

S.E.P TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTEPEC



Departamento de Ingeniería
química y bioquímica

**“Evaluación de fenoles volátiles, polifenoles
totales y capacidad antioxidante de vainilla
de diferentes especies”**

Tesis profesional

Titulación integral

Para obtener el título de:

Maestra en Ciencias en Alimentos

Presenta:

IBQ. Jocelyn Itzel López Cruz

Directora:

Dra. Araceli Pérez Silva

Comité revisor:

**Dra. Ernestina Paz Gamboa, Dra. Guadalupe del
Carmen Rodriguez Jimenes, Dra. María de los
Ángeles Vivar Vera, Dr. Juan Gabriel Torruco Uco.**

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca. Octubre,2023.

Autorización de Presentación Electrónica de Tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oax., 23/Octubre/2023
Oficio No. DEP/CT-4736

C. JOCELYN ITZEL LÓPEZ CRUZ
EGRESADA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN ALIMENTOS
CON NÚMERO DE CONTROL M15350563
PRESENTE

POR MEDIO DE LA PRESENTE ME PERMITO COMUNICARLE QUE EL COMITÉ TUTORIAL INTEGRADO POR LOS CC. ARACELI PÉREZ SILVA, ERNESTINA PAZ GAMBOA, GUADALUPE DEL CARMEN RODRÍGUEZ JIMÉNES, MARIA DE LOS ANGELES VIVAR VERA, Y JUAN GABRIEL TORRUCO UCO, REVISÓ Y APROBÓ EN SU TOTALIDAD EL TRABAJO PROFESIONAL DENOMINADO "EVALUACIÓN DE FENOLES VOLÁTILES, POLIFENOLES TOTALES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE VAINILLA DE DIFERENTES ESPECIES" PRESENTADO POR USTED COMO PRODUCTO DE TESIS DE ACUERDO AL LINEAMIENTO DE TITULACIÓN CORRESPONDIENTE, PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN ALIMENTOS.

POR LO ANTERIOR Y DE ACUERDO A LOS LINEAMIENTOS INSTITUCIONALES SE LE DA TRÁMITE LEGAL PARA QUE PROCEDA A LA PRESENTACIÓN DEL TRABAJO PROFESIONAL.

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica.


JULIÁN KURI MAR
SUBDIRECTOR ACADÉMICO
ccp. Depto. Servicios Escolares
Archivo
Nº de Cómputo

 **EDUCACIÓN** |  **TECNOLÓGICO**
NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTEPEC
SUBDIRECCIÓN
ACADÉMICA

Agradecimientos

Al **Conacyt** por el financiamiento otorgado como estudiante incorporado al proyecto "**Estrategias para la adaptación y mitigación al cambio climáticos necesarios para el rescate del cultivo de vainilla en México**", con número 297484, realizado por el grupo de investigación VaniClim.

A la **Dra. Araceli Pérez Silva** por permitirme formar parte del equipo vainilla y de su familia. Fue para mí un verdadero placer poder trabajar con usted, por que aparte de admirarla como persona, la admiro como mujer, como madre y como maestra. La vida me permitió conocerla y aprender de usted. Son muchas las enseñanzas que llevo conmigo, pero la más importante es que a donde sea que vaya o en lo que me desempeñe, enamorarme de lo que hago, hacerlo con diligencia, con responsabilidad y como para Dios será siempre la clave del éxito personal. Gracias por instruirme y por permitirme en especializar en algo tan increíble y le aseguro que mi aportación a la sociedad no concluye aquí. Con mucho amor Jos.

Al **equipo Vainilla-ITtux** por recibirme e integrarme de una manera tan agradable, por enseñarme el compañerismo en todo momento, por la paciencia y por los conocimientos compartidos, es un placer aprender de cada uno de ustedes, y compartir el trabajo. Muchas gracias especialmente a Eduardo, Yunuen, Lulú, Débora, Abi y Javi. Por permitirme conocerlos más allá del trabajo, más allá de la rutina y por abrirme sus corazones. Estoy sumamente agradecida con Dios por ponerlos en mi camino, aprender con ustedes, sin duda el aprendizaje juntos fue lo mejor de esta etapa. Gracias por la amistad y por la familia que formamos juntos. La vida da muchas vueltas, pero sin duda mi único deseo sería volver a encontrarme con ustedes en alguna otra etapa de la vida, y seguir siendo amigos siempre.

Al **laboratorio de ingeniería de alimentos de la UNIDA/ ITVER**. Especialmente a la Dra. Guadalupe por la cálida bienvenida en el laboratorio, por el apoyo brindado en todo momento, la asesoría y por los momentos compartidos. Gracias doctora

Lupita por su valioso tiempo invertido en este trabajo de investigación. Y a Fernando Cansino por el compañerismo en mi estancia en el ITVer. A ustedes siempre mi respeto y admiración.

Al **(INTA)** de Buenos Aires Argentina, por un cálido recibimiento, por la oportunidad de trabajar con ustedes, aprender de ustedes, por una estancia increíble y por todo el cariño. Gracias especialmente a Adri, Luci, Sergio, Anto, Sebas, Pris, Fer Godoy, Ferni, Rafa y Ani. Por la aceptación en el equipo de trabajo, por regalarme su valioso tiempo, por compartir el conocimiento sobre cada una de sus áreas de trabajo, el apoyo en todo momento, por las increíbles convivencias, y lo más importante por regalarme su amistad. Una amistad que sin duda cuidaré y agradeceré siempre. A ustedes siempre mi respeto, cariño, admiración y amor. Conocerlos sin duda es de los regalos más gratos que me ha brindado la vida.

Dedicatorias

A **Dios** hoy, mañana y siempre. Gracias, papá, porque por 26 años me has hecho sentir verdaderamente como la niña de tus ojos. Es increíble amarte, gracias por permitirme conocerte de la manera en que te conozco, gracias por la vida, por la sabiduría, por el entendimiento y por el trabajo. Gracias por que todo es por ti, porque tú lo eres todo, pero sobre todo gracias por la mujer que me has hecho. La gloria siempre a ti.

A mis **padres**, por el esfuerzo día a día por darme todo lo necesario para poder cumplir mis metas. Por todo el amor, cariño y apoyo. Gracias porque hoy estoy cumpliendo un sueño más, un sueño que comparto con ustedes y que gracias a ustedes veo realizado. Todos mis logros son dedicados a ustedes y a mi hermano siempre. No hay día en el que no exprese mi gratitud por tenerlos en mi vida. Este camino sin duda no ha sido fácil, pero ustedes han estado conmigo y para mí. Gracias por ser mi inspiración día a día para continuar y ser mejor.

A mi **hermano** por ser mi inspiración día a día. Gracias por ser el mejor recuerdo de vida, por ser el mejor hermano, mejor amigo y compañero de vida. Tú vida sigue tan presente en la mía. Estas en cada momento de plenitud, felicidad y alegría. Te dedico esta y muchas alegrías más.

A **mi querido novio** por el apoyo incondicional, por el amor tan grande, tan pleno y diferente. Gracias, amor, porque tu vida es la alegría en la mía, gracias por impulsarme siempre a ser mejor y a dar más. Gracias por hacer mis días más alegres, más sonoros y llenos de amor. Eres el regalo más hermoso de la vida, quiero que seas parte de este y muchos escalones más. Amo tu corazón, espíritu y alma. Haces que el amor sea tan simple, haces que mi vida sea tan llena de instantes únicos. Gracias por estar conmigo en todo este camino. Esto también es dedicado a ti cariño mío.

TESIS:

**EVALUACIÓN DE FENOLES VOLÁTILES, POLIFENOLES
TOTALES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE VAINILLA DE
DIFERENTES ESPECIES**

CONTENIDO

I. MARCO TEÓRICO	15
1.1 Vainilla	15
.....	16
1.2 Especies de vainilla	16
1.2.1 <i>Vanilla planifolia</i>	16
1.2.2 <i>Vanilla xatathitensis</i>.....	17
1.2.3 <i>Vanilla pompona</i>.....	18
1.2.4 <i>Vanilla cribbiana</i>.....	20
1.3 Otras especies de vainilla	21
1.3.1 Diversidad de vainilla	22
1.3.2 <i>Vanilla</i> híbrido- Costa Rica.....	24
1.3.3 <i>Vanilla sp</i>.....	25
1.4 Beneficiado de la vainilla.....	26
1.4.1 Marchitado	26
1.4.2 Sudado	27
1.4.3 Secado	27
1.4.4 Acondicionamiento	27
1.5 Clasificación de la vainilla beneficiada	28
1.6 Compuestos volátiles en vainilla.....	29
1.7 Polifenoles.....	31
1.8 Radicales libres.....	33
1.9 Antioxidantes	34
1.9.1 Sistemas antioxidantes.....	35
1.9.2 Clasificación de los antioxidantes	35
1.9.3 Clasificación según fuente de origen.....	36
1.9.4 Clasificación según la acción en organismos vivos	36
1.9.6 La vainillina como antioxidante	40
1.9.7 Métodos para determinar la capacidad antioxidante.....	40
II. ANTECEDENTES	50
III. JUSTIFICACIÓN	52

IV. OBJETIVOS	53
4.1 Objetivo general	53
4.2 Objetivos específicos	53
V. MATERIALES Y MÉTODOS	54
5.1 Caracterización física de vainas beneficiadas de vainilla	57
5.2 Determinación de humedad	57
5.3 Elaboración de extractos de vainilla para HPLC-DAD	58
5.4 Cuantificación de Fenoles volátiles por HPLC-DAD	59
5.4.1 Condiciones cromatográficas	60
5.5 Cuantificación de Polifenoles Totales por el método de Folin-Ciocalteu	61
5.6 Ensayo de actividad antirradical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH[•])	62
5.7 Ensayo de actividad antirradical 2,2-Azinobis (3ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS^{•+})	63
5.8 Ferric Ion Reducing Antioxidant Power (FRAP)	64
5.9 Oxigen Radical Absorbance Capacity (ORAC)	65
VI. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	66
VII. RESULTADOS	67
7.1 Caracterización física de las muestras de vainilla de diferentes especies	68
7.2 Determinación de fenoles volátiles	70
7.2.1 Cuantificación de vainillina	70
7.2.2 Cuantificación de ácido vainillínico	74
7.2.4 Cuantificación de p -hidroxibenzaldehído	76
7.2.5 Cuantificación de ácido p-hidroxibenzoico	77
7.2.6 Cuantificación de p-hidroxibencil alcohol	77
7.2.7 Cuantificación de anisil alcohol	80
7.2.8 Cuantificación de ácido anísico	80
7.3 Distribución de compuestos aromáticos por especies	82
7.3.1 <i>Vanilla planifolia</i>	82
7.3.2 <i>Vanilla pompona</i>	82
7.3.5 <i>Vanilla xtahitensis</i>	83
7.3.4 <i>Vanilla cribbiana</i>	83
7.3.3 <i>Vanilla híbrido</i>	83
7.4 Determinación de polifenoles totales	84

7.5 Actividad antioxidante por el método DPPH'	86
7.6 Actividad antioxidante por el método ABTS ⁺	88
7.7 Actividad antioxidante por el método FRAP	90
7.8 Determinación de la capacidad antioxidante por el método ORAC	92
VIII. CONCLUSIONES	95
IX. RECOMENDACIONES	96
X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	97
XI. ANEXOS	105

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vainilla y aplicaciones.	16
Figura 2. Vanilla planifolia/ Banco de germoplasma ITTux.	17
Figura 3. Vanilla xtahitensis/ Banco de germoplasma ITTux.	18
Figura 4. Vanilla pompona/ Banco de germoplasma ITTux.	19
Figura 5. Vanilla cribbiana/ Banco de germoplasma ITTux.	21
Figura 6. Distribución del género Vanilla en México.	24
Figura 7. Diagrama del proceso de beneficiado tradicional de la vainilla.	26
Figura 8. Clasificación de antioxidantes según la acción en organismos vivos... 	37
Figura 9. Reacción de Folin-Ciocateau.	42
Figura 10. Reacción de DPPH'.	43
Figura 11. Reacción de ABTS^{••}	45
Figura 12. Reacción de FRAP	47
Figura 13. Mecanismo de acción ensayo ORAC.	48
Figura 14. Materia prima.	54
Figura 15. Caracterización física de las muestras estudiadas	57
Figura 16. Determinación de humedad de las muestras estudiadas	58
Figura 17. Elaboración de extractos de las muestras estudiadas.	59
Figura 18. HPLC-DAD/ ITTUX.	60
Figura 19. Cuantificación de Polifenoles totales.	61
Figura 20. Determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH' .	62
Figura 21. Determinación de la actividad antioxidante por el método de ABTS^{••} .	64
Figura 22. Determinación de la actividad antioxidante por el método de FRAP....	64
.....	65
Figura 23. Determinación de la actividad antioxidante por el método de ORAC... 	65
Figura 24. Determinación de vainillina y potencial en vainillina en muestras de vainillas de diferentes especies	73
Figura 25. Determinación de compuestos anísicos en muestras de vainillas de diferentes especies.	81
Figura 26. distribución de compuestos en especies de vainilla de diferentes especies.	82
Figura 27. Contenido total de polifenoles en muestras de vainilla de diferentes especies.	84

Figura 28. Determinación de la actividad antioxidante por los métodos de DPPH• y ABTS⁺ 90

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición química en 3 especies diferentes de vainilla.	20
Tabla 3. Tipos de compuestos presentes en el aroma vainilla.	30
Tabla 4. Clasificación de los polifenoles y ejemplos.	32
Tabla 5. Especies reactivas de oxígeno.	33
Tabla 6. Técnicas para medir actividad antioxidante.	41
Tabla 7. Descripción del origen y tipo de beneficiado de las muestras estudiadas..	55
Tabla 8. Condiciones cromatográficas para el análisis por HPLC-DAD de muestras de vainilla.	60
Tabla 9. Caracterización física de vainas de vainilla de diferentes especies.	69
Tabla 10. Contenido de Vainillina y potencial aromático de las muestras de vainilla de diferentes especies.	72
Tabla 11. Contenido de ácido vainillínico y vainillil alcohol de las muestras de vainilla de diferentes especies.	79
Tabla 13. Porcentaje de inhibición en los ensayos de DPPH[•] y ABTS^{•+} en muestras de vainilla de diferentes especies.	88
Tabla 14. Imágenes de las vainas del estudio.	105

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar el contenido de fenoles volátiles, polifenoles totales y capacidad antioxidante de muestras de vainilla de diferentes especies. Las vainas beneficiadas fueron de: México (*V. planifolia*, *V. pompona*, *V. mexicana*, *V. insignis* *V. sp.*); Costa Rica (*V. Híbrido*), Guatemala (*V. xtahitensis* y *V. Cribbiana*). Las muestras fueron sometidas a un análisis físico, determinando su longitud, peso, grosor y humedad. Los análisis de los compuestos aromáticos fueron realizados por HPLC-DAD. En los extractos obtenidos se determinó el contenido de polifenoles, se evaluó la actividad antioxidante mediante los métodos ABTS^{•+}, DPPH[•], FRAP y la capacidad antioxidante por el método ORAC. Los resultados obtenidos fueron evaluados mediante el Software Statistica versión 10. Los resultados indican que las vainas de mayor longitud fueron las vainas de *V. híbrido* (23 cm), respecto al grosor fueron las de *V. pompona* (14mm), y de acuerdo con el peso fueron las de *V. cribbiana* (9 g). Los contenidos de humedad en las vainas oscilaron de 10 a 56 g H₂O /100 g muestra seca. Los contenidos de ácido vainillínico (0.11 g/100 g m.s) y vainillil alcohol (0.17 g/100 g m.s) fueron mayores en *V. sp.* Sin embargo, las mayores concentraciones de *p*-HB (0.23 g/100 g m.s), ácido *p*-HB (0.33 g/100 g m.s) y *p*-HB alcohol (0.08 g/100 g m.s.) se determinaron en la muestra de *V. cribbiana*. El mayor contenido de vainillina se determinó en las muestras de *V. sp* (9.02 g/100 g m.s), seguido de las muestras de *V. híbrido* (3.32 g/100 g m.s.). La concentración de los compuestos anísicos fue mayor en las muestras de *V. pompona*, *V. xtahitensis* y *V. cribbiana*, característicos de estas especies. Con respecto a los polifenoles totales, el mayor contenido fue determinado en la muestra de *V. sp* (93.29 mg EAG/g m. s). Las muestras que presentaron mayor porcentaje de actividad antioxidante por los métodos ABTS^{•+} y DPPH[•] fueron *Vanilla planifolia* (65 y 30%) y *Vanilla cribbiana* (52 y 33%), respectivamente. La mayor actividad antioxidante por el método FRAP fue determinado en la muestra de *Vanilla cribbiana* (70 mM ET/g m.s.). Los resultados del ensayo ORAC mostraron una inhibición de más del 80% de las especies reactivas de oxígeno (ROS's), excepto la muestra *V. híbrido*. La especie silvestre de *Vanilla sp* representan una alternativa en el comercio debido a su calidad aromática. Por primera vez se generó evidencia científica de los atributos antioxidantes de muestras de vainillas comerciales, silvestres, aromáticas y no aromáticas.

Palabras claves: vainilla, extracto de vainilla, fenoles, polifenoles, antioxidantes.

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the content of volatile phenols, total polyphenols and antioxidant capacity of vanilla samples of different species. The beneficiated pods were from: *V. planifolia*, *V. pompona*, *V. mexicana*, *V. insignis* *V. sp.* (Mexico); *V. híbrido* (Costa Rica), *V. xtahitensis* and *V. cribbiana* (Guatemala). The samples were subjected to physical analysis, determining their length, weight, thickness and humidity. The analysis of aromatic compounds was carried out by HPLC-DAD. Polyphenol content was determined in the extracts obtained, and antioxidant activity was evaluated by ABTS^{•+}, DPPH[•], FRAP and antioxidant capacity by ORAC methods. The results obtained were evaluated using Statistica version 10 software. The results indicate that the longest pods were those of *V. hybrid* (23 cm), the thickest were those of *V. pompona* (14 mm), and according to weight were those of *V. cribbiana* (9 g). Moisture contents in the pods ranged from 10 to 56 g H₂O /100 g sample. The contents of vanillic acid (0.11 g/100 g d.m) and vanillyl alcohol (0.17 g/100 g d.m) were higher in *V. sp.* However, the highest concentrations of p-HB (0.23 g/100 g d.m), p-HB acid (0.33 g/100 g d.m) and p-HB alcohol (0.08 g/100 g d.m) were determined in the sample of *V. cribbiana*. The highest vanillin content was determined in *V. sp* samples (9.02 g/100 g d.m) followed by *V. híbrido* samples (3.32 g/100 g d.m). The concentration of anisic compounds was higher in the samples of *V. pompona*, *V. xtahitensis* and *V. cribbiana*, characteristic of these species. With respect to total polyphenols, the highest content was determined in the sample of *V. sp* (93.29 mg AGE/g d.m). The samples that presented the highest percentage of antioxidant activity by the ABTS^{•+} and DPPH[•] methods were *Vanilla planifolia* (65 and 30%) and *Vanilla cribbiana* (52 and 33%), respectively. The highest antioxidant activity by the FRAP method was determined in the *Vanilla cribbiana* sample (70 mM ET/g d.m). The ORAC assay results showed more than 80% inhibition of reactive oxygen species (ROS's), except the *V. hybrid* sample. The wild species of *Vanilla sp* represent an alternative in trade due to their aromatic quality. For the first time, scientific evidence was generated on the antioxidant attributes of commercial, wild, aromatic, and non-aromatic vanilla samples.

Key words: vanilla, vanilla extract, phenols, polyphenols, antioxidants

I. MARCO TEÓRICO

1.1 Vainilla

El aroma de vainilla natural proviene principalmente del fruto de la especie *Vanilla planifolia*, encontrada y domesticada por primera vez en América central, perteneciente a la familia de las *Orchidaceae*, dentro del reino *plantae* (Dignum et al., 2002; Ramachandra & Ravishankar, 2000). Es denominada la segunda especie más costosa dentro del mercado, justo después del azafrán (Bythrow, 2005).

El uso más importante de la vainilla es en la repostería (Figura 1), como en: pastelería, dulcería, chocolatería, helados, aunque su aplicación se extienda también en la industria de los perfumes y medicamentos (Bory et al., 2008; Bouetard et al., 2010; Gigant et al., 2011; Pérez-Silva et al., 2020). Sin embargo, dentro del género *Vanilla* se han reportado un total de 110 especies (Purseglove et al., 1981). Es un género es muy diverso ya que sus ejemplares se encuentran distribuidos en las islas del Pacífico (3 especies), América tropical (52 especies), Sudeste asiático y Nueva Guinea (31 especies), África (14 especies) e islas del océano Índico (10 especies) (Bouriquet, 1954). De las cuales únicamente 35 poseen atributos aromáticos (Bory et al., 2008; Pérez-Silva et al., 2020).



Figura 1. Vainilla y aplicaciones.

1.2 Especies de vainilla

1.2.1 *Vanilla planifolia*

Vanilla planifolia Andrews es la especie comercial con mayor demanda a nivel mundial, más del 95 % del comercio de vainilla corresponde a esta especie. Se reporta en originaria de las selvas tropicales húmedas del sureste de México, Centroamérica, Antillas y América del Sur (Anilkumar, 2004; SAGARPA, 2010). Es una planta herbácea perenne, trepadora de árboles u otros soportes y alcanza aproximadamente una altura de 10-15 m mediante raíces adventicias (Figura 2). Posee raíces adventicias aéreas, largas, blanquecinas, de unos 2 mm de diámetro, se producen individualmente frente a las hojas y se adhieren firmemente a la planta o medio de soporte. El grupo representativo tanto cualitativamente como cuantitativamente de la fracción volátil de *Vanilla planifolia* beneficiada son los fenoles, dominando en esta especie, la vainillina (3-metoxi-4-hidroxibenzaldehído o vainillina), el ácido vainillínico, el 4-benzaldehido, el ácido 4- hidroxibenzoico. Sin embargo dentro del grupo de los fenoles se encuentran también compuestos con

grupos funcionales como: alcoholes, cetonas y ésteres (Pérez-Silva et al., 2006; Zhang & Mueller, 2012).



Figura 2. *Vanilla planifolia*/ Banco de germoplasma ITTux.

1.2.2 *Vanilla xtahitensis*

Es originaria exclusivamente de las islas de Tahití (Figura 3), Sin embargo, su distribución se ha extendido hasta algunas islas de Hawái (Lubinsky et al., 2008; Brunshwig et al., 2009). Las teorías han surgido desde hace muchos años con respecto a esta especie, los primeros datos resultantes de los análisis genéticos realizados mostraron que esta especie provenía de una cruce genética entre *V. planifolia* y *V. odorata*, aunque sólo se relacionan distantemente entre sí, estaban directamente relacionados con la genética de *V. xtahitensis*. Sin embargo, estudios recientes del análisis del ADN del cloroplasto permitieron concluir que el fenotipo "materno" correspondía a *V. sotoarenasii* y la parte "paterna" a *V. odorata* C. Presl (Favre et al., 2022). Los compuestos más importantes en esta especie son: vainillina, anisaldehído, anisil alcohol y acetato de anisilo (Makoto et al., 2012). El

sabor es el resultado de la composición del aroma específico de vainas verdes combinados con el método de beneficiado de la Polinesia ancestral. Como consecuencia de ello, el aroma de la vainilla tahitiana es único en el mercado, muy apreciado por la industria gastronómica (Brunschwig et al.,2015).

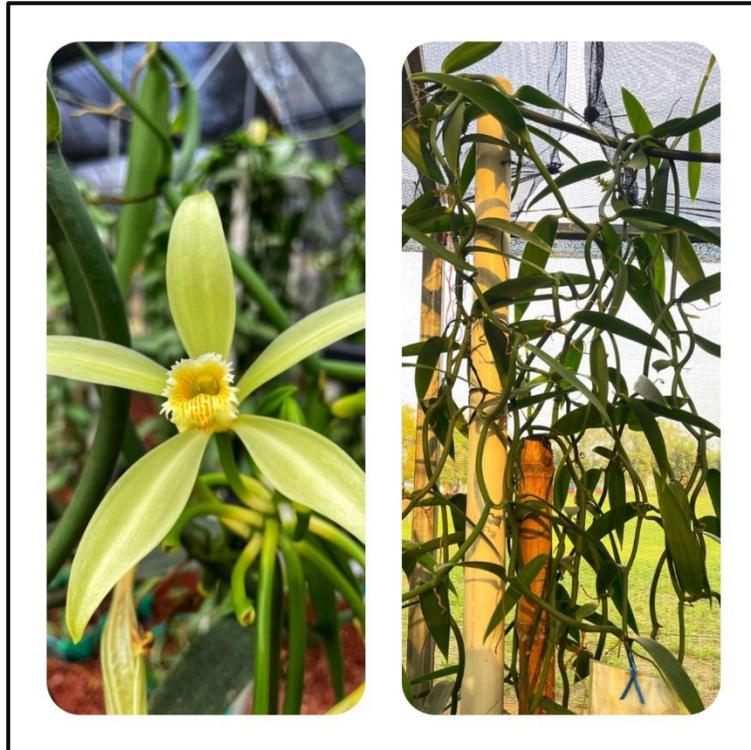


Figura 3. Vanilla xtahitensis/ Banco de germoplasma ITTux.

1.2.3 Vanilla pompona

Vanilla pompona Schiede es nativa de América Central, Trinidad y América del Sur. Ocupa el tercer lugar dentro de las especies comerciales de vainilla (Cameron, 2011). Una de las cualidades principales de esta especie es que puede producir mayor cantidad de frutos. La planta es vigorosa, tallos de mayor grosor (Figura 4) y se parece a la *Vanilla planifolia*, excepto que las hojas son más grandes y miden entre 15 y 28 cm de largo y entre 4 y 11,5 cm de ancho (Soto-Arenas, 1999). Los

principales compuestos aromáticos son: *p*-hidroxibenzaldehído, alcohol vainílico, ácido vainílico, ácido *p*-hidroxibenzoico, anisil alcohol, anisaldehído, ácido anísico y vainillina. En la tabla 1 se muestra una comparación de los compuestos detectados en muestra de *V. planifolia*, *V. pompona* y *V. xtahitensis*, estos compuestos fueron detectados a los nueve meses de edad en los frutos verdes en su forma glucosilada, los cuales son similares aunque en diferentes concentraciones a los compuestos de los frutos verdes de *Vanilla planifolia* y *Vanilla xtahitensis* (Maruenda et al., 2013).



Figura 4. *Vanilla pompona*/ Banco de germoplasma ITTux.

Tabla 1. Composición química en 3 especies diferentes de vainilla (Ranadive et al., 2006).

Compuestos volátiles	<i>Vanilla planifolia</i>	<i>Vanilla pompona</i>	<i>Vanilla xtahitensis</i>
Vainillina	++ ++	++	+++
Alcohol anisílico	-	+	+++
Ácido anísico	+/-	+	+++
Anisaldehído	+/-	+	++
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	+	++	+++
<i>p</i> -hidroxibenzaldehído	++	+	++
Ácido Vainillínico	++	+	++

El número de + significan la abundancia de dicho compuesto y – se refiere a la ausencia del compuesto.

En base a lo anterior podemos concluir que las especies comerciales tienen perfiles aromáticos diferentes entre sí, esto es debido principalmente a las características genéticas de cada una. Es por lo antes mencionado que resulta sumamente importante estudiar otras especies silvestres del género *Vanilla*.

1.2.4 *Vanilla cribbiana*

La especie *Vanilla cribbiana* es una variante del género *Vanilla* la cual es perteneciente al grupo de *Vanilla hostmanii*, esta especie en particular se caracteriza por emitir flores grandes de color blanco y labelo amarillo-anaranjado (Figura 5), algunas veces ha sido confundida con *Vanilla planifolia* y *Vanilla pompona*. Su distribución abarca países de América Central: México, Guatemala, Belice y Honduras. El periodo de floración de *cribbiana* ocurre en temporada de lluvia entre los meses de julio y agosto; y sus frutos son considerados fragantes con potencial de interés comercial (Pérez-Silva et al., 2020; Soto-Arenas & Dressler, 2010).



Figura 5. *Vanilla cribbiana*/ Banco de germoplasma ITTux.

1.3 Otras especies de vainilla

Los trabajos realizados por Soto Arenas durante más de 20 años permitieron identificar que el norte de Oaxaca es un centro importante de diversidad genética del género *Vanilla* (Lubinsky et al., 2008). La mayor parte de la variación genética está en las comunidades indígenas, especialmente en zonas Chinantecas y Mazatecas de Oaxaca (Domínguez-Pérez, 2012). Esta información demuestra que México además de ser la cuna genética de la vainilla, es uno de los países con mayor diversidad de este género. El estudio de las especies silvestres que se encuentran tanto en la zona de la Chinantla, Oaxaca como otras partes de la república y en otros países es de suma importancia, porque permite generar información científica respecto a estos ejemplares que puede contribuir a la mejora del cultivo o la diversificación de este, en el comercio nacional e internacional.

La amplia diversidad genética del género *Vanilla* en México es debido a las condiciones de clima, humedad y precipitación (ASERCA, 2002) y condiciones agroecológicas.

1.3.1 Diversidad de vainilla

El cultivo de *V. planifolia* y *V. pompona* se descubrió en México, probablemente en el norte de Veracruz (Bruman, 1948). Sin embargo, existe otra hipótesis que indica que la vainilla de Veracruz fue obtenida de la región de Teutila en el estado de Oaxaca.

Muchas de las especies de vainilla son similares a *V. planifolia* en lo que refiere a hojas, flores y tallos, tanto en periodo de crecimiento como de floración. Es por eso por lo que cualquier planta de vainilla suele identificarse erróneamente como *V. planifolia* (Soto-Arenas et al., 1982; Soto-Arenas et al., 1986; Soto-Arenas et al., 1998; Hagsatel et al., 1998). Los trabajos realizados por el orquideólogo Miguel Ángel Soto Arenas permitieron reportar que el norte de Oaxaca es un centro importante de diversidad genética de vainilla (Lubinsky et al., 2008).

Se ha reportado que de las plantaciones mexicanas reportadas con especies silvestres incluyen; *Vanilla cribbiana*, *Vanilla insignis*, *Vanilla odorata* y *Vanilla pompona* como se muestra en la figura 6, además de la comercial *Vanilla planifolia* (Soto-Arenas et al., 1982; Soto-Arenas et al., 1986; Soto-Arenas et al., 1998; Hagsatel et al., 1998). Es bien sabido que la vainilla tiene peculiaridades que la convierten en un género taxonómicamente difícil (Wood et al., 2003), principalmente debido a la escasez de información del material genético, floración efímera y la enorme variación vegetativa y fenotípica (por ejemplo, brotes frondosos con o sin hojas, hojas de formas diferentes en la misma planta) (Putz & Holbrook, 1986; Ray et al., 1990).

Una de las principales complicaciones en estas especies silvestres es precisamente la mala manutención de las flores membranáceas debido a que se encuentran en terrenos de difícil alcance, por lo cual se dificulta su estudio (Williams et al., 1982).

Otras son especies muy raras, con poblaciones escasas; sus vejucos son plantas perennes de larga vida que sólo florecen cuando han alcanzado un tamaño considerable. Se ha considerado que *Vanilla planifolia* está en peligro de extinción en México (Purseglove, 1975; Purseglove et al., 1981; Smith, et al., 1992; Soto Arenas, 1999; Cibrián, 1999; Soto Arenas et al., 2004).

En "The Orchidaceae of Mexico", Williams (1951) reportaron como especies nativas del país; *Vanilla inodora*, *Vanilla mexicana*, *Vanilla odorata* y *Vanilla insignis* (Soto Arenas et al., 1989; Soto Arenas et al., 1994).

Por otro lado, *V. insignis* fue descrita en Honduras (Ames et al., 1934), *V. helleri* (Heller & Hawkes, 1966) en Nicaragua, y *V. pauciflora* Dressler (Dressler, 1979) en Panamá. *Vanilla hartii* fue citada en varias partes de América central y del sur (Correll, 1965), y *V. phaeantha* en el Salvador (Hamer, 1974; Villanueva, 2017). Dressler (1993) incluyó tres especies en su 'Field Guide to the Orchids of Costa Rica and Panama'. Aunque esta última también ha sido reportada en Yucatán (Rodríguez-López & Martínez-Castillo, 2019).

Finalmente, en un trabajo publicado para Costa Rica (Soto Arenas & Dressler, 2003) enumeran diez especies para este país, tres de ellas sin nombres hasta la fecha. Esta información brinda principalmente una idea más clara de la extensa biodiversidad del género *Vainilla* particularmente en México y en Centroamérica. Sin embargo, muchas de estas especies no han sido estudiadas a profundidad.

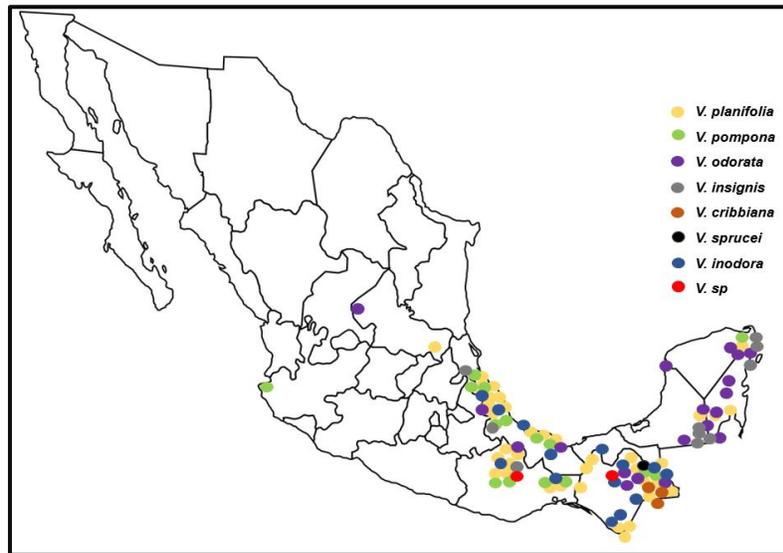


Figura 6. Distribución del género *Vanilla* en México (Flores-Jiménez et al.,2017).

1.3.2 *Vanilla* híbrido- Costa Rica

La primera referencia que se tuvo de vainilla en Costa Rica fue en 1987. En general tienen alrededor de unas 20 hectáreas de plantaciones de vainilla en diferentes partes del país, de las cuales 4 pertenecen a un propietario extranjero (Ocampo et al.,1987; Havkin-Frenkel, 2011). No hay mucha información sobre las primeras plantas de vainilla y su procedencia. Hubo una hectárea de vainilla sembrada en Upala, Alajuela, una hectárea más sembrada en Aguirre y Puntarenas, en 1986. La hectárea de vainilla sembrada en Upala era propiedad de un extranjero que tuvo que viajar a Europa antes de la cosecha de vainilla. Llevó a Europa algunas vainas de vainilla de su plantación de cosechas anteriores y las vainas gustaron tanto que regresó con la intención de cultivar más plantas de vainilla y expandir el cultivo. Sin embargo, cuando regresó, la plantación de vainilla estaba dañada y no pudo continuar con el cultivo (Ocampo et al.,1987; Havkin-Frenkel, 2011).

Debido a los altos precios de la vainilla en la década de 1990, y en un esfuerzo por mejorar el nivel de vida de las comunidades rurales y preservar las zonas de amortiguación alrededor de las reservas biológicas y los parques nacionales,

instituciones nacionales e internacionales se unieron para apoyar el cultivo de vainilla en Quepos y Puerto Jiménez. Ambas localidades están situadas en el sur de Costa Rica (Havkin-Frenkel, 2011). Las reservas biológicas de El Nara y Los Santos, en Puntarenas, fueron seleccionadas para desarrollar este proyecto. Un grupo de agricultores que tienen cultivos de agricultura sostenible, como frijoles y maíz, se reunieron y plantaron *Vanilla planifolia* en las zonas limítrofes de las reservas biológicas. Estos agricultores fueron los pioneros en el cultivo de la vainilla. Sin embargo, el hongo patógeno *Fusarium oxysporium* infectó las plantaciones de vainilla en 1993 (Ramirez et al.,1999).

Como una de las soluciones al problema de la enfermedad, se trajo a Costa Rica un nuevo cultivar de vainilla, llamado "Vaitsy", procedente del Instituto de Investigación y Agricultura de Madagascar. Hasta la fecha se desconoce la designación correcta de la especie y la historia del desarrollo de "Vaitsy" en Madagascar (Zuñiga,1996; Guzmán-Díaz, 1997; Martín-Gonzalez,2003). Es posible que se trate del híbrido interespecífico *V. planifolia* x *V. pompona* de Costa Rica. Se entregó a científicos de la Universidad Politécnica de Costa Rica en Santa Clara, San Carlos, donde se desarrolló el cultivo de tejidos para la propagación de la vainilla. Los laboratorios privados obtuvieron la tecnología y la planta madre para continuar la reproducción vegetativa del nuevo cultivar de vainilla. Además, plantaron las primeras plantas de "Vaitsy" con resultados sorprendentes. Las plantas presentaban una buena resistencia al *Fusarium* y producían vainas grandes, de hasta 26 cm de largo (Ocampo et al.,1987; Havkin-Frenkel, 2011).

1.3.3 *Vanilla* sp

Vanilla sp es una especie afín a *Vanilla odorata*, se encuentra en una comunidad del estado de Chiapas, a la fecha no se puede mencionar el lugar de origen debido a que aún no se tienen registros de la especie y por ende no se tienen datos sobre ella respecto a la caracterización física ni aromática.

1.4 Beneficiado de la vainilla

Los frutos obtenidos a los 9 meses de la polinización de las orquídeas de vainilla son frutos inodoros, estos deben someterse a un proceso denominado beneficiado (Figura 7) para desarrollar el característico aroma a vainilla que conocemos (Pérez Silva et al., 2016). En los frutos verdes o maduros de la orquídea de vainilla, se encuentran contenidos los precursores del aroma, β -D-glucósidos, quienes son los encargados de entrar en contacto con β -D-glucosidasas durante el proceso de curado o beneficiado. En este proceso se involucran una serie de pasos; marchitamiento, sudado, secado al sol y acondicionamiento (Odoux, 2000; Dunphy y Bala, 2009, Pérez-Silva et al., 2011); con diversas variaciones dependiendo de la ubicación geográfica. Durante este proceso los glucósidos fenólicos, tales como glucovainillina, son hidrolizados enzimáticamente por las β -glucosidasas a las formas libres, las cuales son responsables del aroma de la vainilla (Odoux et al., 2006; Brillouet y Odoux, 2010; Pérez Silva et al., 2011). Durante las etapas del beneficiado tradicional hay fluctuaciones con respecto a la temperatura y el tiempo las cuales pueden conducir a variaciones en la calidad aromática de las vainas, incluyendo el contenido de vainillina (Dunphy y Bala, 2009).



Figura 7. Diagrama del proceso de beneficiado tradicional de la vainilla.

1.4.1 Marchitado

Generalmente en este paso lo que se busca es la muerte vegetativa del fruto propiciando así que las enzimas entren en contacto con sus sustratos, y este paso se puede hacer de dos maneras ya sea en hornos industriales de 24-48 horas con

una temperatura de 60 °C y por otro lado cuando se trata de una menor cantidad de vainas verdes, estas se sumergen en agua caliente a una temperatura de 80 °C por 30 segundos, es importante mencionar que esta temperatura y tiempo pueden estar sujetos a diferentes variantes como lo son la maduración del fruto, el sistema de calentamiento que sea empleado en el horno (leña o eléctrico, con o sin circulación de aire) (Curti Díaz, 1995; Havkin-Frenkel & Belanger, 2011; Pérez-Silva et al., 2006).

1.4.2 Sudado

Una vez que las vainas salen del horno o tratamiento térmico al cual hayan sido sometidas se depositan en cajas de madera especiales para el sudado o envueltas en bolsas de nylon con el objetivo de disminuir la temperatura. El propósito de este paso es disminuir la temperatura, hasta llegar a una temperatura óptima para que se puedan llevar a cabo tanto las reacciones de hidrolisis como las oxidativas mediante las cuales el fruto pasará del color verde inicial a una tonalidad café claro, y al mismo tiempo comienza a disminuir la humedad de las vainas y de este modo también se impide el crecimiento de organismos (Curti Díaz, 1995; Havkin-Frenkel & Belanger, 2011; Pérez-Silva et al., 2006).

1.4.3 Secado

El objetivo principal de este paso es secar las vainas de vainilla en superficies en contacto directo con el sol, estas se pueden extender en tapetes o petates por un periodo alrededor de 2-4 horas o hasta que la temperatura en las vainas fluctúe entre los 50-55°C. el periodo y las horas de secado puede variar por diferentes factores como lo es el lugar donde se realiza este proceso además de las temperaturas a las que se encuentre el lugar y las condiciones climáticas, pero generalmente se llevan las vainas a alcanzar una humedad final entre 25-30 % del peso de las vainas (Curti Díaz, 1995; Odux, 2000; Pérez-Silva et al., 2006).

1.4.4 Acondicionamiento

En este último paso del beneficiado lo que ocurre son diversas reacciones tanto químicas como bioquímicas (esterificación, eterificación y degradación oxidativa) en las que se generan en gran manera los metabolitos secundarios y compuestos aromáticos constituyentes del aroma a vainilla (Havkin-Frenkel et al., 2004).

1.5 Clasificación de la vainilla beneficiada

La norma (NMX-FF-074- 2009) especifica los parámetros que se emplean para clasificar las vainas de vainilla (*Vanilla planifolia*) beneficiadas, estos son: la humedad, el contenido de vainillina, algunas características físicas, clasificándose en 4 categorías; extra- gourmet, categoría I, categoría II categoría III. Las categorías I y II se dividen en Gourmet y Ordinaria como a continuación se detallan en la tabla 2.

Tabla 2. Clasificación de la vainilla según la Norma Oficial Mexicana NMX-FF-074- 2009.

Grado de calidad						
Especificación	Extra Gourmet	Categoría I Gourmet ordinaria		Categoría II Gourmet ordinaria		Categoría III Gourmet ordinaria
	Gruesa sin rayas, ni manchas, flexible y brillante	Gruesa sin rayas, ni manchas, flexible y brillante	Delgada con rayas, puede estar rajada	Gruesa sin rayas, ni manchas, flexible y brillante	Delgada con rayas, puede estar rajada	De cualquier grosor, puede estar rajada o rayada
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

1.6 Compuestos volátiles en vainilla

El análisis de los compuestos volátiles, así como su identificación y evaluación cuantitativa puede constituir una valiosa fuente de información sobre la calidad sanitaria de los alimentos, que incluye la calidad organoléptica y garantiza la salud del consumidor (Tavares-González, 2018). Este aroma, el cual resulta percibido por el consumidor depende de un número de factores: la disponibilidad y la estructura de los compuestos, la participación de grasas, aminoácidos, azúcares y también las condiciones de reacción como la temperatura, duración, actividad del agua, pH, y nivel de oxígeno (Plutowska & Wardencki, 2007).

Se ha reportado que el aroma natural de vainilla contiene, además de la vainillina (3-metoxi-4-hidroxibenzaldehído), el cual es su componente principal, más de un centenar de moléculas aromáticas que le confieren un sabor incomparable (Pérez-Silva et al., 2006).

Es por eso que se considera a los frutos beneficiados de vainilla uno de los aromas preferidos en la industria (Pérez-Silva et al., 2016; Arshamian et al., 2022). Este aroma se produce exclusivamente a partir de frutos beneficiados (también denominados vainas) de orquídeas del género *Vanilla*. Los principales compuestos volátiles responsables de tan preciado aroma y que además son los cuantitativamente más importantes son: la vainillina, el p- hidroxibenzaldehído, el ácido vainillínico y el ácido p- hidroxibenzoico. La vainillina es el principal responsable del aroma de la vainilla. Sin embargo, el aroma característico de la vainilla es debido a una mezcla compleja de diferentes compuestos volátiles (Adedeji et al., 1993; Lamparsk. & Klimes, 1976; Pérez-Silva et al., 2006).

Pérez-Silva et al. (2006), identificaron más de 250 compuestos volátiles por HPLC-DAD en *Vanilla planifolia* algunos de los cuales se pueden apreciar en la tabla 3.

Tabla 3. Tipos de compuestos presentes en el aroma vainilla.

clasificación	compuestos
Fenoles	guayacol, 4-metilguayacol, fenol, <i>p</i> -cresol, 4-vinilguayacol, vainillimetileter, 4-vinil fenol, vainillina, acetovainillona, vainillil alcohol, vainillimetilcetona, <i>p</i> -hidroxibenzaldehído, <i>p</i> -hidroxibencilalcohol y ácido vainillínico.
Ácidos alifáticos	ácido acético, ácido propanoico, ácido isobutírico, ácido butírico, ácido isovalérico, ácido valérico, ácido hexanoico, ácido heptanoico, ácido octanoico, ácido 2-heptanoico, ácido nonanoico, ácido dodecanoico, ácido mirístico, ácido pentadecanoico, ácido hexadecanoico, ácido 9-hexadecanoico, ácido heptanoico, ácido estearico, ácido oleico y ácido linoleico.
Ácidos aromáticos	ácido benzoico, ácido bencenpropoico, ácido cinámico, ácido anísico), alcoholes (1-octen3-ol; 2,3-butandiol; 1-octanol; 2,3 butandiol; bencil alcohol, bencenpropanol, anisil alcohol y cinamil alcohol.
Aldehídos	2-heptanal, (E)-2-decenal, (EZ)-2,4 decadienal, (E,E)-2,4 decadienal), Esteres (metil salicilato, metil cinamato, anisil formato y etil linoleato.
hidrocarburos	tricosano y pentacosano, heterocíclicos (furfural, <i>γ</i> -butirolactona y pantolactona).
Cetona	3-hidroxi-2-butanona.

Fuente: Pérez-Silva et al.,2006

siendo, los fenoles volátiles los principales compuestos responsables del aroma en el género *Vanilla*. Además de los atributos aromáticos en vainilla los cuales le

confieren una importante posición en el mercado, es sustancial estudiar otros atributos que tienen un beneficio biológico como los polifenoles (Ito et al., 1986; Shahidi et al., 1995; Shahidi et al., 1997; Shahidi et al.,2000).

1.7 Polifenoles

Los compuestos fenólicos son compuestos que provienen de la ruta del shikimato, constituyen una de las principales clases de metabolitos secundarios en frutos y vegetales (Tabla 4), donde desempeñan diversas funciones fisiológicas. Es decir, aquellos compuestos que intervienen tanto en el crecimiento como en la reproducción de las plantas también son responsables de aquellos procesos defensivos contra agentes patógenos, depredadores o radiación ultravioleta (Kurilich et al.,2000; Kapoor et al.,2001; Pandey et al.,2009). En algunos casos se había cuestionado su estudio debido al posible efecto adverso de algunas de las moléculas principales de este grupo principalmente: los taninos, en la digestibilidad de proteínas. Sin embargo, en la actualidad existe gran interés en estos compuestos debido a la variedad de actividades biológicas que presentan, considerándose uno de los compuestos fitoquímicos alimentarios más importantes por su contribución al mantenimiento de la salud humana. La actividad biológica de los polifenoles está relacionada con su carácter antioxidante, el cual es debido a su habilidad para quelar metales, inhibir la actividad de la enzima lipooxigenasa y actuar como atrapadores de radicales libres (Ito et al., 1986; Shahidi et al., 1995; Shahidi et al., 1997; Shahidi et al.,2000).

Existen numerosos estudios que proporcionan datos que apoyan la correlación negativa entre la ingestión de compuestos fenólicos y el riesgo de padecer ciertas enfermedades, incluyendo las enfermedades cardiovasculares, cáncer, enfermedad de Alzheimer, cataratas y otras disfunciones relacionadas con la edad. Además de estos efectos beneficiosos para la salud, también se ha estudiado su efecto antiinflamatorio y su efecto preventivo en el tratamiento de asma. En ese caso la

cantidad de compuestos polifenólicos presentes en un alimento varía en función de la especie vegetal, variedad y parte del vegetal considerada (fruto, semillas, brotes, hojas), horas de exposición solar, grado de madurez, condiciones de cultivo, procesado y condiciones de almacenamiento (Ruiz et al., 2010; Quiñones et al., 2012; García-Valis et al., 2018).

Tabla 4. Clasificación de los polifenoles y ejemplos.

Estructura química	Tipo
C_6	Fenol simple
C_6-C_1	Ácido fenólico Ácido benzoico
$(C_6-C_1)_n$	Taninos condensados
C_6-C_2	Ácido fenil acético
C_6-C_3	Ácido hidroxicinámico Cúmarinas
$(C_6-C_3)_2$	Lignanós
$C_6-C_1-C_6$	Benzofenonas Xantonas
$C_6-C_2-C_6$	Estilbenos
$C_6-C_3-C_6$	Flavonoides Chalconas
$(C_6-C_3-C_6)_n$	Proantocianinas (taninos $4 < n < 11$)

Fuente: García-Martínez et al., 2015

1.8 Radicales libres

Los agentes oxidantes o radicales libres son aquellas moléculas altamente reactivas las cuales se encuentran desapareadas en su último orbital, buscan principalmente captar electrones de otros radicales libres generando a su vez una reacción en cadena conocida como estrés oxidativo, lo cual empieza a producir una acumulación de especies reactivas de oxígeno (Tabla 5) y genera daños en la salud principalmente en el ADN, proteínas y lípidos (Watson et al.,2010).

Los radicales libres se generan fisiológicamente en el cuerpo humano como parte del metabolismo energético, pero la síntesis incrementa mediante diferentes agresiones como infecciones, ejercicio físico extremo, dietas desequilibradas, tóxicos alimentarios y contaminantes ambientales entre otros (Bohórquez-Fajardo et al. 2016). Son capaces de perjudicar, de forma reversible o irreversible, todo tipo de compuestos bioquímicos, incluyendo ácidos nucleicos, proteínas y aminoácidos libres, lípidos, carbohidratos y macromoléculas. Los ácidos grasos poli-insaturados son altamente sensibles al ataque de los radicales libres; éstos radicales pueden alterar la actividad celular, tanto a nivel de membranas como del metabolismo y expresión genética (Valaco et al. 2007).

Desde el punto de vista de la medicina, hay interés principalmente en dos radicales: el hidroxilo (OH^\bullet) y el radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$); estos pueden atacar y dañar casi cualquier molécula presente en el cuerpo. Son tan activos que, una vez formados solo transcurre una fracción de tiempo para reaccionar y formar un radical estable, pero inmediatamente la molécula atacada forma un nuevo radical libre (Festy, 2007).

Tabla 5. Especies reactivas de oxígeno.

Especies reactivas de oxígeno	origen
Oxígeno singlete (O_2)	Formado por exposición a la luz ultravioleta (UV).
Radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$)	Producido cuando la reducción de oxígeno molecular es incompleta en la cadena

	respiratoria mitocondrial y éste capta un electrón. Se elimina por el superóxido dismutasa.
Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)	Formado cuando el radical superóxido capta 2 protones. Es transformado en agua por las catalasas.
Radical hidroxilo (OH·)	Muy reactivo, ataca a las estructuras celulares en el lugar en el que se produce.
Óxido nítrico (ON)	Destruye células. También es un neurotransmisor.

Fuente: Diez-de la iglesia et al., 2018.

Las formas en la que actúa un radical libre en un sistema biológico, es por medio de los procesos oxidativos, cabe resaltar que la oxidación de moléculas biológicas no siempre es un proceso dañino. Hay algunas funciones fisiológicas, que dependen de la formación de productos oxidados, por ejemplo, los resultados de la oxidación lipídica enzimática en la formación de prostaglandinas biológicamente activas y otros compuestos biológicamente activos, etc. Sin embargo, una acumulación de radicales libres puede ser una causa de potentes efectos dañinos, y, por lo tanto, el organismo tiene que desarrollar fuertes sistemas de protección anti-radical; generalmente, estos sistemas se denominan sistemas antioxidantes (Yu, 2008).

1.9 Antioxidantes

El término antioxidante fue utilizado originalmente para referirse específicamente a un producto químico que previniera el consumo de oxígeno. A finales del siglo XIX y a principios de siglo XX, extensos estudios fueron dedicados a las aplicaciones de antioxidantes en importantes procesos industriales, tales como la prevención de la corrosión del metal, la vulcanización del caucho, y la polimerización de combustibles en la formación de escoria en motores de combustión interna (Matill et al., 1947).

Los antioxidantes son todas aquellas sustancias que hallándose en bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable (biomoléculas), retarda, inhibe o previene la oxidación de dicho sustrato; y desde el punto de vista biológico es: todo compuesto químico que protege los sistemas vivos de los agentes que causan deterioro oxidativo” (Halliwell & Gutteridge,2007). Los antioxidantes son ampliamente utilizados como ingredientes en suplementos dietéticos con la esperanza de mantener la salud y de prevenir enfermedades tales como el cáncer y la cardiopatía isquémica. Además de estas aplicaciones en medicina los antioxidantes tienen muchas aplicaciones industriales, tales como conservantes de alimentos, de cosméticos y la prevención de la degradación del caucho y la gasolina (Castro-Dantas et al., 2003; Huang et al., 2005; Zamora et al. 2007).

Existen muchas reacciones de oxidación; algunas son cruciales para el funcionamiento biológico y algunas otras pueden ser perjudiciales; es por eso por lo que las plantas y los animales mantienen múltiples tipos de antioxidantes, tales como glutatión, vitamina C, y vitamina E, así como enzimas tales como la catalasa, superóxido dismutasa y varias peroxidasas (Vickers et al., 2007). Al estrés oxidativo se le ha asociado la patogénesis de muchas enfermedades humanas, es por ello por lo que el uso de antioxidantes en farmacología es estudiado de forma intensiva, particularmente como tratamiento para accidentes cerebrovasculares y enfermedades neurodegenerativas (Sies et al.,1997).

1.9.1 Sistemas antioxidantes

Los sistemas antioxidantes, tienen aplicación directamente en el sistema fisiológico como protectores frente a radicales libres de diversas estructuras; como enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa, peroxidasa, etc.), antioxidantes endógenos de bajo peso molecular (glutatión, ácido úrico, etc.) y antioxidantes exógenos (Bohorquéz-Fajardo et al.,2016).

1.9.2 Clasificación de los antioxidantes

En la actualidad no existe una sola clasificación de antioxidantes debido a que varios de ellos tienen diferentes mecanismos de reacción, de acuerdo con la literatura se pueden clasificar en:

1.9.3 Clasificación según fuente de origen

En esta clasificación tenemos los antioxidantes naturales y los antioxidantes sintéticos. Los antioxidantes naturales se extraen de las plantas y animales. Entre ellos se destacan los carotenoides y los polifenoles; como los ácidos fenólicos, flavonoides, ácidos hidroxibenzoícos y ácidos hidroxicinámicos (Tsao et al., 2004). Por otro lado, los antioxidantes sintéticos los cuales en su mayoría son compuestos fenólicos con varios grupos alquilo, como el butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), ter-butil-hidroquinona (TBHQ) y propilgalato (PG); donde la estructura de este tipo de compuestos es lo que permite ceder un protón a un radical libre (Ramalho et al., 2006).

1.9.4 Clasificación según la acción en organismos vivos

Los organismos vivos han desarrollado varias estrategias de defensa celular contra los procesos en los que intervienen las especies reactivas de oxígeno (ERO's), mediante la acción de antioxidantes cuya actividad es ir disminuyéndolas con el paso del tiempo (Figura 8). En esta categoría los antioxidantes se agrupan en tres sistemas (Sánchez et al., 1998).

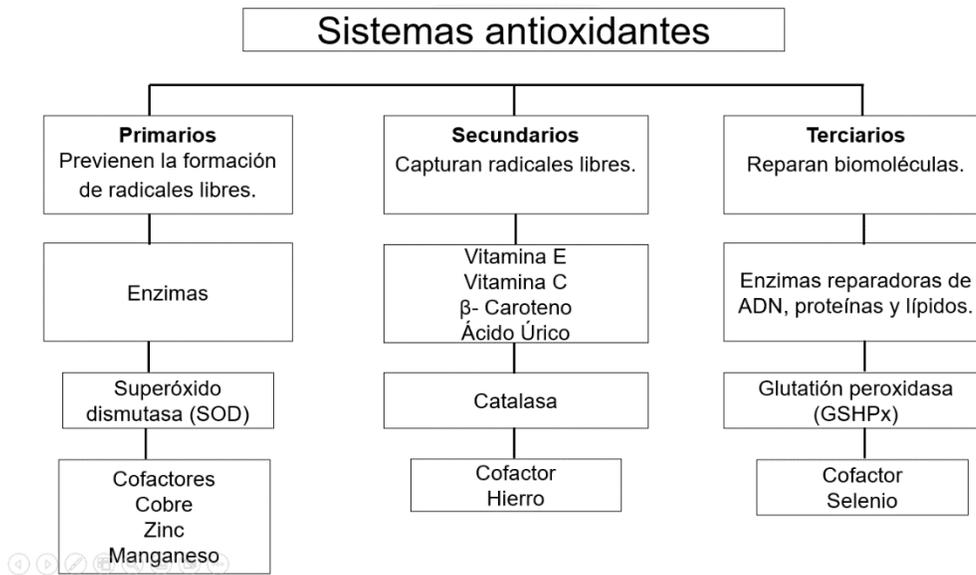


Figura 8. Clasificación de antioxidantes según la acción en organismos vivos (Fuente: Sánchez et al., 1998).

1.9.4.1 Antioxidantes primarios

Los antioxidantes primarios son aquellos que previenen la formación de nuevas especies reactivas de oxígeno (ERO's). Esto mediante la conversión de especies reactivas de oxígeno en moléculas menos perjudiciales, antes de que puedan reaccionar, o evitando su producción a partir de otras moléculas (Katalinic et al., 2005). En este grupo se encuentran las siguientes enzimas; Las glutación peroxidasa (GPx), son dos enzimas selenio dependientes puesto que este las mantiene activas (Cemeli et al., 2009). Para que ejerzan su acción desintoxicante por la reducción del H_2O_2 o los ROOH. El glutación peroxidasa (GPx) está ampliamente distribuido en los tejidos humanos y animales. Su forma reducida glutationa (GSH) dona electrones y se encuentra a concentraciones intracelulares a menudo en el rango milimolar. Las GPx son consideradas enzimas con mayor capacidad de remover peróxidos encontrados en el tejido humano (Katalinic et al., 2005).

La catalasa es una enzima que participa en el metabolismo del H_2O_2 , está presente en la mayoría de los órganos del cuerpo. Aunque su afinidad por el H_2O_2 es inferior a la que muestra la GPx, bajo condiciones de sobreproducción puede asumir el papel preponderante en la eliminación del H_2O_2 , esta enzima cataliza la reducción de H_2O_2 a O_2 y H_2O . A altas concentraciones de H_2O_2 , la catalasa tiene la capacidad de reducirlo, puesto que la catalasa requiere dos moléculas de H_2O_2 para llevar a cabo su reducción; por el contrario, a bajas concentraciones de H_2O_2 decrece su eficiencia (Cemeli et al., 2009).

Este grupo de antioxidantes primarios se completa con: el sistema de las tiorredoxinas, que incluye las tiorredoxinas y la tiorredoxina reductasa, las cuales resisten muchos procesos cruciales para la función celular, proliferación celular, defensa antioxidante y regulación redox (Arnér, 2009), las transferrinas, regulan la producción extracelular de hierro y así previenen la oxidación de los tejidos (Kim et al., 2008), la lactoferrina, la cual tiene la capacidad de capturar iones de hierro libre lo cual le confiere muchas propiedades de antioxidante (Mulder et al., 2008). La ferritina es una proteína cuya función es capturar el hierro libre intracelular que puede convertirse en tóxico para las células (Mackenzie et al., 2008), la ceruloplasmina y las albúminas representan el antioxidante más predominante presente en el plasma, el cual está expuesto a estrés oxidativo continuo (Roche et al., 2008).

1.9.4.2 Antioxidantes secundarios

Los antioxidantes secundarios son aquellos que capturan los radicales y evitan la formación de radicales en cadena. Ejemplos de este tipo de antioxidantes son la vitamina E, vitamina C, β -caroteno y algunas sustancias endógenas con actividad antioxidante, dentro de las cuales se encuentran la bilirrubina y ubiquinona (Doria et al., 2012). La vitamina C, mejor conocida como ácido ascórbico presenta muchas actividades biológicas en el cuerpo humano; se ha encontrado que esta puede reducir los niveles de proteína C-reactiva, un marcador de la inflamación y posiblemente un anunciador de enfermedades del corazón (Podsdek et al., 2007).

Por otro lado, la vitamina E, mejor conocida como tocoferol pertenece a los antioxidantes liposolubles, su actividad biológica incluye tocoferoles, tocotrienoles, especialmente α -tocoferol. La reacción predominante responsable de la actividad antioxidante del tocoferol es la donación de átomos de hidrógeno, donde se forma el radical tocoperóxil (Podsdek, et al., 2007).

1.9.4.3 Antioxidantes terciarios

Son los antioxidantes encargados de la reparación de biomoléculas dañadas. En este grupo se incluyen las enzimas endonucleasas apurinica/apirimidínica y polimerasa β , reparadoras del ADN y la metionina sulfóxido reductasa (Page et al., 2009). Juegan un papel muy importante previniendo o aliviando afecciones crónicas, incluyendo cáncer, alteraciones cardiovasculares, cataratas, arteriosclerosis, diabetes, asma, hepatitis, artritis e inmunodeficiencia (Siddhuraju et al., 2007). Estos antioxidantes reducen el daño oxidativo a los componentes celulares causados por las ERO's. En la actualidad el uso de los antioxidantes sintéticos en productos alimenticios está bajo estricta regulación, debido a la incertidumbre sobre su seguridad. Por esta razón hay un interés creciente en los antioxidantes naturales para atenuar el daño oxidativo, puesto que estos antioxidantes derivados de plantas funcionan como captadores de oxígeno singlete y triplete, eliminadores de peróxidos e inhibidores de enzimas (Choi, 2002; Jaitak et al., 2010).

1.9.5 Actividad antioxidante

Muchos autores emplean en la actualidad de manera indistinta el término "Actividad Antioxidante" o "Capacidad Antioxidante"; debido a que en la literatura se encuentran generalizados los términos como; capacidad, eficiencia, poder, parámetro y potencial (Huang et al., 2005). En ese sentido el término "Actividad Antioxidante" es usado para un ensayo individual y refleja únicamente la reactividad química bajo condiciones específicas aplicadas en el ensayo y es inapropiado generalizarlo como un indicador de la "actividad antioxidante total". En este caso

usamos "capacidad" cuando se refieren a los resultados obtenidos por diferentes ensayos, como "Capacidad secuestradora de radicales peróxido", "Capacidad secuestradora de superóxido", "Capacidad reductora del ión férrico", entre otros (Huang et al.,2005). Igualmente es importante distinguir entre capacidad antioxidante y reactividad. La capacidad antioxidante informa sobre la duración de la acción antioxidante, la reactividad caracteriza el inicio dinámico de la anti-oxidación a una determinada concentración de un antioxidante o mezcla antioxidante (Roginsky et al., 2005).

1.9.6 La vainillina como antioxidante

La vainillina presenta propiedades antioxidantes y puede emplearse como conservante alimentario (Anklam & Muller, 1997; Burri & Loliger, 1989; Davidson & Naidu, 2000). Es un componente clave en muchos productos lácteos, como la mantequilla, los helados y los productos de pastelería. La vainillina se ha encapsulado en goma arábica y en almidones modificados, como almidones oxidados preparados a partir de almidón de maíz y amaranto mediante el método de secado por atomización para evitar su degradación (Chattopadhyaya & Kulkarni, 1998). También Shyamala et al. (2007) reportaron que los extractos de vainilla (*V. planifolia*) poseen actividad antioxidante, en donde los compuestos 4-hidroxi-3-metoxibenzil alcohol y 4-hidroxibenzil alcohol exhiben mayor actividad antioxidante que la vainillina.

1.9.7 Métodos para determinar la capacidad antioxidante

En la actualidad, existe un interés creciente por la extracción y cuantificación de antioxidantes a partir de muestras biológicas, en la búsqueda de antioxidantes naturales y eficaces existen diferentes métodos tanto generales como específicos para erradicar los radicales libres en muestras biológicas y elucidar antioxidantes naturales eficaces para disminuir las complicaciones más comunes relacionados con los radicales libres. Para determinar la actividad antioxidante deben realizarse

una serie de ensayos (Tabla 6), debido a que un solo ensayo no es comparable debido ya que son diferentes reacciones químicas.

Tabla 6. Técnicas para medir actividad antioxidante.

Ensayo antioxidante	Principio del método	Determinación del producto final	Categoría
DPPH [•]	Reacción antioxidantes lipofílicos con un radical orgánico.	colorimétrico	Ensayos basados en la transferencia de electrones (ET)
ABTS ^{•+}	Reacción antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos con un radical orgánico.	colorimétrico	Ensayos basados en la transferencia de electrones (ET)
FRAP	Reacción antioxidante con un complejo Férrico (III).	colorimétrico	Ensayos basados en la transferencia de electrones (ET)
ORAC	Reacción antioxidante con radicales peroxilo inducidos por el AAPH.	Pérdida de fluorescencia de la fluoresceína.	Ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT)

DPPH[•]—2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; ABTS^{•+}—2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid); FRAP—Ferric reducing antioxidant power; PFRAP—Potassium ferricyanide antioxidant power; ORAC—Oxygen radical absorbance capacity. Fuente: (Moharram, 2014).

1.9.7.1 Método de Folin-Ciocalteu

Los compuestos a los que generalmente se les atribuyen actividades antioxidantes son a los compuestos fenólicos. Este ensayo es un método colorimétrico basado en reacciones de transferencia de un solo electrón entre el reactivo de Folin y los compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos son buenos secuestradores de radicales de oxígeno, ya que el potencial de reducción de electrones de los radicales fenólicos es menor que el de los radicales de oxígeno (Ainsworth et al., 2007). El ensayo Folin-Ciocalteu se emplea para expresar el contenido en compuestos fenólicos totales en productos vegetales. Se basa en que los compuestos fenólicos

reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu (Figura 9), a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm. Este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra (Sánchez et al., 2013). El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el medio ácido), de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es la que medimos para evaluar el contenido en polifenoles (García-Martínez et al., 2015).

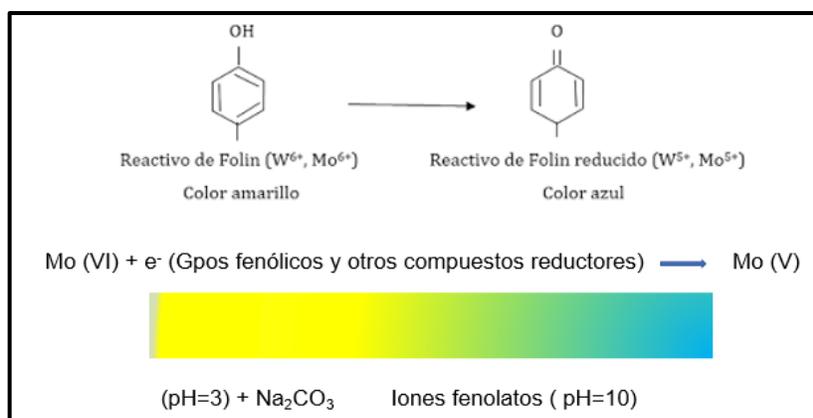


Figura 9. Reacción de Folin-Ciocalteu (Fuente: García-Martínez.; 2015).

El mecanismo de reacción es una reacción redox, por lo que además puede considerarse también, como un método de medida de la actividad antioxidante total. La oxidación de los polifenoles presentes en la muestra causa la aparición de una coloración azulada que presenta un máximo de absorción a 765 nm, y que se cuantifica por espectrofotometría en base a una recta patrón de ácido gálico. Se trata de un método preciso y sensible, que puede padecer numerosas variaciones, fundamentalmente en lo relativo a los volúmenes utilizados de la muestra a analizar, concentración de reactivos y tiempo de reacción. También se pueden presentar variaciones al expresar los resultados, sin embargo, el patrón recomendado es el ácido gálico. Este ensayo de análisis de los polifenoles totales se utiliza con frecuencia en el estudio de las propiedades antioxidantes de alimentos vegetales, como zumos de fruta, al tratarse de un parámetro que generalmente, muestra una

estrecha correlación con los diferentes métodos de medición de la actividad antioxidante (Kaur & Kapoor,2001; Pandey et al.,2009; Lacueva et al.,2010).

1.9.7.2 Ensayo de actividad antirradical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH[•])

Este método fue descubierto por primera vez por Goldschmidt & Renn en 1920. Y desarrollado por primera vez por Blois (1958) quién demostró por primera vez la capacidad del radical libre DPPH[•] para captar un átomo de hidrógeno (H⁺) proveniente de una molécula de cisteína (Foti et al.,2015). La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH[•]) es conocida como un radical libre estable debido principalmente a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo cual la molécula no se dimeriza, como es el caso de la mayoría de los radicales libres. La deslocalización del electrón también intensifica el color violeta intenso típico del radical (Figura 10), el cual absorbe en metanol a 517 nanómetros. Cuando la solución de DPPH[•] reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno, el color violeta se desvanece. El cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente y es utilizado para la determinación de los parámetros para las propiedades antioxidantes (Zengin et al.,2015; Bibisadeer et al.,2020).

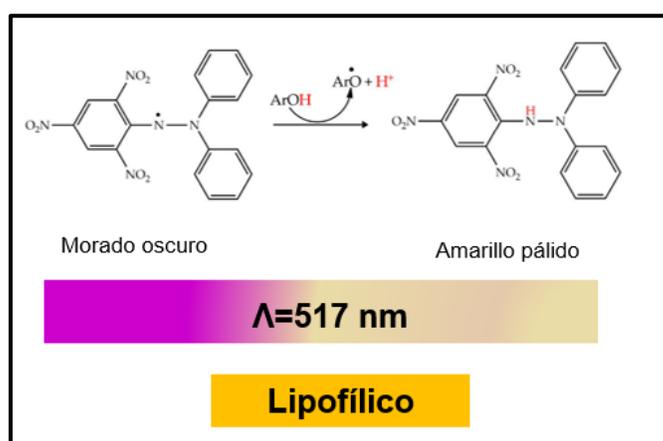


Figura 10. Reacción de DPPH[•] (Fuente: Bibisadeer et al.,2020).

Ventajas y limitaciones:

- simple, barato y rápido, ya que el radical es estable y no necesita generarse en comparación con el ABTS^{•+} (Kedare et al.,2014).
- Puede cuantificar antioxidantes en complejos sistemas biológicos (Kedare et al.,2014).
- El tiempo de eliminación de radicales es de 30 minutos, lo que permite que el DPPH[•] reaccione eficazmente, incluso con antioxidantes débiles (Kedare et al.,2014).
- Los resultados son reproducibles y comparables con otros métodos de eliminación de radicales (Gil et al.,2000).
- Eficaz para compuestos térmicamente inestables, ya que la eliminación de radicales se mide a temperatura ambiente (Bondet et al.,1997).
- Altamente sensible (Kim et al.,2002).
- Se indica una buena correlación con los compuestos bioactivos (fenoles, flavonoides) con un factor de regresión $R > 0,8$ (Kim et al.,2002).
- Los radicales cromógenos DPPH[•] sólo disuelven disolventes orgánicos (lipofílicos) (Kim et al.,2002).
- Dado que el centro de nitrógeno está muy obstaculizado estéricamente por tres grupos fenilo, el DPPH[•] representa un modelo deficiente para la extinción de radicales *in vivo* e *in vitro* (Gil et al.,2000).
- DPPH[•] no es el mejor método para la eliminación de radicales *in vivo* en muestras de alimentos (Schaich et al.,2015).
- El DPPH[•] es sensible a las bases de Lewis (Ancerewicz et al.,1998).
- Semejanza no fisiológica debido a la ausencia de radicales libres DPPH[•] en el cuerpo humano (Granato et al.,2018).

1.9.7.3 Ensayo de actividad antirradical 2,2 Azinobis(3ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS^{•+})

En 1993, Miller & Rice-Evans fueron los primeros en reportar sobre el ensayo ABTS^{•+}, también conocido como TEAC (Miller et al.,1993). Este ensayo fue

mejorado posteriormente por Re (1999). La mejora estaba relacionada con que en comparación con el DPPH[•], que es un radical estable por naturaleza, el radical ABTS^{•+} es un radical que debe generarse mediante reacciones químicas. Originalmente, la generación del radical catiónico (ABTS^{•+}) se realizaba haciendo reaccionar metilmioglobina (Met-Myb) con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) para producir un radical hidroxilo (HO[•]). Este último radical provoca la reducción de ABTS^{•+} en presencia o ausencia de antioxidantes (Miller et al.,1997; Re et al.,1999; Schaisch et al.,2015).

El mecanismo de acción del ABTS^{•+} consiste en que este radical es oxidado por radicales peróxido, por persulfato de potasio, peróxido de hidrógeno, peroxidasa de rabano u otro oxidante hasta formar el catión radical ABTS^{•+} (Re et al., 1999; Villano et al., 2004; Labrinea & Georgiu, 2004). El cual presenta un color verdeazulado (Figura 11), y en la medición los compuestos con capacidad antioxidante reaccionan directamente disminuyendo el color del catión radical ABTS^{•+}, los resultados obtenidos son expresados como porcentaje de inhibición y llevados a una concentración relativa de Trolox como referencia, es por ello por lo que el método se conoce como actividad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC). El radical catiónico posee solubilidad en medios tanto polares como apolares y no es afectado por la fuerza iónica, por lo cual, evalúa antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos de extractos de plantas y fluidos biológicos (Huang et al., 2005; Roginsky & Lissi, 2005; Prior et al., 2005).

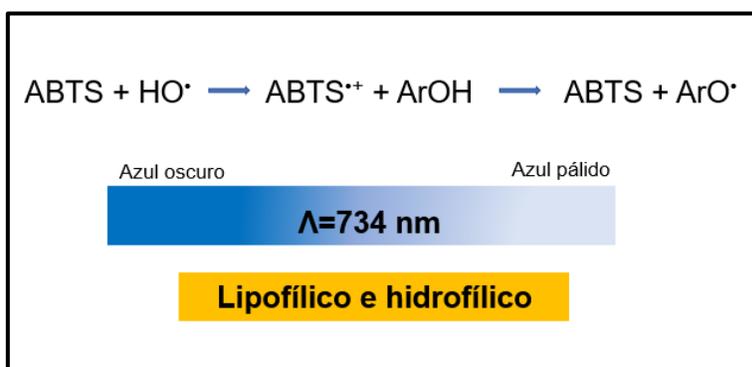


Figura 11. Reacción de ABTS^{•+} (Fuente: Bibisadeer et al.,2020).

La generación del radical $ABTS^{•+}$ constituye la base de uno de los métodos espectrofotométricos que han sido aplicados para medir la actividad antioxidante total de soluciones o sustancias puras y mezclas acuosas.

Ventajas y limitaciones:

- El radical catiónico $ABTS^{•+}$ es soluble tanto en medios orgánicos como acuosos, a diferencia del radical $DPPH^•$, que sólo disuelve en medios orgánicos. Por lo tanto, el ensayo $ABTS^{•+}$ puede utilizarse para analizar muestras tanto lipofílicas como hidrofílicas (Kim et al.,2002).
- Puede utilizarse para determinar la capacidad antioxidante de numerosos compuestos, específicamente carotenoides, compuestos fenólicos y plasmáticos (Re et al.,1999).
- El ensayo $ABTS^{•+}$ proporciona resultados reproducibles (Opitz et al.,2014).
- El radical es estable hasta más de dos días cuando se almacena en la oscuridad a temperatura ambiente en comparación con el $DPPH^•$, que tiene una vida bastante corta (Gupta, 2015).
- Suele mostrar una buena correlación con los compuestos bioactivos (fenoles y flavonoides), con un factor de regresión $R>0,8$.
- El ensayo $ABTS^{•+}$ es a menudo criticado porque el radical no existe de forma natural (no se encuentra en ningún sistema biológico) y debe generarse químicamente (Magalhães et al.,2008).

1.9.7.4 Ferric Ion Reducing Antioxidant Power (FRAP)

El poder antioxidante reductor de iones férricos o capacidad reductora férrica del plasma, abreviado como FRAP, fue desarrollado por Iris Benzie & Strain (1996). Este método se basa principalmente en la reducción de la tripiridiltriazina férrica $[Fe^{III}(TPTZ)]^{3+}$, formando un complejo ferroso de color azul intenso $[Fe^{II}(TPTZ)]^{2+}$ (Figura 12) en condiciones ácidas (pH 3,6). Este método se desarrolló de tal manera que pudiera llevarse a cabo en cualquier laboratorio debido a su simplicidad, alta

reproducibilidad y sencilla instrumentación (Benzie et al.,1996; Huang et al.,2005). Curiosamente, existe muy poca diferencia entre los métodos de ABTS^{•+} y FRAP, excepto que el ensayo ABTS^{•+} se realiza a pH neutro mientras que FRAP se lleva a cabo en condiciones ácidas (Huang et al.,2005).

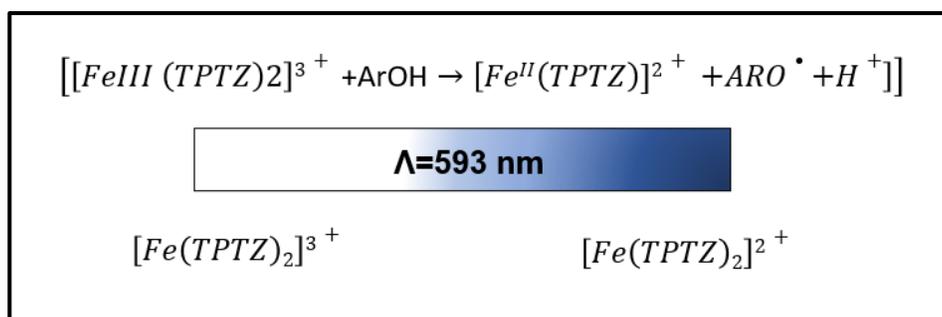


Figura 12. Reacción de FRAP (Fuente: Bibisadeer et al.,2020).

Sin embargo, este ensayo no es específico. Esto se debe a que si cualquier especie presente en la mezcla de reacción posee un potencial redox inferior al del Fe (III), esa especie será responsable de la reducción del complejo lo cual se reflejará en la lectura de la reacción lo que conduce a una subestimación (Benzie et al.,1996).

Ventajas y limitaciones:

- Instrumentación sencilla y barata (Berker et al.,2007).
- Altamente reproducible y sensible (Benzie et al.,1996).
- Puede analizar un amplio espectro de muestras biológicas, incluyendo plasma, sangre, suero, saliva, lágrimas, orina, líquido cefalorraquídeo, exudados, transudados, extractos acuosos y orgánicos de fármacos, alimentos y plantas (Benzie et al.,1999).
- No es específico (Benzie et al.,1996).

1.9.7.5 Oxigen Radical Absorbance Capacity (ORAC)

El "ensayo de capacidad de absorción de radicales de oxígeno" (ORAC) para la estimación de antioxidantes se introdujo por primera vez utilizando *b*-ficoeritrina como indicador fluorescente sensible de la eliminación de radicales peroxilo (Cao & Cutler, 1993). Posteriormente, Ou et al. (2001) introdujeron la fluoresceína como un indicador más fiable en el ensayo ORAC (López-Alarcón & Lissi, 2006). El ensayo ORAC se ha aplicado en gran medida a la evaluación de la capacidad de eliminación de radicales libres en el plasma humano, proteínas, el ADN, los compuestos antioxidantes puros y los extractos antioxidantes (Ou et al., 2001; Navindra et al., 2006; Roger et al., 2007).

En el ensayo ORAC, la pérdida de fluorescencia (Figura 13) es el indicador principal el cual muestra una fase de retardo, durante la cual la cinética se describe mediante la competencia entre la reacción del radical peroxilo con el indicador y el antioxidante (Huang & Prior, 2005). En el ensayo ORAC, la eficacia de un antioxidante se evalúa a partir del área bajo la curva de intensidad de fluorescencia frente al tiempo, lo que sugiere que se puede evaluar una estequiometría para la reacción de los radicales peroxilo con un compuesto específico, o que permite evaluar la capacidad antioxidante total de un compuesto alimentario (Bors et al., 1984). Las ventajas potenciales del ensayo ORAC sobre otros métodos incluyen el uso de radicales peroxilo como reactivos con potencial redox y mecanismo de reacción (es decir, átomo de hidrógeno realiza la transferencia de electrones) similares a los de los oxidantes fisiológicos mediante un mismo pH fisiológico para que los antioxidantes reaccionen con una carga global y un estado de protonación similar al del cuerpo humano (Foley et al., 1999; Ou et al., 2001; Huang et al., 2002).



Figura 13. Mecanismo de acción ensayo ORAC (Fuente: Bibisadeer et al., 2020).

Ventajas y limitaciones:

- Es un método preciso para evaluar la actividad antioxidante especialmente en especies reactivas de oxígeno/ nitrógeno (ROS/RON) las cuales tienen importancia biológica (Halliwell et al.,1991; Wink et al.,1991; Nguyen et al.,1992; Stadtman et al.,1994).
- La principal limitación de este método es el uso de la sonda del lector de placas lo cual produce inconsistencias entre un lote y otro lo que se traduce finalmente en una reactividad variable al radical peróxido (Cao et al.,1999).
- La sonda del equipo no es fotoestable, y tras exponerlo a la luz de excitación durante cierto tiempo, puede sufrir fotoblanqueo (Halliwell et al.,1991; Wink et al.,1991; Nguyen et al.,1992; Stadtman et al.,1994).
- Se ha observado también que la sonda interactúa con los polifenoles debido a la unión inespecífica a proteínas (Tanaka et al.,2001).

II. ANTECEDENTES

Atributos aromáticos

Pérez-Silva et al. (2011). Realizaron un estudio en el cual evaluaron el potencial aromático en vainas de vainilla (*Vanilla planifolia*) de México. Cuantificaron los compuestos libres y glucósidos totales durante un proceso de beneficiado tradicional de 90 días.

Brunschwig et al. (2015). Evaluaron la composición volátil y las propiedades sensoriales de *V. xtahitensis* de la Polinesia Francesa y de Papúa Nueva Guinea por GC-MS. Los resultados mostraron que *V. xtahitensis* de la Polinesia Francesa se caracterizó por un perfil sensorial con fuertes notas de anís y caramelo debido a los compuestos anísicos y la de Papúa Nueva Guinea con fuertes notas especiadas, afrutadas y de ron oscuro debidas al p-vinilguayacol, al p-cresol y a los ésteres.

Pérez-Silva et al. (2021). Evaluaron el potencial aromático de frutos verdes de vainilla de 30 accesiones diferentes obtenidas de 11 especies e híbridos donde cuantificaron glucovainillina y otras agliconas tras una hidrolisis enzimática por HPLC-UV. Los resultados mostraron entre todas las muestras analizadas, el mayor potencial de vainillina en un híbrido *V. planifolia* x *V. xtahitensis* (7,46%).

Actividad antioxidante

Shyamala et al. (2007). Evaluaron la actividad antioxidante de la vainillina en extractos hidroalcohólicos de vainilla (60%). El extracto se perfiló mediante HPLC, donde se identificaron y separaron los principales compuestos de interés, *p*-hidroxibencil alcohol, *p*-hidroxi-3 metoxibencil alcohol, *p*-hidroxibenzaldehído y vainillina.

Akihiro et al. (2010). Evaluaron la actividad antioxidante de la vainillina mediante diferentes ensayos; ABTS, DDPH, radical gavióxilo y un ensayo ORAC y OxHLIA.

Zhao et al. (2017). Evaluaron la actividad antioxidante de la vainillina, el *p*-metilguayacol y el *p*-etilguayacol, tres componentes bioactivos del Baijiu (licor chino) mediante ensayos de DPPH[•], ABTS^{•+}, ORAC. Los resultados demostraron que la vainillina, el *p*-metil guayacol y el *p*-etil guayacol ejercieron actividades antioxidantes similares, dependiendo de las dosis usadas.

III. JUSTIFICACIÓN

Las especies del género *Vanilla* con interés comercial son: *Vanilla planifolia*, *Vanilla xtahitensis*, *Vanilla pompona* y *Vanilla Cribbiana*. En México solo *Vanilla planifolia* y en menor proporción *Vanilla pompona* se comercializan, Sin embargo, debido al cambio climático, muchos de estos cultivos se han visto en riesgo e incluso algunos han llegado a perderse como consecuencia de este efecto. De acuerdo con la literatura, México fue el país que domesticó la vainilla y en la actualidad muchos estudios demuestran la amplia variedad genética e interesantes ejemplares que se encuentran dentro de este amplio género. Existen aparte de las especies comerciales otras que no presentan características aromáticas, pero pueden tener propiedades funcionales como antioxidantes que deben ser estudiadas. Algunas de estas especies de vainilla se encuentran en resguardo en el banco de conservación del germoplasma del género *Vanilla*, perteneciente al Instituto Tecnológico de Tuxtepec. Por lo cual, el conocimiento científico generado de las características físicas, aromáticas y capacidad antioxidante de la vainilla de diferentes especies, permitirá comprender el uso que estas nuevas especies puedan tener en la industria de los alimentos.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar el contenido de fenoles volátiles, polifenoles totales y capacidad antioxidante de vainilla de diferentes especies.

4.2 Objetivos específicos

- Evaluar las características físicas (contenido de humedad, talla y peso) de muestras de vainilla de diferentes especies.
- Identificar y cuantificar los fenoles volátiles por HPLC-DAD de las diferentes muestras de vainilla.
- Evaluar el contenido de polifenoles totales en las muestras de vainilla de diferentes especies.
- Evaluar la capacidad antioxidante por los métodos de DPPH[•], ABTS^{•+}, FRAP y ORAC de muestras de vainilla

V. MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente trabajo se utilizaron vainas beneficiadas de vainilla de diferentes especies: *V. planifolia*, *V. pompona*, *V. xtahitensis*, *V. cribbiana*, *V. híbrido*, *V. insignis*, *V. mexicana* y *V. sp.* Las muestras de vainilla fueron provenientes de Veracruz, Oaxaca, Chiapas y Puebla (México), Guatemala y Costa Rica, según se detalla en la tabla 7.



Figura 14. Materia prima (Fuente: Autor).

Tabla 7. Descripción del origen y tipo de beneficiado de las muestras estudiadas.

Nº	Especie	Origen	Tipo de beneficiado	Año
1	<i>V. planifolia</i>	Loma San Rafael, Valle Nacional, Oaxaca.	tradicional	2020-2021
2		Atzala, Puebla.	tradicional	2020-2021
3		Santa María Chinchina, Oaxaca.	tradicional	2020-2021
4		Santa María Chinchina, Oaxaca.	tecnificado	2018
5		Mazin grande, San Lucas Ojitlán, Oaxaca.	tecnificado	2018
6	<i>V. pompona</i>	María Lombardo de caso, Oaxaca.	tradicional	2020-2021
7		Gutiérrez Zamora, Veracruz	tradicional	2020-2021
8		Santa Cruz Itundujia, Oaxaca.	tradicional	2020-2021
9	<i>V. cribbiana</i>	Coban, Alta Verapaz, Guatemala.	tradicional	2020-2021
10	<i>V. xtahitensis</i>	Coban, Alta Verapaz, Guatemala.	tradicional	2020-2021
11	<i>V. sp. 1</i>	Chumcerro, Chiapas	tradicional	2020-2021
12	<i>V. insignis</i>	La Florida, Oaxaca	tradicional	2020-2021
13	<i>V. mexicana</i>	Loma San Rafael, Valle Nacional, Oaxaca.	tradicional	2020-2021

14	<i>V. híbrido</i>	BA1901, BA1902, BA1903, BA1904 Costa Rica.	tradicional	2020-2021
----	-------------------	---	-------------	-----------

5.1 Caracterización física de vainas beneficiadas de vainilla

Para la caracterización física de las vainas se procedió a medir la longitud de cada una de las vainas con una regla, la talla con ayuda de un vernier de la marca Luzeren y peso de cada una de las vainas en una balanza digital de la marca OHAUS como se muestra en la figura 15.



Figura 15. Caracterización física de las muestras estudiadas (Fuente: Autor).

5.2 Determinación de humedad

El contenido de humedad se determinó de cada una de las muestras de vainilla, seleccionando y cortando la parte central de cada una de las diferentes muestras, las cuales se registró el peso inicial y se dejaron 24 h en una estufa BINDER a 105° C de acuerdo con la AOAC, 2012 (Figura 16).



Figura 16. Determinación de humedad de las muestras estudiadas (Fuente: Autor).

5.3 Elaboración de extractos de vainilla para HPLC-DAD

Los extractos se elaboraron a partir de la pulverización de las muestras de vainilla en un molino de café de la marca KRUPS, una vez obtenidos los polvos se pesaron 300 mg y se llevaron a una extracción orgánica con metanol-agua acidificada (30:70) H_3PO_4 10^{-2} M en baño ultrasónico a 30 kHz durante 10 minutos a temperatura ambiente (Figura 17). Posteriormente, los extractos se filtraron con papel Whatman N° 4 y finalmente se volvieron a filtrar en un filtro de $0,45\mu\text{m}$ para su almacenamiento en viales hasta el análisis por HPLC-DAD (Pérez-Silva et al.,2011).



Figura 17. Elaboración de extractos de las muestras estudiadas (Fuente: Autor).

5.4 Cuantificación de Fenoles volátiles por HPLC-DAD

En todas las muestras se identificaron y cuantificaron los siguientes compuestos: glucovainillina, vainillina, *p*-hidroxibenzaldehído, ácido vainillínico y ácido *p*-hidroxibenzaldehído, vainillil alcohol, anisil alcohol, *p*-hidroxibenzil alcohol y anisaldehído. Para lo cual se empleó un cromatógrafo de líquidos de la marca Agilent Technologies modelo 260 Infinity II Quaternary System (Figura 18), equipado con una bomba cuaternaria G7111B, detector de arreglo de diodos (DAD) G7117C y auto muestreador G7129A. La columna cromatográfica empleada fue una Zorbax ECLIPSE XDB-C18 analítica, de 4,6 × 250 mm y 5 μ m de tamaño de partícula, a una temperatura isocrática de 40 °C, utilizando como fase móvil agua, metanol y agua acidificada a 10 mMol, con un flujo 1 mL/min, volumen de inyección 10 μ L y longitud de onda 230,254 y 280 nm, según las condiciones descritas en la tabla 8.



Figura 18. HPLC-DAD/ ITTUX (Fuente: Autor).

5.4.1 Condiciones cromatográficas

Tabla 8. Condiciones cromatográficas para el análisis por HPLC-DAD de muestras de vainilla.

Tiempo (Min)	Flujo (mL/min)	Fases móviles		
		Agua	Metanol	Agua acidificada (100 Mmolar).
0	1.5	71%	19%	10%
3	2	71%	19%	10%
9	2	71%	19%	10%
15	2	55%	35%	10%
18	2	51%	39%	10%
21	2	48%	42%	10%

Fuente: Pérez-Silva et al.,2022.

5.5 Cuantificación de Polifenoles Totales por el método de Folin-Ciocalteu

El contenido de polifenoles totales se determinó por el método Folin-Ciocalteu reportado por Chumark et al. (2008). Se evaluó la reacción con 500 μ L de extracto de vainilla en un matraz volumétrico de 25 mL, a los cuales se añadieron 500 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu y se dejaron reaccionar por 3 minutos en la oscuridad, una vez transcurrido el tiempo de la reacción se añaden 10 mL de solución de carbonato de sodio (70 g/L) posteriormente se afora con agua destilada agua y finalmente fueron mezclados vigorosamente por 10 segundos. La reacción se mantuvo en oscuridad durante 1 h a 25 ± 1 °C. La absorbancia se registró a 750 nm en un espectrofotómetro de la marga AGILENT 60 carry UV-Vis (Figura 19). El Contenido total de polifenoles se expresó como equivalentes de ácido gálico en gramos por 100 g de materia seca (g EAG/100 g ms). La curva de calibración se realizó con una solución madre de ácido gálico (2000 ppm) con el disolvente de extracción, que se diluyó para dar 10, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 ppm.



Figura 19. Cuantificación de Polifenoles totales (Fuente: Autor).

5.6 Ensayo de actividad antirradical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH[•])

La actividad antioxidante de los extractos de vainas beneficiada de vainilla de diferentes especies sobre radicales DPPH[•] se midió en términos de capacidad de donación de hidrógeno o de eliminación de radicales de acuerdo con el método descrito por Siddhuraju y Becker (2003). Se añadieron 0.1 mL de extracto a 3.9 mL de solución metanólica de DPPH[•] (0.025 g·L). La mezcla se dejó incubar en oscuridad durante 90 min a 25 ± 1 °C. La disminución en la absorbancia a 517 nm se determinó con un espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific, Mod. Genesys 10S; Waltham, MA, EE. UU.). La solución de referencia se preparó con 0.1 mL del disolvente de extracción y 3.9 mL de solución de DPPH (Figura 20). Los resultados se expresaron como equivalentes de Trolox (ET) en gramos por 100 g de materia seca (g ET/100 g ms). La curva de calibración se realizó con una solución madre de Trolox (1 mg·mL) con el disolvente de extracción, que se diluyó para dar 0.200, 0.100, 0.050, 0.025 y 0.010 mg·mL⁻¹.

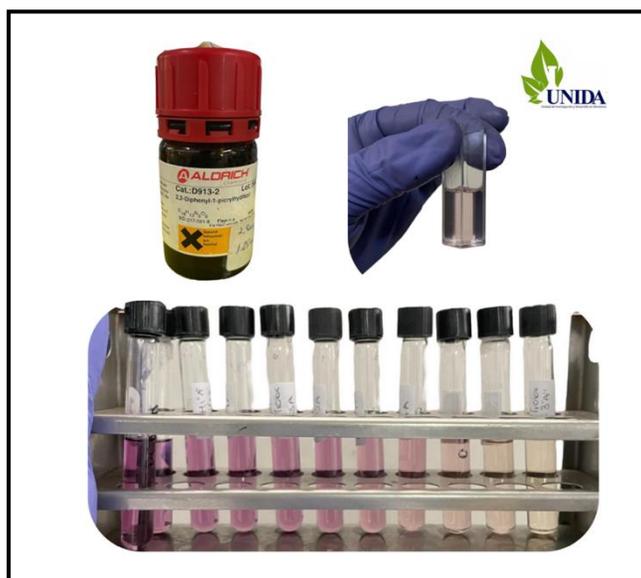


Figura 20. Determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH[•] (Fuente: Autor).

5.7 Ensayo de actividad antirradical 2,2Azinobis (3ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS^{•+})

La actividad de captación de radicales ABTS^{•+} del extracto de vainas beneficiadas de vainilla de diferentes especies se determinó de acuerdo con el procedimiento descrito previamente por Re et al. (1999). Para la formación del catión radical ABTS (ABTS^{•+}), a una solución acuosa de persulfato de potasio (0.0066 g en 5 mL) se adicionó una solución de ABTS^{•+} (0.0384 g en 5 mL de agua) y se dejó en oscuridad durante 16 h a 25 ± 1 °C. Esta solución se diluyó con etanol absoluto para generar una absorbancia de 0.70 ± 0.05 a 734 nm, generalmente en una proporción ABTS^{•+}: etanol absoluto de 1:100. La mezcla de reacción final (1 mL) se preparó a partir de 980 μ L de la solución etanólica de ABTS^{•+} y 20 μ L de la muestra. Esta mezcla de reacción se agitó en vórtex durante 10 s, y después de 7 min, la absorbancia se registró a 734 nm usando un espectrofotómetro UV-Vis (Figura 21). La solución de referencia se obtuvo añadiendo 20 μ L del disolvente de extracción en lugar del extracto. Los resultados se expresaron como equivalentes de Trolox (ET) en gramos por 100 g de base seca (g ET/100 g b.s.). La curva de calibración se realizó con una solución madre de Trolox (1 mg·mL⁻¹) con el disolvente de extracción, que se diluyó para dar 0.200, 0.100, 0.050, 0.025 y 0.010 mg·mL⁻¹.



Figura 21. Determinación de la actividad antioxidante por el método de ABTS^{•+} (Fuente: Autor).

5.8 Ferric Ion Reducing Antioxidant Power (FRAP)

Para la reacción de FRAP se colocan 2.5 mL de reactivo FRAP en un tubo de ensaye y se hacen reaccionar con 83µl del sobrenadante de la muestra. Posteriormente se agita en un vortex durante 10 segundos. La reacción se leyó en un espectrofotómetro PERKINELMER lambda 25 a 593 nm (Figura 22). Se toma el valor de la absorbancia final y se determinan los equivalentes de Fe haciendo la curva con FeSO₄ (para el Fe²⁺) de 0 a 1000µM.

- A. Buffer acetato 300mM
- B. Reactivo TPTZ: TPTZ (PM 312.3) 10mM en HCl (PM 36.5) 40Mm.
- C. FeCl₃.6H₂O: solución 20mM en agua (PM 270.3 pureza 98%)

Para la elaboración del reactivo FRAP: Se mezcla A, B y C en proporción 10:1:1

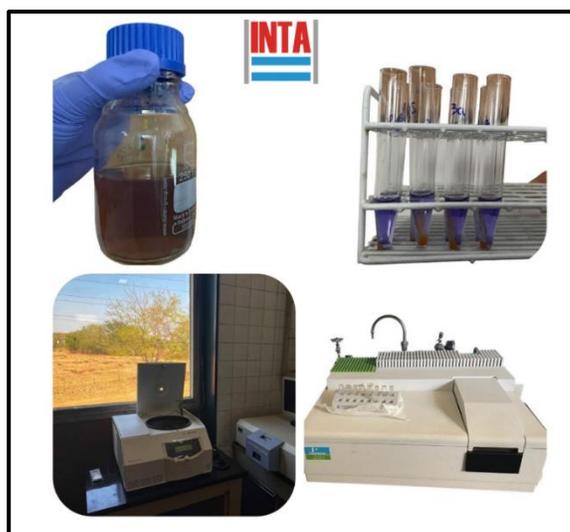


Figura 22. Determinación de la actividad antioxidante por el método de FRAP (Fuente: Autor).

5.9 Oxigen Radical Absorbance Capacity (ORAC)

El mecanismo de reacción consistió en medir 30 μL de muestra, 5 μL del tampón fosfato (75 mM, pH 7,4) y 180 μL FL (48 nM) a los pocillos del lector de placas negras como se muestra en la figura 23. Posteriormente se acomodan y se programa la secuencia de las muestras en el equipo “BioTek Synergy HTX Multimode Reader” en sus respectivas posiciones del rotor de cubetas. Una vez lista la secuencia se gira el rotor, se mezclan los reactivos y se incubaron a 37 °C durante 30 s antes de registrar la fluorescencia inicial (f_0). Se tomaron lecturas de fluorescencia a los 0,5 s y, a continuación, cada minuto (f_1 , f_2 , f_3 , ...) durante 45 min. Una vez terminada la incubación se agregan 30 μL del reactivo AAPH y se realizó el análisis durante 10 min. La fluoresceína y el AAPH se prepararon con tampón fosfato 75 mM a pH 7,4. La solución de trabajo de fluoresceína se preincubó a 37 °C durante 15 minutos antes de cargarla en la gradilla de pocillos.



Figura 23. Determinación de la actividad antioxidante por el método de ORAC (Fuente: Autor).

Los valores ORAC finales se calcularon utilizando una ecuación de regresión entre la concentración de Trolox y el área neta bajo la curva de decaimiento de la

fluoresceína y se expresaron tanto en porcentaje de inhibición como equivalentes de Trolox en micro moles por litro o por gramo.

$$AUC=1+ f_1/f_0+f_2/f_0+f_3/f_0+f_4/f_0+\dots+f_{34}/f_0+f_{35}/f_0$$

VI. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANDEVA) de una vía y se empleó el programa estadístico STATISTICA versión 10. las diferencias entre las medias de los tratamientos se compararán con la prueba de Fisher ($p<0.05$).

VII. RESULTADOS



7.1 Caracterización física de las muestras de vainilla de diferentes especies

Todas las muestras fueron clasificadas de acuerdo con la especie correspondiente para una mejor interpretación de los resultados como se muestra en la tabla 9.

Con respecto a *Vanilla planifolia* se obtuvieron muestras de los estados de Oaxaca y Puebla, proveniente de 2 tipos de beneficiado. Las muestras de *Vanilla pompona* fueron obtenidas de los estados de Veracruz y Oaxaca. Las muestras de *Vanilla híbrido* (*V.planifolia* x *V.pompona*) fueron enviadas de 4 comunidades de Costa Rica. *Vanilla xtahitensis* y *Vanilla cribbiana* fueron enviadas de la finca Rápidos Che'Sib'ik ubicada en Cobán Alta Verapaz, Guatemala. Las muestras no aromáticas fueron obtenidas del estado de Oaxaca y finalmente la muestra de *Vanilla sp* fue obtenida del estado de Chiapas.

Los resultados mostraron que de las muestras de *Vanilla planifolia* las longitudes de las vainas oscilaron entre 17 y 20 cm, con grosor de 5 a 9 mm, peso de las vainas de 5-9 g y contenidos de humedad entre 11 a 48%, siendo las vainas de Loma San Rafael Oaxaca (VPLLSR), las de mayor longitud, grosor, peso y humedad de todas las muestras correspondientes a la especie de *Vanilla planifolia*. Los resultados obtenidos de las muestras de *Vanilla planifolia* son comparables con la NMX-FF-074-SCFI-2009 es decir, que los contenidos de humedad y características físicas de las vainas nos permite clasificarlas como vainas ordinarias de categoría 1 en base a estos parámetros. Sin embargo, los resultados de la caracterización de las otras especies no permiten ser comparados o referenciados con esta norma debido a no pertenecer a la especie *Vanilla planifolia*.

Por otro lado, respecto a las muestras de *Vanilla pompona* se obtuvieron vainas de 11 a 12 cm de largo con grosores de 12 a 24 mm, peso de 4 a 8 g y contenidos de humedad de 36 a 51 %, siendo las vainas de maría lombardo, Oaxaca (VPMMLLO) las de mayor longitud, grosor y peso de todas las muestras correspondientes a *Vanilla pompona*.

Respecto a las muestras de *Vanilla híbrido* los tamaños de las vainas oscilaron de 18 a 23 cm, grosor de 7 a 10 mm, peso de las vainas de 3 a 9 g y los contenidos de humedad de 10 a 14 %, siendo las vainas del lote numero 4 (VH04) las vainas de mayor longitud, peso, grosor y contenido de humedad provenientes de Costa Rica

Las vainas de *Vanilla xtahitensis* (VXTGT) mostraron longitudes de 14 cm, grosor de 6mm, peso de 2 g y contenido de humedad de 33% provenientes de Guatemala. Las vainas de *Vanilla cribbiana* (VCBB19) mostraron longitudes de 14 cm, grosor de 14 mm, peso de 9 g y contenido de humedad de 30% provenientes de Guatemala. Las vainas inodoras tuvieron longitudes de 14 a 16 cm, grosor de 6 a 7 mm, peso de las vainas de 1 a 3 g, con contenidos de humedad de 11 a 27%, siendo las vainas de mayor tamaño las de *Vanilla mexicana* (VMX). Finalmente, las muestras de *Vanilla sp* mostraron longitudes de 16 cm, grosor de 6 mm, peso de las vainas de 3 g y contenidos de humedad de 56%.

Tabla 9. Caracterización física de vainas de vainilla de diferentes especies.

Especie	Código	Longitud (cm)	Grosor (mm)	Peso (g)	Humedad (%)
<i>V. planifolia</i>	VPLLSR	20 ^{Abc}	6 ^{BCfgh}	6 ^{BCfgh}	48 ^{Ac}
	VPLBTCH	17 ^{Cfg}	9 ^{Ad}	9 ^{Ad}	11 ^{Dkl}
	VPLPU	19 ^{Bcd}	6 ^{Bfg}	6 ^{Bfg}	22 ^{Ci}
	VPLCH22	20 ^{Ab}	5 ^{Ch}	5 ^{Ch}	36 ^{Be}
<i>V.pompona</i>	VPMVEG	11 ^{Aj}	12 ^{Bc}	4 ^{Ac}	51 ^{Ae}
	VPMMLLO	12 ^{Aj}	24 ^{Aa}	8 ^{Aa}	39 ^{Bd}
	VPMSCI	11 ^{Aj}	14 ^{Bb}	6 ^{Ab}	36 ^{Be}
<i>V. híbrido</i>	VH01	18 ^{Bde}	7 ^{Bef}	3 ^{Bc}	10 ^{Cl}
	VH02	19 ^{Bcde}	6 ^{Befgh}	3 ^{Bc}	13 ^{Bjk}
	VH03	18 ^{Bef}	8 ^{Abde}	4 ^{Bc}	12 ^{Bjk}
	VH04	23 ^{Aa}	10 ^{Acd}	9 ^{Aa}	14 ^{Aj}

<i>V. xtahitensis</i>	VXTGT	14 ⁱ	6 ^{fg}	2 ^{de}	33 ^f
<i>V. cribbiana</i>	VCBB19	14 ^j	14 ^f	9 ^a	30 ^g
<i>V. insignis</i>	VI22	14 ^{Ahi}	7 ^{Adefg}	3 ^{Acdd}	27 ^{Ah}
<i>Vanilla mexicana</i>	VMX	16 ^{Agh}	6 ^{Agh}	1 ^{Bfg}	11 ^{Bkl}
<i>V. sp</i>	VSPCH	16 ^{fg}	6 ^{fg}	3 ^c	56 ^a

Promedio de 10 determinaciones. Las letras en mayúscula diferentes indican diferencias significativas entre las muestras de la misma especie. Las letras en minúscula diferentes indican diferencias significativas entre todas las especies, Fisher $p < 0.05$.

7.2 Determinación de fenoles volátiles

Para la determinación y cuantificación de fenoles volátiles se cuantificaron 9 compuestos: ácido p-hidroxibenzoico, ácido vainillínico, p-hidroxibenzaldehído, vainillina, vainillil alcohol, p-hidroxibencil alcohol, anisil alcohol, ácido anísico, anisaldehído y glucovainillina que aunque no es un compuesto aromático es un factor importante que nos demuestra cómo se llevó a cabo el beneficiado de la vainilla ya que en condiciones idóneas no debería estar presente en vainas beneficiadas de vainilla.

7.2.1 Cuantificación de vainillina

Los contenidos de vainillina de vainilla y el potencial en vainillina de las muestras evaluadas se encuentran descritos en la tabla 10 y en la figura 24. En las vainas de *Vanilla planifolia*, los contenidos de vainillina oscilaron entre 1.92 a 2.75 g/100 g b.s. Siendo el valor menor identificado en muestras de la comunidad de Loma San Rafael (VPLLSR), Oaxaca, y el más alto se identificó en las muestras del estado de Puebla (VPLPU). De acuerdo con el contenido de vainillina, tres de las muestras pueden ser clasificadas dentro de la categoría gourmet, según la norma NMX-FF-074- 2009. Es importante mencionar que todas las muestras analizadas de *Vanilla planifolia* presentaron contenidos de vainillina mayores a lo reportado por Pérez-Silva et al (2006).

Por otro lado, respecto a *Vanilla pompona* los contenidos de vainillina oscilaron entre 0.02 a 0.04 g/100 g b.s. El valor más alto fue detectado en las muestras de María lombardo, Oaxaca (VPMML0) y Santa Cruz Itundujia, Oaxaca (VPMSCI). El menor contenido de vainillina se determinó en la muestra de Gutiérrez-Zamora, Veracruz. Sin embargo, los contenidos de vainillina en esta especie son menores a los reportados por Ehlers & Pfister, (1997). Estas diferencias pueden deberse principalmente al lugar de origen, madurez de las muestras e incluso al tipo de beneficiado al que fueron sometidas ambas muestras. Por otro lado, Maruenda et al. (2013) en un estudio realizado reportan contenidos de glucovainillina que oscilan entre 5 a 9 g/100 g b.s. en los frutos maduros de *V. pompona* var. *grandiflora*, lo cual indica que es la variedad de *V. pompona* con un alto contenido del precursor glucosilado.

Respecto a *Vanilla híbrido*, los contenidos de vainillina fueron de 0.75 y 3.27 g/100 g b.s. Detectando el menor contenido de vainillina en la muestra VH03 y el mayor se detectó en la muestra VH02 de Costa Rica. Esto indica que el contenido de vainillina de la muestra VH02 fue mayor (3.27 g/100 g b.s.) que el determinado en las muestras de *Vanilla planifolia* en estudio. Estas diferencias se pueden a dos aspectos: al mejoramiento genético realizado particularmente para generar este híbrido y a la madurez de los frutos al momento de ser beneficiados. Este último aspecto tiene un efecto crucial en la calidad aromática, como se demuestra en los resultados del resto de los lotes, los cuales poseen un bajo contenido de vainillina debido a los frutos inmaduros al momento de su beneficiado.

Los contenidos de vainillina en *Vanilla xtahitensis* de Guatemala (VXTGT) evaluados en las vainas del presente estudio fue de 1.4 g/100 g b.s. Este contenido está dentro de lo publicado por Brunschwig et al (2011) (1-2 g/100 g b.s). Contenidos similares se encontraron en *Vanilla cribbiana* (VCBB19) 1.4 g/100 g b.s. Este compuesto fue el más abundante en esta especie como se muestra en la tabla 8. Valores similares fueron reportados por Pérez-Silva et al., 2020 en muestras del mismo lugar de origen que las que fueron empleadas en este estudio, pero de diferente año de cosecha. Sin embargo, este valor es menor a los de *Vanilla*

planifolia reportados por Pérez-Silva et al. (2006), Pérez-Silva et al. (2011) y Zhang et al. (2014). Por otro lado, cabe mencionar que los contenidos de vainillina en esta especie son mayores a los contenidos de vainillina en muestras de *Vanilla pompona* reportados por Ehlers & Pfister (1997).

Por otro lado, en las muestras de vainilla no aromáticas, *Vanilla insignis* y *Vanilla mexicana*, los contenidos de vainillina fueron 0.07 y 0.08 g/100 g b.s., respectivamente. Siendo, estos contenidos de vainillina insuficientes para otorgarles propiedades aromáticas.

Finalmente, en la muestra de *Vanilla sp* proveniente del estado de Chiapas, México (VSPCH) presentó un contenido de vainillina de 7.16 g/100 g b.s. Siendo, el mayor contenido determinado en las muestras analizadas en el presente estudio y reportado en la literatura (Figura 24).

El mayor potencial en vainillina determinado en este estudio se cuantificó en la muestra de *Vanilla sp* (9.02 g/100 g b.s.). Este valor es superior a cualquier valor reportado hasta ahora en muestras de vainilla (Pérez-Silva et al, 2006; Sinha et al., 2008; Pérez-Silva et al., 2011; Zhang et al. 2012).

Tabla 10. Contenido de Vainillina y potencial aromático de las muestras de vainilla de diferentes especies.

Especie	Código	Vainillina ligada g/100 g b.s.	Vainillina g/100 g b.s.	Potencial vainillina g/100 g b.s.
<i>V. planifolia</i>	VPLLSR	0.07 ^f	1.92 ^f	1.99
	VPLBTCH	0.14 ^{cd}	2.14 ^{de}	2.28
	VPLPU	0.11 ^e	2.75 ^c	2.86
	VPLBTMG	0.10 ^e	2.48 ^d	2.58
	VPLCH22	0.17 ^b	2.31 ^{cde}	2.48
<i>V. pompona</i>	VPMVEG	---	0.02 ^j	0.02

	VPMMLO	---	0.04 ^j	0.04
	VPMSCI	---	0.04 ^j	0.04
<i>V. híbrido</i>	VH01	0.05 ^g	0.99 ^h	1.04
	VH02	0.05 ^g	3.27 ^b	3.32
	VH03	0.07 ^f	0.75 ⁱ	0.82
	VH04	0.14 ^d	1.8 ^f	1.94
<i>V. xtahitensis</i>	VXTGT	0.15 ^c	1.4 ^g	1.55
<i>V. cribbiana</i>	VCBB19	0.05 ^g	1.45 ^g	1.5
<i>V. insignis</i>	VI22	---	0.07 ^j	0.07
<i>V. mexicana</i>	VMX	---	0.08 ^j	0.08
<i>V. sp</i>	VSPCH	1.86 ^a	7.16 ^a	9.02

Promedio de tres determinaciones, las letras diferentes en la misma fila en minúsculas indican diferencias entre todas las muestras Fisher ($p>0.05$).

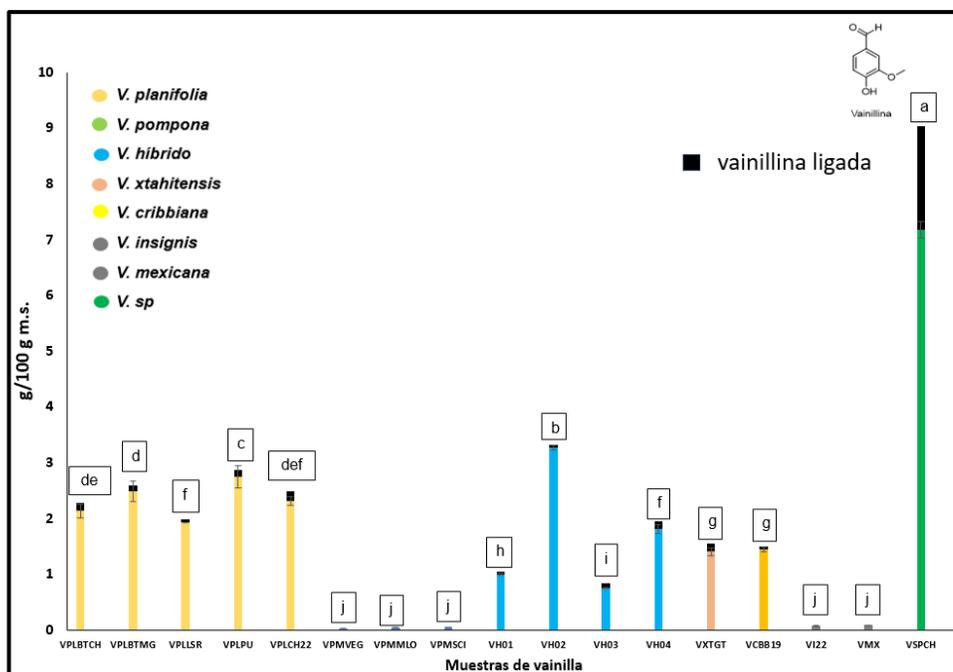


Figura 24. Determinación de vainillina y potencial en vainillina en muestras de vainillas de diferentes especies (Fuente: Autor).

7.2.2 Cuantificación de ácido vainillínico

El segundo compuesto más abundante en muestras evaluadas en este estudio de vainilla fue el ácido vainillínico como se observa en la tabla 11.

Respecto al contenido de ácido vainillínico en las muestras de *Vanilla planifolia* fue de 0.11 g/100 g b.s a 0.19 g/100 g b.s. Siendo, en la muestra de la comunidad de Loma San Rafael (VPLLSR) el menor valor identificado y el más alto se identificó en la muestra del estado de Puebla (VPLPU). Es importante mencionar que estos contenidos a su vez son mayores a lo reportado por Pérez-Silva et al. (2011), Gassenmeier et al., (2008) para las vainas de Indonesia (0.097 g/100 g b.s.), Uganda (0.10 g/100 g b.s.), India (0.143 g/100 g b.s.) en muestras beneficiadas de *Vanilla planifolia*, pero de diferente cosecha. Por otro lado, respecto a *Vanilla* híbrido los contenidos de ácido vainillínico oscilaron de 0.09 g/100 g b.s. a 0.19 g/100 g b.s. Siendo el valor mayor registrado en la muestra de *Vanilla* híbrido (VH02) y el menor fue el de *Vanilla* híbrido (VH01). Estos valores a su vez son similares a lo reportado por Pérez-Silva et al. (2011), Gassenmeier et al., (2008) para las vainas de Indonesia (0.097 g/100 g b.s.), Uganda (0.10 g/100 g b.s.), India (0.143 g/100 g b.s.), pero para vainas de *Vanilla planifolia*. Los contenidos de ácido vainillínico en *Vanilla xtahitensis* fue de 0.06 g/100 g b.s (VXTGT), los cuales son menores a los datos obtenidos en esta investigación para muestras de *Vanilla planifolia* y *Vanilla* híbrido.

En la muestra de *Vanilla cribbiana* los contenidos de ácido vainillínico fueron de 0.10 g/100 g b.s. los cuales son mayor a los reportados por Pérez-Silva et al. (2021) en vainas de *Vanilla cribbiana* del mismo lugar de origen, pero de diferente cosecha. Y finalmente el contenido de ácido vainillínico en la muestra de *Vanilla sp* fue de 0.11 g/100 g b.s. lo cual es mayor a lo reportado por Pérez-Silva et al. (2011), Gassenmeier et al. (2008), para vainas de *Vanilla planifolia* de Indonesia y Uganda. Se ha demostrado que el ácido vainillínico en las muestras de vainilla tiene un origen glucosídico, pero también puede ser formado por la oxidación de la vainillina en el proceso de beneficiado (Pérez Silva et al., 2011; Peña Mojica 2019) y estos valores

pueden variar entre las diferentes muestras debido a que el proceso de beneficiado de cada uno de los lotes fue manipulado de manera diferente.

7.2.3 Cuantificación de vainillil alcohol

Los contenidos de vainillil alcohol en las muestras de *Vanilla planifolia* oscilaron de 0.04 g/100 g b.s a 0.06 g/100 g b.s, como se muestra en la tabla 11. Siendo el menor contenido el determinado en la muestra de la comunidad de la Chinchina sometidas a un beneficiado tradicional, del estado de Oaxaca y los mayores contenidos se determinaron en la muestra del estado de Puebla (VPLPU). Estos valores son mayores a lo reportado por Pérez-Silva et al., 2011 en vainas beneficiadas de *Vanilla planifolia*.

En las muestras de *Vanilla* híbrido de Costa Rica los contenidos de vainillil alcohol oscilaron de 0.02 g/100 g b.s a 0.05 g/100 g b.s. El valor menor fue el determinado en la muestra (VH01) y el mayor determinado en la muestra (VH02) respectivamente. Estos valores fueron menores a lo reportado por Pérez-Silva et al., 2021, pero para frutos maduros de *V. híbrido* de *Vanilla planifolia* X *Vanilla xtahitensis*.

Por otro lado, en *Vanilla xtahitensis* y *Vanilla cribbiana* los contenidos de vainillil alcohol fueron de 0.03 g/100 g b.s, en ambas muestras y sin diferencias estadísticas significativas.

Finalmente, en las muestras de *Vanilla sp* provenientes del estado de Chiapas el contenido de vainillil alcohol fue de 0.17 g/100 g b.s. Es importante mencionar que este contenido es mayor al de todas las muestras de vainilla analizadas en este estudio, esto a su vez es mayor también que lo reportado en la literatura para vainas de *Vanilla planifolia* por Pérez-Silva et al 2011.

La presencia de estos alcoholes tiene un origen glucosídico, sin embargo, después del beneficiado tiende a ser menor que los demás compuestos debido a una posible oxidación a su aldehído correspondiente (Pérez-Silva et al., 2011; Tavares-Gonzales et al., 2018). Las diferencias entre muestras se pueden deber

principalmente al lugar de origen, la diferencia de especie y a las condiciones agronómicas de los diferentes lugares de procedencia y año de cosecha (Sudharshan et al., 2006).

7.2.4 Cuantificación de p -hidroxibenzaldehído

Los contenidos de p-hidroxibenzaldehído en las muestras de *Vanilla planifolia* oscilaron de 0.07 g/100 g b.s, a 0.12 g/100 g b.s. Siendo, los menores contenidos detectados en la muestra de la comunidad de Mazin grande (VPLBTMG) y del estado de Puebla (VPLPU), como se puede apreciar en la tabla 11, y la muestra con mayor concentración fue la de la comunidad de la Chinchina (VPLCH22). Es importante hacer mención que la mayor parte de las muestras de *V. planifolia* presentaron contenidos menores a lo reportado por Pérez-Silva et al. (2011) y Gassenmeier et al. (2008) para vainas también de México. Esto se le puede atribuir principalmente al diferente año de cosecha de las muestras, el lugar de origen y el tipo de beneficiado.

Respecto a *Vanilla pompona* los contenidos de p-hidroxibenzaldehído fueron de 0.01 g/100 g b.s a 0.02 g/100 g b.s, lo cual es similar a lo reportado por Nolasco-Baltazar et al. (2021), para vainas de *Vanilla pompona* tanto del estado de Veracruz como del estado de Oaxaca. Maruenda et al. (2013) informaron que los bajos contenidos de p-hidroxibenzaldehído en estudios anteriores son característicos en frutos maduros de *Vanilla pompona* var. *Grandiflora* incluso después de una hidrólisis enzimática.

En las muestras de *V. híbrido* los contenidos de p-hidroxibenzaldehído oscilaron de 0.07 g/100 g b.s a 0.17 g/100 g b.s. Siendo los menores contenidos los determinados en la muestra de (VH03) y los mayores los de (VH04). Estos valores son mayores a lo reportado por Gassenmeier et al. (2008), (0.113 g/100 g b.s.) para vainas de *Vanilla planifolia* de México.

En *Vanilla xtahitensis* los contenidos de p-hidroxibenzaldehído fueron de 0.12 g/100 g b.s. estos valores fueron menores a lo reportado por Brunschwig et al. (2015).

Finalmente, la muestra en la que se determinó el mayor contenido de p-hidroxibenzaldehído fue en la de *Vanilla cribbiana* (VCBB19) con 0.23 g/100 g b.s. Este valor es similar a lo reportado por Pérez-Silva et al. (2021), en muestras de *Vanilla cribbiana* del mismo lugar de origen. Este valor a su vez es el mayor que el de todas las muestras analizadas en el presente estudio y se puede deber particularmente a la especie.

7.2.5 Cuantificación de ácido p-hidroxibenzoico

Los contenidos de ácido p -hidroxibenzoico en las muestras de *Vanilla planifolia* y *Vanilla* híbrido oscilaron desde 0.02 g/100 g b.s. a 0.04 g/100 g b.s. Estos valores a su vez fueron menores a lo reportado por Pérez-Silva et al. (2011). Pero mayores que lo reportado por Gassenmeier et al., (2008) para las vainas de Papua Nueva Guinea (0.03 g/100 g b.s.), Uganda (0.03 g/100 g b.s.), India (0.02 g/100 g b.s.) e Indonesia (0.01 g/100 g b.s.), en vainas de *Vanilla planifolia*.

Por otro lado, en *Vanilla sp* (VSPCH) se determinó una concentración de 0.08 g/100 g b.s. los cuales son mayores a los reportados para *Vanilla planifolia* por Gassenmeier et al. (2008) en vainas beneficiadas de Papua Nueva Guinea (0.03 g/100 g b.s.), Uganda (0.03 g/100 g b.s.), India (0.02 g/100 g b.s.) e Indonesia (0.01 g/100 g b.s.).

Finalmente, el mayor contenido de ácido p -hidroxibenzoico se determinó en las muestras de *Vanilla cribbiana* (VCBB19) (0.33 g/100 g b.s.). Siendo estos valores similares a lo reportado por Pérez-Silva et al. (2021). Y a su vez es el mayor contenido de ácido p-hidroxibenzoico en todas las muestras analizadas en este estudio.

7.2.6 Cuantificación de p-hidroxibencil alcohol

Los resultados mostraron que los contenidos de p-hidroxibencil alcohol en las muestras de *Vanilla planifolia* oscilaron de 0.05 g/100 g b.s a 0.12 g/100 g b.s. Estos valores son mayores a lo reportado por Pérez-Silva et al. (2011), en vainas de

Vanilla planifolia. Estas diferencias se pueden deber principalmente a las estas diferencias pueden deberse principalmente al lugar de origen y fluctuaciones entre el diferente año de cosecha y las condiciones agronómicas (clima, suelo, sustrato y altitud) en las que se desarrollan los cultivos de vainilla.

Respecto a *Vanilla pompona* los contenidos de p-hidroxibencil alcohol oscilaron de 0.02 g/100 g b.s a 0.11 g/100 g b.s. Los cuales son mayores a lo reportado por Nolasco-Baltazar et al. (2021) en vainas de los estados de Veracruz y Oaxaca. Sin embargo, es portante mencionar que estas diferencias pueden deberse principalmente a las variedades dentro de una misma especie.

Las muestras con mayor contenido de p-hidroxibencil alcohol fueron las correspondientes a *Vanilla planifolia* provenientes del estado de Puebla (VPLPU). Estos resultados son mayores a lo reportado por Pérez Silva et al. (2006) para vainas de *Vanilla planifolia*.

En *Vanilla* hibrido los contenidos de p-hidroxibencil alcohol oscilaron de 0.03 g/100 g b.s a 0.11 g/100 g b.s. Estos valores son menores a lo reportado por Pérez-Silva et al. (2011), para vainas de *Vanilla planifolia*.

Tabla 11. Contenido de ácido vainillínico y vainillil alcohol de las muestras de vainilla de diferentes especies.

Especie	Código	Ac.Van g/100 g b.s.	p-HB g/100 g b.s.	Ac. p- HB g/100 g b. s	V-OH g/100 g b.s.	p-HB OH g/100 g b.s.	Anisil- OH g/100 g b.s.	Ac. anísico g/100 g b.s.	Anisaldehído g/100 g b.s.	total, compuestos aromáticos
<i>V. planifolia</i>	VPLBTCH	0.12 ^{cd}	0.08 ^{fg}	0.02 ^{de}	----	0.05 ^e	---	---	---	2.54
	VPLBTMG	0.17 ^b	0.07 ^g	0.03 ^{bd}	0.06 ^b	0.11 ^b	---	---	---	3.01
	VPLLSR	0.11 ^{de}	0.09 ^e	0.03 ^{bd}	0.05 ^c	0.04 ^{ef}	---	---	---	2.30
	VPLPU	0.19 ^a	0.07 ^{fg}	0.03 ^{bd}	0.06 ^b	0.12 ^a	---	---	---	3.34
	VPLCH22	0.13 ^c	0.12 ^d	0.04 ^d	0.04 ^d	0.05 ^e	0.06 ^d	---	---	2.92
<i>V. pompona</i>	VPMVEG	---	0.02 ^h	0.01 ^e	---	0.11 ^b	0.43 ^{Aa}	0.11 ^{Ad}	---	0.70
	VPMMLLO	---	0.01 ^h	0.01 ^e	---	0.02 ^{gh}	0.42 ^{Aa}	0.08 ^{Ce}	---	0.59
	VPMSCI	---	0.02 ^h	0.01 ^e	---	0.02 ^{gh}	0.30 ^{Bb}	0.08 ^{Be}	---	0.48
<i>V. híbrido</i>	VH01	0.09 ^{ef}	0.08 ^{ef}	0.02 ^{de}	0.02 ^f	0.03 ^{fg}	---	0.04 ^{Af}	---	1.33
	VH02	0.19 ^a	0.13 ^c	0.04 ^d	0.05 ^{bc}	0.07 ^d	0.02 ^{Cg}	---	---	3.82
	VH03	0.08 ^{fg}	0.07 ^g	0.02 ^{de}	0.04 ^d	0.04 ^{ef}	0.04 ^{Bf}	---	---	1.11
	VH04	0.12 ^{cd}	0.17 ^b	0.02 ^{de}	0.03 ^e	0.11 ^b	0.05 ^{Ae}	---	---	2.45
<i>V. xtahitensis</i>	VXTGT	0.6 ^g	0.12 ^d	0.22 ^b	0.03 ^e	0.05 ^e	0.11 ^c	0.27 ^b	---	2.40
<i>V. cribbiana</i>	VCBB19	0.10 ^{ef}	0.23 ^a	0.33 ^a	0.03 ^e	0.08 ^{cd}	0.04 ^f	0.22 ^c	---	2.53
<i>V. insignis</i>	VI22	---	0.01 ^h	0.01 ^e	---	0.08 ^{cd}	0.04 ^{Af}	---	---	0.22
<i>V. mexicana</i>	VMX	---	0.01 ^h	0.02 ^{de}	---	0.01 ^h	---	---	---	0.13
<i>V. sp</i>	VSPCH	0.11 ^{de}	0.02 ^h	0.08 ^c	0.17 ^a	0.09 ^c	0.06 ^d	0.32 ^a	---	9.69

AV- Ácido vainillínico; pHB- p-Hidroxibenzaldehído; AcpHB; Ácido p-hidroxibenzoico;VOH- Vainillil alcohol; p-HBOH; p-hidroxibencil alcohol; anisilOH- anisil alcohol;Ac. anísico- Ácido anísico. Las letras en minúscula diferentes en a misma columna indican diferencias significativas entre las muestras entre todas las especies, Fisher p<0.05.

7.2.7 Cuantificación de anisil alcohol

Los contenidos de anisil alcohol son descritos en la tabla 11. En *Vanilla pompona* los contenidos de anisil alcohol oscilaron de 0.30 g/100 g b.s a 0.43 g/100 g b.s. Los mayores contenidos de anisil alcohol se determinó en la muestra de *Vanilla pompona* pertenecientes a las comunidades de Gutiérrez Zamora (VPMVEG) y los menores contenidos en la muestra de Santa Cruz Itundujia (VPMSCI) como se muestra en la figura 25. Es importante hacer mención que estos resultados fueron mayores a los reportados por Ehlers & Pfister (1997). Pero menores que lo reportado por Nolasco-Baltazar et al. (2021). Estas diferencias se pueden atribuir principalmente a las diferencias entre los diferentes años de cosecha, lugar de origen de las muestras o incluso a que sean subespecies diferentes de *Vanilla pompona*.

Por otro lado, en *Vanilla* híbrido los contenidos fueron de anisil alcohol fueron de 0.02 g/100 g b.s a 0.05 g/100 g b.s. Siendo a su vez menores que las muestras de *Vanilla pompona*.

En la muestra de *Vanilla xtahitensis* el contenido de anisil alcohol fue de 0.11 g/100 g b.s. Este valor fue menor a lo reportado por Ehlers & Pfister (1999), Brunschwig et al. (2015). Estas diferencias se pueden atribuir principalmente al origen (Sudharshan et al.,2006), como se mencionó anteriormente esta muestra proviene de Guatemala y no de la Polinesia Francesa.

7.2.8 Cuantificación de ácido anísico

En *Vanilla pompona* los rangos de ácido anísico oscilaron entre 0.08 g/100 g m.s. y 0.11 g/100 g m.s. Es importante mencionar que estos valores son similares a lo reportado por Nolasco-Baltazar et al. (2021) en vainas beneficiadas del estado de Veracruz y Oaxaca.

En *Vanilla xtahitensis* el contenido de ácido anísico fue de 0.27 g/100 g b.s. El cual es mayor que lo reportado por Ehlers & Pfister (1997).

Por otro lado, el contenido de ácido anísico en la muestra de *Vanilla cribbiana* fue de 0.22 g/100 g b.s. Es importante mencionar que estos resultados son mayores a los reportados por Nolasco-Baltazar et al. (2021) para muestras de *Vanilla pompona*.

Finalmente, el mayor contenido de ácido anísico determinado en este estudio (0.32 g/100 g b.s.) fue en la muestra de *Vanilla sp.* Es sustancial mencionar que este contenido de ácido anísico fue mayor que en todas las muestras analizadas. Lo cual le confiere una importancia comercial interesante a esta especie de vainilla.

De manera general los compuestos anísicos son responsables de notas de anís, floral, herbal, frutal y dulce. Dichos compuestos tienen un bajo umbral de percepción (Leffingwell & Associates, 2019) en comparación con los compuestos vainillínicos (que requieren mayores concentraciones para ser percibidos por el olfato). Esto último ha sido evidenciado en los estudios de olfactometría, en donde estos compuestos anísicos son considerados compuestos de impacto aromático (Takahashi et al., 2013; Brunschwing et al., 2015).

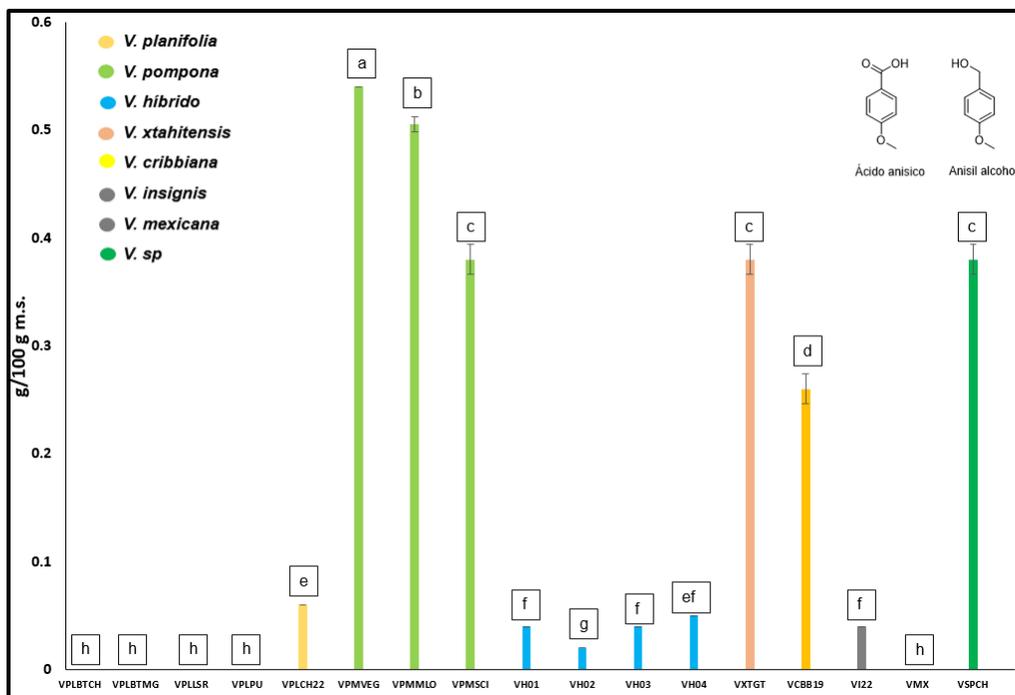


Figura 25. Determinación de compuestos anísicos en muestras de vainillas de diferentes especies (Fuente: Autor).

7.3 Distribución de compuestos aromáticos por especies

Una vez mencionado lo anterior, y para una mejor comprensión de los resultados se agruparon los compuestos identificados y se realizaron gráficos de pastel (Figura 26) para cada una de las muestras correspondientes a cada una de las especies en 3 grupos vainillínicos (vainillina, ácido vainillínico y vainillil alcohol), bencílicos (p-hidroxibenzaldehído, ácido p-hidroxibenzoico y p-hidroxibencil alcohol) y anísicos (anisil alcohol, ácido anísico y anisaldehído).

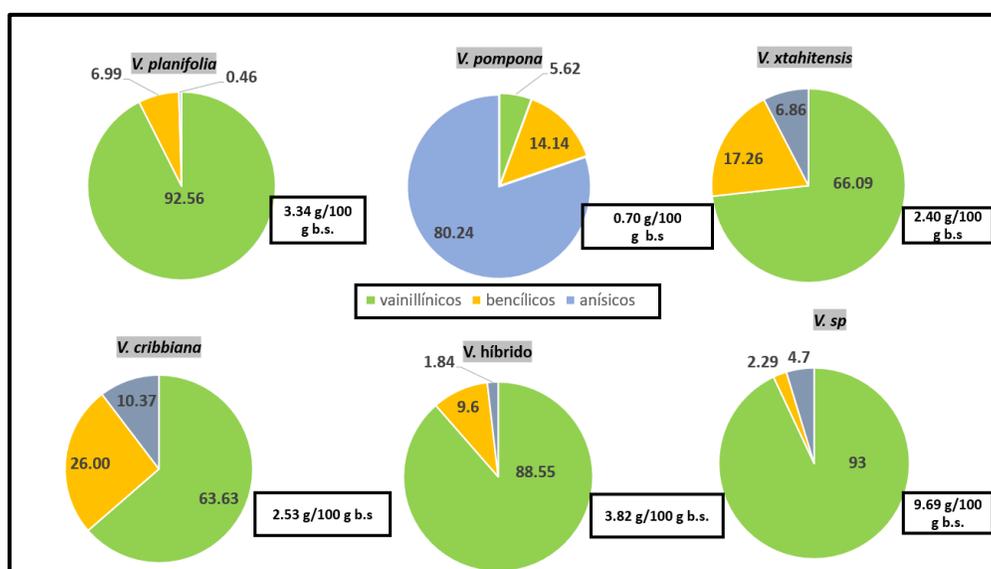


Figura 26. distribución de compuestos en especies de vainilla de diferentes especies (Fuente: Autor).

7.3.1 *Vanilla planifolia*

En *Vanilla planifolia*, de un total de 3.34 g/100 g b.s, correspondiente al total de los compuestos agrupados, el 92.56% corresponde a los compuestos vainillínicos, el 6.99 % a los compuestos bencílicos y solo un 0.45% corresponde a los compuestos anísicos.

7.3.2 *Vanilla pompona*

En *Vanilla pompona* de un total de 0.70 g/100 g b.s, correspondiente al total de los compuestos agrupados, el 80.24% corresponde a los compuestos anísicos, el 14.14 % a los compuestos bencílicos y solo un 5.62% corresponde a los compuestos vainillínicos.

7.3.5 *Vanilla xtahitensis*

En *Vanilla xtahitensis* de un total de 2.40 g/100 g b.s, correspondiente al total de los compuestos agrupados, el 66.09 % corresponde a los compuestos vainillínicos, el 17.26% a los compuestos bencílicos y un 10.37% corresponde a los compuestos anísicos.

7.3.4 *Vanilla cribbiana*

En *Vanilla híbrido* de un total de 2.53 g/100 g b.s, correspondiente a un total, el 63.63 % corresponde a los compuestos vainillínicos, el 26 % a los compuestos bencílicos y un 10.37% corresponde a los compuestos vainillínicos.

7.3.3 *Vanilla híbrido*

En *Vanilla híbrido* de un total de 3.82 g/100 g m.ms, correspondiente a un total, el 88.55 % corresponde a los compuestos vainillínicos, el 9.6 % a los compuestos bencílicos y solo un 1.84% corresponde a los compuestos vainillínicos.

7.3.6 *Vanilla sp*

En *Vanilla sp* de un total de compuestos aromáticos 9.69 g/100 g b.s, correspondiente a un total, el 93% corresponde a los compuestos vainillínicos, el 2.29% a los compuestos bencílicos y un 4.7% corresponde a los compuestos anísicos. El contenido total de compuestos volátiles de esta especie corresponde más del doble del contenido de la especie comercial, *V. planifolia*.

De esta manera se tuvo una representación gráfica de la fracción volátil de cada una de las diferentes especies en estudio, lo cual demuestra el perfil aromático característico de cada una de las especies de vainilla. Esto es importante porque revela el posible uso comercial de cada una de las diferentes vainillas, dependiendo del gusto del consumidor, y también del uso o aplicación que se le brinde.

7.4 Determinación de polifenoles totales

Para la cuantificación de polifenoles totales se seleccionaron las mejores muestras de acuerdo con el perfil aromático y sobre todo que fueran representativas de cada una de las diferentes especies, también se realizó un extracto testigo de café arábica que es con el cual se podrá comparar los resultados en equivalentes de ácido gálico de las diferentes muestras de vainilla como se muestra en la tabla 12 y en la figura 27. Los contenidos de polifenoles totales en las diferentes muestras de vainilla oscilaron entre 16 a 93.26 mg/EAG/ g b.s., como se muestra en la figura 32.

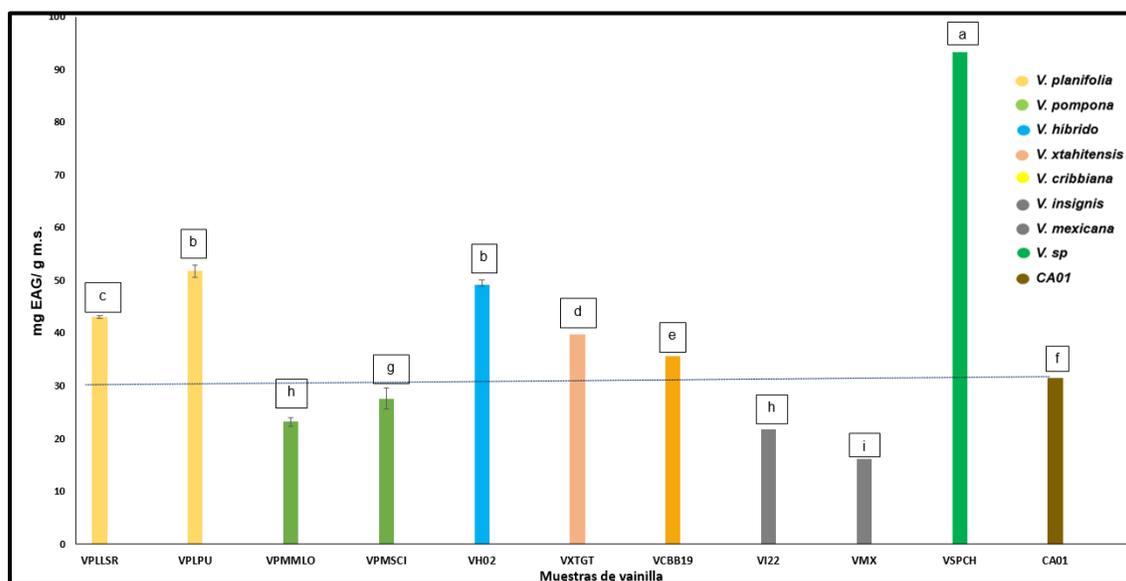


Figura 27. Contenido total de polifenoles en muestras de vainilla de diferentes especies (Fuente: Autor).

En las muestras de *Vanilla planifolia* , VPLLSR y VPLPU, el contenido de polifenoles totales fue de 43.13 mg/EAG/g b.s y 51.81 mg/EAG/ g b.s, respectivamente.

En *Vanilla pompona* el contenido de polifenoles totales fue de 23.22 mg/EAG/g b.s a 27.65 mg/EAG/g b.s.

En *Vanilla* híbrido se encontró un contenido de polifenoles totales de 49.23 mg/EAG/g b.s.

Respecto a *Vanilla xtahitensis* (VXTGT), *Vanilla cribbiana* (VCBB19) y *Vanilla insignis* (VI22), el contenido de polifenoles totales fue de 39.82 mg/EAG/g b.s, 35.71 mg/EAG/g b.s y 21.82 mg/EAG/g b.s., respectivamente.

La muestra testigo analizada de café tuvo un contenido de 31.46 mg/EAG/g b.s., siendo un contenido de polifenoles menor que en la muestra de *V. pompona* (VPMML0) y las vainillas no aromáticas (*V. mexicana* y *V. insignis*).

En *Vanilla sp* el contenido total de polifenoles fue de 93.26 mg/EAG/g b.s., siendo el valor más alto cuantificado en las muestras de vainilla, triplicando el valor del cuantificado en el café.

Cabe mencionar que el contenido total de polifenoles es un parámetro que permite demostrar de manera rápida la presencia de moléculas con actividades antioxidantes como; fenoles simples, ácidos hidroxicinámico, alcoholes, cumarinas, fenilpropanoides, estilbenos, flavonoides y taninos (O`connell et al.,2001).

Es la primera vez que se reporta el contenido total de polifenoles en muestras de vainilla diferentes a *V. planifolia*; por lo cual el café es una excelente referencia de comparación debido a que posee ácidos fenólicos que provienen de una ruta biosintética similar a la vainillina (shikimato) (Ningjian et al., 2014; Vasquez-Ovando et al., 2016).

Los diferentes contenidos de polifenoles en las muestras de vainilla se pueden deber principalmente a la especie y al proceso de beneficiado de las vainas. En este proceso se forman otros polifenoles provenientes de transformaciones, de

oxidación, reducción, polimerización, hidrólisis o reacciones con proteínas (Pérez Silva et al., 2011; Zyzelewicz et al., 2018).

Tabla 12. Contenido de polifenoles totales en muestras de vainilla

Especie	Código	CFT mg EAG/g b.s.
<i>V. planifolia</i>	VPLLSR	43.13 ^c
	VPLPUE	51.81 ^b
<i>V. pompona</i>	VPMMLO	23.22 ^h
	VPMSCI	27.65 ^g
<i>V. híbrido</i>	VH02	49.23 ^b
<i>V. xtahitensis</i>	VXTGT	39.82 ^d
<i>V. cribbiana</i>	VCBB19	35.71 ^e
<i>V. insignis</i>	VI22	21.82 ^h
<i>V. mexicana</i>	VMX	16.24 ⁱ
<i>V.sp</i>	VSPCH	93.29 ^a
Café (testigo)	CA01	31.46 ^f

CFT-Contenido de polifenoles totales. Promedio de tres determinaciones, las letras diferentes en minúsculas indican diferencias entre todas las muestras Fisher ($p > 0.05$).

7.5 Actividad antioxidante por el método DPPH*

Para la interpretación de estos datos es importante mencionar que la actividad antirradical se expresa en porcentaje de inhibición el cual va de 0 a 100 % en un tiempo determinado, el cual está relacionado con el tipo de ensayo, la velocidad y el tiempo de reacción. Una vez mencionado lo anterior, en el ensayo de DPPH* se observó que los porcentajes inhibitorios que obtuvieron las muestras de vainilla de diferentes especies fue de 11 a 37 % como se muestra en la figura 28 y tabla 13.

Es decir, el menor porcentaje de inhibición y sin mostrar diferencias significativas lo obtuvo la muestra de *Vanilla planifolia* (VPLLSR) 11% y la muestra de *Vanilla insignis* (VI22) 12%. Por otra parte, la muestra de *Vanilla xtahitensis* (VXTGT),

Vanilla mexicana (VMX) y *Vanilla sp* (VSPCH) inhibieron de un 20 a 26% el radical DPPH[•] respectivamente. *Vanilla híbrido* (VH02) y *vanilla planifolia* (VPLPU), ambas inhibieron en un 30% el radical DPPH[•]. Finalmente, de todas las muestras de vainilla analizadas en este estudio la muestra en la que se determinó un mayor porcentaje de inhibición del radical DPPH[•] fue la muestra de *Vanilla cribbiana* (VCCB19) 37%. La muestra de café como testigo inhibió un 76% del radical DPPH[•].

Estos resultados demuestran el tipo de compuestos químicos responsables de generar este comportamiento en un ensayo de actividad antirradical y en el caso del radical DPPH[•] tiene afinidad única y exclusivamente con los compuestos lipofílicos dentro de los cuales las principales moléculas son algunos carotenoides e isoprenos (Lu et al., 2005; Rao & Rao, 2007; Shardell et al., 2011).

Cabe hacer mención que además de la vainillina, otros compuestos fenólicos presentes en la vainilla como: el vainillil alcohol, p-hidroxíbencil alcohol y el ácido vainillínico, son los responsables de su capacidad antioxidante, este parámetro fue determinado por los métodos DPPH[•] y β -caroteno-linoleato por Shyamala et al. (2007).

Ahora bien, compararlo con la muestra testigo de café resulta interesante porque, aunque no poseen las mismas moléculas y concentraciones, el café tipo arábico es una de las variedades de café con mayor actividad antirradical debido principalmente a los ácidos clorogénicos e hidroxicinámicos (Anese et al., 2003; Gunalán et al., 2012; Ningjian et al., 2014).

Tabla 13. Porcentaje de inhibición en los ensayos de DPPH[•] y ABTS^{•+} en muestras de vainilla de diferentes especies.

Especie	Códigos	DPPH[•] Inhibición %	ABTS^{•+} Inhibición %
<i>V. planifolia</i>	VPLPU	30 ^c	65 ^b
	VPLLSR	11 ^h	18 ^j
<i>V. pompona</i>	VPMML0	19 ^f	37 ^e
<i>V. híbrido</i>	VH02	30 ^c	42 ^d
<i>V. xtahitensis</i>	VXTGT	22 ^e	38 ^e
<i>V. cribbiana</i>	VCBB19	37 ^b	53 ^c
<i>V. insignis</i>	VI22	12 ^h	26 ^h
<i>V. mexicana</i>	VMX	26 ^d	21 ⁱ
<i>V. sp</i>	VSPCH	20 ^{ef}	29 ^g
Café	CA01	76 ^a	100 ^a

DPPH[•]—2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; ABTS^{•+}—2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid). Promedio de tres determinaciones, las letras diferentes en minúsculas indican diferencias entre todas las muestras Fisher ($p > 0.05$).

7.6 Actividad antioxidante por el método ABTS^{•+}

En el ensayo de ABTS^{•+} se observó que los porcentajes inhibitorios que obtuvieron las muestras de vainilla de diferentes especies fue de 18% a 65 % como se muestra en la tabla 13.

El menor porcentaje de inhibición del radical catiónico ABTS^{•+} lo obtuvieron las muestras de *Vanilla planifolia* (VPLLSR) 18%, *Vanilla mexicana* (VMX) 21% y *Vanilla insignis* (VI22) 26% y *Vanilla sp* 29%. Por otra parte, las muestras de *Vanilla*

pompona (VPMMLLO) 37%, *Vanilla xtahitensis* (VXTGT) 38% y *Vanilla híbrido* (VH02) 42%.

Las muestras de vainilla que lograron inhibir un mayor porcentaje del radical catiónico ABTS^{•+} fue la muestra de *Vanilla cribbiana* (VCCB19) 53% y *Vanilla planifolia* (VPLPU) 65%.

A manera de referencia en este estudio la muestra de café como testigo inhibió un 100% del radical catiónico ABTS^{•+}.

De manera general estos resultados demuestran la afinidad de la reacción química con los antioxidantes presentes en la muestra. De esta manera, se tuvo que los compuestos responsables de generar este comportamiento con el radical catiónico ABTS^{•+} fueron tanto los compuestos lipofílicos como los hidrofílicos a diferencia de la reacción con el radical DPPH[•]. Es decir que en esta reacción química se obtiene particularmente una lectura más completa, es decir, que se puede medir la actividad antirradical de manera general. Es por lo cual que este es uno de los ensayos de actividad antirradical con mayor aplicación en la evaluación de muestras vegetales porque como se mencionó anteriormente expresa una actividad antioxidante general, rápida y en el cual se tendrá mayor lectura que con el DPPH[•].

Una vez mencionado lo anterior comparar los resultados con la muestra testigo de café resulta interesante porque las muestras de vainilla tuvieron la capacidad de inhibir más de un 50% del radical catiónico ABTS^{•+}. Por lo cual es importante hacer hincapié en que no solo los compuestos lipofílicos tienen una influencia en la actividad antirradical, sino que también en muestras de vainilla los compuestos hidrofílicos (fenoles simples, alcoholes y ácidos) tienen un impacto en lo que respecta a la actividad antioxidante. Esto a su vez demuestra también que no solo la vainillina tiene una actividad antioxidante como se demuestra en la literatura (Anklam & Muller, 1997; Burri & Loliger, 1989; Davidson & Naidu, 2000;

Shyamala et al.,2007), sino que también otros compuestos que pueden o no tener impacto aromático.

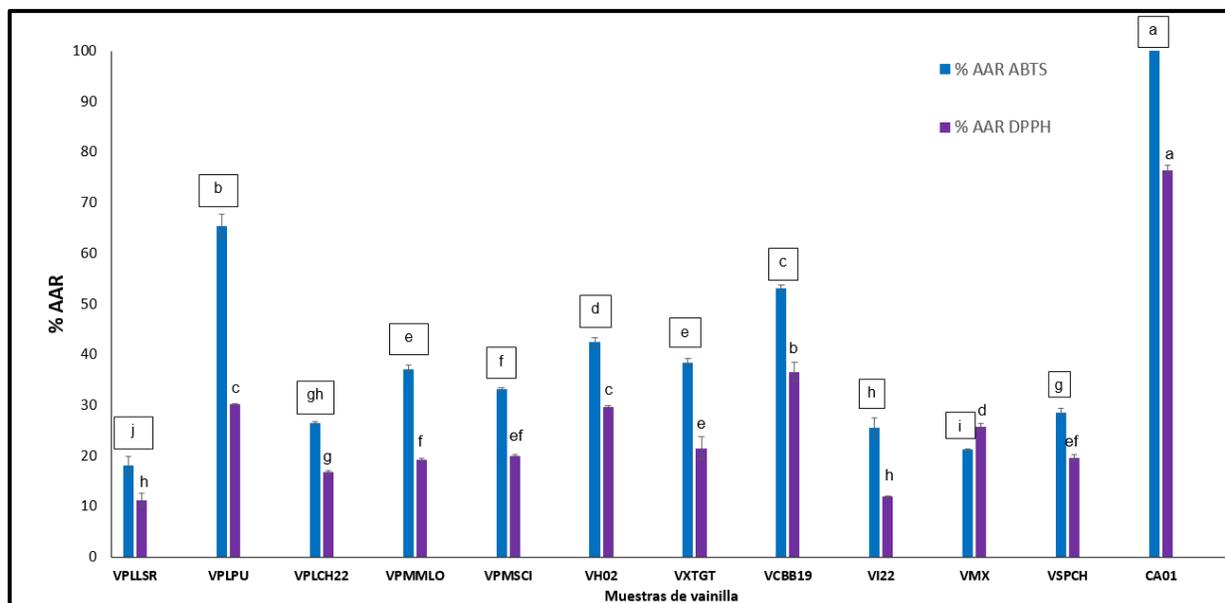


Figura 28. Determinación de la actividad antioxidante por los métodos de DPPH• y ABTS⁺⁺

7.7 Actividad antioxidante por el método FRAP

Los resultados de la actividad antirradical por el método FRAP son descritos en la figura 29. Las actividades antirradicales de los extractos de vainilla de diferentes especies en este ensayo fueron de 10 mM ET g b.s a 70 mM ET g b.s.

Las muestras que tuvieron menor actividad en el ensayo de FRAP fueron las muestras de *Vanilla mexicana* (VMX) 10 mM ET g b.s, *Vanilla insignis* (VI22)14 mM ET g b.s y *Vanilla pompona* (VPMMLLO)16 mM ET g b.s., es decir las menos aromáticas.

Por otro lado, las muestras de *Vanilla planifolia* (VPLPU) 35 mM ET g b.s, *Vanilla sp* (VSPCH) 36 mM ET g b.s y *Vanilla hibrido* (VH02) y *Vanilla xtahitensis* (VXTGT) 29 mM ET g b.s.

Finalmente, la mayor actividad en el ensayo FRAP de las muestras de vainilla de diferentes especies se determinó en la muestra de *Vanilla cribbiana* (VCBB19) 70 mM ET g b.s.

La actividad de la muestra analizada de café fue de 403 mM ET g b.s como se puede apreciar en la figura 34.

Una vez mencionado los resultados, es importante resaltar que estos valores obtenidos del ensayo de actividad antioxidante por el método FRAP muestran dos tipos de lecturas, la primera va a estar expresada mediante la capacidad de las moléculas presentes en las muestras de vainilla para poder reducir el complejo tripiridiltriazina férrica $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{TPTZ})]^{3+}$ a $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{TPTZ})]^{2+}$ y la otra lectura es la actividad quelante de algunas moléculas con el complejo férrico.

De esta manera se tiene que las muestras de vainilla analizadas en este estudio presentaron un efecto antioxidante, aunque fue menor que la muestra testigo de café. Lo cual indica que los compuestos presentes en las muestras de vainilla tienen una actividad reductora y también pueden formar agentes quelantes (Apak et al.,2003). Los agentes quelantes hoy en día juegan un papel estratégico para la eliminación de metales pesados en el cuerpo humano, por lo tanto, el consumo de alimentos que contengan estos compuestos bioactivos es benéfico para la salud (Rubio-Cortés et al.,2021).

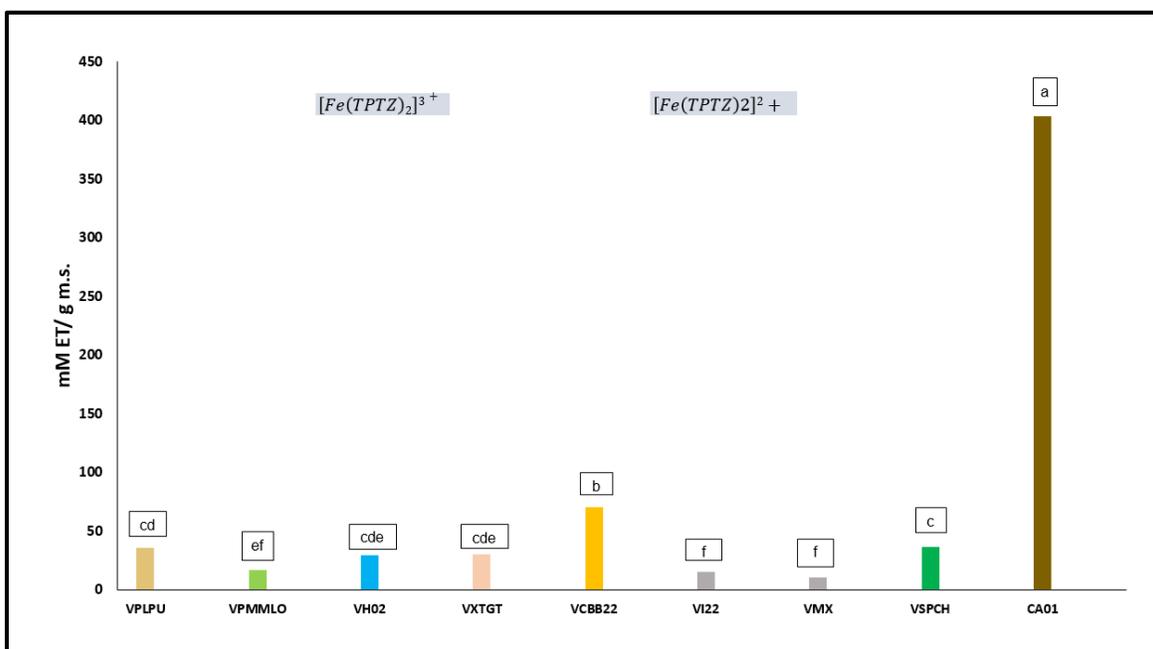


Figura 29. Determinación de la actividad antioxidante por el método FRAP

7.8 Determinación de la capacidad antioxidante por el método ORAC

Para la interpretación de estos datos es importante mencionar que la capacidad antioxidante presentada en este ensayo se muestra en porcentaje de inhibición el cual va de 0 a 100. Los resultados se muestran en la figura 30.

Los porcentajes de inhibición de las muestras de vainilla de diferentes especies osciló de 77% a 88%. Es importante mencionar que todas las muestras de vainilla analizadas en este estudio inhibieron más del 80%, excepto la muestra de *Vanilla híbrido* (77%). No presentaron diferencias estadísticas significativas entre muestras.

Muestras como *Vanilla insignis* y *Vanilla mexicana* a pesar de no poseer atributos aromáticos obtuvieron los mismos porcentajes de inhibición que las muestras aromáticas. Esto último es la prueba sustancial que no solo los compuestos aromáticos en la vainilla tienen un impacto en la actividad antioxidante frente a radicales biológicos, sino que es evidente que hay otras moléculas dentro de la

composición química de vainilla que tienen un impacto en la reducción en la actividad antioxidante a pesar de no ser aromáticas.

Como se mencionó anteriormente el exceso de radicales biológicos en el cuerpo humano genera un impacto negativo produciendo en primer lugar un estrés oxidativo lo que a su vez genera daño en moléculas como proteínas, lípidos y daños al ADN. Lo que es causa del envejecimiento y de diversas enfermedades humanas como la diabetes, enfermedades cardiovasculares, Alzheimer, Parkinson e inclusive el cáncer (Badithe et al.,1999; Finkel, et al.,2000; Halliwell et al.,2006; Halliwell et al.,2007).

Hay que hacer énfasis en que el equilibrio entre la oxidación en el cuerpo humano y los antioxidantes es un concepto crítico para mantener un sistema biológico sano (Finkel, et al.,2000; Tiwari et al.,2001).

Con base al ensayo ORAC, la vainilla posee una capacidad antioxidante similar a la muestra testigo de café, aun cuando éste presentó una mayor actividad en los ensayos anteriormente descritos. Estos resultados demuestran un comportamiento análogo en las muestras de vainilla de diferentes especies y en la muestra testigo. Lo cual pone en evidencia la capacidad de las muestras de vainilla para inhibir especies reactivas del oxígeno (ERO's) que afectan el cuerpo humano (Ou et al.,2001; Huang et al.,2002; Ou et al.,2006; Zhang et al.,2009).

Los resultados obtenidos confirman que los compuestos fenólicos presentes en la vainilla que son excelentes antioxidantes (Scalbert et al.,2005; Blokhina et al.,2003) y pueden ser utilizados como sustitutos de los antioxidantes sintéticos, como el butilhidroxianisol y el butilhidroxitolueno (BHA y BHT, respectivamente), los cuales pueden ser tóxicos (Kahl et al.,1993).

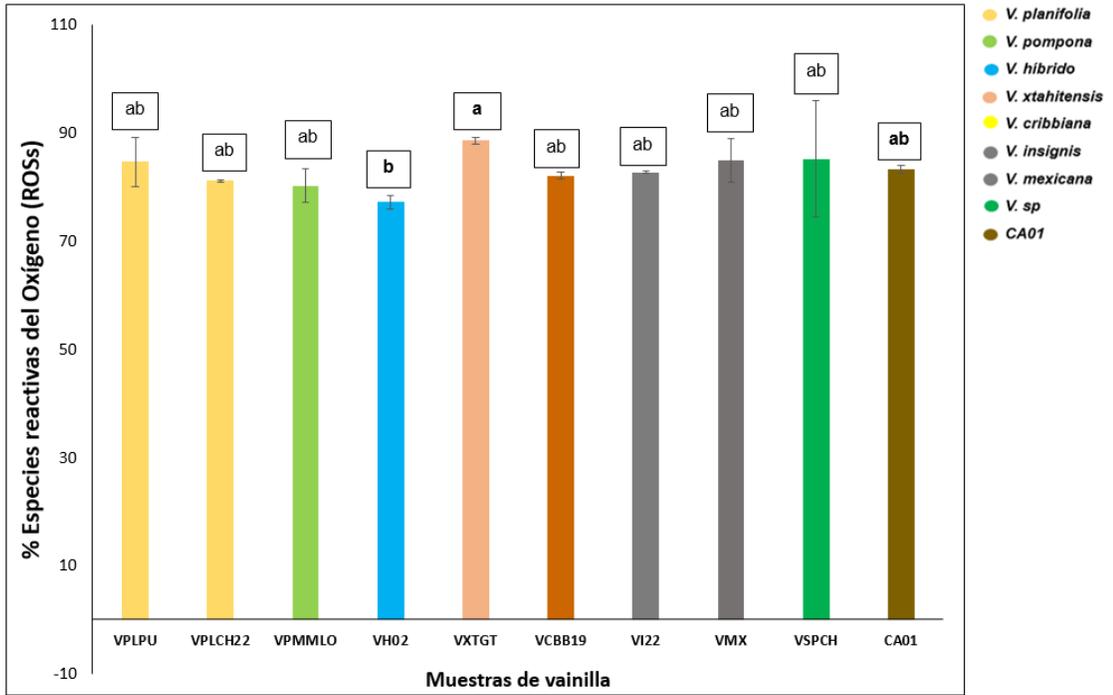


Figura 30. Determinación de la capacidad antioxidante por el método ORAC.

VIII. CONCLUSIONES

- Las características físicas de las vainas estudiadas fueron diferentes dependiendo de la especie. Las vainas de mayor longitud correspondieron a *V. híbrido* (VH04). El grosor de las vainas osciló entre 5 y 14 mm, siendo las muestras de *V. pompona* (VPMML0) las de mayor grosor y la muestra de *V. cribbiana* (VCBB19) la de mayor peso (9 g). Los contenidos de humedad oscilaron entre 10 a 56 g de agua / 100 g de muestra.
- El potencial aromático expresado en vainillina fue mayor en las vainas de *V. sp* (VSPCH), seguido de una muestra *V. híbrido* (VH02) y en la muestra *V. planifolia* (VPLPU). Respecto a los compuestos anísicos fueron mayormente presentes en las especies *V. pompona* (VPMML0), *V. xtahitensis* (VXTGT), *V. híbrido* (VH02) y *V. cribbiana* (VCBB19). La especie silvestre de *Vanilla sp* representan una alternativa en el comercio debido a su calidad aromática, debido a que presenta tres veces más el contenido de vainillina respecto a la especie comercial *V. planifolia* de categoría gourmet.
- El mayor contenido de polifenoles lo presentó la muestra de *V. sp* (VSPCH), siendo tres veces mayor que la muestra de café analizada como testigo.
- Las muestras que presentaron mayor porcentaje de actividad antioxidante por los métodos ABTS^{•+} y DPPH[•] fueron *Vanilla planifolia* (VPLPU) y *Vanilla cribbiana* (VCBB19), respectivamente. Los ensayos de FRAP y ORAC realizados en las diferentes muestras de vainilla indicaron que la vainilla independientemente de la calidad aromática presenta propiedades antioxidantes. De esta manera se generó por primera vez evidencia científica de los atributos antioxidantes de muestras de vainillas comerciales, silvestres, aromáticas y no aromáticas.

IX. RECOMENDACIONES

-Se recomienda realizar estudios metabólicos en muestras de vainilla de diferentes especies para profundizar en la identificación de compuestos que estén implicados en los efectos antioxidantes en los alimentos y nutraceuticos que el consumo de vainilla genere.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Adedeji J., Hartman y Ho Tang. 1993. Flavor characterization of different Varieties of Vanilla beans. *Perfumer & Flavorist*, 18:25-32.
2. Ainsworth, EA y Gillespie, KM (2007). Estimación del contenido fenólico total y otros sustratos de oxidación en tejidos vegetales utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu. *Protocolos de la naturaleza* , 2 (4), 875-877.
3. Alonso-Palacios, M.E. 2014. *Determinación de glucovainillina y perfiles aromáticos de diferentes plantaciones de Vanilla planifolia de la región de la Chinantla*. [Tesis de maestría]. Instituto Tecnológico de Tuxtepec.
4. Ames, O. (1934). An addition to the genus Vanilla. *Botanical Museum Leaflets, Harvard University*, 2(8), 101-102.
5. Anilkumar, A.S. 2004. Vanilla cultivation: a profitable agri-based enterprise. *Kerala Calling*: 26-30.
6. Anklam, E., Gaglione, S. y Müller, A. (1997). Comportamiento de oxidación de la vainillina en productos lácteos. *Química de los alimentos* , 60 (1), 43-51.
7. Anuradha, K., Shyamala, B.N. y Naidu, M.M. 2013. Vanilla-Its Science of Cultivation, Curing, Chemistry, and Nutraceutical Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53: 1250-1276.
8. Arango, D. A., & Moreno, F. (2011). Desarrollo inicial de la vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews, Orchidaceae) bajo diferentes usos de la tierra y condiciones climáticas en Colombia. In *Congreso Forestal Latinoamericano* (pp. 1-17). Lima, Perú: Cámara Nacional Forestal.
9. Arnér, ES (2009). Centrarse en las tioredoxinas reductasas de mamíferos: selenoproteínas importantes con funciones versátiles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Temas generales* , 1790 (6), 495-526.
10. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaftund Technologie*, 28, 25±30.
11. Benzie IF, et al. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*. 1996, 239 (1): 70-6.
12. Benzie, I. F. F., & Szeto, Y. T. (1999). Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 633±636.
13. Besse, P., Da Silva, D., Bory, S., Grisoni, M., Le Bellec, F., Duval. M.F. 2004. RAPD genetic diversity in cultivated vanilla: *Vanilla planifolia*, and relationships with *V. tahitensis* and *V. pompona*. *Plant Science*. 167: 379-385.
14. Bory, S. Grisoni, M. Duval, M. F. and Besse, P. 2007. Biodiversity and preservation of Vanilla: present state of knowledge. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 55: 551-571.

15. Bory, S. Catrice, O. Brown, S. Leitch, I. J Gigant, R. Chiroleu, F. Grisoni, M. Duval, M.F. Y Besse, P. 2008. Natural polyploidy in *Vanilla planifolia* (Orchidaceae). *Genome*. 51: 816- 826.
16. Bohórquez Fajardo, R. (2016). Determinación de actividad antioxidante de extractos de hojas de *Diplostegium phyllicoides* (Kunth) Wedd.
17. Bruman H. 1948. The culture history of Mexican vanilla. *The Hispanic American Historical Review*. 28(3): 360-376.
18. Bouetard, A. Lefeuvre, P. Gigant, R. Bory, S. Pignal, M. Besse, P. Grisoni, M. 2010. Evidence of transoceanic dispersion of the genus *Vanilla* based on plastid DNA phylogenetic analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 55: 621-630.
19. Burri, J., Graf, M., Lambelet, P., & Löliger, J. (1989). Vanillin: more than a flavouring agent—a potent antioxidant. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 48(1), 49-56.
20. Brunschwig, C., Senger-Emonnot, P., Aubanel, M.-L., Pierrat, A., Rochard, S., Raharivelomanana, P. 2012. Odor-active compounds of Tahitian vanilla flavor. *Food Research International*, 46, 148-157.
21. Cameron, K. M. 2011. *Vanilla Orchids, Natural History and Cultivation*. Timber Press, USA.
22. Cemeli, E., Baumgartner, A. y Anderson, D. (2009). Antioxidantes y el ensayo Comet. *Investigación de mutaciones/Revisiones en investigación de mutaciones* , 681 (1), 51-67.
23. Cibrián, J. A. (1999). Variación genética de *Vanilla planifolia* en México. *Undergraduate Thesis. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México*.
24. Corell, D. S. 1965. Supplement to Orchids of Guatemala and British Honduras. *Fieldiana: Bot.*
25. 31(7): 725.
26. Curti, D. E. 1989. Manual para el cultivo de vainilla en la región de Papantla, Veracruz. Comisión Nacional de la Fruticultura, México.
27. Dantas, TC, Dantas, MSG, Neto, AD, D'ornellas, CV y Queiroz, LR (2003). Nuevos antioxidantes del líquido de cáscara de anacardo aplicados a la estabilización de gasolina . *Combustible* , 82 (12), 1465-1469.
28. Dávila Meneses, A., Quintanilla Retana, F., Castillo Araya, K., Sánchez Ortiz, L., Barquero Uriarte, T., & Romero Zúñiga, J. J. (2018). Caracterización clínica y epidemiológica de la población tamizada en el centro de detección temprana de cáncer gástrico, costa rica: período 1996-2015. *Revista Costarricense de Salud Pública*, 27(2), 68-81.
29. De la Iglesia, L. (2018). *Trabajo fin de grado métodos analíticos para la determinación de antioxidantes en olivas* (Doctoral dissertation, Doctoral dissertation, Universidad complutense).

30. Dignum, M.J.W., Kerler, J. y Verpoorte, R. 2002. Vanilla curing under laboratory conditions. *Food Chemistry*. 79, 165-171. 10.
31. Dominguez-Perez, N. (2012). *Estudio de los precursores glicosilados y perfil aromático de Vanilla planifolia sub tipo rayada y Vainilla Tlaxepusco (vanilla sp)*. [Tesis de maestría]. Instituto Tecnológico de Tuxtepec.
32. Doria, E., Buonocore, D., Focarelli, A. y Marzatico, F. (2012). Relación entre el envejecimiento del músculo humano y la vía del sistema oxidativo. *Medicina Oxidativa y Longevidad Celular*, 2012 .
33. Dunphy, P. y Bala, K. 2011. The Quality of Cured Vanilla Beans-Flavor and sensory attributes and mouthfeel. *Perfumer and Flavorist*, 36(10), 38.
34. Favre, F., Jourda, C., Grisoni, M., Piet, Q., Rivallan, R., Dijoux, J. B., ... & Charron, C. (2022). A genome-wide assessment of the genetic diversity, evolution and relationships with allied species of the clonally propagated crop *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 69(6), 2125-2139.
35. Festy, D. (2007). *Antioxidantes: guía práctica* . Ediciones Robinbook.
36. Flores Jiménez, Á., Reyes López, D., Jiménez García, D., Romero Arenas, O., Rivera Tapia, J. A., Huerta Lara, M. y Pérez Silva, A. 2017. Diversity and bioclimatic profiles of *Vanilla* spp. (Orchidaceae) in Mexico. *Revista de Biología Tropical*, 65(3), 975-987.
37. Gallage, N. J., y Møller, B. L. 2018. Vanilla: The Most Popular Flavour. In *Biotechnology of Natural Products* (pp. 3-24). Springer, Cham.
38. Gallage N.J. y Moller B.L. 2015. Vanillin-Bioconversion and Bioengineering of the Most Popular Plant Flavor and Its De Novo Biosynthesis in the Vanilla Orch. *Mol. Plant*. 8, 40- 57.
39. García, J. R., De La Rosa, L. A., González-Barrios, A. G., Herrera-Duenez, B., López-Díaz, J. A., González-Aguilar, G. A., ... & Álvarez-Parrilla, E. (2011). Cuantificación de polifenoles y capacidad antioxidante en duraznos comercializados en Ciudad Juárez, México. *Tecnociencia Chihuahua*, 5(2), 67-75.
40. García Martínez, E. M., Fernández Segovia, I., & Fuentes López, A. (2015). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.
41. García-Valis, S. (2018). Evaluación de los compuestos fenólicos y su capacidad antioxidante durante el beneficiado tradicional de la vainilla (*Vanilla planifolia*). Tesis de maestría en ciencias en alimentos. Instituto tecnológico de Tuxtepec, Oaxaca.
42. Gassenmeier, K., Riesen, B., & 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(3), 194-201.
43. Gatfield, I. 2006. Divanillin: Novel Taste-Active Component of Fermented Vanilla Beans The elucidation of the fate of vanillin during the traditional curing process. *Perfumer and Flavorist*, 31(8), 18-21.
44. Gigant, R., S. Bory, M. Grisoni, y P. Besse. 2011. Biodiversity and evolution in the Vanilla genus. En: O. Grillo, y G. Venora, editores, *The dynamical processes of biodiversity - case studies of evolution and spatial distribution*. InTech, FR. 1-26.

45. Halliwell, B. (2007). Bioquímica del estrés oxidativo. *Transacciones de la sociedad bioquímica* , 35 (5), 1147-1150.
46. Hamer, F. 1974. *Las Orquídeas de El Salvador*, 2: 375. Ministerio de Educación. San Salvador.
47. Salvador.
48. Havkin-Frenkel, D., French, J., Pak, F., y Frenkel C. 2004. Interrelation of Curing and Botany in Vanilla (*Vanilla planifolia*) Bean. Future for Medicinal and Aromatic Plants. *Acta Hort.* 629, 93-102.
49. Havkin-Frenkel D., Belanger F. 2011. Handbook of vanilla science and technology. pp. 183–218. Blackwell Publishing Ltd.
50. Heller, A. H., & Hawkes, A. D. (1966). Nicaraguan orchid studies. *Phytologia*, 14(1), 1-37.
51. Huang, D., Ou, B. y Prior, RL (2005). La química detrás de los ensayos de capacidad antioxidante. *Revista de química agrícola y alimentaria* , 53 (6), 1841-1856.
52. Ito, N., M. Hirose, S. Fukushima, H. Tsuda, T. Shirai and M. Tatematsu, *Food Chem. Toxicol.* 24 (1986) 1099 –1102.
53. Jaitak, V., Sharma, K., Kalia, K., Kumar, N., Singh, HP, Kaul, VK y Singh, B. (2010). Actividad antioxidante de *Potentilla fulgens*: una planta alpina del Himalaya occidental. *Revista de análisis y composición de alimentos* , 23 (2), 142-147.
54. Jordán Bueso M. 1999. Constituyentes aromáticos del zumo de naranja. Efecto del procesado industrial.
55. Kanisawa, T., Tokoro K., Kawahara S. 1994. Flavor development in the beans of *Vanilla planifolia*. Olfaction Taste XI, Proc. Int. Symp. Springer, Tokyo. 268-270.
56. Katalinic, V., Modun, D., Music, I. y Boban, M. (2005). Diferencias de género en la capacidad antioxidante de los tejidos de rata determinadas por ensayos de 2, 2'-azinobis (6-sulfonato de 3-etilbenzotiazolina; ABTS) y del poder antioxidante reductor férrico (FRAP). *Bioquímica y fisiología comparadas Parte C: Toxicología y farmacología* , 140 (1), 47-52.
57. Kaur, C. y Kapoor, HC (2001). Antioxidantes en frutas y verduras: la salud del milenio. *Revista internacional de ciencia y tecnología de los alimentos* , 36 (7), 703-725.
58. Kim, D.O.; Lee, K.W.; Lee, H.J.; and Lee, C.Y. 2002. Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Phenolic Phytochemicals *J. Agric. Food Chem.* 50, 3713-371.
59. Klein, B. P., & Kurilich, A. C. (2000). Processing effects on dietary antioxidants from plant foods. *HortScience*, 35(4), 580-584.
60. Lepters-Andrzejewski S., Brunschwing C., Collard F., Dron M. 2011. Vanilla. Eds Odoux E. and Grisoni M. CRC Press, Boca Raton. 205-228.

61. Lim, T.K., 2012. *Vanilla planifolia*. Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants, Fruits, 4:106-114.
62. Lubinsky, P., Cameron, K.M., Molina, M.V., Wong, M., Lepers-Andrzejewski, S., GómezPompa, A., Kim, S-M. 2008. Neotropical roots of a polynesian spice: the hybrid Origin of tahitian vanilla, *vanilla tahitensis* (orchidaceae). *American Journal of Botany* 95(8): 1040– 1047.
63. Lubinsky, P., Bory, S., Hernández-Hernández, J., KIM, S. C. y Gómez-Pompa, A., 2008. Origins and Dispersal of Cultivated Vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. [Orchidaceae]). *Economic Botany*, 62(2): 127–138.
64. Maruenda H., Lujan Vico M., Householder J. E., Janovec J. P., Naka A., Gonzalez A. E., Cañari C. 2013. Exploration of *Vanilla pompona* from the Peruvian Amazon as a potential source of vanilla essence: Quantification of phenolics by HPLC-DAD. *Food Chemistry* 138: 161–167.
65. Moharram, H.; Youssef, M. Methods for determining the antioxidant activity: A review. *Alex. J. Food Sci.Technol.* 2014, 11, 31–42.
66. Morse, D. y Choi, AM (2002). Hemo oxigenasa-1: la “molécula emergente” ha llegado. *Revista estadounidense de biología molecular y células respiratorias* , 27 (1), 8-16.
67. Mulder, AM, Connellan, PA, Oliver, CJ, Morris, CA y Stevenson, LM (2008). La suplementación con lactoferrina bovina respalda el estado inmunológico y antioxidante en varones humanos sanos. *Investigación en nutrición* , 28 (9), 583-589.
68. Musalem López, O. 2002. La vainilla en México una alta tradición con un alto potencial. Apoyos y servicios a la comercialización agropecuaria. ASERCA.
69. Odoux, E. 2000. Changes in vanillin and glucovanillin concentrations during the various stages of the process traditionally used for curing *Vanilla fragrans* beans in Réunion. *Fruits*. 55, 119-125.
- a.
70. Odoux, E., 2010. *Vanilla Curing*. En *Vanilla*. (eds) Odoux, E. y Grisoni, M. CRC Press, Taylor y Francis Group.
71. Palama, T. L., Khatib, A., Choi, Y. H., Payet, B., Fock, I., Verpoorte, R., et al. 2009. Metabolic changes in different developmental stages of *Vanilla planifolia* pods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 7651–7658.
72. Pandey, KB y Rizvi, SI (2009). Polifenoles vegetales como antioxidantes dietéticos en la salud y las enfermedades humanas. *Medicina oxidativa y longevidad celular* ,
73. Park, SK, Kim, K., Page, GP, Allison, DB, Weindruch, R. y Prolla, TA (2009). Perfiles de expresión genética del envejecimiento en múltiples cepas de ratones: identificación de biomarcadores de envejecimiento e impacto de los antioxidantes dietéticos. *Celda de envejecimiento* , 8 (4), 484-495.
74. Peña-Mojica, E. (2019). *Estudio del efecto enzimático, térmico y fotoquímico en la transformación de la vainillina* [Tesis de maestría]. Instituto Tecnológico de Tuxtepec.

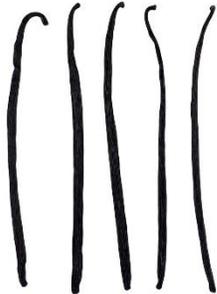
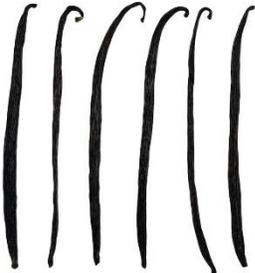
75. Pérez-Silva, A., Odoux, E., Brat, P., Ribeyre, F., Rodriguez-Jimenes, G., Robles-Olvera, V., Garcia-Alvarado, M., Günata, Z. 2006. GC – MS and GC – Olfactometry analysis of aroma compounds in a representative organic aroma extract from cured vanilla (*Vanilla planifolia* G. Jackson) beans. *Food Chemistry*, 99, 728-735.
76. Pérez-Silva, A., Gunata, Z., Lepoutre, J. P., Odoux, E. 2011. New insight on the genesis of odor active compounds in vanilla beans (*Vanilla planifolia* G. Jackson) during traditional curing. *Food Research International*. 44: 2930-2937.
77. Pérez-Silva et al., 2016. La vainilla: más que un aroma. Libro del Congreso Internacional de Vainilla Sistemas agroforestales y productos no maderables del bosque / editado por Amelia Paniagua Vásquez, José Bernal Bolaños Azofeifa. – 1 ed. – Heredia, C. R. INISEFOR / UNA, 214 p.
78. Pérez Silva et al., 2020. Vanilla cribbiana: A species with commercial potential in the food industry/16 p. Instituto Tecnológico de Tuxtepec, Oaxaca- Manuscrito en preparación.
79. -Pérez-Silva, A., Nicolás-García, M., Petit, T., Dijoux, JB, de los Ángeles Vivar-Vera, M., Besse, P., & Grisoni, M. (2021). Cuantificación del potencial aromático de frutos maduros de *Vanilla planifolia* (Orchidaceae) y varias de sus especies e híbridos estrecha y lejanamente relacionados. *Investigación y tecnología alimentaria europea* , 247 , 1489-1499.
80. Plutowska B., Wardencki W. 2007. Aromagrams – Aromatic profiles in the appreciation of food quality. *Food Chemistry* 101: 845–872.
81. Podsędek, A. (2007). Antioxidantes naturales y capacidad antioxidante de las verduras Brassica: una revisión. *LWT-Ciencia y tecnología de los alimentos* , 40 (1), 1-11.
82. Purseglove J.W., Brown, E.G., Green C.L. y Robbins, S.R.J. 1981. *Tropical and Agriculture*. Ed. Rhind y Wringley, G. Longman. Volumen 2, Londres. 664-735.
83. Quiñones, M., Miguel, M. y Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición hospitalaria* , 27 (1), 76-89.
84. Ramalho, VC y Jorge, N. (2006). Antioxidantes utilizados en aceites, gorduras y alimentos gordurosos. *Química nova* , 755-760.
85. Ranadive, A. S. 1992. Vanillin and related flavor compounds in vanilla extracts made from beans of various global origins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 40(10), 1922- 1924.
86. Rao, S. R., Ravishankar, G. A. 2000. Vanilla Flavor: Production by conventional and biotechnological routes. *Journal of the science of food and Agriculture*. 80: 289-304.
87. Ray, T. S. 1990. Metamorphosis in the Araceae. *Amer. J. Bot.* 77: 1599-1609.
88. Re Roberta, Pellegrini Nicoletta, Rroteggente Anna, Rannala Ananth, Min Yang, Rice-Livans Catherine. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. International Antioxidant Research Centre, Guy's, King's and St Thomas' School of Biomedical Sciences, Kings College-Guy's Campus, London SE1 9RT, UK. p. 7.

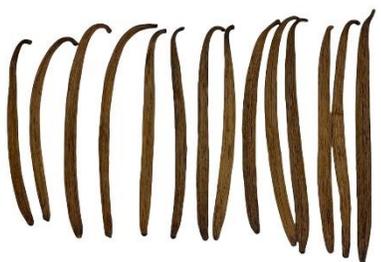
89. Roche, M., Rondeau, P., Singh, N. R., Tarnus, E., & Bourdon, E. (2008). The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS letters*, 582(13), 1783-1787.
90. Rodríguez-López, T., & Martínez-Castillo, J. (2019). Exploración actual sobre el conocimiento y uso de la vainilla (*vanilla planifolia* Andrews) en las Tierras Bajas Mayas del Norte, Yucatán, México. *Polibotánica*, (48), 169-184.
91. Roginsky, V., & Lissi, E. (2005). Review of methods to determine chainbreaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92(2), 235–254.
92. Planeación Agrícola Nacional 2017-2030. Primera Edición 2017. © D.R por Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA).
93. Purseglove, J. W. (1975). Monocotyledons. (*No Title*).
94. Putz, F. E., & Holbrook, N. M. (1986). Notes on the natural history of hemiepiphytes. *Selbyana*, 61-69.
95. Servicio de Información, Agroalimentaria y Pesquera. SIAP. 2016.
96. Shahidi, F., in: Food Factors for Cancer Prevention. Ed. by H. Ohigashi, T. Osawa, J. Terao, S. Watanabe and T. Yoshikawa, pp. 299–303. Springer, Tokyo 1997.
97. Shahidi, F., and M. Naczk, Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects and Applications. Technomic Publishing Co., Lancaster,PA, 1995.
98. Siddhuraju, P. y Manian, S. (2007). La actividad antioxidante y la capacidad de eliminación de radicales libres de los extractos fenólicos dietéticos de las semillas de gramo de caballo (*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc.). *Química de los alimentos* , 105 (3), 950-958.
99. Sies, H. (1997). Estrés oxidativo: oxidantes y antioxidantes. *Fisiología experimental: traducción e integración* , 82 (2), 291-295.
100. Shyamala, B. N., Madhava, N., Sulochanamma, G., & Srinivas, P. (2007). Studies on the Antioxidant Activities of Natural Vanilla Extract and Its Constituent Compounds through in Vitro Models. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 55, No. 19, 2007, 55(19), 6.
101. Smith, N. J. H., J.T. Williams, D.L. Plucknett, y J.P. Talbot. 1992. *Tropical Forests and Their Crops*, pp.357-364 . Cornell University Press. Ithaca.
102. Soto Arenas, M.A. 1982. El Pedregal de San Angel: un refugio natural de orquídeas. *Ocelote* 1(1): 9-11.
103. Soto Arenas, M.A. 1986. Orquídeas de Bonampak, Chiapas. *Orquídea* (Méx.) 10(1): 113-132.
104. Soto Arenas, M.A. 1986. El género *Elleanthus* en México y una nueva especie de Guerrero, *Elleanthus teotepecensis* Orquídea (Méx.) 10(1): 161-190. 1986.
105. Hágsater, E. & M.A. Soto Arenas. 1998. Orchid conservation in Mexico. *Selbyana* 19(1): 15-19.

106. Soto-Arenas, M.A. 1999. Filogeografía y recursos genéticos de las vainillas de México. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. J101. Instituto Chinoín, A.C., Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología, A.C. México, DF.
107. Soto Arenas, M.A. 2003. Vanilla. Pp. 321-334. In: Pridgeon, A.M., P.J. Cribb, M.W. Chase y F.N. Rasmussen.
108. Soto-Arenas, M.A. y Salazar G.A. 2004. Orquídeas. En García-Mendoza, M.J. Ordoñez y Briones-Salas M. Biodiversidad de Oaxaca. Instituto de Biología. UNAM-Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Natulaleza-World Wildlife Fund. México, pp 271- 293.
109. Soto-Arenas, M. A., Dressler, L. R. 2010. A revision of the Mexican and central American species of *Vanilla plumier ex miller* with a characterization of their ITS region of the nuclear ribosomal DNA. *Lankesteriana*. 9(3): 285-354.
110. Takahashi, M., Inai, Y., Miyazawa, N., Kurobayashi, Y. y Fujita, A. (2013). Identificación de los olores clave en vainas de vainilla curadas de Tahití (*Vanilla tahitensis*) mediante GC-MS y análisis de dilución de extractos aromáticos. *Biociencia, biotecnología y bioquímica* , 77 (3), 601-605.
111. Tavares-González, F. B. (2018). *Caracterización aromática y genética de cultivares del género vainilla (Vanilla sp.) de México*. [Tesis de doctorado]. Instituto Tecnológico de Veracruz.
112. Tsao, R. y Deng, Z. (2004). Procedimientos de separación de fitoquímicos antioxidantes naturales. *Revista de cromatografía B* , 812 (1-2), 85-99.
113. Valco, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.D.; Mazur, M. and Telser, J. 2007. Review Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease. *Internat. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44-84
114. Vásquez-Hernández. (2017). Evaluación de los precursores glucosilados durante el desarrollo de frutos y perfil aromático de vainilla (*Vanilla planifolia*). [Tesis de maestría]. Instituto Tecnológico de Tuxtepec.
115. Vickers, T. 2007. Antioxidant. *Wikipedia the Free Enciclopedia*. En: http://en.wikipedia.org/wiki/Main_Page. Consultada el 30 de Junio de 2007.
116. Villanueva-Viramontes, S., Hernández-Apolinar, M., Carnevali Fernández-Concha, G., Dorantes-Euán, A., Dzib, G. R., & Martínez-Castillo, J. (2017). Wild *Vanilla planifolia* and its relatives in the Mexican Yucatan Peninsula: Systematic analyses with ISSR and ITS. *Botanical Sciences*, 95(2), 169-187.
117. Wanasundara, ONU, Amarowicz, R. y Shahidi, F. (1995). Caracterización parcial de antioxidantes naturales en harina de canola. *Investigación alimentaria internacional* , 28 (6), 525-530.

XI. ANEXOS

Tabla 14. Imágenes de las vainas del estudio

Nº	Especies	Imagen
1	Loma San Rafael, Valle Nacional, Oaxaca.	
2	Atzala, Puebla.	
3	Santa María Chinchina, Oaxaca.	

<p>4</p>	<p>Santa María Chinchina, Oaxaca. (Beneficiado tecnificado)</p>	
<p>5</p>	<p>María Lombardo de caso, Oaxaca.</p>	
<p>6</p>	<p>Gutiérrez Zamora, Veracruz</p>	
<p>7</p>	<p>Santa Cruz Itundujia, Oaxaca.</p>	

8	Coban, Alta Verapaz, Guatemala.	
9	Coban, Alta Verapaz, Guatemala.	
10	Chumcerro, Chiapas	
11	La Florida, Oaxaca	

12	Loma San Rafael, Valle Nacional, Oaxaca.	
13	BA1901, BA1902, BA1903, BA1904 Costa Rica.	