la vainilla durante el curado, por lo que una aglicona con propiedades olfativas se deriva de un glucósido sin aroma. Esta reacción se logra tanto químicamente en condiciones ácidas, como enzimática empleando una glicosidasa (β -glucosidasa, si el azúcar es glucovainillina). Esta enzima tiene mayor afinidad con los glucósidos de vainillina, *p*-hidroxibenzaldehído y ácido ferúlico, que con los de ácido vainillínico, guayacol y creosol; y su actividad es mayor seis o siete meses después de la polinización (Dignum *et al.*, 2004; Odoux y Grisoni, 2011).

Los compuestos glicosilados, precursores del sabor, se encuentran en el interior de la vaina, en donde son secretados en la región placentar alrededor de las semillas, mientras las enzimas hidrolíticas, que catalizan la liberación de precursores de sabor, se localizan principalmente en el exterior. La vainillina y sus intermediarios en la ruta biosintética de la vainillina (ácido 4-cumárico, 4-hidroxibenzaldehído y 3,4-dihidroxibenzaldehído) se producen en el tejido blanco

interno, alrededor de los pelos glandulares, rodeando las semillas. Su acumulación, está correlacionada con el crecimiento de las células ciliadas especiales (Havkin-Frenkel *et al.*, 2004).

La distribución de la glucovainillina a lo largo de la vaina es: 40 % en el extremo final, 40 % en la porción central, y 20 % en el extremo del tallo. Mientras que la β -glucosidasa se localiza principalmente en la región externa, lo que refuerza la necesidad de un adecuado matado para establecer un contacto entre las enzimas y sus correspondientes sustratos, que resulta de la desorganización de tejidos (Havkin-Frenkel *et al.*, 2004).

Existen evidencias de que la ruta de vainillina- β -D-glucósido puede proceder del ácido 4-cumárico vía 4-hidroxibenzaldehído, con la formación del glucósido aunque no necesariamente como paso final. Además de esta ruta propuesta por Walton *et al.* (2003), en las últimas cuatro décadas se han propuesto diferentes rutas biosintéticas de la vainillina.

Una de ellas considera al ácido hidroxicinámico como precursor del β -glucósido. Zenk (1965) citado por Walton *et al.* (2003), y Odoux y Grisoni (2011) reportan que la vainillina y el ácido vainillínico se derivan del ácido ferúlico, reduciendo su cadena de tres carbonos a sólo uno (Figura 6), lo que se conoce como ruta del ferulato (Havkin-Frenkel y Belanger, 2007). Funk y Brodelius en 1990 proponen que el ácido caféico a través de una serie de metilaciones, una demetilación y una glucosilación produce ácido vainillínico (Figura 7), y este se reduce posteriormente a vainillina.

Una evidencia más propuesta por Kanisawa *et al.* (1994), citado por Odoux y Grisoni (2011) indica que la biosíntesis de vainillina puede ser más compleja, relacionando los niveles de compuestos fenólicos simples y sus glucósidos (Figura 8). En esta ruta el acortamiento de la cadena de tres carbonos ocurre a partir del ácido cumárico para dar lugar al 4-hidroxibenzaldehído, el cual es hidroxilado y metilado para formar vainillina (Odoux y Grisoni, 2011).

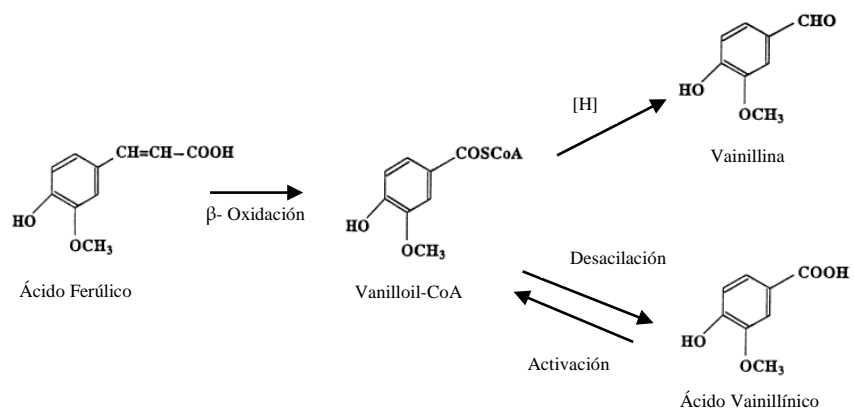


Figura 6. Ruta biosintética de la vainillina propuesta por Zenk (1965).

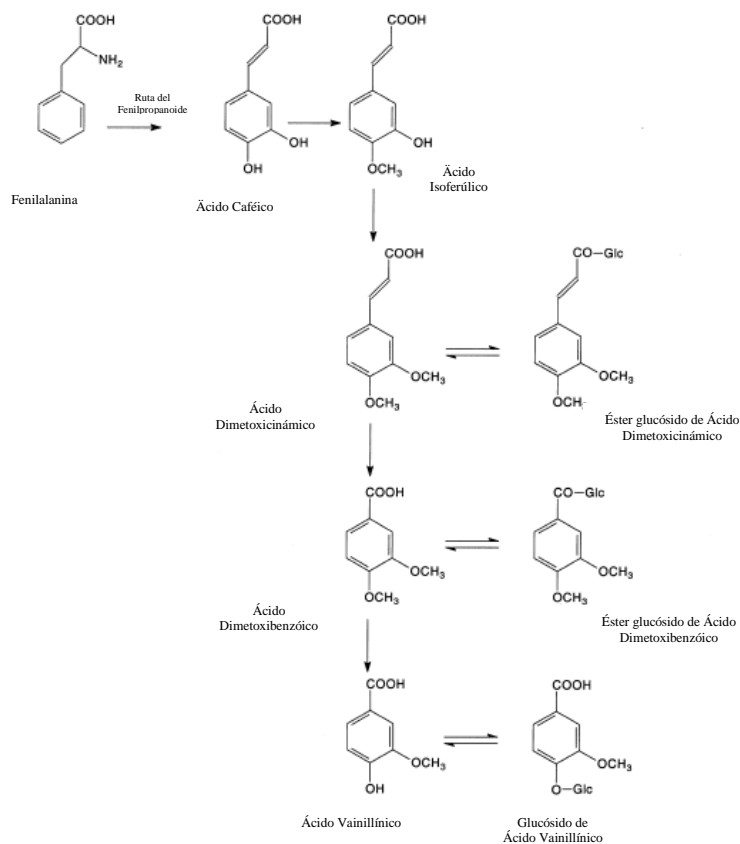


Figura 7. Ruta propuesta por Funk y Brodelius (1990) a partir del ácido ferúlico.

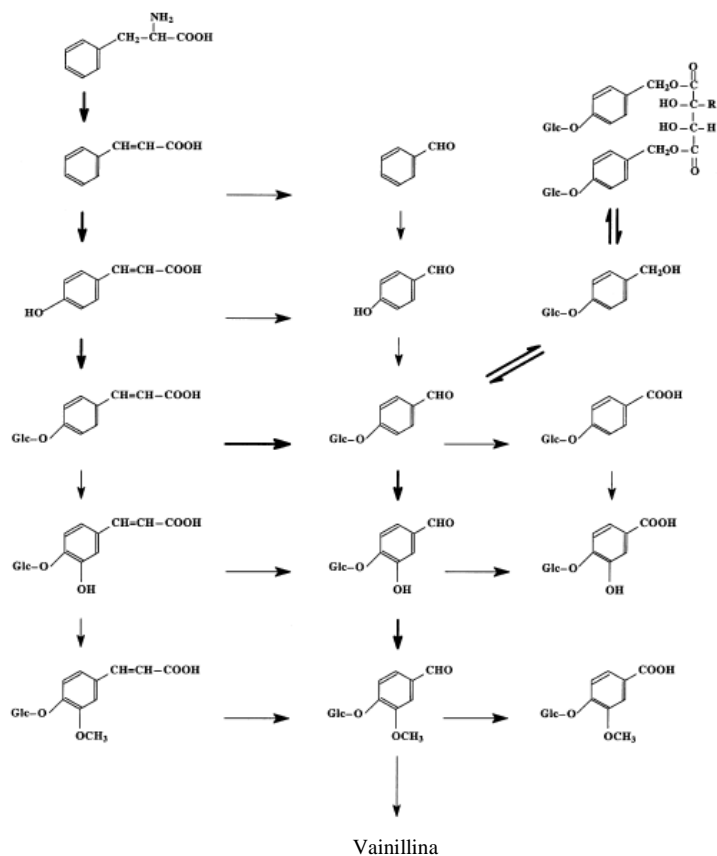


Figura 8. Ruta biosintética propuesta por Kanisawa *et al.* (1994), con relaciones entre ácido *p*-hidroxicinámico, *p*-hidroxibenzaldehído y *p*-hidroxibenzoato.

Los componentes más importantes en la parte volátil tienen un anillo aromático y se derivan de la ruta del fenilpropanoide. Muchos se encuentran en el fruto verde en forma de glicósidos y no tienen propiedades olfativas (Odoux y Grisoni, 2011).

Además de las teorías mencionadas, Havkin-Frenkel y Belanger (2007) mencionan que la vainillina es producto de la ruta del ácido shikímico, en la cual la fenilalanina o tirosina sufren una deaminación a C6-C3 fenilpropanoide, precursor de la vainillina (Figuras 9 y 10). En estas rutas, el fenilpropanoide es seguido por una hidroxilación y metilación del anillo aromático para formar vainillina, lo que se conoce como la ruta del benzoato.

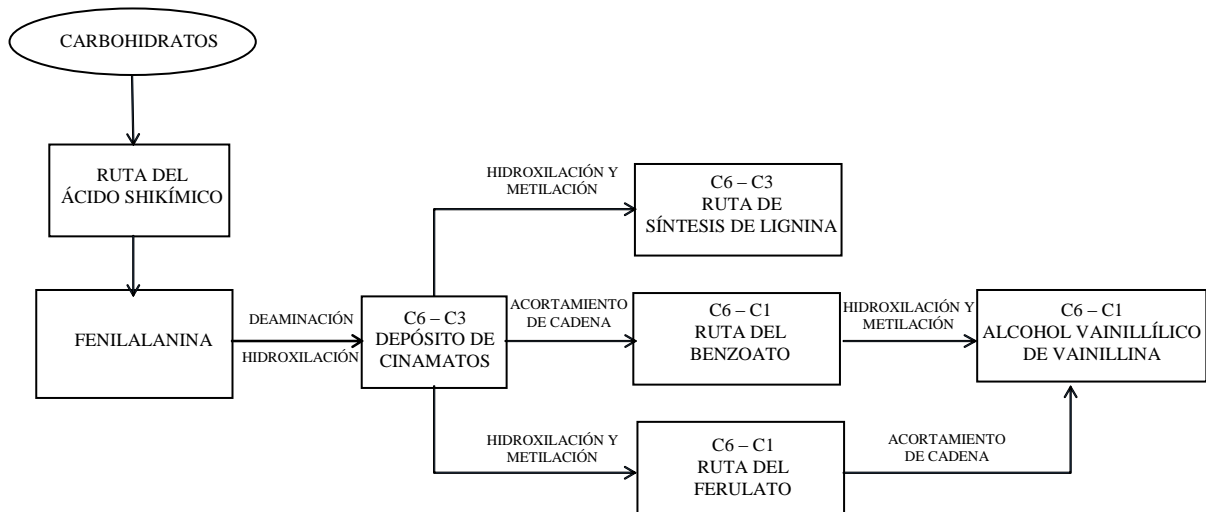


Figura 9. Ruta del ferulato y benzoato (Havkin-Frenkel y Belanger, 2007).

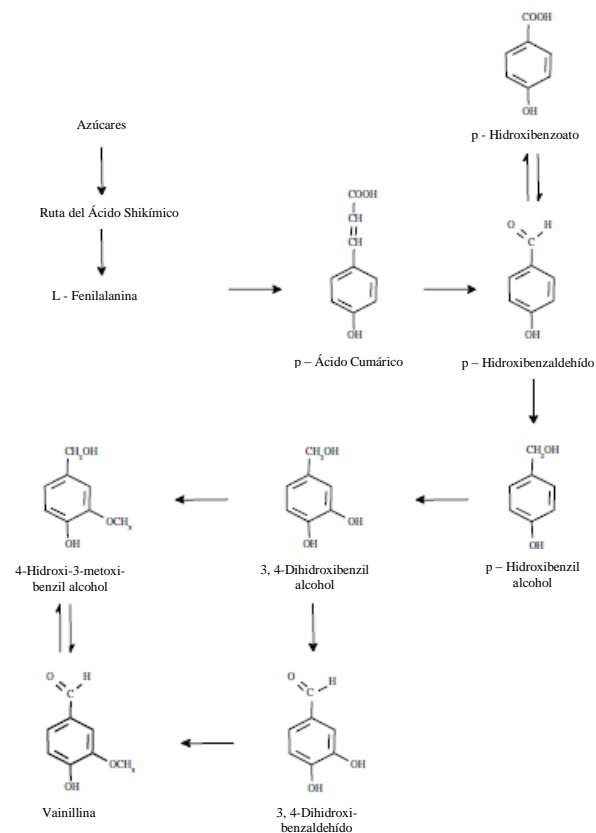


Figura 10. Ruta biosintética de la vainillina propuesta por Havkin-Frenkel *et al.* (1996).

3.9 Empaques

El empaque en atmósferas modificadas es una técnica de conservación usada principalmente para prolongar la vida de anaquel de diversos alimentos, y los principales materiales utilizados son las películas plásticas. La característica de barrera de las películas de materiales poliméricos es su coeficiente de permeabilidad, bajo condiciones específicas de presión y temperatura, por unidad de espesor y de superficie. En estructuras constituidas por películas de varios polímeros (multicapas), la permeabilidad se aproxima a la de la capa menos permeable. En la práctica, la permeabilidad es un parámetro básico para la evaluación objetiva de las propiedades de barrera y, por tanto, para la definición de la aptitud para el envasado de los materiales plásticos (González-Aguilar *et al.*, 2005).

Muchas películas no ofrecen todas las propiedades requeridas para un empaque, en muchas ocasiones para proporcionar películas con un rango amplio de propiedades físicas y bajos costos, muchas películas individuales se combinan para obtener películas multicapa a través de procesos como laminación, recubrimiento, metalización y coextrusión para formar estructuras complejas o laminadas, donde cada polímero proporciona una función específica como fuerza, transparencia y mejora en la transmisión de gas (Mangaraj *et al.*, 2009).

Existen más de 200 polímeros básicos, pero sólo unos pocos se consideran importantes comercialmente. Las principales familias de plásticos utilizados en la práctica son: polietilenos, poliolefinas, polímeros estirénicos, polímeros vinílicos, poliésteres y poliamidas (González-Aguilar *et al.*, 2005).

Los polietilenos son los polímeros de mayor utilización práctica en el envasado de alimentos. Existen polietilenos de baja densidad (LDPE: Low-Density Polyethylene), de media densidad (MDPE) y de alta densidad (HDPE: High-Density Polyethylene); así como polietilenos lineales de baja densidad (LLDPE: Linear Low-Density Polyethylene) y polímeros de ultra baja densidad (ULDPE). Los LDPE son los más baratos y comunes, elaborados por polimerización de etileno, son relativamente transparentes y es necesario el sellado térmico. Los HDPE son polímeros de adición lineal de etileno, más rígidos que los LDPE., aunque todavía flexibles y con poca transparencia.

3.10 Aplicaciones de Atmósferas Modificadas y Películas Plásticas

Existen diversas investigaciones en las cuales se han aplicado diferentes tipos de empaques con atmósferas modificadas a múltiples y variados productos tanto hortícolas como chícharo (Elwan *et al.*, 2015), chile (Chitravathi *et al.*,2015; Ornelas-Paz *et al.*,2012; Singh *et al.*, 2014), tomate (Majidi *et al.*,2014), alcachofa (Ghidelli *et al.*,2015), espárragos (Li y Zhang, 2015; Simón y Gonzalez-Fandos, 2011), zanahoria (Liu *et al.*,2014), cilantro (Waghmare y Annapure, 2015) calabaza (Manjunatha y Anurag, 2014), berenjena (Ghidelli *et al.*,2014); como también frutícolas, por ejemplo pèrsimo (Cia *et al.*,2006), cerezas (Esturk *et al.*,2012; Padilla-Zakour *et al.*,2004), coco (Luengwilai *et al.*, 2014), granada (Caleb *et al.*, 2013), uva de mesa (Lichter *et al.*,2005), uva pasa y ciruela pasa (Halouat *et al.*,1998), entre otros.

Así como también en cárnicos tales como chorizo (Fernández-Fernández *et al.*, 2002), pechuga de pavo (Nair *et al.*, 2015), y carne fresca (Blana y Nychas *et al.*, 2014; Thoden van Velzen y Linnemann *et al.*, 2008).

Dichos estudios se han realizado empleando sólo atmósferas modificadas o su combinación con otras técnicas, como recubrimientos, manejo de temperaturas o sustancias preservadoras para evaluar su efecto en el crecimiento microbiano, ampliación de vida de anaquel o pérdida de peso.

IV. LITERATURA CITADA

- Azofeifa-Bolaños J. B., Paniagua-Vásquez A. y García-García J. A. 2014. Importancia y desafíos de la conservación de *Vanilla* spp. (Orquidaceae) en Costa Rica.
- Blana V. A. and Nychas G. E. 2014. Presence of quorum sensing signal molecules in minced beef stored under various temperature and packaging conditions. *International Journal of food Microbiology*. 173: 1-8.
- Boyce M. C., Haddad P.R. and Sostaric T. 2003. Determination of flavor components in natural vanilla extracts and synthetic flavourings by mixed micellar electrokinetic capillary chromatography. *Analytica Chimica Acta*. 485:179-186.

- Bütehorn U. y Pyell U. 1996. Micellar electrokinetic chromatography as a screening method for the analysis of vanilla flavourings and vanilla extracts. *Journal of Chromatography*. 736: 321-332.
- Bythrow J. D. 2005. Vanilla as a Medicinal Plant. *Semin Integr Med*. 3: 129-131.
- Caleb O. J., Opara U. L., Mahajan P. V., Manley M., Mokwena L. and Tredoux A. G. J. 2013. Effect of modified atmosphere packaging and storage temperature on volatile composition and postharvest life of minimally-processed pomegranate rils (cvs. ‘Acco’ and ‘Herskawitz’). *Postharvest biology and Technology*. 79: 54-61.
- Cia P., Benato E. A., Sigrist J. M. M., Sarantopóulos C., Oliveira L. M. and Padula M. 2006. Modified atmosphere packaging for extending the storage life of ‘Fuyu’ persimmon. *Postharvest Biology and Technology*. 42: 228-234.
- Colombia Alternative Development (CAD) Project. 2003. Manual de Fitoprotección y Análisis de plaguicidas. Cultivo: Vainilla (*Vanilla planifolia*). Fundación Chemonics Colombia. Colombia. 22 p.
- Chitravathi K., Chauhan O. P. and Raju P. S. 2015. Influence of modified atmosphere packaging on shelf-life of green chillies (*Capsicum annuum* L.). *Food Packaging and Shelf Life*. 4: 1-9.
- Cicchetti, E. and Chaintreau, A. 2009. Quantitation of the main constituents of vanilla by reverse phase HPLC and ultra-high-pressure-liquid chromatography with UV detection: Method validation and performance comparison. *J. Sep. Sci*. 32: 3043-3052.
- Damirón V. R. 2004. La vainilla y su cultivo. Dirección General de Agricultura y Fitosanitaria del Estado de Veracruz. 50 p.
- De la Cruz M. J., Rodríguez J. G. C. and García H. S. 2009. Vanilla: Post-harvest Operations. 50 p.
- Dignum M. J. W., Kerler J. and Verpoorte, R. 2001. Vanilla production: Technological, chemical, and biosynthetic aspects. *Food Reviews International* 17: 199-219.
- Dignum M. J. W., Kerler J. and Verpoorte, R. 2002. Vanilla curing under laboratory conditions. *Food Chemistry* 79: 165-171.
- Dignum M. J. W., Heijden R., Kerler J., Winkel C. and Verpoorte R. 2004. Identification of glucosides in green beans of *Vanilla planifolia* Andrews and kinetics of vanilla β -glucosidase. *Food Chemistry*. 85: 199-205.

- Domínguez G. R. 2005. Crecimiento y niveles nutrimentales en *Vanilla planifolia*. Tesis de Maestría en Ciencias en Edafología. Texcoco, Edo. de México. México.
- Dong Z., Gu F., Xu F. and Wang Q. 2014. Comparison of four kinds of extraction techniques and kinetics of microwave-assisted extraction of vanillin from *Vanilla planifolia* Andrews. *Food Chemistry*. 149: 54-61.
- Elwan M. W. M, Nasef I. N., El-Seifi A. K., Hassan M. A. and Ibrahim R. E. 2015. Storability, shelf life and quality assurance of sugar snap peas (cv. Super sugar snap) using modified atmosphere packaging. *Postharvest Biology and Technology*. 100: 205-2011.
- Esturk O., Ayhan Z. and Ustunel M. A. 2012. Modified atmosphere packaging of 'Napoleon' cherry: Effect of packaging material and storage time on physical, chemical, and sensory quality. *Food Bioprocess Technol*. 5: 1295-1304.
- FAOSTAT. 2014. <http://faostat.fao.org> (Consultado: 1 de Noviembre de 2014).
- Fernández-Fernández E., Vázquez-Oderi M. L. and Romero-Rodríguez M. A. 2002. Sensory characteristics of Galician chorizo sausage packed under vacuum and under modified atmospheres. *Meat Science*. 62: 67-71.
- García R., M. I. 1999. Estudio del tipo de fibra presente en el residuo de la vaina de vainilla y de su incorporación a un producto de panificación (mantecadas). Tesis de Maestría en Ciencias con especialidad en Alimentos. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. México.
- Ghidelli C., Mateos M., Rojas-Argudo C. and Pérez-Gago M. B. 2014. Extending the shelf life of fresh-cut eggplant with a soy protein-cystine based edible coating and modified atmosphere packaging. *Postharvest Biology and Technology*. 95: 81-87.
- Ghidelli C., Mateos M., Rojas-Argudo C. and Pérez-Gago M. 2015. Novel approaches to control browning of fresh-cut artichoke: Effect of a soy protein-based coating and modified atmosphere packaging. *Postharvest Biology and Technology*. 99: 105-113.
- González-Aguilar, G. A.; Gardea, A. A. y Cuamea-Navarro, F. 2005. Nuevas tecnologías de conservación de productos vegetales frescos cortados. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD). México. 558 p.
- Halouat A. E., Gourama H., Uyttendaele M. and Devere J. M. 1998. Effects of modified atmosphere packaging and preservatives on the shelf-life of high moisture prunes and raisins. *International Journal of food Microbiology*. 41: 177-184.

- Havkin-Frenkel D., French J. C., Graft N. M., Joel D. M., Pak F. E. and Frenkel C. 2004. Interrelation of curing and Botany in Vanilla (*Vanilla planifolia*) Bean. *Acta Hort.* 629:93-102.
- Havkin-Frenkel D. and Belanger F. C. 2007. Applications of Plant Metabolic Engineering. Eds. Verpoorte *et al.* Cap. 7. Application of Metabolic Engineering to Vanillin Biosynthetic Pathways in *Vanilla planifolia*. Springer. 175-196 pp.
- Hernández, H. J. 2011. Programa Estratégico para el desarrollo rural Sustentable de la Región sur – Sureste de México: Trópico Húmedo. Paquete tecnológico Vainilla (*Vanilla planifolia* Jackson). Establecimiento y mantenimiento. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional Golfo Centro. Campo experimental Ixtacuaco. Tlapacoyan, Ver. México. 24 p.
- Hernández, H. J. y Sánchez M. S. 2011. Producción de planta de calidad de vainilla (*Vanilla planifolia* G. Jackson). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional Golfo Centro. Campo experimental Ixtacuaco. Martínez de la Torre, Ver. México. 31 p.
- Jager L. S., Perfetti G. A. and Diachenko W. 2007. Determination of coumarin, vanillin, and ethyl vanillin in vanilla extract products: liquid chromatography mass spectrometry method development and validation studies. *Journal of Chromatography.* 1145: 83-88.
- Kumar K.K., AnanthaKumar A. A., Ahmad R., Adhikari S., Variyar P. S. and Sharma A. 2010. Effect of gamma-radiation on major aroma compounds and vanillin glucoside of cured vanilla beans (*Vanilla planifolia*). *Food chemistry* 122: 841-845.
- Li T. and Zhang M. 2015. Effects of modified atmosphere package (MAP) with a silicon gum film window on the quality of stored green asparagus (*Asparagus officinalis* L) spears. *LWT-Food Science and Technology.* 60: 1046-1053.
- Lichter A., Zutahy Y., Kaplunov T., Aharoni N. and Lurie S. 2005. The effect of ethanol dip and modified atmosphere on prevention of *Botrytis* rot of table grapes. *HortTechnology.* 15: 284-291.
- Liu Y., Wu J., Miao S., Chong C. and Sun Y. 2014. Effect of a modified atmosphere on drying and quality characteristics of carrots. *Food Bioprocess Technol.* 7: 2549-2559.

- Luengwilai K., Beckles D. M., Pluemjit O. and Siriphanich J. 2014. Postharvest quality and storage life of ‘Makapuno’ coconut (*Cocos nucifera* L.). *Scientia Horticulturae*. 175: 105-110.
- Majidi H., Minaei S., Almassi M. and Mostofi Y. 2014. Tomato quality in controlled atmosphere storage, modified atmosphere packaging and cold storage. *J Food Sci Technol*. 51: 2155-2161.
- Mangaraj, S., Goswami, T. K. and Mahajan, P. V. 2009. Applications of Plastic Films for Modified Atmosphere Packaging of Fruits and Vegetables: A Review. *Food Eng Rev* 1:133–158.
- Manjunatha M. and Anurag R. K. 2014. Effect of modified atmosphere packaging and storage conditions on quality characteristic of cucumber. *J Food Sci Technol*. 51: 3470-3475.
- Maskeri R., Sheetal D. U., Belagali Y., Shoeb A., Bhagwat V. and Ramya. 2012. Evaluation of aphrodisiac effect of vanillin in male wistar rats. *Pharmacognosy Journal*. 32: 61-64.
- Nair D. V. T., Kiess A., Nannapaneni R., Schilling W. and Sharma C. S. 2015. The combined efficacy of carvacrol and modified atmosphere packaging on the survival of *Salmonella*, *Campylobacter jejuni* and lactic acid bacteria on Turkey breast cutlets. *Food Microbiology*. 49: 134-141.
- Naturland.2000. Asociación Naturland. Agricultura Orgánica en el Trópico y Subtrópico. Guía de 18 cultivos. Vainilla. Alemania. 18 p. www.naturland.de
- NMX-FF-074-SCFI-2009. 2009. Norma Mexicana Productos no industrializados para uso humano – vainilla – (*Vanilla fragans* (Salisbury) Ames – Especificaciones y métodos de prueba. 38 p.
- Odoux E. and Grisoni M. 2011. Vanilla. Medicinal and Aromatic Plants – Industrial Profiles. Taylor & Francis Group. E.U.A. 387 p.
- Ornelas-Paz J. J., Zamudo-flores P. B., Torres-Cisneros C. G., Holgúin-Soto R., Ramos-Aguilar O. P., Ruíz-Cruz S., Guevara-Arauza J. C., González-Aguilar G. A. and Santana-Rodríguez V. 2012. The barrier properties and potential use of recycled-LDPE films as a packaging material to preserve the quality of Jalapeño peppers by modified atmospheres. *Scientia Horticulturae*. 135: 210-218.

- Padilla-Zakour O. I., Tandon K. S. and Wargo J. M. 2004. Quality of modified atmosphere packaged ‘Hedelfingen’ and ‘Lapins’ sweet cherries. *HortTechnology*. 14: 331-337.
- Przygodzka M., Zielińska D., Ciesarová Z., Kukurová K. and Zieliński H. 2014. Comparison of methods for evaluation of the antioxidant capacity and phenolic compounds in common spices. *LWT – Food Science and Technology*. 58: 321-326.
- Salazar-Rojas V. M., Herrera-Cabrera B. E., Delgado-Alvarado A., Soto-Hernández M., Castillo-González F. and Cobos-Peralta M. 2011. Chemotypical variation in *Vanilla planifolia* Jack. (Orchidaceae) from the Puebla – Veracruz Totonacapan region. *Genet Resour Crop Evol.* DOI 10.1007/s10722-011-9729-y
- Sagrero-Nieves L. and Schwartz S. J. 1988. Phenolic content of *Vanilla planifolia* as affected by harvest period. *Journal of Food Composition and Analysis*. 1: 362-365.
- SIACON. 2014. Sistema de Información Agropecuaria de Consulta. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. <http://www.siap.gob.mx/vainilla/> (Consultado: 1 de noviembre de 2014).
- Simón A. and Gonzalez-Fandos E. 2011. Influence of modified atmosphere packaging and storage temperature on the sensory and microbiological quality of fresh peeled White asparagus. *Food Control*. 22: 369-374.
- Singh R., Giri S. K. and Kotwaliwale. 2014. Shelf-life enhancement of green bell pepper (*Capsicum annum* L.) under active modified atmosphere storage. *Food Packaging and Shelf life*. 1: 101-112.
- Sinha, A. K., Sharma, U. K. and Sharma, N. 2008. A comprehensive review on vanilla flavor: Extraction, isolation and quantification of vanillin and others constituents. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 59(4): 299-326.
- Tapia-Ochoategui A. P., Camacho-Díaz B. H., Perea-Flores M. J., Ordóñez-Ruíz I. M., Gutiérrez-López G. F. y Dávila-Ortiz G. 2011. Cambios morfométricos durante el beneficio tradicional de las vainas de vainilla (*Vanilla planifolia*; orchidaceae) en México. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 10: 105-115.
- Thoden van Velzen E. U. and Linnemann A. R. 2008. Modified atmosphere packaging of fresh meats – sudden partial adaptation caused an increase in sustainability of Dutch supply chains of fresh meats. *Packaging Technology and Science*. 21: 37-46.

- Van Dyk S., Holford P., Subedi P., Walsh K., Williams M. and McGlasson W. B. 2014. Determining the harvest maturity of vanilla beans. *Scientia Horticulturae*. 168: 249-257.
- Waghmare R. B. and Annapure U. S. 2015. Integrated effect of sodium hypochlorite and modified atmosphere packaging on quality and shelf life of fresh-cut cilantro. *Food Packaging and Shelf Life*. 3: 62-69.
- Waliszewski K. N., Pardo V. T. and Ovando S. L. 2006. A simple and rapid HPLC technique for vanillin determination in alcohol extract. *Food Chemistry*. 101: 1059-1062.
- Waliszewski K. N., Márquez O. and Pardo V. T. 2009. Quantification and characterisation of polyphenol oxidase from vanilla bean. *Food Chemistry* 117: 196-203.
- Walton N. J., Mayer M. J. and Narbad A. 2003. Vanillin. *Phytochemistry*. 63:505-515.

CAPITULO II

CARACTERÍSTICAS DE CALIDAD DE VAINILLA PROCEDENTE DE DIFERENTES BENEFICIOS Y CAMBIOS DURANTE EL ALMACENAMIENTO

RESUMEN

Se analizaron vainas procedentes de cuatro beneficios ubicados en el Estado de Veracruz, México y se empacaron de forma individual, en tres tipos de material (celofán, polietileno de baja densidad y empaques al vacío). Los resultados mostraron que existen diferencias en la calidad de los diferentes beneficios, no mostrando una tendencia clara entre ellos, lo cual denota una gran variabilidad entre los procesos de curado entre empresas. Por ejemplo hay un máximo de vainillina de 15,555 ppm y un mínimo de 9,866 ppm; mientras que la mayor variabilidad entre beneficios se muestra en el contenido de ácido *p*-hidroxibenzóico de 52 a 350 ppm y ácido vainillínico de 286.1 a 732.8 ppm

Las variables que definieron la calidad de las vainas fue el contenido de vainillina y porcentaje de humedad; no encontrando diferencias entre los diferentes tipos de empaque, ya que todos presentaron pérdidas de hasta 20 % al segundo mes con un aumento de 1 % de vainillina.

Lo anterior se relaciona directamente con el tipo de matado de la vaina, ya que los diferentes beneficiadores manejan tanto diferentes temperaturas como tiempos de inmersión en agua caliente, lo cual afecta la hidrólisis de los compuestos aromáticos. Debido a que hubo pérdidas significativas de peso, es necesario incrementar el número de capas de la película para retener la humedad y número de vainas por empaque, para conservar las características organolépticas de las vainas.

Palabras clave: beneficios, matado, vainillina.

I. INTRODUCCIÓN

El curado de las vainas de vainilla tiene el fin de producir un aroma agradable y característico a partir de vainas verdes con una madurez fisiológica de aproximadamente nueve meses. Aunque es un proceso que varía entre regiones o de un país a otro, generalmente abarca cuatro pasos principales: escaldado o matado, soleado/sudado, secado y acondicionamiento (Dignum *et al.*, 2001; Odoux y Grisoni, 2011). Cada una de estas etapas reviste gran importancia, pues detiene la maduración de la vaina verde y se inicia un proceso de acondicionamiento para la obtención de una vaina con color y aroma característico de la vainilla.

La composición de la vainilla procesada es variable y compleja, debido a numerosas variables tales como especie, condiciones de crecimiento, composición del suelo, madurez del fruto y principalmente el tipo de beneficiado. Todas estas variables definen el contenido relativo de los constituyentes químicos en las vainas procesadas, lo cual hace difícil definir la composición típica (De La Cruz *et al.*, 2009).

Aunque existen diferencias entre los quimiotipos de la vainilla, la vainillina es el componente más abundante (20 g kg⁻¹ de vaina), además de que contiene otros compuestos, entre los que destacan el ácido vainillínico (1 g kg⁻¹ de vaina), *p*-hidroxibenzaldehído (2 g kg⁻¹ de vaina), ácido *p*-hidroxibenzóico (0.2 g kg⁻¹ de vaina), proteínas, azúcares, fibras como hemicelulosa y celulosa, ceras, resinas, pigmentos, taninos, minerales y aceites esenciales (De La Cruz *et al.*, 2009).

El nivel de los aldehídos, vainillina y *p*-hidroxibenzaldehído y sus respectivos ácidos (ácido vainillínico y ácido *p*-hidroxibenzóico), en vainillas curadas es usado como un indicador de la calidad para propósitos comerciales. Aunque estos compuestos en conjunto son importantes, de forma individual no proveen la intensidad y características de sabor de la vainilla (Pérez-Silva *et al.*, 2006). Sin embargo, a pesar de que el proceso de beneficiado de la vainilla se ha realizado por cientos de años en México, no existe información disponible que indique la razón de las diferencias de calidad entre los diferentes beneficios, así como los cambios que se presentan durante el almacenamiento.

Por lo anterior, el objetivo de esta fase fue evaluar los cambios en la calidad organoléptica de vainas de cuatro beneficios de la región del Totonacapan, Veracruz, y los cambios químicos que experimentaron por un periodo de diez meses, empacadas bajo diferentes tipos de películas plásticas simples (celofán, polietileno de baja densidad y empacado al vacío).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

Las vainas recién beneficiadas se obtuvieron en mayo de 2013 procedentes de cuatro beneficiadores ubicados en la zona del Totonacapan, Veracruz que fueron: (1) Primero de Mayo; (2) Puntilla Aldama; (3) 20 soles; (4) Venustiano Carranza. Los beneficios 1, 3 y 4 se ubican en el municipio de Papantla de Olarte a 20° 27' 36" N y 97°19'48" W, a 60, 180 y 100 m de altura, respectivamente. Mientras que el beneficio 2 se localiza en el municipio de San Rafael a 20°11'23" N y 96°54'29" W y altitud de 20 m.

En esta etapa se evaluaron tres tipos de empaque con una sola vaina: a) bolsas de celofán (Figura 11a); b) bolsas de polietileno de baja densidad (calibre 400) (Figura 11b); y c) bolsas para vacío (FoodSaver™, Corea) (Figura 11c). Las películas se cortaron a una medida estándar (23 cm x 10.5 cm). Los empaques de celofán y polietileno se sellaron con una máquina de resistencia eléctrica, y las de vacío con una máquina de doble función (sellado y extracción de aire) (FoodSaver™, Corea). Las muestras se almacenaron durante 10 meses en cajas de cartón con tapa, donde el promedio de humedad relativa y temperatura fueron 41.2 % y 24.8 °C, respectivamente. Cada dos meses se tomaron cuatro repeticiones de las muestras de los beneficios 1 y 3, y tres repeticiones de los beneficios 2 y 4 para cada tipo de empaque.

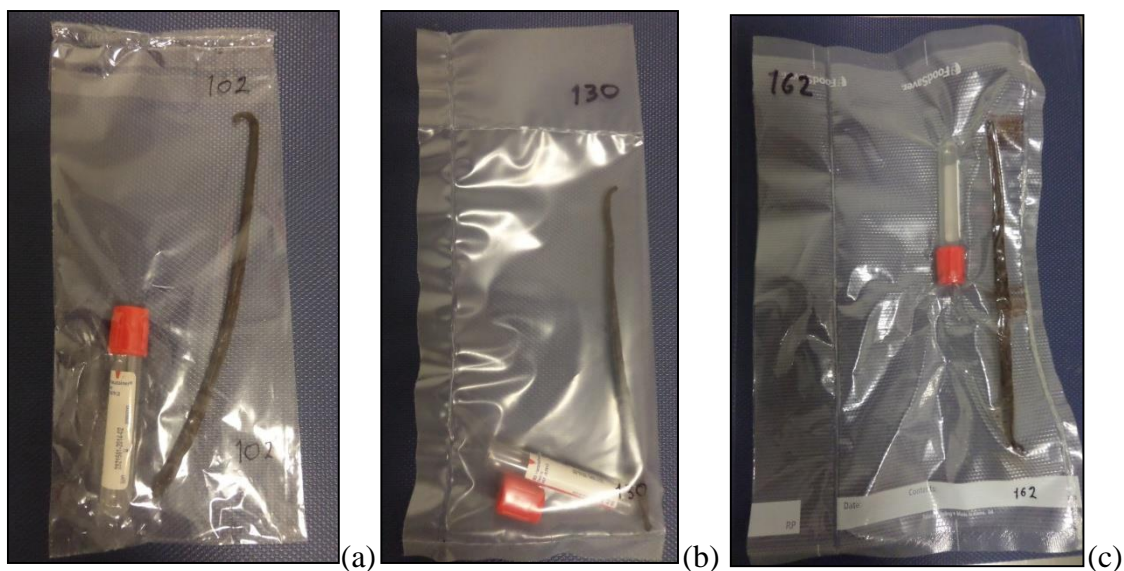


Figura 11. Empaques empleados en la primera fase de la investigación con películas simples: (a) celofán; (b) polietileno; y (c) vacío.

2.2 Variables

Se realizó un análisis inicial de las vainas de los diferentes beneficios. Se tomaron cinco repeticiones de una vaina por beneficio (fecha cero), y en cada muestreo bimestral se tomaron cuatro y tres repeticiones dependiendo del beneficio, hasta el mes décimo. En cada muestreo, cada vaina se pesó y se cortó en secciones transversales de aproximadamente 1 cm, las cuales se envolvieron juntas en papel aluminio y se colocaron en un congelador (0°C) por un día, excepto tres secciones, seleccionadas al azar que se emplearon para calcular el contenido de humedad.

Humedad. La determinación de humedad es un paso obligado en el análisis de alimentos. Es la base de referencia que permite comparar valores y expresarlos en base húmeda o seca. Este análisis se realizó por pérdida de peso, después de colocar las tres secciones de la vaina en un horno mecánico de convección (Lab-Line Imperial V, Alpha Multiservices, Inc, USA), a 50 °C por siete días.

Compuestos fenólicos principales. Para este estudio se siguió el proceso de extracción e inyección modificado de Cicchetti y Chaintreau (2009), para identificar la presencia y medir la cantidad de los cuatro compuestos principales de la vainilla (4-hidroxibenzaldehído, ácido 4-hidroxibenzóico, vainillina y ácido vainillínico) por medio de HPLC. El proceso de extracción consistió en sacar las vainas del congelador y molerlas con un molino de carga (IKA® A11 basic). Después, se pesó 0.05 g de polvo y se colocó en viales de vidrio de 20 mL con tapa de rosca. Se colocó un magneto y 18 mL de solución etanol-agua destilada (1:1) (alcohol etílico absoluto anhidro, grado HPLC, Karal®), la cual se preparó 24 h antes y se mantuvo en refrigeración (4°C). La mezcla se agitó por 30 min a velocidad 6 en una parrilla digital de agitación (Thermo Scientific™, Cimarec™, USA), y se colocó en refrigeración por 24 h. Posteriormente, las muestras se agitaron durante 5 min, también a velocidad 6, y se tomó un mililitro que se filtró a través de un acrodisco (Titan, 0.045 µm) y se colocó en un vial de vidrio de 2 mL con tapa de rosca con septa pre-perforada. Los extractos de las muestras se colocaron en el automuestreador del HPLC (Series 200, Perkin Elmer™) para inyectar 10 µL a un caudal de 1 mL min⁻¹.

Las condiciones del cromatógrafo fueron: temperatura del horno a 30 °C y 30 min de duración de cada corrida. La fase móvil fue una solución de ácido fosfórico (H₃PO₄) al 0.01 M con metanol (75:25); columna C18 5µm 250x4.6mm, serie 08010034K (Perkin Elmer™), y detector UV/VIS a 254 nm (Series 200, Perkin Elmer™). La fase móvil, la solución metanol: agua y el agua empleados en el HPLC se filtraron con un sistema al vacío con matraz Kitasato, filtros de 47 mm y tamaño de poro de 0.45 µm (Titán).

Para la identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos se emplearon sustancias puras. La solución estándar se preparó en una solución etanol: agua (1:1) con 500 µg mL⁻¹ de vainillina (3 metoxi- 4-hidroxibenzaldehído); y 100 µg mL⁻¹ de ácido 4-hidroxibenzóico, 4-hidroxibenzaldehído y ácido vainillínico (ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico) (Sigma-Aldrich, USA). A partir de esta mezcla se realizaron las diluciones necesarias para la obtención de las curvas de calibración (Anexo A). Para el lavado de la columna se empleó metanol:agua (1:1).

pH. Al extracto obtenido se le tomaron lecturas de pH con un potenciómetro (HI 2211, Hanna Instruments®).

2.3 Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Se realizó una matriz con los coeficientes de correlación de Pearson y los niveles de significancia con el paquete estadístico SAS® v. 9.0. Además, se obtuvieron diagramas de dispersión elaborados con Infostat v. 2011.

Se empleó un diseño factorial de medidas repetidas (Correa, 2004), que consideró los efectos del tipo de empaque, beneficio, tiempo y las interacciones entre ellos, quedando el modelo de la siguiente manera:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \tau_k + (\alpha\tau)_{ik} + (\beta\tau)_{jk} + (\alpha\beta\tau)_{ijk} + e_{ijkl}$$

Donde:

Y_{ijk}: Variable respuesta

μ: Media general

α_i: Efecto del empaque i-ésimo; tal que i: celofán, polietileno, vacío

β_j: Efecto del beneficio j-ésimo tal que j: 1, 2, 3, 4

(αβ)_{ij}: Efecto de la interacción del empaque i-ésimo y el beneficio j-ésimo

τ_k: Efecto del tiempo tal que k: 0, 2, 4, 6, 8, 10

(ατ)_{ik}: Efecto de la interacción del empaque i-ésimo y el tiempo k-ésimo

(βτ)_{jk}: Efecto de la interacción del beneficio j-ésimo y el tiempo k-ésimo

(αβτ)_{ijk}: Efecto de la interacción del empaque i-ésimo, el beneficio j-ésimo y el tiempo k-ésimo

e_{ijk}: Error de Y_{ijk} con $\sim N(0, \sigma^2)$

Con las siguientes hipótesis estadísticas:

- 1) H₀: $\alpha_1 = \alpha_2 = \alpha_3 = 0$ vs H_a: al menos un empaque es diferente
- 2) H₀: $\beta_1 = \beta_2 = \beta_3 = \beta_4 = 0$ vs H_a: al menos un beneficio es diferente
- 3) H₀: $\alpha_1\beta_1 = \alpha_2\beta_2 = \dots = \alpha_3\beta_4 = 0$ vs H_a: Existe interacción entre empaque y beneficio
- 4) H₀: $\tau_1 = \tau_2 = \dots = \tau_6 = 0$ vs H_a: al menos un tiempo o fecha es diferente

- 5) $H_0: \alpha_1\tau_1 = \alpha_2\tau_2 = \dots = \alpha_3\tau_6 = 0$ vs H_a : Existe interacción entre empaque y tiempo
- 6) $H_0: \beta_1\tau_1 = \beta_2\tau_2 = \dots = \beta_4\tau_6 = 0$ vs H_a : Existe interacción entre beneficio y tiempo
- 7) $H_0: \alpha_1\beta_1\tau_1 = \alpha_2\beta_2\tau_2 = \dots = \alpha_3\beta_4\tau_6 = 0$ vs H_a : Existe interacción entre empaque, beneficio y tiempo

Y finalmente, se analizaron los procedimientos para evaluar las tres estructuras de covarianza para las dos variables respuesta principales: vainillina y humedad, ya que la calidad de la vainilla generalmente se evalúa con el porcentaje de humedad de la vaina y el contenido de vainillina.

III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Diferencias entre Beneficios

La composición de la vainilla procesada es compleja debido a numerosas variables tales como especie, condiciones de crecimiento, nutrición del suelo, madurez del fruto y, principalmente, por las diferencias en el método de curado, lo cual hace difícil definir y generalizar la composición típica (Rao y Ravishankar, 2000).

Salazar-Rojas *et al.* (2011) resumen que las concentraciones promedio de los cuatro compuestos principales en *V. planifolia* son: vainillina (10,000 – 20,000 ppm), *p*-hidroxibenzaldehído (2,000 ppm), ácido vainillínico (2,000 ppm) y ácido *p*-hidroxibenzóico, 200 ppm. Sin embargo, reporta que en 25 muestras de vainilla cultivadas en la zona de Totonacapan Puebla-Veracruz, el contenido medio para estos compuestos es: 13,700 (vainillina); 460 (*p*-hidroxibenzaldehído); 587 (ácido vainillínico) y 80 ppm (*p*-hidroxibenzoico) para los mismos compuestos.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran un máximo de vainillina de 15,555 ppm y un mínimo de 9,866 ppm; mientras que la mayor variabilidad entre beneficios se muestra en el contenido de ácido *p*-hidroxibenzóico de 52 a 350 ppm y ácido vainillínico de 286.1 a 732.8 ppm (Cuadro 4).

Cuadro 4. Promedios de los valores de los cuatro compuestos principales para los cuatro beneficios analizados.

Beneficio	Ac. <i>p</i> -hidroxibenzóico (ppm)	<i>p</i> -hidroxibenzaldehído (ppm)	Ac. Vainillínico (ppm)	Vainillina (ppm)
1	184.3 c	544.2 a	377.0 b	21,200 a
2	350.1 a	605.0 a	671.1 a	14,900 c
3	52.6 d	498.6 b	286.1 c	18,800 b
4	292.8 b	440.8 c	732.8 a	20,200 a
Valor mínimo	17.2	300.6	238.4	4,000
Valor máximo	1,220.9	1,501.1	2,468.2	31,500
Coefficiente de variación	68.5	33.6	49.7	25.6
Desviación estándar	244.9	278.6	435.9	0.5
NOM-182-SCFI-2011	58-100	219 - 498	411 - 861	Mínimo 20,000

Con la matriz de correlaciones obtenida, de manera general podemos ver aunque son bajas, la mayoría son significativas. Las mayores correlaciones corresponden a ácido 4 hidroxibenzóico - ácido vainillínico (0.83); humedad – vainillina (-0.70); y humedad – 4 hidroxibenzaldehído (-0.59) (Cuadro 5); correlaciones que se representan en los diagramas de dispersión mostrados en la Figura 12.

Cuadro 5. Matriz de correlación de las variables evaluadas (correlaciones y niveles de significancia).

	Humedad	Ácido 4-hidroxibenzóico	4-hidroxibenzaldehído	Ácido Vainillínico	Vainillina
Humedad	1.00	-0.25 <.0001	-0.59 <.0001	-0.42 <.0001	-0.70 <.0001
Ac. 4-hidroxibenzóico	-0.25 <.0001	1.00	0.44 <.0001	0.83 <.0001	0.07 0.2171
4-hidroxibenzaldehído	-0.59 <.0001	0.44 <.0001	1.00	0.32 <.0001	0.47 <.0001
Ac. Vainillínico	-0.42 <.0001	0.83 <.0001	0.32 <.0001	1.00	0.24 <.0001
Vainillina	-0.70 <.0001	0.07 0.2171	0.47 <.0001	0.24 <.0001	1.00

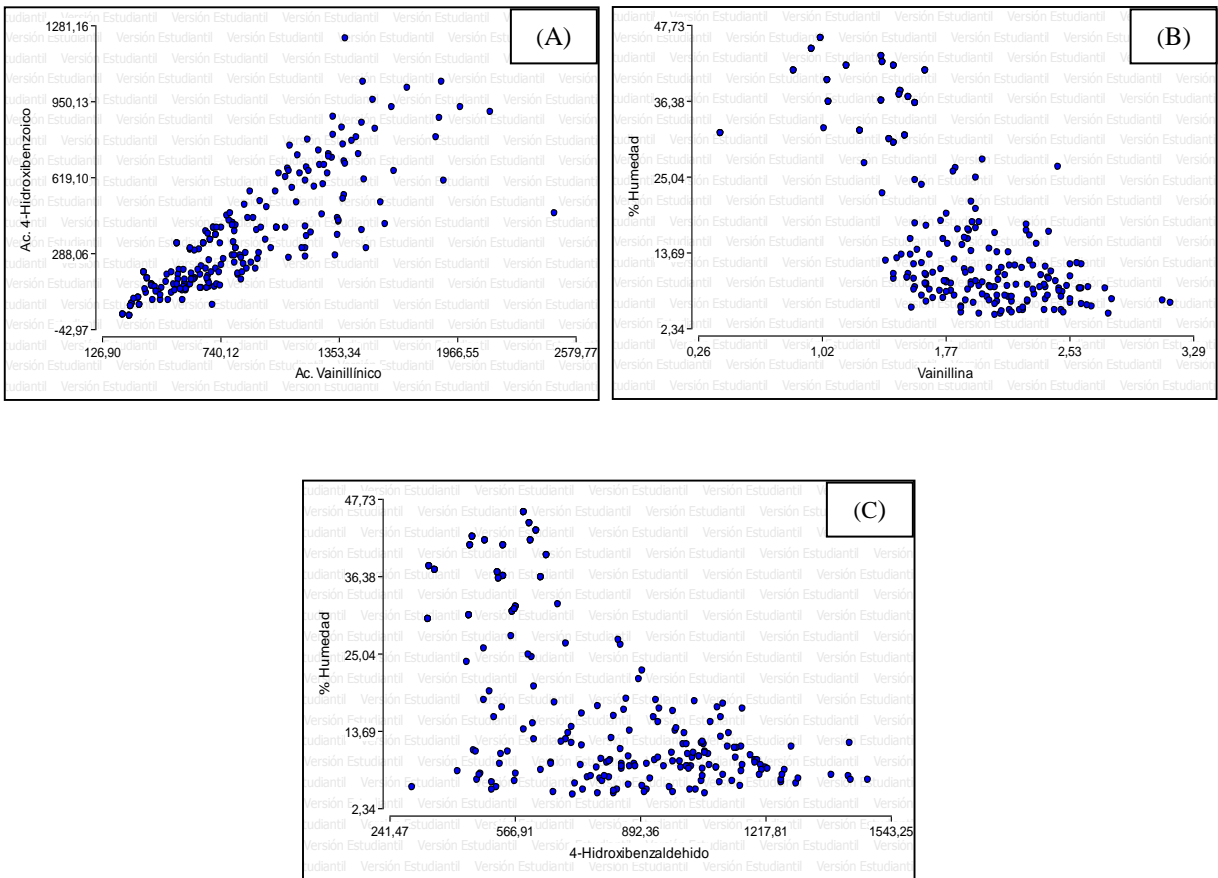


Figura 12. Diagramas de dispersión de ácido 4 hidroxibenzoico–ácido vainillínico (A), humedad–vainillina (B), y humedad–4 hidroxibenzaldehído (C), con correlaciones de 0.83, -0.70 y -0.59, respectivamente.

En lo que respecta a las tres estructuras de covarianza evaluadas para la variable vainillina para el modelo factorial de medidas repetidas, el menor criterio Bayesiano (BIC- Schwarz's Bayesian Information Criterion) obtenido fue de 122.1, correspondiente a la estructura simétrica compuesta, contra 135.9 el de sin estructura, y 123.6 del de la autorregresiva. De esta manera, se considera que la mejor estructura para el análisis de medidas repetidas de los datos de esta variable, es la simétrica compuesta.

Esta estructura es adecuada cuando las lecturas en todos los tiempos tienen la misma varianza, es decir, que a través del tiempo las medias tienen la misma variabilidad y todos los pares de medidas en la misma unidad experimental tienen correlación (Correa, 2004).

Dentro de esta estructura, en el análisis de varianza puede observarse que los efectos significativos son el beneficio (B), el empaque (E), el tiempo, y las interacciones B*E y B*Tiempo; con valores de $Pr > F$ menores de 0.05. Mientras que los efectos que no resultaron significativos fueron las interacciones E*Tiempo y B*E*Tiempo (Ver anexo B).

En cuanto a las diferencias de los mínimos cuadrados de este análisis, al comparar los valores de significancia entre los diferentes tratamientos, tenemos que, en cuanto a la comparación entre los beneficios 1 y 4, éstos no son significativos (0.0858), lo que indica que son los beneficios más parecidos entre ellos.

En lo que respecta a la variable humedad, el menor Criterio Bayesiano con valor de 810 se obtuvo en el modelo sin estructura, contra 966 el de estructura simétrica compuesta, y 967.5 de la autorregresiva, lo cual indica que la mejor estructura para el análisis de medidas repetidas de los datos de humedad, fue la no estructurada.

En esta modelación se trabaja con una estructura abierta, sin realizar ningún supuesto sobre igualdad de varianzas o correlaciones. Aunque tiene la desventaja de que no aprovecha las tendencias de varianzas y covarianzas en el tiempo (Correa, 2004).

Dentro de esta estructura, y al analizar su análisis de varianza (Anexo C) puede observarse que los efectos significativos son el beneficio (B), el empaque (E), el Tiempo, y la interacción B*Tiempo; con valores de $Pr > F$ menores de 0.05. Mientras que los efectos que no resultaron significativos fueron las interacciones B*E, E*Tiempo y B*E*Tiempo.

En cuanto a las diferencias de los mínimos cuadrados de este análisis, al comparar los valores de significancia entre los diferentes tratamientos, se observa, en cuanto a la comparación entre los beneficios 1 y 4 éstos no fueron significativos (0.7298), así como el 2 y 4 (0.0979), lo que indica que son los beneficios más parecidos.

Ranadive (1992), citado por Salazar-Rojas *et al.* (2011), observó al comparar las concentraciones de los cuatro compuestos principales de vainilla desarrollada bajo condiciones controladas de madurez del fruto y proceso de curado, que la composición de las vainas variaba en el contenido de vainillina y ácido vainillínico, mientras que la variación no fue tan

significativa en el contenido de *p*-hidroxibenzaldehído y ácido *p*-hidroxibenzóico. Estos autores concluyeron que el origen geográfico, madurez del fruto y método de curado afectaron la concentración de vainillina y particularmente la del ácido vainillínico, pero no los contenidos de *p*-hidroxibenzaldehído y ácido *p*-hidroxibenzóico (Salazar-Rojas *et al.*, 2011).

Los resultados de este trabajo muestran una gran variabilidad entre beneficios, atribuido a las diferencias entre cada etapa del proceso de curado. Mientras que los beneficios 1 y 2 llevan a cabo procesos de enfriamiento (el beneficio 1 después del primer sudado, y el beneficio 2 al final de todos los sudados), el beneficio 3 no lleva a cabo este proceso. Es importante recordar que el proceso de beneficio en México es artesanal, por lo cual la variación de tiempos y temperaturas entre beneficiadores, se debe en parte a la cantidad de vainas procesadas y decisiones del maestro beneficiador producto de su experiencia.

El paso más importante del curado es el matado, ya que el desarrollo del sabor complejo de la vainilla depende principalmente de este paso. Todos los beneficios analizados lo llevan a cabo después del despezonado, pero con diferentes temperaturas y tiempos, lo cual pudiera estar afectando el proceso de fermentación durante el curado. De acuerdo con Odoux y Grisoni (2011), en teoría el matado debe realizarse durante aproximadamente 3 min a 65 °C, aunque depende también del tamaño de la vaina, por lo que es recomendable clasificarlas antes. El beneficio 1 realiza un matado que, si la vaina se encuentra “mojada” dura más de 10 min y si se encuentra “entreseca” dura aproximadamente 10 segundos, ambos procesos con temperaturas de 70–100 °C; el beneficio 2 lo realiza en un tiempo de 5 min a 90 °C; y el beneficio 3 lo realiza por 10 segundos con temperaturas de 80–100° (Cuadro 6).

Cuadro 6. Condiciones del curado y características de las vainas procedentes de tres de los beneficios analizados.

Beneficio	Escaldado	
	Temperatura (°C)	Tiempo
B1 (1° de Mayo)	100	1 seg
	90	3 seg
	70	5 – 10 min (vainas mojadas)
	70	5 – 6 seg (vainas entresecas)
B2 (Puntilla Aldama)	Agua caliente	5 min
	Sol	Con nylon
B3 (20 Soles)	80 - 100	10 seg

De acuerdo con Dignum *et al.* (2002), los contenidos de vainillina y ácido vainillínico disminuyen sólo cuando se realiza un escaldado de 20 minutos a 80 °C. Sin embargo, en este caso, al tener un escaldado de pocos segundos o minutos, el contenido de vainillina en todos los beneficios y empaques se incrementó, mientras que el porcentaje de humedad se redujo drásticamente a lo largo del tiempo de almacenamiento.

Mariezcurrera *et al.* (2008) menciona que en México las condiciones más empleadas son: 65°C por 3 min, 70°C por 2 min, y 80°C por 10 segundos, tres veces en intervalos de 30 segundos. Asimismo se podría esperar que entre más rápido sea el rompimiento de la pared celular se producirá mayor contacto entre la β -glucosidasa y su sustrato y, por lo tanto, será más eficiente la hidrólisis de los precursores aromáticos y mayores los niveles de vainillina y otros compuestos volátiles, siempre y cuando no se inhiba la actividad de la enzima.

Márquez y Waliszewski (2008) y Pardo *et al.* (2009) realizaron tres inmersiones a 80°C de 10 segundos cada una, obteniendo los mejores contenidos de vainillina, 4-hidroxibenzaldehído y ácido vainillínico, perdiendo sólo 43 % de la actividad enzimática.

3.2 Efecto del Empaque y Tiempo de Almacenamiento

Los resultados mostraron que conforme transcurrió el tiempo de almacenamiento se registraron cambios en la composición de las variables analizadas (Cuadro 7). Hubo un aumento en la concentración de vainillina y una reducción considerable en la humedad. La NOM-182-SCFI-2011 especifica que los contenidos mínimos para los cuatro compuestos principales son: 20,000 ppm para vainillina, 219–498 ppm para *p*-hidroxibenzaldehído; 411–861 ppm para ácido vainillínico y 58–100 ppm para ácido *p*-hidroxibenzóico. Mientras que Havkin-Frenkel y Belanger (2011) amplían esos intervalos entre 9,296–22,757 para vainillina, 635–1549 para *p*-hidroxibenzaldehído; 887–994 ácido vainillínico y 10–255 ppm para ácido *p*-hidroxibenzóico.

Cuadro 7. Medias de los cuatro compuestos principales a los 10 meses de almacenamiento, considerando beneficio y tipo de empaque.

Beneficio	Empaque	Ac. 4-hidroxibenzóico (ppm)	4-hidroxibenzaldehído (ppm)	Ac. Vainillínico (ppm)	Vainillina (ppm)
1	Celofán	482.3	1,120.4	939.6	24,274.7
	Polietileno	293.1	1,081.8	864.0	22,681.9
	Vacío	286.7	1,110.4	692.9	23,282.7
2	Celofán	744.7	1,239.7	1,534.9	19,389.3
	Polietileno	797.9	1,289.8	1,764.7	17,037.8
	Vacío	589.5	1,058.5	1,411.7	16,287.4
3	Celofán	106.4	658.8	423.1	19,904.9
	Polietileno	146.8	902.1	562.0	18,526.3
	Vacío	165.9	893.0	688.8	22,989.9
4	Celofán	569.0	834.6	1,211.4	22,549.9
	Polietileno	463.8	560.7	1,770.5	22,829.1
	Vacío	471.3	917.0	1,537.6	25,106.7
Valor mínimo		38.45	356.9	317.4	15,400.0
Valor máximo		929.7	1,501.1	2,047.9	29,700.0
Coeficiente de Variación		62.2	27.5	45.6	17.9
Desviación estándar		249.4	266.7	482.1	0.38
NOM-182-SCFI-2011		58-100	219 - 498	411 - 861	Mínimo 20,000

La mayoría de los valores cumple de manera general con las especificaciones, pero se puede apreciar que el mayor contenido de vainillina se registró en los beneficios 1 y 4, mientras que el beneficio 3, tiene los valores más bajos en todos los compuestos, con excepción de la vainillina, principalmente en las vainas empacadas en celofán.

Se considera que las agliconas liberadas después de la hidrólisis son el sustrato de las reacciones enzimáticas, y al ser oxidadas, reducidas, descarboxiladas, metiladas, o algún otro proceso metabólico, es posible tener interconversiones de un compuesto fenólico a otro, de acuerdo con las condiciones que se presenten de temperatura, disponibilidad de oxígeno, entre otras (Odoux y Grisoni, 2011).

Para la variable vainillina, en el caso de los empaques, no hubo diferencias entre el polietileno (P) y el empaque al vacío (V); mientras que para el factor tiempo, aquéllos en los cuales no se presentó significancia fueron principalmente en la comparación entre los meses 4-6, 6-10 y

entre 8-10. Cabe mencionar que en el octavo mes se presentaron los valores máximos de vainillina para los empaques de celofán y polietileno, los cual se pudiera relacionar directamente con la permeabilidad de gases de la película utilizada (Anexo D).

La Figura 13 muestra que el empaque con mayor contenido de vainillina (1.94 %) fue el celofán (C), lo cual puede deberse a que este tipo de película al tener mayor permeabilidad, permite un mayor intercambio de oxígeno y contribuye a un incremento en la biosíntesis de vainillina. En cuanto a beneficios, se aprecia en la misma figura que el beneficio 1 presenta los valores más altos de vainillina para cada tipo de empaque. Además, se muestra una tendencia positiva para los tres empaques y los cuatro beneficios a través del tiempo, incrementándose la vainillina desde el mes cero hasta el octavo, y presentándose una reducción en el décimo mes.

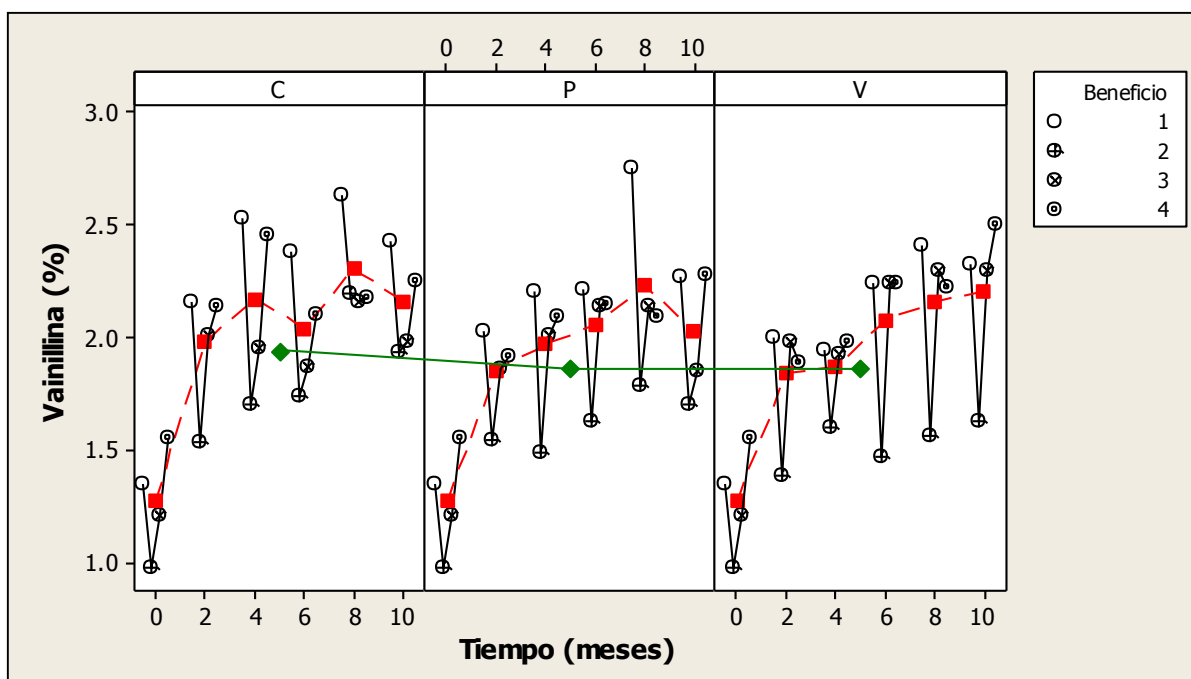


Figura 13. Gráfica multivariada para la variable respuesta **Vainillina**, para los factores Beneficio, Empaque y Tiempo. (C: Celofán, P: Polietileno, V: Empaque al vacío). (■: Media de Vainillina entre beneficios de cada fecha; ◆: Media de Vainillina por cada tipo de empaque).

En cuanto a la variable humedad, en el caso de los empaques, no hubo diferencias entre el celofán (C) y polietileno (P). Mientras que para el factor tiempo, todos presentaron significancia, es decir, que todos los tiempos fueron diferentes entre ellos (Anexo E).

La Figura 14 muestra que el empaque con mayor media de humedad (16.82 %) es el usado con vacío, lo cual es más notorio a partir del segundo mes. Esto indica que debido a su menor permeabilidad, permitió menor pérdida de humedad e intercambio de oxígeno. Con relación a los beneficios, el 1 y 2 presentan los valores más altos para cada tipo de empaque en la fecha 0, es decir al inicio del estudio, mientras que para los dos meses el beneficio 4 presenta mayor retención de humedad para los empaques celofán y polietileno, y el beneficio 2 para el empaque al vacío. A partir de los 4 meses y hasta los 10, la diferencia entre los cuatro beneficios es mínima.

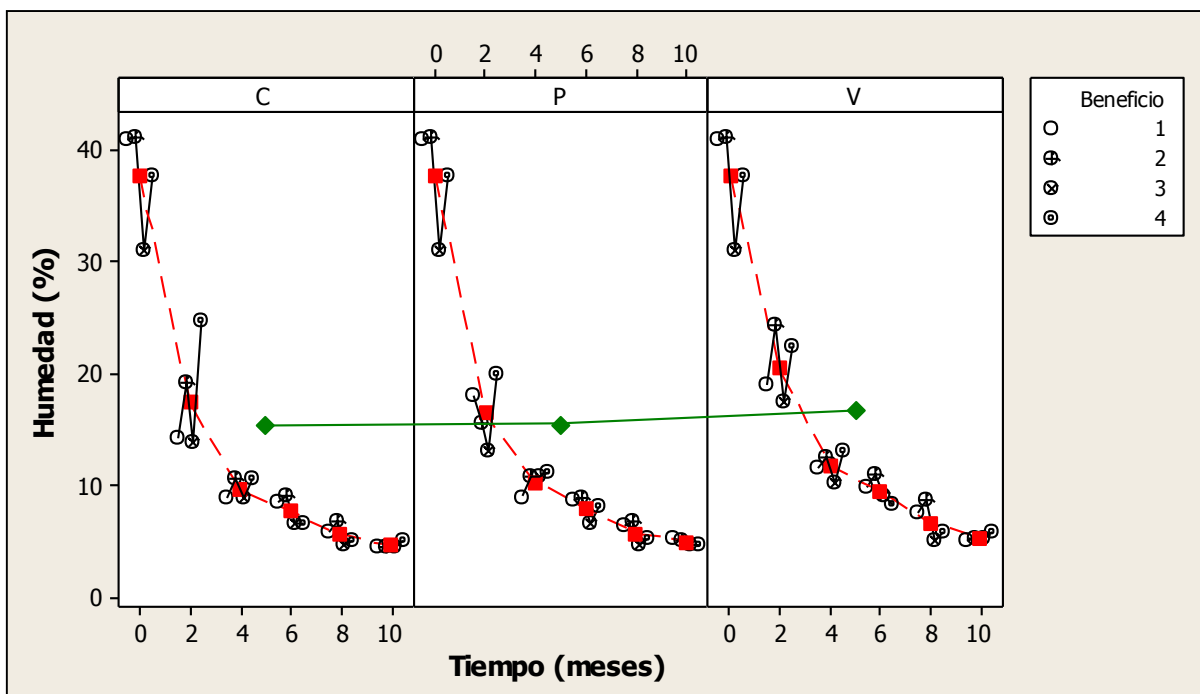


Figura 14. Gráfica multivariada para la variable respuesta **Humedad**, para los factores Beneficio, Empaque y Tiempo. (C: Celofán, P: Polietileno, V: Empaque al vacío). (■: Media de Humedad entre beneficios de cada fecha; ◆: Media de Humedad por cada tipo de empaque).

IV. CONCLUSIONES

- 1) La composición fisicoquímica de la vainilla beneficiada es variable dependiendo de los pasos en el proceso de curado, reflejándose en la composición y contenido de humedad inicial. Es probable que las vainas utilizadas en cada beneficio tuvieran una madurez fisiológica diferente, sin embargo el proceso de beneficio seguramente influye en la composición de las vainas, por lo cual sí existieron diferencias entre beneficios.
- 2) El beneficio 1 presentó los mayores porcentajes de vainillina en base a peso seco, y el beneficio 2 los menores.
- 3) No se observaron diferencias entre los diferentes empaques debido a la rápida pérdida en la humedad en todos los tratamientos, por lo cual es necesario incrementar el número de capas de la película para retener la humedad y número de vainas por empaque, para conservar las características organolépticas de las vainas.

V. LITERATURA CITADA

- Cicchetti, E. and Chaintreau, A. 2009. Quantitation of the main constituents of vanilla by reverse phase HPLC and ultra-high-pressure-liquid chromatography with UV detection: Method validation and performance comparison. *J. Sep. Sci.* 32: 3043-3052.
- Correa L. G. 2004. Análisis de Medidas Repetidas. Facultad de ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia. 41 p.
- De la Cruz M. J., Rodríguez J. G. C. and García H. S. 2009. Vanilla: Post-harvest Operations. 50 p.
- Dignum M. J. W., Kerler J. and Verpoorte, R. 2001. Vanilla production: Technological, chemical, and biosynthetic aspects. *Food Reviews International* 17: 199-219.
- Dignum M. J. W., Kerler J. and Verpoorte, R. 2002. Vanilla curing under laboratory conditions. *Food Chemistry* 79: 165-171.
- Havkin-Frenkel D. and Belanger F. C. 2011. Handbook of Vanilla Science and Technology. Wiley – Blackwell Publishing. USA. 339 p.

- InfoStat. 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Mariezcurrena M. D., Zavaleta H. A. Waliszewski K. N. and Sánchez V. 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*. 43: 1452-1457.
- Márquez O. and Waliszewski K. N. 2008. The effect of thermal treatment on β -glucosidase inactivation in vanilla bean (*Vanilla planifolia* Andrews). *International Journal of food Science and Technology*. 43: 1993-1999.
- NOM-182-SCFI-2011. 2011. Norma Oficial Mexicana. Vainilla de Papantla, extractos y derivados – especificaciones, información comercial y métodos de ensayo (prueba). 11 p.
- Odoux E. and Grisoni M. 2011. Vanilla. Medicinal and Aromatic Plants – Industrial Profiles. Taylor & Francis Group. E.U.A. 387 p.
- Pardio V. T., Mariezcurrena M. D., Waliszewski K. N., Sánchez V. and Janczur M. K. 2009. Effects of killing conditions of vanilla (*Vanilla planifolia*, Andrews) pods during the curing process on aroma composition of pod ethanol extract. *International Journal of Food Science and Technology*. 44: 2417-2423.
- Pérez-Silva A., Odoux E., Brat P., Ribeyre F., Rodriguez-Jimenes G., Robles-Olvera V., García-Alvarado M. A. and Günata Z. 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.
- Rao S. R. and Ravishankar G. A. 2000. Vanilla flavor: production by conventional and biotechnological routes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80: 289-304.
- Salazar-Rojas V. M., Herrera-Cabrera B. E., Delgado-Alvarado A., Soto-Hernández M., Castillo-González F. and Cobos-Peralta M. 2011. Chemotypical variation in *Vanilla planifolia* Jack. (Orchidaceae) from the Puebla – Veracruz Totonacapan region. *Genet Resour Crop Evol*. DOI 10.1007/s10722-011-9729-y
- SAS. 2013. Versión 9.0. Statistical Analysis System. Sistema SAS para Windows.

CAPITULO III

EFFECTO DE DIFERENTES EMPAQUES EN LA CONSERVACIÓN DE VAINAS DE VAINILLA BENEFICIADA

RESUMEN

El uso de materiales poliméricos y atmósferas modificadas es una técnica de conservación que se ha extendido para incrementar la vida de anaquel de diversos productos hortofrutícolas; y está afectado por factores tales como la temperatura de almacenamiento, el tipo de producto y, por supuesto, el material de empaque.

Durante esta fase se analizaron vainas de dos empresas beneficiadoras: (1) Primero de Mayo y (2) 20 soles®, las cuales fueron envasadas en cuatro diferentes tipos de empaque: uno simple (C: celofán) y tres empaques dobles (C-C: Celofán doble; C-P: Celofán – Polietileno; y C-V: Celofán – Vacío), empacadas de forma individual y en cinco unidades por un periodo de seis meses. Esta fase se realizó en el periodo de mayo de 2014 a diciembre del mismo año, y las vainas analizadas fueron de la cosecha de 2013.

El tipo de empaque que mantuvo las características iniciales de la vaina fue C-P y de manera general los empaques con cinco vainas perdieron menor humedad, aunque el contenido de vainillina se mantuvo constante, mientras que las vainas empacadas individualmente perdieron humedad (30 %), aunque el incremento de vainillina fue constante. Se encontraron relaciones significativas entre humedad–4-hidroxibenzaldehído (-0.77), humedad–vainillina (-0.82), y ácido 4-hidroxibenzóico–ácido vainillínico (0.88), y 4-hidroxibenzaldehído–vainillina (0.85). Por lo anterior el mejor empaque para la comercialización de vainas al menudeo es el uso de películas dobles en cantidades mayores a una vaina.

Palabras clave: empaque, humedad, permeabilidad, vainillina.

I. INTRODUCCIÓN

El nivel de los aldehídos, vainillina y 4-hidroxibenzaldehído y sus respectivos ácidos (ácido vainillínico y ácido 4-hidroxibenzóico), es usado en vainas curadas como un indicador de la calidad para propósitos comerciales. Estos compuestos, aunque en pequeñas cantidades, son importantes para el desarrollo del sabor y aroma de la vainilla (Pérez-Silva *et al.*, 2006). Sin embargo, cuantitativamente, la vainillina es el mayor componente en la vaina, y su contenido, junto con el grado de humedad, son determinantes para su clasificación.

Existen factores que afectan las condiciones de la vainilla beneficiada: contenido de humedad de la vaina, tipo de empaque, temperatura y humedad relativa del medio. Para prevenir el intercambio de humedad con el ambiente, una práctica común es agrupar un número determinado de vainillas beneficiadas, empacarlas en bolsas de polietileno y almacenarlas en un lugar fresco y seco (De La Cruz *et al.*, 2009).

Los empaques utilizados no son herméticos, por lo cual se presenta un intercambio gaseoso con el medio. Asimismo, hay cambios en la composición al interior del empaque con la generación de gases y volátiles, resultado del proceso de beneficio o de metabolismo propio de la vaina. Otro tipo de empaque empleado en vainilla ha sido el envasado al vacío, que consiste en introducir la vainilla al empaque de mayor grosor y remover la atmósfera circundante. El mayor grosor del empaque de plástico impide el intercambio de gases y humedad entre el interior y exterior del mismo. Este proceso, aunque preserva la humedad de la vaina de vainilla, tiene los siguientes inconvenientes: a) el sellado impide la volatilización de compuestos indeseables, lo que puede contribuir a la falta de sabor de las vainas, b) el empacado al vacío crea una atmósfera anaeróbica que contribuye al crecimiento y actividad de microorganismos anaerobios que pueden ser responsables de la desaparición del sabor y la formación de sabores indeseables, y c) la atmósfera pobre en oxígeno evita las reacciones de oxidación no enzimáticas, que contribuyen al sabor durante el acondicionamiento y almacenamiento (Havkin-Frenkel, 2005; Havkin-Frenkel y Frenkel, 2010).

Por lo anterior, en esta segunda fase de la investigación se analizaron vainas procedentes de dos beneficios, empleando películas dobles de empaques comerciales, para evaluar si de esta

forma se reduce la permeabilidad al vapor de agua, y preserva la humedad, evitando afectar la relación de compuestos volátiles.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

En esta fase se emplearon películas dobles de los materiales probados en la primera fase: celofán doble, celofán dentro de polietileno (calibre 400), celofán dentro de bolsas para vacío a base de polietileno con una capa exterior de nylon para agregar fuerza y rigidez de acuerdo con las especificaciones de la marca (FoodSaver™, Corea); y celofán simple.

Las vainas procedieron de dos beneficios: (1) Primero de Mayo y (2) Empresa 20 Soles®. Se empacaron una y cinco vainas por empaque, replicando la presentación comercial de vainilla gourmet, que se comercializa en aeropuertos o tiendas gourmet. En total se evaluaron ocho tratamientos como se muestra en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Condiciones de empaque de vainas beneficiadas de vainilla.

Tratamiento	Tipo de empaque	Condición	Número de vainas / empaque
1	Celofán	Aire	1
2	Celofán	Aire	5
3	Celofán doble	Aire	1
4	Celofán doble	Aire	5
5	Celofán - Polietileno	Aire	1
6	Celofán - Polietileno	Aire	5
7	Celofán – Bolsa vacío	Vacío	1
8	Celofán – Bolsa vacío	Vacío	5

Las bolsas de celofán tuvieron una dimensión de 5 cm x 25 cm, las de polietileno (6 cm x 26 cm) y las de vacío (7 cm x 28 cm), después de introducir una o cinco vainas, se sellaron en condición de aire normal y/o vacío. Cada tratamiento consistió en tres repeticiones para cada tratamiento (Figura 15).



Figura 15. Empaques dobles empleados en la segunda fase de la investigación, con una y cinco vainas (a) Celofán simple; (b) Celofán doble; (c) Celofán–Polietileno; y (d) Celofán–Vacío.

Los tratamientos se almacenaron en cajas de cartón con tapa, donde la temperatura y humedad relativa promedio fueron de 23.6 °C y 40.5 %. Se realizaron seis muestreos mensuales.

Los análisis humedad, compuestos fenólicos principales, pH, pérdida de peso, etanol y acetaldehído, y azúcares se llevaron a cabo en el Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Los análisis de actividad de agua, firmeza, color y crecimiento microbiano, se realizaron en el Laboratorio de Análisis de Alimentos de la Facultad de Ingeniería Química, en la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; y el análisis de permeabilidad se llevó a cabo

en el Laboratorio de Análisis Físicoquímicos del Departamento de Ingeniería Agroindustrial en la Universidad Autónoma Chapingo.

2.2 Variables

Humedad. La determinación de humedad se realizó cada mes por pérdida de peso, colocando tres segmentos (de empaques con una vaina) u 8 segmentos de vaina (de empaques con 5 vainas) en bolsas de papel Glassine de 9 x 19 cm dentro de un horno mecánico de convección (Lab-Line Imperial V, Alpha Multiservices, Inc, USA), a 50 °C por siete días, cuando alcanzó peso constante.

Compuestos fenólicos principales. Para evaluar la presencia y cuantificar los cuatro compuestos principales de la vainilla (4-hidroxibenzaldehído, ácido 4-hidroxibenzóico, vainillina y ácido vainillínico), por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se siguió el proceso de extracción e inyección del método modificado de Cicchetti y Chaintreau (2009) que se describe a continuación: las vainas congeladas se molieron con un molino Custom Grind™ Deluxe, (Hamilton Beach™); se pesaron 0.05 g y se colocaron en viales de vidrio de 20 mL con tapa de rosca. Se colocó un magneto pequeño y se agregaron 18 mL de solución etanol-agua destilada (1:1) (alcohol etílico absoluto anhidro, grado HPLC, Karal®), la cual se preparó con 24 h de anticipación y se mantuvo en refrigeración (4°C). La mezcla se agitó por 30 min a velocidad 6 en una parrilla digital de agitación (Thermo Scientific™, Cimarec™, USA), y se colocaron en refrigeración por 24 horas. Transcurrido ese tiempo las muestras se colocaron nuevamente en agitación durante 5 min a la misma velocidad, y se tomó un mililitro que se filtró con un acrodisco (Titan, 0.045 µm) y se colocó en un vial de vidrio de 2 mL con tapa de rosca con septa pre-perforada. Los extractos se colocaron en el automuestreador del HPLC (Series 200, Perkin Elmer™) para inyectar 10 µL a un caudal de 1 mL min⁻¹.

Las condiciones del cromatógrafo fueron: temperatura del horno a 30 °C y 30 min de duración de cada corrida. La fase móvil fue una solución de ácido fosfórico (H₃PO₄) al 0.01 M con metanol (75:25); columna C18 5µm 250x4.6mm, serie 08010034K (Perkin Elmer™), y detector UV/VIS a 254 nm (Series 200, Perkin Elmer™). La fase móvil, la solución metanol:

agua y el agua empleados en el HPLC se filtraron con un sistema al vacío con matraz Kitasato, filtros de 47 mm y tamaño de poro de 0.45 μm (Titán).

Para la identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos se emplearon sustancias puras. La solución estándar se preparó de la misma manera que en la primera fase, en una solución etanol: agua (1:1) con 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de vainillina (3 metoxi- 4-hidroxibenzaldehído); y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ácido 4-hidroxibenzóico, 4-hidroxibenaldehido y ácido vainillínico (ácido 4-hidroxí-3-metoxibenzoico) (Sigma-Aldrich, USA). A partir de esta mezcla se realizaron las diluciones necesarias para la obtención de las curvas de calibración (Anexo A). Para el lavado de la columna se empleó metanol:agua (1:1).

pH. El pH se midió de manera mensual en los extractos obtenidos con un potenciómetro (HI 2211, Hanna Instruments®).

Pérdida de peso. Se calculó la pérdida de peso de vainas expuestas al ambiente de cada uno de los dos beneficios, por 16 días consecutivos. Por otro lado, las vainas empacadas se pesaron desde el momento del empacado hasta el momento de su análisis.

Etanol y Acetaldehído. Se realizaron cuatro determinaciones de etanol y acetaldehído para el beneficio 1, y tres para el beneficio 2, basándose en el método propuesto por Davis y Chase (1969), con algunas modificaciones, siguiendo la siguiente metodología: se pesaron 0.3 g de vaina y se colocaron en viales de 10 mL, los cuales se sellaron con una engrapadora manual y se llevaron a 0 °C por 15 días. Después se sacaron, se dejaron 2 h a temperatura ambiente y posteriormente se colocaron en baño María por 10 min a 30 °C. Transcurrido este tiempo, se tomó con una jeringa 1 mL de espacio de cabeza para inyectarlo en el Cromatógrafo de Gases (Perkin Elmer Clarus 400), tiempo de corrida de 4 min, temperatura de horno: 150 °C, temperatura de inyector: 170 °C, temperatura de detector FID: 180 °C y temperatura TCD: 180 °C.

Color. El color se evaluó con un Colorímetro Hunter Lab marca Colorflex. Se analizó cada 2 meses colocando tres segmentos de vaina de 8 cm y cubriéndolas con una tapa cilíndrica de foamy, obteniendo los valores de L, a y b. Para las vainas empacadas con una sola muestra, se

colocaron las 3 repeticiones para poder determinar las lecturas, y se consideraron esos mismos valores para todas (Figura 16).



Figura 16. Análisis de color de vainas con colorímetro Hunter Lab.

Firmeza. Para medir la firmeza de las vainas se utilizó un Texturómetro TA.XT.Plus – Stable MicroSystems, empleando la punta SMS P/0.5 de 4 cm de largo por 1.2 cm de diámetro, y la base cilíndrica hueca de 3.5 cm de alto por 2.1 cm de diámetro interno. Se colocó un trozo de vaina de 8 cm sobre la base y se empleó el software Texture Exponent 32, seleccionando en el siguiente orden las opciones (1) Food, (2) Fruits and vegetables, (3) Pears y Firmness or Bioyield Point Measurements of Pears by Probing, para poder cargar el programa. El equipo se calibró a una velocidad de 5 mm s^{-1} , distancia de 8 mm, distancia de retorno de 2 mm, velocidad de retorno de 10 mm s^{-1} y una fuerza de contacto de 0.1 g. Además de una velocidad de adquisición de 25 puntos por segundo y un tiempo de prueba típico de 150 segundos. (Figura 17).

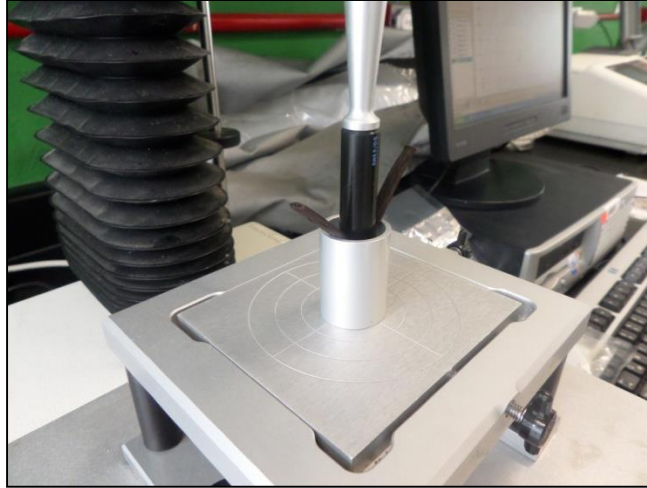


Figura 17. Evaluación de firmeza de vainas beneficiadas de vainilla.

Actividad de agua. La actividad de agua (A_w) se midió bimestralmente introduciendo en la charola del equipo Aqua Lab un segmento de vaina de aproximadamente un centímetro en el caso de muestras con una vaina, y tres segmentos en el caso de empaques con cinco vainas (Figura 18), a una temperatura promedio de la muestra de 24.7 °C.

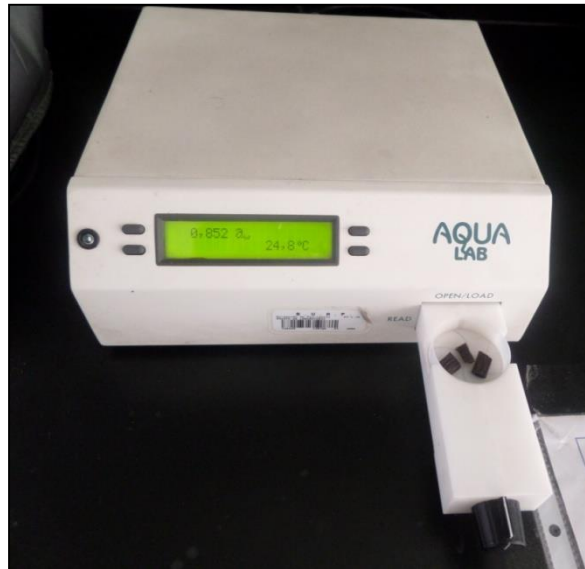


Figura 18. Análisis de actividad de agua

Actividad microbiológica. Se realizaron recuentos en placa de Bacterias Mesófilas Aerobias, Coliformes totales, y Hongos y Levaduras, en base a las normas NOM-092-SSA1-1994,

NOM-113-SSA1-1994, y NOM-111-SSA1-1994, respectivamente. Para cada beneficio, se realizó un análisis inicial y otro a los 6 meses de almacenamiento. En éste último las muestras se dividieron en 8 tratamientos, reuniendo en cada tratamiento las repeticiones de cada tipo de empaque y número de vainas.

Se pesaron 10 g de vaina de cada tratamiento con cinco vainas y aproximadamente 4 g de los tratamientos con una vaina. Se colocaron en 90 mL de solución peptonada, y a partir de esta se realizaron las diluciones, considerando cinco diluciones para BMA y hongos y levaduras (10^{-1} - 10^{-5}); y dos diluciones para coliformes totales (10^{-1} y 10^{-2}), todas por triplicado.

Azúcares. En cuanto a la determinación de azúcares se realizó al final del periodo de evaluación, con el método modificado de Mustafa *et al.* (2003). Para la elaboración de los extractos se pesó 1 g de vaina molida y se agregaron 60 mL de etanol al 80 % en un matraz de 250 mL con tres perlas de ebullición. Se calentó en una parrilla hasta reducir su volumen a 20 mL. Se filtró con algodón y se refrigeró por 24 h.

Los extractos se filtraron por cartuchos de limpieza (Cromabond®C₁₈ec, 3mL/500mg, 60Å, 45µm, Macherey-Nagel, Alemania). Pasando primero 5 mL de metanol grado HPLC, 5 mL de agua destilada y finalmente 2 mL de extracto, con lo cual se obtuvo 1 mL el cual se filtró con un acrodisco (Titan, 0.045 µm) y se colocó en un vial de 2 mL con tapa y septa. Se colocaron los extractos filtrados en el automuestreador del HPLC (Series 200, Perkin Elmer™) para la inyección. Las condiciones del cromatógrafo fueron: temperatura del horno de 40 °C, flujo de 1 mL min⁻¹, volumen de inyección de 10 µL y detector de índice de refracción (Perkin Elmer Series 200).

La fase móvil fue una solución de acetonitrilo:agua (80:20) y se empleó una columna Pinnacle II Amino 5 µm 150 x 4.6 mm (Restek™), con un tiempo de corrida de 11.5 min. Para las curvas de calibración se pesaron por separado 0.1 g de fructosa, glucosa y sacarosa al 99.5 % (todos de Sigma-Aldrich, USA) en la balanza analítica (Voyager® Pro, Modelo VP114CN, Ohaus, Suiza). Se colocó cada azúcar en un matraz de 10 mL y se aforaron con metanol:agua (1:9). Se realizaron las lecturas en el HPLC, y por medio de una regresión lineal se obtuvieron

las fórmulas para determinar los porcentajes de cada azúcar en las muestras, los cuales en su conjunto representan los azúcares totales.

Permeabilidad. Para evaluar la permeabilidad al vapor de agua de las películas plásticas se emplearon los métodos modificados de McHugh *et al.* (1993) y Gennadios *et al.* (1994). Para ello se prepararon 160 mL de solución saturada de nitrato de potasio (marca Fermont) a 25 °C a baño maría en un frasco de 1 L. Se colocó en su interior un higrómetro portátil y se tapó para medir la humedad relativa, la cual fue de 96.3 %. Se utilizaron cajas petri desechables con base de 9.4 cm de diámetro, 1.3 cm de altura y 85 mL de capacidad; las cuales se perforaron por un costado con una broca caliente. Por otra parte, cada película plástica empleada (celofán, polietileno de baja densidad (calibre 400), y película FoodSaverTM (lado liso y lado acanalado), se colocaron en un bastidor simple de costura de 14 cm de diámetro para sujetar el plástico y tensarlo. Cada película se realizó por triplicado.

Las placas perforadas se colocaron en la película plástica y se sellaron con silicón caliente y parafina comercial. Se taparon los orificios con tapones de tubos de plástico (Plus BD Vacutainer ® de 13 x 75 mm), y también se sellaron con parafina y silicón. Se quitaron los bastidores y se recortó el sobrante de plástico.

A cada placa se le inyectaron 34 mL de solución saturada de nitrato de potasio (marca Fermont) que representó 40 % de su capacidad, la cual también fue preparada en baño maría a 25 °C. Se pesaron y se colocaron en una estufa mecánica de convección de aire (Thermo Scientific) a una temperatura media de 24.5 °C, y se pesaron 2 veces por día durante 10 días, para obtener la pérdida de peso. La humedad relativa media dentro de la estufa fue de 34 %.

Para obtener los espesores de las películas plásticas, se cortaron 10 trozos de 2.2 x 2.2 cm de cada empaque, los cuales se intercalaron con 11 cubreobjetos de la misma medida. Se midió el espesor del bloque formado con un micrómetro manual (Central Scientific Co., Chicago, Illinois) (Figura 19). Posteriormente, se midió el espesor de los 11 cubreobjetos, para conocer por medio de la diferencia, el espesor de los trozos de películas, y dividir esta cantidad entre 10, para conocer el espesor de cada tipo de película plástica empleada.

Los espesores obtenidos fueron: 25 μm para celofán, 102 μm para polietileno de baja densidad, y 68 μm para el empaque al vacío (del lado liso), y 183 μm (lado acanalado).



Figura 19. Medición de espesor de las películas plásticas con micrómetro manual.

Finalmente, para conocer la permeabilidad se empleó la fórmula:

$$rv = \frac{Pv A Pv^* (Hr^i - Hr^e)}{e}$$

Donde:

rv : Pendiente de la recta de cambios de peso en función del tiempo (g s^{-1})

Pv : Permeabilidad a vapor de agua ($\text{g m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$)

A : Área expuesta de la película plástica (m^2) = 0.00694

Pv^* : Presión de vapor de saturación a 25 °C (Pa) = 3167

Hr^i : Humedad relativa al interior de la celda = 96.3 %

Hr^e : Humedad relativa al exterior de la celda (de la estufa a 25 °C) = 34 %

e : Espesor de la película (m)

Despejando Permeabilidad (Pv):

$$P = \frac{r v e}{A P v^* (H r^i - H r^e)}$$

De tal manera, las permeabilidades a vapor de agua obtenidas quedan resumidas en el Cuadro 9; considerando que las permeabilidades de las películas plásticas dobles son el resultado de la suma de las películas simples.

Cuadro 9. Espesor y tasa de permeabilidad al vapor de agua de las películas empleadas.

Película plástica	Espesor (μm)	Permeabilidad a vapor de agua ($\text{g m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$)
Celofán	25	1.34×10^{-11}
Polietileno de baja densidad	102	5.51×10^{-11}
Empaque al vacío (lado liso)	68	3.76×10^{-11}
Empaque al vacío (lado acanalado)	183	1.3×10^{-10}
Celofán doble	50	2.68×10^{-11}
Celofán - Polietileno de baja densidad	127	6.85×10^{-11}
Celofán – Polietileno de vacío (lado liso)	93	5.10×10^{-11}
Celofán – Polietileno de vacío (lado acanalado)	208	1.17×10^{-10}

2.3 Diseño experimental y Análisis estadístico

Se realizó una matriz con los coeficientes de correlación de Pearson y los niveles de significancia con el paquete estadístico SAS® v. 9.0, y con los datos más representativos, se obtuvieron diagramas de dispersión elaborados con Infostat v. 2011.

Asimismo, se empleó un diseño factorial de medidas repetidas factorial con dos bloques (Correa, 2004), que consideró los efectos del tipo de empaque, número de vainas por empaque, tiempo y las interacciones entre ellos, quedando el modelo de la siguiente manera:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \tau_k + (\alpha\tau)_{ik} + (\beta\tau)_{jk} + (\alpha\beta\tau)_{ijk} + e_{ijkl}$$

Donde:

Y_{ijk}: Variable respuesta

μ: Media general

α_i: Efecto del empaque i-ésimo; tal que i Celofán, Celofán doble, Celofán-Polietileno, Celofán-Vacío o i: 1, 2, 3, 4

β_j: Efecto de la cantidad de vainas j-ésima tal que j: 1, 5

(αβ)_{ij}: Efecto de la interacción del empaque i-ésimo y la cantidad de vainas j-ésima

τ_k: Efecto del tiempo tal que k: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6

(ατ)_{ik}: Efecto de la interacción del empaque i-ésimo y el tiempo k-ésimo

(βτ)_{ji}: Efecto de la interacción de la cantidad de vainas j-ésima y el tiempo k-ésimo

(αβτ)_{ijk}: Efecto de la interacción del empaque i-ésimo, la cantidad de vainas j-ésima y el tiempo k-ésimo

e_{ijk}: Error de Y_{ijk} con $\sim N(0, \sigma^2)$

Con las siguientes hipótesis estadísticas:

- | | | |
|--|----|--|
| 1) H ₀ : α ₁ = α ₂ = α ₃ = α ₄ = 0 | vs | H _a : al menos un empaque es diferente |
| 2) H ₀ : β ₁ = β ₂ = 0 | vs | H _a : las dos cantidades de vainas son diferentes |
| 3) H ₀ : α ₁ β ₁ = α ₁ β ₂ = ... = α ₄ β ₂ = 0 | vs | H _a : Existe interacción entre empaque y número de vainas |
| 4) H ₀ : τ ₁ = τ ₂ = ... = τ ₇ = 0 | vs | H _a : al menos un tiempo o fecha es diferente |
| 5) H ₀ : α ₁ τ ₁ = α ₁ τ ₂ = ... = α ₄ τ ₇ = 0 | vs | H _a : Existe interacción entre empaque y tiempo |
| 6) H ₀ : β ₁ τ ₁ = β ₁ τ ₂ = ... = β ₂ τ ₇ = 0 | vs | H _a : Existe interacción entre número de vainas y tiempo |
| 7) H ₀ : α ₁ β ₁ τ ₁ = α ₁ β ₁ τ ₂ = ... = α ₄ β ₂ τ ₇ = 0 | vs | H _a : Existe interacción entre empaque, número de vainas y tiempo |

Por último, se analizaron los procedimientos para evaluar las tres estructuras de covarianza para las dos variables respuesta principales: vainillina y humedad, considerando que la calidad de la vainilla generalmente se evalúa con el porcentaje de humedad de la vaina y el contenido de vainillina.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Efecto del Empaque y Tiempo de Almacenamiento en el contenido de Humedad y Compuestos Fenólicos.

El uso de atmósferas modificadas es una técnica empleada durante el almacenamiento y transporte de varios productos agrícolas, en los cuales la conservación de sustancias volátiles es importante. Por ejemplo Borém *et al.* (2013) evaluaron granos de café verde empacados herméticamente en polietileno bicapa con polietileno de alta densidad y una capa de PVC, con una capa exterior de nylon, y encontraron que después de 12 meses de almacenamiento sin inyección de CO₂, se mantuvieron características sensoriales deseables de color, sabor y aroma, además de que facilitó su manejo tanto mecánico como manual; aunque los resultados fueron levemente mejor con inyección de CO₂.

Para la variable **humedad**, en la Figura 20, se observa que la vainilla proveniente del beneficio 1 presentó 40.8 % de humedad inicial, menor que la del beneficio 2 (46 %), diferencia que se mantiene a lo largo del almacenamiento, considerando que las pérdidas de humedad de las vainillas del beneficio 1 a los seis meses de almacenamiento son de 25 a 33 % mayores a la del beneficio 2 en empaques con una vaina. La pérdida de humedad es mayor en las vainas individuales empacadas en celofán, siendo 70 % para el beneficio 1 y 37.6 % para el beneficio 2; mientras que el uso de los empaques dobles reduce las pérdidas significativamente en comparación con los empaques con una vaina. Independientemente del empaque utilizado las vainas mantenidas con cinco unidades, conservan la humedad con pérdidas solamente de un 5 a 14 % para el beneficio 1, y de 9 a 11 % para el beneficio 2, después de seis meses de almacenamiento.

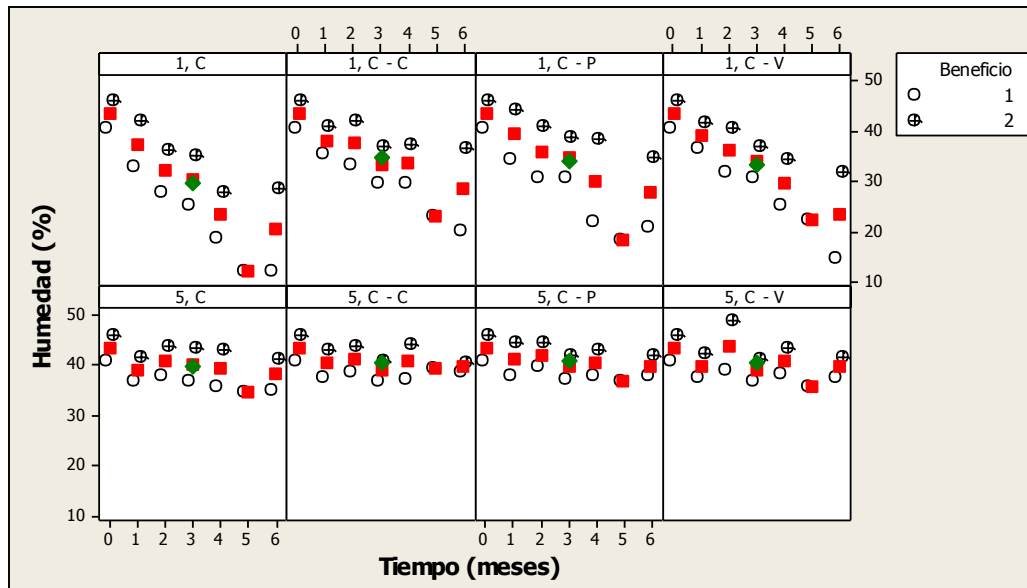


Figura 20. Gráfica multivariada para la variable respuesta **Humedad**, para los factores Beneficio, Empaque, Tiempo y número de vainas por empaque. (C: Celofán, C-C: Celofán doble, C-P: Celofán-Polietileno, C-V: Celofán-Vacío). [\bar{x} : 36.8, σ : 7.98, CV: 21.7].

(\blacksquare : Media de Humedad entre beneficios de cada fecha; \blacklozenge : Media de Humedad por cada tipo de empaque y número de vainas).

De acuerdo con Havkin-Frenkel y Frenkel (2010), el contenido de humedad es uno de los principales factores en la conservación de las vainas curadas, ya que en un nivel adecuado se reducen las posibilidades de crecimiento microbiano. Por otro lado la composición del aire en un empaque puede cambiar durante el almacenamiento debido a la permeabilidad del material del empaque o por procesos que lleva a cabo el mismo producto (Ucherek, 2001), lo cual también influye directamente en la formación de un ambiente propicio para el crecimiento o inhibición de microorganismos.

Considerando los dos beneficios, se analizaron los procedimientos para evaluar las tres estructuras de covarianza para la variable humedad, el menor criterio Bayesiano (BIC-Schwarz's Bayesian Information Criterion) obtenido fue de 265.8, correspondiente a la estructura simétrica compuesta.

En el análisis de varianza de esta estructura, se observa que los efectos significativos son el empaque, número de vainas, tiempo, y las interacciones Empaque*Número de vainas y

Tiempo*Número de vainas; con valores de $Pr > F$ menores de 0.05. Mientras que los efectos que no resultaron significativos fueron la interacción doble Tiempo*Empaque y la triple (Ver Anexo F).

En cuanto a las diferencias de los mínimos cuadrados de este análisis, al comparar los valores de significancia entre los diferentes tratamientos, tenemos que, en cuanto a la comparación entre los empaques Celofán doble (C-C) y Celofán-Polietileno (C-P), éstos no son significativos (0.8055), lo que indica que son los empaques más parecidos entre ellos.

Dentro de la matriz de correlaciones obtenida, puede observarse que la mayoría tiene correlaciones significativas, sin embargo, las mayores ocurren entre humedad-4-hidroxibenzaldehído (-0.77), humedad-vainillina (-0.82), y ácido 4-hidroxibenzóico-ácido vainillínico (0.88), y 4-hidroxibenzaldehído-vainillina (0.85) (Cuadro 10).

Estas asociaciones, con niveles de significancia menores de 0.0001, pueden observarse de igual forma en los diagramas de dispersión mostrados en la Figura 21.

Cuadro10. Matriz de correlación de las variables evaluadas (correlaciones y niveles de significancia).

	Humedad	Ac. 4-hidroxibenzóico	4-hidroxibenzaldehído	Ac. Vainillínico	Vainillina
Humedad	1.00	-0.63	-0.77	-0.54	-0.82
		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
Ac. 4-hidroxibenzóico	-0.63	1.00	0.49	0.88	0.34
	<.0001		<.0001	<.0001	<.0001
4-hidroxibenzaldehído	-0.77	0.49	1.00	0.31	0.85
	<.0001	<.0001		<.0001	<.0001
Ac. Vainillínico	-0.54	0.88	0.31	1.00	0.29
	<.0001	<.0001	<.0001		<.0001
Vainillina	-0.82	0.34	0.85	0.29	1.00
	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	

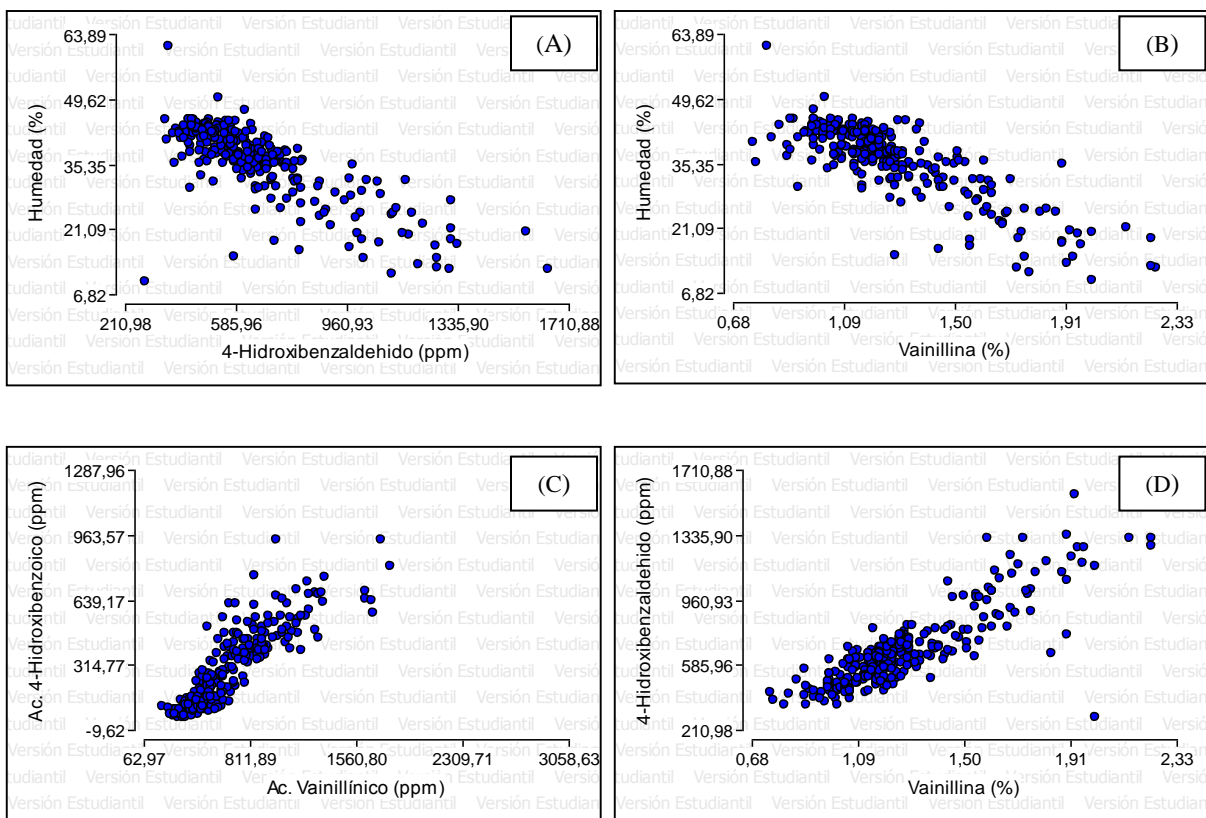


Figura 21. Diagramas de dispersión de humedad – 4-hidroxibenzaldehído (A), humedad – vainillina (B), y ácido 4-hidroxibenzoico – ácido vainillínico (C), y 4-hidroxibenzaldehído – vainillina (D); con correlaciones de -0.77, -0.82, 0.88 y 0.85, respectivamente.

Como se comentó, existe una correlación negativa significativa entre las variables humedad y vainillina (-0.82). De acuerdo con López (2013), la vainillina es poco soluble en agua y se volatiliza en soluciones acuosas, por lo que a mayor contenido de humedad existe menor contenido de vainillina. Por otra parte, si se considera que la biosíntesis de vainillina ocurre por medio de una β -oxidación, la escases de O_2 en los empaques con cinco vainas explicaría la constante en los valores en esos tratamientos, ya que la humedad se retiene mejor con mayor número de vainas por empaque, pero con una reducción en los niveles de O_2 la biosíntesis de vainillina se reduce.

Para el caso de la **vainillina**, las vainas de ambos beneficios tuvieron un contenido inicial de vainillina del 1.1 % que incrementó consistentemente en las vainas empacadas individualmente entre un 75-100 % hacia el final del periodo de almacenamiento, siendo

mayor en el beneficio 1, con un valor máximo de 2.0 % en el cuarto mes para celofán simple y celofán-polietileno; y en el sexto mes valores máximos de 1.7 % y 2.0 % en celofán doble y celofán-vacío, respectivamente. Mientras que el valor máximo en el beneficio 2 fue de 1.7 % y se presentó en el cuarto mes en el empaque de celofán. Para el caso de la vainilla empacada con cinco unidades, se presentaron niveles constantes de vainillina, aunque menores a los especificados en la norma y el incremento máximo fue solamente de hasta un 25 % en ambos beneficios (Figura 22).

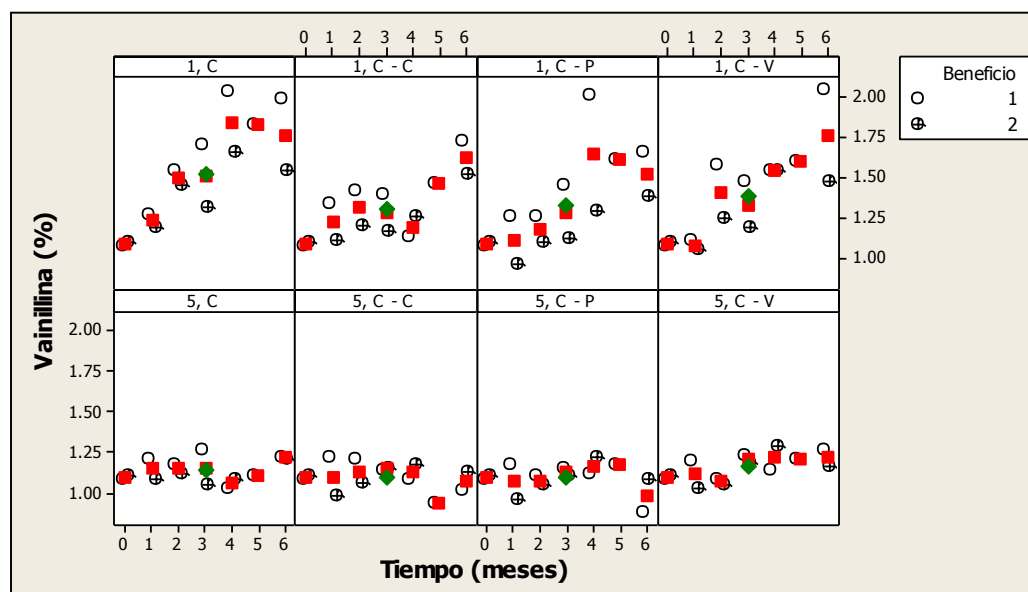


Figura 22. Gráfica multivariada para la variable respuesta **Vainillina**, para los factores Beneficio, Empaque, Tiempo y número de vainas por empaque. (C: Celofán, C-C: Celofán doble, C-P: Celofán-Polietileno, C-V: Celofán-Vacío). [\bar{x} : 1.25, σ : 0.266, CV: 21.2].

(■: Media de Vainillina entre beneficios de cada fecha; ◆: Media de Vainillina por cada tipo de empaque y número de vainas).

Es común que en *V. planifolia* los niveles de vainillina estén por debajo de las normas. En un estudio realizado por Gassenmeier *et al.* (2008) a 93 muestras de vainas curadas de varios países tales como México, Madagascar, Indonesia, Uganda, India y Papúa Nueva Guinea, mostraron niveles promedio de vainillina de 1.9, 1.76, 1.1, 1.7, 1.59, 1.3 %, respectivamente; aunque cabe mencionar que en este estudio no se menciona que las vainas hayan estado empacadas.

Por otra parte, en un estudio elaborado por Márquez y Waliszewski, (2008), se analizaron diferentes tipos de matado en vainilla de Papantla, Méx. con diferentes combinaciones de tiempos y temperaturas, encontrando en extractos etanólicos que el matado con agua caliente a 60 °C por 3 min provoca 51 % de la pérdida de la actividad de la β -glucosidasa, mientras que a 80°C por 30 seg (3 inmersiones de 10 segundos) la enzima pierde 48 % de su actividad, lo cual señala que es mejor una temperatura elevada por tiempos cortos, tal y como se realiza en el beneficio 1 (Cuadro 6). Es deseable una menor pérdida de la actividad de esta enzima, ya que es la que tiene mayor afinidad con la vainillina (Odoux y Grisoni, 2011).

En la investigación realizada por López (2013), se analizaron muestras con diferentes tiempos de almacenamiento y se encontró que el porcentaje de vainillina es mayor en vainas con 2 años de almacenamiento, alcanzando prácticamente 1.8 %, mientras que las vainas al término del curado, tuvieron aproximadamente 0.9 % de este compuesto fenólico, lo cual podría indicar que la hidrólisis de vainillina aumenta con el paso del tiempo.

La vainillina junto con el 4-hidroxibenzaldehído son compuestos fenólicos responsables de criterio de vainillina en las vainas curadas, el cual es el más deseado bioquímicamente (Odoux y Grisoni, 2011).

El contenido de vainillina es el parámetro analítico más importante en la vainilla beneficiada, pero los otros tres compuestos fenólicos principales son también importantes, sobre todo como parámetros de autenticidad (Gassenmeier *et al.*, 2008).

También considerando los dos beneficios, se analizaron los procedimientos para evaluar las tres estructuras de covarianza para la variable vainillina y el menor Criterio Bayesiano con valor de -21.7 se obtuvo en el modelo autorregresivo.

Dentro de esta estructura, y al observar su análisis de varianza (Ver Anexo G) los efectos significativos son, tiempo de almacenamiento y número de vainas por empaque, así como su interacción (Tiempo*Número de vainas); con valores de $Pr > F$ menores de 0.05. Mientras que los efectos que no resultaron significativos fueron el tipo de empaque, y las interacciones dobles Empaque*Número de vainas y Tiempo*Empaque, y la triple.

En cuanto a las diferencias de los mínimos cuadrados de este análisis, al comparar los valores de significancia entre los diferentes empaques, los empaques C-C y C-P no fueron significativos (0.7995), lo cual indica que son los empaques más parecidos para vainillina.

Para el caso del **ácido *p*-hidroxibenzoico**, los valores iniciales fueron de 146 y 81 ppm para los beneficios 1 y 2, respectivamente. El beneficio 1 mostró un incremento durante los seis meses de almacenamiento, independientemente del tipo de empaque y número de vainas empacadas. Para los tratamientos con una vaina, el tratamiento C-P registró el mayor valor (625 ppm), y el tratamiento celofán con 5 vainas con 746 ppm. Cabe mencionar que el valor menor de 387 ppm se mostró en el tratamiento de vacío. Mientras tanto, para el beneficio 2, el incremento de ácido 4-hidroxibenzoico fue mínimo, mostrando el valor máximo de 238 ppm en el tratamiento celofán con una vaina (Figura 23).

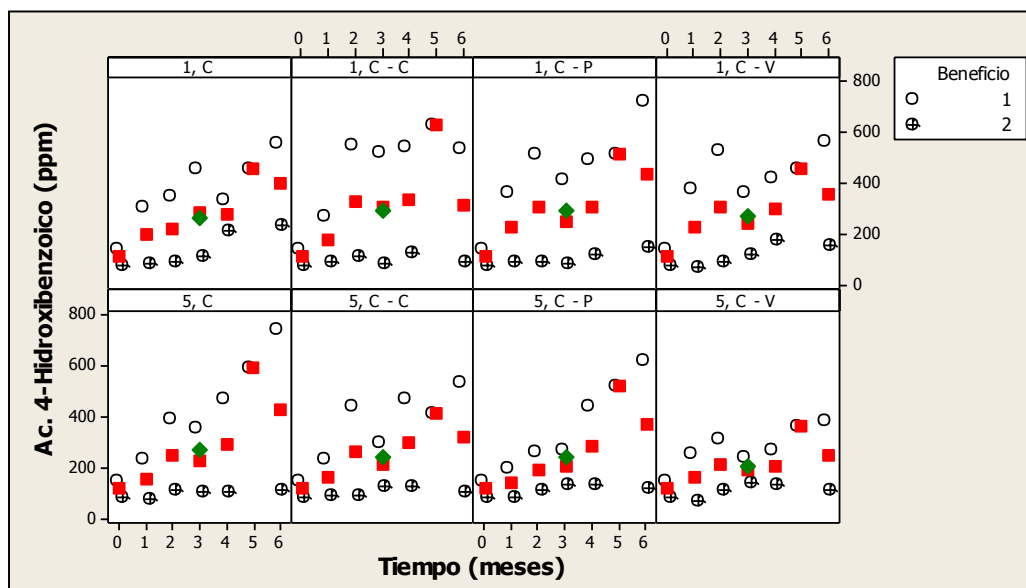


Figura 23. Gráfica multivariada para el **ácido *p*-hidroxibenzoico**, para los factores Beneficio, Empaque, Tiempo y número de vainas por empaque. (C: Celofán, C-C: Celofán doble, C-P: Celofán-Polietileno, C-V: Celofán-Vacío). [\bar{x} : 260.2, σ : 198.1, CV: 76.1].

(■: Media de Ac. 4-Hidroxibenzoico entre beneficios de cada fecha; ◆: Media de Ac. 4-Hidroxibenzoico por cada tipo de empaque y número de vainas).

El ácido *p*-hidroxibenzoico, es un metabolito secundario perteneciente a los ácidos fenólicos y al igual que los demás posee un anillo aromático unido a un grupo hidroxilo. En la presente

investigación tuvo una alta correlación significativa positiva con el ácido vainillínico (0.88). Dichos ácidos fenólicos proporcionan el aroma indeseable de ahumado/fenólico a las vainas curadas, por lo que es deseable que se mantenga en una concentración baja.

Los valores de **p-hidroxibenzaldehído** (Figura 24), antes de empacar las vainas fueron de 535 y 527 ppm para el beneficio 1 y 2, respectivamente. Se observa un incremento consistente en las vainas empacadas individualmente, sobre todo en el beneficio 1; y sin un incremento sustancial en vainas empacadas en cinco unidades durante los seis meses de almacenamiento. Los valores máximos registrados en tratamientos con una vaina para el beneficio 1 fueron de 1321, 1167 y 1267 ppm para los tratamientos 1, 5 y 7 (celofán, C-P y C-V, respectivamente). Mientras que para el beneficio 2 los valores máximos se registraron en un intervalo de 716 a 756 ppm, no existiendo diferencias significativas entre ellos. En cuanto a los tratamientos con cinco vainas, hubo leves incrementos en cuanto a su contenido en ambos beneficios, oscilando entre 434 y 750 ppm para el primero, y 415 y 495 ppm para el segundo.

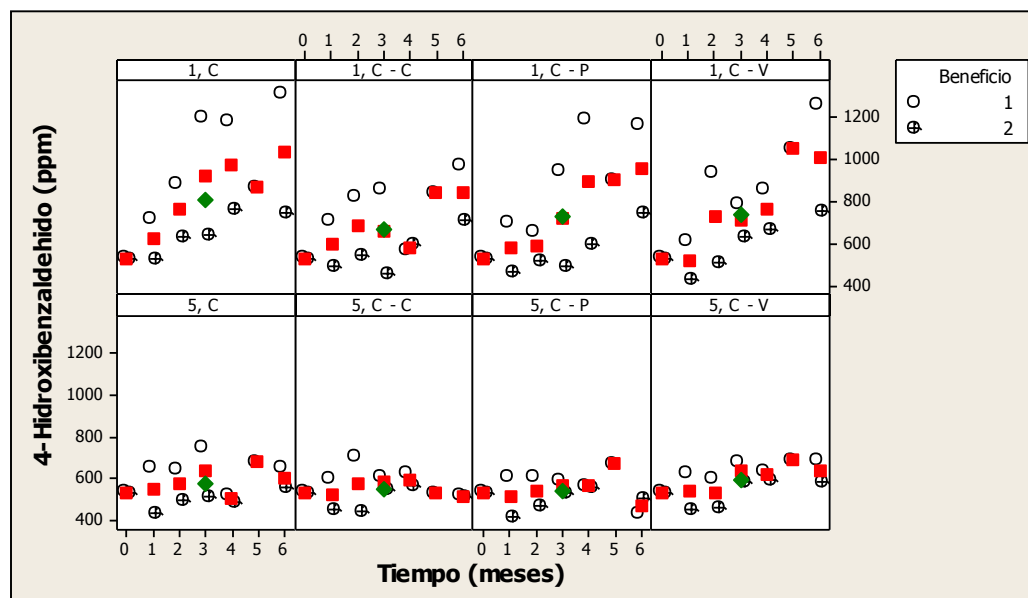


Figura 24. Gráfica multivariada para el ***p*-hidroxibenzaldehído**, para los factores Beneficio, Empaque, Tiempo y número de vainas por empaque. (C: Celofán, C-C: Celofán doble, C-P: Celofán-Polietileno, C-V: Celofán-Vacío). [\bar{x} : 649.5, σ : 217.9, CV: 33.5].

(■: Media de 4-Hidroxibenzaldehído entre beneficios de cada fecha; ◆: Media de 4-Hidroxibenzaldehído por cada tipo de empaque y número de vainas).

En un estudio realizado por Pardo *et al.* (2009) con vainilla de Papantla, Mex. en el cual evaluaron siete métodos de matado, los mayores niveles de vainillina y *p*-hidroxibenzaldehído, se encontraron en extractos etanólicos elaborados con vainas curadas de manera rápida, con inmersión en agua a 80°C por 10 segundos tres veces con intervalos de 30 segundos. Este tipo de matado es similar al realizado en el beneficio 2, sin embargo, los mejores resultados se presentaron en el beneficio 1, el cual realiza su matado por tiempos más breves aún (1 a 3 segundos) y con mayor temperatura (90 a 100 °C) (Cuadro 6).

Los cual nos indica que, en efecto, el rompimiento de la célula en esas condiciones crea mejores condiciones para que los precursores glucosídicos encapsulados de los compuestos aromáticos y sus enzimas hidrolíticas catalicen la liberación de vainillina y el *p*-hidroxibenzaldehído (Pardo *et al.*, 2009).

El comportamiento del *p*-hidroxibenzaldehído es muy similar al de la vainillina, por lo que existe una correlación positiva significativa del 0.85 entre ambas variables (Figura 22); ya que de acuerdo con Havkin-Frenkel y Belanger (2007) y Havkin-Frenkel *et al.* (2004), el *p*-hidroxibenzaldehído es un intermediario de la biosíntesis de vainillina, que necesita ser hidroxilado y metilado para poder formar el compuesto más importante de la vainilla (Oudou y Grisoni, 2011).

Finalmente para el **ácido vainillínico** (Figura 25), sus valores iniciales fueron de 399 y 314 ppm para los beneficios 1 y 2, respectivamente. El valor máximo para el beneficio 1 fue de 1605 ppm y se presentó en el tratamiento 2 (celofán con 5 vainas), seguido del 6 (celofán-polietileno) con 1320 ppm y el 4 (celofán doble) con 1302 ppm. Mientras que el menor fue de 913 ppm el cual se observó en el tratamiento 8, el cual fue empacado al vacío y con el mismo número de vainas. Para el beneficio 2, aunque hubo un incremento, los valores se mantuvieron entre 409 y 480 ppm para los tratamientos con cinco vainas; y 501 y 560 ppm para los tratamientos con solo una vaina empacada.

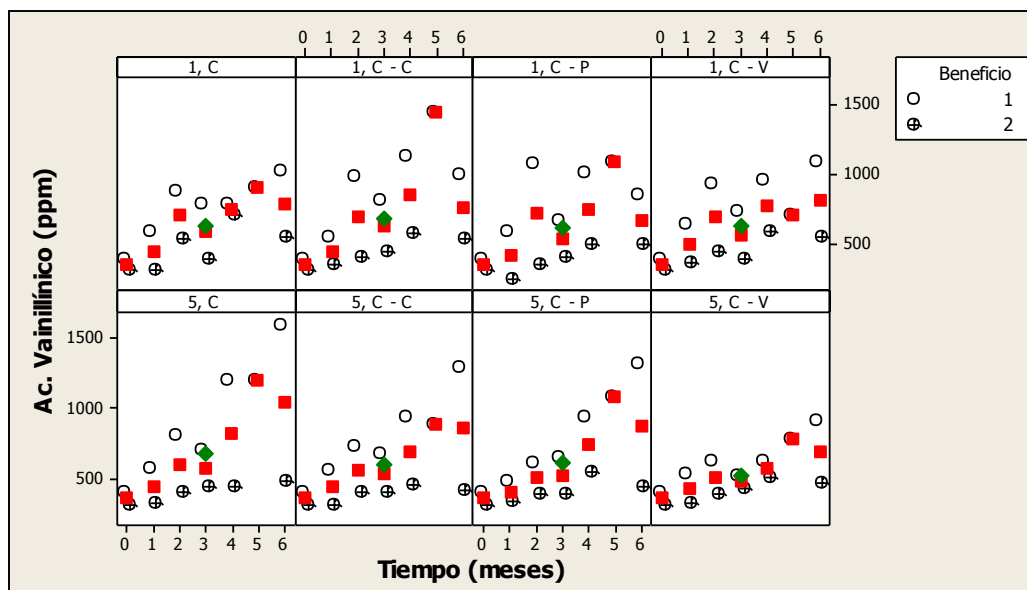


Figura 25. Gráfica multivariada para **ácido vainillínico**, para los factores Beneficio, Empaque, Tiempo y número de vainas por empaque. (C: Celofán, C-C: Celofán doble, C-P: Celofán-Polietileno, C-V: Celofán-Vacío). [\bar{x} : 622.9, σ : 328.1, CV: 52.7].

(\blacksquare : Media de Ac. Vainillínico entre beneficios de cada fecha; \blacklozenge : Media de Ac. Vainillínico por cada tipo de empaque y número de vainas).

El comportamiento del ácido vainillínico es parecido al ácido *p*-hidroxibenzóico (Figura 23), ya que los valores también aumentan, sobre todo en el beneficio 1 para ambas cantidades de vainas envasadas; ocurriendo también un incremento en el beneficio 2 pero de menor magnitud. Ambas variables tienen un comportamiento similar en todos los tratamientos; lo cual explica la elevada correlación entre ellas (0.88).

El ácido vainillínico, el ácido *p*-hidroxibenzóico, y otros compuestos como el guayacol, se relacionan ampliamente con el criterio de aroma ahumado/fenólico, el cual es un factor indeseable. Por lo que es preferible que sus valores se mantengan bajos. Si la concentración de ácido vainillínico fuera mayor de la esperada, puede deberse a que existe una oxidación de la vainillina (Odoux y Grisoni, 2011).

3.2 Efecto del Empaque y Número de Vainas en la Firmeza

En el caso del beneficio 1, tipo de empaque y numero de vainas tuvieron una correlación de -0.70, con un nivel de significancia menor de 0.0001. Mientras que para el beneficio 2, la correlación fue de -0.30 con un nivel de significancia de 0.0070. Ambos casos se pueden apreciar en los diagramas de dispersión mostrados en la Figura 26.

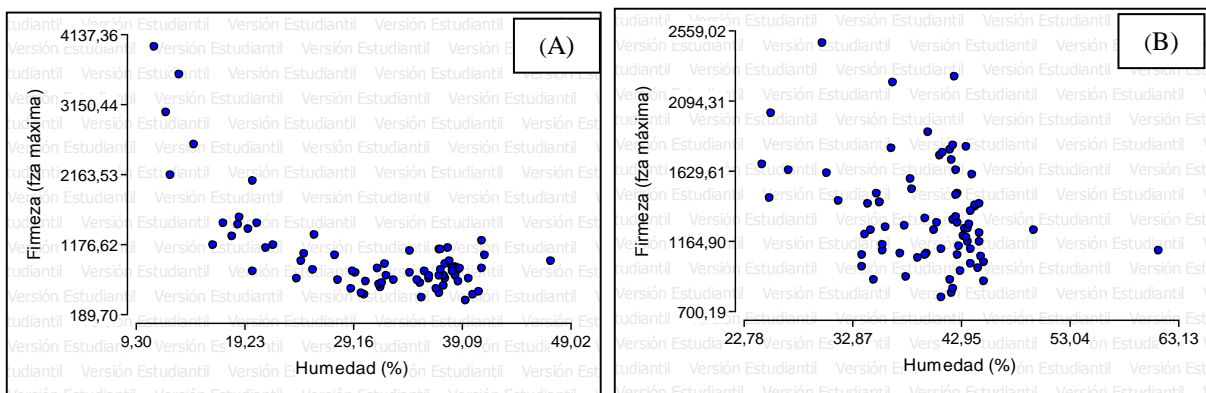


Figura 26. Diagramas de dispersión de firmeza – humedad para el beneficio 1 (A) y beneficio 2 (B); con correlaciones de -0.70 y -0.30, respectivamente.

Por medio de regresiones lineales simples, se obtuvieron los parámetros estimados con los cuales se formó un modelo para cada beneficio. Siendo el modelo 1 para el beneficio 1, y el modelo 2 para el beneficio 2

$$\hat{Y}_1 = 2653.97266 - 53.18181X_1 \quad (1)$$

Donde: \hat{Y}_1 : Firmeza de vainas del beneficio 1; X_1 : Humedad de vainas del beneficio 1.

$$\hat{Y}_2 = 2069.60345 - 18.38566X_1 \quad (2)$$

Donde: \hat{Y}_2 : Firmeza de vainas del beneficio 2; X_1 : Humedad de vainas del beneficio 2.

Con las observaciones hechas durante el análisis, se realizó también una gráfica multivariada en la cual se aprecia la firmeza en función de los factores tiempo, tipo de empaque y número de vainas por empaque (Figura 27). En ambos beneficios, en los tratamientos con una vaina se obtuvo una mayor firmeza; esto por el hecho de que sufrieron una mayor deshidratación que

en los que tenían cinco vainas. Para el caso de los tratamientos con cinco vainas, se aprecia que las correspondientes al beneficio 2 requirieron una mayor fuerza de desplazamiento, esto se debió principalmente a que tenían mayor grosor que las del beneficio 1.

Las flechas indicadas en la Figura 27 corresponden a las vainas individuales empacadas con celofán simple y celofán-vacío del beneficio 1. Estas muestras durante el análisis con el texturómetro se quebraron ya que presentaban una mayor deshidratación, por lo que coincide con las mayores firmezas requeridas.

Para la variable firmeza, de manera general, para tratamientos con una vaina el mejor empaque para ambos beneficios fue celofán-polietileno, ya que a los seis meses de empaque requirió menores fuerzas de desplazamiento con valores de 1305 g para el beneficio 1 y 1259 g para el beneficio 2; y para tratamientos con 5 vainas el mejor empaque correspondió al celofán doble con las menores fuerzas requeridas, 692 g para el beneficio 1 y 1425 g para el beneficio 2.

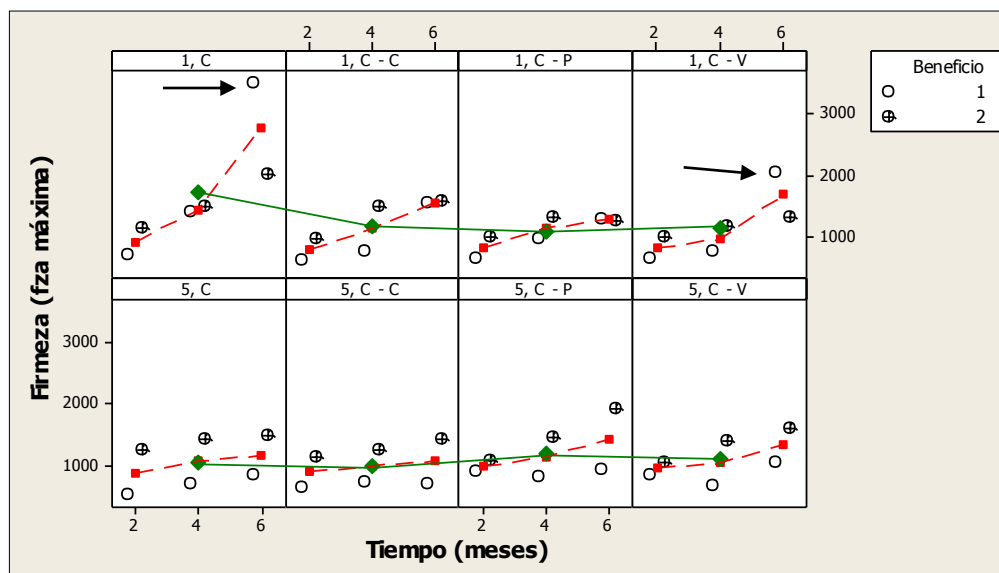


Figura 27. Gráfica multivariada para **Firmeza**, considerando los factores Beneficio, Empaque, Tiempo y número de vainas por empaque. (C: Celofán, C-C: Celofán doble, C-P: Celofán-Polietileno, C-V: Celofán-Vacío). (■: Media de Firmeza entre beneficios de cada fecha; ◆: Media de Firmeza de los tres tiempos, por cada tipo de empaque y número de vainas)

Esto comprueba la explicación de Avella *et al.* (2007) de que algunos empaques tienen baja propiedad de barrera a vapor de agua, pero puede mejorar adicionando un segundo componente o hacer multicapas. Además de que aunado al manejo de atmósferas modificadas, se logra una menor firmeza, mayor retención de humedad, así como menor contaminación microbiana (Valle, 2003).

3.3 Efecto del Empaque y Número de Vainas en la Actividad Microbiana

Para el Beneficio 1, la actividad de agua (A_w) presentó una reducción de aproximadamente 0.20 en los tratamientos con una sola vaina, mientras que en los tratamientos con cinco vainas se mantuvo prácticamente constante en un valor de 0.9 (Figura 28).

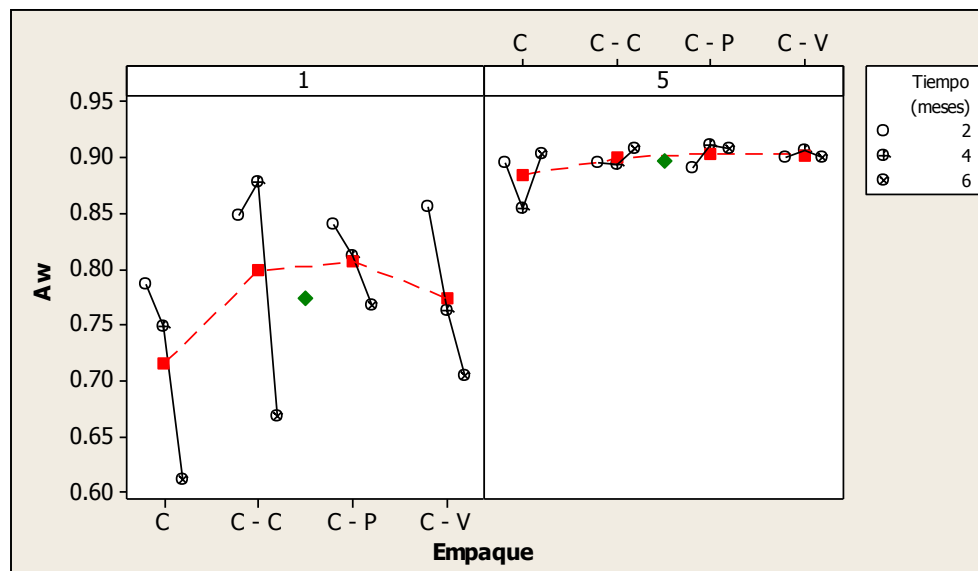


Figura 28. Actividad de agua (A_w) del Beneficio 1. (C: Celofán, C-C: Celofán doble, C-P: Celofán-Polietileno, C-V: Celofán-Vacío). (■:Media de A_w entre meses por cada tipo de empaque y número de vainas; ◆: Media de la A_w de las dos cantidades de vainas).

Para las vainas analizadas del Beneficio 1, existió un crecimiento de bacterias mesófilas aerobias (BMA), principalmente en los tratamientos celofán y celofán doble con cinco vainas, mientras que en los tratamientos C-P y C-V el conteo fue mucho menor (Cuadro 11 y Figura 29). En el conteo de coliformes totales no se presentó ninguna unidad formadora de colonia (UFC) al sexto mes. Finalmente para el conteo de hongos y levaduras, la mayor cantidad se

presentó en los tratamientos con celofán, seguramente debido a las características de permeabilidad del empaque, que permitió el desarrollo de estos organismos (Cuadro 11 y Figura 30).

De acuerdo con las especificaciones indicadas en la NMX-FF-074-SCFI-2009, el valor máximo de BMA es de 100 UFC y de 10 UFC para mohos y levaduras. Mientras que para coliformes totales, el recuento debe ser negativo. Por lo que en este aspecto, para el beneficio 1 se cumple la presencia nula de coliformes totales en todos los tratamientos a los seis meses de empaado, y sólo los tratamientos 1 y 3 cumplen el requerimiento de un valor máximo de 10 UFC de hongos y levaduras. Y para BMA, todos los tratamientos superan el límite máximo permitido (Cuadro 11).

Cuadro 11. Actividad de agua (A_w), conteo de bacterias mesófilas, coliformes totales y hongos y levaduras (UFC: unidades formadoras de colonias), inicial y a los 6 meses de almacenamiento del Beneficio 1.

Empaque / No. de vainas	Tiempo (meses)	Actividad de agua (A_w)	Bacterias Mesófilas Aerobias (UFC g⁻¹)	Coliformes Totales (UFC g⁻¹)	Hongos y Levaduras (UFC g⁻¹)
	0	0.90	2100	1700	450
C-1	6	0.61	4000	0	Menor de 10
C-5	6	0.90	25000	0	23000
CC-1	6	0.67	3000	0	Menor de 10
CC-5	6	0.91	30000	0	300000
CP-1	6	0.77	5500	0	200
CP-5	6	0.91	1500	0	3000
CV-1	6	0.70	1000	0	100
CV-5	6	0.90	1500	0	2000

C: Celofán; C-C: Celofán doble; C-P: Celofán – Polietileno; C-V: Celofán – Vacío.

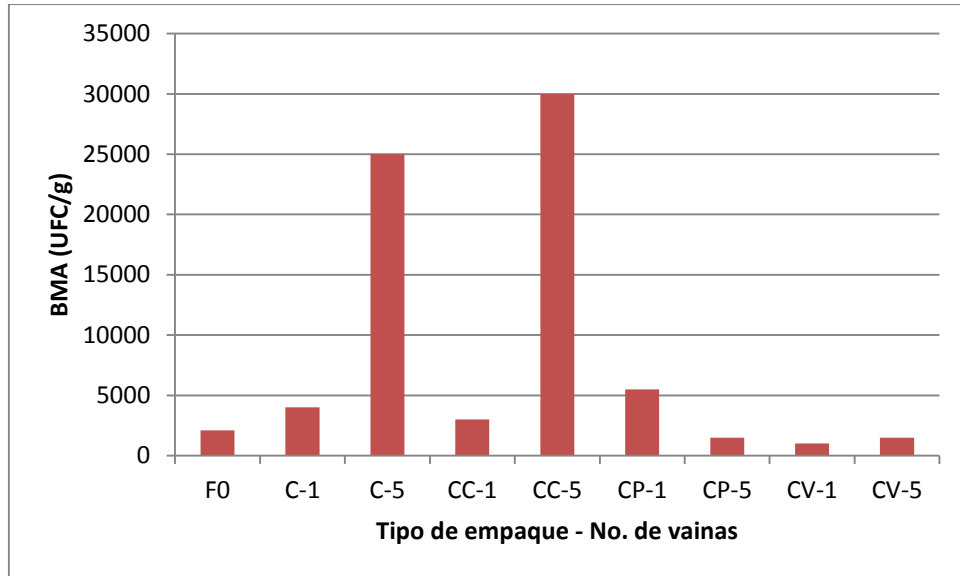


Figura 29. Conteo de **Bacterias Mesófilas Aerobias (BMA)** (unidades formadoras de colonia (UFC)) en vainas curadas y empacadas del Beneficio 1. (F0: Análisis inicial, antes de que las vainas se empacaran; C: Celofán; C-C: Celofán doble; C-P: Celofán – Polietileno; C-V: Celofán – Vacío).

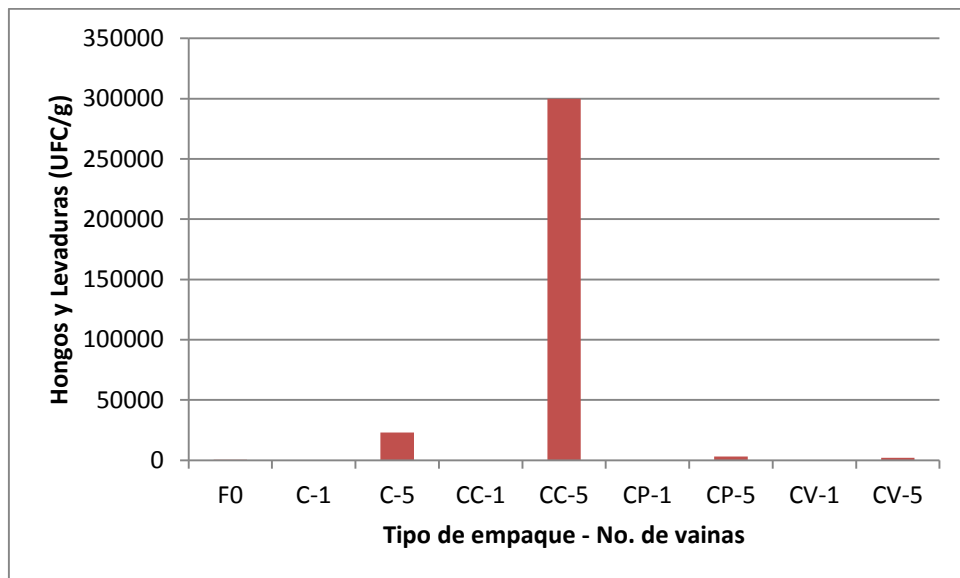


Figura 30. Conteo de **Hongos y Levaduras** (UFC: unidades formadoras de colonias) en vainas curadas y empacadas del Beneficio 1. (F0: Fecha cero, antes de ser empacadas las vainas; C: Celofán; C-C: Celofán doble; C-P: Celofán – Polietileno; C-V: Celofán – Vacío).

La influencia de la A_w sobre el recuento de microorganismos fue relevante en los tratamientos con cinco vainas, ya que existió mayor conteo de UFC de BMA y en hongos y levaduras principalmente en los tratamientos con celofán con cinco vainas. Por lo que puede corroborarse lo indicado por Odoux y Grisoni (2011), que un bajo contenido de agua y un alto contenido de fenoles como la vainillina, se inhibe el desarrollo por hongos en vainillas curadas, lo cual fue evidente en las vainas empacadas individualmente.

Para el Beneficio 2, la actividad de agua presentó una reducción de aproximadamente 0.10 en los tratamientos con una sola vaina, mientras que en los tratamientos con cinco vainas existió un leve crecimiento para el segundo mes y posteriormente una reducción de 0.02 hasta el sexto mes quedando en un valor de 0.90 al sexto mes del empaque (Figura 31).

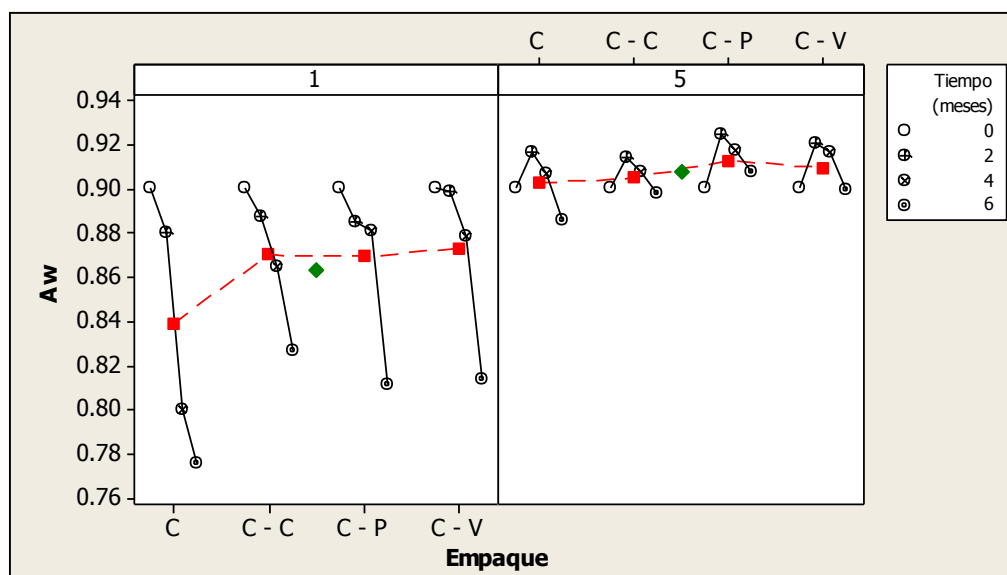


Figura 31. Actividad de agua (A_w) del Beneficio 2. (C: Celofán, C-C: Celofán doble, C-P: Celofán-Polietileno, C-V: Celofán-Vacío). (■: Media de A_w entre meses por cada tipo de empaque y número de vainas; ◆: Media de la A_w de las dos cantidades de vainas).

En el caso del Beneficio 2, en el análisis inicial se presentó un elevado conteo de UFC g^{-1} en BMA, obteniéndose un recuento de 25 M, pero reduciéndose considerablemente en todos los tratamientos a los seis meses. Pero cabe notar que, en los tratamientos con cinco vainas existieron los menores recuentos, correspondiendo a las mayores A_w (cuadro 12 y Figura 32). Para los recuentos de coliformes totales, también en todos los casos se redujeron las UFC,

llegando en la mayoría de los casos a niveles menores de 10 UFC g⁻¹ (Cuadro 12). Finalmente en el caso de hongos y levaduras, hubo un incremento notable de 617 % en las vainas individuales con C-C, y una reducción en los otros empaques (Cuadro 12 y Figura 33).

En lo que respecta a los límites permitidos de microorganismos indicados en la NMX-FF-074-SCFI-2009, existe presencia de coliformes totales en todos los tratamientos, el recuento de hongos y levaduras supera al límite máximo recomendado, al igual que para la presencia de BMA (Cuadro 12).

Cuadro 12. Actividad de agua (Aw), conteo de bacterias mesófilas, coliformes totales y hongos y levaduras (UFC: unidades formadoras de colonias), inicial y a los 6 meses de almacenamiento del Beneficio 2

Empaque / No. de vainas	Tiempo (meses)	Actividad de agua (Aw)	Bacterias Mesófilas Aerobias (UFC g⁻¹)	Coliformes Totales (UFC g⁻¹)	Hongos y Levaduras (UFC g⁻¹)
	0	0.90	25000000	867	810
C-1	6	0.78	2200	20	800
C-5	6	0.89	300	Menor de 10	600
CC-1	6	0.83	30000	10	5000
CC-5	6	0.90	1000	Menor de 10	700
CP-1	6	0.81	20000	20	500
CP-5	6	0.91	2000	Menor de 10	600
CV-1	6	0.81	6000	Menor de 10	400
CV-5	6	0.90	900	Menor de 10	500

C: Celofán; C-C: Celofán doble; C-P: Celofán – Polietileno; C-V: Celofán – Vacío.

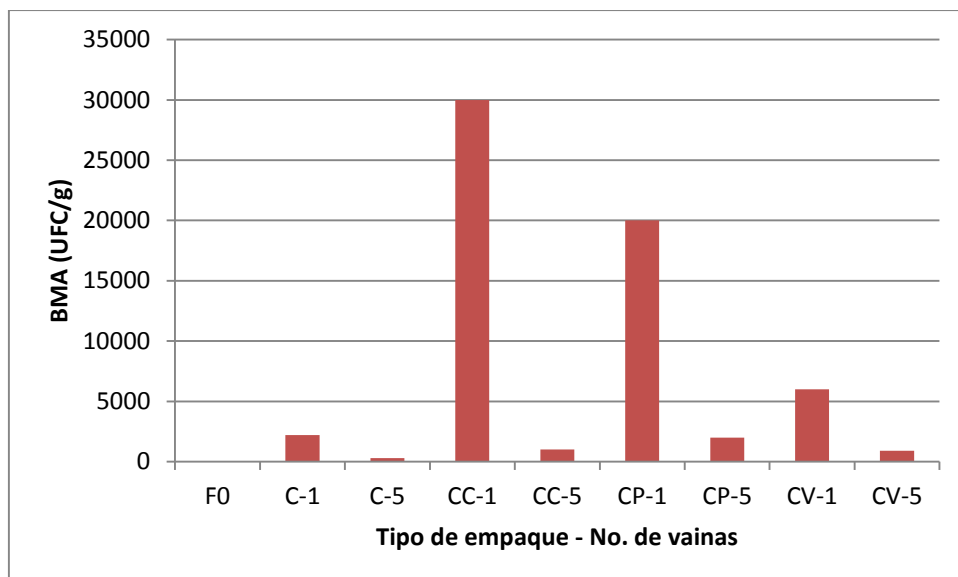


Figura 32. Actividad de **Bacterias Mesófilas Aerobias (BMA)** en vainas curadas y empacadas del Beneficio 2. (F0: Fecha cero, antes de ser empacadas las vainas). [Nota: en F0 el recuento realizado fue de 25,000,000 UFC g⁻¹]. (F0: Fecha cero, antes de ser empacadas las vainas; C: Celofán; C-C: Celofán doble; C-P: Celofán – Polietileno; C-V: Celofán – Vacío).

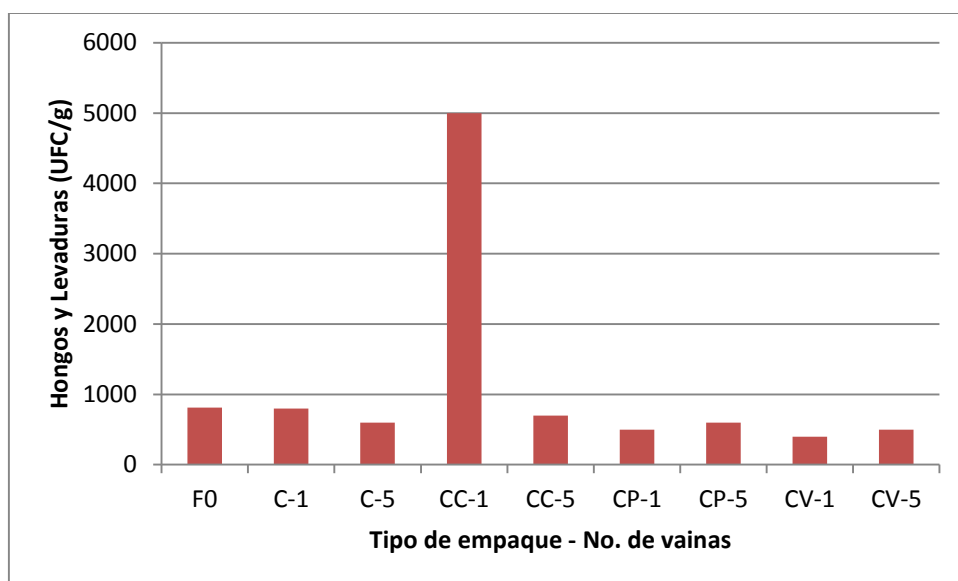


Figura 33. Actividad de **Hongos y Levaduras (H y L)** en vainas curadas y empacadas del Beneficio 2. (F0: Fecha cero, antes de ser empacadas las vainas). (F0: Fecha cero, antes de ser empacadas las vainas; C: Celofán; C-C: Celofán doble; C-P: Celofán – Polietileno; C-V: Celofán – Vacío).

De acuerdo con Odoux y Grisoni (2011), algunos riesgos en las vainas curadas son el crecimiento microbiano por fermentación de bacterias o el desarrollo de hongos, contaminación de micotoxinas; y contaminación bacteriana relacionada a condiciones higiénicas deficientes.

En este caso existió un mayor crecimiento de hongos que en las muestras del beneficio 1, lo cual podría deberse al manejo, tanto en el beneficio como en el laboratorio. Por lo que se debe tener un control durante todo el proceso postcosecha para evitar contaminación cruzada, y si el almacenamiento dura varios meses, se deben controlar también parámetros como la temperatura, humedad, composición del aire y tipo de empaque.

Los mismos autores, también han reportado que la vainillina tiene propiedades microbianas sobre diferentes microorganismos relacionados con alimentos y algunos patógenos como: *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella entérica*, *Candida albicans*, *Lactobacillus casei*, *Penicillium expansum* y *Saccharomyces cerevisiae*, y algunas especies de *Aspergillus*; aunque dicha actividad microbiana depende del tiempo de exposición, concentración y el tipo de organismo.

Es conveniente realizar análisis microbiológicos en cada muestreo, para observar si realmente existe o no influencia de la Aw y del tipo de empaque sobre su crecimiento. Es claro que, en el caso de vainas curadas de vainilla, existe una alta correlación entre el contenido de humedad y la Aw (0.96 y 0.94 para los beneficios 1 y 2, respectivamente); por lo que sería de utilidad crear una serie de tiempo adecuada que permita apreciar si independientemente del empaque empleado, una menor Aw correspondería a menor crecimiento microbiano, ya que de acuerdo con Odoux y Grisoni (2011), no se debe superar una Aw de 0.70 para evitar el desarrollo de hongos, y 0.91 para el crecimiento de bacterias.

3.4 Efecto del Empaque y Número de Vainas en el Contenido de Azúcares

Para las muestras del beneficio 1, el porcentaje más alto de azúcares totales se presentó en los tratamientos: C y C-V con una vaina, con valor de 10.7 %. Mientras que los valores más bajos se registraron en los tratamientos con cinco vainas con valores desde 3.0 hasta 5.4 %. Se

observó una mayor cantidad de glucosa que de sacarosa; y una menor proporción de fructosa con valores de 0.5 a 1.3 % (Figura 34).

Por otro lado, para el beneficio 2 existió la misma tendencia, mayor contenido de azúcares totales en tratamientos con una vaina, principalmente en el de celofán (9.8 %) y menor aquellas vainas empacadas en cinco unidades, con porcentajes de 5.9 a 6.7 %. Sin embargo, sus valores fueron menores que en el beneficio 1. No hubo diferencias significativas en el contenido de glucosa y sacarosa, oscilando sus valores entre 2.6 y 4.4 %; y con valores de fructosa similares a los del beneficio 1 (Figura 35).

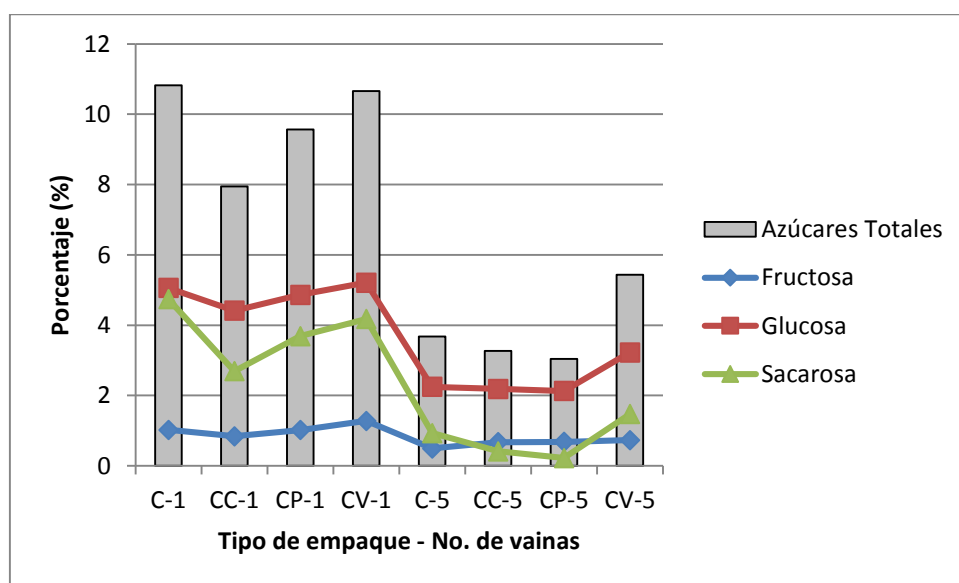


Figura 34. Contenido de **azúcares** en vainas del Beneficio 1, empacadas durante seis meses. (C: Celofán; C-C: Celofán doble; C-P: Celofán – Polietileno; C-V: Celofán – Vacío), con una y cinco vainas. [Para Azúcares totales= \bar{x} : 6.80, σ : 3.21, CV: 47.1].

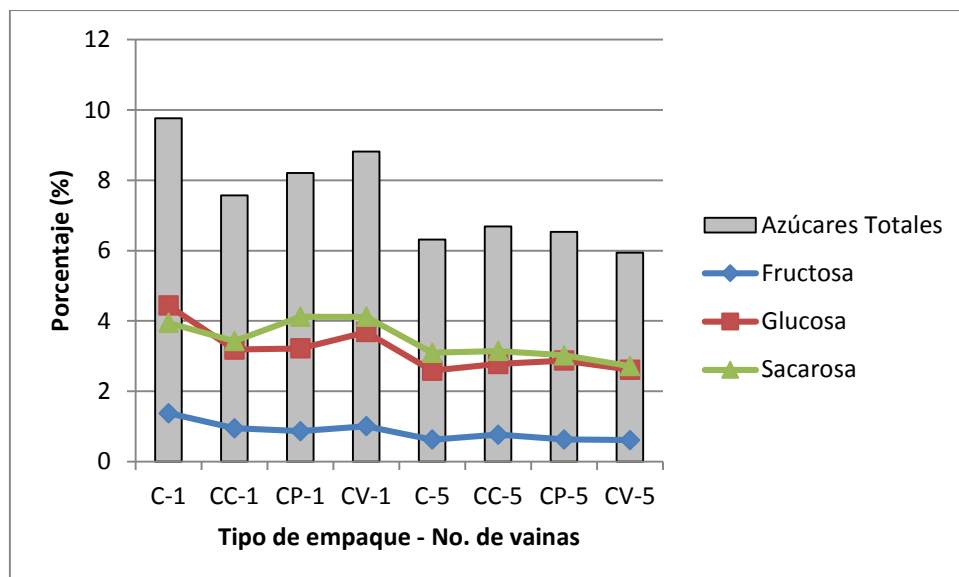


Figura 35. Contenido de **azúcares** en vainas del Beneficio 2, empacadas durante seis meses. (C: Celofán; C-C: Celofán doble; C-P: Celofán – Polietileno; C-V: Celofán – Vacío), con una y cinco vainas. [Para Azúcares totales= \bar{x} : 7.49, σ : 1.35, CV: 18.05].

Para ambos beneficios, el contenido de azúcares totales fue mayor en los empaques con una sola vaina, principalmente en celofán simple y C-V, con la misma tendencia para los tres tipos de azúcares. En cuanto a la fructosa, para los dos beneficios fue cercano a 1 %, sin variaciones significativas entre tratamientos. Esto difiere con lo mencionado por Rao y Ravishankar (2000), quienes mencionan que el azúcar que se encuentra en cantidades traza es la sacarosa, pero aunque su estudio no lo menciona, se consideran vainas sin haber sido empacadas. Sin embargo, aunque se presume que las vainas curadas son frutos sin actividad fisiológica, en los tratamientos con cinco vainas la respiración podría ser menor y los azúcares ya no se metabolizarían por la ruta aeróbica, provocando en su lugar reacciones de fermentación alcohólica aumentando la concentración de acetaldehído y etanol (Arévalo, 1996).

De acuerdo con Odoux y Grisoni (2011) el contenido de azúcares en vainas de Madagascar en base a peso seco es de 10 %; de los cuales 80 % corresponden a sacarosa, 15 % a glucosa y 5 % a fructosa. Esto, aunque no se especifica, es en el supuesto de que son vainas aún sin empacar. Dicho valor de azúcares totales se aproxima con los obtenidos para los tratamientos con una sola vaina empacada.

3.5 Efecto del Empaque y Número de Vainas en el Contenido de Etanol y Acetaldehído

Para el caso del etanol, durante los seis meses de almacenamiento solo existió un incremento a través del tiempo en las vainas empacadas en C-V con cinco vainas, para el beneficio 1 (Figura 36); y en las vainas empacadas con celofán simple con una vaina, para el beneficio 2 (Figura 37).

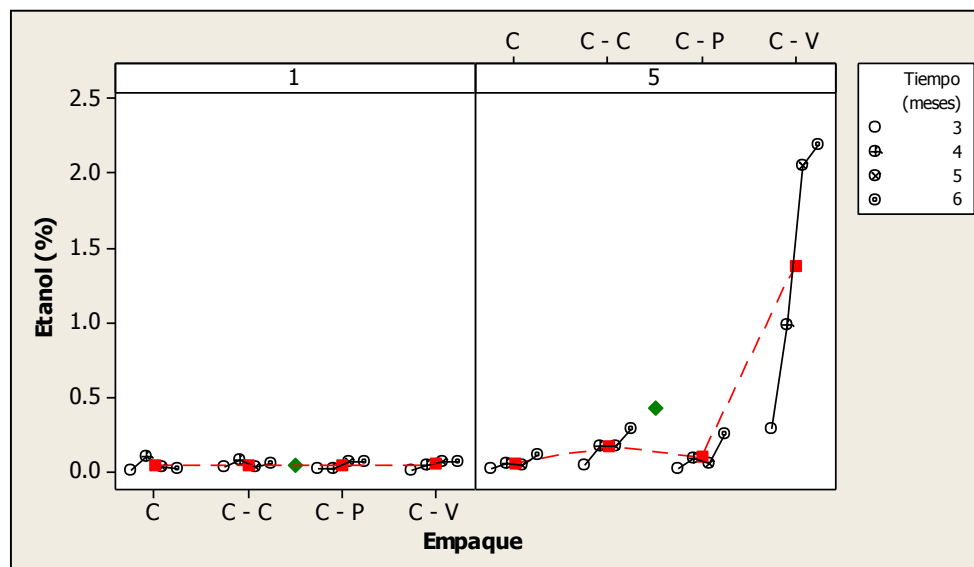


Figura 36. Comportamiento del **etanol** para los tratamientos del Beneficio 1 (C: Celofán, C-C: Celofán doble, C-P: Celofán-Polietileno, C-V: Celofán-Vacío). [\bar{x} : 0.233, σ : 0.562, CV: 240.9].

(■: Media de Etanol entre meses por cada tipo de empaque y número de vainas; ◆: Media de Etanol de las dos cantidades de vainas).

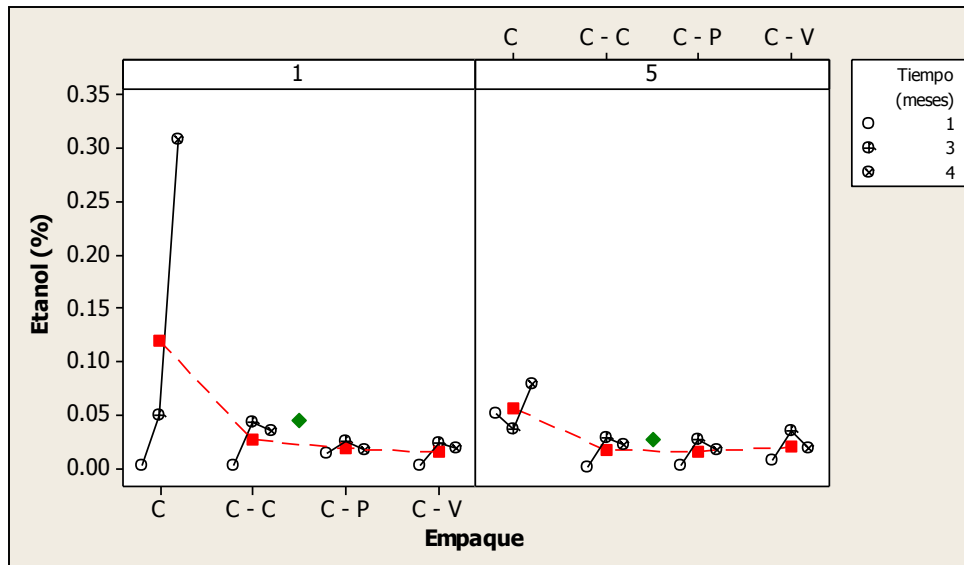


Figura 37. Comportamiento del **etanol** para los tratamientos del Beneficio 2 (C: Celofán, C-C: Celofán doble, C-P: Celofán-Polietileno, C-V: Celofán-Vacío). [\bar{x} : 0.036, σ : 0.066, CV: 183.8].

(■: Media de Etanol entre meses por cada tipo de empaque y número de vainas; ◆: Media de Etanol de las dos cantidades de vainas).

Mientras que, para el acetaldehído existió también un aumento en las vainas empacadas en C-V con cinco vainas para el beneficio 1 (Figura 38); y para el beneficio 2 se incrementó en prácticamente todos los tratamientos, principalmente en los que contenían cinco vainas (Figura 39) en los cuales se encontraban los menores niveles de oxígeno y mayores porcentajes de humedad, lo que ocasionó que, aunque tuviera una textura húmeda y flexible, adquirieran sabores y aromas desagradables. Es notable que, el contenido de acetaldehído sea mayor en vainas empacadas en cinco unidades en ambos beneficios, lo cual coincide con los niveles más bajos de azúcares, por lo cual es presumible que la glucosa sea metabolizada a través de la ruta del piruvato.

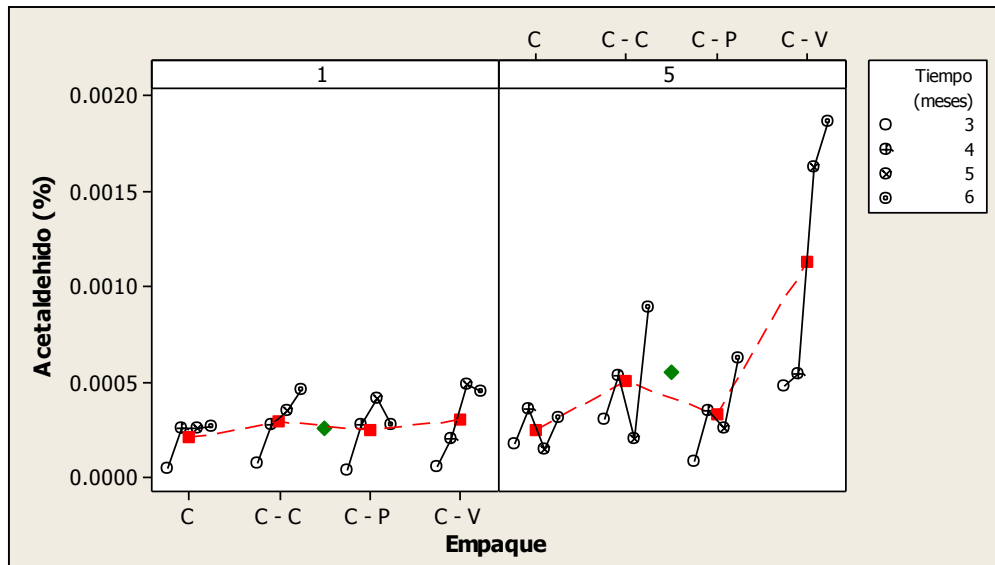


Figura 38. Comportamiento del **acetaldehído** para los tratamientos del Beneficio 1 (C: Celofán, C-C: Celofán doble, C-P: Celofán-Polietileno, C-V: Celofán-Vacío). [\bar{x} : 0.00040, σ : 0.00047, CV: 115.5]. (■: Media de Acetaldehído entre meses por cada tipo de empaque y número de vainas; ◆: Media de Acetaldehído de las dos cantidades de vainas).

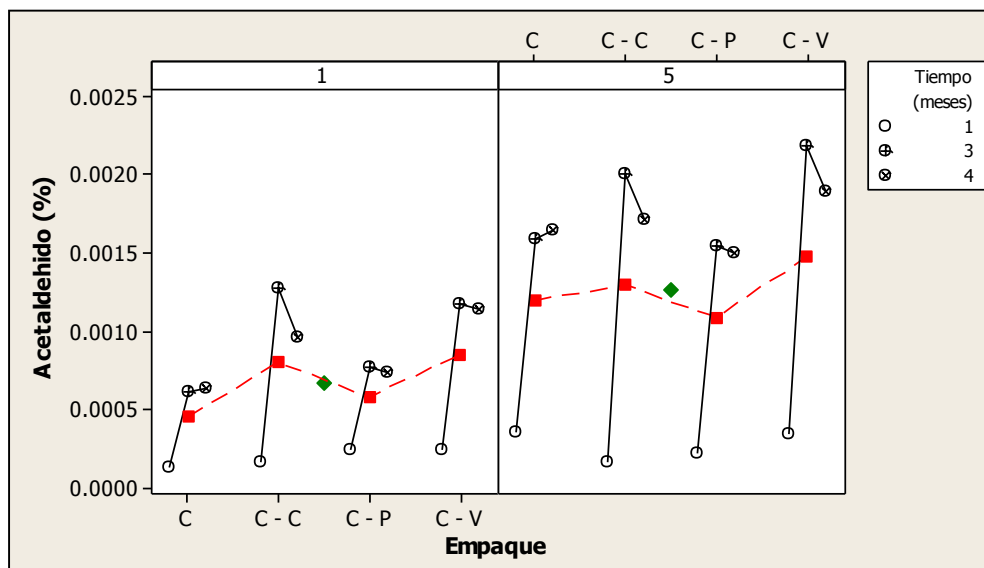


Figura 39. Comportamiento del **acetaldehído** para los tratamientos del Beneficio 2 (C: Celofán, C-C: Celofán doble, C-P: Celofán-Polietileno, C-V: Celofán-Vacío). [\bar{x} : 0.00097, σ : 0.00069, CV: 70.9]. (■: Media de Acetaldehído entre meses por cada tipo de empaque y número de vainas; ◆: Media de Acetaldehído de las dos cantidades de vainas).

Los volátiles como el etanol y acetaldehído son emitidos en condiciones de bajo contenido de oxígeno permitiendo el desarrollo de sabores indeseables debido a la fermentación en los tejidos (Havkin-Frenkel y Frenkel, 2010). Se generan en pequeñas cantidades debido a la baja actividad de la enzima pirúvico-decarboxilasa que puede actuar sobre el piruvato aumentando su concentración, y el cual si se desvía a la ruta del etanol, forma dos moléculas de acetaldehído y dos de CO₂ por cada molécula de glucosa. Si existe la presencia de la enzima alcohol deshidrogenasa y NADH, es cuando ocurre la reducción de acetaldehído a etanol (Arévalo, 1996 y 2000; Valle, 2003). Esta reacción ocurre en ambientes como el creado con vacío y aumenta a medida que se prolonga el almacenamiento.

En contraparte, si existe presencia de O₂, éste se consume y se lleva a cabo el proceso respiratorio normal, con la formación de CO₂ y agua, anulando la formación de metabolitos fermentativos llevando a cabo el efecto Pasteur (Valle, 2003).

En condiciones de anaerobiosis, con la producción de etanol hay un incremento en la concentración de acetaldehído. La proporción de acetaldehído y etanol es de 1:100, pero si existen altas concentraciones de CO₂ dicha proporción puede llegar hasta 1:2 – 1:5 (Arévalo, 1996). Por lo que es importante conocer dos parámetros importantes: la concentración umbral de O₂ en la cual se inicial el metabolismo y la velocidad de intercambio de gases y vapor de agua a través del empaque.

IV. CONCLUSIONES

- 1) No se presentaron efectos significativos en la calidad de la vainilla entre los empaques analizados evaluando la cantidad de compuestos aromáticos y pérdida de humedad, por lo que podría considerarse cualquier tipo de empaque doble como una opción de empaque de vainas comercializadas al menudeo.
- 2) El número de vainas empacadas influye notablemente en el contenido de humedad y vainillina, firmeza, azúcares, etanol y acetaldehído; ya que las vainas empacadas en cinco unidades aunque conservaron su flexibilidad, tuvieron menor acumulación de vainillina con rangos inclusive inferiores a lo requerido por la norma NOM-182-SCFI-2011.

V. LITERATURA CITADA

- Arévalo G. M. L. 1996. Estudios de maduración y conservación de frutos de chicozapote (*Manilkara sapota*) mediante el uso de recubrimientos céreos. Tesis de Maestría. Programa en Fruticultura. Colegio de Postgraduados. México. 70 p.
- Arévalo G. M. L. 2000. Uso de radiaciones ionizantes en frutos de aguacate “Hass” como tratamiento cuarentenario. Tesis de Doctorado. Programa de Fruticultura. Colegio de Postgraduados. México. 68 p.
- Avella M., Bruno G., Errico M. E., Gentile G., Piciocchi N., Sorrentino A. and Volpe M. G. 2007. Innovative packaging for minimally processed fruits. *Packaging Technology and Science*. 20: 325-335.
- Borém F. M., Carmanini R. F., Pereira F. L., Silva G. G., Aparecida F. V. and Pedroza I. E. 2013. Evaluation of the sensory and color quality of coffee beans stored in hermetic packaging. *Journal of Stored Products Research*. 52: 1-6.
- Cicchetti, E. and Chaintreau, A. 2009. Quantitation of the main constituents of vanilla by reverse phase HPLC and ultra-high-pressure-liquid chromatography with UV detection: Method validation and performance comparison. *J. Sep. Sci.* 32: 3043-3052.
- Correa L. G. 2004. Análisis de Medidas Repetidas. Facultad de ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia. 41 p.
- Davis P. L. and Chase W. G. 1969. Determination of alcohol in citrus juice by gas chromatographic analysis of head space. *HortScience* 4: 117-119.
- De la Cruz M. J., Rodríguez J. G. C. and García H. S. 2009. Vanilla: Post-harvest Operations. 50 p.
- Gassenmeier K., Riesen B. and Magyar B. 2008. Commercial quality and analytical parameters of cured vanilla beans (*Vanilla planifolia*) from different origins from the 2006 – 2007 crop. *Flavour and Fragrance Journal*. 23: 194-201.
- Gennadios A., Weller C. L. and Gooding C. H. 1994. Measurement errors in water vapor permeability of highly permeable, hydrophilic edible films. *Journal of Food Engineering* 21: 395-409.

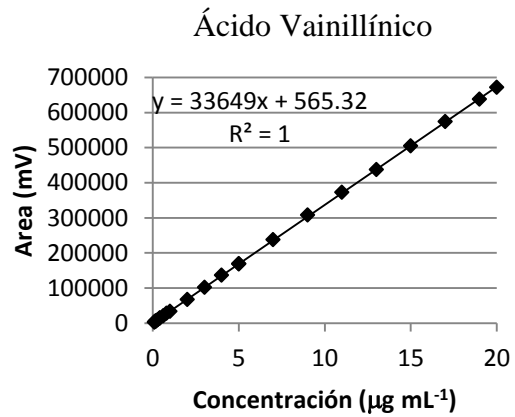
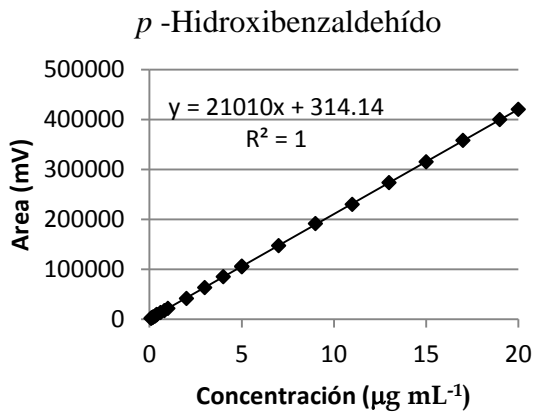
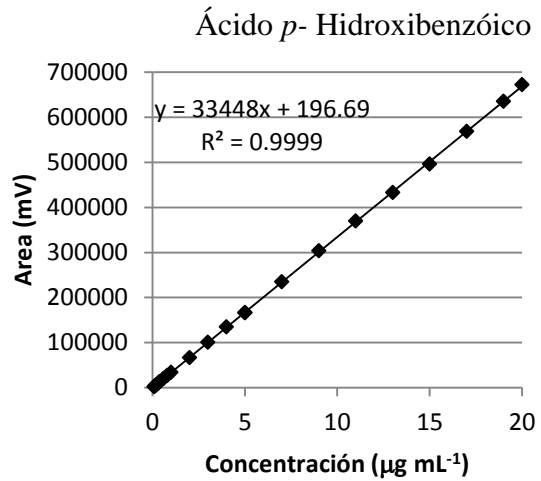
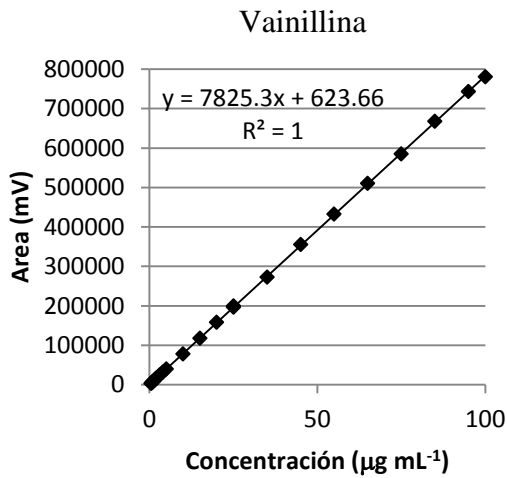
- Havkin-Frenkel D. and Belanger C. F. 2007. Application of metabolic engineering to vanillin biosynthetic pathways in *Vanilla planifolia*. Verpoorte, R.; Alfermann, A.W.; Johnson, T.S. (Eds). Springer. 175-196 pp.
- Havkin-Frenkel, D. and Frenkel C. 2010. Post Harvest of Cured Vanilla Beans. The State University of New Jersey, NJ, USA. 24 p.
- López L. D. 2013. Calidad microbiológica y organoléptica de vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews) beneficiada artesanalmente. Tesis de Maestría. Programa en Fisiología Vegetal. Colegio de Postgraduados. México. 86 p.
- Márquez O. and Waliszewski K. N. 2008. The effect of thermal treatment on β -glucosidase inactivation in vanilla bean (*Vanilla planifolia* Andrews). International Journal of food Science and Technology. 43: 1993-1999.
- McHugh T. H., Avena-Bustillos R. and Krochta J. M. 1993. Hydrophilic edible films: Modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects. Journal of Food Science. 58: 899-903.
- Mustafa, K., Mustafa, E., Mustafa, K.U. and Mehmet, A. 2003. Comparison of different extraction y detection methods for sugar using amino-bonded phase HPLC. Journal of Chromatographic Science. 41: 331-333.
- NMX-FF-074-SCFI-2009. 2009. Norma Mexicana Productos no industrializados para uso humano – vainilla – (*Vanilla fragans* (Salisbury) Ames – Especificaciones y métodos de prueba. 38 p.
- NOM-092-SSA1-1994. 1995. Norma Oficial Mexicana. Bienes y servicios. Método para la cuenta de Bacterias Aerobias en placa. 5 p.
- NOM-111-SSA1-1994. 1995. Norma Oficial Mexicana. Bienes y servicios. Método para la cuenta de Mohos y Levaduras en alimentos. 6 p.
- NOM-113-SSA1-1994. 1995. Norma Oficial Mexicana. Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos Coliformes Totales en placa. 7 p.
- Odoux E. and Grisoni M. 2011. Vanilla. Medicinal and Aromatic Plants – Industrial Profiles. Taylor & Francis Group. E.U.A. 387 p.
- Pardo V. T., Mariezcurrena M. D., Waliszewski K. N., Sánchez V. and Janczur M. K. 2009. Effects of killing conditions of vanilla (*Vanilla planifolia*, Andrews) pods during the

curing process on aroma composition of pod ethanol extract. *International Journal of Food Science and Technology*. 44: 2417-2423.

- Pérez-Silva A., Odoux E., Brat P., Ribeyre F., Rodriguez-Jimenes G., Robles-Olvera V., García-Alvarado M. A. and Günata Z. 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.
- Rao S. R. and Ravishankar G. A. 2000. Vanilla flavor: production by conventional and biotechnological routes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80: 289-304.
- SAS. 2013. Versión 9.0. Statistical Analysis System. Sistema SAS para Windows.
- Ucherek M. 2001. The interrelation of changes in oxygen content and product quality in modified atmosphere packages of peanuts. *Packaging Technology and Science*. 14: 249-252.
- Valle G. S. 2003. Factores de variación de la atmósfera interna en frutos de aguacate (*Persea americana* Mill.) 'Hass'. Tesis de Doctorado. Programa en Fisiología Vegetal. Colegio de Postgraduados. México. 152 p.

ANEXOS

ANEXO A. Curvas estándar de calibración de los cuatro compuestos fenólicos mayoritarios de la vainilla obtenidos por HPLC (cromatografía líquida de alta resolución). [Tiempo de corrida 26 min; fase móvil H₃PO₄ 0.01M : Metanol (75:25); velocidad de flujo de 1 mL min⁻¹ a 30 °C; volumen de inyección de 10 µL; a 254 nm, detector UV/VIS; y columna Brownlee Validated Aqueous C18 5µ 250 x 4.6 mm].



ANEXO B. Análisis de Varianza de la estructura de covarianzas simétrica compuesta para la variable **Vainillina** (Fase I)

Efecto	GL	F-Valor	Pr > F
B	3	63.07	<.0001
E	2	3.53	0.0377
B*E	6	2.46	0.0386
Tiempo	5	83.17	<.0001
B*Tiempo	15	1.77	0.0445
E*Tiempo	10	1.24	0.2723
B*E*Tiempo	30	0.76	0.8083

ANEXO C. Análisis de Varianza de la estructura de covarianzas sin estructuración para la variable **Humedad** (Fase I)

Efecto	GL	F-Valor	Pr > F
B	3	29.77	<.0001
E	2	10.70	0.0002
B*E	6	0.80	0.5767
Tiempo	5	2145.96	<.0001
B*Tiempo	15	18.77	<.0001
E*Tiempo	10	1.85	0.0566
B*E*Tiempo	30	1.15	0.2895

ANEXO D. Análisis de Varianza para la variable Vainillina con comparación entre medias para beneficio, empaque y tiempo.

Procedimiento GLM

Variable dependiente: Vainillina

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	10	45.14005294	4.51400529	64.44	<.0001
Error	259	18.14388372	0.07005361		
Total correcto	269	63.28393667			

R-cuadrado	0.713294	Coef Var	13.99335	Raiz MSE	0.264676	Media	1.891444
------------	----------	----------	----------	----------	----------	-------	----------

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
B	3	14.15631167	4.71877056	67.36	<.0001
E	2	0.37300667	0.18650333	2.66	0.0717
T	5	30.61073461	6.12214692	87.39	<.0001

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
B	3	12.98727199	4.32909066	61.80	<.0001
E	2	0.37300667	0.18650333	2.66	0.0717
T	5	30.61073461	6.12214692	87.39	<.0001

t Tests (LSD) para Vainillina

NOTA: Este test controla el índice de error comparisonwise de tipo I, no el índice de error experimentwise.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	259
Error de cuadrado medio	0.070054
Valor crítico de t	1.96917

Las comparaciones importantes del nivel 0.05 están indicadas por ***.

Comparación entre Beneficios	Diferencia entre medias	95% Límites de confianza		
1 - 4	0.09860	0.00833	0.18887	***
1 - 3	0.23147	0.14636	0.31658	***
1 - 2	0.62077	0.53049	0.71104	***
4 - 1	-0.09860	-0.18887	-0.00833	***
4 - 3	0.13287	0.04259	0.22314	***
4 - 2	0.52217	0.42701	0.61732	***
3 - 1	-0.23147	-0.31658	-0.14636	***
3 - 4	-0.13287	-0.22314	-0.04259	***
3 - 2	0.38930	0.29903	0.47957	***
2 - 1	-0.62077	-0.71104	-0.53049	***
2 - 4	-0.52217	-0.61732	-0.42701	***
2 - 3	-0.38930	-0.47957	-0.29903	***

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	259
Error de cuadrado medio	0.070054
Valor crítico de t	1.96917
Diferencia menos significativa	0.0777

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

t Agrupamiento	Media	N	E
A	1.94400	90	C
B	1.86600	90	V
B	1.86433	90	P

Alfa 0.05
 Error de grados de libertad 259
 Error de cuadrado medio 0.070054
 Valor crítico de t 1.96917

Las comparaciones importantes del nivel 0.05 están indicadas por ***.

Comparación entre Tiempos	Diferencia entre medias	95% Límites de confianza		
8 - 10	0.10000	-0.01373	0.21373	
8 - 6	0.17405	0.06031	0.28778	***
8 - 4	0.22429	0.11055	0.33802	***
8 - 2	0.33952	0.22579	0.45326	***
8 - 0	0.95629	0.85143	1.06114	***
10 - 8	-0.10000	-0.21373	0.01373	
10 - 6	0.07405	-0.03969	0.18778	
10 - 4	0.12429	0.01055	0.23802	***
10 - 2	0.23952	0.12579	0.35326	***
10 - 0	0.85629	0.75143	0.96114	***
6 - 8	-0.17405	-0.28778	-0.06031	***
6 - 10	-0.07405	-0.18778	0.03969	
6 - 4	0.05024	-0.06350	0.16397	
6 - 2	0.16548	0.05174	0.27921	***
6 - 0	0.78224	0.67738	0.88710	***
4 - 8	-0.22429	-0.33802	-0.11055	***
4 - 10	-0.12429	-0.23802	-0.01055	***
4 - 6	-0.05024	-0.16397	0.06350	
4 - 2	0.11524	0.00150	0.22897	***
4 - 0	0.73200	0.62714	0.83686	***
2 - 8	-0.33952	-0.45326	-0.22579	***
2 - 10	-0.23952	-0.35326	-0.12579	***
2 - 6	-0.16548	-0.27921	-0.05174	***
2 - 4	-0.11524	-0.22897	-0.00150	***
2 - 0	0.61676	0.51190	0.72162	***
0 - 8	-0.95629	-1.06114	-0.85143	***
0 - 10	-0.85629	-0.96114	-0.75143	***
0 - 6	-0.78224	-0.88710	-0.67738	***
0 - 4	-0.73200	-0.83686	-0.62714	***
0 - 2	-0.61676	-0.72162	-0.51190	***

ANEXO E. Análisis de Varianza para la variable **Humedad** con comparación entre medias para beneficio, empaque y tiempo

Procedimiento GLM

Variable dependiente: Humedad

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	10	42072.14638	4207.21464	533.01	<.0001
Error	259	2044.35918	7.89328		
Total correcto	269	44116.50556			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Humedad Media
0.953660	17.61400	2.809498	15.95037

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
B	3	1132.73675	377.57892	47.84	<.0001
E	2	103.20174	51.60087	6.54	0.0017
T	5	40836.20789	8167.24158	1034.71	<.0001

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
B	3	621.63542	207.21181	26.25	<.0001
E	2	103.20174	51.60087	6.54	0.0017
T	5	40836.20789	8167.24158	1034.71	<.0001

t Tests (LSD) para Humedad

NOTA: Este test controla el índice de error comparisonwise de tipo I, no el índice de error experimentwise.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	259
Error de cuadrado medio	7.893279
Valor crítico de t	1.96917

Las comparaciones importantes del nivel 0.05 están indicadas por ***.

Comparación entre Beneficios	Diferencia entre medias	95% Límites de confianza		
2 - 4	0.9925	-0.0176	2.0026	
2 - 1	2.4861	1.5278	3.4443	***
2 - 3	5.3838	4.4256	6.3420	***
4 - 2	-0.9925	-2.0026	0.0176	
4 - 1	1.4936	0.5353	2.4518	***
4 - 3	4.3913	3.4331	5.3495	***
1 - 2	-2.4861	-3.4443	-1.5278	***
1 - 4	-1.4936	-2.4518	-0.5353	***
1 - 3	2.8977	1.9943	3.8012	***
3 - 2	-5.3838	-6.3420	-4.4256	***
3 - 4	-4.3913	-5.3495	-3.4331	***
3 - 1	-2.8977	-3.8012	-1.9943	***

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	259
Error de cuadrado medio	7.893279
Valor crítico de t	1.96917
Diferencia menos significativa	0.8247

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

t Agrupamiento	Media	N	E
A	16.8234	90	V
B	15.5544	90	P
B	15.4732	90	C

Alfa 0.05
 Error de grados de libertad 259
 Error de cuadrado medio 7.893279
 Valor crítico de t 1.96917

Las comparaciones importantes del nivel 0.05 están indicadas por ***.

Comparación entre Tiempos	Diferencia entre medias	95% Límites de confianza		
0 - 2	19.5570	18.4440	20.6701	***
0 - 4	27.1078	25.9947	28.2208	***
0 - 6	29.2687	28.1557	30.3818	***
0 - 8	31.6851	30.5721	32.7982	***
0 - 10	32.7018	31.5888	33.8148	***
2 - 0	-19.5570	-20.6701	-18.4440	***
2 - 4	7.5507	6.3435	8.7580	***
2 - 6	9.7117	8.5044	10.9189	***
2 - 8	12.1281	10.9208	13.3354	***
2 - 10	13.1448	11.9375	14.3520	***
4 - 0	-27.1078	-28.2208	-25.9947	***
4 - 2	-7.5507	-8.7580	-6.3435	***
4 - 6	2.1610	0.9537	3.3682	***
4 - 8	4.5774	3.3701	5.7846	***
4 - 10	5.5940	4.3868	6.8013	***
6 - 0	-29.2687	-30.3818	-28.1557	***
6 - 2	-9.7117	-10.9189	-8.5044	***
6 - 4	-2.1610	-3.3682	-0.9537	***
6 - 8	2.4164	1.2092	3.6237	***
6 - 10	3.4331	2.2258	4.6404	***
8 - 0	-31.6851	-32.7982	-30.5721	***
8 - 2	-12.1281	-13.3354	-10.9208	***
8 - 4	-4.5774	-5.7846	-3.3701	***
8 - 6	-2.4164	-3.6237	-1.2092	***
8 - 10	1.0167	-0.1906	2.2239	***
10 - 0	-32.7018	-33.8148	-31.5888	***
10 - 2	-13.1448	-14.3520	-11.9375	***
10 - 4	-5.5940	-6.8013	-4.3868	***
10 - 6	-3.4331	-4.6404	-2.2258	***
10 - 8	-1.0167	-2.2239	0.1906	***

ANEXO F. Análisis de Varianza de la estructura de covarianzas simétrica compuesta para la variable **Humedad** (Fase II)

Efecto	GL	F-Valor	Pr > F
Empaque	3	8.34	0.0001
Número de vainas	1	262.05	<.0001
Empaque*Número de vainas	3	3.37	0.0262
Tiempo	6	38.39	<.0001
Tiempo*Empaque	18	0.88	0.6006
Tiempo*Número de vainas	6	21.47	<.0001
Tiempo*Empaque*Número de vainas	18	0.54	0.9230

ANEXO G. Análisis de Varianza de la estructura de covarianzas autorregresiva para la variable **Vainillina** (Fase II)

Efecto	GL	F-Valor	Pr > F
Empaque	3	1.61	0.1990
Número de vainas	1	35.66	<.0001
Empaque*Número de vainas	3	0.86	0.4684
Tiempo	6	7.88	<.0001
Tiempo*Empaque	18	1.09	0.3927
Tiempo*Número de vainas	6	6.84	<.0001
Tiempo*Empaque*Número de vainas	18	1.22	0.2824