

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS
ESCUELA DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Trabajo final de graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos para optar por el grado de Licenciada en Ingeniería de Alimentos.

Análisis de la variación de los principales metabolitos aromáticos presentes en vainas *Vanilla* spp. de Costa Rica empleando cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a un detector ultravioleta (HPLC-UV)

Elaborada por:

Karla Alejandra Salazar Campos

Carné: B26095

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

Abril, 2022

Tribunal Examinador

Proyecto de graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos como requisito para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos.

Elaborada por:

Karla Alejandra Salazar Campos

Aprobado por:



Ph.D. Natalia Barboza Vargas
Presidenta del Tribunal



M.Sc. Alicia Hernández Peñaranda
Directora del Proyecto



M.Sc. Ana Lucía Mayorga Gross
Asesora del Proyecto



M.Sc. Víctor M. Vásquez Chaves
Asesor del Proyecto



Ph.D. Eric Wong González
Profesor Designado

Declaración de confidencialidad parcial

El presente Trabajo Final de Graduación, es de carácter parcialmente confidencial. Con el fin de proteger la identidad de los productores se codificó el nombre de cada uno de ellos. Por su parte la ubicación exacta de las fincas que proveen la materia prima se empleó únicamente para agruparlas por regiones. Se considerarán de carácter confidencial las modificaciones realizadas en el CIPRONA para las metodologías de análisis por HPLC-UV con el fin de proteger su autoría.

Dedicatoria

*A mis abuelitos, a ma, a pa y a Naty. Este es el resultado
tangible de su esfuerzo también, gracias
por su amor y apoyo incondicional.*

Agradecimientos

Un especial agradecimiento a *Ph.D.* Carolina Rojas Garbanzo (D.E.P.), por su participación como asesora en esta investigación, su disposición, actitud positiva y su excelente labor como profesora.

A mi directora de tesis, doña Alicia, por la confianza que puso en mí desde el primer día de la asistencia. Por todas sus enseñanzas y palabras de aliento aun cuando no sabía cómo seguir. A mis asesores, la profe Ana Lucía y don Víctor por su paciencia y valiosa guía durante la investigación. A APROVAİNILLA por facilitar el contacto con los productores y toda la información suministrada de primera mano que fue vital para la investigación.

Al personal del CIPRONA, que desde mis primeros días me hicieron sentir bienvenida y siempre tuvieron una excelente disposición a enseñarme. Gracias a los investigadores, profesores, personal administrativo y a todos los colaboradores, de una u otra forma su aporte ha sido importante para el desarrollo de esta investigación y mi crecimiento personal. Ha sido un gusto compartir con ustedes.

Al personal docente y administrativo de la Escuela de Tecnología de Alimentos por su compromiso para formar excelentes profesionales y personas. A *M.Sc.* Pedro Vargas, porque tal vez aún sin saberlo, en esas primeras clases de “Fundamentos de Tecnología de Alimentos” me ayudó a descubrir mi vocación. A la Universidad de Costa Rica, sus valores y compromiso con la sociedad me ayudaron a crecer durante esta etapa de la vida.

Índice General	Página
Tribunal Examinador	ii
Declaración de confidencialidad parcial	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Índice General.....	vi
Índice de Figuras.....	viii
Índice de Cuadros	x
Índice de Abreviaturas.....	xi
Resumen	xii
1. Justificación	1
2. Objetivos.....	5
2.1. General	5
2.2. Específicos	5
3. Marco Teórico.....	6
3.1. Aspectos generales.....	6
3.2. Cultivo de vainilla en Costa Rica	7
3.3. Desarrollo y procesamiento de los frutos	8
3.4. Actividad enzimática y reacciones químicas durante el beneficiado de las vainas.....	12
3.5. Calidad del producto terminado	15
3.6. Análisis de extractos de vainilla por medio de HPLC-UV.....	19
4. Materiales y Métodos.....	21
4.1. Localización.....	21
4.2. Descripción de la materia prima.....	21
4.2.1. Codificación de las muestras de vainilla	22
4.2.2. Muestreo de las vainas de vainilla.....	23
4.3. Materiales.....	24
4.4. Caracterización fenotípica de las vainas de <i>Vanilla</i> spp. según la región productora	25
4.4.1. Largo, ancho y grosor	25
4.4.2. Color	26
4.4.3. Brillo.....	27

4.4.4.	Flexibilidad	27
4.4.5.	Vainas con defectos.....	28
4.4.6.	Determinación del contenido de humedad de las vainas de vainilla	28
4.5.	Elaboración de una herramienta para la clasificación de la vainilla costarricense	29
4.6.	Identificación y cuantificación de los principales metabolitos aromáticos en las vainas de <i>Vanilla</i> spp. de tres regiones productoras de Costa Rica	29
4.6.1.	Obtención de extractos de vainilla para la identificación y la cuantificación de compuestos del aroma.	29
4.6.2.	Identificación y cuantificación de los principales metabolitos aromáticos.....	29
4.7.	Análisis estadístico de los datos experimentales	30
4.7.1.	Compuestos no identificados y contenido de metabolitos aromáticos.....	30
4.7.2.	Ajustes de los cromatogramas para el análisis de componentes principales	31
4.7.3.	Análisis de componentes principales	31
5.	Resultados	32
5.1.	Determinación de las características fenotípicas de las vainas de <i>Vanilla</i> spp. verdes y beneficiadas en tres regiones productoras de Costa Rica.....	32
5.1.1.	Clasificación de las vainas de vainilla beneficiada	32
5.1.2.	Determinación del largo, ancho y grosor de las vainas de vainilla.....	36
5.1.3.	Categorización de las vainas de vainilla por color	38
5.1.4.	Humedad de las vainas de vainilla.....	40
5.1.5.	Defectos físicos presentes en las vainas de vainilla verdes y beneficiadas.....	42
5.2.	Identificación y cuantificación de compuestos aromáticos por medio de la técnica de HPLC	45
5.2.1.	Metabolitos aromáticos identificados por medio del uso de patrones y espectro UV.....	45
5.2.2.	Metabolitos no identificados presentes en los extractos de vainilla	50
5.3.	Análisis exploratorio de la relación entre las variables fenotípicas, la ubicación y el estado de procesamiento de las vainas de vainilla sobre los metabolitos aromáticos	52
5.3.1.	Análisis de Componentes Principales (PCA)	52
6.	Conclusiones.....	59
7.	Recomendaciones.....	60
8.	Bibliografía.....	61
9.	Anexos	69

Índice de Figuras

Página

Figura 1. (A) Flor, inflorescencias, frutos en crecimiento y (B) frutos verdes desarrollados de <i>V. planifolia</i>	8
Figura 2. Diagrama explicativo del procesamiento de los frutos de vainilla. Elaborado con base a De la Cruz, Rodríguez & García (2009), Frenkel <i>et al.</i> (2011), Paniagua & García (2013) y Xochipa <i>et al.</i> (2016).....	9
Figura 3. Representación gráfica del beneficiado de los frutos de vainilla durante el “ <i>killing</i> ” (A) y después del “ <i>killing</i> ” (B), asoleado (C) y acondicionamiento (D).....	10
Figura 4. Reacción de hidrólisis enzimática de glucovainillina (Khoiratty, Kodja & Verpoorte, 2018).....	14
Figura 5. Reacciones mediadas por enzimas peroxidasas para la formación del ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico (A) y el ácido vanílico (B) (Pérez, 2006).	15
Figura 6. Espectro de absorción de la vainillina (A) y el ácido vanílico (B) en HPLC-UV (Huesgen, 2011).....	20
Figura 7. Vista lateral (A) y corte transversal (B) de una vaina de vainilla verde. Se indican los puntos de medición para (1) largo, (2) ancho y (3) grosor.....	25
Figura 8. Código de color para vainilla verde o no beneficiada basado en escalas.	26
Figura 9. Código de color para vainilla beneficiada. Elaboración propia a partir de la Norma Mexicana	27
Figura 10. Cantidad de vainilla beneficiada en cada categoría con base al criterio de longitud.	33
Figura 11. Clasificación de vainas de vainilla beneficiadas según la región de producción en Costa Rica con base en la herramienta elaborada.....	34
Figura 12. Clasificación de vainas de vainilla beneficiadas para cada productor evaluado con base en la herramienta elaborada.....	35
Figura 13. Cantidad de vainas de vainilla verde según cada categoría de color.....	38
Figura 14. Cantidad de vainas de vainilla beneficiada según cada categoría de color.....	40
Figura 15. Contenido de humedad en vainas de vainilla beneficiada según productor. Las letras diferentes en la parte superior de cada columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$). A) Pacífico Central, B) Huetar Norte y C) Brunca.....	42
Figura 16. Defectos presentes en vainas curadas de vainilla según los productores de tres regiones de Costa Rica.....	43
Figura 17. Cantidad de vainas beneficiadas con defectos, provenientes de tres regiones productoras de Costa Rica.....	44

Figura 18. Influencia de las variables de estudio sobre los componentes del modelo (A) y la puntuación de las observaciones para los componentes (B), según la región y la especie en estudio.	54
Figura 19. Influencia de las variables de estudio sobre los componentes del modelo (A) y la puntuación de las observaciones para los componentes (B), según el estado de procesamiento de las vainas de vainilla.	56
Figura 20. Influencia de las variables de estudio sobre los componentes del modelo (A) y la puntuación de las observaciones para los componentes (B), según el productor de <i>V. planifolia</i>	58
Figura 21. Cromatograma obtenido a partir del análisis de HPLC-UV para el patrón de 80 ppm de la curva de calibración.	70

Índice de Cuadros

Página

Cuadro I. Rango de concentración (m/v) de compuestos volátiles en extractos de vainas de vainilla beneficiada de <i>V. planifolia</i>	13
Cuadro II. Especificaciones de la vainilla por grado de calidad y tipo de acuerdo con la Norma Mexicana para vainilla de consumo humano (SE, 2009).....	17
Cuadro III. Clasificación cualitativa de las vainas de vainilla según la Norma Costarricense INTE/ISO5565-1 (2019).....	18
Cuadro IV. Criterios de clasificación de las vainas de vainilla en la finca Las Dos Manos Vanilla Ltda. en Costa Rica (Varela, 2011).....	19
Cuadro V. Calidad de vainilla beneficiada según tamaño en el Rancho Santa Beatriz en México (Hernández-Hernández <i>et al</i> , 2010).	19
Cuadro VI. Especies de vainilla estudiadas según el productor y la región de procedencia.	22
Cuadro VII. Vainas de vainilla muestreadas según el análisis realizado.	23
Cuadro VIII. Herramienta empleada para la clasificación de vainas de vainilla según calidad.....	32
Cuadro IX. Dimensiones promedio (largo, ancho y grosor) de vainas verdes y beneficiadas de tres regiones de Costa Rica.....	36
Cuadro X. Dimensiones promedio (largo, ancho y grosor) de las vainas verdes y beneficiadas según la especie.....	37
Cuadro XI. Contenido de humedad promedio para vainas verdes y beneficiadas de vainilla de tres regiones productivas de Costa Rica.....	41
Cuadro XII. Contenido promedio (m/v) de metabolitos presentes en vainas de vainilla verde por región y especie.....	47
Cuadro XIII. Contenido promedio (m/v) de metabolitos presentes en vainas de vainilla beneficiada, por región y especie de origen.	48
Cuadro XIV. Rango de áreas bajo la curva en los cromatogramas determinados por HPLC-UV, correspondientes a los metabolitos no identificados presentes en las vainas de vainilla verdes y beneficiadas provenientes de tres regiones productoras de Costa Rica.	51
Cuadro XV. Dimensiones promedio (largo, ancho y grosor) de las vainas verdes según la especie y región de origen.	69
Cuadro XVI. Dimensiones promedio (largo, ancho y grosor) de las vainas beneficiadas según la especie y región de origen.....	69
Cuadro XVII. Contenido de humedad promedio para vainas verdes y beneficiadas de vainilla de tres regiones productivas de Costa Rica según especie.	69
Cuadro XVIII. Variables incluidas para los PCA analizados en la sección 5.3.1.....	70

Índice de Abreviaturas

t: Toneladas

nm: nanómetro, utilizada para medir la longitud de onda

λ : Lambda, letra griega utilizada para designar la longitud de onda

ANDEVA: Estadística, análisis de varianza

APROVAINILLA: Asociación Nacional de Vainilleros Unidos

CIPRONA: Centro de Investigaciones en Productos Naturales

CITA: Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos

DOMT: Enzima metil-transferasa

ETA: Escuela de Tecnología de Alimentos

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (Por las siglas en inglés *Food and Agriculture Organization*)

GPS: Sistema de posicionamiento global, por sus siglas en inglés *Global Positioning System*

HCR: Híbrido Costa Rica, en referencia a una especie de vainilla cultivada en Costa Rica

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia, por sus siglas en inglés *High Performance Liquid Chromatography*

INBio: Instituto Nacional de Biodiversidad

INTECO: Instituto de Normas Técnicas de Costa Rica

PCA: Análisis de Componentes Principales, por sus siglas en inglés *Principal Component Analysis*

PROCOMER: Promotora del Comercio Exterior de Costa Rica

PTFE: Politetrafluoroetileno, más conocido como teflón

SE: Secretaría de Economía, en referencia a la Secretaría de Economía de México

TFG: Trabajo Final de Graduación

UCR: Universidad de Costa Rica

UNA: Universidad Nacional de Costa Rica

UV: Ultravioleta

Resumen

Salazar Campos, Karla Alejandra

Análisis de la variación de los principales metabolitos aromáticos presentes en las vainas verdes y curadas de *Vanilla* spp. empleando cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC-UV).

Tesis de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos. San José, Costa Rica.

K. Salazar C., 2021.

70 h: 20 il. – 108 refs.

Se evaluó la relación entre las características físicas de vainas de cuatro especies de *Vanilla* spp. (*V. planifolia*, *V. pompona*, *V. hardii* y el híbrido Costa Rica (híbrido HCR)), la región de cultivo (Huetar Norte, Pacífico Central y Brunca) y el estado de procesamiento (verdes o curadas) sobre los principales metabolitos aromáticos presentes, con el fin de explorar si estos factores pueden asociarse a la calidad del producto terminado.

En una primera etapa se caracterizó el aspecto físico de las muestras (dimensiones, color, defectos, etc.) y se clasificaron con una herramienta elaborada para esta investigación. Se determinó el contenido de humedad y se realizaron extractos en una disolución etanólica. Se cuantificaron mediante HPLC-UV los siguientes metabolitos: vainillina, *p*-hidroxibenzaldehído, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido anísico, alcohol *p*-hidroxibencílico, alcohol anísico, alcohol vanílico y guaiacol. Los datos obtenidos, una vez centrados y estandarizados, se sometieron a un análisis de componentes principales.

Se encontraron nueve compuestos que coinciden con el tiempo de retención de los patrones evaluados más no en el espectro UV. También se observaron diferencias en el análisis de componentes principales (PCA) con relación al estado de procesamiento, más no diferencias claras en cuanto a las regiones de cultivo. Las muestras del híbrido Costa Rica, particularmente las del Pacífico Central, presentaron mejor calidad general por lo que poseen gran potencial para la explotación comercial.

Palabras Clave: Vainilla, metabolitos, vainillina, HPLC, Costa Rica, enzimas, beneficiado

1. Justificación

La vainilla es una especia de alto valor comercial a nivel mundial, se le considera una de las sustancias saborizantes y aromáticas con mayor distribución en el mundo (Havkin-Frenkel & Belanger, 2007; Jager, Perfetti & Diachenko, 2007; De La Cruz, Rodríguez & García, 2009; Guzmán & Zara, 2012). Proviene del fruto curado de *Vanilla* spp., que pertenece a la familia de las orquídeas (Orchidaceae); se puede encontrar en zonas boscosas de alta humedad y con temperaturas alrededor de los 20 a 30 °C, por lo que el clima tropical es ideal para su desarrollo (De La Cruz, Rodríguez & García, 2009; Hernández-Hernández, 2011; Paniagua & García, 2013). Se estima que existen 110 especies, de las cuales *V. planifolia*, *V. pompona* y *V. tahitensis* son las más empleadas a nivel comercial por sus características de aroma y sabor (Azoifeifa, Paniagua & García, 2014; Paniagua & García, 2013).

De acuerdo con FAO (2021), la producción mundial de vainas de vainilla en los últimos cinco años supera las 7000 t, siendo Madagascar el principal productor seguido por Indonesia, Papúa Nueva Guinea y México. La demanda a nivel mundial del fruto curado ronda las 12000 t (Palama, 2014); sin embargo, la insuficiente oferta no cubre las demandas del mercado actual, por lo que se ha recurrido al uso de vainilla sintética en las diferentes formulaciones (Soto, 2006; Pacheco 2009; Paniagua & García, 2013; Azoifeifa, Paniagua & García, 2014).

En los últimos años ha existido gran fluctuación en los precios de la vainilla desde los \$50 hasta los \$1000 por kilogramo de vainas según la especie y la época del año. Dichos precios se han visto afectados por una serie de eventos naturales que han comprometido la producción o aumentos en la producción que hacen caer el precio significativamente. En cualquiera de los casos, el precio de venta varía según las diferentes calidades del producto (Brownell, 2011; Hernández-Hernández, 2011; Palama, 2014; Nestlé, 2015; Havkin-Frenkel & Belanger, 2016; SpiceJungle, 2018).

Según han señalado Hjerl & Lykke (2016) y Nestlé (2015), el cultivo de vainilla es una actividad desarrollada en zonas con contextos sociales de pobreza. El producto requiere cuidado constante y mano de obra que en su mayoría tienden a ser mujeres y en algunos países niños. Las fluctuaciones en el precio han llevado a los productores a redoblar esfuerzos, pues se exponen a robos y asaltos por el alto valor del producto y la demanda insatisfecha (Watts, 2018). Adicional a

esto por lo general, el intermediario resulta ser quien obtiene las mayores ganancias mientras que los productores reciben pagos mínimos (Hjerl & Lykke, 2016).

En Costa Rica, de igual forma que en otros países, para el procesamiento de la vainilla se requiere gran cantidad de mano de obra, ya que es un proceso lento, delicado y laborioso, por lo que posee relevancia a nivel económico y social al involucrar familias de escasos recursos (Ecott, 2004; Nestlé, 2015; Paniagua & Azofeifa, 2014). Desde el año 2009 la asociación de productores APROVAINILLA, con apoyo de la Universidad Nacional de Costa Rica (UNA) y la Universidad de Costa Rica (UCR), se han encargado de localizar y capacitar a los productores en el país para lograr una comercialización más justa y con productos de mejor calidad (APROVAINILLA, 2020).

Según indica PROCOMER (2021), para el año 2000 Costa Rica exportó la mayor cantidad de vainilla registrada en el país: 4,3 t a América del Norte por un valor de casi \$185 000. Sin embargo, posterior a esta fecha las exportaciones de vainilla han permanecido fluctuantes. El registro más reciente corresponde a 0,3 t exportadas durante el 2018, por lo que no se sabe con certeza el estado de las exportaciones de este producto en los últimos dos años.

Para que los frutos vainilla desarrollen las características deseadas para la comercialización, el fruto se debe procesar. El punto de partida es la cosecha de las vainas en el momento adecuado de madurez, cuando el color es verde claro con amarillo; de lo contrario se obtiene un producto de menor calidad (De La Cruz, Rodríguez & García, 2009). El curado o beneficiado es un proceso enzimático que permite el desarrollo del aroma y la obtención de un producto microbiológicamente estable. Consta de cuatro etapas: el marchitamiento o “*killing*”, el sudado, el secado y el acondicionamiento.

El “*killing*” es un tratamiento combinado de tiempo y temperatura, cuyo objetivo es detener el proceso de maduración del fruto y suavizar los tejidos para potenciar la actividad enzimática (Frenkel *et al.*, 2011). Aún calientes los frutos se almacenan en cajas, donde se da el sudado; en este punto los frutos exudan parte del líquido contenido en su interior (Hernández-Hernández, 2011). Durante el secado las vainas se secan al sol entre 3 a 4 horas, o una asoleada; en este espacio de tiempo se favorece la actividad enzimática para la formación del aroma y a su vez disminuye muy lentamente la humedad. Luego de estar al sol, los frutos se envuelven en mantas y se guardan para que continúen transpirando. El secado es un proceso lento que se repite de varias

veces durante la semana hasta lograr el aspecto deseado de las vainas, que es determinado por cada productor. Finalmente se da el acondicionamiento, durante el cual la vainilla reposa en un cuarto ventilado para estabilizar el contenido de humedad y las características sensoriales.

Según las condiciones en las que se lleve a cabo el curado, así se darán las reacciones enzimáticas requeridas para la formación de los compuestos aromáticos. Por esto es importante que cada productor estandarice su proceso. Cada etapa incide en las características del producto final, un ejemplo de esto es la degradación de la clorofila que da paso a colores más oscuros (De La Cruz, Rodríguez & García, 2009; Hernández-Hernández, 2011; Frenkel *et al.*, 2011; Paniagua & García, 2013).

Aunque existe variabilidad en la composición química de las vainas, se han identificado aproximadamente 170 compuestos responsables del sabor y aroma característicos de la vainilla. Dentro de los principales componentes se encuentran la vainillina, el ácido vanílico, el *p*-hidroxibenzaldehído, el alcohol vanílico, entre otros. Estos compuestos pueden variar según el origen y el curado de las vainas; por ejemplo, la vainillina se encuentra entre 1,6% a 2%. (Havkin-Frenkel & Belanger, 2007; De La Cruz, Rodríguez & García, 2009 Longo & Sanromán, 2010).

En Costa Rica originalmente se cultivaron *V. planifolia* y *V. pompona*. Actualmente la mayoría de las plantaciones corresponden al Híbrido Costa Rica (HCR), que ha llamado la atención por su resistencia a enfermedades. Otra especie que se evalúa en esta investigación es *V. harti*, conocida también como “pincelito” y que presenta características físicas similares a *V. planifolia* (Soto & Dressler, 2010; Belanger & Havkin-Frenkel, 2011; Varela, 2011; Paniagua & García, 2013; Azofeifa, Paniagua & García, 2014).

En Costa Rica ha aumentado la disponibilidad de vainilla natural en supermercados, tiendas especializadas y ferias; sin embargo, la información disponible sobre la calidad y características de esta a nivel nacional es escasa. Se considera relevante, por los motivos antes mencionados, la recopilación y análisis de las características de las vainas de vainilla cultivadas y procesadas para la venta del consumidor local.

De forma paralela a esta investigación, se desarrolló la norma INTE/ISO5565-1 (2019), que sirvió de apoyo para la clasificación de las muestras. Se consideró a su vez los criterios señalados por la Norma Mexicana para vainilla de consumo humano (SE, 2009), así como los de otros autores,

tanto en características físicas de las vainas como otros factores determinantes en calidad, por ejemplo: la humedad final del producto beneficiado y el contenido de metabolitos aromáticos de interés antes mencionados.

Dentro del contexto económico y social en el que se produce la vainilla en Costa Rica, es importante establecer criterios de clasificación del fruto beneficiado que favorezcan la estandarización del proceso, para también obtener productos de mejor calidad. Por medio de la generación de información científica, se pretende dar un respaldo para el posicionamiento en el mercado nacional o internacional.

En la presente investigación se evaluó la relación entre las características físicas, la especie y la zona de cultivo, respecto al comportamiento de los principales metabolitos aromáticos presentes en vainas de vainilla verdes y beneficiadas. Los compuestos de interés serán analizados por medio de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Esta técnica de separación permite a su vez permite cuantificar los analitos por medio del uso de patrones y el espectro de absorción al contar con un detector ultravioleta (UV) (Barquero, 2004; Skoog *et al.*, 2010).

El uso de esta técnica para la identificación y cuantificación de compuestos en vainilla se encuentra ampliamente documentado y ha demostrado gran exactitud y precisión a lo largo del tiempo. Provee una adecuada separación de los analitos, permite trabajar tanto con componentes no volátiles como con aquellos que si lo son y disminuye errores asociados a interacciones con otros compuestos (Hoffman & Zapf, 2011; Ranadive, 2011).

La información obtenida se someterá a un análisis estadístico de componentes principales (PCA). Esta metodología es muy útil cuando se trabajan mediciones sobre varias variables simultáneas y pretende encontrar un reducido número de combinaciones lineales de ellas para así simplificar los datos y facilitar la comprensión y el análisis de estos (Hernández, 1998; Polo, 2005).

Con esta investigación se pretende colaborar con la comunidad vainillera de Costa Rica, al determinar las características físicas de los frutos verdes y beneficiados en cuatro especies de *Vanilla* spp., de las regiones Huetar Norte, Pacífico Central y Brunca. Se procederá a analizar los principales metabolitos presentes, evaluar de forma preliminar la interacción entre variables y explorar cómo podría mejorarse la calidad de los productos evaluados.

2. Objetivos

2.1. General

Evaluar la relación de las características fenotípicas, la ubicación y el estado de procesamiento sobre los principales metabolitos aromáticos en vainas de vainilla (*Vanilla* spp.) verdes y beneficiadas de tres regiones productoras en Costa Rica.

2.2. Específicos

1. Determinar las características fenotípicas de las vainas de *Vanilla* spp. verdes y beneficiadas, de tres regiones productoras en Costa Rica para identificar características según la región de producción.
2. Identificar y cuantificar los principales metabolitos contribuyentes al aroma presentes en las vainas de *Vanilla* spp. verdes y beneficiadas, de tres regiones productoras de Costa Rica, empleando cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a un detector ultravioleta (HPLC-UV).
3. Analizar la relación de las variables fenotípicas, la ubicación y el estado de procesamiento de las vainas de vainilla sobre los metabolitos aromáticos por medio de un análisis estadístico multivariado.

3. Marco Teórico

3.1. Aspectos generales

La vainilla natural proviene del fruto curado de *Vanilla* spp., perteneciente a la familia de las orquídeas (Orchidaceae). A diferencia de otras plantas de esta familia, este género se cultiva como saborizante y aromatizante en la industria de alimentos y cosméticos. Se ha trabajado durante años en mejoras con el fin de lograr mayor productividad, mayor variedad de aromas y mejorar la calidad del producto final (Cameron, 2011).

Se considera que su origen se dio en México y América Central (Havkin & Belanger, 2011); sin embargo, se encuentra naturalmente distribuida en otros países de América, África, Oceanía y Asia (Cameron, 2011; Bory *et al.*, 2011). Existen más de 100 especies, de las cuales *Vanilla planifolia* representa el 95% de la producción a nivel mundial, que también se comercializa como “vainilla Bourbon” cuando se produce en Madagascar (Bory *et al.*, 2011; Pignal, 2011). Pese a ser de la misma especie, se encuentra protegida por denominación de origen, por lo que se cree que las condiciones geográficas o ambientales tienen un rol en sus características.

Los frutos de *V. planifolia* se describen de aroma dulce, ligeramente picante y notas a tabaco. El procesamiento correcto de las vainas permite obtener concentraciones de vainillina superiores a 1,5% (m/m) en base seca, y los compuestos anísicos están prácticamente ausentes (Come, 2011; Hernández-Hernández, 2011; Takahashi *et al.*, 2013). Las vainas de *Vanilla pompona* se destinan principalmente a las aplicaciones farmacéuticas, cosméticas y de perfumería por sus notas más florales y dulces pero carentes de cuerpo. El contenido de vainillina es menor al 2%, en base seca, y presenta mayores concentraciones de ácido *p*-hidroxibenzoico (Ranadive, 2011). En contraste con *V. planifolia*, las vainas son más cortas y gruesas; su longitud se encuentra entre 10 y 17 cm y presenta una concentración de compuestos anísicos mayor a lo reportado comúnmente tanto en *V. planifolia* como en *V. tahitensis* (De la Cruz, Rodríguez & García, 2009; Paniagua & Azofeifa, 2013; Galeas, 2015).

En Costa Rica se ha registrado la presencia de *V. planifolia* y *V. pompona*, mas no de *V. tahitensis*. La primera se encuentra de forma silvestre en la Zona Atlántica; las vainas son casi cilíndricas y de 12 a 20 cm de longitud, mientras que *V. pompona* se ha encontrado en el Pacífico Sur y Puntarenas. (Paniagua & García, 2013; Azofeifa, Paniagua & García, 2014; Varela, 2011).

En este estudio se hace referencia a dos especies menos conocidas. En Costa Rica se ha encontrado que las plantaciones para producción comercial en su mayoría corresponden a un híbrido originado del cruce en dos etapas de *V. planifolia* con *V. pompona* y posteriormente con *V. planifolia*. Destacan entre las características del “Híbrido Costa Rica” (HCR) la resistencia a enfermedades, una longitud de más de 20 cm y concentraciones de compuestos vanílicos superiores al 2% en base seca (Varela, 2011; Paniagua & García, 2013; Azofeifa, Paniagua & García, 2014). Por su parte *Vanilla hartii*, no es una especie de explotación comercial ya que florea con menor frecuencia. Sin embargo, la planta presenta características físicas muy similares a *V. planifolia* y los frutos por su parte son de menor tamaño y tienden a ser más cilíndricos, fragantes y dulces (Soto & Dressler, 2010).

3.2. Cultivo de vainilla en Costa Rica

En los años 1990s en un esfuerzo entre instituciones estatales e internacionales se promovió el cultivo de *V. planifolia*, con el objetivo de aumentar los ingresos y mejorar la calidad de vida de comunidades en Quepos y Puerto Jiménez. Estos cultivos se perdieron como consecuencia del huracán César en 1996. Posteriormente, con el apoyo de instituciones como la Universidad de Costa Rica (UCR) y el Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio) se restauraron algunas pequeñas plantaciones. El cultivo del híbrido “Vaitsy” en los años siguientes fue parte de la respuesta que se dio a esta situación. Con el paso del tiempo y las fluctuaciones de los precios algunas plantaciones fueron abandonadas y surgieron otras (Varela, 2011).

En 2009 se crea la Asociación Nacional de Vainilleros Unidos (APROVAINILLA), que con el apoyo del Instituto de Investigación y Servicios Forestales de la Universidad Nacional de Costa Rica (INISEFOR-UNA) y del Centro de Investigaciones en Productos Naturales de la Universidad de Costa Rica (CIPRONA-UCR) brindan acompañamiento y capacitación a los productores para lograr productos de mejor calidad y lograr una comercialización más justa (APROVAINILLA, 2020).

Según mencionan Paniagua & García (2013) se encuentran plantaciones de vainilla en diferentes territorios: Pacífico Central, Pacífico Sur, Atlántico y en el norte del país. Para efectos de este estudio, se emplearon muestras de las regiones Pacífico Central, Brunca y Huetar Norte (Decreto N°7944, 1978).

3.3. Desarrollo y procesamiento de los frutos

Las plantas de vainilla se desarrollan durante 2 a 3 años antes de iniciar la etapa productiva. Se desarrollan grupos de inflorescencias similares a un racimo tal como se muestra en la Figura 1A. Posterior a la polinización, realizada de forma manual, se desarrolla el fruto (Figura 1B) y alcanza la madurez en los 7 a 8 meses siguientes (Hernández-Hernández *et al.*, 2010; Hernández-Hernández, 2011; Paniagua & Azofeifa, 2014).

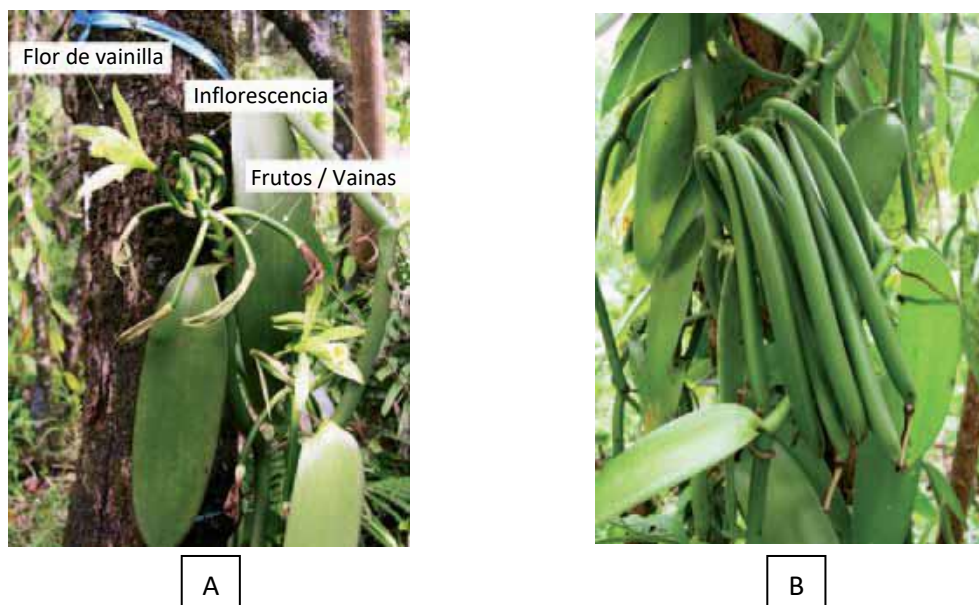


Figura 1. (A) Flor, inflorescencias, frutos en crecimiento y (B) frutos verdes desarrollados de *V. planifolia* (Kahane *et al.*, 2008).

Cuando el fruto se torna más redondeado y presenta un color verde brillante con los extremos amarillos es el momento ideal para la cosecha (Paniagua & García, 2013). Se pueden cosechar los racimos o cada vaina de forma individual. Si no se cosechan, continuarán el proceso natural de dehiscencia, lo que da como resultado, vainas abiertas de menor valor comercial. Si no han alcanzado la madurez apropiada pueden presentar bajo peso, menor contenido de compuestos aromáticos y mayor riesgo de crecimiento de moho (Hernández-Hernández *et al.*, 2010; Hernández-Hernández, 2011).

Posterior a la cosecha, se inicia el proceso de beneficiado o curado. El procesamiento de la vainilla es artesanal, requiere mucho trabajo manual y vigilancia constante, pues de ello dependen las características sensoriales del producto final (Paniagua & García, 2013). Los frutos maduros,

llamados también vainas verdes, carecen del aroma y características sensoriales propios de la vainilla. Esto se debe a que los compuestos que dan estas características se encuentran unidos a azúcares y otros compuestos que disminuyen la volatilidad. Beneficiar las vainas genera las condiciones apropiadas para que las reacciones enzimáticas y químicas formen el preciado aroma (Frenkel *et al.*, 2011). En la Figura 2 se ejemplifican las operaciones básicas requeridas para beneficiar la vainilla.

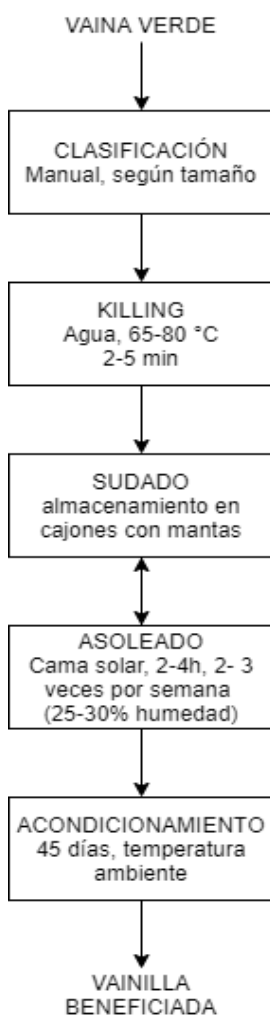


Figura 2. Diagrama explicativo del procesamiento de los frutos de vainilla. Elaborado con base a De la Cruz, Rodríguez & García (2009), Frenkel *et al.* (2011), Paniagua & García (2013) y Xochipa *et al.* (2016).

Las condiciones específicas del proceso varían según el país, el área o el productor, por lo que el producto final también varía. Aún con diversas formas de curar o beneficiar, las vainas tienen

en común las etapas presentadas en la Figura 2 (Hernández-Hernández, 2011; CNP, 2020). Adicionalmente, la Figura 3 muestra la vainilla (A) durante y (B) posterior al “*killing*”, en el secado al sol o asoleado (C) y en la etapa final del acondicionamiento (D).

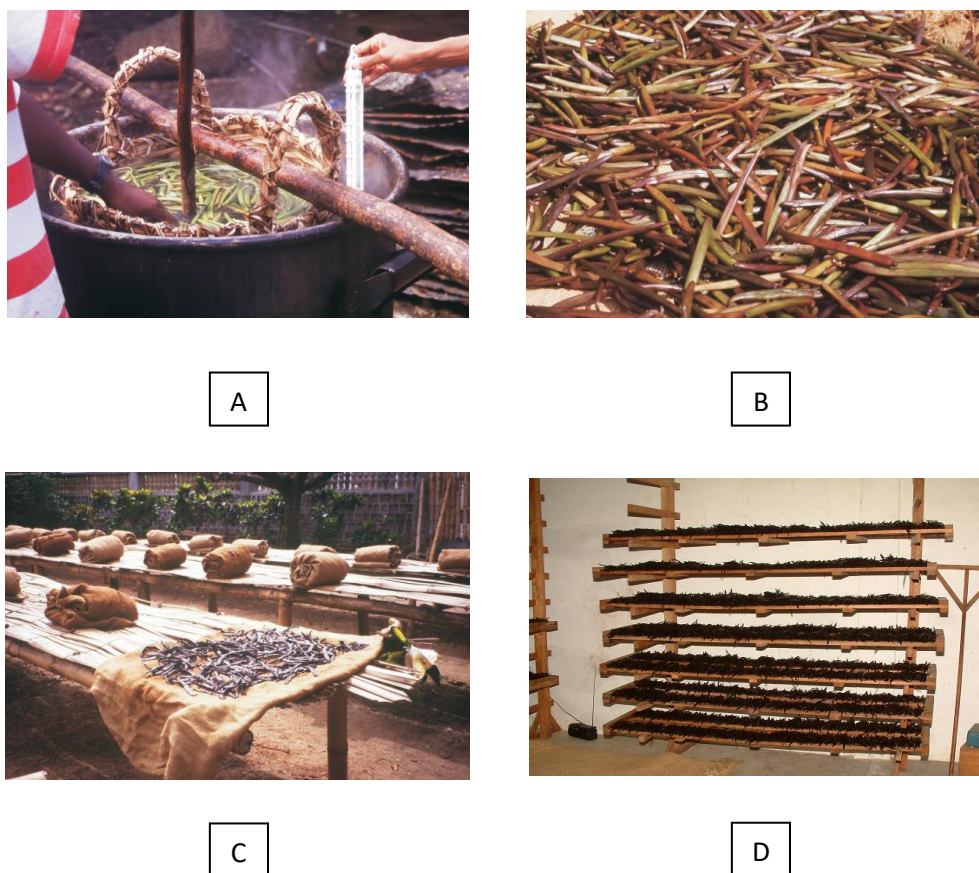


Figura 3. Representación gráfica del beneficiado de los frutos de vainilla durante el “*killing*” (A) y después del “*killing*” (B), asoleado (C) y acondicionamiento (D). (Odoux, 2006; De La Cruz, Rodríguez y García, 2009).

El primer paso consiste en clasificar las vainas. La separación permite diferenciar los frutos de forma grosera por tamaño y aquellos que se han abierto o presentan algún defecto. La clasificación permite un procesamiento más homogéneo en las etapas posteriores (Hernández-Hernández, 2011; Paniagua & García, 2013). El “*killing*”, o marchitamiento, es el nombre que se da al tratamiento térmico cuyo objetivo es detener los procesos vegetativos y poner en contacto las enzimas con los sustratos correspondientes (Frenkel *et al.*, 2011). Existen diferentes tratamientos combinando tiempo y temperatura, ya sea en agua caliente (Figura 3A) o por congelación. Un

indicador de que el proceso se ha realizado de forma apropiada es que las vainas tengan un color verde oscuro a café (Xochipa *et al.*, 2016), como se muestra en la Figura 3B.

Las vainas se guardan en cajas, generalmente de madera, para mantener el calor y favorecer la transpiración. De este modo se da el primer sudado y se da inicio a la deshidratación de las vainas (Hernández-Hernández, 2011). El color chocolate y la presencia de un aroma suave son indicativos de que se concluyó esta etapa apropiadamente; si el color no es el apropiado u homogéneo se colocan al sol hasta que cambien. La humedad inicial de las vainas es entre 70% - 80%, y disminuye cerca de un 10% en esta etapa (Xochipa *et al.*, 2016).

La siguiente etapa corresponde a secuencias o ciclos de secado al sol y sudado. Consiste en colocar las vainas de 3 a 4 horas al sol en camas o mantas (Figura 3C) durante las horas más calientes del día, alcanzando temperaturas entre 45°C a 65°C (Frenkel *et al.*, 2011; Xochipa *et al.*, 2016). Luego se envuelven en mantas y se guardan en cajones de forma que mantengan el calor y transpiren. Este procedimiento se repite 2 a 3 veces por semana hasta un máximo de 25 ciclos para las vainas de mayor tamaño (Hernández-Hernández, 2011).

El paso entre las etapas de secado y sudado son la clave y razón de ser del beneficio de la vainilla. Al mantener los frutos calientes por periodos prolongados de tiempo, se favorece la actividad enzimática que genera el aroma y características sensoriales tan buscados en el fruto. Se requiere especial cuidado y monitoreo constante, para que la humedad disminuya de forma gradual hasta un 25% a 30%, si el cambio es muy abrupto, la calidad sensorial se verá afectada (SE, 2009; Hoffman & Zapf, 2011; INTECO, 2019). Para esto se debe procurar agrupar los frutos que tienen tamaños y grosores similares y se debe revisar el avance del proceso de forma periódica (Hernández-Hernández, 2011).

El punto final del ciclo de secado y sudado es determinado por cada productor, puede ser entre 11 a 25 ciclos de sudado y asoleado, según el tamaño y características de los frutos (Xochipa *et al.*, 2016). Una práctica común para determinar el punto final es enrollar la vaina en un dedo, al soltarla, esta debe regresar a la forma original sin romperse y sin que los fluidos o contenido interno se derrame (Hernández-Hernández *et al.*, 2010).

Durante el procesamiento las mantas utilizadas, así como los cajones de sudado deben mantenerse limpias para evitar la proliferación de microorganismos no deseados (Xochipa *et al.*,

2016). El control de la temperatura, durante el secado al sol, no es una práctica muy extendida a nivel artesanal; pese a esto, es un punto de control a implementar en la estandarización del proceso. Se debe procurar que la temperatura no supere los 65°C ya que puede llevar a la inactivación de algunas enzimas, afectando el resultado final del proceso (Waliszewski *et al.*, 2009; Frenkel *et al.*, 2011).

El acondicionamiento es la última etapa, en esta se agrupan nuevamente las vainas de acuerdo con las características físicas y se colocan en camas o estantes en cuartos ventilados para que continúe el desarrollo del aroma y sabor durante 30 a 45 días. Se recomienda realizar inspecciones cada 15 días para evaluar el estado general de las vainas (Hernández-Hernández, 2011). Concluido este periodo se empacan y están listas para la venta (Zamora *et al.*, 2016).

3.4. Actividad enzimática y reacciones químicas durante el beneficiado de las vainas

Hay gran variedad de compuestos relacionados con el aroma de la vainilla beneficiada, se han identificado más de 150 componentes del aroma entre alcoholes, ésteres, ácidos, aldehídos y cetonas. Algunos compuestos se encuentran en cantidades relativamente bajas; pese a esto tienen relevancia en cuanto a las características sensoriales, pues la intensidad en estos casos no necesariamente es un reflejo de la concentración. Los compuestos más importantes son: la vainillina, el *p*-hidroxibenzaldehído, el ácido vanílico y el ácido *p*-hidroxibenzoico (Gassenmeier *et al.*, 2008; Cai *et al.*, 2019). En el Cuadro I se presentan los rangos de concentración reportados para *V. planifolia* de los compuestos de interés en esta investigación.

Los compuestos volátiles presentes y su concentración, son resultado de la actividad enzimática, químicas y biológica que se da durante el curado de las vainas. No solo la forma de realizar el curado cambia las características del producto final, sino también la especie con la que se trabaje (Dignum *et al.*, 2004; Hoffman & Zapf, 2011; Paniagua & García, 2013). En el fruto verde, los compuestos del aroma están almacenados en forma de glucósidos. Debido a esto, las enzimas tienen una participación esencial en el desarrollo del aroma y el sabor de la vainilla, al hidrolizar estos compuestos (Odoux, 2011b).

Cuadro I. Rango de concentración (m/v) de compuestos volátiles en extractos de vainas de vainilla beneficiada de *V. planifolia*.

Compuestos	Rango de concentración (% m/v)
Vainillina	0,93 a 2,28
Ácido Vanílico	0,02 a 0,14
<i>p</i> -hidroxibenzaldehído	0,04 a 0,15
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	0,001 a 0,069
Alcohol Vanílico	0,008 a 0,009
Alcohol <i>p</i> -hidroxibencílico	0,006 a 0,007
Acetovanillona	0,0013 a 0,0015
Guaiacol	0,0009 a 0,001
Alcohol Anísico	0,00023 a 0,00025
Ácido anísico	ND
Anisaldehído	ND

Elaboración propia a partir de Hernández-Hernández *et al.*, 2010; SE, 2011; Hoffman & Zapf, 2011; Xochipa *et al.*, 2016. ND: no detectado.

En la vaina están presentes hidrolasas, proteasas y glicosidasas. Las primeras se encargan del deterioro de las paredes celulares, lo que favorece el contacto entre enzimas y sustratos. Las proteasas actúan principalmente después del “*killing*” y se encuentran al interior de las vacuolas celulares. Entre las glicosidasas se presentan α y β -glucosidasas, α y β -galactosidasa y en menor proporción α y β -manosidasas; sin embargo, la β -glucosidasa es la más estudiada por su relación con la hidrólisis de la glucovainillina (Frenkel *et al.*, 2011; Podstolski, 2011).

No se ha logrado identificar todas las enzimas que participan en estos procesos, por dificultades técnicas e interferencias que se presentan durante su purificación. Sin embargo, se sabe que algunas de las β -glucosidasas tienen menor especificidad, por lo que pueden trabajar sobre diferentes sustratos (Odoux, 2011a; Guzmán & Zara, 2012; Khoiratty, Kodja & Verpoorte, 2018). En la Figura 4 se ejemplifica la hidrólisis de la glucovainillina durante el curado, se separa la vainillina de la glucosa, permitiéndole exhibir sus propiedades sensoriales.

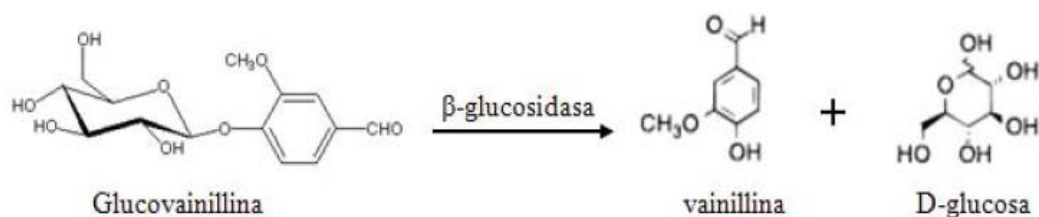


Figura 4. Reacción de hidrólisis enzimática de glucovanillina (Khoiratty, Kodja & Verpoorte, 2018).

La oxidación, en parte, resulta de la actividad enzimática. La polifenoloxidasas (PPO) y las peroxidasas se encargan naturalmente del cambio de color durante la senescencia de las vainas. Estas enzimas poseen la capacidad de degradar gran variedad de substratos celulares como aminoácidos y ácidos orgánicos que finalmente polimerizan en estructuras de color oscuro, dando el característico color café a las vainas curadas. Los lípidos también aportan al aroma por medio de la oxidación que aumenta la volatilidad por la formación de alcoholes, cetonas, aldehídos, entre otros (Frenkel *et al.*, 2011; Podstolski, 2011). El ácido *p*-hidroxibenzoico presente es otro ejemplo de estos procesos. Es el resultado de la acción de la enzima peroxidasa sobre el *p*-hidroxibenzaldehído, como se muestra en la Figura 5A (Pacheco, 2009). Mientras que el ácido vanílico se forma a partir de la peroxidación de la vainillina, (Figura 5B); sin embargo, este mismo compuesto puede llevar a la formación de guaiacol si experimenta una descarboxilación (Pérez, 2006).

Es importante conocer tanto sobre los procesos enzimáticos como de las reacciones que ocurren durante el curado, para comprender mejor la variación en la concentración de los diversos compuestos. No se puede perder de vista que, al detenerse los procesos vegetativos con el “*killing*”, las vainas de vainilla continúan siendo un sistema con actividad química y biológica que cambia en el tiempo, siempre y cuando no inactive las enzimas.

Según señalan Khoiratty, Kodja & Verpoorte (2018), la presencia de hongos endófitos en las vainas puede intervenir también en la formación del aroma, de forma similar al que se da en los viñedos. Se plantea es que cada sitio de cultivo corresponde a un sistema de cultivo diferente dónde los microorganismos juegan un papel importante, lo que contribuye a la diversidad de compuestos aromáticos.

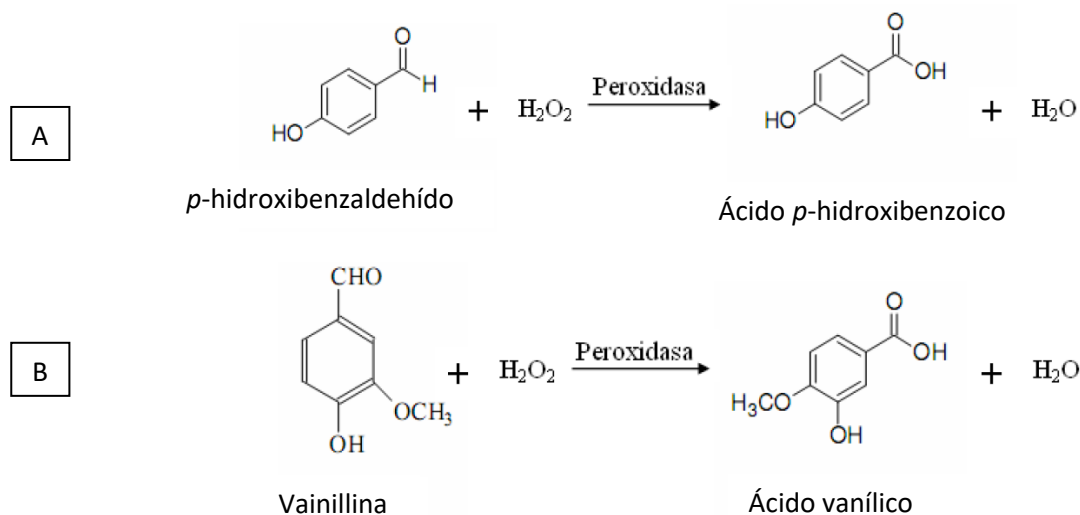


Figura 5. Reacciones mediadas por enzimas peroxidasa para la formación del ácido *p*-hidroxibenzoico (A) y el ácido vanílico (B) (Pérez, 2006).

3.5. Calidad del producto terminado

La calidad de un producto es el resultado de un conjunto de atributos deseados (Guzmán & Zara, 2012). En vainas de vainilla beneficiada son especialmente importantes los aspectos sensoriales y fisicoquímicos (Ranadive, 2011). Cuando las vainas de vainilla se benefician adecuadamente presentan una textura rugosa similar a una pasa, se doblan con facilidad sin quebrarse y regresan a la forma original; la coloración varía entre café claro hasta negro (Hernández-Hernández *et al.*, 2010; Xochipa *et al.*, 2016). El aroma de este producto es altamente complejo, de forma que varía mucho según la especie y las condiciones de curado. Entre los descriptores de interés se encuentran floral, anísico, almendrado, madera, dulce, chocolate y frutal (Lepers *et al.*, 2011; Toth *et al.*, 2011), también se procura evitar que se desarrollen notas a moho, tierra, vinagre, paja o agrio (Toth *et al.*, 2011).

Las vainas se clasifican según la calidad, y para esto se consideran características como el grosor, la longitud, el brillo, la flexibilidad, el aroma, el color y el contenido de vainillina. Existen diversas tablas de clasificación según las normas de cada país, e incluso pueden variar de acuerdo con el productor o cada finca (Hernández-Hernández, 2011). En los cuadros II, III, IV y V, se presentan los criterios teóricos considerados tanto de la Norma Mexicana para vainilla de consumo

humano (SE, 2009), como de la Norma Costarricense INTE/ISO5565-1 (2019), la de la finca Las Dos Manos Ltda. (Varela, 2011) y la del Rancho Santa Beatriz (Hernández-Hernández *et al.*, 2010), que son de relevancia para la investigación.

En cuanto al criterio de longitud, este se aplica desde las etapas iniciales del procesamiento, pues los frutos de mayor tamaño requieren un proceso un poco más extenso en comparación al que requieren las vainas más pequeñas (Paniagua & García, 2013). El color oscuro, el brillo y la flexibilidad se encuentran entre los principales indicadores de calidad para la vainilla beneficiada (De La Cruz, Rodríguez y García, 2009), por lo que son más relevantes en las categorías de mayor calidad y los criterios son más laxos conforme esta disminuye. La presencia de rayas rojizas se considera un defecto que disminuye la calidad del producto (Hernández-Hernández *et al.*, 2010) por lo que puede estar presente en la vainilla de menor grado.

La determinación de humedad no es un criterio de rechazo inmediato cuando se comercializa el fruto, porque requiere de equipo especializado y análisis en un laboratorio, pero puede afectar el precio de compra y es importante que se controle. Un contenido de humedad menor al 25% genera productos quebradizos y de menor valor aromático, mientras que productos con valores por encima del 30% se tornan más propensos al deterioro (Dignum, Kerler & Verpoorte, 2002; SE, 2009; INTECO, 2019).

Otros factores como el contenido de vainillina son de importancia; en *Vanilla planifolia* se espera de un 2,0 % a 2,4% para el fruto de mayor calidad. Las vainas con concentraciones de vainillina por debajo de 1,6% se deberían a procesos inadecuados (SE, 2009; INTECO, 2019). El aroma también es relevante, como lo menciona Odoux (2011a) y la Norma INTE/ISO5565-1 (2019). Así mismo es una variable compleja, motivo por el cual en ocasiones los autores se limitan a definirla como: “aroma característico, dulce, con ausencia de aromas a moho, pudrición o sustancias desinfectantes” (INTECO, 2019). Es decir, se debe considerar que el producto no presente aromas asociados a moho, pudrición o sustancias de limpieza para mantener una buena calidad.

Cuadro II. Especificaciones de la vainilla por grado de calidad y tipo de acuerdo con la Norma Mexicana para vainilla de consumo humano (SE, 2009).

Especificación	Grado de calidad					
	Extra	Categoría I		Categoría II		Categoría III
	Gourmet	Gourmet	Ordinaria	Gourmet	Ordinaria	Ordinaria
Características físicas	Gruesas sin rayas ni manchas, flexible y brillante.	Gruesas sin rayas ni manchas, flexible y brillante.	Delgada, con rayas, puede estar rajada	Gruesas sin rayas ni manchas, flexible y brillante.	Delgada, con rayas, puede estar rajada	De cualquier grosor, puede estar rajada o rayada
Humedad (%)	25 a 30	25 a 30	20 a 24	25 a 30	20 a 24	15 a 20
Vainillina (%)	2,0 a 2,4	2,0 a 2,4	1,6 a 2,0	2,0 a 2,4	1,6 a 2,0	1,6
Tamaño (cm)	≥20	≥17,5		≥15		<15

Cuadro IV. Criterios de clasificación de las vainas de vainilla en la finca Las Dos Manos Vanilla Ltda. en Costa Rica (Varela, 2011).

Grado	Color y brillantez	Tamaño (cm)	Vainillina (%)	Humedad (%)	N° de vainas por kilogramo
Mini	Café oscuro	14-15	2	20	-
Pequeña	Café oscuro, brillante	16-18	2	20	155
Mediana	Café oscuro, brillante	19-22	2	25	90
Grande	Café oscuro, brillante	23-26	2,5	25	78
Premium	Café oscuro, brillante	≥27	2,5	25	variable

Cuadro V. Calidad de vainilla beneficiada según tamaño en el Rancho Santa Beatriz en México (Hernández-Hernández *et al*, 2010).

Calidad	Intervalo de longitud (cm)
Gourmet o extra 1	20-21,9
Gourmet o extra 2	18-19,9
Gourmet o extra 3	16-17,9
Superior 1	14-15,9
Superior 2	12-13,9
Picadura	<12

3.6. Análisis de extractos de vainilla por medio de HPLC-UV

Para analizar los extractos de vainilla se dispone de diferentes técnicas de laboratorio desde las cromatográficas hasta las isotópicas según el enfoque deseado (Hoffman & Zapf, 2011). La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) es una de las técnicas más eficientes para la separación de sustancias y a la vez permite la identificación y cuantificación de analitos por medio del uso de patrones y el espectro de absorción si el detector usado es ultravioleta (UV).

Mediante esta técnica se busca una separación de compuestos por medio de una fase estacionaria (polar o no polar), la columna, y una fase móvil que transporta la muestra. Las interacciones no covalentes entre las dos fases y la disolución inyectada permiten separar los compuestos según su polaridad; aquellos con mayor afinidad a la fase estacionaria se desplazan más lento, generando una gradiente de velocidades entre los analitos (Barquero, 2004; Skoog *et al.*, 2010).

Cada sustancia tiene su propio espectro de absorción, al usar un detector UV es posible diferenciar un compuesto de otro (Quesada, 2007). A manera de ejemplo, en la Figura 6 se muestran los espectros de absorción de la vainillina (A) y el ácido vanílico (B); este comportamiento se mantiene a diferentes concentraciones. Como se ha mencionado, las vainas de vainilla beneficiadas tienen un aroma complejo formado por gran número de compuestos, por lo que en un cromatograma podrían coincidir el tiempo de retención de dos analitos diferentes, más no su espectro (Odoux, 2011).

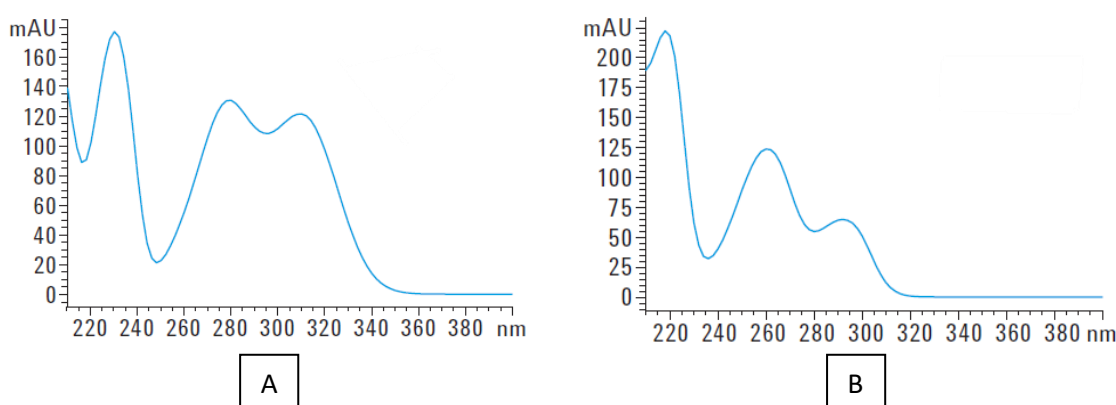


Figura 6. Espectro de absorción de la vainillina (A) y el ácido vanílico (B) en HPLC-UV (Huesgen, 2011).

El uso de la técnica HPLC-UV para analizar de extractos de vainilla se encuentra ampliamente documentada y se han implementado mejoras a lo largo del tiempo, cabe destacar que permite trabajar tanto con compuestos volátiles como aquellos que no lo son y un menor error por interacciones entre los compuestos (Hoffman & Zapf, 2011; Ranadive, 2011; Cai *et al.*, 2019). Para el análisis de los extractos, por su matriz y características la longitud de onda de 280 nm tiene buena selectividad para los diferentes metabolitos de interés pese a no ser la de máxima absorbancia de todos los compuestos (Sujalmi *et al.*, 2005; Waliszewski, Pardio & Ovando, 2006; Huesgen, 2011).

4. Materiales y Métodos

4.1. Localización

La caracterización fenotípica, los extractos de vainilla, la identificación, la cuantificación de compuestos y el procesamiento de los datos se llevó a cabo en las instalaciones del Centro de Investigaciones en Productos Naturales (CIPRONA), ubicado en la Ciudad de la Investigación de la Universidad de Costa Rica en Sabánilla, específicamente en el Laboratorio General y en la Unidad de Equipos Analíticos.

La recolección de muestras se dio entre los meses de diciembre 2017 a marzo 2018. La asignación de muestras a un determinado sector geográfico se hizo con base en la división por regiones socioeconómicas de Costa Rica, las que contemplan factores económicos, sociales, políticos y geográficos (Decreto n.º7944, 1978).

4.2. Descripción de la materia prima

La materia prima se compró directamente a los productores en las diferentes regiones. Se analizaron vainas de vainilla en dos estados de procesamiento (verdes y beneficiadas) de tres regiones productoras (Huetar Norte, Pacífico Central y Brunca) y correspondientes a las especies: *V. planifolia*, *V. pompona*, *V. hardii* y el híbrido Costa Rica (HCR). Las vainas se seleccionaron al azar de acuerdo con el criterio de cada productor y se recolectaron de forma manual. En el caso del fruto verde, el indicador de madurez es la presencia de tonalidades amarillas.

La materia prima recolectada se colocó en bolsas plásticas protegidas de la luz, se colocó en una hielera y se trasladó al CIPRONA. Las muestras verdes se almacenaron en congelación (-18 °C a -20 °C), y las beneficiadas se mantuvieron en refrigeración (4°C a 5°C) hasta el momento del análisis. Posterior a la determinación de humedad, se colocaron las muestras secas y molidas en frascos color ámbar (19 °C-20 °C) y resguardadas de la luz.

En la finca se recolectaron mediciones de temperatura y humedad relativa con un termohigrómetro, así como las coordenadas por medio de un dispositivo con sistema de posicionamiento global (GPS). Se verificó la ubicación de las fincas y se identificaron las tres regiones según se mencionó en la sección 4.1. Se analizaron vainas de vainilla de 14 productores

distribuidos de la siguiente forma: 6 en región Huetar Norte, 5 en Pacífico Central y 3 en la región Brunca. El número de muestras varió de acuerdo a la disponibilidad del material de cada productor. La identificación de cada especie la llevó a cabo previamente M.Sc. Amelia Paniagua (2018), especialista en agroforestería y silvicultura, que desde el año 2006 ha trabajado desde el INISEFOR-UNA con el cultivo de vainilla en sistemas agroforestales. En el Cuadro VI se detalla la identificación previamente realizada para cada productor.

Cuadro VI. Especies de vainilla estudiadas según el productor y la región de procedencia.

Región	Productor	Especie*
Pacífico Central	A	Híbrido HCR
	B	Híbrido HCR
	C	Híbrido HCR
	D	Híbrido HCR
	Y	Híbrido HCR
Huetar Norte	J	Híbrido HCR
	K	Híbrido HCR
	L	Híbrido HCR
	M	Híbrido HCR
	Q	<i>V. planifolia</i>
	V	<i>V. planifolia</i>
Brunca	H	<i>V. hardii</i> o “pincelito”
	O	<i>V. pompona</i>
	R	Híbrido HCR

*Clasificación a partir de la información suministrada por Paniagua (2018)

4.2.1. Codificación de las muestras de vainilla

Para la identificación se asignó un código de 5 caracteres a cada muestra:

- La primera letra corresponde al código del productor, puede ser cualquier letra entre la A y la Z
- La segunda se refiere al estado de la vaina: (V) verde o (L) beneficiada o curada.
- Los siguientes dos dígitos corresponden al número de vaina, asignado al azar entre 01 y el 12. Estas son las repeticiones por productor.
- El último dígito corresponde a la réplica de la extracción, que están entre 1 y 3.

Es decir, si se presenta el código AV012, este corresponderá a la extracción o réplica 2 de la vaina 01, en estado verde y del productor A.

4.2.2. Muestreo de las vainas de vainilla

En el Cuadro VII se detalla la cantidad de vainas de vainilla verdes y beneficiadas utilizadas en cada etapa. A cada vaina se le determinó humedad y se le realizaron extractos por triplicado.

Cuadro VII. Vainas de vainilla muestreadas según el análisis realizado.

Productor	Estado de procesamiento	Cantidad de Vainas Muestreadas *		
		Para la clasificación	Para la determinación de humedad	Para la elaboración de extractos
A	Verde	10	5	4
	Beneficiada	10	5	4
B	Beneficiada	6	4	4
C	Verde	10	5	3
	Beneficiada	12	6	3
D	Verde	10	5	5
	Beneficiada	11	6	6
Y	Beneficiada	11	6	6
J	Beneficiada	11	6	6
K	Verde	8	4	4
	Beneficiada	10	5	5
L	Verde	2	1	1
	Beneficiada	10	5	5
M	Verde	5	1	1
Q	Beneficiada	12	6	6
V	Beneficiada	10	5	5
H	Verde	8	4	4
	Beneficiada	4	4	4
O	Verde	2	1	1
	Beneficiada	1	1	1
R	Beneficiada	6	4	4

4.3. Materiales

Reactivos:

- Acetonitrilo grado HPLC
- Ácido acético
- Agua destilada y desionizada
- Etanol
- Metanol grado HPLC
- *p*-hidroxibenzaldehído 98% Aldrich Chemistry
- Acetovainillona $\geq 98\%$ Sigma Aldrich
- Ácido *p*-hidroxibenzoico $\geq 99\%$ Aldrich Chemistry, Reagent Plus®
- Ácido vanílico $\geq 97\%$ Fluka Analytical (HPLC)
- Ácido *p*-anísico $\geq 99\%$, Sigma Aldrich
- Alcohol *p*-hidroxibencílico ®SAFC, Sigma Aldrich
- Alcohol anísico, natural $\geq 98\%$, Sigma Aldrich
- Alcohol vanílico $\geq 98\%$ Sigma Aldrich
- Etilvainillina $\geq 98\%$ SAFC, Sigma Aldrich
- Guaiacol, natural $\geq 99\%$, Sigma Aldrich
- Vainillina 99% Sigma Aldrich, Reagent Plus®
- *p*-Anisaldehído, natural 98%, Sigma Aldrich

Equipos y útiles de laboratorio:

- Baño ultrasónico marca Branson®
- Dispositivo de posicionamiento global (GPS)
- Equipo HPLC marca Dionex®, modelo Ultimate 3000 (incluye inyector automático, bomba, detector y software)
- Estufa gravimétrica PRECISION®
- Estufa con conexión de vacío NAPCO®
- Filtro de papel, Whatman N° 41, sin cenizas
- Filtros de membrana de PTFE de 0,45 μm
- Molino de cuchillas Janke & Kunkel IKA®
- Termohigrómetro VICTOR VC230A

4.4. Caracterización fenotípica de las vainas de *Vanilla spp.* según la región productora

Se midió: largo, ancho y grosor de cada vaina, para lo que se empleó una regla y un Vernier. Según lo recomienda la Norma Mexicana para la vainilla de consumo humano (SE, 2009). Se consideró el color, brillo, flexibilidad y defectos como rajadas, manchas y crecimiento de mohos en la superficie de forma cualitativa por observación. Este análisis se hizo a un número variable de vainas (de 1 a 12) según disponibilidad de cada productor. Los datos recolectados se evaluaron por medio de una tabla de clasificación, que se detallará más adelante, para conocer la cantidad de vainas en cada categoría. A continuación, se explican los criterios para la recolección de los datos.

4.4.1. Largo, ancho y grosor

En la Figura 7, se muestra una representación de los puntos de medición para el largo, ancho y grosor (1, 2 y 3 respectivamente). El ancho y el grosor se midieron con Vernier y el largo con una regla metálica, ya que la escala del Vernier no es tan amplia para medir la longitud de las muestras. El grosor (3) se midió a la mitad del largo de la vaina.

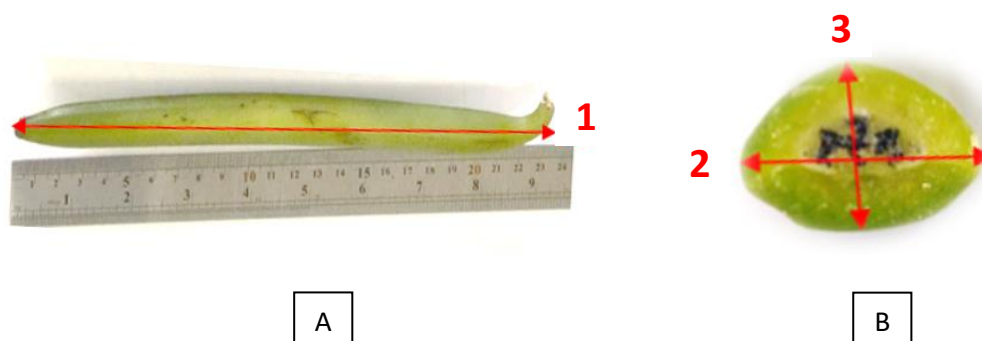


Figura 7. Vista lateral (A) y corte transversal (B) de una vaina de vainilla verde. Se indican los puntos de medición para (1) largo, (2) ancho y (3) grosor. Elaboración propia.

Los datos obtenidos de estas mediciones se sometieron a la herramienta de clasificación que se detalla en el apartado 4.5. Para evaluar las diferencias según la región, el productor, la especie y el estado de procesamiento los datos se analizaron mediante los ANDEVA correspondientes a cada comparación, con un 5% de significancia y se comparó por medio de una prueba de Tukey ($p < 0,05$) la presencia de diferencias significativas.

4.4.2. Color

La determinación de color se hizo de forma visual apoyado con las escalas de color presentadas en las Figuras 8 y 9. Para las vainas verdes se consideraron las coloraciones verde oscuro, verde y verde con amarillo, que son señalados por diversos autores como tonalidades presentes a lo largo del proceso de maduración del fruto (Hernández-Hernández, 2011; Paniagua & García, 2013).

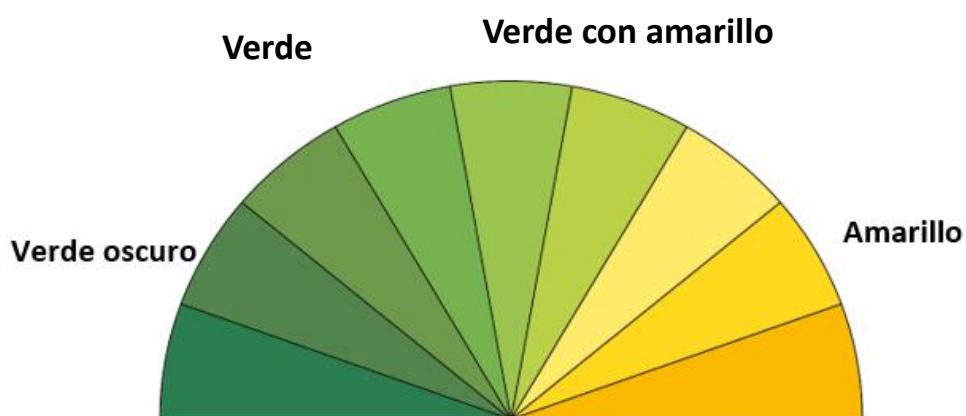


Figura 8. Código de color para vainilla verde o no beneficiada basado en escalas. Elaboración propia.

Para la vainilla beneficiada se emplearon las categorías de color que menciona la Norma Mexicana para vainilla de consumo humano (tonalidades de negro a café oscuro y claro). Se empleó la escala de color que se muestra en la Figura 9; la misma fue elaborada a partir de lo indicado en la normal previamente mencionada (SE, 2009). Estas observaciones se realizaron una única vez y los datos recolectados se evaluaron conforme a la teoría y por medio de la tabla de clasificación que se detalla más adelante; de esta forma se asignó la cantidad de vainas en las categorías de color correspondientes.

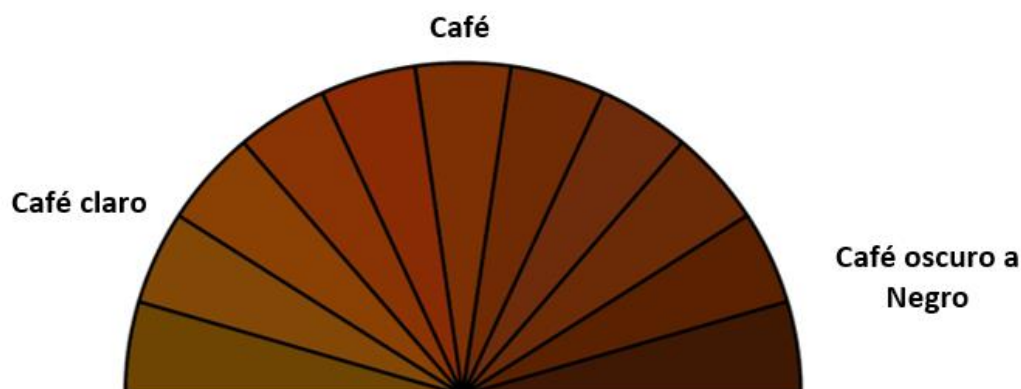


Figura 9. Código de color para vainilla beneficiada. Elaboración propia a partir de la Norma Mexicana (SE, 2009).

4.4.3. Brillo

Las vainas beneficiadas de mejor calidad son brillantes, según menciona De La Cruz, Rodríguez y García (2009). Por este motivo, para esta investigación, las vainas se clasificaron por observación en dos categorías: brillantes u opacas. Los resultados de esta clasificación se consideraron también en el análisis de defectos en la sección 4.4.5.

4.4.4. Flexibilidad

El fruto beneficiado debe ser fácil de doblar, al enrollarlo en un dedo y soltarlo debe retornar a la forma original sin romperse y debe presentar resistencia a la presión de los dedos sin quebrarse. Este criterio es de importancia ya que es el que emplean los compradores y productores como método empírico para definir si las vainas están “listas” (SE, 2009; Hernández-Hernández *et al*, 2010).

Se aplicó este criterio con base en la experiencia adquirida durante la visita a los productores para la compra de la materia prima. Esta observación se realizó una vez para cada vaina y se clasificaron en dos categorías: no flexible (es toda vaina que se quiebre, se abra o excrete alguna sustancia líquida) y flexible (toda vaina que no se quiebre ni se abra y tampoco excrete sustancias en el proceso). Los datos recolectados se evaluaron por medio de una tabla de clasificación, para obtener la cantidad de vainas en las categorías correspondientes. Los resultados se contemplaron también para el análisis de defectos en la sección 4.4.5

4.4.5. Vainas con defectos

Se consideraron defectuosas aquellas vainas que presenten uno o más de los siguientes defectos: se encuentran parcial o totalmente abiertas en forma longitudinal, presentan moho visible, se consideran opacas y aquellas que presentan leñosidad (SE, 2009; Hernández-Hernández *et al.*, 2010). Con base en estas características se determinó la cantidad de vainas defectuosas respecto al total. Para esto se empleó la fórmula que se presenta a continuación:

$$Vainas\ defectuosas(\%) = \frac{Vainas\ con\ defectos}{Total\ vainas\ evaluadas} * 100 \quad [1]$$

Los datos de las vainas se analizaron según el lugar de proveniencia por medio de los ANDEVA correspondientes a cada comparación, se empleó una significancia del 5% y se comparó por medio de una prueba de Tukey ($p < 0,05$) la presencia de diferencias significativas. Es importante señalar que las muestras con defectos, pese a esto, se emplearon en la elaboración de los extractos etanólicos.

4.4.6. Determinación del contenido de humedad de las vainas de vainilla

En la literatura se menciona que las vainas verdes presentan 80% de humedad aproximadamente, mientras las curadas deben contener entre un 25% a 30% de humedad como el rango ideal para lograr el adecuado balance entre preservación y calidad (Dignum, Kerler & Verpoorte, 2002; SE, 2009). Para la determinación se empleó la metodología gravimétrica de horno al vacío por triplicado (ASTA, 1985). Los cálculos correspondientes se realizaron de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$Humedad(\%) = \frac{masa\ inicial\ muestra - masa\ final\ muestra}{masa\ inicial\ muestra} * 100 \quad [2]$$

Posterior al análisis, las masas secas, se molieron nuevamente y se almacenaron en frascos color ámbar resguardadas de la luz y debidamente identificadas. Para cada vaina se determinó un valor promedio de humedad y un promedio general de humedad en vainas para cada productor. Para analizar las diferencias de las muestras según el estado de procesamiento, la región y el productor de origen se realizaron los ANDEVA correspondientes con un 5% de significancia y se comparó por medio de una prueba de Tukey ($p < 0,05$) la presencia de diferencias significativas.

4.5. Elaboración de una herramienta para la clasificación de la vainilla costarricense

Debido a que existen diversos criterios para evaluar la calidad de las vainas beneficiadas de vainilla, según se presentó en los Cuadros II, III, IV y V, en esta investigación se planteó elaborar una herramienta que unificara estos criterios. Para realizar dicha herramienta se utilizó la información de los cuadros mencionados y la información recopilada anteriormente por Zúñiga (2017), para lo que se obtuvo un cuadro resumen. Se aplicaron los criterios de longitud y coloración establecidos en la herramienta para clasificar cada vaina beneficiada, para obtener la cantidad de muestras en cada categoría ya sea por especie, región o productor de procedencia.

4.6. Identificación y cuantificación de los principales metabolitos aromáticos en las vainas de *Vanilla* spp. de tres regiones productoras de Costa Rica

4.6.1. Obtención de extractos de vainilla para la identificación y la cuantificación de compuestos del aroma.

Se realizaron extracciones para 23 vainas verdes y 59 beneficiadas por triplicado. Se empleó el procedimiento descrito por Arroyo (2016) con las modificaciones realizadas en el CIPRONA. La extracción se hizo en 10 mL de disolución etanólica, por cada 0,0001 g de muestra. Las muestras se colocaron en un baño ultrasónico por 30 min a una temperatura 21 °C – 24 °C. Posteriormente se filtraron en dos etapas, con papel Whatman N°41 por gravedad y con un filtro de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,45µm.

4.6.2. Identificación y cuantificación de los principales metabolitos aromáticos

4.6.2.1. Elaboración de la curva de calibración para metabolitos conocidos

Se inyectó cada patrón por separado en el cromatógrafo para determinar el tiempo de retención y el espectro de absorción del compuesto. Posteriormente, se elaboró la curva de calibración en concentraciones desde 2 ppm y hasta 400 ppm con 12 niveles. Cada dilución de la curva contiene los 12 patrones correspondientes: *p*-hidroxibenzaldehído, acetovainillona, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido *p*-anísico, alcohol *p*-hidroxibencílico, alcohol anísico, alcohol

vanílico, etil vainillina, guaiacol, vainillina y *p*-anisaldehído. Se inyectaron las diluciones en el HPLC-UV para construir una curva de calibración, donde se relacionan las áreas obtenidas con las concentraciones por medio de la ecuación a partir de la recta de mejor ajuste.

4.6.2.2. Análisis cromatográfico de los extractos de vainilla

Los extractos se analizaron por medio de cromatografía líquida de alta eficacia, utilizando un equipo de HPLC acoplado a un detector UV a partir del método descrito por Huesgen (2011) en fase reversa con una columna C18, a $\lambda = 280$ nm y modificaciones adicionales realizadas en el CIPRONA. A los cromatogramas obtenidos, se les realizó una reducción del ruido de forma manual, posteriormente se extrajo del equipo los datos de integración (área bajo la curva).

La identificación de los compuestos aromáticos se realizó a partir del tiempo de retención y el espectro de absorción UV de los compuestos patrón, determinados previamente en la curva de calibración. Aquellos que no coincidieron se les denominó “compuestos desconocidos” y se les asignó un consecutivo de acuerdo con el tiempo de retención (desconocido 01, desconocido 02, etc.) y se incluyeron posteriormente en el PCA. Una vez concluido este análisis y se cuantificaron los metabolitos en aquellos casos donde existe un patrón de referencia, por medio de las ecuaciones correspondientes a las curvas de calibración.

4.7. Análisis estadístico de los datos experimentales

4.7.1. Compuestos no identificados y contenido de metabolitos aromáticos

Para evaluar las diferencias entre las áreas bajo la curva de los compuestos no identificados por medio de HPLC-UV, de acuerdo con el estado de procesamiento, la región, la especie y el productor, se realizaron los ANDEVA correspondientes, empleando una significancia del 5% y se comparó por medio de una prueba de Tukey ($p < 0,05$) la presencia de diferencias significativas.

De forma similar, se evaluaron las diferencias en el contenido de metabolitos aromáticos de acuerdo con el estado de procesamiento, la región, la especie y el productor. Para esto se realizaron los ANDEVA correspondientes a cada comparación, con una significancia del 5%, y para la presencia de diferencias significativas se empleó la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

4.7.2. Ajustes de los cromatogramas para el análisis de componentes principales

Para realizar el análisis de los cromatogramas se normalizaron los datos experimentales de forma que fueran comparables (Wu, 2012). En este caso se trabajó con áreas relativas a la masa de muestra para incluir tanto los compuestos identificados, como los desconocidos.

4.7.3. Análisis de componentes principales

Se realizó un PCA por medio del software SIMCA (versión 13.0.3) con el fin de explorar la posible correlación entre las variables analizadas y la relación entre las muestras estudiadas. Se evaluó el comportamiento de los datos, la presencia de muestras extremas, los agrupamientos y comportamientos particulares de acuerdo con las variables evaluadas.

Para la construcción de los modelos se consideraron las características físicas, la especie, el estado de procesamiento y la región de origen. Se excluyó la variable “productor” debido a que no generaba datos claros sobre tendencias en el comportamiento o en la comprensión del modelo. Se analizó el ajuste del modelo, el número de componentes principales, y la presencia de muestras extremas. Se seleccionó el modelo que explicaba el mayor porcentaje de variabilidad de los datos experimentales.

5. Resultados

5.1. Determinación de las características fenotípicas de las vainas de *Vanilla* spp. verdes y beneficiadas en tres regiones productoras de Costa Rica

5.1.1. Clasificación de las vainas de vainilla beneficiada

A continuación, en el Cuadro VIII se presenta la herramienta elaborada para la clasificación de los frutos de vainilla beneficiados, de acuerdo con los criterios de calidad y clasificaciones existentes en la literatura.

Cuadro VIII. Herramienta empleada para la clasificación de vainas de vainilla según calidad.

Categoría	Largo (cm)	Color	Humedad Esperada (%)
Extra	≥22	Negro a café oscuro, brillante	25-30
Premium	≥19,5		
Superior 1	≥17	Negro a café, brillante	
Superior 2	≥14,5		
Superior 3	≥12	Negro a café claro, puede presentar rayas o aberturas	
Picadura	<12	Negro a café claro, puede presentar rayas o aberturas	<25

Elaboración propia con base en: SE (2009), Varela (2011), Hernández-Hernández *et al.* (2010), Zúñiga (2017) e INTECO (2019).

En la Figura 10 se presenta la clasificación general de las muestras beneficiadas al aplicar la herramienta elaborada. Se encontró que más del 60% de las muestras se ubican en las mejores categorías de calidad: “extra”, “premium” y “superior 1”. Tener un alto porcentaje de muestras en estas categorías es un indicio del potencial de la vainilla de producción nacional, que puede reflejarse en altos ingresos para las familias productoras con la herramienta de clasificación elaborada.

En la categoría de menor calidad (“picadura”) solo se ubica un 5,5% de las muestras, siendo este valor menor a los datos reportados por Gassenmeier *et al.* (2008). Los autores señalan que, en países como Madagascar y Papúa Nueva Guinea, principales productores a nivel mundial,

durante la cosecha 2006-2007 reportaron de 20% a 35% de vainilla de baja calidad o “picadura” (Gassenmeier *et al.*, 2008).

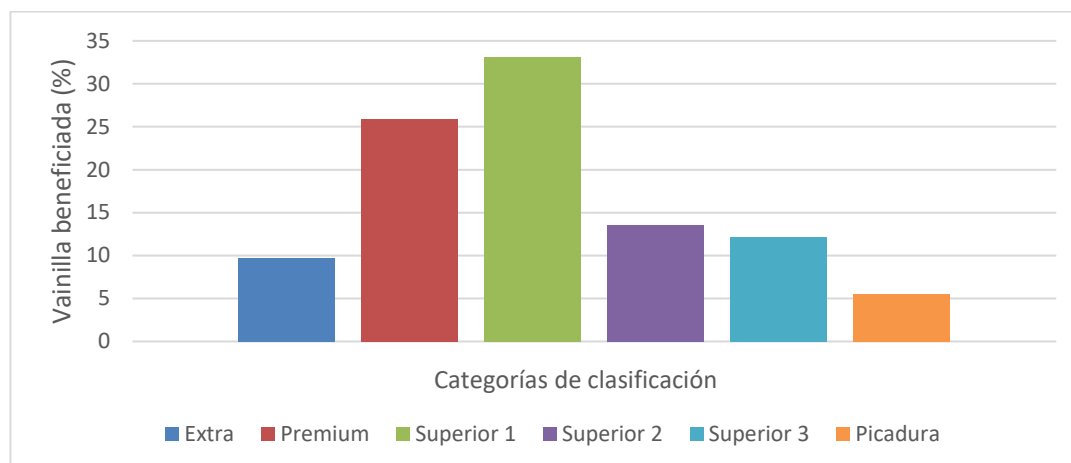


Figura 10. Cantidad de vainilla beneficiada en cada categoría con base al criterio de longitud.

En la Figura 11 se presenta la clasificación de las vainas de vainilla beneficiadas para cada región. Las muestras evaluadas de la región Pacífico Central presentaron un 55,3% de vainilla en la categoría “superior 1” y en menor proporción “picadura”, “superior 3” y “extra”. Se puede extraer de la Figura 11 que este es un producto más homogéneo, ya que más del 50% del producto se ubica en una única categoría. El 80% de las muestras del Pacífico Central se encuentra entre las categorías “extra”, “premium” y “superior 1”, y menos de un 3% en las categorías de baja calidad. Se puede considerar que tanto las características de la región, las prácticas de curado y la especie cultivada, podrían tener un impacto positivo en la calidad de este producto.

El comportamiento de las muestras varía para las regiones Huetar Norte y Brunca, esto podría relacionarse a la diversidad de especies que conforman las muestras. En la región Huetar Norte, las muestras se encuentran distribuidas entre las seis diferentes categorías; es un producto más heterogéneo, cuenta tanto con vainas de alta calidad en las categorías “extra” y “premium”, así como otras de menor calidad en “superior 3” y “picadura”. Las muestras de la región Brunca se encuentran en cuatro categorías, el producto de esta región es heterogéneo también. Las diversas calidades presentes pueden relacionarse tanto a las características de cada especie como el estado de la planta, el momento de la cosecha o la variabilidad propia del cultivo (De La Cruz, Rodríguez y García, 2009; Paniagua & García, 2013). Para entender mejor el comportamiento que se presenta

en las regiones Huetar Norte y Brunca se recomienda aumentar el tamaño de la muestra e incluso previo a esto, evaluar si las plantas están en adecuadas condiciones para la producción y si las especies que se están cultivando y las prácticas de curado son apropiadas (Azofeifa *et al.*, 2018).

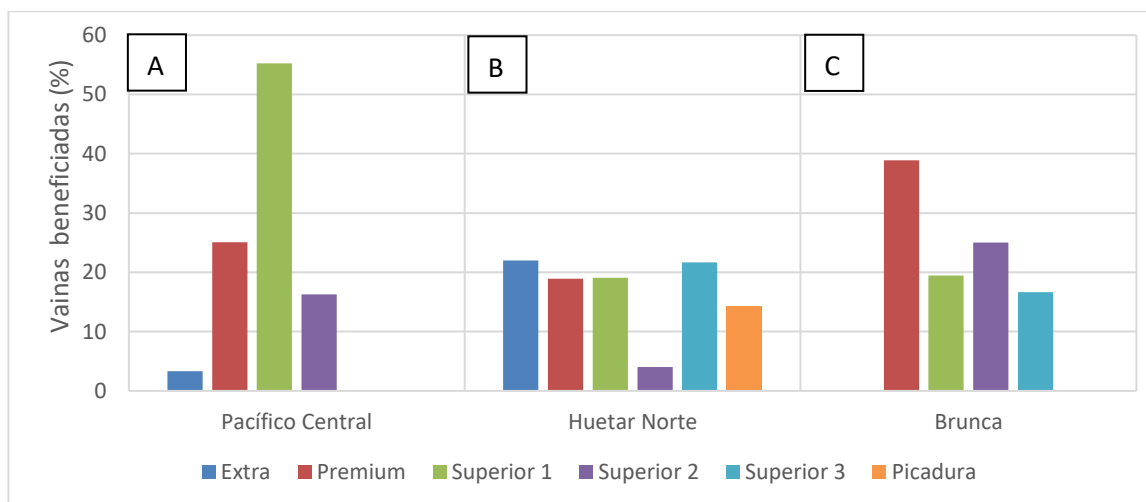


Figura 11. Clasificación de vainas de vainilla beneficiadas según la región de producción en Costa Rica con base en la herramienta elaborada. A) Pacífico Central B) Huetar Norte C) Brunca.

En la Figura 12 se detalla la cantidad de vainilla por categoría para cada productor evaluado. Las vainas de *V. pompona* del productor O y las del HCR beneficiadas por L, son las que exhiben las características más deseables. La vainilla O no presentó defectos, en cuanto a las muestras del productor L, es importante que se verifique la madurez del fruto al momento de la cosecha y evitar secar en exceso las vainas, así mantendrá mejores características sensoriales, pues se encontró leñosidad en las muestras.

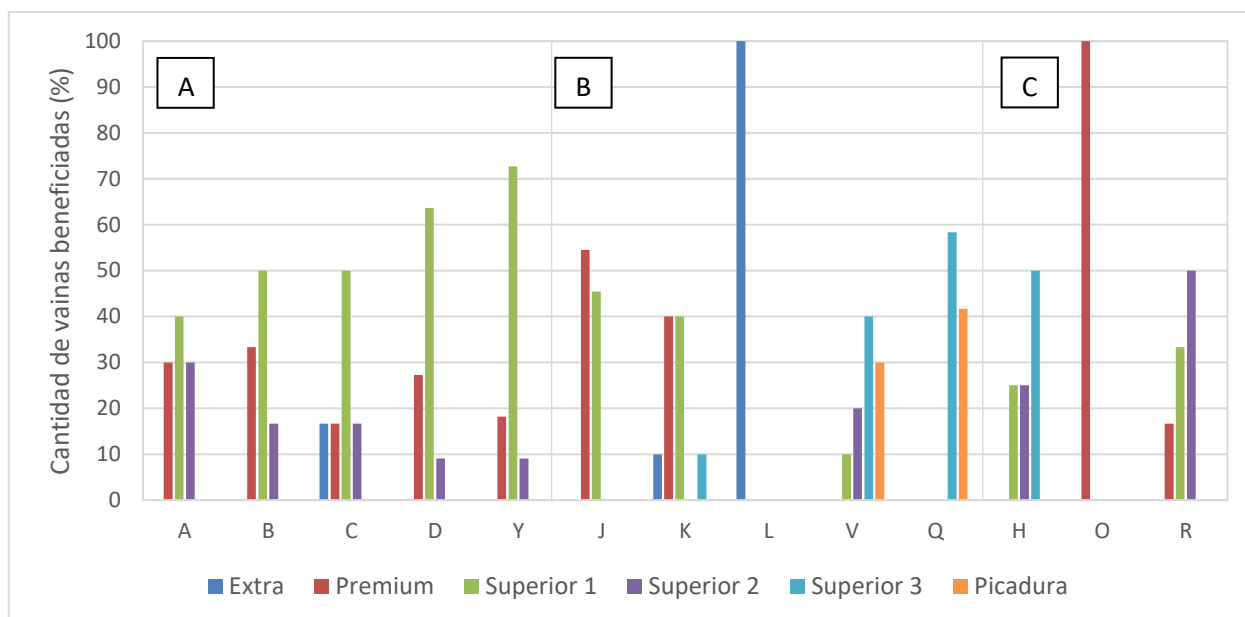


Figura 12. Clasificación de vainas de vainilla beneficiadas para cada productor evaluado con base en la herramienta elaborada. A) Pacífico Central B) Huetar Norte C) Brunca.

Las categorías “superior 1” y “superior 2” son calidades intermedias y se presentan en diez de trece productores evaluados. Previamente se mencionó que la vainilla del Pacífico Central posee mayor cantidad de muestras en categoría “superior 1”. En la Figura 12 se aprecia como los productores de dicha región (A, B, C, D y Y) tienen más del 40% de su producto en esta categoría.

En la categoría “superior 3” encontramos productores tanto de la región Huetar Norte como de la Brunca y corresponden a diferentes especies de vainilla: *V. planifolia*, *V. pompona*, HCR y *V. hardii*. En esta categoría se encuentran defectos que evidencian malos manejos durante el beneficiado y frutos que sencillamente son de menor calidad únicamente por ser más pequeños. Los valores correspondientes a “picadura” para las muestras de la región Huetar Norte (Figura 11) son debido a los productores V y Q. Ambos cultivan *V. planifolia*, las muestras tenían menor tamaño y evidenciaban falta de control en el beneficiado, pues presentan defectos en cuanto a flexibilidad o leñosidad y contenidos de humedad menores al 20%. Todo esto en conjunto se traduce en una calidad pobre.

5.1.2. Determinación del largo, ancho y grosor de las vainas de vainilla

En el Cuadro IX se presentan las dimensiones promedio de largo ancho y grosor para las vainas de vainilla verdes y beneficiadas de las regiones Huetar Norte, Pacífico Central y Brunca. De acuerdo con esto, las vainas de vainilla verde no presentan diferencias significativas ($p=0,599$; $p=0,663$; $p=0,966$) para el largo, ancho y grosor en las tres regiones estudiadas. Por su parte las beneficiadas no presentan diferencias significativas ($p=0,798$; $p=0,390$) en cuanto a largo y ancho por región.

En la región Brunca se identificaron tres especies: *V. pompona*, el Híbrido Costa Rica (HCR) y *V. hardii*, también conocida como “pincelito”, mientras que en las regiones Huetar Norte y Pacífico Central predomina el cultivo del HCR (Paniagua, 2018). De forma que la diversidad de especies en conjunto con un reducido número de productores de estas podría haber afectado el valor obtenido para el grosor de las vainas de vainilla en la región Brunca.

Cuadro IX. Dimensiones promedio (largo, ancho y grosor) de vainas verdes y beneficiadas de tres regiones de Costa Rica.

Región	Vainas de vainilla verde			Vainas de vainilla beneficiada		
	Largo (cm)	Ancho (cm)	Grosor (cm)	Largo (cm)	Ancho (cm)	Grosor (cm)
Huetar Norte	18 ± 3^a	$1,5 \pm 0,4^a$	$1,2 \pm 0,2^a$	17 ± 4^a	$0,9 \pm 0,2^a$	$0,4 \pm 0,1^a$
Pacífico Central	20 ± 2^a	$1,9 \pm 0,2^a$	$1,3 \pm 0,1^a$	18 ± 2^a	$1,2 \pm 0,2^a$	$0,44 \pm 0,07^a$
Brunca	19 ± 3^a	$1,8 \pm 0,7^a$	$1,2 \pm 0,4^a$	17 ± 2^a	$1,4 \pm 0,6^a$	$0,34 \pm 0,09^b$

Para cada columna, letras diferentes representan diferencias significativas ($p<0,05$) de acuerdo a la región.

Al comparar los dos estados de procesamiento, se encontró que el grosor de las vainas disminuye significativamente ($p<0,05$) después del beneficiado. Esto se asocia al proceso de curado, donde el fruto pierde aproximadamente dos terceras partes de su masa en agua, generando a su vez una disminución en el volumen. El punto final del proceso lo determina cada productor; esto tiene impacto en la humedad final del producto, así como en las dimensiones, masa y calidad de las vainas (Xochipa-Morante *et al.*, 2016). La literatura es poco específica en cuanto a que se considera mayor o menor grosor, pero señala en reiteradas ocasiones que el grosor puede variar según la

especie y que las vainas más gruesas son de mejor calidad (De La Cruz, Rodríguez & García, 2009; Frenkel *et al.*, 2011).

Para evaluar a mayor detalle las dimensiones de los frutos, en el Cuadro X se presentan los valores promedio para cada especie evaluada, tanto en verde como en beneficiada. Entre las especies en estudio, las dimensiones de largo, ancho y grosor presentan diferencias significativas ($p < 0,05$) para cada estado de procesamiento. Pese a que la diferencia entre categorías de clasificación de la herramienta no es tan clara o evidente, no implica que todos los productos sean similares. Si no que, en este caso, la dispersión entre los datos es alta. Cada productor presentó vainas con diferentes dimensiones; estas variaciones se ven reflejadas en desviaciones estándar que incluso superan el ± 1 cm. La vainilla es un fruto, y al igual que en otros productos agrícolas no todos los frutos de la misma planta son idénticos en sus características físicas. Por esta razón se generan diversas clasificaciones en cuanto a calidad (De La Cruz, Rodríguez y García, 2009; Paniagua & García, 2013).

Cuadro X. Dimensiones promedio (largo, ancho y grosor) de las vainas verdes y beneficiadas según la especie.

Especie	Vainas de vainilla verde			Vainas de vainilla beneficiada		
	Largo (cm)	Ancho (cm)	Grosor (cm)	Largo (cm)	Ancho (cm)	Grosor (cm)
<i>V. planifolia</i>	ND	ND	ND	12 ± 2^c	$0,8 \pm 0,2^c$	$0,4 \pm 0,1^a$
<i>V. pompona</i>	$22,2 \pm 0,3^a$	$2,6 \pm 0,2^a$	$1,67 \pm 0,07^a$	$22,0 \pm 0,1^a$	$2,6 \pm 0,1^a$	$0,360 \pm 0,001^{ab}$
<i>V. hardii</i>	16 ± 2^b	$1,0 \pm 0,1^c$	$0,7 \pm 0,2^c$	15 ± 2^{bc}	$0,6 \pm 0,1^c$	$0,3 \pm 0,1^b$
HCR	20 ± 2^a	$1,8 \pm 0,3^b$	$1,3 \pm 0,1^b$	19 ± 2^{ab}	$1,1 \pm 0,2^b$	$0,44 \pm 0,07^a$

Para cada columna, letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre especies. ND: muestras no disponibles.

Se encontraron diferencias ($p < 0,05$) entre las especies identificadas tanto para las vainas verdes como las beneficiadas y estos pueden estar asociados a características propias de las mismas. Los frutos de *V. pompona* son los de mayor longitud y ancho para ambos estados de procesamiento, esto difiere parcialmente de la teoría ya que generalmente esta especie presenta vainas de 10 cm a 17cm; sin embargo, son congruentes con un ancho superior a los 2,5 cm (Paniagua & García, 2013). Las vainas verdes de HCR son iguales en longitud a las de *V. pompona*, pero de menor ancho. Tanto *V. planifolia* como *V. hardii* presentaron las menores dimensiones en cuanto al largo y al ancho de las vainas evaluadas. Como consecuencia de esto, se espera que las vainas de *V. pompona* y del híbrido se consideren de mayor calidad (Ranadive, 2011) y por tanto estos productores podrían

obtener mayores ganancias por dicho producto si mejoran el procesamiento. Adicionalmente en la sección de Anexos, los Cuadros XV y XVI detallan las dimensiones de las muestras evaluadas según la región y especie de origen.

5.1.3. Categorización de las vainas de vainilla por color

El color es una forma práctica conveniente y sencilla para evaluar la maduración de los frutos. Para las vainas de vainilla verde, se consideraron coloraciones “verde oscuro”, “verde” y “verde con amarillo”. En la Figura 13 se presenta la cantidad de muestras por categoría de color para vainilla sin curar. En el estado óptimo de madurez, las vainas son verdes con coloraciones amarillas en la zona apical (Paniagua & García, 2013). El 42% de las vainas, respecto al total, son color “verde oscuro”; es decir, no se cosecharon en el momento ideal y podrían generar un producto beneficiado de menor calidad por una cosecha temprana. En este grupo se ubican frutos provenientes de las tres regiones; los productores A, K y H poseen el 83% de las vainas con coloración oscura, lo que representa un 35% del total de vainas verdes evaluadas y por lo tanto una gran cantidad de las muestras verdes evaluadas no estaban en las condiciones óptimas de madurez para la cosecha.

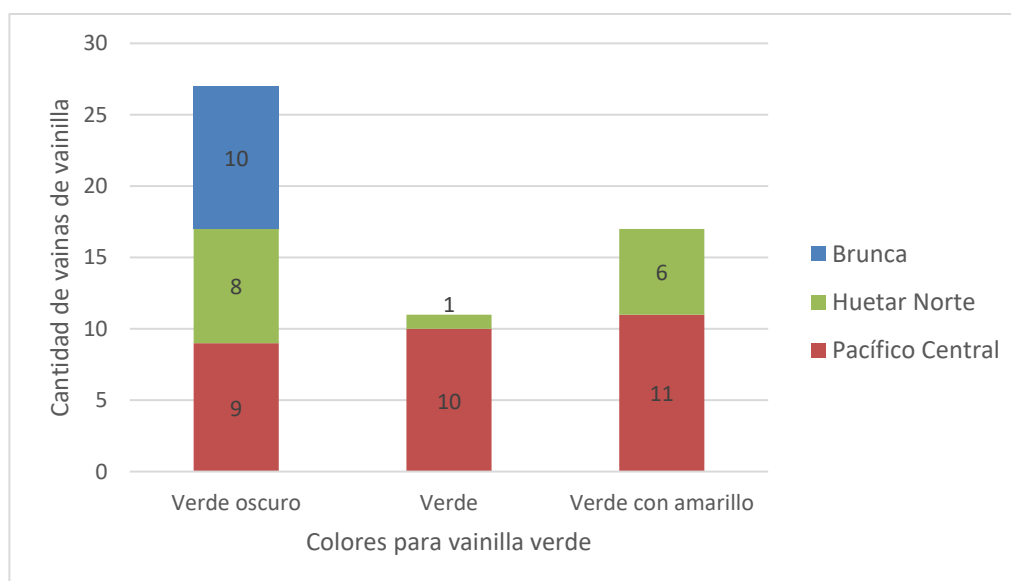


Figura 13. Cantidad de vainas de vainilla verde según cada categoría de color.

Los frutos color “verde” y “verde con amarillo” podrán desarrollar mejores características sensoriales durante el curado y representan el 58% de las vainas verdes evaluadas (Hernández-Hernández *et al.*, 2010; Hernández-Hernández, 2011; Odoux, 2011b). Es decir, hay tanto frutos que han sido cosechados en el momento adecuado mejorando las condiciones para el beneficiado posterior, como otros que se han cosechado antes de tiempo. Esto es relevante, ya que no solo corresponde a una característica física visible, sino que en esa etapa se da un aumento en el contenido de vainillina glicosilada y de las enzimas glucosidasas necesarias para las reacciones de hidrólisis que forman compuestos aromáticos importantes (Lapeyre *et al.*, 2011). Es decir, si las condiciones de madurez no son las adecuadas, los frutos beneficiados pueden presentar un menor contenido de compuestos aromáticos.

En las vainas curadas, la coloración se considera una característica diferenciadora en cuanto a calidad, siendo las coloraciones oscuras las más deseables (De La Cruz, Rodríguez y García, 2009). Se emplearon las categorías “café claro”, “café” y “café oscuro a negro” según la escala presentada en la Figura 10. En la Figura 14 se representa la cantidad de muestras por categoría de color para el producto beneficiado. El color café que desarrollan las vainas se asocia a la actividad de la enzima polifenoloxidasas. La exposición de los frutos a altas temperaturas por periodos prolongados acelera el secado de las vainas, pero puede inhibir el pardeamiento por la desnaturalización de las enzimas (Waliszewski *et al.*, 2009). El 85% de los frutos beneficiados evaluados se encuentran en la categoría “café oscuro a negro”, como resultado de un proceso de secado adecuado que permite el desarrollo de características de mayor calidad (De La Cruz, Rodríguez & García, 2009). En este segmento se encuentran representadas las vainas de las tres regiones evaluadas.

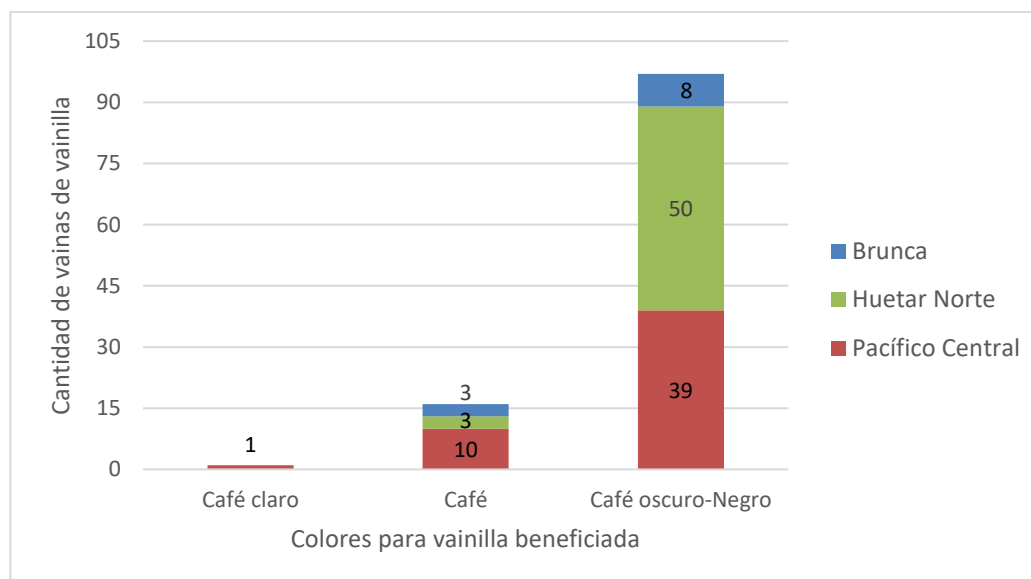


Figura 14. Cantidad de vainas de vainilla beneficiada según cada categoría de color.

5.1.4. Humedad de las vainas de vainilla

En el Cuadro XI se presentan los resultados de la determinación de humedad realizada en vainas verdes y beneficiadas de las tres regiones productivas estudiadas. No se encontraron diferencias significativas ($p=0,847$) en cuanto al contenido de humedad de las muestras verdes de las tres regiones evaluadas. La literatura reporta datos alrededor de 80% de humedad en vainas verdes, por lo que los valores obtenidos corresponden con lo esperado (Odoux, 2011b; Pérez *et al.*, 2011). La vainilla beneficiada presenta diferencias significativas ($p<0,05$), siendo mayor el contenido de humedad en las vainas del Pacífico Central y estas superan los valores recomendados. De acuerdo con la norma INTE/ISO5565-1 (2019) la humedad apropiada es entre 20% y 30%. En vainilla beneficiada, estos valores de humedad tienen asociada una actividad de agua (A_w) que puede superar 0,85. Pese a que el deterioro por microorganismos se da a partir de 0,65 A_w , no es común que se presente deterioro durante el almacenamiento si se mantienen los valores de humedad recomendados (Odoux, 2011b). Para mayor detalle del contenido de humedad, en el cuadro XVII (sección de anexos) se detallan los valores promedio para las muestras verdes y beneficiadas según su región y especie de origen.

Cuadro XI. Contenido de humedad promedio para vainas verdes y beneficiadas de vainilla de tres regiones productivas de Costa Rica.

Región	Humedad promedio (g/100 g)	
	Vainas verdes	Vainas beneficiadas
Huetar Norte	80 ± 2 ^a	22 ± 10 ^b
Pacífico Central	81 ± 2 ^a	40 ± 14 ^a
Brunca	78 ± 8 ^a	16 ± 5 ^b

Para cada columna las diferentes letras representan diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo con la región.

En la Figura 15 se muestra en detalle la humedad de la vainilla de cada productor. El alto porcentaje de humedad en las vainas evaluadas del Pacífico Central podría deberse a falta de conocimiento técnico del punto final del beneficiado. En este sentido es importante evaluar los productos a comercializar ya que existe tanto un riesgo de deterioro microbiológico como de características sensoriales (Dignum, Kerler & Verpoorte, 2002). La Norma Mexicana para la vainilla de consumo humano (SE, 2009) y la Norma INTE/ISO5565-1 (2019) permiten un máximo de 30% de humedad para asegurar la calidad del producto. El producto de V y K se encuentra dentro del rango de 20% a 30%, ambos muy cercanos al límite inferior. Los productores A, Y, C, Q y D presentan vainas con contenidos de humedad superiores al 30% por lo que no solo se expone el producto al deterioro, si no que puede tratarse de un producto potencialmente no inocuo. La vainilla restante, principalmente las muestras de la región Huetar Norte y Brunca, presentan humedades inferiores al 20%. Se considera que debajo de este contenido de humedad el producto es de baja calidad pues puede haber pérdida de la flexibilidad y del aroma por sobre procesamiento (Pérez *et al.*, 2011). Anteriormente se mencionó que muchas de las familias productoras son de escasos recursos, y se verán directamente afectados sus ingresos por un producto con un bajo peso y baja calidad. Se puede trabajar sobre este aspecto limitando las horas del secado para disminuir la velocidad con que se da el mismo.

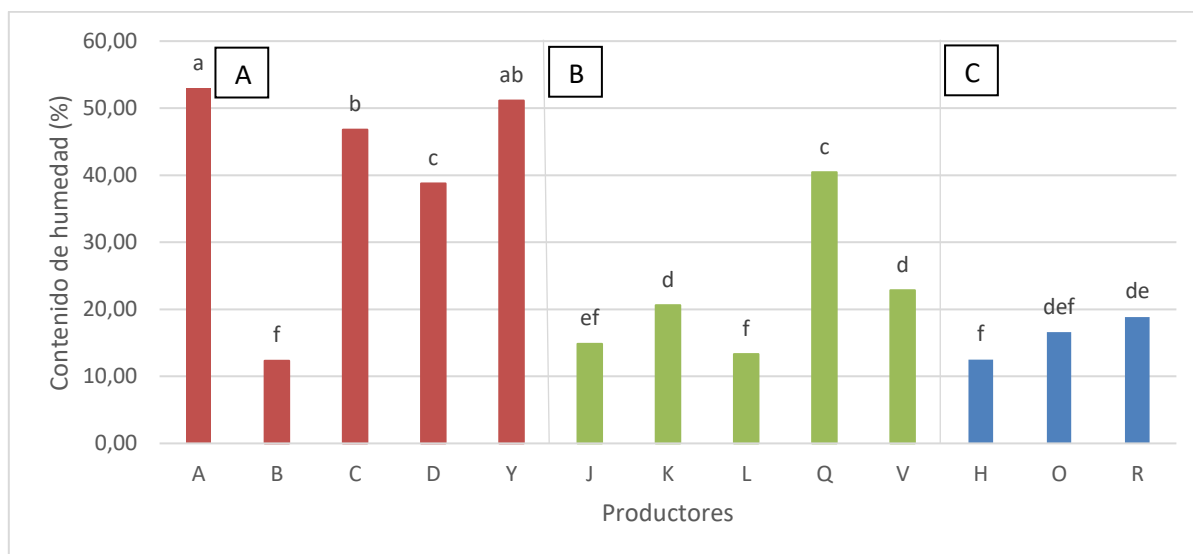


Figura 15. Contenido de humedad en vainas de vainilla beneficiada según productor. Las letras diferentes en la parte superior de cada columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$). A) Pacífico Central, B) Huetar Norte y C) Brunca.

Es de importancia evaluar las condiciones de almacenamiento para evitar tanto la pérdida como el aumento de humedad, según corresponda en cada caso, para no comprometer la calidad del producto. Se recomienda utilizar cajones de madera o metal con una cubierta de papel encerado durante el acondicionamiento (Odoux, 2011b). Para mantener la humedad estable en los frutos luego de este período, lo mejor es almacenarlas en empaques de película múltiple. Algunos materiales recomendados son el celofán y polivinilo, ya sea que se empaque al vacío o no y se debe procurar un sello adecuado en el empaque (Zamora *et al.*, 2016).

5.1.5. Defectos físicos presentes en las vainas de vainilla verdes y beneficiadas

En las muestras verdes evaluadas solo se presentó un defecto en el caso de una muestra del productor C que se encontraba abierta en uno de sus ápices. Se encontraron defectos en la vainilla beneficiada de todas las regiones productoras, pese a no detectarse diferencias significativas ($p = 0,587$). Las muestras de algunos productores no presentaron defectos mientras otras presentaban defectos en la totalidad de las vainas evaluadas. Estas discrepancias se evidencian en la Figura 16.

En la literatura se mencionan y se caracterizan los defectos que se pueden presentar en este tipo de producto; sin embargo, la cantidad de defectos presentes está más relacionado al seguimiento que dan los productores al proceso y las mejoras en el mismo (INTECO, 2019; Hernández-Hernández *et al.*, 2010; Ranadive, 2011; Paniagua & García, 2013), por lo que es importante evaluar lo sucedido en cada situación y para así mejorar la calidad del producto. Cada región evaluada presenta vainas con algún tipo de defecto; esta situación es esperable ya que los productos agrícolas tienen calidad variable (Grolleaud, 2002). De la vainilla de los 13 productores evaluada, 6 presentan menos del 20% de defectos en las muestras. Las vainas de los productores A, Y, O y R no presentaron defectos.

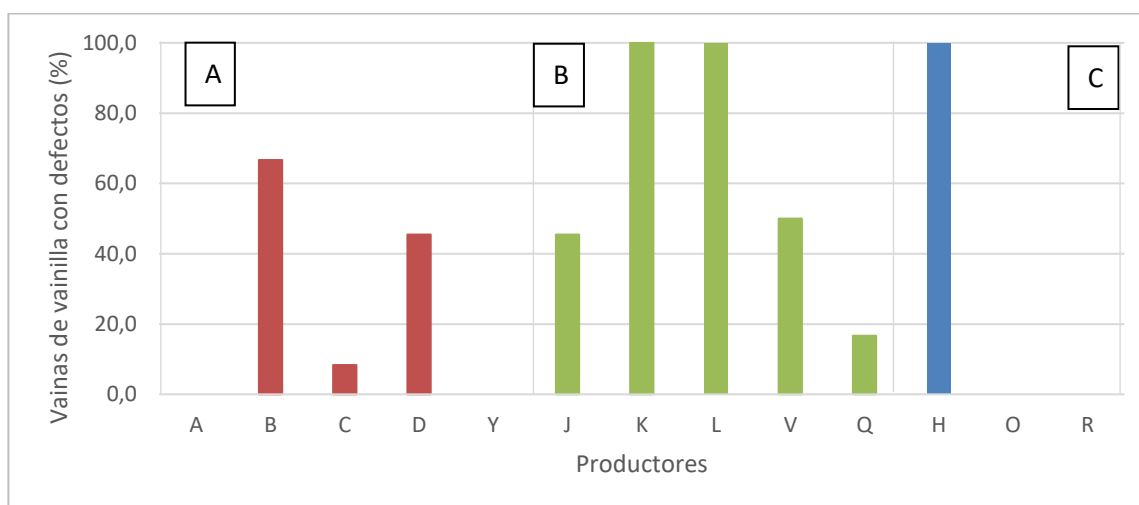


Figura 16. Defectos presentes en vainas curadas de vainilla según los productores de tres regiones de Costa Rica. A) Pacífico Central B) Huetar Norte C) Brunca.

En el Pacífico Central, la vainilla de dos productores presentó más de 40% de vainas con defectos mientras que la de 3 de 5 productores presentan menos de 10% de defectos en su material; entre ellos leñosidad, vainas no flexibles y algunas muestras estaban abiertas. En la región Huetar Norte las muestras del productor Q presentan la menor cantidad de defectos, mientras que la vainilla de K y L presentó algún tipo de defecto en la totalidad del producto. Ambos grupos de muestras presentaron leñosidad y pérdida de flexibilidad. En las muestras de la región Brunca, la vainilla del productor H es la única que presenta defectos, ya que los productores O y R no.

En la Figura 17 se presenta con mayor detalle la distribución de los defectos en cada región. En esta etapa se clasificaron y evaluaron más de 100 vainas de vainilla de diferentes productores. Las vainas del productor K fueron las únicas que presentaron crecimiento de mohos, pese a tener un bajo contenido de humedad (ver Figura 15). Según lo señalado por Odoux (2011b) para una humedad del 20,6% aún se puede tener valores de A_w en los que se presente deterioro microbiológico por lo que se debe cuidar el punto final del secado al sol.

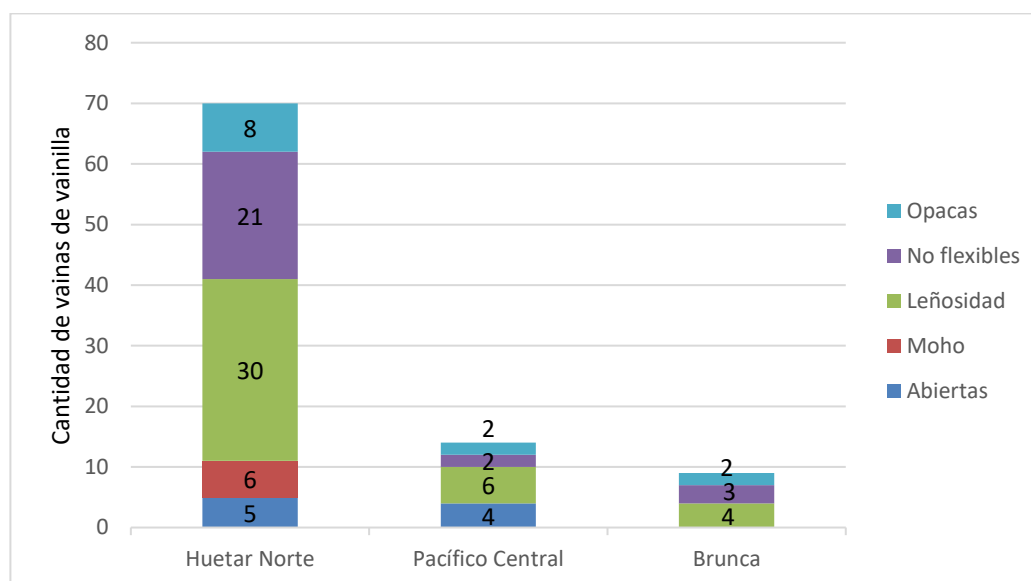


Figura 17. Cantidad de vainas beneficiadas con defectos, provenientes de tres regiones productoras de Costa Rica.

El beneficiado en diversos países coincide con la época lluviosa; sin embargo, en Costa Rica pese a que se da durante la época seca, las regiones de producción son lluviosas y/o de alta humedad. Esto resulta en un gran problema pues el producto se encuentra expuesto al medio ambiente cuando es más susceptible a la contaminación por microorganismos y dificulta la disminución de la humedad (Odoux, 2011b). El productor K puede tener dificultades en cuanto a la manipulación del producto durante el beneficiado, el almacenamiento o en ambas y la humedad relativa de la región podría tener un impacto negativo importante.

Este mismo productor presenta también vainas no flexibles y con leñosidad. Esta última característica, la cual se asocia a vainas que se cosecharon antes de tiempo (Hernández-Hernández, 2010). Las vainas cosechadas de forma anticipada también son más sensibles a infestaciones de

Penicillium y *Aspergillus* y a su vez algunas especies de estos microorganismos son productores de micotoxinas por lo que se considera apropiado reforzar los protocolos de higiene para las superficies de contacto con alimentos y de los colaboradores (Sarter, 2011).

La vainilla de L es de las que presenta mayor longitud teniendo un alto potencial comercial; sin embargo, presenta leñosidad y pérdida de flexibilidad, que se puede asociar nuevamente a la cosecha temprana (Hernández-Hernández *et al.*, 2010) y al contenido de humedad menor al 15% (ver Figura 16). Con un mejor manejo del beneficiado y de las condiciones de almacenamiento, el productor L estará en capacidad de ofrecer un producto de alta calidad que le permita vender a un mejor precio.

Las vainas abiertas se deben a la característica dehiscente de la vainilla y corresponde a frutos cosechados tardíamente o que no se realizó el “*killing*” apropiadamente. Este defecto se presentó en las vainas de los productores del Pacífico Central y Huetar Norte (Hernández-Hernández *et al.*, 2010).

Según Ranadive (2011), el brillo se asocia a los compuestos oleosos presentes en las vainas. Las vainas opacas han perdido de forma superficial los compuestos oleosos, ya sea por defectos durante el beneficiado o un almacenamiento inadecuado. Este defecto se presentó en las vainas de todas las regiones estudiadas, por lo que se reitera que es importante mejorar las condiciones de almacenamiento posterior al curado de las vainas y que mantengan mejores características de calidad previo a la venta (Zamora *et al.*, 2016).

5.2. Identificación y cuantificación de compuestos aromáticos por medio de la técnica de HPLC

5.2.1. Metabolitos aromáticos identificados por medio del uso de patrones y espectro UV

En los Cuadros XII y XIII, se presenta el contenido promedio de los metabolitos aromáticos presentes en vainilla verde y beneficiada para cada región estudiada según la especie. La figura 21, en la sección de anexos, muestra un cromatograma donde se observa la representación gráfica de los patrones (tiempo de retención y área) mediante el cual se hizo la identificación y cuantificación de los compuestos. No se identificó etil vainillina en las muestras, verdes o beneficiadas por tratarse

de un producto de origen natural y no adulterado (Hoffman & Zapf, 2011). El anisaldehído, por su parte, se esperaba en las vainas beneficiadas. Sin embargo, los aldehídos aparecen conforme se avanza en el proceso de curado por la autooxidación de ácidos grasos, pero desaparecen pronto o se encuentran como trazas; de forma similar sucede con la acetovainillona que tampoco se logró identificar en las muestras (Odoux *et al.*, 2011). El guaiacol no se identificó en las muestras verdes evaluadas, pero sí una pequeña cantidad en las muestras de HCR de la región Huetar Norte; este metabolito puede provenir tanto de reacciones enzimáticas como de las rutas de formación de la vainillina propiamente (Pérez, 2006; Odoux, 2011).

La vainillina fue el metabolito que se presentó en mayor concentración ($p < 0,05$) en las vainas verdes, así como en las beneficiadas; coincidiendo con lo esperado según la teoría (Dignum *et al.*, 2004). Las muestras beneficiadas de HCR presentaron concentraciones de vainillina significativamente mayores ($p < 0,05$) a las otras especies evaluadas (Cuadro XII). Aun considerando esto, el contenido promedio de vainillina de las vainas de HCR de la región Huetar Norte son inferiores a lo señalado por la normativa (1,6% (SE, 2009)), por lo que se deben evaluar las prácticas de beneficiado para no perder el metabolito de mayor interés en el producto final.

Se realizó una comparación entre vainas verdes y beneficiadas, encontrando que, de forma general, los frutos verdes tienen mayor concentración ($p < 0,05$) de vainillina respecto a los beneficiados. Esto se debe a que las vainas maduras sin beneficiar poseen una alta concentración de vainillina en forma glucosilada, como consecuencia del corte y molienda para procesamiento de las muestras en el laboratorio y la actividad enzimática presente en el fruto, la glucovainillina se presenta en forma hidrolizada y aún no se han dado las condiciones para la transformación de esta en otros compuestos como en las muestras beneficiadas (Odoux, 2006; Cai *et al.*, 2019).

Cuadro XII. Contenido promedio (m/v) de metabolitos presentes en vainas de vainilla verde por región y especie.

Metabolito	Concentración (% m/v)			
	Región Pacífico Central HCR (n=36)	Región Huetar Norte HCR (n=18)	Región Brunca <i>V. hardii</i> (n=12)	Región Brunca <i>V. pompona</i> (n=3)
Vainillina	2 ± 1 ^a	2,5 ± 0,6 ^a	0,7 ± 0,8 ^b	ND
Alcohol vanílico	0,1 ± 0,7 ^a	0,2 ± 0,5 ^a	0,02 ± 0,02 ^a	ND
<i>p</i> -hidroxibenzaldehído	0,1 ± 0,1 ^b	0,3 ± 0,1 ^a	0,002 ± 0,002 ^b	ND
Ácido vanílico	0,01 ± 0,02 ^a	0,04 ± 0,04 ^a	0,002 ± 0,004 ^a	ND
Alcohol anísico	ND	0,002 ± 0,009 ^b	0,1 ± 0,2 ^b	0,9 ± 0,1 ^a
Alcohol <i>p</i> -hidroxibencílico	ND	0,03 ± 0,05 ^a	0,1 ± 0,3 ^a	ND
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	0,01 ± 0,02 ^a	0,03 ± 0,05 ^a	ND	ND
Ácido anísico	ND	ND	0,02 ± 0,03 ^b	0,09 ± 0,02 ^a
Guaiacol	ND	ND	ND	ND
Acetovainillona	ND	ND	ND	ND
Anisaldehído	ND	ND	ND	ND
Etil vainillina	ND	ND	ND	ND

Letras diferentes para cada fila representan diferencias significativas (p<0,05). Análisis cromatográfico realizado por medio de HPLC-UV. ND: no detectado

Cuadro XIII. Contenido promedio (m/v) de metabolitos presentes en vainas de vainilla beneficiada, por región y especie de origen.

Metabolito	Concentración (% m/v)					
	Región Pacífico Central HCR (n=69)	Región Huatar Norte HCR (n=48)	Región Huatar Norte <i>V. planifolia</i> (n=33)	Región Brunca HCR (n=12)	Región Brunca <i>V. hardii</i> (n=12)	Región Brunca <i>V. pompona</i> (n=3)
Vainillina	1,6 ± 0,5 ^a	0,7 ± 0,4 ^b	0,1 ± 0,1 ^c	1,7 ± 0,1 ^a	0,3 ± 0,3 ^c	0,031 ± 0,004 ^c
Alcohol vanílico	0,02 ± 0,1 ^a	0,4 ± 0,1 ^a	0,02 ± 0,04 ^a	0,06 ± 0,01 ^a	0,002 ± 0,01 ^a	ND
<i>p</i> -hidroxibenzaldehído	0,1 ± 0,1 ^b	0,04 ± 0,03 ^c	0,02 ± 0,03 ^c	0,17 ± 0,01 ^a	0,02 ± 0,04 ^c	ND
Ácido vanílico	0,06 ± 0,04 ^{ab}	0,09 ± 0,05 ^a	0,02 ± 0,02 ^{bc}	0,09 ± 0,01 ^a	0,1 ± 0,1 ^{ab}	ND
Alcohol anísico	0,01 ± 0,02 ^b	0,001 ± 0,009 ^b	0,3 ± 0,3 ^a	0,11 ± 0,08 ^b	ND	ND
Alcohol <i>p</i> -hidroxibencílico	0,002 ± 0,02 ^a	0,07 ± 0,02 ^a	ND	ND	ND	ND
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	0,01 ± 0,01 ^b	0,01 ± 0,02 ^{ab}	0,06 ± 0,08 ^a	0,029 ± 0,01 ^{ab}	0,02 ± 0,02 ^{ab}	ND
Ácido anísico	ND	0,01 ± 0,02 ^b	0,05 ± 0,05 ^a	ND	0,01 ± 0,01 ^b	0,030 ± 0,005 ^{ab}
Guaiacol	ND	0,001 ± 0,007	ND	ND	ND	ND
Acetovainillona	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Anisaldehído	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Etil vainillina	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Letras diferentes para cada fila representan diferencias significativas (p<0,05). Análisis cromatográfico realizado por medio de HPLC-UV. ND: no detectado

El contenido de vainillina, de forma general aumenta durante el curado (Cai *et al.*, 2019). Sin embargo, el mismo proceso de curado, por la exposición constante al sol y temperatura, producen pérdidas de los componentes aromáticos (Frenkel *et al.*, 2011). El sobre procesamiento que se evidencia en algunas muestras en los bajos contenidos de humedad, puede ocasionar adicionalmente que el contenido de vainillina promedio sea inferior al 1%.

La vainillina puede experimentar reacciones químicas que dan origen a otros compuestos como el ácido vanílico, alcohol vanílico y di-vainillina, entre otros (Hoffman & Zapf, 2011; Khoiratty, Kodja & Verpoorte, 2018; Cai *et al.*, 2019). La reducción de la vainillina a alcohol vanílico podría ser una de las razones por la que la concentración de este compuesto es mayor que lo reportado por Hernández-Hernández *et al.* (2010), en las muestras evaluadas. Un mayor contenido de este compuesto no necesariamente tiene un impacto negativo sobre la calidad sensorial del producto; de acuerdo con Pérez *et al.* (2006) es uno de los cinco compuestos de mayor impacto en el aroma, incluso a concentraciones 1000 veces menores que la vainillina. Esta podría ser una característica diferenciadora del aroma en la vainilla de producción nacional, si las condiciones del procesamiento favorecen estas rutas.

Se encontró una mayor cantidad ($p < 0,05$) de *p*-hidroxibenzaldehído en los frutos verdes que en los beneficiados. La disminución en su concentración en las muestras beneficiadas puede relacionarse con un procesamiento inadecuado o con el origen de los frutos (Cai *et al.*, 2019). Gassenmeier *et al.* (2008), señala que las prácticas de curado inapropiadas pueden generar bajos contenidos tanto del *p*-hidroxibenzaldehído como del ácido *p*-hidroxibenzoico y favorecer en su lugar otros compuestos como el ácido vanílico (Hernández-Hernández *et al.*, 2010; Xochipa *et al.*, 2016).

El alcohol anísico se presentó en concentraciones superiores en las a lo señalado por la teoría (Cuadro I) para las muestras beneficiadas de *V. planifolia* (Hernández-Hernández *et al.*, 2010; Lepers *et al.*, 2011). Por lo general los compuestos anísicos se presentan en mayor proporción en la especie *V. tahitensis* (Lepers *et al.*, 2011; Takahashi *et al.*, 2013). La concentración de estos compuestos podría deberse a un beneficiado incorrecto, particularidades geográficas, medioambientales, entre otros. Hoffman & Zapf (2011) reportan que, tanto el ácido anísico como el alcohol anísico se presentan en concentraciones inferiores a las 5 ppm. En las muestras evaluadas

para todos los territorios, las concentraciones varían de 0 a 20 ppm, por lo que estos compuestos pueden tener mayor relevancia en las características sensoriales de la vainilla de producción nacional, favoreciendo notas dulces y a madera (Odoux, 2011).

En la vainilla beneficiada de las tres regiones se encontró un contenido de alcohol vanílico mayor a lo esperado (Cuadro I), mas no se presentaron diferencias significativas ($p=0,07$) para las regiones y especies que se estudiaron. El ácido vanílico no presenta diferencias claras en relación a la ubicación geográfica. Xochipa *et al.* (2016) menciona que las diferencias en el contenido de ácido vanílico se relaciona a las condiciones climáticas del sitio de cultivo. Sin embargo, esto aplica únicamente a muestras de diferente origen geográfico con poca variación en el ácido *p*-hidroxibenzoico y el *p*-hidroxibenzaldehído (Ranadive, 1992), lo que sugiere en este caso, que la concentración de ácido vanílico no se ve afectada por las diferencias geográficas.

En las vainas verdes, el *p*-hidroxibenzaldehído se encuentra en cantidades significativamente mayores ($p<0,05$) en la región Huasteca Norte. Las vainas beneficiadas del híbrido de las regiones Brunca y Pacífico Central (Cuadro XII), presentaron cantidades significativamente mayores ($p<0,05$) de *p*-hidroxibenzaldehído respecto a las otras especies de las regiones estudiadas, pero en general son bajas (Cuadro I). Por su parte el ácido *p*-hidroxibenzoico se encuentra dentro de lo reportado por SE (2011) y Xochipa *et al.* (2016), entre 58 a 1549 ppm. Venkatasubramanian *et al.* (2009), señalan que estos compuestos pueden seguir reaccionando y transformarse en guaiacol, ácido *p*-hidroxibenzoico e incluso alcohol vanílico, lo que disminuye la calidad sensorial del producto como consecuencia de almacenamientos prolongados de las vainas. El guaiacol se presentó en bajas concentraciones en los frutos beneficiados, más no se evaluaron diferencias significativas ya que se encontró únicamente en las muestras del híbrido de la región Huasteca Norte.

5.2.2. Metabolitos no identificados presentes en los extractos de vainilla

En el Cuadro XIII se presentan los metabolitos no identificados en vainas de vainilla verdes y beneficiadas. A estos se les evaluó la presencia de diferencias significativas entre las muestras verdes y aquellas que si se encontraban beneficiadas. La identificación de estos compuestos se encuentra fuera del alcance de la presente investigación. Pese a esto, la presencia de estas sustancias en los cromatogramas se considera un hallazgo relevante, pues se requirió la revisión

manual de más de 100 cromatogramas, por lo que tampoco es un suceso aislado y podría ser de interés para investigaciones futuras.

Cuadro XIV. Rango de áreas bajo la curva en los cromatogramas determinados por HPLC-UV, correspondientes a los metabolitos no identificados presentes en las vainas de vainilla verdes y beneficiadas provenientes de tres regiones productoras de Costa Rica.

Metabolitos	Tiempo de retención (min)	Rango de áreas (mAU*min)	
		Vainilla verde	Vainilla beneficiada
Desconocido 01	6,38	0,7 a 54,7	0,1 a 62,9
Desconocido 02	7,73	0,5 a 226,1	0,1 a 513,5
Desconocido 03	9,14	0,1 a 12,2	0,2 a 23,6
Desconocido 04	10,46	0,5 a 12,1	0,2 a 17,0
Desconocido 05	12,60	34,8 a 126,4	0,6 a 64,0
Desconocido 07	16,28	0,4 a 6,5	0,1 a 20,7
Desconocido 08	19,63	0,3 a 7,7	0,2 a 9,2
Desconocido 09	24,44	0,1 a 2,9	0,01 a 4,9
Desconocido 10	25,22	0,1 a 3,3	0,03 a 23,9
Desconocido 11	27,91	0,1 a 1,4	0,01 a 3,91

Análisis cromatográfico realizado por medio de HPLC-UV. $\lambda = 280$ nm.

Las vainas de vainilla presentan actividad química, enzimática y biológica, por lo que la exposición al ambiente, la radiación solar e incluso microorganismos pueden variar su composición cualitativa y cuantitativamente. Los metabolitos no identificados son compuestos que en el análisis realizado por HPLC-UV coinciden en el tiempo de retención con un patrón; sin embargo, el espectro de absorción de este no coincide con la referencia. El número del consecutivo asignado para estos metabolitos corresponde al tiempo de retención del estándar, pero no coinciden en el espectro. Por ejemplo, el “Desconocido 01” sería un compuesto similar o mezcla que coincide en tiempo de retención con el alcohol *p*-hidroxibencílico, pero no es este ya que el espectro UV no coincide.

5.3. Análisis exploratorio de la relación entre las variables fenotípicas, la ubicación y el estado de procesamiento de las vainas de vainilla sobre los metabolitos aromáticos

Para evaluar la relación entre las variables, en esta etapa se trabajó con áreas relativas a la masa, ya que no todos los metabolitos se identificaron y por ende no se pudieron cuantificar. Este es un análisis exploratorio para evaluar posibles correlaciones entre las variables de estudio y el comportamiento de las muestras de forma general, como base para estudios posteriores. Se buscó establecer si existían comportamientos diferentes o agrupaciones con base en las regiones, especies, estado de procesamiento, características físicas o productores.

5.3.1. Análisis de Componentes Principales (PCA)

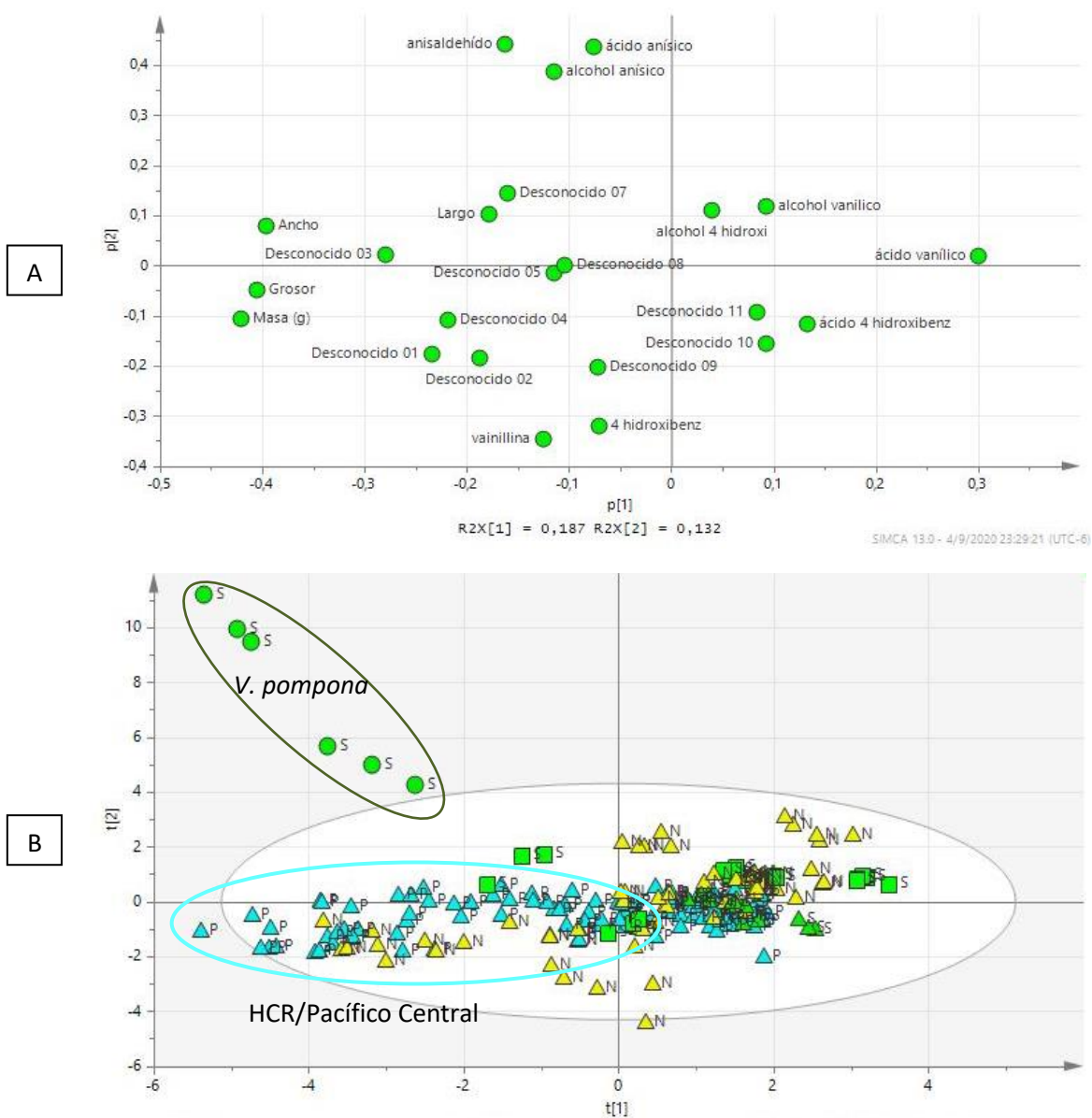
En el primer modelo propuesto se evaluaron tanto las características fenotípicas como algunos de los compuestos presentes, conocidos y desconocidos, la región y las especies. El modelo ajustó 123 observaciones (82 vainas) para 23 variables, posee un $r^2 = 0,42$ y tres componentes principales; en el Cuadro XVIII en la sección de anexos se detallan las variables incluidas. En la Figura 18, se presenta (A) la influencia de las variables en estudio sobre los componentes del modelo o “loading plot” y (B) el “score plot” o las puntuaciones obtenidas para cada observación en el modelo.

No se encontraron comportamientos o tendencias fácilmente reconocibles para la mayor parte de las observaciones. Esto podría ser debido a variables no controladas tanto en la vainilla verde como en la beneficiada, por ejemplo: la edad de las vainas o el tiempo en que las mismas fueron almacenadas por los productores luego del procesamiento (Odoux, 2006; Frenkel *et al.*, 2011; Paniagua & García, 2013), e incluso el efecto de errores acumulados. En futuras investigaciones se puede considerar el uso de muestras sometidas a controles más estrictos de maduración, beneficiado, etc. Para esta investigación era de interés evaluar las muestras en las condiciones de cosecha y procesamiento al momento en que se obtuvieron las muestras.

Las muestras de *V. pompona*, si presentan un comportamiento diferente a otras muestras. En el análisis de los extractos (Cuadro XII y XIII) se identificó alcohol anísico ($0,90 \pm 0,1$ % m/v) y ácido anísico ($0,09 \pm 0,02$ % m/v) en las vainas verdes y para las muestras beneficiadas bajas concentraciones de vainillina ($0,031 \pm 0,004$ % m/v) y ácido anísico ($0,030 \pm 0,005$ % m/v), que varía

las características sensoriales de estas muestras. Estudios previos realizados por Delgado, Salazar & Herrera (2014) señalan que esta especie presenta un menor contenido de vainillina en comparación a *V. planifolia*, los autores también mencionan que la composición química de *V. pompona* es similar a la de *V. tahitensis*, por lo que la presencia de compuestos anísicos no es anormal y favorece el aroma dulce y floral en las muestras (Lepers *et al.*, 2011; Takahashi *et al.*, 2013). Así también como se indicó en el Cuadro X, tanto las muestras verdes como las beneficiadas presentaron mayores dimensiones en cuanto a el largo y ancho de las vainas. El efecto de estas características de relaciona con el “loading plot” (Figura 18A), donde se observa que las variables favorecen la diferenciación de estas muestras.

Si se evalúan específicamente las muestras del híbrido HCR de región Pacífico Central (P), marcadas en celeste corresponden a vainas de los productores A, C y D. Las muestras beneficiadas poseen concentraciones significativamente mayores ($p < 0,05$) de vainillina ($1,6 \pm 0,5$ % m/v) y *p*-hidroxibenzaldehído ($0,1 \pm 0,1$ % m/v) respecto a las vainas beneficiadas de *V. planifolia*, *V. hardii* y *V. pompona* (Cuadro XIII). Estos analitos de acuerdo con la Figura 18A, podrían estar favoreciendo el comportamiento que se observa en la Figura 18B, de forma similar se refleja en la clasificación que se obtuvo para las muestras (Figuras 11 y 12) a partir de la herramienta discutida previamente (Cuadro VIII). Se puede concluir que, pese a que las diferencias son poco claras, al contar con los datos analizados previamente, se presenta una diferencia entre las muestras de *V. pompona* respecto a las *V. hardii* y al híbrido en relación con sus características físicas (Cuadro X) y las concentraciones de metabolitos (Cuadro XII y XIII). Mientras que las muestras de HCR del Pacífico Central, se podrían diferenciar levemente respecto a otras especies y regiones por su contenido de aromático.



N: Huetar Norte P: Pacífico Central S: Brunca O: *V. pompona* Δ: HCR □: *V. hardii*.

Figura 18. Influencia de las variables de estudio sobre los componentes del modelo (A) y la puntuación de las observaciones para los componentes (B), según la región y la especie en estudio.

En la Figura 19A se presenta la influencia de las variables de estudio sobre el modelo, mientras que en la Figura 19B se muestran las puntuaciones de las observaciones de acuerdo con los componentes principales. Se emplearon diferentes colores para evaluar el comportamiento de las muestras en relación al estado de procesamiento. En la Figura 19B, es posible observar una tendencia de la vainilla verde hacia el lado izquierdo y la vainilla beneficiada hacia el lado derecho. Los frutos sin beneficiar presentaron grosores significativamente mayores ($p < 0,05$) a la vainilla beneficiada (sección 5.1.2), que a su vez se traduce como una masa mayor, ya que no han disminuido aún el contenido de humedad (sección 5.1.4). Adicional a esto, en el Cuadro XII y sección 5.2.1, las vainas verdes presentaron mayor proporción de vainillina. Estas características concuerdan con la distribución de las variables que afectan el modelo presentado en la Figuras 19A.

Los extractos de frutos beneficiados presentaron concentraciones significativamente mayores ($p < 0,05$) de ácido vanílico e inferiores ($p < 0,05$) para la vainillina y el *p*-hidroxibenzaldehído, que también podría relacionarse con la tendencia de estas muestras. Se puede considerar a partir de esto y los defectos presentes en las vainas (Figuras 16 y 17) que parte del potencial sensorial se ha visto afectado por el beneficiado de las mismas, por lo que nuevamente se sugiere evitar el sobre procesamiento de las vainas y almacenarlas en un empaque adecuado, en un ambiente fresco y resguardadas de la luz.

De acuerdo con la información del “*loading plot*” (Figuras 18A y 19A) se consideró que la masa, el grosor y el ancho del fruto son características relevantes para la diferenciación de las muestras, tal como lo menciona Gassenmeier *et al.* (2008) al referirse a la calidad de los frutos. Los autores destacan que los criterios analíticos no reflejan la totalidad las propiedades de los extractos, por esta razón se les debería dar mayor importancia a las características físicas en las investigaciones. También resultan de importancia la cantidad presente de los compuestos desconocidos 01, 02 y 03 (Cuadro XIV). Estos compuestos podrían ser un apoyo para evaluar modelos futuros en otros experimentos, en lugar de analizar las 9 estructuras que no se lograron identificar en este estudio.

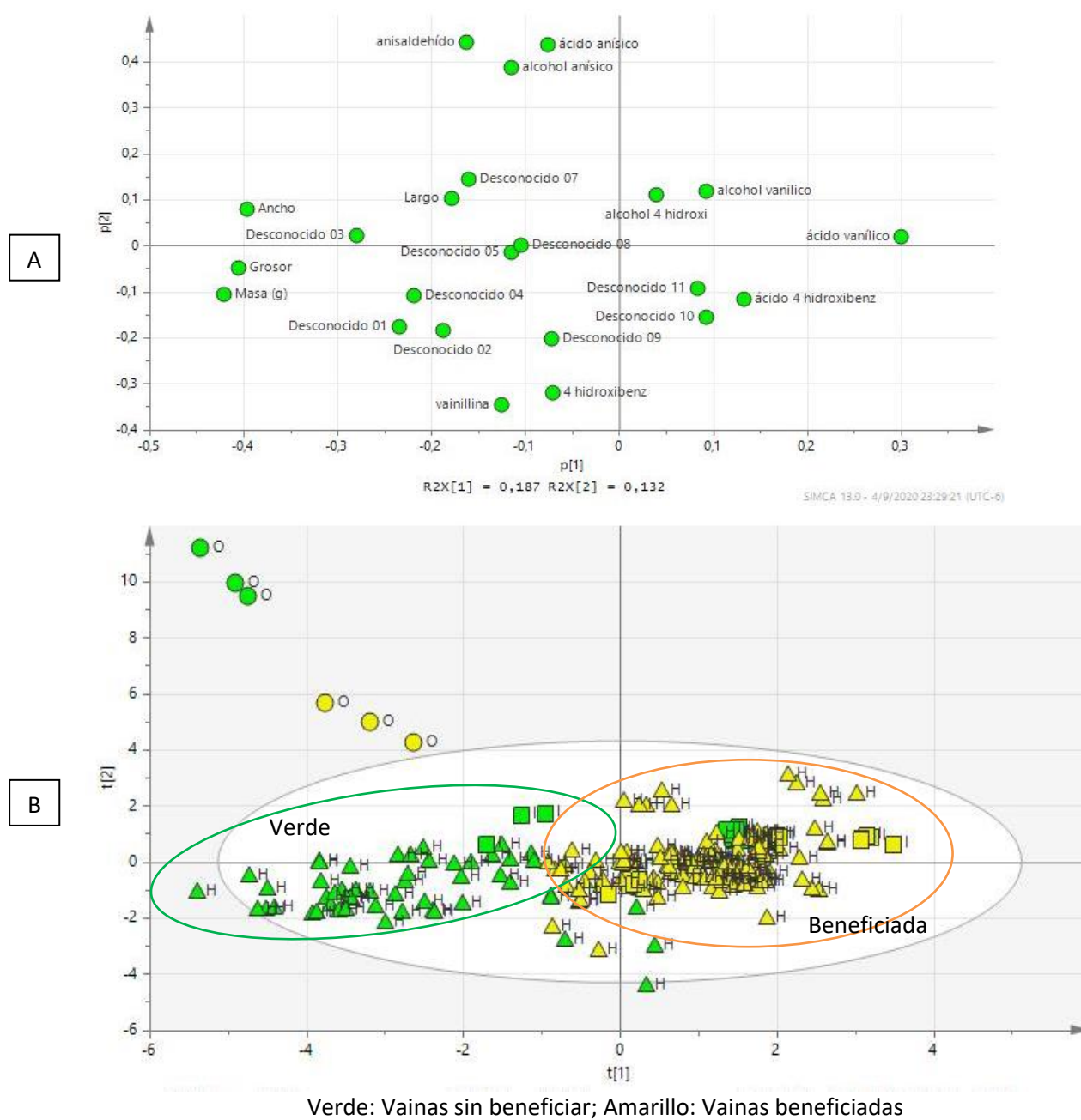
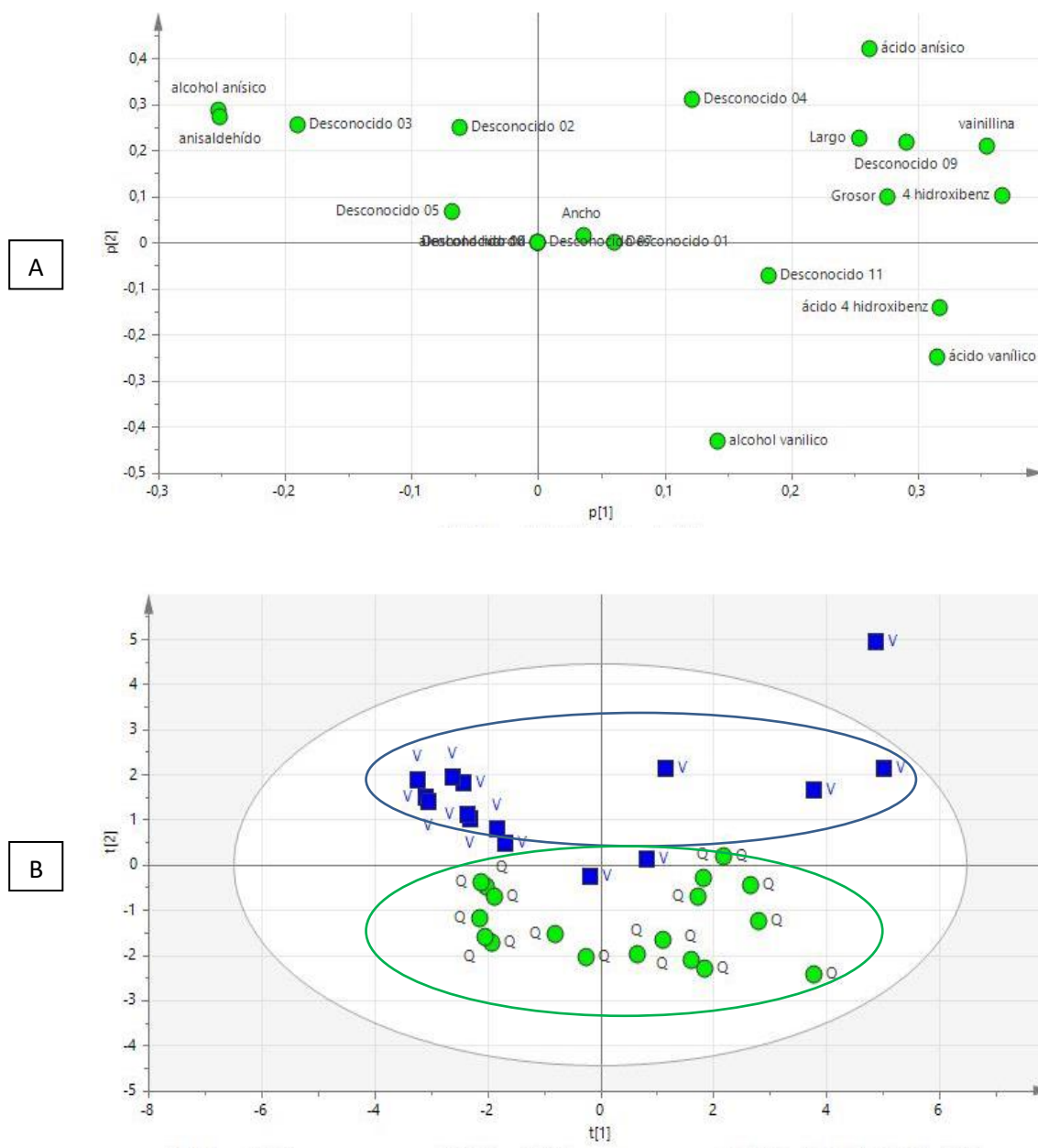


Figura 19. Influencia de las variables de estudio sobre los componentes del modelo (A) y la puntuación de las observaciones para los componentes (B), según el estado de procesamiento de las vainas de vainilla.

El segundo modelo se realizó para las muestras de *V. planifolia*. Tomó en consideración 33 observaciones (11 vainas) para 22 variables; el detalle de las variables incluidas en el modelo se encuentra en el Cuadro XVIII en la sección de anexos. Al analizar estos datos por separado se obtuvo un ajuste del 50,4%. Las muestras pertenecen únicamente a la región Huetar Norte y se encuentran beneficiadas. En la Figura 20 se presentan tanto la influencia de las variables sobre el modelo, así como la puntuación para las observaciones de los productores V y Q o “*score plot*”.

Se puede observar de forma más simple una separación entre los extractos de muestras de ambos productores. Las muestras del productor Q presentaban un contenido de humedad del 40 %, mientras que los frutos de V presentaron un 23 % de humedad (Figura 15). Esto podría favorecer diferentes grados de actividad enzimática u otras reacciones que, junto a las diferencias en el curado, resultan en muestras con comportamientos y características diferentes (Odoux, 2006; Frenkel *et al.*, 2011; Podstolki, 2011). Debido a que, en este modelo, a diferencia del anterior (Figura 19A) características como el grosor e incluso la masa no generan una diferenciación importante de las muestras. Si no que toman mayor relevancia el contenido de vainillina, pese a ser significativamente menor ($p < 0,05$) al de otras especies estudiadas (Cuadro XII y XIII), los compuestos anísicos como el alcohol anísico y el ácido anísico presentes en cantidades significativamente mayores ($p < 0,05$) a otras vainas beneficiadas (Cuadro XII y XIII), y que según se ha mencionado pueden ser señales de un beneficiado inadecuado.



Verde: muestras del productor Q Azul: muestras del productor V

Figura 20. Influencia de las variables de estudio sobre los componentes del modelo (A) y la puntuación de las observaciones para los componentes (B), según el productor de *V. planifolia*.

6. Conclusiones

- Las vainas beneficiadas de *V. pompona* y del híbrido HCR estudiadas, presentaron longitudes significativamente mayores ($p < 0,05$) a las muestras de *V. planifolia* estudiadas.
- Más del 50% de los frutos verdes evaluados son color verde oscuro, un indicador de madurez insuficiente que puede afectar la calidad del producto final. Pese a la posibilidad de un despezonado temprano, el 85% de las muestras beneficiadas evaluadas presentaron coloraciones entre café oscuro a negro, asociado a los productos de mayor calidad.
- Solo las muestras beneficiadas de dos productores se encuentran en el rango recomendado para el contenido de humedad. Esto es de gran importancia ya que se relaciona directamente con la calidad del producto
- Las vainas evaluadas de todas las regiones presentaron defectos. Entre los defectos más comunes están la leñosidad, pérdida de flexibilidad y ausencia de brillo. Todos asociados a una cosecha temprana e inadecuado procesamiento de los frutos.
- Las muestras beneficiadas de HCR presentaron concentraciones significativamente mayores ($p < 0,05$) de vainillina comparadas con otras especies estudiadas.
- De acuerdo con los resultados obtenidos, el contenido de compuestos anísicos y las dimensiones de las vainas podrían ser características diferenciadoras en el perfil de *V. pompona* producida en la región Brunca.
- Las muestras verdes y las beneficiadas presentaron comportamientos diferentes en el análisis de componente principales. Esto posiblemente relacionado a los cambios en las dimensiones durante el curado y la transformación que experimentan los metabolitos aromáticos.

7. Recomendaciones

- Para mejorar la calidad general (física como sensorial) del producto es importante capacitar a los productores en temas de manipulación de alimentos y de procesamiento.
- Se recomienda definir puntos de control durante el curado y el uso de herramientas de fácil acceso como termómetros y cronómetros; así como implementación de una etapa de empaque que proteja el producto terminado.
- Para futuras investigaciones puede ser de utilidad el uso de un grupo control de vainas beneficiadas en condiciones controladas.

8. Bibliografía

- ALDÁS, J. & URIEL, E. 2017. Análisis multivariante aplicado con R. 2 ed. Paraninfo, Madrid.
- APROVAINILLA. 2020. Quiénes somos?. Costa Rica. Recuperado el 20 de noviembre de 2020 de <https://aprovainilla.net/quienes-somos/>
- ARROYO, N. 2016. Alternativas para mejorar el rendimiento de extracción de vainillina en frutos curados de vainilla. Tesis Lic. en Ing. de Alimentos. Universidad de Costa Rica, Escuela de Tecnología de Alimentos. San José.
- ASTA. 1985. Official Analytical Methods of the American Spices Association. 3 ed. Estados Unidos.
- AZOFEIFA, J., GIGANT, L., NICOLÁS, M., PIGNAL, M., TAVARES, F., HÁGSATER, E., SALAZAR, G., REYES, D., ARCHILA, F., GARCÍA, J., SILVA, D., ALLIBERT, A., SOLANO, F., RODRÍGUEZ, G., PANIAGUA, A., BESSE, P., PÉREZ, A. & GRISONI, M. 2017. A new species from Costa Rica closely related to *V. planifolia* (Orchidaceae). *European Journal of Taxonomy*. 214: 1-26.
- AZOFEIFA, J., PANIAGUA, A. & GARCÍA, J. 2014. Importancia y desafíos de la conservación de *Vanilla* spp. (Orquidaceae) en Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana* 25 (1): 189 – 202.
- AZOFEIFA, J., RIVER, G., PANIAGUA, A. & CORDERO, R. 2018. Selección cualitativa del esqueje en la sobrevivencia y desarrollo morfogenético de *Vanilla planifolia* Andrews. *Agron.Mesoam.* 29 (3): 619-627.
- BARQUERO, M. 2004. Mecanismos y aplicaciones de la cromatografía líquida de alto desempeño. San José, UCR.
- BELANGER, F. & HAVKIN-FRENKEL, D. 2011. Molecular analysis of a Vanilla hybrid cultivated in Costa Rica. In: Havkin-Frenkel, D. & Belanger, F., eds. *Handbook of vanilla science and technology*. Estados Unidos, Wiley–Blackwell Publishing Ltd. p. 256 – 265.
- BEVILACQUA, M., BRO, R., MARINI, F., RINNAN, A., RAMUSSEN, M. & SKOV, T. 2017. Recent chemometrics advances for foodomics. *Trends in Analytical Chemistry*. 96: 42-51.
- BORY, S., BROWN, S., DUVAL, M., BESSE, P. 2011. Evolutionary Process and Diversification in the Genus *Vanilla*. In: Odoux, E. & Grisoni, M., eds. *Vanilla*. Estados Unidos, CRC Press. p. 15-29.
- BÖTTCHER, J. & MONKS, K. 2020. Natural or artificial? – Determination of vanillin in vanilla products and associated marker substances. Recuperado el 20 de noviembre de 2020 de <https://www.knauer.net/en/Blog/Vanilla>
- BROWNELL, R. 2011. Fair trade - the future of vanilla? In: Havkin-Frenkel, D. & Belanger, F., eds. *Handbook of vanilla science and technology*. Estados Unidos, Wiley–Blackwell Publishing Ltd. p. 107 – 116.

- BRUNSCHWIG, C., SENGHER-EMONNOT, P., AUBANEL, M., PIERRAT, A., GEORGE, G., ROCHARD, S. & RAHARIVELOMANANA, P. 2012. Odor-active compounds of Tahitian vanilla flavor. *Food Research International* 46: 148-157.
- CAI, Y., GU, F., HONG, Y., CHEN, Y., XU, F. & AN, K. 2019. Metabolic Transformation and Enzyme Activities of Hainan Vanilla Beans During Curing to Improve Flavor Formation. *Molecules* 24: 2781
- CAMERON, K. 2011. Vanilloid Orchids Systematics and Evolution. In: Odoux, E. & Grisoni, M., eds. *Vanilla*. Estados Unidos, CRC Press. p. 1-14.
- CÔME, B. 2011. Recognizing the Quality and Origin of Vanilla from Reunion Island. In: Odoux, E. & Grisoni, M., eds. *Vanilla*. Estados Unidos, CRC Press. p. 273-282.
- CONSEJO NACIONAL DE LA PRODUCCIÓN. 2020. Ficha técnica de industrialización de Vainilla. Recuperado el 10 de octubre de 2020 de https://www.cnp.go.cr/biblioteca/fichas/Vainilla_FTP.pdf
- DE LA CRUZ, J., RODRIGUEZ, G. & GARCÍA, H. 2009. *Vanilla: Post-Harvest Operations*. S.I., FAO. Recuperado el 17 de septiembre de 2018 de http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/inpho/docs/Post_crcruzest_Compendium_-_Vanilla.pdf.
- DECRETO N.º7944, 1978. División Regional del Territorio de Costa Rica, para los efectos de investigación y planificación del desarrollo socioeconómico. Costa Rica. *Diario Oficial La Gaceta*. 2 feb.
- DELGADO, A., SALAZAR, M. & HERRERA, E. 2014. Polimorfismo químico de componentes del aroma en germoplasma de *Vanilla* spp de la región del Totonacapan Puebla-Veracruz, México. En: Araya, C., Cordero, R., Paniagua, A. & Azofeifa, J., eds. *I Seminario Internacional de vainilla*. Heredia, UNA. p. 93-118.
- DIGNUM, M., KERLER, J. & VERPOORTE, R. 2002. Vanilla curing under laboratory conditions. *Food Chemistry* 79: 165-171.
- DIGNUM, M., VAN DER HEIJDEN, R., KERLER, J., WINKEL, C. & VERPOORTE, R. 2004. Identification of glucosides in green beans of *Vanilla planifolia* Andrews and kinetics of vanilla β -glucosidase. *Food Chemistry* 85: 199-205.
- ECOTT, T. 2004. *Vanilla: travels in search of the luscious substance*. Penguin Group. Inglaterra.
- EXLEY, R. 2011. Vanilla Production in Australia. In: Havkin-Frenkel, D. & Belanger, F., eds. *Handbook of vanilla science and technology*. Estados Unidos, Wiley–Blackwell Publishing Ltd. p. 69-78.
- FAO. 2021. Estadísticas de vainilla. Recuperado el 2 de abril de 2021 <http://www.fao.org/faostat/es/#search/vainilla>.

- FRENKEL, C., RANADIVE, A., TOCHIHUITL, J. & HAVKIN-FRENKEL, D. 2011. Curing of vanilla. In: Havkin-Frenkel, D. & Belanger, F., eds. Handbook of vanilla science and technology. Estados Unidos, Wiley–Blackwell Publishing Ltd. p. 79 – 106.
- FRENKEL, C., RANADIVE, A., TOCHIHUITL, J. & HAVKIN-FRENKEL, D. 2011. Curing of vanilla. In: Havkin-Frenkel, D. & Belanger, F., eds. Handbook of vanilla Science and Technology. Estados Unidos, Wiley–Blackwell Publishing Ltd. p. 79 – 106.
- GALEAS, P. 2015. Gas chromatography - mass spectrometry and gas chromatography-olfactometry analysis of aroma compounds of *Vanilla pompona* schiede. Tesis MSc in Food Science. Universidad de New Jersey, New Brunswick.
- GASSENMEIER, K., RIESEN, B. & MAGYAR, B. 2008. Commercial quality and analytical parameters of cured vanilla beans (*Vanilla planifolia*) from different origins from 2006-2007 crop. Flavor and Fragrance Journal. 23: 194-201.
- GONZALEZ, C., HERNÁNDEZ, L. & VAILLANT, F. 2017. Análisis de un jugo de mora (*Robus adenotrichos*) endulzado con estevia (*Stevia rebaudina* Bertoni), una aproximación metabolómica. Revista U.D.C.A. Actualidad & Divulgación Científica. 20(1): 121-129.
- GROLLEAUD, M. 2002. Pérdidas postcosecha: un concepto mal definido o mal utilizado. FAO. Recuperado el 20 de octubre de 2020 de <http://www.fao.org/3/AC301S/ac301s00.htm#Índice>.
- GUZMÁN, C. & ZARA, R. 2012. Vanilla. In: Peter, K. ed. Handbook of Herbs and Spices. 2 ed. Estados Unidos, Woodhead Publishing Series. V. 1, p. 547 – 589.
- GUZMÁN, C. & ZARA, R. 2012. Vanilla. In: Peter, K. ed. Handbook of Herbs and Spices. 2 ed. Estados Unidos, Woodhead Publishing Series. V. 1, p. 547 – 589.
- HAVKIN-FRENKEL, D. & BELANGER, F. 2007. Application of metabolic engineering to vanillin biosynthetic pathways in *Vanilla planifolia*. In: Verpoorte, R., Alfermann, A. & Johnson, T., eds. Applications of Plant Metabolic Engineering. Países Bajos, Springer. p. 175 – 196.
- HAVKIN-FRENKEL, D. & BELANGER, F. 2016. Biotechnological production of vanillin. In: Havkin-Frenkel, D. & DUDAI, N. eds. Biotechnology in flavor production. 2 ed. Estados Unidos, Wiley–Blackwell Publishing Ltd. p. 165 – 192.
- HERNÁNDEZ, A. 2018. Cultivo de vainilla y conflictos sociales relacionados al cultivo en diferentes partes del mundo. CIPRONA, UCR. Comunicación personal.
- HERNÁNDEZ, O. 1998. Temas de análisis estadístico multivariado. San José, UCR. p. 9-39.
- HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, J. 2011. Mexican Vanilla Production. In: Havkin-Frenkel, D. & Belanger, F., eds. Handbook of vanilla science and technology. Estados Unidos, Wiley–Blackwell Publishing Ltd. p. 3 – 25.

- HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, J. 2011. Mexican Vanilla Production. In: Havkin-Frenkel, D. & Belanger, F., eds. Handbook of vanilla science and technology. Estados Unidos, Wiley–Blackwell Publishing Ltd. p. 3 – 25.
- HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, J., SÁNCHEZ, S., CUTRI, E. & LARIOS, H. 2010. La producción de Vainilla en México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. México.
- HJERL, J & LYKKE, P. 2016. The hidden cost of vanilla: Children labor and debt spirals. Recuperado el 5 de septiembre de 2018 de <https://old.danwatch.dk/en/undersogelse/thehiddencostofvanilla/>
- HOFFMAN, P. & ZAPF, C. 2011. Flavor, Quality and Authentication. In: Havkin-Frenkel, D. & Belanger, F., eds. Handbook of vanilla science and technology. Estados Unidos, Wiley–Blackwell Publishing Ltd. p. 162 – 182.
- HUESGEN, A. 2011. Analysis of natural and artificial vanilla preparations. Application Note. Agilent Technologies Germany.
- INOUE, K. & TOSHIMASA, T. 2015. Foodomics. In: Picó, Y. ed. Comprehensive Analytical Chemistry. Estados Unidos, Elsevier. 68, p. 653 - 684.
- JAGER, L., PERFETTI, G., DIACHENKO, G. 2007. Determination of coumarin, vanillin and ethyl vanillin in vanilla extract products: liquid chromatography mass spectrometry method development and validation studies. Journal of Chromatography 1145: 83 – 88.
- KHOYRATTY, S., KODJA, H. & VERPOORTE, R. 2018. Vanilla flavor production methods: A review. Industrial Corps & Products 125: 433-442.
- LAPEYRE, F., CONÉJÉRO, G., VERDEIL, J. & ODOUX, E. 2011. Anatomy and Biochemistry of Vanilla Bean Development (*Vanilla planifolia* G. Jackson). In: Odoux, E. & Grisoni, M., eds. Vanilla. Estados Unidos, CRC Press. p. 149-171.
- LEPERS, S., BRUNSCHWIG, C., COLLARD, F. & DRON, M. 2011. Morphological, Chemical, Sensory, and Genetic Specificities of Tahitian Vanilla. In: Odoux, E. & Grisoni, M., eds. Vanilla. Estados Unidos, CRC Press. p. 205-228.
- LONGO, A. & SANROMÁN, M. 2010. Vegetable flavors from cell culture. In: Hui, Y. ed. Handbook of fruit and vegetable flavors. Estados Unidos, John Wiley & Sons, Ltd. p. 663 – 680.
- LUCAS, R. 2011. Vanillas's Debt to Reunion Island. In: Odoux, E. & Grisoni, M., eds. Vanilla. Estados Unidos, CRC Press. p. 261-272.
- LUNA, J., RUIZ, H., HERRERA, E., NAVARRO, A., DELGADO, A. & LUNA, M. 2016. Variedad de microflora presente en vainilla (*Vanilla planifolia* jacks. Ex Andrews) relacionados con procesos de beneficiado. Agroproductividad 9 (1): 3-9.

- MAYORGA-GROSS, A.L., QUIRÓS-GUERRERO, L.M., FOURNY, G. & VAILLANT, F. 2016. An untargeted metabolomic assessment of cocoa beans during fermentation. *Food Research International* 89: 901-909.
- NESTLÉ. 2015. Progress Report on Responsible sourcing of Vanilla. Recuperado el 22 noviembre de 2018 de <https://www.nestle.com/asset-library/documents/creating-shared-value/responsible-sourcing/vanilla-progress-report-january-2015.pdf>.
- ODOUX, E. 2006. Glucosylated aroma precursors and glucosidase(s) in vanilla bean (*Vanilla planifolia* G. Jackson). *Fruits* 61: 171-184.
- ODOUX, E. 2011a. Developing the Aromatic Quality of Cured Vanilla Beans (*Vanilla planifolia* G. Jackson). In: Odoux, E. & Grisoni, M., eds. *Vanilla*. Estados Unidos, CRC Press. p. 188-204.
- ODOUX, E. 2011b. Vanilla Curing. In: Odoux, E. & Grisoni, M., eds. *Vanilla*. Estados Unidos, CRC Press. p. 173-188.
- PACHECO, I. 2009. Evaluación del efecto de sonicación-microondas en el beneficio de vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews). Tesis MSc. en Ciencias. Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional. Oaxaca, México.
- PALAMA, T. 2014. Metabolomic analysis of a commercially important aromatic plant from the Indian Ocean: *Vanilla planifolia*. In: Gurib-Fakim, A. *Novel plant biosources: Applications in food, medicine and cosmetics*. Estados Unidos, John Wiley & Sons, Ltd. p. 471 – 478.
- PALAMA, T., KHATIB, A., HAE, Y., COME, B., FOCK, I., VERPOORTE, R. & KODJA, H. 2011. Metabolic characterization of green pods from *Vanilla planifolia* accessions grown in La Reunion. *Environmental and Experimental Botany* 72: 258 – 265
- PANIAGUA, A. & AZOFEIFA, B. 2014. Importancia de *Vanilla* spp. Boletín Informativo #6. Arovainilla, Costa Rica. Recuperado el 5 de mayo de 2020 <https://www.aprovainilla.org/boletines-informativos>
- PANIAGUA, A. & AZOFEIFA, B. 2014. La floración. Boletín Informativo #2. Arovainilla, Costa Rica. Recuperado el 5 de mayo de 2020 <https://www.aprovainilla.org/boletines-informativos>
- PANIAGUA, A. & GARCÍA, J. 2013. Vainilla orgánica en sistemas agroforestales. INISEFOR-UNA. Costa Rica. Recuperado el 10 de mayo de 2018 de https://docs.wixstatic.com/ugd/c42f76_ef8d2d803c64460f897610d44a5d135d.pdf
- PANIAGUA, A. 2018. Especies de vainilla de las muestras de estudio. Heredia, Costa Rica. Comunicación personal.
- PARDIO, V., MARIEZCURRENA, M. WALISZEWSKI, K., SÁNCHEZ, V. & JANCZUR, M. 2009. Effect of killing conditions of vanilla (*Vanilla planifolia*, Andrews) pods during the curing process on

- aroma composition of pod ethanol extract. *International Journal of Food Science & Technology*. 44: 2417-2423.
- PÉREZ, A. 2006. Contribution à l'étude de la genèse des composés d'arôme au cours du procédé mexicain de transformation de la vanille (*Vanilla planifolia* G. Jackson). Montpellier II, Th Sciences, p. 136.
- PÉREZ, A., GUNATA, Z., LEPOUTRE, J. & ODOUX, E. 2011. 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: 2930-2937
- PÉREZ, A., ODOUX, E., BRAT, P., RIBEYRE, F., RODRIGUEZ, G., ROBLES, V., GARCÍA, 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.
- PIGNAL, M. 2011. Vanilla in Herbaria. In: Odoux, E. & Grisoni, M., eds. *Vanilla*. Estados Unidos, CRC Press. p. 43-49.
- PODSTOLSKI, A. 2011. Enzymes Characterized from Vanilla. In: Havkin-Frenkel, D. & Belanger, F., eds. *Handbook of vanilla science and technology*. Estados Unidos, Wiley-Blackwell Publishing Ltd. p. 281-291.
- POLO, C. 2005. Estadística multivariable. Cataluña, Univ. Politéc. De Catalunya. p. 13-41.
- PROCOMER. 2021. Estadísticas de exportación de vainilla. Recuperado el 2 de abril de 2021 de <http://sistemas.procomer.go.cr/estadisticas/inicio.aspx>.
- QUESADA, S. 2007. Manual de experimentos de laboratorio para bioquímica. EUNED
- RANADIVE, A. 1992. Vanillin and related flavor compounds in Vanilla extracts made from beans of various origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40: 1922-1924.
- RANADIVE, A. 1992. Vanillin and related flavour compounds in Vanilla extracts made from beans of various origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40: 1922-1924.
- RANADIVE, A. 2011. Quality Control of Vanilla Beans and Extracts. In: Havkin-Frenkel, D. & Belanger, F., eds. *Handbook of vanilla science and technology*. Estados Unidos, Wiley-Blackwell Publishing Ltd. p. 141-161.
- RANADIVE, A. 2011. Quality Control of Vanilla Beans and Extracts. In: Havkin-Frenkel, D. & Belanger, F., eds. *Handbook of vanilla science and technology*. Estados Unidos, Wiley-Blackwell Publishing Ltd. p. 141-161.
- SANTOS, I., SMUTS, J. & SCHUG, K. 2017. Rapid profiling and authentication of vanilla extracts using gas chromatography-vacuum ultraviolet Spectroscopy. *Food Anal. Methods*. 10: 4068-4078.

- SARTER, S. 2011. Microbial Safety of Cured Vanilla Beans. In: Odoux, E. & Grisoni, M., eds. *Vanilla*. Estados Unidos, CRC Press. p. 229-236.
- SECRETARÍA DE ECONOMÍA (SE). 2009. Norma Mexicana Productos no industrializados para uso humano –Vainilla – (*Vanilla fragans* (Salisbury) Ames) –Especificaciones y métodos de prueba. NMX-FF-074-SCFI-2009. México. p.38.
- SECRETARÍA DE ECONOMÍA (SE). 2011. Norma Oficial Mexicana Vainilla de Papantla, extractos y derivados-Especificaciones, información comercial y métodos de ensayo(prueba). NOM-182-SCFI-2011. México. p. 11.
- SINHA, A., SHARMA, U. & SHARMA N. 2008. A comprehensive review on vanilla flavor: Extraction, isolation and quantification of vanillin and others constituents. *International Journal of Food Science and Nutrition*. 59(4): 299-236
- SKOOG, D., WEST, D., HOLLER, F. & CROUCH, S. 2010. *Fundamentos de Química Analítica*. 8 ed. México, Cengage Learning. p. 985-1007.
- SOTO, M. & DRESSLER, 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. *Lankasteriana* 9(3): 285-354.
- SOTO, M. 2006. La vainilla: retos y perspectivas de su cultivo. *CONABIO. Biodiversitas* 66: 1 – 9.
- SPICEJUNGLE. 2018. Tahitian Vanilla Beans (Tahiti). Recuperado el 4 de junio de 2018 de <https://www.beanilla.com/tahitian-vanilla-beans?nosto=nosto-page-product1>
- SUJALMI, S., SUHARSO, S., SUPRIYANTO, R., & BUCHARI, B. 2005. Determination of vanillin in vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) from Lampung Indonesia by high performance liquid chromatography. *Indonesian Journal of Chemistry* 5(1):7-10.
- TAKAHASHI, M., NAI, Y., MIYAZAWA, N., KUROBAYASHI, Y. & FUJITA, A. 2013. Identification of the key odorants in Tahitian cured vanilla beans (*Vanilla tahitensis*) by CG-MS and an aroma extract dilution analysis. *Bioscience, Biotechnology & Biochemistry*. 70 (40): 601-605.
- TOTH, S. 2012. Comparison and integration of analytical methods for the characterization of vanilla chemistry. Tesis *PhD* Food Science. University of New Jersey. New Jersey, Estados Unidos.
- VALDÉS, A., CIFUENTES, A. & LEÓN, C. 2017. Foodomics evaluation of bioactive compounds in foods. *Trends in Analytical Chemistry*. 96: 2-13.
- VARELA, E. 2011. Vanilla Production in Costa Rica. In: Havkin-Frenkel, D. & Belanger, F., eds. *Handbook of vanilla science and technology*. Estados Unidos, Wiley–Blackwell Publishing Ltd. p. 40 – 49.

- VIVEROS, B. 2007. Evaluación de la extracción de vainilla, mediante la adaptación de un dispositivo Soxhlet. Tesis Lic. en Ing. de Alimentos. Universidad de las Américas Puebla, Dpto. de Ing Química y Alimentos. México. Disponible en http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lia/viveros_g_b/
- WALISZEWSKI, K. MÁRQUEZ, O. & PARDIO, V. 2009. Quantification and characterization of polyphenol oxidase from vanilla bean. *Food Chemistry* 117: 196-203.
- WALISZEWSKI, K., PARDIO, V. & OVANDO, S. 2006. A simple and rapid HPLC technique for vanillin determination in alcohol extract. *Food Chemistry* 101: 1059-1062.
- WATTS, J. 2018. Madagascar's vanilla wars: prized spice drives death and deforestation. *The Guardian: International Edition*. Recuperado el 7 de junio de: <https://www.theguardian.com/environment/2018/mar/31/madagascars-vanilla-wars-prized-spice-drives-death-and-deforestation>.
- WU, SHENGLI. 2010. *Data Fusion in Information Retrieval*. Berlín, Springer.
- XOCHIPA, R., DELGADO, A., HERRERA, B., ESCOBEDO, J. & ARÉVALO, L. 2016. Influencia del proceso de beneficiado tradicional mexicano en los compuestos del aroma de *Vanilla planifolia* Jacks. *Ex Andrews. Agroproductividad* 9 (1): 55-62.
- YANG, H., BARROS-RIOS, J., KOUTEVA, G., RAO, X., CHEN, F., SHEN, H., LIU, C., PODSTOLSKI, A., BELANGER, F., HAVKIN-FRENKEL, D. & DIXON, R. 2017. A re-evaluation of the final step of vanillin biosynthesis in the orchid *Vanilla planifolia*. *Phytochemistry* 139: 33-46.
- ZHANG, S. & MUELLER, C. 2012. Comparative analysis of volatiles in traditionally cured bourbon and ugandan vanilla bean (*Vanilla planifolia*) extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 10433-10444.

9. Anexos

Cuadro XV. Dimensiones promedio (largo, ancho y grosor) de las vainas verdes según la especie y región de origen.

Región	Especie	Dimensiones (cm)		
		Largo	Ancho	Grosor
Huetar Norte	HCR	18,82	1,59	1,24
Pacífico Central	HCR	20,14	1,88	1,26
Brunca	<i>V. pompona</i>	22,20	2,55	1,68
	<i>V. hardii</i>	16,20	1,05	0,73

Cuadro XVI. Dimensiones promedio (largo, ancho y grosor) de las vainas beneficiadas según la especie y región de origen.

Región	Especie	Dimensiones (cm)		
		Largo	Ancho	Grosor
Huetar Norte	HCR	20,53	0,95	0,44
	<i>V. planifolia</i>	12,60	0,83	0,43
Pacífico Central	HCR	18,63	1,15	0,45
Brunca	<i>V. pompona</i>	22,20	2,60	0,36
	<i>V. hardii</i>	15,08	0,63	0,29
	HCR	17,33	1,02	0,37

Cuadro XVII. Contenido de humedad promedio para vainas verdes y beneficiadas de vainilla de tres regiones productivas de Costa Rica según especie.

Región	Especie	Humedad (g/100 g)	
		Verdes	Beneficiadas
Huetar Norte	HCR	79,9	16,2
	<i>V. planifolia</i>	ND	31,7
Pacífico Central	HCR	81,1	40,4
Brunca	<i>V. pompona</i>	70,7	16,6
	<i>V. hardii</i>	86,4	12,4
	HCR	ND	18,9

ND: Muestras no disponibles

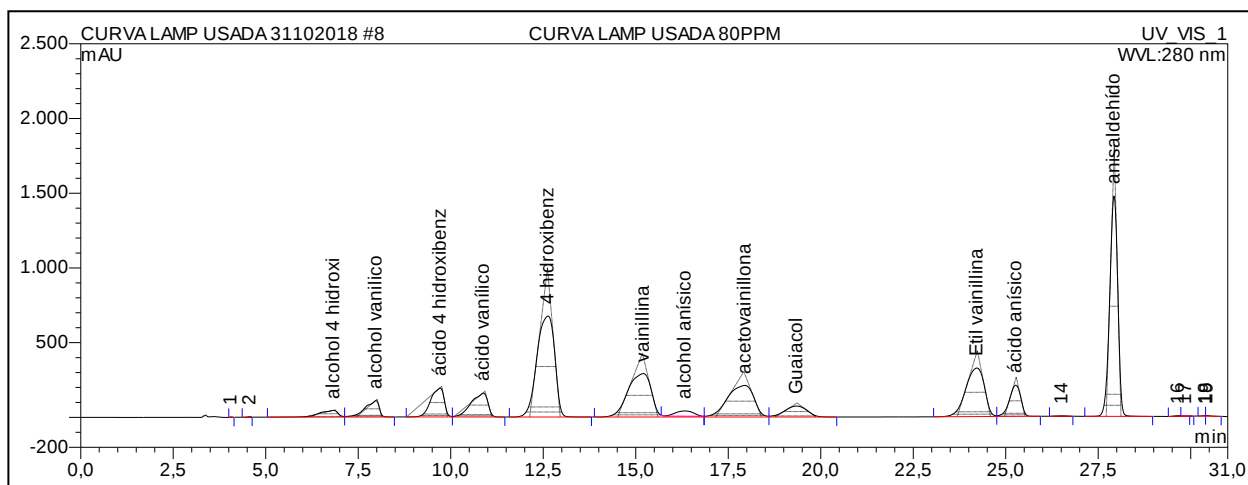


Figura 21. Cromatograma obtenido a partir del análisis de HPLC-UV para la mezcla de patrones de 80 ppm de la curva de calibración.

Cuadro XVIII. Variables incluidas para los PCA analizados en la sección 5.3.1.

Variable	Modelo 1	Modelo 2
Largo	Si	Si
Ancho	Si	Si
Grosor	Si	Si
Masa	Si	No
Anisaldehído	Si	Si
Ácido anísico	Si	Si
Alcohol anísico	Si	Si
Vainillina	Si	Si
Ácido vanílico	Si	Si
Alcohol vanílico	Si	Si
<i>p</i> -hidroxibenzaldehído	Si	Si
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	Si	Si
Alcohol <i>p</i> -hidroxibencílico	Si	Si
Desconocido 01	Si	Si
Desconocido 02	Si	Si
Desconocido 03	Si	Si
Desconocido 04	Si	Si
Desconocido 05	Si	Si
Desconocido 07	Si	Si
Desconocido 08	Si	Si
Desconocido 09	Si	Si
Desconocido 10	Si	Si
Desconocido 11	Si	Si