

# Comparación de métodos de marchitamiento de vainas de vainilla mediante un modelo mecanístico

K. Arguelles Peña<sup>1</sup>, A. Perez Silva<sup>2</sup>, V.J. Robles Olvera<sup>1</sup>, M.A. García Alvarado<sup>1</sup>, G.C. Rodríguez Jimenes<sup>1\*</sup>,

<sup>1</sup>Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos, Tecnológico Nacional de México/Campus Veracruz, M.A. de Quevedo, 2779, Formando Hogar, C.P. 91897, Veracruz, Veracruz, México

<sup>2</sup>Tecnológico Nacional de México/Campus Tuxtepec. Avenida Dr. Víctor Bravo Ahuja S/N, 5 de Mayo, 68350 San Juan Bautista Tuxtepec, Oax., México

[\\*guadalupe.rj@veracruz.tecnm.mx](mailto:*guadalupe.rj@veracruz.tecnm.mx)

**Área de participación:** Ingeniería Química

## Resumen

Se obtuvo un modelo con la solución analítica de las ecuaciones cinéticas para la glucovainilla y vainillina en función del tiempo. Se realizaron siete tratamientos de marchitamiento a las vainas (horneado: 10 h a 60 °C, escaldado con vapor: 15 s a 100 °C y ultrasonido: 3, 6 y 20 min, 90 y 180 W), se llevó cabo el beneficio y se compararon los tratamientos por intervalos conjuntos de 95 % de confianza. Se determinaron los parámetros cinéticos óptimos ( $k_{GV}$ ,  $k_V$  y  $k_2$ ) para obtener el modelo para cada tratamiento. Se obtuvo como mejor tratamiento el escaldado con vapor, obteniendo una alta concentración de vainillina al final del beneficio.

**Palabras clave:** Vainilla, marchitamiento, modelo

## Abstract

A model was obtained with the analytical solution of the kinetic equations for glucovanillin and vanillin as a time function of time. Seven killing treatments were carried out on the pods (baking: 10 h at 60 °C, steam blanching: 15 s at 100 °C and ultrasound: 3, 6 and 20 min, 90 and 180 W), the curing was carried out and the treatments were compared by 95% confidence intervals. The optimal kinetic parameters ( $k_{GV}$ ,  $k_V$  and  $k_2$ ) were determined to obtain the model for each treatment. Steam blanching was obtained as the best treatment, obtaining a high concentration of vanillin at the end of the curing.

**Key words:** Vanilla, killing, model

## Introducción

La vainilla es una especie vegetal de la familia *Orquidaceae*, que comprende 110 especies, siendo la más importante *Vanilla planifolia* Andrews, de la cual se obtiene el extracto natural de vainilla, el cual comprende diversos compuestos aromáticos como fenoles, ácidos alifáticos, alcoholes, aldehídos, ésteres, etc., siendo los mayoritarios el ácido *p*-hidroxibenzoico, el *p*-hidroxibenzaldehído, el ácido vainílico y la vainillina [1, 2]. Sin embargo las vainas verdes que produce la orquídea tienen que someterse a un proceso de beneficio para que desarrollen los compuestos mencionados. Para ello el beneficio comprende cuatro etapas: marchitamiento, sudado-soleado, secado y acondicionamiento. En la primera etapa, el marchitamiento tiene como finalidad detener el metabolismo y permitir el contacto entre enzimas y sustratos; los compuestos mayoritarios se encuentran en forma glucosilada en la vacuola y deben ser hidrolizados por la enzima  $\beta$ -glucosidasa, ubicada en el citoplasma, para producir la vainillina y las otras agliconas [2, 3, 4]. La concentración de los compuestos aromáticos va cambiando a través del tiempo de beneficiado, proporcionando el perfil aromático característico de la vainilla, donde predomina la vainillina como producto formado a partir de la glucovainillina. Se han realizado investigaciones sobre beneficio de vainas de vainilla en condiciones controladas [5, 6] que han permitido conocer la evolución de los cuatro compuestos aromáticos principales y su precursor, por lo que en este trabajo se propone un modelo que permitiría reproducir el comportamiento mencionado, para lo cual se

requieren plantear un sistema de ecuaciones a partir de las consideraciones teóricas que expliquen la variación en la concentración de los compuestos durante el beneficio, posteriormente resolver el sistema para expresar las concentraciones de la vainillina y glucovainillina en función del tiempo, para ajustar el modelo a los resultados. Dicho modelo nos permitirá no solo comparar tratamientos de marchitamiento, sino ver las constantes en las ecuaciones que afectan la producción de vainillina, lo cual no se ha reportado.

En este trabajo se proponen comparar el método de marchitamiento tradicional, horneado, con el escaldado con vapor y ultrasonido como otras alternativas, para lo cual se planteó y resolvió el sistema de ecuaciones para obtener las ecuaciones que representan la evolución de la concentración de glucovainillina y vainillina en función del tiempo.

## Metodología

Se usaron vainas de *Vanilla planifolia* con madurez fisiológica del parque Ecopark Xanath de Papantla, Veracruz, con un tamaño promedio de  $16.83 \pm 1.30$  cm, fueron despezonadas y limpiadas.

## Materiales

Los reactivos utilizados fueron cloruro de sodio y estándares de glucovainillina y vainillina de Sigma-Aldrich. Se empleó una incubadora Lab-line Imperial III Incubator, una marmita, un baño ultrasónico AS5150B ultrasonic cleaner y un horno Bertuzzi Modelo 2100.

## Marchitamiento y beneficio

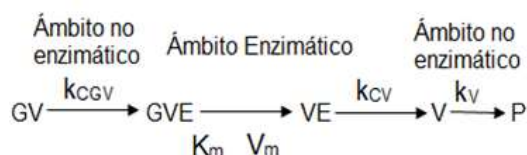
En el tratamiento de horneado, las vainas fueron envueltas con tela húmeda y colocadas en la incubadora Lab-line Imperial III Incubator a  $60^\circ\text{C}$  durante 10 h y se procedió a su beneficio. Por otro lado, para el tratamiento con vapor a  $100^\circ\text{C}$ , las vainas se colocaron en una canastilla y se introdujeron en la marmita precalentada durante 15 segundos y al finalizar fueron sumergidas en agua a  $25^\circ\text{C}$ . En el caso del marchitamiento por ultrasonido se realizaron cinco tratamientos (3 min a 90 W, 6 min a 90 W, 20 min a 90 W, 6 min a 180 W y 20 min a 180 W) en el baño ultrasónico manteniendo la temperatura a  $25^\circ\text{C}$ . Para continuar el beneficio, la etapa de soleado-sudado fue simulada con un ambiente controlado, las vainas marchitas se colocaron en recipiente cerrados a 75 % de humedad relativa con una solución sobresaturada de NaCl y a  $30^\circ\text{C}$  en un horno Bertuzzi Modelo 2100. Los siete tratamientos se hicieron por duplicado y se emplearon 39 vainas por cada experimento. Las vainas se limpiaron diariamente con etanol y se tomó una muestra de 3 vainas para cada uno de los nueve puntos de muestreo (0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 días). Las vainas se sacaron del ambiente de humedad relativa hasta que se pardearon completamente y se mantuvieron rígidas, lo cual ocurrió entre 30 y 37 días. Como etapa de acondicionamiento las vainas se almacenaron en bolsas ziploc a temperatura ambiente, hasta completar 90 días.

## Cuantificación de vainillina y glucovainillina

Se tomaron tres vainas de cada tratamiento, se congelaron con nitrógeno líquido y se molieron con un molino Krups; del polvo obtenido se pesaron 300 mg y se aforaron a 50 mL con una mezcla metanol: $\text{H}_3\text{PO}_4$  0.01 M (30:70 v/v). Se mantuvo el matraz durante 2 min a 37 kHz en el baño ultrasónico, el contenido fue filtrado con Whatman No. 4 y luego pasado por acrodisco de  $0.45\ \mu\text{m}$  antes de la inyección en HPLC. La cuantificación se realizó con un HPLC Varian Prostar 363, una columna microsorb C18 de 4.6 mm de diámetro y 150 mm, utilizando como fase móvil 90% agua acidificada (800 ml de agua más 10 ml de ácido acético) y 10% metanol. Se utilizó un flujo de 1.5 mL/min y una longitud de onda de 254 nm en el detector UV. La cuantificación de los compuestos se realizó bajo la técnica de estándar externo a partir de las curvas de calibración. El intervalo de concentración para glucovainillina y vainillina fue de 1 a 100 mg/L disueltos en etanol 60% m/v [7].

## Obtención del modelo

Para obtener el modelo se plantearon y resolvieron las siguientes ecuaciones de velocidad de acuerdo a las reacciones de la Figura 1:



**Figura 1. Reacciones de la glucovainillina**

En la primera reacción la GV (glucovainillina libre) forma un complejo GVE (glucovainillina-enzima) con una constante de velocidad  $k_{CGV}$ , seguido de la formación del complejo vainillina-enzima (VE) considerando que la reacción sigue una cinética de Michaelis-Menten con una constante  $K_m$  (constante de Michaelis-Menten) y una  $V_m$  (velocidad máxima), para después liberar la vainillina con una constante de velocidad  $k_{CV}$ . Finalmente la vainillina puede utilizarse en la formación de otros productos (P) con una constante de velocidad  $k_V$ .

Las ecuaciones 1 a 4 plantean la variación de las concentraciones de las especies formadas desde glucovainillina a vainillina, mientras que la ecuación 5 considera la variación de la concentración de algún otro producto derivado de la vainillina.

$$\frac{dGV}{dt} = -k_{CGV}(GV - GVE) \quad (1)$$

$$\frac{dGVE}{dt} = k_{CGV}(GV - GVE) - \frac{V_m}{K_m + GVE} GVE \quad (2)$$

$$\frac{dVE}{dt} = \frac{K'V_m}{K_m + GVE} GVE - k_{CV}(VE - V) \quad (3)$$

$$\frac{dV}{dt} = k_{CV}(VE - V) - k_V V \quad (4)$$

$$\frac{dP}{dt} = k_V V \quad (5)$$

## Resultados y discusión

### Obtención del modelo

Para la linealización del modelo se tomaron en cuenta las siguientes consideraciones de cuasiestacionalidad:

$$K_m \gg GVE \quad \frac{dGVE}{dt} = 0 \quad \frac{dVE}{dt} = 0$$

Las ecuaciones 1 a 5 se simplificaron a las ecuaciones 6 a 10

$$\frac{dGV}{dt} = -k_{CGV}(GV - GVE) \quad (6)$$

$$\frac{dGVE}{dt} \approx 0 = k_{CGV}(GV - GVE) - \frac{V_m}{K_m} * GVE = k_{CGV}GV - \left(k_{CGV} + \frac{V_m}{K_m}\right) * GVE \quad (7)$$

$$\frac{dVE}{dt} \approx 0 = \frac{K'V_m K_{GV} GV}{K_m} - k_{CV}(VE - V) \quad (8)$$

$$\frac{dV}{dt} = k_{CV}(VE - V) - k_V V \quad (9)$$

$$GVE = \frac{k_{CGV}}{k_{CGV} + \frac{V_m}{K_m}} GV = K_{GV} * GV \quad (10)$$

Integrando la ecuación 6 se obtiene la ecuación 11, que representa la evolución de glucovainillina a través del tiempo

$$GV(t) = GV_0 e^{-k_{GV} t} \quad (11)$$

Despejando  $k_{CV}$  de la ecuación 8 se obtiene la ecuación 12

$$k_{CV} = \frac{K'V_m K_{GV} GV}{K_m (VE - V)} \quad (12)$$

Sustituyendo el término  $k_{CV}(VE - V)$  de 12 en 9, simplificando el término  $K'V_m K_{GV}/K_m$  como la constante  $k_2$  y sustituyendo  $GV$  de la ecuación 11 se obtiene la ecuación 13

$$\frac{dV}{dt} + k_V V = k_2 GV_0 e^{-k_{GV}t} \quad (13)$$

Considerando que  $k_2$  y  $GV_0$  son valores que no varían a través del tiempo se simplifican a  $C_V$ .

$$C_V = k_2 GV_0 \quad (14)$$

Integrando 13 y sustituyendo 14 en la ecuación integrada se obtiene 15

$$V(t) = \left( V_0 - \frac{C_V}{k_V - k_{GV}} \right) e^{-k_V t} + \frac{C_V}{k_V - k_{GV}} e^{-k_{GV} t} \quad (15)$$

La ecuación 15 representa la evolución de la concentración de vainillina a través del tiempo. Las ecuaciones 11 y 15 representan el modelo, donde la constante  $K_{GV}$  está relacionada al consumo de glucovainillina para la formación del complejo enzima sustrato,  $k_V$  relacionada al consumo de vainillina y  $k_2$  considera la constante de Michaelis-Menten y la velocidad máxima de la  $\beta$ -glucosidasa; entonces, de acuerdo al modelo los mejores tratamientos son aquellos que tienen  $k_{GV}$  máxima, que implica una mayor formación de GVE,  $k_V$  mínima que significa que la degradación de vainillina es mínima y  $k_2$  máxima. Solo dos tratamientos mostraron estas condiciones donde  $k_V$  no fue significativa (Tabla 1), los cuales fueron el horneado, que alcanzó una concentración baja de vainillina y el escaldado con vapor que también mostró una degradación mínima de vainillina, pero que alcanzó una mayor concentración que en el horneado.

**Tabla 1. Significancia de los parámetros  $k_{GV}$ ,  $k_V$  y  $k_2$  de los ajustes del modelo a la evolución de la concentración de glucovainillina y vainillina durante el beneficio de vainas de vainilla marchitadas con vapor, ultrasonido y horneado**

Tratamiento	$k_{GV}$	p	$k_V$	p	$k_2$	p
Horneado	0.0372	<0.0001	0.0121	0.2218	0.0131	0.0287
Vapor	0.0531	<0.0001	0.0126	0.1347	0.0322	0.0002
3 min 90 W	0.0697	<0.0001	0.0489	0.0034	0.0419	0.0004
6 min 90 W	0.0704	<0.0001	0.0187	0.0710	0.0429	0.0001
20 min 90 W	0.0499	<0.0001	0.0377	0.0149	0.0533	<0.0001
6min 180 W	0.0510	<0.0001	0.0190	0.1178	0.0379	0.0015
20 min 180 W	0.0686	<0.0001	0.0211	0.0081	0.0441	<0.0001

Por intervalos conjuntos de 95 % de confianza de las constantes (Figura 2, 3 y 4) se demostró que los tratamientos de horneado y ultrasonido 20 min 180 W presentan diferencias significativas. Sin embargo en las gráficas el tamaño de los intervalos nos indica que hay dispersión en los datos, la cual sería menor si los intervalos fueran más pequeños. Con los valores óptimos de las constantes (Tabla 1) se obtuvieron las curvas de glucovainillina (Figura 5) y vainillina (Figura 6), en las cuales se puede observar como la glucovainillina es hidrolizada en todos los tratamientos, sin embargo la vainillina alcanza una concentración máxima y después disminuye, posiblemente por la degradación de vainillina a otros compuestos o por pérdida de la misma por lixiviación; este comportamiento no fue observado en los tratamientos de Rodríguez-Castillo [5], pero fue observado en otros trabajos [6, 8, 9]. Odoux y Grisoni mencionan que cuando se obtienen concentraciones de ácido vainillínico más altas que las esperadas, puede ser debido a la oxidación de vainillina, y además el ácido vainillínico puede experimentar descarboxilación hacia guayacol [2].

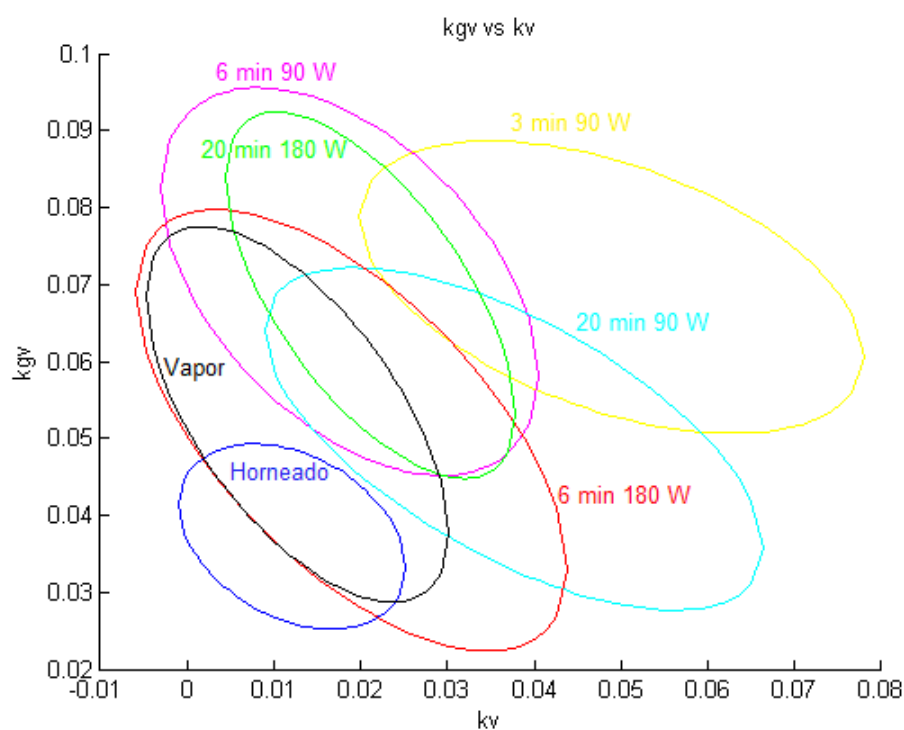


Figura 2. Intervalos conjuntos de confianza al 95% ( $k_{GV}$  vs  $k_V$ )

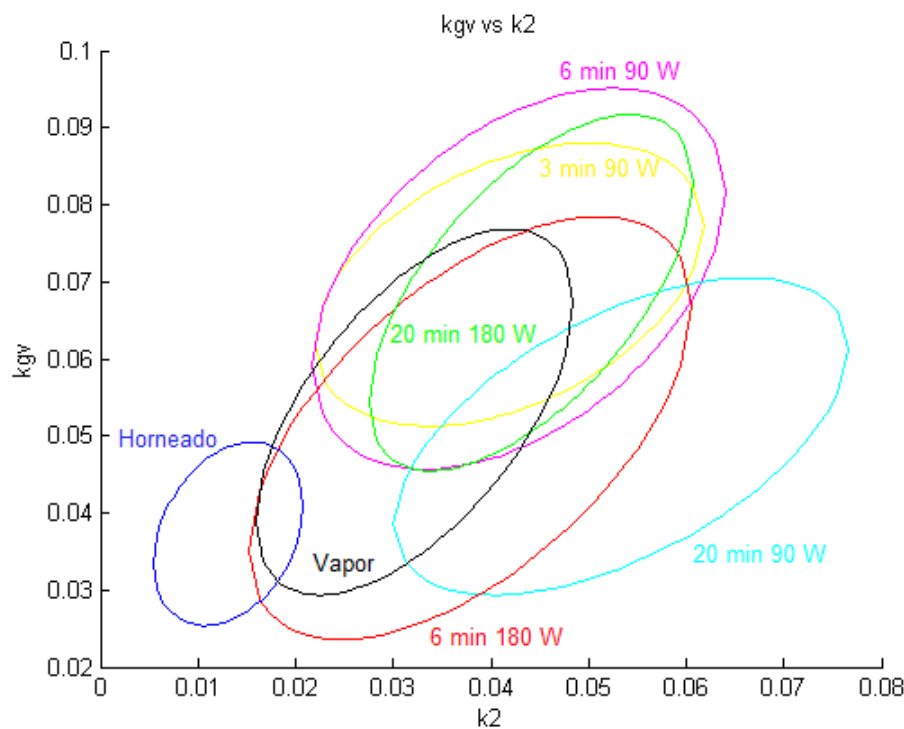


Figura 3. Intervalos conjuntos de confianza al 95% ( $k_{GV}$  vs  $k_2$ )

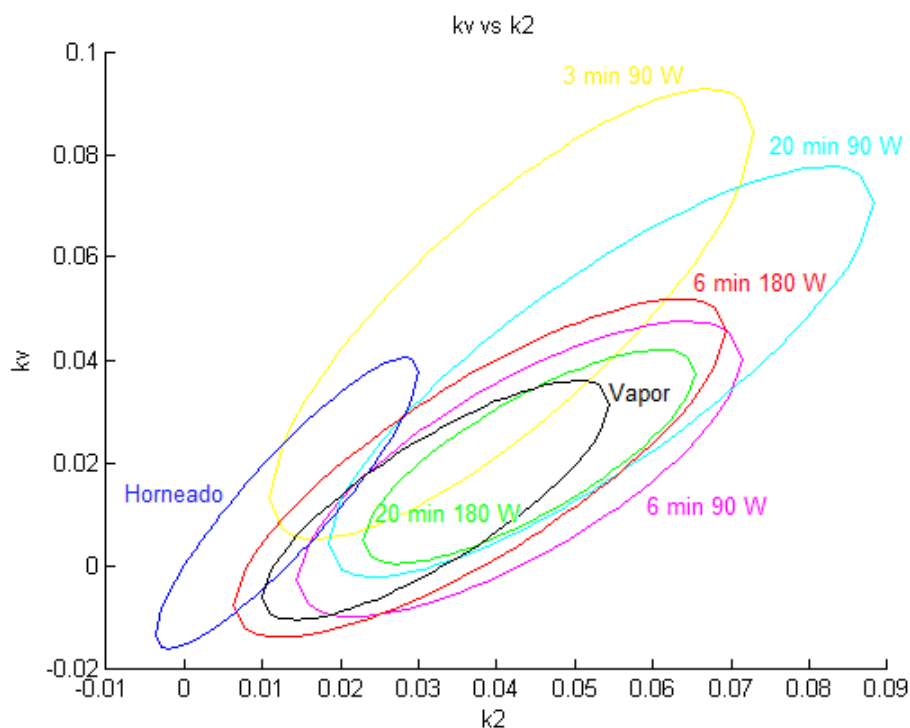


Figura 4. Intervalos conjuntos de confianza al 95% ( $k_v$  vs  $k_2$ )

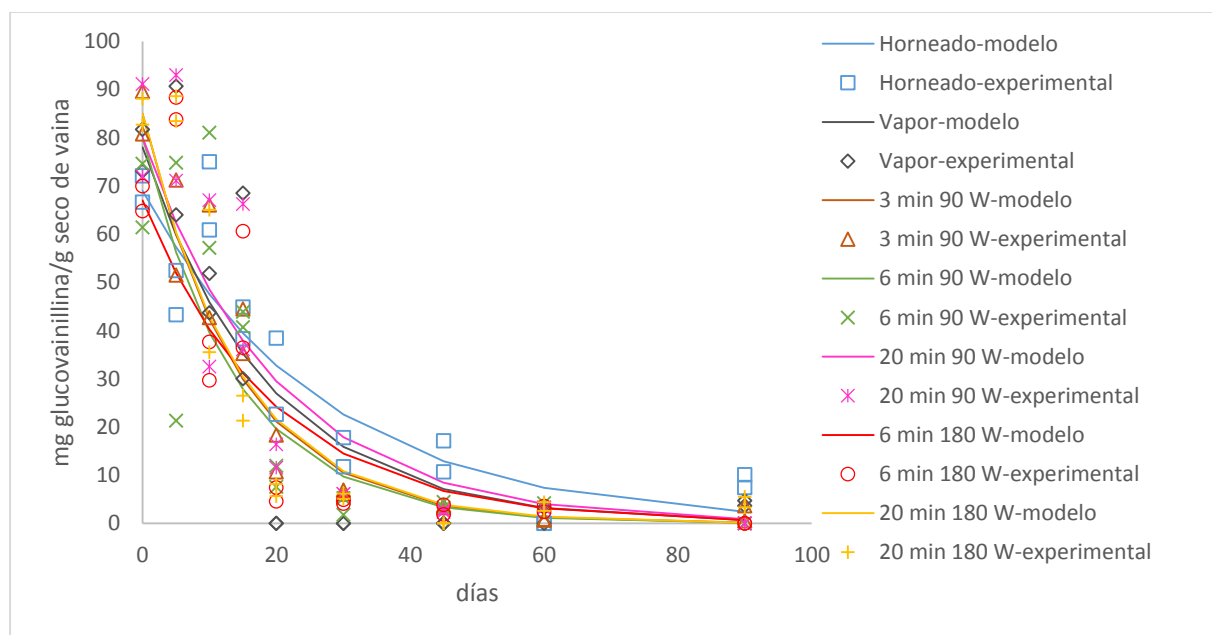


Figura 5. Ajuste del modelo a la evolución de la glucovanillina durante el beneficio de las vainas de vainilla

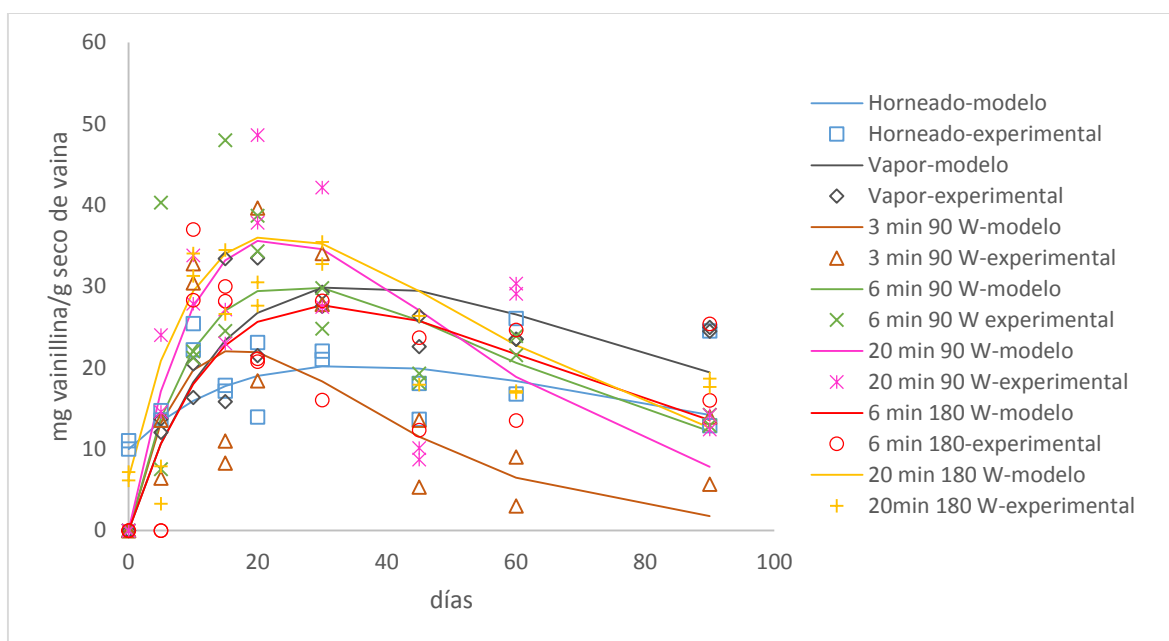


Figura 6. Ajuste del modelo a la evolución de vainillina durante el beneficio de las vainas de vainilla

## Conclusiones

El modelo mecanístico reprodujo adecuadamente el comportamiento de formación-degradación de vainillina y la hidrólisis de glucovanillina de los tratamientos y permitió compararlos. El mejor tratamiento fue el escaldado con vapor, obteniendo una alta concentración de vainillina al final del beneficio.

## Agradecimientos

A CONACyT por la beca otorgada a la estudiante. Al Fordecyt-Conacyt por el apoyo otorgado para la realización del Proyecto de investigación "Estrategias para la adaptación y mitigación al cambio climático necesarias para el rescate del cultivo de vainilla en México", No. 297484.

## Referencias

- [1] Pérez-Silva, A., Gunata, Z., Lepoutre, J. P. and Odoux, E. "New Insight on the Genesis and fate of odor-active compounds in vanilla beans (*Vanilla planifolia* G. Jackson) during traditional curing". *Food Research International* 44, no. 9, pp. 2930–2937. 2011.
- [2] Odoux, E. and Grisoni, M. "Vanilla". R. Hardman. CRC Press. USA. 2010.
- [3] Odoux, E., Escoute, J., and Verdeil, J. "The relation between glucovanillin,  $\beta$ -D-glucosidase activity and cellular compartmentation during the senescence, freezing and traditional curing of vanilla beans". *Annals of Applied Biology*, pp. 1–10. 2006.
- [4] Havkin-Frenkel, D. and Belanger, F. "Handbook of Vanilla Science and Technology". Wiley Blackwell, Iowa, USA. 2011.
- [5] Rodríguez-Castillo, G. L., Rodríguez-Jimenes, G., García-Alvarado, M.A., Robles-Olvera, V.J., and De la Cruz Medina, J. "Efecto Del tratamiento térmico sobre el marchitamiento de vainas de vainilla (*Vanilla Planifolia*)". Instituto Tecnológico de Veracruz. Veracruz, México. 2009.
- [6] Rosado, T. L., Salgado, M. A., Robles, V. J., García, M. A., and Rodríguez-Castillo, G. C. "Efecto del tipo de marchitamiento en la evolución de los compuestos aromáticos en un beneficio controlado de vainilla (*Vanilla planifolia*)". In *V Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones*. 2007.
- [7] Sreedhar, R. V., Roohie, K., Venkatachalam, L., Narayan, M. S. and Bhagyalakshmi, N. "Specific pretreatments reduce curing period of vanilla (*Vanilla planifolia*) Beans". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, no. 8, pp. 2947–55. 2007.

- [8] Pacheco-Reyes, I. "Evaluación del Efecto de sonicación-microondas en el beneficio de vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews)". Tesis de Maestría en Ciencias de Conservación y Aprovechamiento de Recursos Naturales. Instituto Politécnico Nacional. Santa Cruz Xocotlán, México. 2009.
- [9] Tapia-Ochoategui, A. P. "Cambios bioquímicos y microestructurales en vainas de vainilla (*Vanilla planifolia*; Orchidaceae) durante el beneficio tradicional realizado en México". Tesis de Doctorado en Ciencias en Alimentos. Instituto Politécnico Nacional. D.F. México. 2011.