



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DETERMINACIÓN DE ADULTERACIÓN EN EXTRACTOS DE VAINILLA POR HPLC

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO DE ALIMENTOS

**PRESENTA
DIEGO ALEJANDRO CORTÉS ORDAZ**



Ciudad Universitaria, CD. MX.

2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente: **Humberto Ramón Gómez Ruiz.**

Vocal: **Araceli Patricia Peña Álvarez.**

Secretario: **Héctor García Ortega.**

1er Suplente: **Michel Monserrat Camacho Lara.**

2º Suplente: **Lucia Hernández Garciadiego.**

El tema se desarrolló en la Facultad de Química, Laboratorio 108 del edificio "B", División de Estudios de Posgrado, Departamento de Química Analítica.

Asesor del tema:

M. en C Humberto Ramón Gómez Ruiz _____

Supervisor técnico:

M. en C Lucia Hernández Garciadiego _____

Sustentante:

Diego Alejandro Cortés Ordaz _____

Dedicatorias

Quiero agradecer a Dios por permitirme llegar a este momento de mi vida, en donde me encuentro culminando mis estudios, no ha sido un camino fácil, ha estado lleno de obstáculos, retos, errores, aciertos, desvelos, enojos y mucho esfuerzo.

Dedico este trabajo a ti, madre, que eres la persona más importante en mi vida, eres mi ejemplo a seguir, y mi principal motivación. Te agradezco por todo tu amor y apoyo incondicional que me has brindado a lo largo de mi vida, por ser esa persona que nunca ha dejado de creer en mí y en lo que puedo llegar a lograr. Gracias por tu paciencia, tu cariño, tus regaños y tus consejos los cuales me han impulsado para mejorar y convertirme en una mejor persona cada día. El mejor regalo y herencia que me diste es el de la oportunidad de continuar con mis estudios y perseguir mis sueños, sé que siempre contaré contigo madre.

A mi familia, porque ha sido fundamental para que concluya mi carrera universitaria, gracias al apoyo que me ha brindado, y por su paciencia en los momentos más difíciles cuando llegaba frustrado de la universidad. Agradezco a mi hermano Víctor por su cariño, consejos y regaños, a mi abuelita Enriqueta, por ser una de mis motivaciones, a mi tío Armando, por ser mi guía en el estudio desde que comencé mi vida universitaria en la prepa, a mi tía Edith, por sus consejos y por tener tiempo de escucharme, y a mi primo Yoav, a quien quiero como a un hermano, y es esa la razón por la cual quiero convertirme en su ejemplo a seguir. Sin todos ellos no podría haberlo logrado.

Dedico también este trabajo al amor de mi vida, Jatziry Lugardo, mi "chatita", agradezco a la vida el haberte conocido y el poder llegar a compartir este momento tan importante contigo, te convertiste junto a mi madre en la persona más importante en mi vida. Gracias por todo el amor, el cariño, la paciencia y el apoyo que me has dado a lo largo de estos seis años. Agradezco de todo corazón que hayas estado presente en los momentos más difíciles a los cuales nos hemos enfrentado tú y yo, pero también en aquellos llenos de éxito, alegría y felicidad. Espero que en un futuro aún lo sigas estando. No hubiera sido posible lograrlo sin tu amor y tu compañía, nunca olvides lo mucho que te amo y que siempre estaré para ti.

Agradecimientos

Agradezco a todos los profesores que desempeñan un papel fundamental dentro de las aulas y los laboratorios de la Facultad de Química, ser académico no es una tarea fácil, pero deben estar orgullosos de que con su trabajo forjaran a los futuros profesionistas que este país y la sociedad necesitan.

Al Dr. Humberto y a la Mtra. Lucía, por abrirme las puertas del laboratorio 108 de la División de Estudios de Posgrado y darme la confianza, el apoyo y la paciencia para llevar a cabo este proyecto con el cual culminaré mis estudios.

A la Dra. Patricia Severiano por abrirme el espacio en el laboratorio 4-D del Departamento de Alimentos y Biotecnología. Agradezco el tiempo dedicado y su apoyo, los cuales fueron fundamentales para culminar mi trabajo experimental. Agradecemos a los jueces entrenados del programa de Servicio Social "Apoyo a proyectos para realizar y desarrollar pruebas de Evaluación Sensorial" con clave 2020-12/16-3165 de la Facultad de Química UNAM, por su participación en el desarrollo del perfil sensorial de las muestras de vainilla de este estudio.

Quiero agradecer de forma especial al M. en C. Hiram F. Cahero, la dedicación, el empeño y el compromiso con el que realiza su labor de docente dentro de la Facultad de Química, es admirable. Gracias por compartir sus conocimientos y experiencias, las cuales llevaré conmigo tratando de ponerlas en práctica en mi vida profesional. Usted fue uno de los responsables de que encontraré un profundo cariño y amor al mundo de la química de los alimentos. Agradezco que me brindara la oportunidad de realizar mi servicio social dentro de las aulas de la Facultad, por tomarse el tiempo de revisar mi trabajo escrito y por el acompañamiento durante mi proceso de titulación, y sobre todo agradezco su amistad.

A la UNAM, por abrirme las puertas y darme la oportunidad de realizar mis estudios, de recorrer sus pasillos, de aprender en sus aulas, de estudiar en sus bibliotecas, de ayudarme a descubrir mis habilidades, mis talentos, mis debilidades, de impulsarme en mi crecimiento personal, de proporcionarme todos los recursos y las herramientas que usaré ejerciendo mi profesión.

El pertenecer a la máxima casa de estudios del país es uno de los logros más importantes de mi vida desde que ingrese a la preparatoria número 5 "José Vasconcelos"; me llena de gran orgullo y de honor decir que soy orgullosamente UNAM.

"Por mi raza hablará el espíritu"

A mis amigos. En el camino encontré a maravillosas personas que me brindaron su apoyo, cariño, que me escucharon y me dieron consejos. Agradezco a Karen Tovar, Diego Tercero, Enrique Vera, Edgar García, Fanny Linares, Miguel Esquivel, Diana Montañez, Ximena Sandoval, Jürgen Álvarez, Adrián Minutti, Alejandro Luna, Balam Vargas, Guillermo Mancera, Gerardo Peralta, José Limón, Jessica Trejo, Fernanda Gutiérrez, Raymundo Islas, Sherlim Zamudio, Sandra Márquez, Itzel Salas, Daniela Checa y Erick Verdeja. Sin su presencia mi paso por la Facultad no hubiera sido el mismo. También agradezco a mis amigos Ricardo Romo, Jesús Castañeda y Diego Tapia, siempre llevare en mi recuerdo todas las experiencias que vivimos, las fiestas, las reuniones, los viajes, las retas, las peleas, las pláticas, las risas, las alegrías, las tristezas y también el tiempo de estudio que con algunos de ellos pasé. Puedo decir con seguridad que encontré a mis mejores amigos con los que contaré para toda la vida.

Contenido

I. Introducción	4
II. Objetivos.....	6
2.1 Objetivo general.....	6
2.2 Objetivos específicos.....	6
III. Hipótesis.....	7
Capítulo 1. La vainilla	8
1.1 Generalidades de la vainilla.....	8
1.2 Importancia del uso de la vainilla a nivel mundial.....	13
1.3 Normatividad sobre etiquetado y denominaciones de extractos naturales de vainilla, derivados y sustitutos	16
Capítulo 2. Cromatografía.....	19
2.1 Técnicas cromatográficas.....	19
2.2 Clasificación según el mecanismo de separación.....	22
Capítulo 3. Teoría de cromatografía	27
3.1 Separación	27
3.2 Equipo para cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC)..	28
3.3 Parámetros cromatográficos.....	35
Capítulo 4. Tratamiento de muestras.	41
4.1 Preparación de muestras para su análisis	41
4.2 Extracción por maceración	42
Capítulo 5. La Evaluación Sensorial	43
5.1 Percepción y propiedades sensoriales	43

5.2. Métodos sensoriales.....	44
5.3 Perfil Flash (Flash Profile)	45
Capítulo 6. Desarrollo experimental.....	47
6.1 Metodología.....	47
6.2 Muestras empleadas en el estudio.....	48
6.3 Reactivos y disolventes	51
6.4 Selección de compuestos a analizar.....	51
6.5 Tratamiento de las muestras.....	52
6.6 Extracción de las vainas de vainilla	53
6.7 Análisis de las muestras	54
6.8 Identificación y cuantificación.....	54
6.9 Determinación del límite de detección (LD) y cuantificación (LC)	58
6.10 Análisis sensorial	58
6.11 Análisis estadístico.....	60
Capítulo 7. Resultados y discusión del estudio analítico	62
7.1 Análisis de parámetros de elución óptima de los analitos.....	62
7.2 Determinación de los límites de detección y cuantificación.	68
7.3 Identificación y cuantificación de los componentes presentes en las muestras	69
7.4 Análisis estadístico de los extractos elaborados a partir de vainas de vainilla	74
7.5 Análisis estadístico de las muestras comerciales de extractos de vainilla	76
Capítulo 8. Resultados y discusión del Análisis Sensorial	81
8.1 Generación de atributos	81

8.2 Perfil sensorial de los extractos de vainilla comerciales.....	83
Capítulo 9. Conclusiones.....	92
Bibliografía.....	94
Anexo A.....	105
Anexo B.....	108
Anexo C.....	116

I. Introducción

Los productos comerciales conocidos en el mercado como "vainilla" son extractos alcohólicos elaborados a partir de los compuestos naturales presentes en las vainas de la orquídea *V. planifolia* cuyo sabor, olor y color característicos son el resultado del proceso de curado, también conocido como beneficiado.

En el extracto alcohólico de vainilla se encuentran alrededor de 200 compuestos responsables de sus características organolépticas (Huesgen, 2011), entre éstos destaca la vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído). Las formas comerciales más comunes en las que se comercializa son: "extractos de vainilla natural", "saborizante natural" y "saborizante sintético" o "artificial". Si bien es difícil determinar la diferencia entre éstas, debido a que el aroma y el sabor son muy parecidos entre los productos naturales y los sintéticos, situación que es aprovechada en muchas ocasiones por los productores de extractos de vainilla para realizar prácticas fraudulentas de adulteración engañando al consumidor.

Por lo anteriormente expuesto, es primordial la identificación y cuantificación de los principales componentes del extracto natural de vainilla, así como la detección de adulterantes o prácticas de etiquetado fraudulentas en extractos de vainilla comerciales.

En este proyecto se propone un método analítico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés) con detector de luz UV de arreglo de diodos (DAD, por sus siglas en inglés) para evaluar los principales componentes del extracto natural de vainilla, así como para identificar y cuantificar los compuestos utilizados en la síntesis de la vainillina y las sustancias frecuentemente adicionadas como adulterantes.

El análisis químico por el método propuesto se aplicará a extractos preparados en el laboratorio a partir de vainas de vainilla de la región de Papantla, Veracruz y a diferentes muestras comerciales.

La diferenciación entre los extractos naturales y los artificiales se realizó a partir del perfil químico y de las concentraciones de los componentes que corresponden a la vainilla natural, así como mediante la detección de subproductos de síntesis orgánica de la vainillina. Con ello se buscó conocer si las muestras comerciales cumplen con lo reportado en su etiquetado y no infringen la legislación mexicana vigente.

Es cierto que no se puede negar el papel que desempeñan los métodos analíticos instrumentales para la identificación química de compuestos presentes en una muestra, pero, en muchos casos estos no miden todas las características de un alimento, sino solamente algunas de ellas.

El interés de este trabajo es también definir el perfil sensorial de las muestras comerciales de extractos y saborizantes de vainilla, lo cual permitirá cuantificar las diferencias o semejanza que son significativamente importantes en sus características sensoriales de aroma, sabor y color en la aceptación, por ello, se hizo uso de la evaluación sensorial empleando la prueba descriptiva denominada Perfil Flash modificado (Väkeväinen et al., 2020) que permite medir, interpretar y analizar aquellas características de los alimentos que son percibidas por los sentidos (vista, olfato, gusto, tacto y oído), y, por lo tanto, las diferencias sensoriales entre extractos o saborizantes naturales y extractos o saborizantes artificiales.

II. Objetivos

2.1 Objetivo general

- Proponer un método analítico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia para evaluar los principales componentes del extracto natural de vainilla (*Vanilla planifolia*) y determinar la posible adulteración en extractos comerciales que se encuentran en el mercado mexicano.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar el perfil y las concentraciones de los componentes presentes en la vainilla natural.
- Identificar subproductos de la síntesis de la vainilla sintética en las muestras comerciales.
- Determinar si los productos comerciales cumplen con lo reportado en su etiquetado y que no infringen la legislación mexicana vigente.
- Generar el perfil sensorial correspondiente a la vainilla de la especie *V. planifolia* para conocer los atributos sensoriales que la caracterizan.
- Definir los atributos sensoriales característicos para un extracto natural y uno artificial de vainilla.
- Definir la correlación entre el análisis sensorial de los extractos naturales de la vainilla y los extractos sintéticos y el perfil químico determinado por HPLC.

III. Hipótesis

- El perfil químico y las concentraciones de los componentes que corresponden a la vainilla natural determinado por HPLC y aquel de las muestras comerciales que declaran ser “extractos o saborizantes naturales de vainilla” deberán ser idénticos entre sí y con ello evitar infringir la legislación mexicana vigente.
- Debe ser posible determinar diferencias sensoriales entre un extracto natural y uno artificial de vainilla y, por lo tanto, correlacionarla con el perfil de componentes presentes en ellos.

Capítulo 1. La vainilla

1.1 Generalidades de la vainilla

La vainilla cuyo nombre del náhuatl "tlilxochitl" que significa "flor negra" pertenece a la familia de las Orquidaceae, un grupo de plantas clasificadas como monocotiledóneas (González, 1999) originaria de México, con una distribución a lo largo de las zonas tropicales de todos los continentes, excepto Australia (Gigant, Bory, Grisoni & Besse, 2011). El número de especies descritas son alrededor de 110, de las cuales sólo tres tienen importancia comercial debido a las características de sus frutos (*V. planifolia*, *V. thahiensis* y *V. pompona*), siendo la especie *V. planifolia* la que cubre alrededor del 95% de la demanda (Bory, Grisoni, Duval & Besse, 2008).

La vainilla es una planta perenne de tipo hemiepífita, es decir, que crece sobre otro vegetal u objeto usándolo solamente como soporte (Soto-Arenas, 2003) posee un tallo robusto y que inicia su crecimiento en el suelo y luego se adhiere y trepa por medio de raíces adventicias sobre el tronco de árboles llamados hospederos, anfitriones o más comúnmente, tutores (Havkin Frenkel *et al.*, 2004; FAO, 2009) (Figura 1).



Figura 1. Flor, hoja y fruto representativo de la *Vanilla planifolia*.

Investigaciones recientes consideran que en México se encuentra la mayor diversidad genética del género *Vainilla*. Es ésta la razón por la cual se estima que las primeras plantaciones fueron establecidas en los municipios de Papantla y Misantla aproximadamente hace 250 años (Lubinsky et al., 2008; Herrera-Cabrera et al., 2012). En la actualidad su cultivo se realiza en la región de Totonacapan localizada entre los estados de Puebla y Veracruz (Figura 2), ambos estados son considerados los más importantes en México debido al aprovechamiento del cultivo, selección y producción de vainilla. Esta región incluye los municipios de Papantla, Tecolutla, Gutiérrez Zamora, Coxquihui en el estado de Veracruz. San José Acateno, Tanampulco y Ayotoxco en el estado de Puebla (Soto-Arenas 2003; Chenatu et al., 2010).



Figura 2. Ubicación de la región de crecimiento de la *Vanilla planifolia* en la región de Totonacapan ubicada con color rojo en el mapa.

Fuente: Antonio Narro, 2001. "Establecimiento, producción, beneficio y comercialización de la vainilla (*Vanilla* spp.) en México".

El proceso de crecimiento de las vainas de vainilla dura hasta nueve meses. El fruto es una vaina aplanada y alargada que comúnmente recibe el nombre de silicuas o cápsula por parte de los botánicos y mide entre 15 a 20 cm de largo, del cual se obtienen los extractos (Bonfil, 1988). Al momento de la cosecha, las vainas son firmes, gruesas, de color verde amarillento y sin olor (Figura 3 a); pero sólo cuando las vainas se vuelven de color marrón (Figura 3 b), después de secarse y curarse, etapa también conocida como "beneficiado", en el que ocurren los cambios enzimáticos donde se desarrollan sus características particulares debido a la acción de las β -glucosidasas (Ecott, 2004), tales como la formación de la vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído), y otros compuestos aromáticos y saborizantes. De esta manera puede ser comercializada y utilizada por las diferentes industrias de alimentos.



Figura 3. Frutos de vainilla no beneficiados (a) y frutos beneficiados de vainilla (b).

De acuerdo con Dignum et al. (2001) y Odoux (2011), el “beneficiado” incluye las etapas de marchitamiento que involucra un tratamiento térmico que interrumpe la maduración, pero mantiene la actividad enzimática del proceso fermentativo; el sudado, que consiste en ciclos de exposición de silicuas (fruto capsular) al sol con el uso de contenedores de madera para resguardar la temperatura y la humedad de las vainas de vainilla; el secado o tendido de silicua al sol o en hornos para prevenir crecimiento de microorganismos y el acondicionamiento de silicuas en cajas durante tres a cuatro meses para obtener el aroma característico.

La composición y la calidad de los frutos curados es variable, principalmente debido a la cantidad de factores que influyen durante su procesamiento, así como también por las condiciones de crecimiento, la composición del suelo, la madurez del fruto, entre muchas otras más. De forma general, se tiene que los frutos curados, comúnmente llamados vainas de vainilla, contienen alrededor de 200 componentes volátiles y semi-volátiles responsables de sus características organolépticas. La vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído), el ácido vainillínico (ácido-4-hidroxi-3-metoxibenzoico), el ácido 4-hidroxibenzoico y el 4-hidroxibenzaldehído son los compuestos principales encontrados y su cuantificación es un criterio importante para verificar su calidad (Pérez-Silvia *et al.*, 2006) (Figura 4).

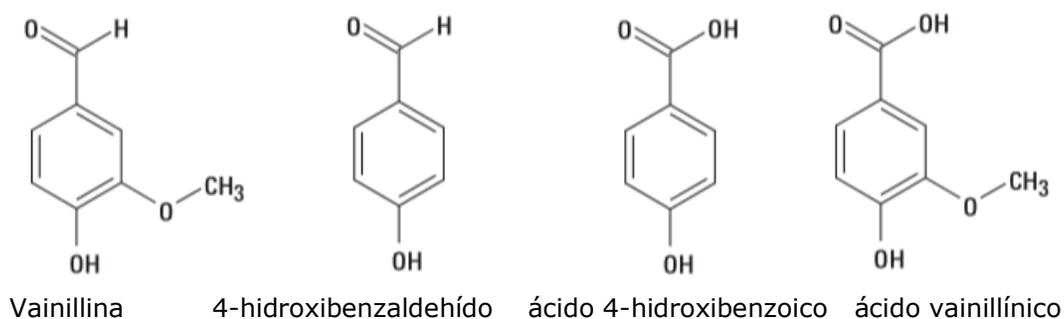


Figura 4. Componentes naturales presente en la vainilla responsables de sus características organolépticas.

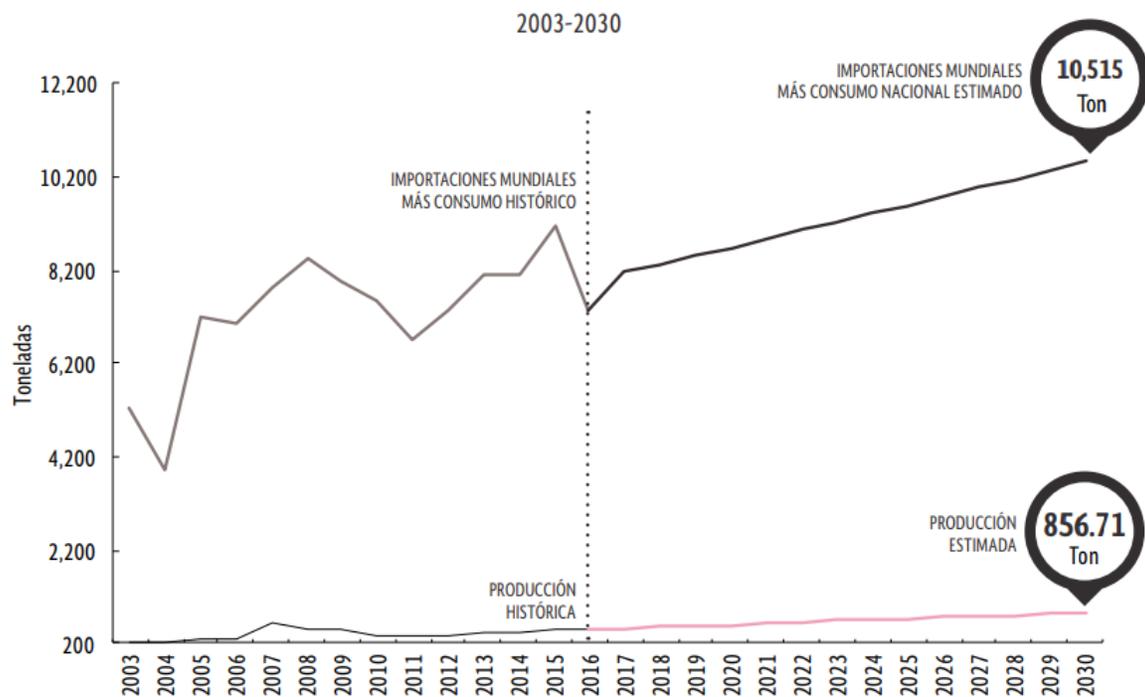
Además de contener estos compuestos volátiles y semi-volátiles también, en las vainas de vainilla se encuentran presentes otros grupos de compuestos químicos conformados por proteínas, azúcares, resinas, pigmentos, minerales, aceites esenciales y fibra (FAO,2009) y los cuales han sido reportados por Rao y Ravishankar (2000) (Tabla 1).

Tabla 1. Composición química de los frutos de vainilla beneficiados (Rao y Ravishankar, 2000).

Componente	Concentración (g/kg en base seca)
Vainillina	20
Ácido vainillínico	1
Ácido 4-hidroxibenzoico	2
4-hidroxibenzaldehído	0.2
Azúcares	250
Lípidos	150
Fibra	150-250
Minerales	60
Agua	350

1.2 Importancia del uso de la vainilla a nivel mundial

La vainilla es sin duda una de las materias primas de mayor importancia en el mercado mundial, y es la segunda especie más cara después del azafrán. Debido principalmente a sus características organolépticas, se emplea en diversas industrias, que van desde la industria de los alimentos, la cosmética como también en la farmacéutica, por lo cual, en las últimas décadas el costo por tonelada (ton) producida es elevado, oscilando entre los 5,262 US \$/ton y los 6,528 US \$/ton de vaina beneficiada (Havkin-Frenkel & Belanger, 2007; FAOSTAT, 2016).



Gráfica 1. Consumo internacional-producción de vainilla.

Fuente: SAGARPA, Planeación agrícola nacional 2017-2030 de la Vainilla Mexicana.

El cultivo de la vainilla se ha extendido de tal modo que, entre 1990 y 2000 la producción mundial ascendió a 4,466 toneladas cosechadas en un total de 38,485 hectáreas, los principales productores son: Madagascar, Indonesia, China y La Unión de Comoras, desplazando a México al décimo primer lugar de producción contribuyendo con menos del 5% anual, sin embargo, pese al esfuerzo en el cultivo de la vainilla la demanda sostenida duplica a la oferta actual de producción (Gráfica 1.) (Anilkumar, 2004; SAGARPA, 2010; SHCP, 2014).

En la industria alimentaria, el principal uso de los extractos de origen natural de vainilla es como saborizante en la elaboración de diversos productos como lo son los helados, bebidas carbonatadas, productos de repostería, chocolates, entre otros, siendo el sabor "vainilla" el más popular entre los consumidores (De Jager, Perfetti & Diachenko, 2007; Sinha et al., 2008; Hernández-Hernández, 2011).

Las estimaciones de McCormick & Co., Inc. revelaron que el extracto de vainilla fue utilizado en gran medida por el sector industrial (75% del suministro total), seguido por el sector minorista (20%) y el sector de servicios de alimentos (5%) (Gillette & Hoffman, 1992). Del total de la aplicación industrial, el 30% se utilizó en preparaciones de helados, el 17% en bebidas no alcohólicas, el 11% en bebidas alcohólicas, el 10% en yogurt y el 7% restante en productos de panadería, confitería, cereales y productos de tabaco.

Para minimizar los costos y satisfacer la demanda comercial en un 97% del mercado que depende de la vainilla en las últimas décadas se ha optado por el uso de vainilla sintética o artificial obtenida por métodos químicos de síntesis o biotecnológicos, con precios entre los 11 US \$/kg y 15 US \$/kg en contraste con los extractos de vainilla natural que han alcanzado precios de hasta 1,500 US \$/kg hasta 4,000 US \$/kg (Ecott,

2004; Soto-Arenas, 2003; Hernández-Hernández, 2011; Paniagua & Azofeifa, 2014). Aunque la producción de vainilla por estos medios es capaz de satisfacer la demanda anual mundial, tiene serios inconvenientes. Por un lado, en la comercialización de los extractos naturales de vainilla se están llevando a cabo prácticas fraudulentas como la adulteración con vainillina sintética, obtenida a partir de cumarina, guayacol o eugenol, o con etilvainillina (Figura 5), que se produce también de manera sintética a partir de safrol o lignina. En segundo lugar, aunque la etilvainillina es aproximadamente tres o cuatro veces más potente como agente saborizante que la vainilla (Moreno-Ley et al., 2019) sus características sensoriales son de menor calidad.

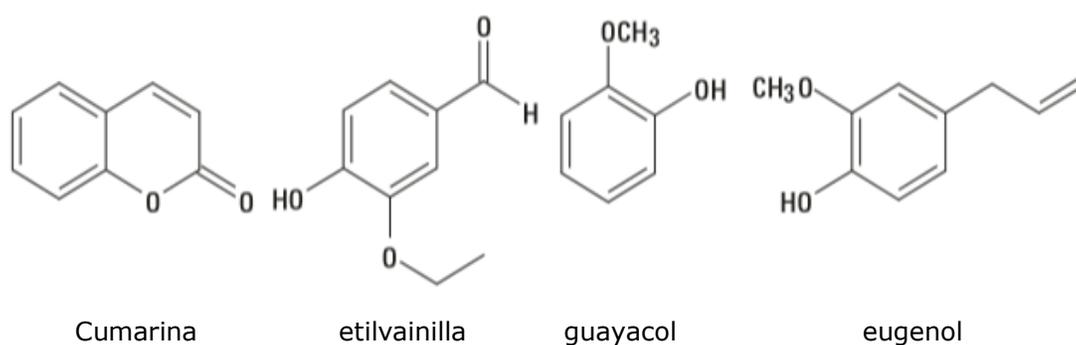


Figura 5. Componentes sintéticos presente en vainilla artificial y componentes usados para la síntesis de vainillina y etilvainillina.

Los extractos de vainilla provenientes de las vainas de vainilla natural poseen un sabor picante delicado y puro que no puede ser duplicado exactamente por los productos sintéticos. Por esta razón, y debido a la oferta limitada, la vainilla natural puede obtener un precio superior, lo que lleva a numerosos esfuerzos para su adulteración (Sinha, Sharma & Sharma, 2009).

1.3 Normatividad sobre etiquetado y denominaciones de extractos naturales de vainilla, derivados y sustitutos

La adulteración consiste básicamente en sustituir o agregar una cierta cantidad de materias primas y/o compuestos originales por otros similares, pero más baratos y de menor calidad (Cortez, 2011). Esta práctica se realiza con el propósito de lograr mayores ganancias por parte de los productores aun cuando en ocasiones se pone en riesgo la calidad y la seguridad alimentaria de los consumidores (Rhodia, 2014).

Otro problema al que se enfrenta los extractos naturales de vainilla se debe a la poca vigilancia en la regulación sobre su etiquetado (NOM-030-SCFI-2006) y el cumplimiento con las disposiciones oficiales mexicanas, existen muchas marcas que engañan a los consumidores colocando en su etiquetado la frase "extracto natural de vainilla" y que en lo absoluto lo son ya que están elaborados de manera sintética a partir de un material vegetal completamente diferente, como lo es la lignina, el safrol, el guayacol y/o el eugenol.

En México las Normas Oficiales Mexicanas (NOM) son las regulaciones técnicas de observancia obligatoria expedidas por las dependencias gubernamentales competentes, como la Secretaría de Economía, la Secretaría de Salud y la Secretaría de Energía, que establecen las reglas, especificaciones, atributos, características o prescripciones aplicables a un producto, proceso, instalaciones y etiquetado de diferentes productos y servicios. Por su parte las normas NOM-139-SCFI-2012, NOM-182-SCFI-2011 y la NOM-030-SCFI-2006 (DOF, 2006; DOF, 2011; DOF, 2012) son las encargadas de definir la información comercial, el etiquetado y la denominación de extracto natural de vainilla, derivados y sustitutos de la siguiente manera:

- "Extracto natural de vainilla: Solución alcohólica de la vaina de vainilla beneficiada, de color ámbar obtenida mediante diferentes procesos, tales como la maceración, la percolación o filtración, entre otros, puede o no estar concentrado, la concentración de etanol en el extracto no debe de ser menor del 35%(v/v) y debe contener, por lo menos, una UCV (unidad de concentración de vainilla) que equivale a un mínimo de 0.11 g de vainillina en 100 mL de extracto.
- Oleorresinas de vainilla: Son los productos que se obtienen de la vainilla beneficiada mediante una extracción con disolventes eliminándolos total o parcialmente, perdiendo en el proceso, constituyentes aromáticos.
- Saboreador, saborizante o aromatizante natural: Se le conoce así a la preparación de sustancias o sus mezclas obtenidas exclusivamente por procesos físicos, a partir de vegetales o de materias primas de origen animal en su estado natural o procesadas por fermentación de materias lácteas y que son aptas para el consumo humano.
- Saboreador, saborizante o aromatizante sintético-artificial: Se les conoce así a las sustancias que no han sido aún identificadas en los productos naturales procesados o no y que son aptas para consumo humano.
- Vainilla en polvo o polvo vainillado: Se le conoce así a la mezcla de frutos beneficiados de vainilla molida u oleorresina de vainilla o ambas, mezcladas con uno o más de los siguientes ingredientes: azúcar, dextrosa, lactosa, almidón comestible, sólidos de jarabe de maíz o goma de acacia.

Al igual que en las vainas de vainilla, los extractos deben contener la misma cantidad de compuestos químicos responsables de sus características saborizantes en proporciones similares, siendo la vainillina el de mayor concentración. Por ello, determinar el perfil químico de compuestos presentes en ellas por medio de una técnica analítica permitirá diferenciar entre los extractos de origen natural y los sintéticos o artificiales.

Capítulo 2. Cromatografía

La cromatografía se define como “un método físico de separación en el cual los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una que es estacionaria (fase estacionaria), mientras que la otra (la fase móvil) se mueve en una dirección determinada” (IUPAC 1995).

2.1 Técnicas cromatográficas.

Las técnicas cromatográficas se clasifican comúnmente indicando el estado físico de la fase móvil y la fase estacionaria utilizadas (Harris, 2013). De acuerdo con esta clasificación, existen tres grupos de técnicas cromatográficas (Figura 6):

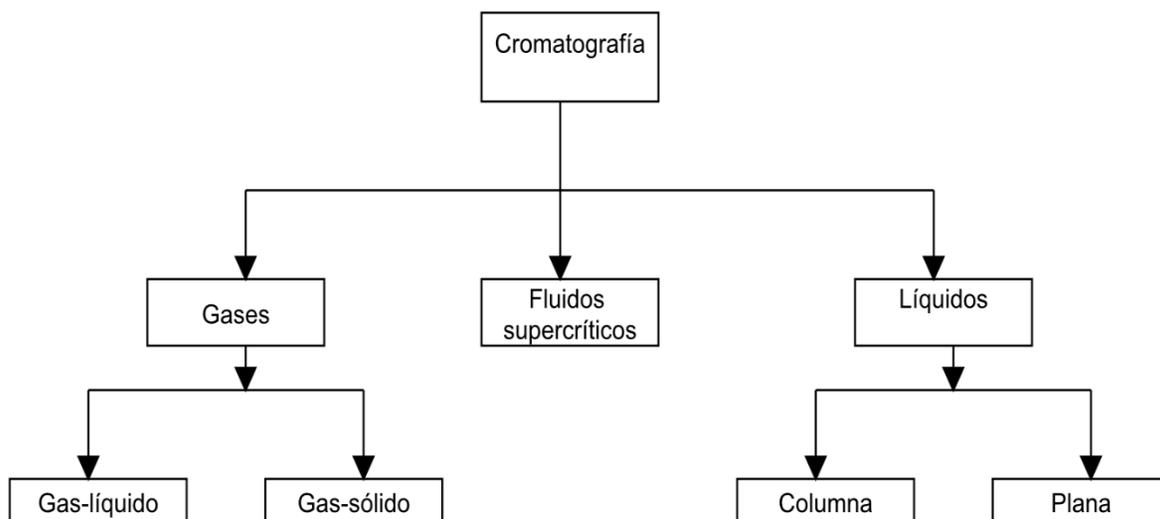


Figura 6. Clasificación de acuerdo con su fase móvil y estacionaria.

- Cromatografía de gases.
 1. Fase estacionaria líquida (GLC)
 2. Fase estacionaria sólida (GSC)

- Cromatografía de líquidos.
 1. Fase estacionaria sólida (LSC)

- Cromatografía de fluidos supercríticos.

2.1.1 Cromatografía de gases (CG)

Es una técnica de separación en la que se hace pasar el analito en forma gaseosa a través de la columna, el cual es arrastrado por la fase móvil constituida por un gas inerte (helio, hidrógeno o nitrógeno) y donde la fase estacionaria es un sólido (cromatografía gas-sólido) o un líquido no volátil "sostenido" por un sólido inerte (cromatografía gas-líquido). Este tipo de cromatografía siempre se lleva a cabo en una columna empaquetada o tubular abierta (capilar). Las columnas tubulares abiertas de sílice fundida pueden ser de pared recubierta (GLC), de soporte recubierto (GLC) y de capa porosa (GSC) (McNair & Miller, 1998).

La CG se encuentra limitada al análisis de muestras que son volátiles por debajo de 300°C, por lo tanto, los componentes de la muestra (analitos) son separados unos de otros con base en la diferencia de la volatilidad de los solutos y en la distinta capacidad de interacción de estos con la fase estacionaria (Harris, 2013).

La CG es considerada más eficiente que HPLC debido a que se requiere una menor cantidad de muestra para poder ser analizada (inclusive en

cantidades de trazas en ppb), y la elevada cantidad de platos (N) que se tienen cuando se utilizan columnas tubulares abiertas (capilares), lo cual se refleja en una mejor separación (McNair & Miller, 1998; Snyder, 2010) aún cuando se tiene una resolución limitada.

2.1.2 Cromatografía de líquidos (CL)

La cromatografía de líquidos una técnica de separación en la que la fase móvil es un líquido que pasa a través de una fase estacionaria, sólida. Esta forma de cromatografía puede realizarse con diferentes arreglos experimentales, por ejemplo, utilizando columnas empaquetadas de acero inoxidable (Harris, 2013).

Hoy día, la cromatografía de líquidos se denomina cromatografía de líquidos de alta eficacia (o alta presión), y con el acrónimo HPLC (por sus siglas en inglés), en la cual se hace pasar mediante una bomba un disolvente a alta presión a través de una columna tubular empaquetada que contiene partículas porosas muy pequeñas de fase estacionaria de un diámetro de 3 y 10 μm . Cuanto menor es el tamaño de partícula, más eficaz es la columna. Lo más común es utilizar partículas microporosas de sílice pura o entrelazada dependiendo del mecanismo de separación. Además, es la más utilizada, debido a que se caracteriza por su sencillez, alta sensibilidad, precisión y selectividad (Rubinson & Rubinson, 2001; Sinha et al, 2008; Harris, 2013), y por tener una amplia gama de equipamiento en fases estacionarias (Snyder, 2010).

2.1.3. Cromatografía de fluidos supercríticos

La cromatografía de fluidos supercríticos (CFS) es una forma de cromatografía de fase normal que se utiliza para el análisis y purificación

de moléculas de bajo a moderado peso molecular, se caracteriza por una mayor resolución y rapidez, en relación con la cromatografía de líquidos. Los principios y la instrumentación son similares a los de la técnica de HPLC con columnas empaquetadas o con columnas tubulares abiertas, semejantes a las que se utilizan en cromatografía de gases, sin embargo, en la CFS típicamente se utilizan fluidos supercríticos como fase móvil (Harris, 2013), generalmente CO₂ porque es compatible con el detector de ionización de llama, además de no ser tóxico.

2.2 Clasificación según el mecanismo de separación

Como se ha mencionado, la cromatografía se divide en varias categorías en función del mecanismo de interacción del soluto con la fase estacionaria: adsorción (fase normal e inversa), absorción (fase químicamente unida normal e inversa), intercambio iónico, exclusión molecular (filtración en gel) y cromatografía de afinidad (Figura 7).

2.2.1 Cromatografía de adsorción

La separación se basa en la retención de los componentes en el fluido sobre la superficie del material sólido, durante un tiempo corto, pero suficiente para que se establezca el equilibrio dinámico entre la fase adsorbida (moléculas adsorbidas) y el resto del fluido (moléculas no adsorbidas) usando una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida o gaseosa (Harris, 2013). Cuanto más fuertemente se adsorbe un soluto, más lentamente atravesará la columna.

2.2.2 Cromatografía de absorción o reparto

Esta técnica utiliza una fase estacionaria líquida, en forma de una fina película de alto punto de ebullición sobre la superficie de un soporte sólido. Durante la separación el soluto se encuentra en equilibrio entre el líquido estacionario y la fase móvil (McNair & Miller, 1998).

1. Cromatografía en fase normal (CFN)

Es un procedimiento utilizado en cromatografía de líquidos, que se caracteriza por usar una fase estacionaria de carácter polar, tal como la sílice pura o alúmina, y un disolvente no polar. Un disolvente más polar tiene una fuerza mayor.

En la actualidad esta técnica ha sido desplazada principalmente debido a las características y ventajas que ofrece la CFR para realizar análisis químico. Actualmente, la CFN es útil principalmente para a separación de isómeros, la purificación de muestras para su posterior análisis por CFR, y ocasionalmente el análisis de muestras muy polares que están pobremente retenidas y separadas por CFR (Rubinson & Rubinson, 2001; Harris, 2013).

2. Cromatografía de fase inversa (CFR)

Es la técnica más utilizada en cromatografía de líquidos, se caracteriza porque la fase estacionaria es no polar o débilmente polar, tal como la sílice entrelazada con cadenas de ODS (C18) o cualquier otro polímero no polar, como las partículas de fenilo, y un disolvente más polar. En contraste a la fase normal, un disolvente menos polar tiene una fuerza mayor.

Las separaciones por CFR suelen ser muy convenientes y versátiles, por lo que se emplea en la mayoría de las separaciones de compuestos orgánicos. Las columnas también tienden a ser más

eficientes y reproducibles, y están disponibles en una gama más amplia que incluyen dimensiones de columna, tamaño de partícula y tipo de fase estacionaria (C1-C30, fenilo, ciano.) Una ventaja adicional de CFR es el equilibrio rápido de la columna después de un cambio en la fase móvil, o entre corridas cuando se usa elución de gradiente. (Snyder, 2010; Harris, 2013).

2.2.3 Cromatografía de intercambio iónico

Se basa en la atracción entre los iones del soluto y los centros cargados que se encuentran unidos covalentemente en la fase estacionaria. Los intercambiadores aniónicos, grupos cargados positivamente en la fase estacionaria atraen a los aniones del soluto. Los intercambiadores catiónicos contienen puntos cargados negativamente en la fase estacionaria, que atraen a los cationes del soluto, es decir, las resinas de intercambio aniónico sólo pueden fijar a los aniones y las resinas de intercambio catiónico sólo a cationes (Harris, 2013). Los intercambiadores iónicos fijan más rápidamente a los iones de mayor carga, menor radio y mayor polarizabilidad (Snyder, 2010).

2.2.4 Cromatografía de exclusión

También llamada cromatografía de filtración por gel o permeación por gel, esta técnica se basa fundamentalmente en efectos de exclusión, tales como diferencias en el tamaño de las moléculas. Las moléculas se separan según su tamaño y peso molecular. Las moléculas de menor tamaño penetran en los poros pequeños de la fase estacionaria pero no lo hacen así las moléculas grandes, debido a que las moléculas pequeñas tienen que recorrer un volumen mayor antes de abandonar la columna, las moléculas grandes son las primeras que eluyen. La fase estacionaria es

comúnmente estireno con 8% de divinilbenceno (DVB) con diámetros de poro de 80, 100, 150, 300, 500 o 1000 Å (Rubinson & Rubinson, 2001; Harris, 2013). A diferencia de otras formas de cromatografía, no hay interacción atractiva entre la "fase estacionaria" y el soluto en el caso ideal de una exclusión molecular.

2.2.5 Cromatografía de afinidad

Esta técnica es considerada la de mayor selectividad, emplea interacciones específicas, no covalentes, entre una clase de moléculas de soluto y una segunda molécula que está unida covalentemente (inmovilizada) en la fase estacionaria (Harris, 2013), con lo que se consigue aislar un único compuesto de una mezcla compleja. Una vez que queda retenido sólo el soluto de interés, éste se eluye cambiando las condiciones, como el pH o la fuerza iónica. La cromatografía de afinidad es especialmente aplicable en bioquímica, y se basa en interacciones específicas entre enzimas y sustratos, anticuerpos y antígenos o entre receptores y hormonas.

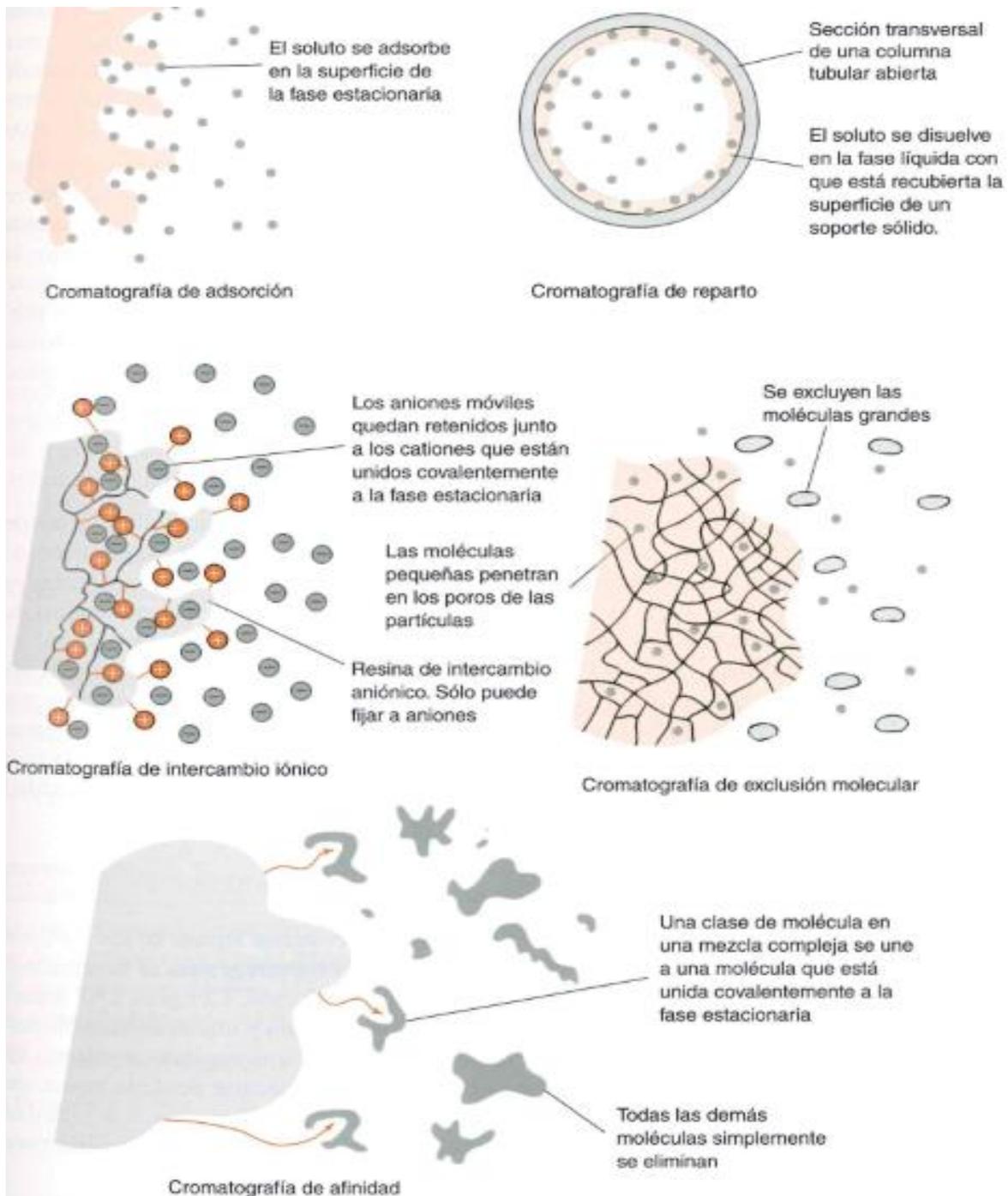


Figura 7. Ilustración gráfica de los diferentes mecanismos de separación.

Fuente: Harris, 2013. Capítulo 23 "Introducción a las separaciones analíticas" p. 555.

Capítulo 3. Teoría de cromatografía

3.1 Separación

El proceso cromatográfico está dividido en cuatro etapas: inyección, separación, elución y detección. En un sistema cromatográfico los componentes de una mezcla son separados, dentro de la columna, debido a que estos migran a través de la fase estacionaria a velocidades diferentes de acuerdo con el equilibrio de distribución (constante de distribución, K), provocado principalmente por la solubilidad de los solutos en la fase estacionaria y por sus fuerzas intermoleculares. La Figura 8 ilustra el proceso de una separación cromatográfica (Rubinson & Rubinson, 2001). La concentración de cada componente eluido es registrado por el detector y es proporcional al tamaño del pico o el área registrada en el cromatograma.

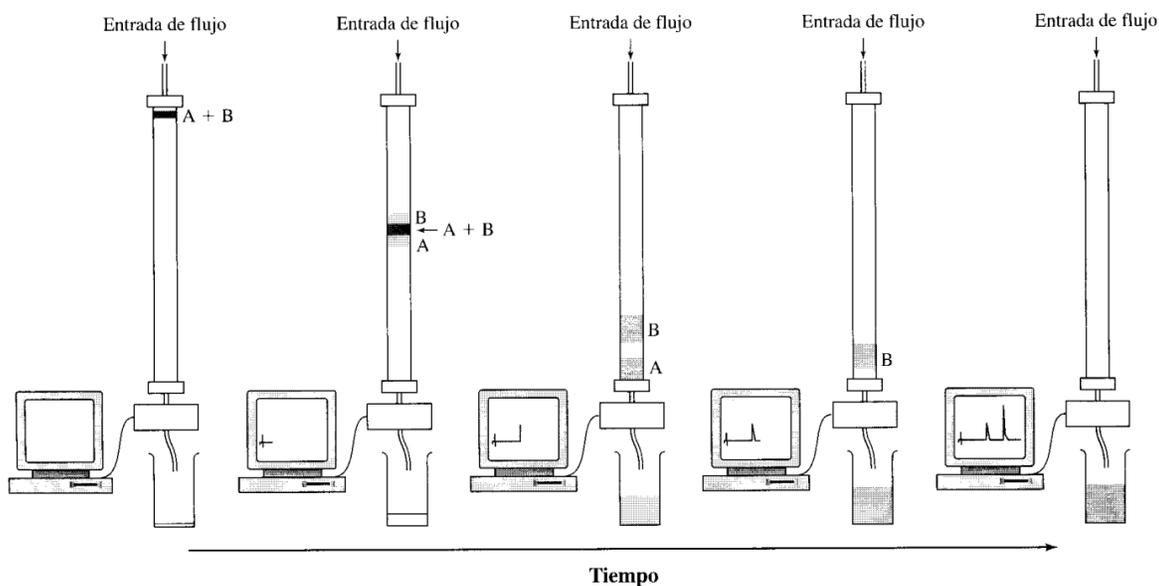


Figura 8. Representación esquemática de una separación cromatográfica de una mezcla que contiene dos solutos de interés.

Fuente: Rubinson & Rubinson, 2001. Capítulo 13, p. 584.

3.2 Equipo para cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC)

Los componentes esenciales de un sistema cromatográfico de HPLC se muestran en la Figura 9. La fase móvil se extrae de un depósito denominado reservorio y de ahí pasa a una bomba, que controla el caudal y genera suficiente presión para conducir la fase móvil a través de la columna. Se usa un inyector o inyector automático para colocar la muestra en la columna sin detener el flujo de la bomba. La separación tiene lugar en la columna, que generalmente reside dentro de un horno de columna. El detector responde a los cambios en la concentración de analito durante la ejecución. Un sistema de datos monitorea la salida del detector y proporciona procesamiento de datos para la salida de datos tanto gráfica como tabular. Un controlador del sistema (a menudo combinado con el sistema de datos) dirige las funciones de los distintos módulos. La mayoría de los métodos analíticos se basan en la detección UV, pero muchos otros detectores están disponibles para aplicaciones especializadas.

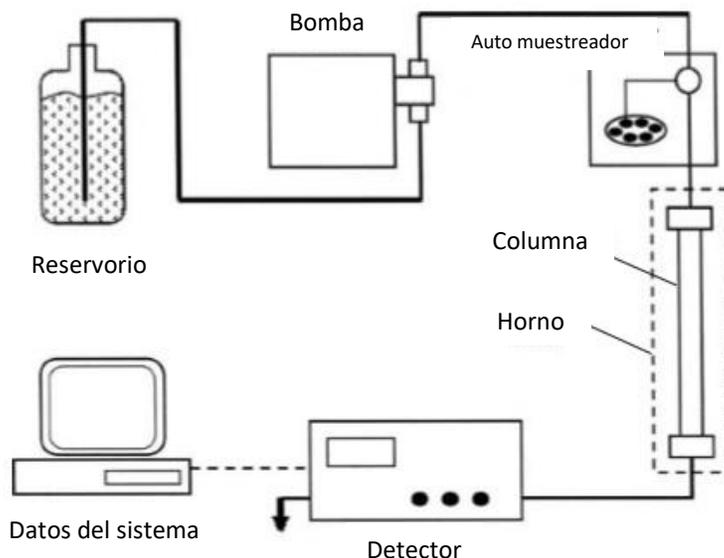


Figura 9. Diagrama de un sistema cromatográfico de HPLC.

Fuente: Snyder 2010. Capítulo 3. "Equipo" p. 89.

3.2.1 Reservorio

El reservorio de la fase móvil es la parte más simple pero esencial de un sistema cromatográfico de HPLC, es la encargada de contener la fase móvil que será empleada para el análisis cromatográfico. La gran mayoría de los reservorios son elaborados a partir de vidrio, un material considerado inerte para cualquier disolvente utilizado, sin embargo, algunas aplicaciones de las técnicas cromatográficas, tales como la determinación de iones Na^+ por cromatografía iónica se requiere de un sistema libre de vidrio (Snyder, 2010).

3.2.2 Sistema de bombeo

Este sistema emplea el uso de una bomba la cual se encarga de impulsar la fase móvil desde el reservorio, haciéndolo pasar por el sistema de inyección y a través de la columna.

Los tipos de bombas que se pueden encontrar son: Recíprocas de presión constante y bombas de jeringa (consideradas de poca utilidad e importancia) (Snyder, 2010).

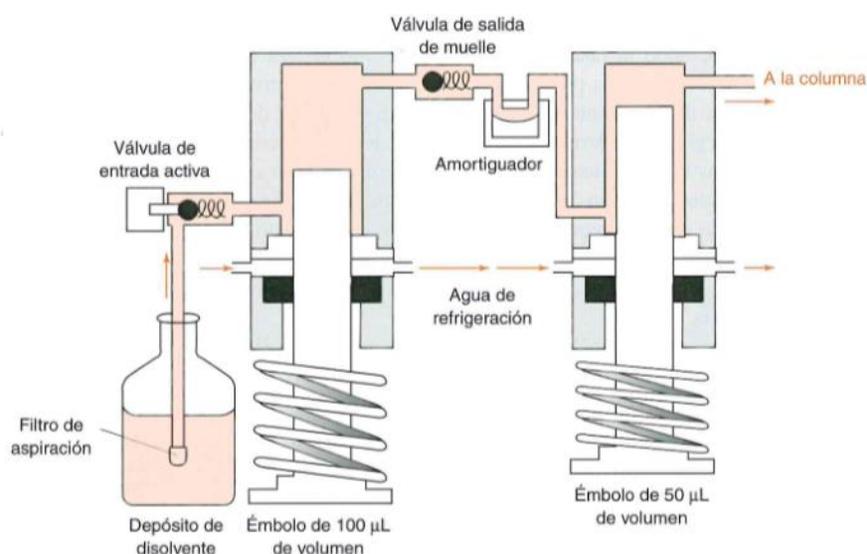


Figura 10. Representación esquemática de una bomba recíproca.

En la Figura 10 se muestra una bomba recíproca de presión constante que trabaja a altas presiones (6000 psi), similar a la que posee el equipo de HPLC utilizado para realizar el análisis. El disolvente se introduce a través de una válvula electrónica, sincronizada con el movimiento de uno de los pistones. La válvula de salida mantiene constante la presión de salida evitando que se formen burbujas del disolvente, de manera resumida, mientras el pistón grande aspira la fase móvil, el pistón pequeño lo introduce al inyector y a la columna (Harris, 2013).

3.2.3 Inyector

La introducción de la muestra en la columna requiere que la cantidad de muestra a introducir sea rápida y sin necesidad de interrumpir el flujo constante de la fase móvil a través del sistema cromatográfico.

La válvula de inyección, que se observa en la Figura 11. Se utiliza una jeringa, en la posición de "carga", para lavar y llenar el bucle con nueva muestra a la presión atmosférica. El líquido que procede de la bomba a alta presión pasa por el segmento de válvula situado en la parte inferior izquierda. Cuando la válvula gira 60° en sentido contrario a las agujas del reloj, el contenido del bucle de muestra es inyectado a alta presión en la columna (Harris, 2013).

Hoy en día muy rara vez se hace uso de la inyección manual, tan solo está orientada para algunas separaciones preparativas y para capacitación del operador del equipo. Pero para el análisis químico que a menudo involucra cientos de muestras por día, la inyección de muestras debe ser precisa, exacta y automática. Para tales aplicaciones se hace empleo de un auto muestreador (inyector automatizado) el cual recaba todas las características antes mencionadas (Snyder, 2010; Harris, 2013).

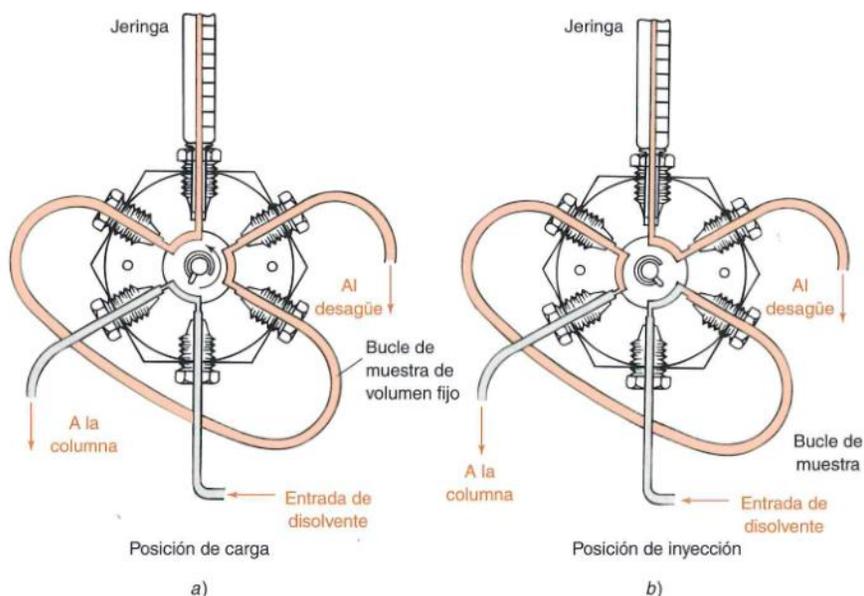


Figura 11. Válvula de inyección usada en HPLC. Posición de carga (a) y posición de inyección (b).

Fuente: Harris, 2013. Capítulo 25 "cromatografía de líquidos" p. 622.

3.2.4 Columna

Las columnas utilizadas para cromatografía de líquidos son columnas empaquetadas, debido a que el diámetro formado por el disolvente, que lleva al analito es demasiado grande. Las columnas están elaboradas de acero inoxidable con una longitud entre 3 a 30 cm, un diámetro interno de 1 a 5 mm y con un tamaño de partícula alrededor de 1.5 a 10 μm .

La Figura 12 muestra los componentes de una columna de HPLC que esta provista de una precolumna cambiabile, para retener por absorción las impurezas (Snyder, 2010).

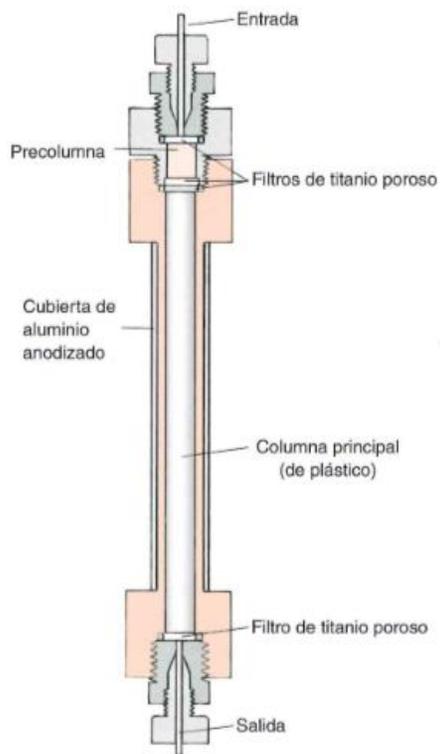
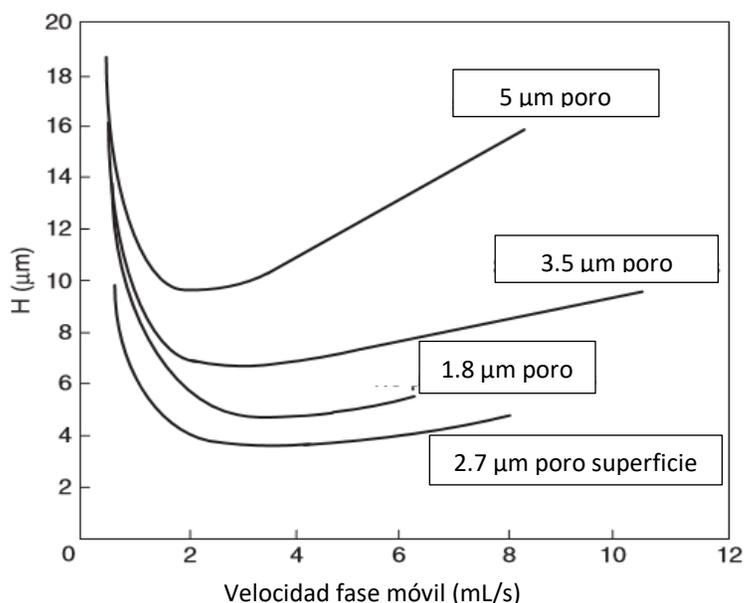


Figura 12. Columna de HPLC.

A un menor tamaño de partícula la eficiencia de la separación aumenta al tener mayor cantidad de número de platos teóricos debido a que se disminuye el ensanchamiento de las bandas, en la Gráfica 2 se puede observar de una mejor manera la relación de la disminución de la eficiencia debido al tamaño de partícula contenida en la columna.



Gráfica 2. Eficiencia de la columna como función del tamaño de partícula. Muestra: Naftaleno. Condiciones: 50x4.6mm, columna C₁₈; Fase móvil 60% acetonitrilo-agua; 23°C.

Fuente: Snyder 2010. Capítulo 5. "La columna" p. 207.

3.2.5 Fase estacionaria

El soporte más común utilizada como fase estacionaria en HPLC son partículas micro porosas esféricas de sílice muy pura. La superficie de la sílice tiene hasta 8 μmoles de grupos silanol (Si-OH) por metro cuadrado. La Figura 13 muestra a representación esquemática de la estructura de gel de sílice que conforma los soportes de la fase estacionaria.

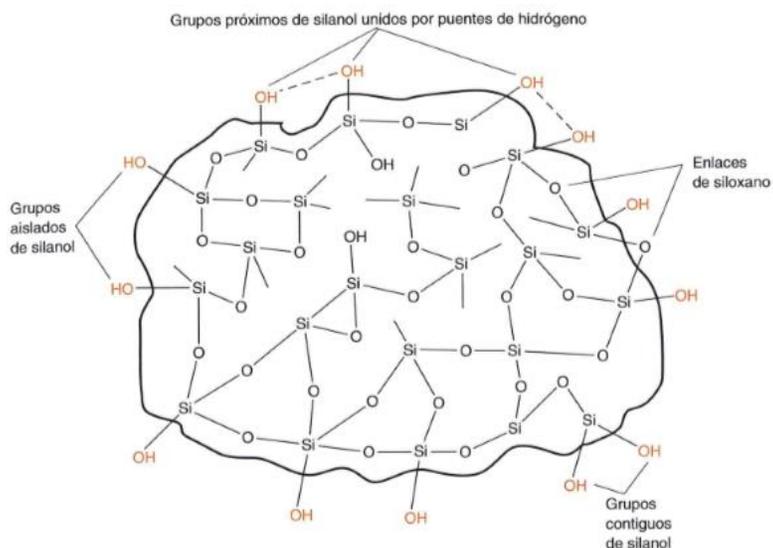


Figura 13. Esquema de la estructura de sílice.

Fuente: Harris, 2013. Capítulo 25 "cromatografía de líquidos" p. 611.

La sílice pura se puede utilizar como fase estacionaria en cromatografía de adsorción. En la cromatografía de reparto (de fase químicamente unida) se lleva a cabo con fase estacionaria enlazada covalentemente a la sílice, mediante reacciones tales como las que se muestran en la Figura 14.

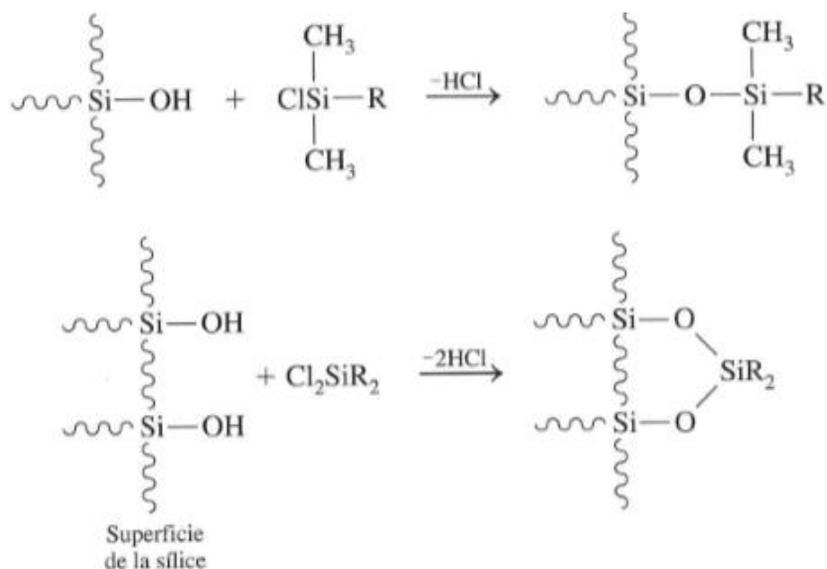


Figura 14. Síntesis para obtención de fases enlazadas covalentemente con soporte de sílice.

3.2.6 Detector

Un detector ideal, de cualquier tipo que sea, debe ser sensible a pequeñas concentraciones de analito, dar una respuesta lineal y no ensanchar los picos del cromatograma. No debe ser sensible a variaciones de temperatura y de la composición del disolvente. El detector más común en HPLC es el detector de ultravioleta debido a que muchos solutos absorben luz ultravioleta.

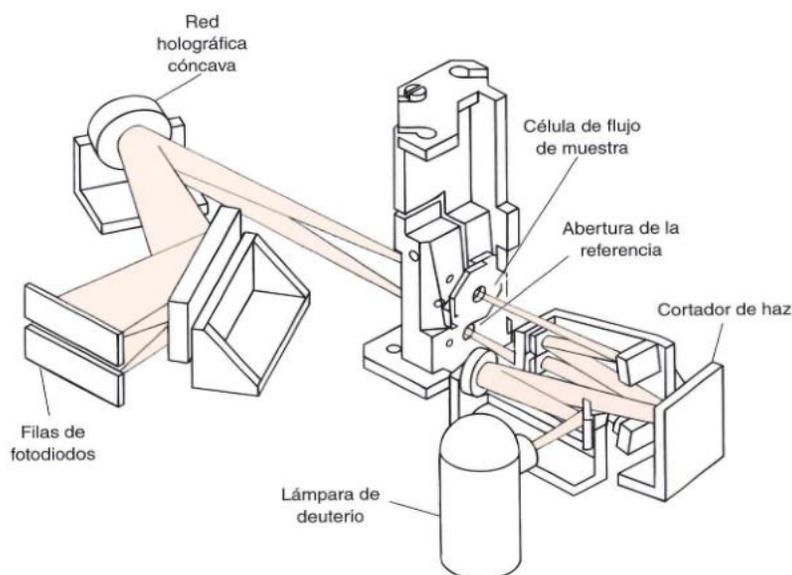


Figura 15. Detector de UV de arreglo de diodos para HPLC.

Fuente: Harris, 2013. Capítulo 25 "cromatografía de líquidos" p. 624.

En la Figura 15 se muestra el sistema de detector UV, el cual utiliza una fila de fotodiodos para registrar todo el espectro de cualquier soluto que pasa por el detector. Una fila de fotodiodos se usa para registrar el espectro completo de UV de cada pico a medida que se eluye. De este modo es posible determinar qué compuesto corresponde a cada pico. La absorbancia de la muestra se determina midiendo la intensidad de la luz que llega el fotodiodo sin la muestra (una referencia en blanco) y

comparándolo con la intensidad de la luz que llega al detector después de pasar a través de la muestra.

3.3 Parámetros cromatográficos

Un parámetro es una cantidad que puede tener distintos valores y que caracteriza un proceso, una operación o un resultado. Se puede parametrizar la forma, la posición y la resolución de las bandas de una cromatografía. Estos parámetros se pueden correlacionar con factores químicos o procesos moleculares que tienen lugar durante las separaciones (Rubinson & Rubinson, 2001). Entre los principales parámetros que describen el proceso cromatográfico son el tiempo muerto (t_M), el tiempo de retención de cada analito (t_R), ancho del pico (W_i), el factor de capacidad (k'), la selectividad (α), la resolución (R) y el número de platos (N). De esta manera se puede entender cómo la separación es afectada por las diferentes condiciones experimentales: la columna, disolvente, temperatura, el flujo, etc.

La Tabla 2 resume los efectos que se pueden generar con los principales parámetros cromatográficos (capacidad k' , selectividad α y número de platos N) cuando las condiciones experimentales se modifican. De esta manera, se busca encontrar las condiciones para mejorar las separaciones cromatográficas.

En la Tabla 2 se indica con ++ un efecto mayor; con +, un efecto menor; con -, un efecto relativamente pequeño; con 0, sin efecto alguno; y los símbolos en negritas indican las condiciones que se utilizan y recomiendan para controlar k' , α o N , de manera respectiva.

Tabla 2. Efectos en los parámetros α , k' y N al modificar las diferentes condiciones experimentales involucradas en la separación.

Condición	k'	α	N
%B	++	+	-
B-disolvente (ACN, MetOH, etc.)	+	++	-
Temperatura	+	+	+
Tipo de columna (C18, fenilo, etc.)	+	++	-
pH en fase móvil ^a	++	++	+
Concentración del buffer ^a	+	+	-
Longitud de la columna	0	0	++
Tamaño de partícula	0	0	++
Velocidad del flujo	0	0	+
Presión	-	-	+

Un cromatograma es un gráfico de la respuesta del detector, pudiendo ser la concentración del analito u otra cantidad usada como una medida a lo largo de un cierto tiempo o volumen inyectado. Tan sólo de la observación del cromatograma (Figura 9) podemos deducir algunas de las características de una separación cromatográfica, en primer lugar, se obtendrá un análisis cualitativo del número de componentes que se encuentran presentes en la muestra y que son de interés. En segundo lugar, la presencia de una buena resolución (R), esto se observa cuando en el gráfico las bandas alcanzan la línea base sin estar sobrepuestos, que indica que cada componente pasa suficiente tiempo interaccionando con la fase estacionaria (conocido como factor de capacidad k'), y por ende una mejor selectividad (distancia entre dos bandas) obteniendo de esta manera una mejor eficiencia en la separación (Agilent, 2011; Harris, 2013).

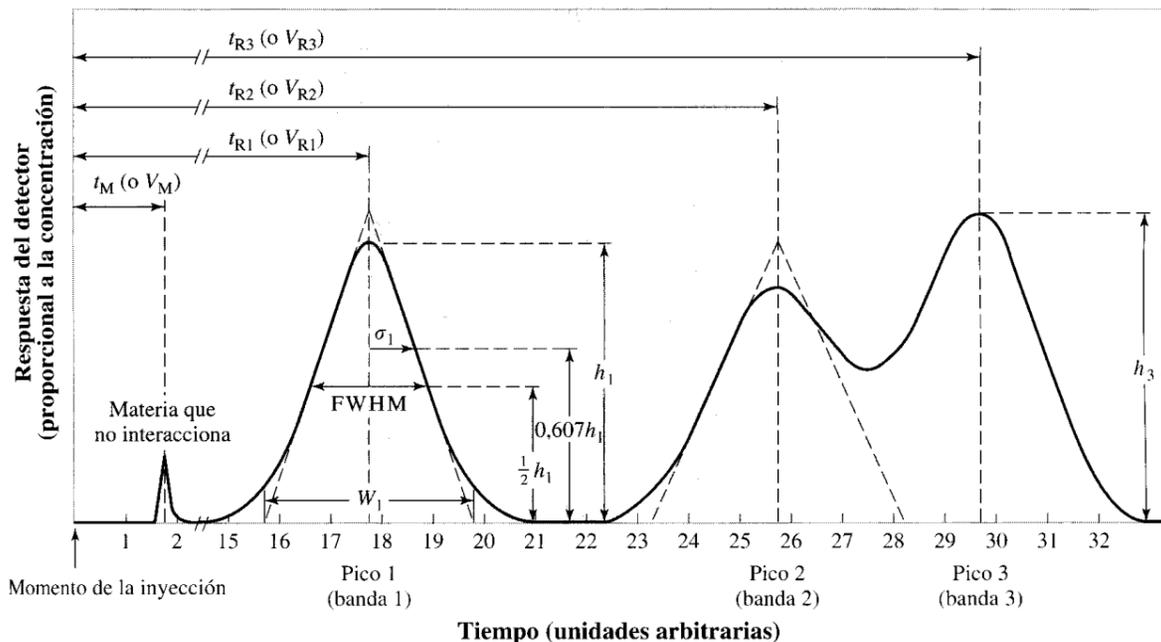


Figura 16. Cromatograma hipotético que indica los parámetros utilizados para la caracterización de un cromatograma.

Fuente: Rubinson & Rubinson, 2001. Capítulo 13, p. 589.

La Figura 16. da la información de los parámetros cromatográfico como lo es el tiempo de retención, tiempo muerto y ancho del pico, a continuación, se dan algunas definiciones concretas sobre estos parámetros.

Tiempo muerto (t_M): Es el tiempo que se tarda un soluto sin interactuar con ella desde el punto de inyección y hasta el detector.

Tiempo de retención (t_R): Es el tiempo en el que eluye cada soluto (analito de interés).

Tiempo de retención ajustado (t_R'): Es el tiempo efectivo en el que un soluto permanece en la fase estacionaria. Se calcula como la diferencia entre el tiempo de retención de un soluto de interés y el tiempo muerto ($t_R' = t_R - t_M$).

Ancho del pico en la base (W_i): medida entre los cortes de las tangentes trazadas en los flancos de mayor pendiente de un pico eluido. (Rubinson & Rubinson, 2001).

Estos parámetros son suficientes para caracterizar la calidad de una buena separación experimental. No obstante, para caracterizar los picos es más común el uso otras cantidades derivadas de los parámetros anterior mencionados.

3.3.1 Factor de capacidad

La medida de la retención de un soluto en la columna es llamado factor de capacidad (k'), mientras más tiempo permanece un componente en la columna, mayor es su factor de capacidad (Ecuación 1) (Harris, 2013).

El valor óptimo del factor de capacidad está entre un rango de 2 a 10, ya que a valores de $k' < 2$ existe poca retención del analíto, y valores de $k' > 10$ significan mayores tiempos de elución.

$$k_i = \frac{V_{Ri} - V_M}{V_M} \quad \text{Ecuación 1}$$

3.3.2 Selectividad

La capacidad de separar dos componentes es la selectividad de una columna, esta se encuentra dada por el cociente de sus tiempos de retención ajustados (t_R') (Ecuación 2). Cuando mayor es la selectividad, mayor es la separación entre los dos componentes. La selectividad es independiente del caudal (Rubinson & Rubinson, 2001; Harris, 2013).

$$\alpha_{1,2} = \frac{V_{R2} - V_M}{V_{R1} - V_M} = \frac{k_2}{k_1} \quad \text{Ecuación 2}$$

3.3.3 Eficacia de separación

Dos factores determinan el grado con el que se pueden separar los compuestos por cromatografía. Uno es la diferencia de tiempos de elución de los respectivos picos; cuanto más distantes sean, mejor será la separación (Agilent, 2011; Harris, 2013). El otro factor es la anchura de los picos; cuanto más ancho sean, peor será la separación.

3.3.4 Número de platos

Es el parámetro que cuantifica la eficiencia de la columna y que es usada para comparar el desempeño de diferentes columnas para obtener bandas estrechas (Agilent, 2011). Esta propiedad puede obtenerse de las características de una banda individual, pero no todas las bandas individuales poseen el mismo valor; por lo tanto, N es una medida del ensanchamiento de banda por unidad de tiempo (Ecuación 3).

$$N = \left(\frac{V_{Ri}}{\sigma_i} \right)^2 = \left(\frac{t_{Ri}}{\sigma_i} \right)^2 = 16 \left(\frac{t_{Ri}}{W_i} \right)^2 \quad \text{Ecuación 3}$$

3.3.5 Altura de plato

La altura de plato es la constante de proporcionalidad entre la varianza (σ^2) de la banda y la distancia que ha recorrido (x). El nombre está tomado de la teoría de destilación, que la separación se lleva a cabo en pasos discretos llamados platos. La altura de plato también se llama altura equivalente a un plato teórico (HEPT). En cromatografía no existen

“platos” físicos, de manera que se debe considerar la altura de plato como un término que relaciona la anchura de una banda con la distancia que ha recorrido a través de la columna. Cuanto más pequeña es la altura de plato, más estrecha es la banda por lo tanto una columna eficaz tiene mayor número de platos teóricos (Ecuación 4). (Rubinson & Rubinson, 2001).

$$H = \frac{L}{N} = \frac{L}{16} \left(\frac{W_i}{t_{Ri}} \right)^2 \quad \text{Ecuación 4}$$

3.3.6. Resolución

La resolución describe la capacidad de una columna para separar dos compuestos (picos cromatográficos de interés) y por lo cual es considerada una medida cuantitativa. En análisis cuantitativos es muy conveniente que la resolución sea > 1.5 . Cuando mayor es la resolución, mejor es la separación entre dos picos, así mismo se ve afectada por parámetros: número de platos (N), la selectividad (α) y el factor de capacidad (K') (Agilent, 2011; Harris, 2013) (Ecuación 5).

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha + 1} \right) \left(\frac{k_2}{1 + k_2} \right) \quad \text{Ecuación 5}$$

Capítulo 4. Tratamiento de muestras.

4.1 Preparación de muestras para su análisis

Es el conjunto de pasos necesarios para convertir una muestra representativa (bruta), en una forma adecuada para poderla analizar. La Figura 17. indica el diagrama de flujo para la preparación de una muestra.

La preparación de muestras involucra su transformación en una forma más adecuada para su análisis; puede comprender etapas como la disolución de muestra, la extracción de la sustancia que se desea analizar (analito) de una matriz compleja, la concentración de un analito diluido, la eliminación o enmascaramiento de una especie que interfiera en el análisis o la transformación química del analito para facilitar su detección (derivatización) (Harris, 2013).

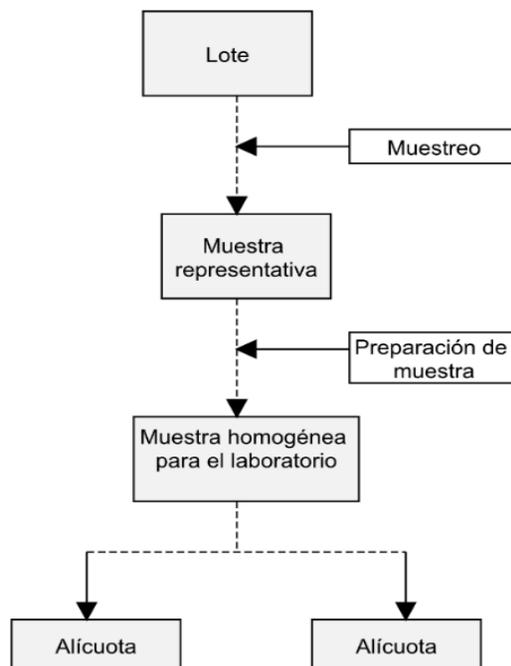


Figura 17. Diagrama de flujo de análisis químico donde se involucra la preparación de muestras.

Para análisis cromatográficos generalmente las muestras se disuelven. Es importante disolver todo el material de partida, con el fin de recuperar la totalidad del analito y que la muestra sea homogénea. Las muestras sensibles al calor o a la luz se deben guardar en un ambiente protegido, por ejemplo, aquellos libres de humedad, presión o luz.

4.2 Extracción por maceración

En este tipo de extracción la muestra se trata con un disolvente que disuelva él o los analitos de interés, sin descomponerlos, aunque no se disuelva necesariamente toda la muestra.

La maceración es un proceso de extracción sólido-líquido. La materia prima posee una serie de compuestos solubles en el líquido utilizado para la extracción. La maceración se fundamenta en la difusión libre del analito sobre la matriz de la muestra debidamente subdividida o cortadas y que contiene el analito, dicha difusión se realiza a temperatura ambiente, lo que genera dos productos que pueden ser empleados dependiendo de las necesidades de uso, el sólido ausente de esencias y el extracto. Es un método convencional muy común porque es simple y económico. La naturaleza de los compuestos extraídos depende de la materia empleada, así como del disolvente de extracción utilizado, este es el procedimiento que generalmente se emplea en la industria. (Rubinson & Rubinson, 2001; Harris, 2013).

Capítulo 5. La Evaluación Sensorial

La evaluación sensorial es la disciplina científica que permite evocar, medir, analizar, interpretar las reacciones a aquellas características de los alimentos y materiales como son percibidas por los sentidos: vista, olfato, gusto, tacto, temperatura, etc. (IFT, 1975). Uno de los principales objetivos de la evaluación sensorial es el entendimiento del papel que juegan las características sensoriales de un producto en la experiencia sensorial de consumo y, por ende, en la aceptación o rechazo de ese producto (Severiano et al., 2016).

El diseño o interpretación correcta de los resultados de la evaluación sensorial, requiere del conocimiento de los aspectos psicológicos y fisiológicos de los jueces humanos, que se definen como un mecanismo nervioso complejo, que empieza en un aparato receptor externo y termina en la corteza cerebral (Manfugás 2007). Los jueces son considerados como "el instrumento empleado en la evaluación sensorial", los cuales están capacitados para evaluar mediante los sentidos características como el sabor, el olor, la textura, o el aspecto de un producto (Ibáñez & Barcina 2001).

5.1 Percepción y propiedades sensoriales

Los analizadores reciben los estímulos del mundo exterior, los transmiten a través de un nervio conductor y los transforman en sensaciones, las que se interpretan e integran con otras sensaciones y experiencias anteriores para conformar la percepción. Las características organolépticas de los alimentos constituyen el conjunto de estímulos que interactúan con los receptores de los órganos de los sentidos del juez evaluador. El receptor transforma la energía que actúa sobre él, en un proceso nervioso que se

transmite a través de los nervios hasta los sectores corticales del cerebro, donde se producen sensaciones como el color, la forma, el tamaño, el aroma, la textura y el sabor (Manfugás 2007).

La percepción es la respuesta ante las características organolépticas, es el reflejo de la realidad, que pudiera ser más o menos objetiva, en función de la aplicación o no de técnicas correctas de evaluación. Cada sentido resulta ser el instrumento que proporciona una información valiosa y específica acerca de los mismos. Existen algunos términos universales para la clasificación de los atributos sensoriales de los alimentos y otros particulares para áreas específicas. Las propiedades sensoriales son los atributos de los alimentos que se detectan por medio de los sentidos y son, por tanto, la apariencia, el olor, el aroma, el gusto y las propiedades quinestésicas o texturales. (Varela & Ares, 2012). Cada órgano receptor está especializado en recibir una sola una clase de estímulo. Existen seis clases de estos: mecánicos, térmicos, luminosos, acústicos, químicos y eléctricos. Cada uno de ellos dará lugar a una sensación que vendrá caracterizada por su calidad, intensidad, duración y por la sensación de agrado o rechazo (Hough & Fisman *et al.*, 2005).

5.2. Métodos sensoriales.

Los métodos sensoriales, en forma general, pueden ser clasificados en dos grupos: métodos afectivos y métodos analíticos (Stone & Sidel, 2004).

Los métodos afectivos evalúan la respuesta que provoca el producto en el consumidor (gusto o aceptación), y tienen como objetivo poner en evidencia las preferencias de los consumidores al producto objeto de estudio (Carpenter & Lyon, 2002).

Los métodos analíticos evalúan las características de los alimentos y permiten medir la cantidad y calidad de los estímulos percibidos; para ello se utilizan jueces que han sido seleccionados y entrenados previamente (Manfugás, 2007; García, 2012). Dentro de este tipo de métodos se encuentran las pruebas discriminativas y descriptivas.

Las pruebas discriminativas permiten diferenciar entre dos muestras y determinar si las muestras son perceptiblemente diferentes o si son suficientemente similares para ser utilizadas indistintamente. Existen diferentes pruebas discriminativas, entre las más utilizadas se encuentran la comparación por Pares, la Prueba Triangular, la Prueba Duo-Trío, la Prueba A o no A, la Prueba Diferente del Control, la Prueba Secuencial (Severiano, *et al.*, 2016).

Las descriptivas permiten cuantificar las características de un producto. Entre los métodos más utilizados son el Método de Perfil de sabor, Perfil de textura, Análisis Cuantitativo Descriptivo QDA[®], Método Spectrum[™], Métodos rápido como el Perfil Flash, entre otros (Carmona, 2003).

5.3 Perfil Flash (Flash Profile)

Dentro de las técnicas de caracterización sensorial que existen hoy en día, se encuentra el Perfil Flash (Dairou & Siefferman, 2002), que resulta de la combinación del Perfil de Libre Elección y de una Evaluación Sensorial Comparativa, basada en la presentación simultánea de los productos estudiados. La presentación simultánea de los productos permite una mayor discriminación entre estos, ya que las personas o jueces que realizan la prueba describen los productos y escogen sus propios términos para evaluarlos (Williams & Langron, 1984). Los datos obtenidos pueden ser analizados por técnicas estadísticas univariadas, como el análisis de

varianza (ANOVA), y por técnicas estadísticas multidimensionales, como el Análisis de Componentes Principales (ACP), la Clasificación Jerárquica Ascendente (CJA) y el Análisis Generalizado Procrusteno o de Procrustes (AGP) (Gower, 1975), siendo este último el que elimina las diversas fuentes de variación entre los sujetos, así como el uso de las diferentes partes de la escala (Damásio, 1999).

La elaboración del Perfil Flash modificada con jueces entrenados es un método adecuado ya que puede producir perfiles sensoriales de una forma más rápida, pero con un consenso similar a un perfil convencional, como el Análisis descriptivo cuantitativo (QDA) (Moussaoui y Varela, 2010; Albert *et al.*, 2011; Hough & Fiszman, 2011; Varela & Ares, 2012; Väkeväinen *et al.*, 2020).

Capítulo 6. Desarrollo experimental

6.1 Metodología

En la Figura 18 se muestra el esquema de bloques donde se resume la estrategia experimental empleada para la identificación y cuantificación analítica de los componentes de los extractos de vainilla mediante HPLC.

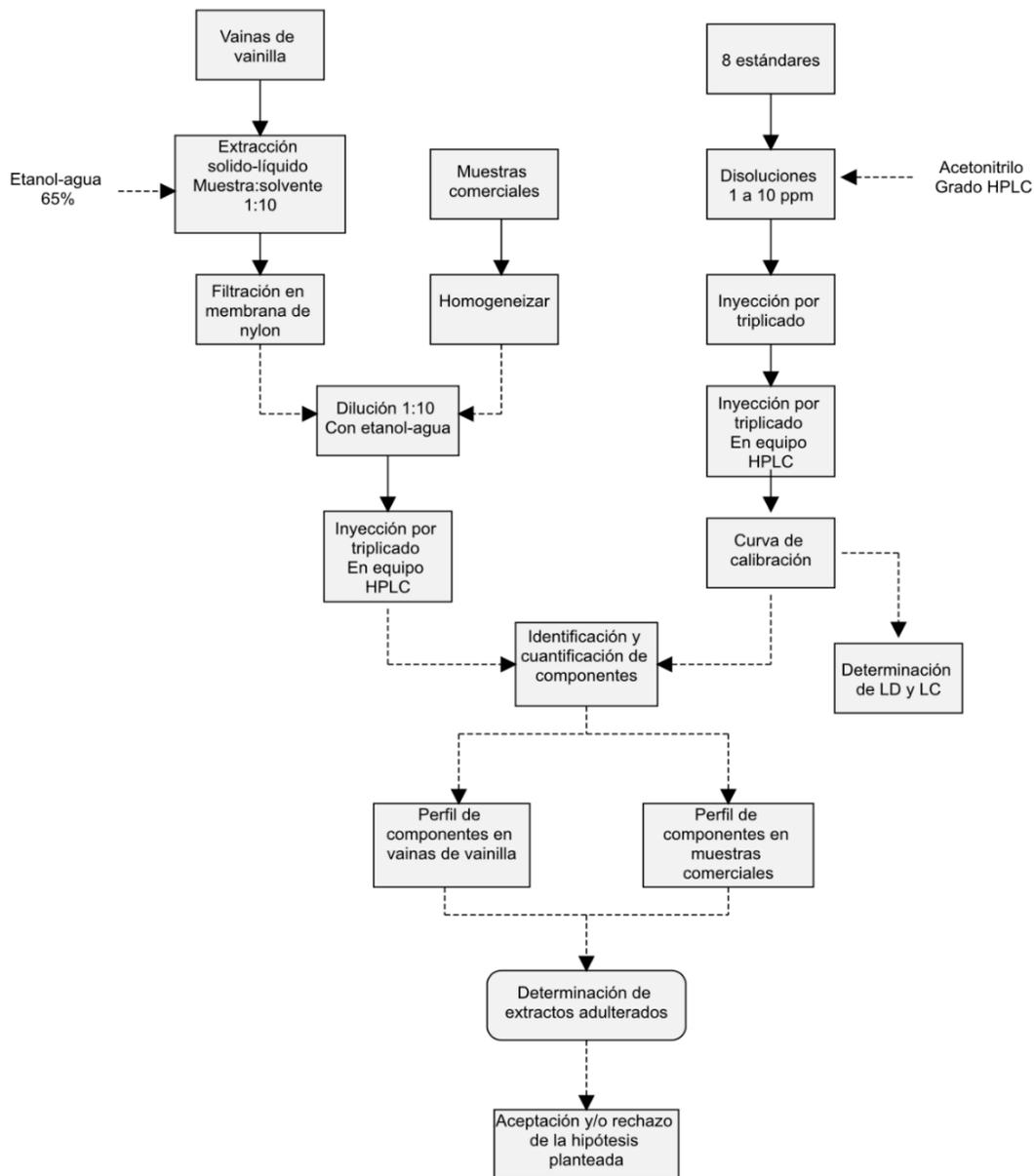


Figura 18. Esquema de bloques de la estrategia experimental.

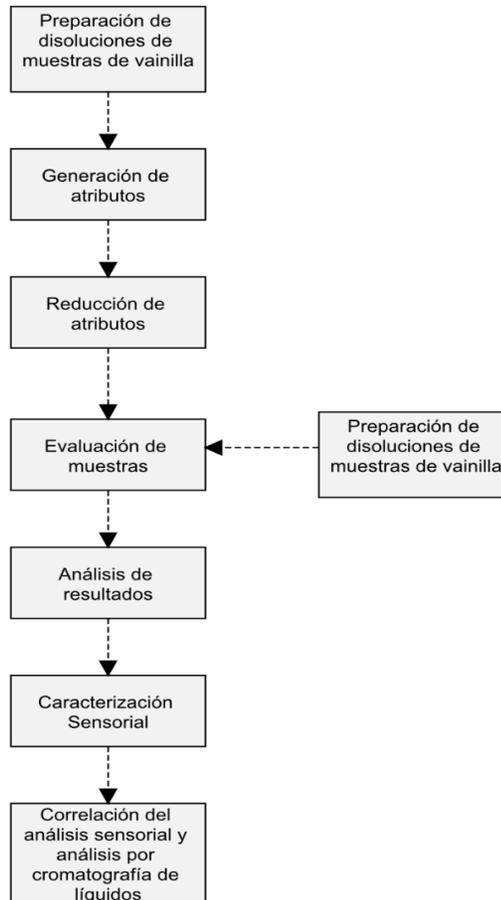


Figura 19. Esquema de bloques de la estrategia del análisis sensorial aplicado a las muestras.

La Figura 19 muestra el esquema de bloques para la aplicación del análisis sensorial y su correlación con el análisis cromatográfico de las muestras. A continuación, se describe a detalle la metodología empleada.

6.2 Muestras empleadas en el estudio

La muestra empleada en el estudio consistió en un total de 14 vainas de vainilla beneficiadas de la especie *V. planifolia* de la región de Papantla, Veracruz, y en 13 muestras de distintas marcas comerciales de extractos y saborizantes tanto naturales como artificiales de vainilla según lo declarado en su etiqueta. En la Figura 20 se indica la forma en la que se

comercializan algunas vainas de vainillas adquiridas para la experimentación y en la Figura 21 se observa la presentación de algunas muestras comerciales. Las muestras comerciales se eligieron en función al objetivo: tener extractos que declarasen de manera explícita en su etiquetado ser ya sea artificiales o naturales.



Figura 20. Presentación comercial de vainas de vainillas adquiridas



Figura 21. Muestras comerciales.

Para cada muestra comercial se registró el nombre completo de la marca o nombre del producto, lote, denominación y lugar de elaboración del producto o procedencia; se adquirieron cuatro muestras que declaran ser "saborizante sintético", cinco "saborizante natural" y cuatro muestras "extracto natural de vainilla", de acuerdo con lo que se declara en la parte principal de su etiquetado. Dichas especificaciones se indican con mayor detalle en la Tabla 3.

Tabla 3. Especificaciones en el etiquetado de muestras comerciales.

Marca	Lote	Denominación	Lugar de elaboración o procedencia
La Anita®	223911 2	Saborizante artificial	Mérida, Yucatán, México.
Vainilla Molina®	059/19	Saborizante artificial	Zapopan, Jalisco, México.
Vainilla Molina®	1770/18	Saborizante natural	Zapopan, Jalisco, México.
SweetLeaf®	190323	Saborizante natural	1203W, San Pedro St, EUA.
Zanilli®	No especifica	Saborizante natural	Santa Catarina, NL, México.
Mamima®	19058	Saborizante natural	Mérida, Yucatán, México.
Pasa®	11/190368	Extracto de vainilla natural	No especifica
Pasa®	3/190368	Saborizante natural	Naucalpan, Edo de Mex., México.
LOL-TUN®	60619	Saborizante artificial	Santa Martha, CDMX, México.
Altea®	270619	Saborizante artificial	Las cumbres, NL, México.
Pro-Gourmet®	Cosecha 2017-2018	Extracto de vainilla natural	Asturias, CDMX, México.
Bankey Cake®	No especifica	Extracto de vainilla natural	9300 Allen, Road West, EUA.
The mexican vainilla®	VP091117VA100000-2	Extracto de vainilla natural	Tuxpan, Veracruz, México.

6.3 Reactivos y disolventes

- Acetonitrilo grado HPLC, marca J.T. Baker[®], Estados Unidos.
- Alcohol metílico grado HPLC, marca J.T. Baker[®], Estados Unidos.
- Ácido trifluoroacético grado HPLC, marca J.T. Baker[®], Estados Unidos.
- Agua destilada y desionizada para HPLC.
- Alcohol etílico grado HPLC, marca J.T. Baker[®], lote B592403, Estados Unidos.
- Estándar de vainillina, marca Sigma-Aldrich[®], lote #MKCD2565.
- Estándar de ácido 4-hidroxibenzoico, marca Sigma-Aldrich[®], lote #BCBW4816.
- Estándar de ácido vainillínico, marca Sigma-Aldrich[®], lote #BCBX5623.
- Estándar de 4-hidroxibenzaldehído, marca Sigma-Aldrich[®], lote #BCBT6626.
- Estándar de cumarina, guayacol, marca Sigma-Aldrich[®], lote #SLB55147.
- Estándar de eugenol, marca Sigma-Aldrich[®], lote #STBG9481.
- Estándar de etilvainillina, marca Sigma-Aldrich[®], lote #LRAA9066.

Todos los estándares utilizados corresponden a la marca Sigma-Aldrich[®], Estados Unidos, con 99% de pureza.

6.4 Selección de compuestos a analizar

De los ocho estándares empleados, cuatro de ellos son compuestos naturales propios de las vainas de vainilla, tal es el caso de la vainillina, el ácido 4-hidroxibenzoico, el 4-hidroxibenzaldehído y el ácido vainillínico, y los otros cuatro corresponden a los productos característicos ya sea del proceso de elaboración de la vainillina sintética o de la composición de

extractos adulterados de vainilla. En específico, el eugenol y el guayacol son subproductos de la síntesis de la vainillina; la cumarina y la etilvainillina, principales compuestos en la vainilla sintética, los cuales se utilizan frecuentemente en la adulteración de extractos naturales.

A partir de los ocho estándares se realizó la identificación y cuantificación de los compuestos de interés en las muestras comerciales. El análisis cuantitativo mediante HPLC se realizó por el método patrón externo (Peña, Cervera & Labastida, 2017); las curvas de calibración que se construyeron se incluyen en el Anexo A.

6.5 Tratamiento de las muestras

Se adquirieron un total de 14 vainas de vainilla beneficiadas de la especie *V. planifolia* de la región de Papantla, Veracruz, las cuales se mantuvieron almacenadas en su empaque entre 24 y 48 horas antes de su extracción. Cada vaina de vainilla, cuya longitud en promedio oscilaba entre 14 y 15cm, se sometió a un troceado y a un corte transversal con navaja. De cada una se pesó un 1.0 g en balanza analítica, a fin de obtener una mayor precisión y exactitud en la cantidad de la muestra antes de realizar la extracción.

Por otro lado, las 13 muestras comerciales se agitaron para lograr la adecuada homogeneización de sus componentes. Este procedimiento se realizó por que algunas muestras presentaban sólidos en suspensión, mientras que en otras se observaba la separación de dos fases líquidas, con ello se tuvo una alícuota más representativa de la muestra para la elaboración de la dilución, filtración e inyección en el equipo cromatográfico para el análisis.

6.6 Extracción de las vainas de vainilla

Se realizó una extracción por la técnica de maceración a temperatura ambiente ($\approx 28^{\circ}\text{C}$ aproximadamente) con 10.0 mL de una solución acuosa de etanol al 65% (Moreno-Ley *et al.*, 2018) a 1.0 g de cada vaina de vainilla, simulando el proceso que se sigue de forma comercial para la obtención de estos extractos. Cada una se dejó en extracción por un período de dos semanas a 28°C temperatura ambiente en viales de vidrio de tapón de rosca de 12.0 mL los cuales se cubrieron con papel aluminio para evitar el paso de luz y, con ello, la descomposición de los componentes extraídos, debido a su sensibilidad. Posteriormente, se realizó la filtración de ≈ 1.5 mL de los extractos en filtros de jeringa de membrana de nylon de $0.45\ \mu\text{m}$ para preparar las soluciones y diluciones requeridas. La filtración se considera importante en cualquier análisis químico cromatográfico debido a que con ésta se evita la presencia de sólidos que puedan llegar contaminar la columna con partículas, obstruir los conductos y dañar el sistema de bombeo y el inyector al momento de la inyección de la muestra en el equipo cromatográfico. Para las muestras comerciales se realizó el mismo proceso de filtración después de su homogeneización. En la Figura 22, se muestra el extracto de una vaina de vainilla y el recubrimiento empleado para su protección.



Figura 22. Recubrimiento de los extractos con papel aluminio.

6.7 Análisis de las muestras

Se realizaron diluciones 1:10 de los extractos provenientes de las vainas de vainilla, así como también de las muestras comerciales. Las diluciones fueron necesarias debido a que los extractos iniciales presentaron una concentración muy elevada de los componentes a determinar, lo que provocó la saturación del detector UV del equipo cromatográfico. Las diluciones se realizaron tomando de la misma solución de maceración (mezcla acuosa de etanol al 65%) la alícuotas correspondientes con una micropipeta y llevándolo al aforo en matraces volumétricos de 1.0 mL. Finalmente, se inyectaron por triplicado en el cromatógrafo de líquidos con las condiciones establecidas.

6.8 Identificación y cuantificación

La identificación se hizo por comparación con los tiempos de retención de la inyección individual de los estándares. Una vez que los picos se integraron e identificaron se realizó la cuantificación por el método de patrón externo, para ello, se construyeron las curvas de calibración con los ocho estándares objeto del presente trabajo, se usó como factor de respuesta el área del pico cromatográfico en función de la concentración de las disoluciones inyectadas (1-10ppm).

A continuación, se detalla el equipo cromatográfico utilizado a lo largo del estudio, la variable de respuesta, y en la Tabla 4 se describen las condiciones cromatográficas que se establecieron.

Equipo:

- Cromatógrafo de líquidos modular marca Hewlett Packard, serie 1100 (Figura 23), con auto-muestreador, bomba y detector de luz UV de arreglo de diodos (DAD).

- Columna Phenomenex Kinetex® con fase estacionaria de octadecilsilano (C18) enlazado químicamente a micropartículas de sílice porosas (tamaño de poro 100 Å), con una longitud y diámetro interno de 4.6 x 150 mm, y funcionalidad a un intervalo de pH 2.0-8.0.

Variable de respuesta: Concentración de los compuestos establecidos en la curva de calibración por interpolación.

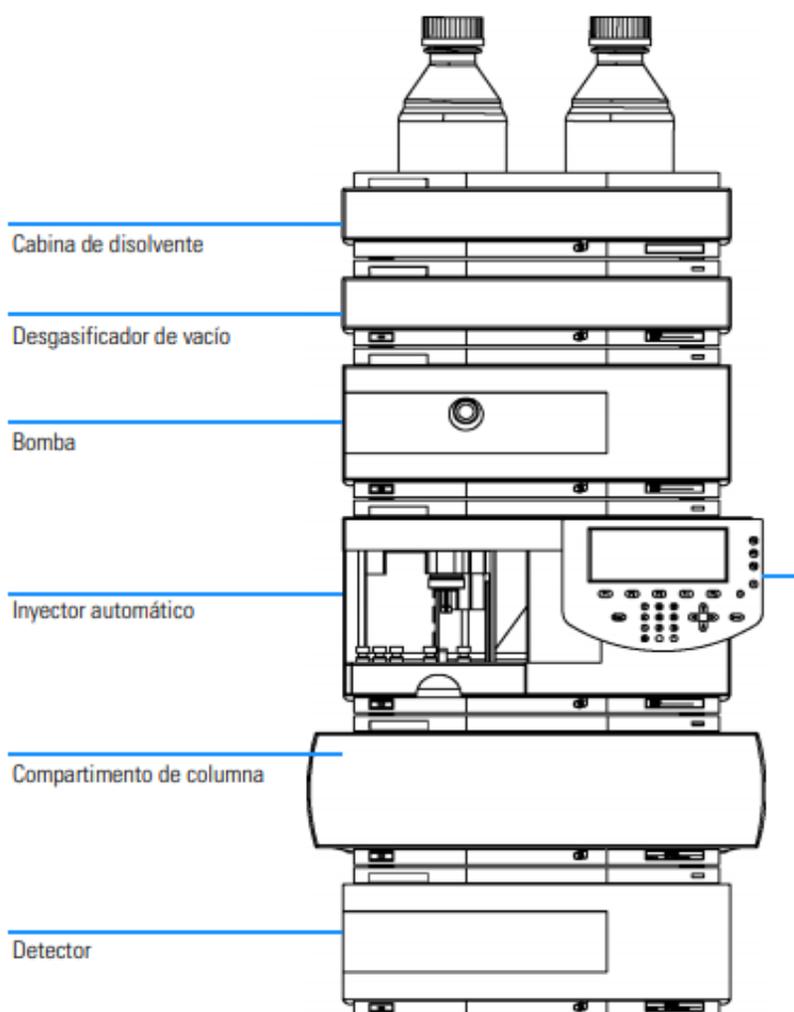


Figura 23. Cromatógrafo de líquidos modular marca Hewlett Packard.

En la Tabla 4 se muestran las condiciones cromatográficas para la separación de los ocho compuestos estudiados.

Tabla 4. Condiciones cromatográficas para el análisis de extractos de vainilla.

Columna	Phenomenex Kinetex® con fase estacionaria de octadecilsilano (C18) y longitud y diámetro interno de 4.6x150 mm.		
Fase móvil y gradiente	(A) ácido trifluoro acético 0.1% en agua		
	(B) ácido trifluoro acético 0.1% en acetonitrilo		
	Gradiente de elución		
	Tiempo (min)	% A	% B
	0	95	5
	12	35	65
	17	95	5
Flujo	0.8 mL/min		
Temperatura de la columna	35 °C		
Volumen inyección	5 µL		
Detector	UV de arreglo diodos (DAD); $\lambda_{\text{máx}}$ 260 y 280 nm		

La fase móvil se acidificó con ácido trifluoro acético para favorecer la separación y la selectividad en la elución de los componentes (Tanaka *et al.*, 1978) ya que en medio neutro algunos compuestos presentaban tiempos de retención muy cercanos, como es el caso del ácido 4-hidroxibenzoico y el ácido vainillínico (esta técnica es conocida como formación por pares de iones).

El procedimiento cromatográfico consistió en la preparación de disoluciones en acetonitrilo de cada estándar individual y de la mezcla de los ocho estándares a analizar, en ambos casos en un intervalo de concentraciones de 1 a 10 ppm (mg/L), y en particular para la construcción de 10 puntos experimentales de una curva de calibración absoluta aplicando el método de patrón externo (Anexo A).

Las disoluciones estándar en acetonitrilo se inyectaron por triplicado empleando las condiciones señaladas en la Tabla 4.

En primera instancia, se identificaron los tiempos de retención (t_R) de cada estándar inyectado por separado para poder identificar los compuestos presentes en las muestras.

Con los valores del área de cada pico y los datos de regresión de las curvas de calibración (método del patrón externo), se calculó la concentración promedio (mg/L) de los compuestos presentes en cada una de las muestras. Para lograr un preciso análisis estadístico, las concentraciones se reportaron en porcentaje relativo (%), como se muestra en la Tabla 5 en la sección de resultados, aunque los resultados se determinaron en mg/L. La longitud de onda máxima ($\lambda_{m\acute{a}x}$) de cada compuesto a la que se le realizó la cuantificación, los t_R y los parámetros de regresión lineal de las curvas de calibración, se indican igualmente en la sección de Resultados.

6.9 Determinación del límite de detección (LD) y cuantificación (LC)

Se realizó la determinación de los límites de detección y cuantificación de los ocho estándares. Estas determinaciones se hicieron acorde a la prueba "ring test, and standardisation" reportada por Vogelgesan y Hädrich (1997) y al método de Miller que se discute en el Anexo B.

Para la estimación de los límites de detección y de cuantificación, se aplicaron las aproximaciones estadísticas; el cálculo del error y la desviación estándar de la ordenada y la pendiente las curvas de calibración de los ocho estándares. Los valores de estas estimaciones se muestran representadas en los gráficos en el Anexo B.

6.10 Análisis sensorial

La caracterización de los extractos de vainilla comerciales se realizó por el método de Perfil Flash modificado, el cual permitió determinar las diferencias y semejanzas existentes entre las muestras de los extractos de vainilla natural y los artificiales, y comparándolos con los datos obtenidos por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC).

6.10.1 Generación de atributos descriptivos y selección de atributos representativos

Se realizaron pruebas triangulares para determinar qué muestras eran sensorialmente diferentes. Con base en estos resultados, se seleccionaron 12 muestras representativas de las 27 muestras que corresponden tanto a muestras comerciales como a los extractos de las vainas de vainilla elaborados experimentalmente en el laboratorio.

En el Perfil Flash modificado participaron 24 jueces entrenados en cabinas individuales (12 evaluaron 6 muestras, y el resto las otras 6) en metodología descriptiva pertenecientes al Laboratorio de Evaluación sensorial de la Facultad de Química.

El primer paso de la aplicación del Perfil Flash modificado fue la generación de atributos, para ello se eligieron seis muestras de las 12 muestras (todas muestras comerciales) seleccionadas en la prueba triangular. Para evaluar las muestras, estas se diluyeron 1:3 utilizando como diluyente agua purificada, preparando un total de 140.0 mL.

A cada juez se le entregó 30.0 mL de la solución preparada en vasos codificados con número de tres dígitos. Cada evaluador realizó una descripción de su apariencia, olor, textura y sabor de acuerdo con su propia percepción pidiéndoles que utilizaran sus propias palabras y que evitaran términos hedónicos.

Una vez que se obtuvieron los descriptores, se realizó un consenso con los evaluadores (para una reducción de atributos), con el fin de determinar los atributos que se evaluarían para cada muestra.

6.10.2 Evaluación de las muestras

Se llevó a cabo la evaluación de 12 muestras comerciales (a una muestra comercial no se le aplicó la evaluación debido a que no se contaba con muestra suficiente) diluidas 1:3 de las marcas seleccionadas. Se le entregó a cada juez 30.0 mL de la solución a evaluar, una galleta neutra tipo habanera, y agua para el enjuague bucal entre las muestras, se les pidió que evaluaran cada una de las muestras indicando si se encontraban presente o no, y en que intensidad cada uno de los atributos que resultaron del consenso anterior.

La evaluación se realizó en un cuestionario elaborado en el software FIZZ acquisition, por lo que los jueces capturaron sus resultados en los cuestionarios electrónicos.

Para medir la intensidad sensorial de los atributos en las muestras, se hicieron pruebas de intervalo con escala estructurada de nueve puntos, de 1 a 9, donde el 1 indicó la ausencia del atributo y el 9 la máxima intensidad del atributo correspondiente.

La elaboración del Perfil Flash con jueces entrenados puede producir perfiles sensoriales más rápido, pero con un consenso similar a un perfil convencional, como el Análisis descriptivo cuantitativo (QDA) (Moussaoui & Varela, 2010; Varela & Ares, 2012; Albert, Varela, Salvador, Hough & Fiszman, 2011; Väkeväinen *et al.*, 2020). Los panelistas diferenciaron el total de las muestras comerciales de los extractos de vainilla y generaron un vocabulario para describirlos.

6.11 Análisis estadístico

6.11.1 Análisis estadístico del método analítico cromatográfico

En cuanto al análisis estadístico de los datos, se aplicó en primera instancia la prueba estadística de Análisis de Varianza (ANOVA) a los extractos obtenidos de las vainas de vainilla para la comprobación de la siguiente hipótesis:

- H_0 = El perfil de los componentes presentes en los extractos obtenidos de las vainas de vainilla es el mismo para todas las vainas de la misma especie.

Se tiene un valor $F_{\text{crítico}}$ de 1.821 que debe cumplirse para aceptar la hipótesis nula.

En segundo lugar, a partir del perfil de componentes y sus concentraciones presentes en la vainilla natural se realizó el cálculo de los siguientes parámetros estadísticos: la media, μ ; la desviación estándar muestral, s ; y los intervalos de confianza, I.C. (Rubinson & Rubinson, 2001; Montgomery, 2004; Gutiérrez & Roman, 2008).

Se realizó la prueba estadística denominada "Comparación para la Media" para comprobar el siguiente planteamiento de la segunda hipótesis:

- El perfil y las concentraciones de los componentes que corresponden a la vainilla natural y aquel de las muestras comerciales deberán ser idénticos entre sí.

El cálculo de los intervalos de confianza "I.C.", de la media permite tener una mayor precisión sobre el intervalo x en el que puede estar el parámetro estudiado y tener una mayor certidumbre en el criterio de aceptación o rechazo de la hipótesis; En este método se rechaza la hipótesis nula (H_0) si el valor del parámetro declarado en la hipótesis nula (H_0) se encuentra fuera del intervalo de confianza para el mismo parámetro, con un nivel de confianza al 95% (Rubinson & Rubinson, 2001; Montgomery, 2004; Gutiérrez & Roman, 2008).

6.11.2 Análisis estadístico aplicado a la evaluación sensorial

El diseño de las sesiones para la evaluación sensorial se realizó utilizando el software FIZZ versión 2.3, módulo Acquisition y judge, by BIOSYSTEMES, 2007, Courtenon, France. Se aplicó el Análisis Procrustes Generalizado (APG) a los datos obtenidos utilizando el software estadístico XLSTAT 2014, Addinsoft, versión 2.06 b.

Capítulo 7. Resultados y discusión del estudio analítico

7.1 Análisis de los parámetros de elución óptima de los analitos

La Figura 24 muestra el cromatograma correspondiente de los ocho estándares estudiados, como se puede observar, en este cromatograma se aprecia una buena resolución en la separación de los compuestos de interés, lo cual es importante para que la cuantificación sea correcta, de la misma manera el cromatograma indica el nombre de los componentes presentes en la disolución estándar. Las concentraciones analizadas fueron de 1-10 ppm, el primer compuesto en eluir es el ácido 4-hidroxibenzoico seguido por el ácido vainillínico, el 4-hidroxibenzaldehído, la vainillina, el guayacol, la etilvainillina, la cumarina y, por último, el eugenol. Después de los 15 minutos de elución, se observan numerosos picos con una débil señal UV a una longitud de onda a 260 nm, los cuales son asociados a compuestos que corresponden a impurezas que se encuentra tanto en la fase móvil como de los estándares y que no son de interés en este estudio. La elución de algunos picos provenientes de estas impurezas muy cercano al pico del eugenol afectó la reproducibilidad de la integración de éste, por lo que la correlación de los puntos experimentales en la curva de calibración fue menor que en el resto de los estándares (Tabla 5), y por consiguiente afectó su cuantificación.

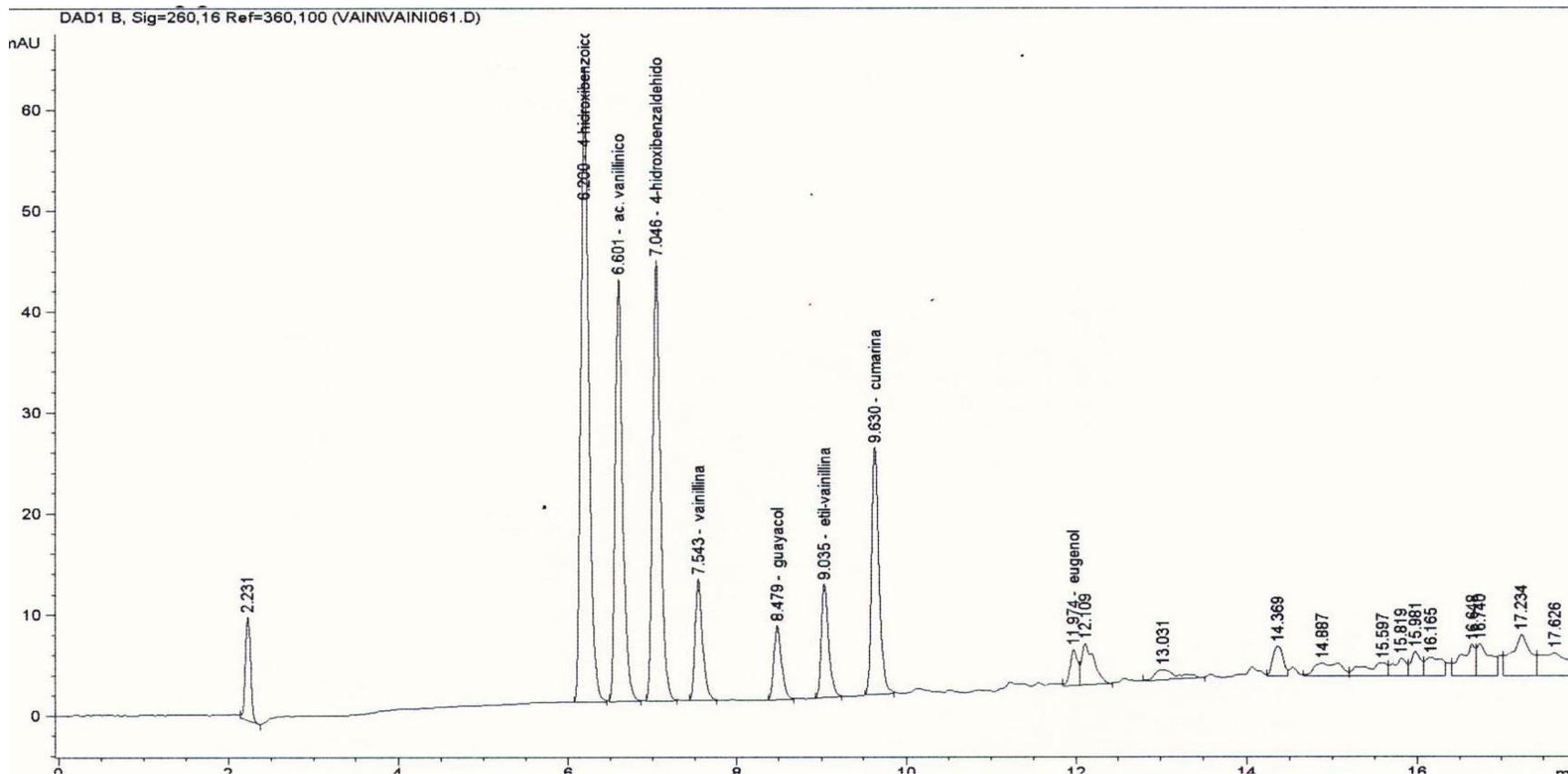


Figura 24. Cromatograma de los estándares 4-hidroxi benzaldehído, ácido vanilínico, ácido 4-hidroxi benzoico, vainillina, cumarina, guayacol y eugenol (concentración 10 ppm), señal obtenida a 260 nm.

Respecto al orden de elución, se puede decir que es consistente de acuerdo con la polaridad de los compuestos y con la polaridad de la fase estacionaria utilizada (C18) y la fase móvil, el orden de elución corresponde a una menor retención de los compuestos más polares, que eluyen antes que los no polares, que son los más retenidos en la cromatografía de fase inversa. Este orden de polaridad se muestra en la Figura 25, se observa que los de carácter más ácido eluyen primero, esto es debido a la fuerza del disolvente (fase móvil) acidificado con ácido trifluoroacético.

Una de las principales ventajas de la acidificación de la fase móvil es que se obtuvo una mejor separación y resolución entre los compuestos de carácter ácido, ya que de acuerdo con Tanaka *et al*, (1978), en medio neutro los compuestos: ácido 4-hidroxibenzoico y el ácido vainillínico (ácido-4-hidroxi-3-metoxibenzoico), tienen tiempos de retención muy cercanos.

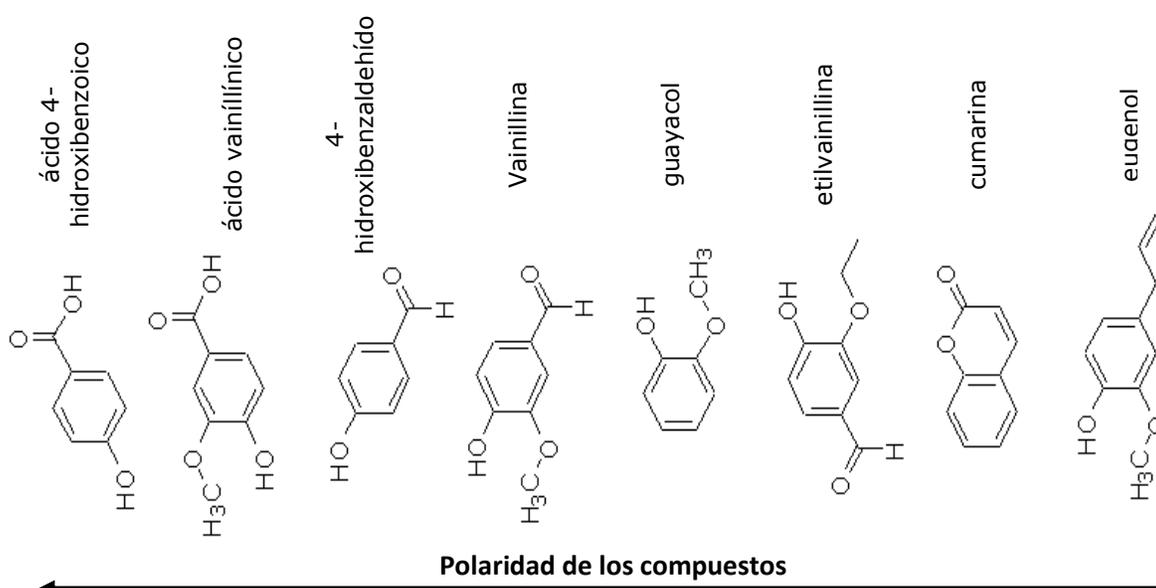


Figura 25. Orden ilustrativo de la polaridad de los compuestos a determinar.

La modificación del pH de la fase móvil promueve la ionización de este tipo de compuestos, cuando un ácido se ioniza (cuando se convierte de una especie sin carga a una con carga), el compuesto se vuelve mucho más polar o hidrofílico, por lo que la retención en HPLC de fase reversa es menor en el proceso cromatográfico. Sin embargo, este efecto del pH no afecta a los compuestos de carácter neutro (sin capacidad de ionizarse), por lo que su tiempo de retención no cambian, este es el caso de la vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído), el 4-hidroxibenzaldehído, cumarina, guayacol, eugenol y la etilvainillina.

En la Tabla 5 se indican sus correspondientes tiempos de retención (t_R), la longitud de onda máxima ($\lambda_{m\acute{a}x}$) a la que se realizó la cuantificación y los parámetros de regresión lineal.

Tabla 5. Tiempos de retención, longitud de onda de cuantificación y parámetros de regresión.

Compuesto	t_R (min)	λ (nm)	Pendiente	Ordenada	r^2
Ácido 4-hidroxibenzoico	6.216	260	34.6758	-2.89723	0.99992
Ácido vainillínico	6.599	260	20.9808	-2.93741	0.99993
4-hidroxibenzaldehído	7.063	260	22.8505	-1.17552	0.99992
Vainillina	7.545	280	14.1020	5.84552	0.99993
Guayacol	8.42	260	2.60401	-0.52373	0.99981
Etilvainillina	8.84	280	13.388	0.406733	0.99967
Cumarina	9.234	280	12.0445	1.716	0.99945
Eugenol	11.894	280	3.6728	6.8416	0.99348

De acuerdo con los datos de la Tabla 5, se obtuvo una excelente correlación (r^2) en el intervalo de 1 a 10 ppm para prácticamente los ocho compuestos. No obstante, los estándares que presentaron menor correlación fueron el eugenol y el guayacol, lo que se debió a problemas de integración debido a las impurezas que contenía tanto la fase móvil como los estándares, esta disminución en la correlación de los puntos experimentales en la curva de calibración se observó mayor mente cuando las concentraciones de estos fueron inferiores a 2 ppm, esta misma situación ha sido reportada por Ranadive (1992) y por Lamprecht *et al.* (1994). Ambos autores concuerdan en que no se logra resolver completamente de manera satisfactoria la separación de todos los componentes debido a problemas de reproducibilidad de la integración relacionado con la cumarina, el guayacol y el eugenol a pesar de la acidificación de la fase móvil.

Los parámetros cromatográficos como el factor de capacidad (k'), la selectividad (α), la resolución (R_s), el número de platos teóricos (N) se calcularon a partir de los datos experimentales obtenidos de la inyección del estándar a la concentración de 10 ppm (tiempo de retención y el ancho del pico en la base de cada estándar, así como el tiempo muerto). Utilizando estos parámetros se determinó si el método analítico empleado para este estudio tiene una buena resolución, selectividad y eficiencia en la separación de todos los compuestos.

Tabla 6. Parámetros cromatográficos de la disolución estándar 10 ppm.

Compuesto	k'	W_{i(min)}	N	α	R_s
Ácido 4-hidroxibenzoico	2.139	0.3893	4085.47		
Ácido Vainillínico	2.332	0.3620	5316.90	1.090	1.0195
4-hidroxibenzaldehido	2.567	0.3061	8524.23	1.100	1.5260
Vainillina	2.810	0.3021	9986.75	1.094	1.5850
Guayacol	3.252	0.3023	12437.41	1.157	2.8954
Etilvainillina	3.46	0.2950	14.367.47	1.063	1.4063
Cumarina	3.663	0.3410	11732.51	1.058	1.2389
Eugenol	5.007	0.2109	50888.85	1.366	9.6391

*El tiempo muerto $t_M=1.98$ obtenido a partir del tiempo de elución de una solución de KNO_3 .

Como se puede observar en la Tabla 6, se obtuvo valores de la resolución mayores a 1, lo que nos indica que existe una buena capacidad de la columna y del método analítico aplicado para separar los compuestos, esto mismo se correlaciona tanto con los valores de selectividad (α) como del factor de capacidad (k') obtenidos. Los valores de selectividad obtenidos igualmente son mayores a 1, lo que también indica que existe una buena separación de dos componentes que eluyen de forma continua, cuanto mayor sea el valor de " α " es mayor y mejor la separación y resolución. Los valores del factor de capacidad (k'), igualmente reportados en la Tabla 6, se encuentran entre un rango de 2 a 5, estos mismos valores se encuentran dentro de los valores óptimos para la retención de un analito, recordando que mientras más bajo es el valor existe menor retención del analito en la fase estacionaria por lo que eluye más rápidamente, y a valores más altos, existirá mayor retención del analito, por consiguiente, mayor tiempo de elución y mayor ensanchamiento de las bandas.

De acuerdo con los valores obtenidos de los parámetros cromatográficos, se determinó que el método analítico empleado es adecuado para realizar un análisis cualitativo y cuantitativo, ya que existe una selectividad, resolución y eficiencia adecuada para la separación de cada uno de los compuestos analizados en este estudio.

7.2 Determinación de los límites de detección y cuantificación.

El objetivo de la determinación de estos límites es tener la certeza sobre la menor cantidad de analito, expresada en concentración, que el método analítico nos permite realizar la detección (LD) y la cuantificación (LC) de cada uno de los componentes a determinar en el procedimiento experimental, aquellos componentes cuyo valores que se encontraron por debajo del límite de detección (LD) calculado se consideraron como “no detectado” (ND), esto significa que no fueron detectados en las muestras de acuerdo al método analítico utilizado.

Tabla 7. Límites de detección y cuantificación de los componentes determinados.

Compuesto	LD (mg/L)	LC (mg/L)
Ácido 4-hidroxibenzoico	0.30	0.85
Ácido Vainillínico	0.39	1.10
4-hidroxibenzaldehído	0.16	0.47
Vainillina	0.21	0.61
Guayacol	0.43	1.25
Etilvainillina	0.07	0.19
Cumarina	0.14	0.41
Eugenol	0.59	1.82

Los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC), de los componentes cuantificados por el método analítico (HPLC) se encontraron entre los rangos de 0.19 a 1.82 mg/mL (Tabla 7). Los límites se determinaron haciendo uso de las curvas de calibración de los ocho estándares analizados, a las cuales se les aplicaron las aproximaciones estadísticas de cálculo de error y desviación estándar de la ordenada y la pendiente obteniendo los intervalos de confianza correspondientes con un nivel de confianza del 95% con el estadístico t de Student en una prueba de alternativa bilateral de dos colas, estos cálculos se encuentran reportados por los autores Vogelgesan y Hädrich (1997) en su publicación "Limits of Detection, Identification and Determination: A Statistical Approach for Practitioners".

7.3 Identificación y cuantificación de los componentes presentes en las muestras

La Figura 26 muestra el cromatograma correspondiente al extracto de vainilla A, que es un extracto natural obtenido por maceración a partir de las vainas de vainilla, mientras que la Figura 27 presenta el cromatograma correspondiente de la muestra comercial marca *SweetLeaf*[®], cuyo etiquetado declara ser un saborizante natural.

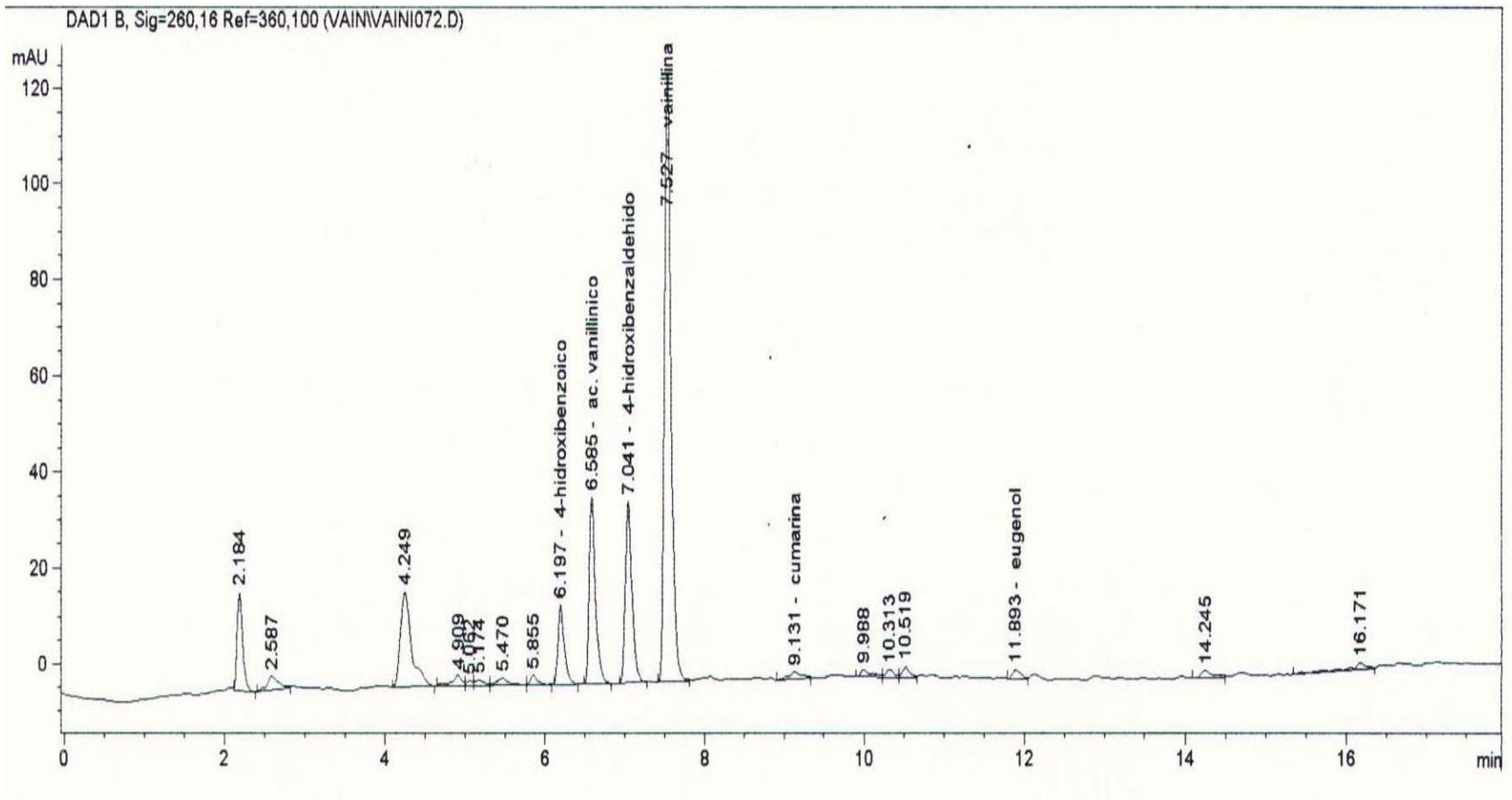


Figura 26. Cromatograma del extracto natural elaborado a partir de la vaina "A".

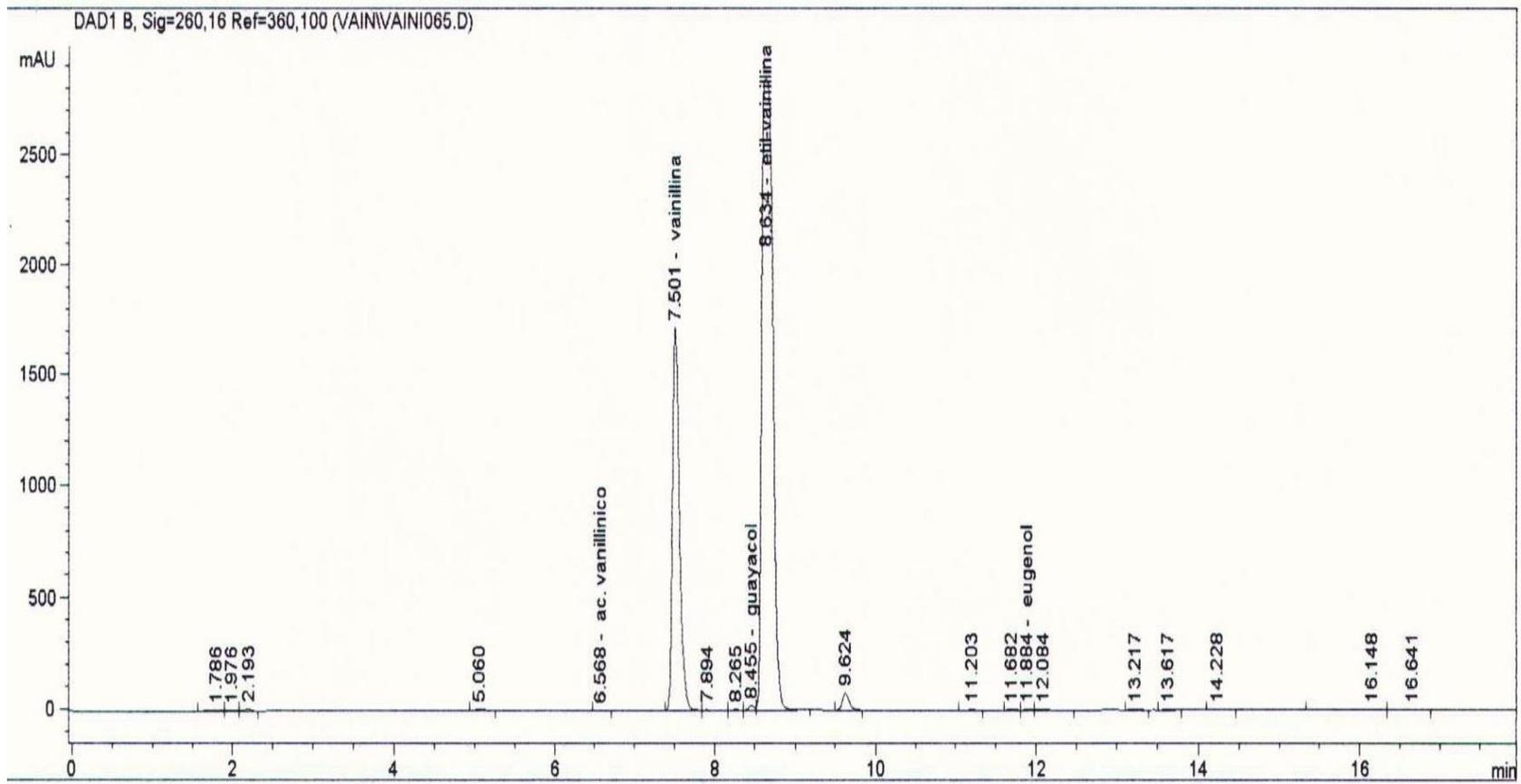


Figura 27. Cromatograma de la muestra comercial marca *SweetLeaf*[®] que declara ser un saborizante natural.

Comparando los cromatogramas de las Figuras 19 y 20, el número de compuestos identificados es diferente para ambas muestras. Para el extracto obtenido a partir de la vaina de vainilla "A" (Figura 26), se identificaron cuatro picos con señales intensas correspondientes a los principales compuestos esperados en los extractos naturales de vainilla: vainillina, ácido 4-hidroxibenzoico, 4-hidroxibenzaldehído y ácido vainillínico, y señales menores de cumarina y eugenol; estos mismos fueron reportados por Herrmann y Stockli (1982) y Jagerdeo *et al.*, (2000), donde se menciona que estos son considerados los compuestos que se encuentran típicamente presentes en el extracto de vainilla y los responsables de sus características organolépticas, pero no de la vainilla sintética. En el caso de la muestra comercial "SweetLeaf®" (Figura 27) se identificaron señales intensas para la vainillina y la etilvainillina, y señales mucho menores para ácido vainillínico, guayacol y eugenol.

De acuerdo con la denominación de saborizante natural que se reporta en la etiqueta para la marca *SweetLeaf*® (Metodología, Tabla 2), se esperaba que este producto contuviera el mismo perfil de componentes que la muestra del extracto de vaina natural "A", sin embargo, están ausentes dos compuestos característicos: el ácido 4-hidroxibenzoico, el 4-hidroxibenzaldehído, mientras que el ácido vainillínico presentó una señal muy poco intensa (Figura 26), además, como ya se comentó, se observa el pico de la etilvainillina, una señal intensa con un tiempo de retención de 8.84 min. que no se observa en el cromatograma de la muestra "Vainilla A" (Figura 26), determinándose así la presencia de un compuesto empleado como adulterante en la marca *SweetLeaf*®, ya que este se utiliza en la mayoría de los casos como el componente principal de la vainilla sintética.

En la Tabla 8 se indica la concentración promedio expresada en porcentaje (%) de los ocho analitos en cada una de las muestras estudiadas.

Tabla 8. Resultados de la cuantificación de los componentes en cada una de las muestras.

		Componentes	ác. 4-Hidroxibenzoico	ác. Vainillínico	4-Hidroxibenzaldehído	Vainillina	Guayacol	Etilvainillina	Cumarina	Eugenol	Suma del %
		% de acuerdo a la conc. En [mg/L]	% relativo	% relativo	% relativo	% relativo	% relativo	% relativo	% relativo	% relativo	relativo
Muestras	Extractos de vainas naturales	Vaina A	1.76	6.65	6.20	80.86	0.00	2.05	1.51	0.97	100.00
		Vaina B	1.53	11.99	5.61	78.24	0.00	0.48	2.07	0.08	100.00
		Vaina Zanilli®	2.01	8.73	5.55	79.43	0.00	0.00	0.46	3.82	100.00
		Vaina Mamima®	1.56	6.01	6.81	81.76	0.00	0.00	2.83	1.03	100.00
		Vaina C	1.65	5.71	5.75	86.11	0.00	0.00	0.00	0.79	100.00
		Vaina D	1.31	5.07	6.15	87.30	0.07	0.00	0.02	0.08	100.00
		Vaina E	1.78	6.59	5.92	85.47	0.14	0.00	0.08	0.02	100.00
		Vaina F	1.52	8.18	6.77	82.68	0.00	0.00	0.00	0.84	100.00
		Vaina G	1.59	9.00	6.77	81.57	0.21	0.00	0.00	0.86	100.00
		Vaina H	1.09	4.73	6.26	87.54	0.02	0.00	0.00	0.35	100.00
		Vaina I	2.68	9.72	6.33	81.06	0.00	0.09	0.04	0.07	100.00
		Vaina J	2.90	10.49	6.69	78.94	0.00	0.09	0.14	0.75	100.00
		Vaina K	2.90	9.41	6.86	79.86	0.00	0.09	0.37	0.51	100.00
	Vaina L	2.41	9.79	6.23	80.18	0.00	0.04	0.23	1.12	100.00	
	Muestras comerciales de extractos y saborizantes	La anita® saborizante artificial	0.00	0.00	8.30	33.64	1.43	54.07	0.00	2.56	100.00
		Vainilla Molina® saborizante artificial	0.00	0.00	0.09	94.64	0.58	4.67	0.00	0.03	100.00
		Vainilla Molina® saborizante natural	0.08	0.12	0.00	83.36	0.97	13.39	0.00	2.08	100.00
		SweetLeaf® saborizante natural	0.00	0.02	0.00	49.08	1.74	48.82	0.06	0.27	100.00
		Zanilli® saborizante natural	2.14	11.72	4.59	71.40	4.59	1.53	3.03	0.99	100.00
		Mamima® saborizante natural	0.00	0.00	19.73	41.96	7.69	28.33	0.00	2.29	100.00
Pasa® extracto natural		0.00	3.19	1.34	47.95	14.14	32.31	0.01	1.06	100.00	
Pasa® saborizante natural		0.00	0.31	10.54	18.31	1.80	61.02	8.00	0.02	100.00	
LOL-TUN® saborizante artificial		0.00	0.07	0.00	87.68	0.59	10.40	0.11	1.16	100.00	
Altea® saborizante artificial		0.00	0.00	0.00	89.16	0.42	10.40	0.00	0.02	100.00	
Pro Gourmet® extracto de vainilla natura		0.00	0.00	0.00	99.73	0.00	0.12	0.01	0.13	100.00	
Bankey Cake extracto vainilla		0.00	0.14	0.00	78.68	0.00	21.10	0.06	0.02	100.00	
The mexican vainilla® extracto de vainilla		2.58	9.26	6.94	80.97	0.00	0.10	0.00	0.16	100.00	

7.4 Análisis estadístico de los extractos elaborados a partir de vainas de vainilla

Cabe mencionar que únicamente se aplicó la prueba estadística de Análisis de Varianza (ANOVA) (Tabla 9) a los resultados de concentración obtenidos únicamente de los extractos de las vainas de vainilla elaborados experimentalmente en el laboratorio (Tabla 8). Con este análisis se comprobó que no existía diferencia significativa ($\alpha=0.05$) en la proporción de los componentes presentes en ellas, con lo que se aceptó la hipótesis nula planteada en este trabajo ($H_0=$ El perfil de los componentes presentes en los extractos obtenidos de vainas de vainilla es el mismo para todas las vainas de la misma especie), debido a que la $F_{\text{calculada}}$ es menor que el valor de $F_{\text{crítico}}$.

Tabla 9. ANOVA de un factor para los extractos de vainilla.

Variaciones	Σ de cuadrados	g.l.	Prom. de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico F
Entre grupos	-1.45×10^{-11}	13	1.119×10^{-12}	-1.4×10^{-15}	0.00	1.821
Dentro de los grupos	78867.755	98	804.77			
Total	78867.755	111				

De esta manera, quedó demostrado estadísticamente por la prueba estadística aplicada (ANOVA) que el perfil de componentes presente en los extractos de vainilla de la especie *V. planifolia* utilizada en este trabajo es el mismo para todas las vainas y sólo depende únicamente de la especie y no del tiempo de beneficiado de las vainas de vainilla o el tiempo requerido de extracción de la vaina de vainilla para obtener el extracto.

Posteriormente aceptada la hipótesis, se realizaron los cálculos de la media, μ , desviación estándar, s , y los intervalos de confianza, I.C. para los extractos de las vainas de vainilla obtenidos en el laboratorio. Los datos se encuentran resumidos en la Tabla 10.

Tabla 10. Parámetros estadísticos de la composición de las vainas de vainilla.

Componentes	ác. 4-Hidroxibenzoico	ác. Vainillínico	4-Hidroxibenzaldehído	Vainillina	Guayacol	Etilvainillina	Cumarina	Eugenol
	% relativo	% relativo	% relativo	% relativo	% relativo	% relativo	% relativo	% relativo
Promedio Vainas	1.91	8.00	6.28	82.21	0.03	0.20	0.55	0.81
Desviación estándar (S)	0.59	2.22	0.45	3.14	0.07	0.55	0.91	0.95
Intervalo de confianza (I.C.)	0.34	1.28	0.26	1.81	0.04	0.32	0.52	0.55
Nivel de significancia alfa	0.05							
Tamaño de la muestra	14							
T de student a dos colas	2.16							
Promedio Vainas con I.C.	1.91 ± 0.34	8.00 ± 1.28	6.28 ± 0.26	82.21 ± 1.81	0.03 ± 0.04	0.20 ± 0.32	0.55 ± 0.52	0.81 ± 0.55

De acuerdo con la Tabla 10, el perfil y las concentraciones de los principales componentes de la vainilla natural están conformados por la presencia de la vainillina, el ácido 4-hidroxibenzoico, el 4-hidroxibenzaldehído y el ácido vainillínico en un respectivo porcentaje de 82%, 2%, 8% y 6%, por lo que el compuesto en mayor concentración presente en los extractos de vainilla de la especie *V. planifolia* es la vainillina, mientras que el guayacol, la etilvainillina, la cumarina y el eugenol son los compuestos minoritarios (< 0.81%), y en muchos casos, especialmente en el caso de la etilvainillina, están ausentes (Tabla 8). Estos valores obtenidos concuerdan con los reportados por Pérez Silvia *et al.*, (2006) en su estudio realizado por cromatografía de gases-espectroscopia de masas (GC-MS) y análisis de olfatometría GC de compuestos aromáticos donde se reporta que la vainillina representa en promedio el 85% de los componentes totales.

7.5 Análisis estadístico de las muestras comerciales de extractos de vainilla

Una vez que se determinó el perfil de componentes que se encuentra presente en los extractos de vainilla de la especie *V. planifolia*, se realizó un segundo análisis estadístico denominado "Comparación para la Media" para comprobar la segunda hipótesis: "El perfil y las concentraciones de los componentes que corresponden a la vainilla natural y aquel de las muestras comerciales son igual entre sí".

En la Tabla 11 se indica los resultados de este análisis estadístico realizado. En ella se resaltan en azul aquellas marcas comerciales en las que se acepta la hipótesis, es decir, aquellas en las que el perfil y la concentración de los componentes que corresponden a extractos naturales de vainilla son iguales. Por otro lado, para el resto de las marcas comerciales sí existe diferencia significativa ($\alpha=0.05$), puesto que no presentan el mismo perfil de componentes característicos de la vainilla natural.

Tabla 11. Muestras comerciales que cumplen con la hipótesis nula.

Componentes	ác. 4-Hidroxibenzoico	ác. Vainillinico	4-Hidroxibenzaldehído	Vainillina	Guayacol	Etil-vainillina	Cumarina	Eugenol
	% relativo	% relativo	% relativo	% relativo	% relativo	% relativo	% relativo	% relativo
Promedio Vainas	1.91 ± 0.34	8.00 ± 1.28	6.28 ± 0.26	82.21 ± 1.81	0.03 ± 0.04	0.20 ± 0.32	0.55 ± 0.52	0.81 ± 0.55
La anita® saborizante artificial	ND	ND	8.30	33.64	1.43	54.07	ND	2.56
Vainilla Molina® saborizante artificial	ND	ND	0.09	94.64	0.58	4.67	ND	ND
Vainilla Molina® saborizante natural	ND	0.12	ND	83.36	0.97	13.39	ND	2.08
SweetLeaf® saborizante natural	ND	ND	ND	49.08	1.74	48.82	0.06	0.27
Zanilli® saborizante natural	2.14	11.72	4.59	71.40	4.59	ND	3.03	ND
Mamima® saborizante natural	ND	ND	19.73	41.96	7.69	28.33	ND	2.29
Pasa® extracto natural	ND	ND	ND	47.95	14.14	32.31	ND	1.06
Pasa® saborizante natural	ND	0.31	10.54	18.31	1.80	61.02	8.00	ND
LOL-TUN® saborizante artificial	ND	ND	ND	87.68	0.59	10.40	0.11	1.16
Altea® saborizante artificial	ND	ND	ND	89.16	0.42	10.40	ND	ND
Pro Gourmet® extracto de vainilla natura	ND	ND	ND	99.73	ND	ND	ND	ND
Bankey Cake extracto vainilla	ND	0.14	ND	78.68	ND	21.10	0.06	ND
The mexican vainilla® extracto de vainilla	2.58	9.26	6.94	80.97	ND	ND	ND	ND

 Muestras comerciales artificiales.

 Muestras comerciales que declaran ser naturales y no lo son.

 Muestras que declaran ser naturales y tienen el mismo perfil de componentes que las vainas de vainilla.

*ND = No detectado dado por el valor de LD determinado.

De esta manera, de acuerdo con los datos de la Tabla 11, las únicas dos marcas comerciales en las que se acepta la segunda hipótesis planteada, es decir, que el perfil de componentes presentes es igual al de la vainilla natural, son *The mexican vainillina*[®] y *Zanilli*[®]. De esta manera se consideró que estos productos comerciales son extractos 100% naturales de vainilla y, por lo tanto, cumplen con la denominación que se reporta en su etiquetado y con la normatividad mexicana vigente (NOM-139-SCFI-2012, NOM-182-SCFI-2011 y la NOM-030-SCFI-2006) (DOF, 2006; DOF, 2011; DOF, 2012).

En el caso de las marcas *La Anita*[®], *Vainilla Molina artificial*[®], *Altea*[®] y *LOL-TUN*[®], cuyos datos se resaltan en color verde en la Tabla 11, el análisis estadístico muestra diferencia en el perfil de composicional con respecto al perfil de componentes de vainilla natural. En estas marcas se encontró la presencia de vainillina y etilvainillina, esta última presente en alta concentración (>4.67%), y la cual característica en productos de vainilla elaborados de manera artificial. También es evidente la ausencia de ácido hidroxibenzoico y del 4-hidroxibenzaldehído, característico de la vainilla natural. Sin embargo, a pesar de que no tener el mismo perfil de componentes que los extractos naturales, estos productos no infringen la legislación mexicana debido a que en su etiquetado declaran ser “saborizantes artificiales” (NOM-139-SCFI-2012, NOM-182-SCFI-2011 y la NOM-030-SCFI-2006) (DOF, 2006; DOF, 2011; DOF, 2012).

Se encontró también diferencia significativa ($\alpha=0.05$) entre los perfiles de los componentes para las muestras de las marcas *Molina natural*[®], *Mamima*[®], *SweetLeaf*[®], *Pasa extracto natural*[®], *Pasa natural*[®], *Bankey Cake*[®] y *Pro-Gourmet*[®], resaltadas en naranja en la Tabla 11. Esta diferencia se debe esencialmente a la presencia promedio de 40% de etilvainillina. Algunas de estas marcas también contienen guayacol y eugenol, ambos compuestos son considerados como subproductos típicos

de la síntesis orgánica de vainillina y etilvainillina (Faith *et al.*, 1957). En el caso de la marca *Pro-Gourmet*[®] su perfil químico únicamente contiene presencia de vainillina. En estos casos, todas las marcas declaran ser extractos y/o saborizantes 100% naturales en su etiquetado, pero la presencia de estos componentes lo desmiente, por lo cual hace posible considerar que se aplicó una práctica fraudulenta a dichos productos o que son saborizantes artificiales, por esta razón infringen la normatividad del etiquetado y denominación de los productos comerciales de vainilla y sus derivados expuestas en la NOM-139-SCFI-2012, NOM-182-SCFI-2011 y la NOM-030-SCFI-2006 (DOF, 2006; DOF, 2011; DOF, 2012).

Las rutas principales de síntesis para la elaboración de la vainilla sintética se encuentran reportadas a detalle por Faith *et al.* (1957), dichos rutas se encuentran ilustrados en el Anexo C.

Aunque la etilvainillina no muestra toxicidad para los humanos cuando ésta es agregada a los extractos de vainilla natural, se debe agregar la leyenda "imitación, producto artificial o sintético" en la etiqueta, de lo contrario se considera fraude alimentario.

Por otro lado, aunque en las muestras comerciales *Pasa extracto natural*[®], *Molina natural*[®], *Mamima*[®] y *Bankey Cake*[®] se reportó un valor ND (no detectado) de eugenol y/o de cumarina, eso no significa que éstas muestras no contengan dichos compuestos, esto se debe más bien a la baja sensibilidad que estos compuestos presentaron en el método analítico aplicado, así como que el valor de límite de detección puede variar de acuerdo también al método matemático utilizado para su determinación ya que, la presencia de cumarina en extractos comerciales de vainilla disponibles en el mercado se atribuye principalmente, de acuerdo con lo descrito por EFSA (2008), a dos razones, la primera, se debe a una práctica de adulteración a los extractos de vainilla natural a

los cuales se les añade extracto de habichuelas del árbol tonka. La segunda razón se debe a que ésta se encuentra como subproducto de síntesis en la producción de vainilla sintética, además de que uso en los alimentos ha sido prohibido en los Estados Unidos debido a ser considerados como agente hepatotóxico (Rosengarten, 1969; Jagerdeo et al., 2000).

La presencia de este tipo de compuestos en las muestras comerciales es un verdadero riesgo para la salud de los consumidores. Debido a que el extracto de la vainilla natural es una de las materias primas de mayor demanda, la más utilizada en la elaboración de una gran cantidad de productos alimenticios y de tener un alto costo en su producción son las razones principales por las que se lleve a cabo prácticas fraudulentas por parte de los productores, por el simple hecho de obtener mejores ganancias.

Capítulo 8. Resultados y discusión del Análisis Sensorial

8.1 Generación de atributos

En la Tabla 12 se registran los 26 atributos seleccionados del total de los descriptores generados por parte de los jueces durante la primera sesión de evaluación de las muestras. Las marcas utilizadas para la generación de atributos se indican a continuación, y fueron consideradas como las más representativas debido a que en esta prueba se incluyeron dos con denominación de "extractos naturales", dos "saborizantes naturales" y dos "saborizantes artificiales". La codificación utilizada de tres dígitos generados aleatoriamente para cada muestra en el siguiente listado a continuación:

- Zanilli® código 815
- The mexican vainilla® código 920
- Pro-Gourmet® código 670
- Mamima® código 410
- La Anita® código 715
- Molina sintética® código 222

La Figura 21 ejemplifica la presentación de algunas muestras para poder llevar a cabo la evaluación sensorial en vasos de plástico transparente codificados con tres dígitos generados aleatoriamente. El orden de las muestras se asignó a azar.



Figura 21. Muestras comerciales codificadas para su evaluación sensoriales.

Para llevar a cabo la evaluación sensorial, el total de jueces se dividió en dos grupos, un grupo fue conformado por siete jueces y el segundo por seis, a cada juez, de ambos grupos, se les presentó tres muestras diferentes, las cuales se les realizó la descripción correspondiente expuesta en la metodología, se realizó el mismo procedimiento a cada una de las muestras, de esta manera se generaron los atributos correspondientes. El grupo de evaluadores utilizaron un lenguaje común sin el empleo de vocabulario técnico para definir las muestras. Generar la mayor cantidad de atributos es lo correcto para describir completamente un producto de acuerdo con los autores Dairou y Sieffeann (2002).

Los atributos más característicos fueron seleccionados de acuerdo con el mayor número de frecuencia mencionado por los jueces evaluadores y los cuales de muestran en la Tabla 12, en cambio los atributos que fueron descartados se debieron a que presentaban una baja frecuencia, es decir, fueron mencionado muy pocas veces por los jueces y se consideraron que por lo tanto no describían representativamente al total de las muestras se muestran reportados en la tabla 13.

Tabla 12. Atributos seleccionados para realizar la prueba descriptiva de Perfil Flash.

Olor	Sabor	Resabio	Aspecto	Textura
dulce	vainilla	metálico	color	viscosa
caramelo	dulce	amargo	homogeneidad	aceitosa
vainilla	amargo		brillo	seco
jarabe/medicamento	alcohol		precipitado	
amargo	madera			
alcohol	picante			
madera	astringente			
tostado				
azucar quemada				
miel				

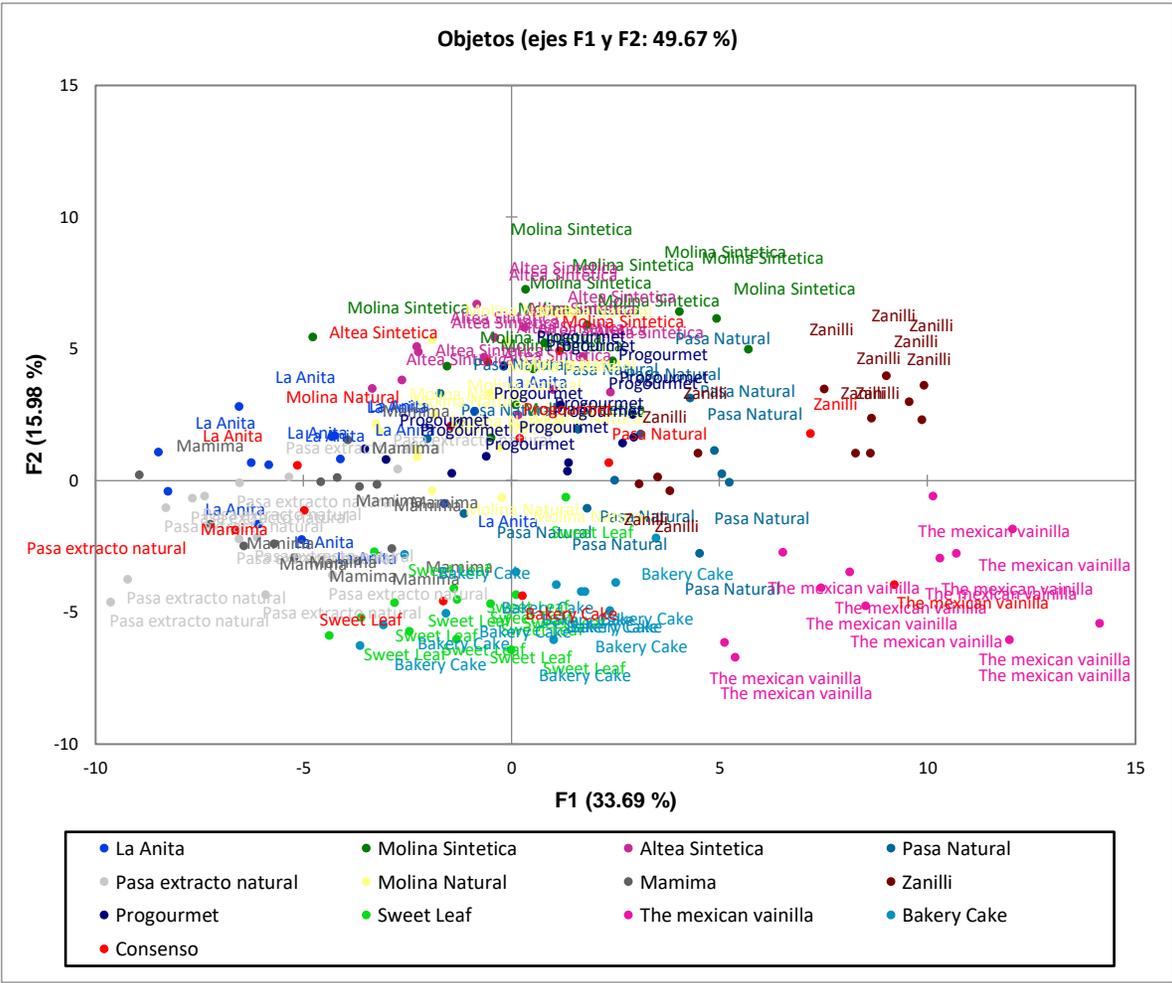
Tabla 13. Atributos descartados para realizar la prueba descriptiva de Perfil Flash.

Olor	Sabor	Resabio	Aspecto	Textura
clavo	platano	acido	mantequilla	suave
ron	big cola	hierbabuena	puntos blancos	resinosa
vinagre	melaza		rojizo	
	menta		turbio	
	helado de vainilla			

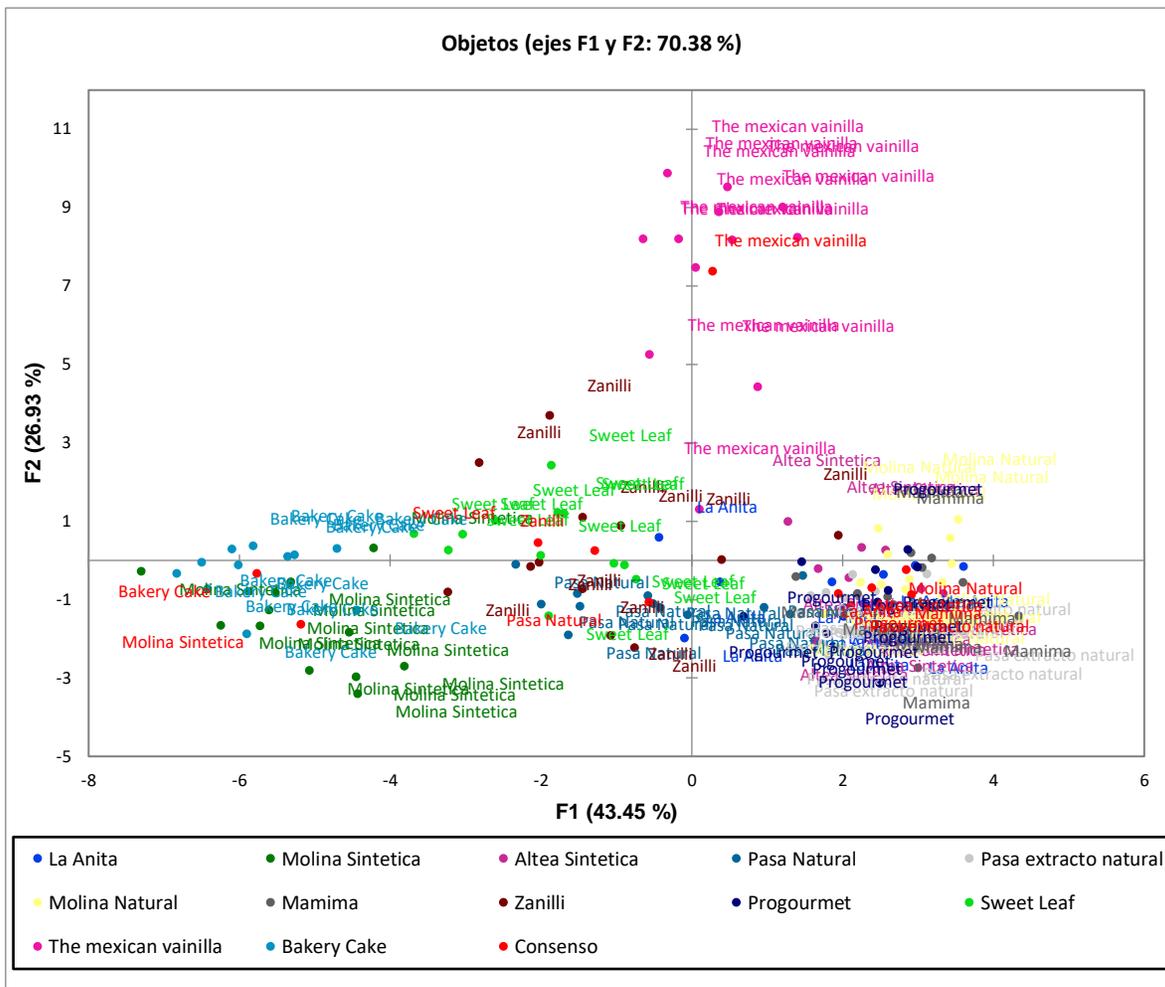
8.2 Perfil sensorial de los extractos de vainilla comerciales

Para la prueba sensorial de Perfil Flash de las muestras comerciales de extractos de vainilla (naturales y artificiales), se emplearon los 26 atributos seleccionados a los cuales se les asignaron valores de acuerdo con la escala estructurada de 9 puntos utilizada, donde el valor 1 no representa presencia del atributo y el valor 9 el atributo es percibido con la máxima intensidad.

La elaboración de Perfil Flash modificada con jueces entrenados es un método adecuado en el proceso de desarrollo de alimentos (Väkeväinen et al., 2020). La fiabilidad del Perfil Flash como herramienta para obtener el perfil sensorial de las muestras comerciales de “extractos naturales” y “saborizantes sintéticos” se estimó por consenso del panel y variaciones residuales. El consenso del panel para los atributos de sabor olor y resabio se visualiza en la Gráfica 3 y los correspondientes a los atributos de aspecto y textura en la Gráfica 4.



Gráfica 3. Diagrama del consenso del total de panelistas del Perfil Flash para los atributos de sabor, olor y resabio.



Gráfica 4. Diagrama del consenso del total de panelistas del Perfil Flash para los atributos de textura y aspecto.

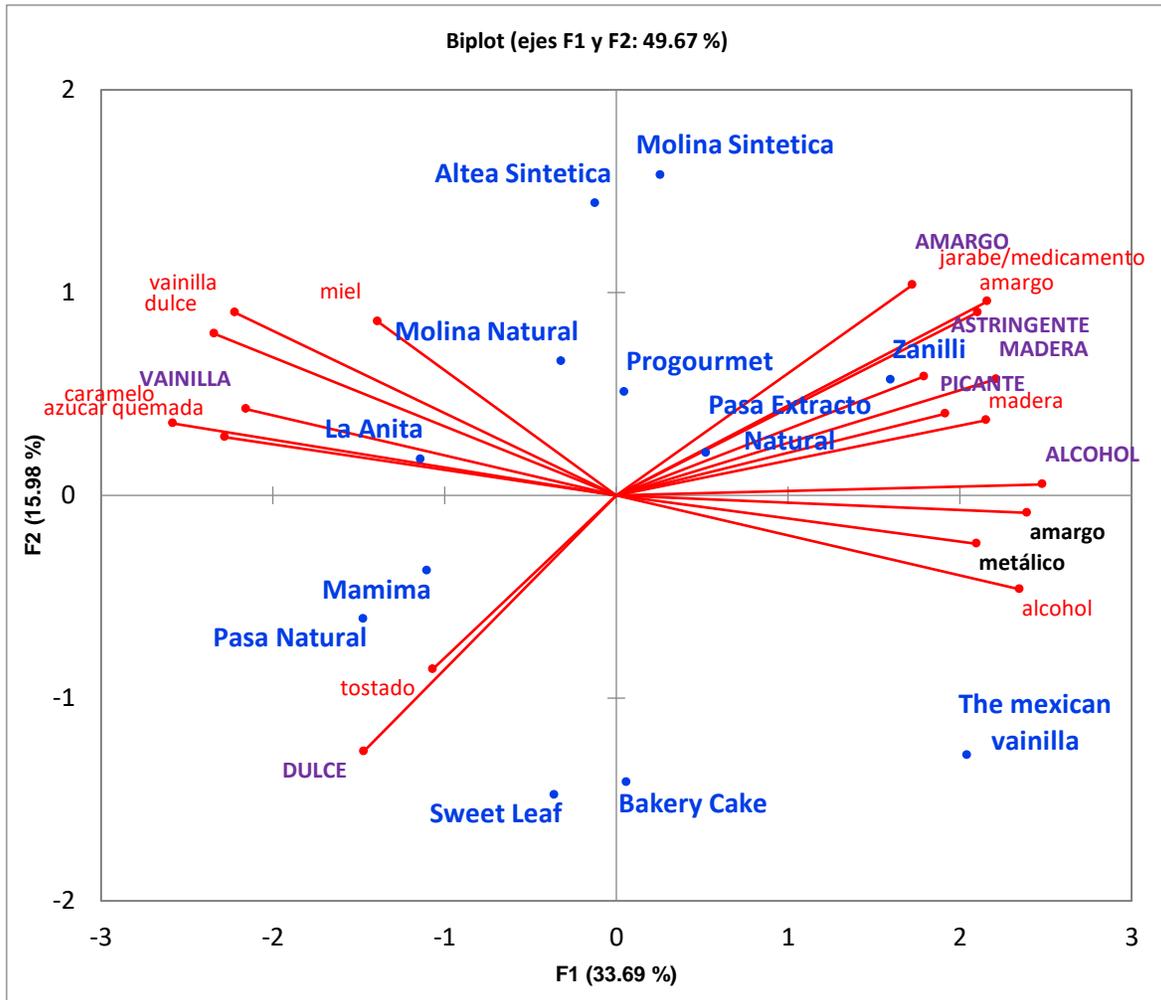
Aunque los panelistas no fueron entrenados específicamente para extractos de vainilla, sí estaban entrenados para evaluar otros productos alimenticios. Un buen consenso del panel de jueces como los que se observan en las Gráficas 3 y 4 justificaron el uso de esta prueba.

En la Gráfica 5 se muestran resaltados en color violeta los atributos de sabor, en negro los correspondientes al resabio, en rojo a los que corresponden al olor, y en color azul el nombre de las muestras comerciales evaluadas.

La Gráfica 5 muestra la representación gráfica de los resultados del ACP (Análisis de Componentes Principales) en el que se visualizan el posicionamiento sensorial de los atributos de sabor, olor y el resabio de 12 muestras comerciales evaluadas: *Zanilli*[®], *The mexican vainilla*[®], *Pro-Gourmet*[®], *Mamima*[®], *La Anita*[®], *Molina sintética*[®], *Molina natural*[®], *Pasa natural*[®], *Altea sintética*[®], *Pasa extracto natural*[®], *SweetLeaf*[®] y *Bakery cake*[®] (no se evaluó la marca *LOL-TUN*[®] debido a que no se contaba ya con muestra suficiente), donde el componente 1 (F1) explicó el 33.69% de la variabilidad de las muestras y el componente 2 (F2) el 15.98% de la variabilidad, explicando un total de 49.67% de la variabilidad de las muestras.

De manera positiva las muestras de las marcas *Molina Sintética*[®], *Pro-Gourmet*[®], *Pasa Extracto Natural*[®], *Zanilli*[®], *The mexican vainilla*[®] y *Bakery Cake*[®] se encontraron correlacionadas con el componente 1 (F1). Las muestras de las marcas *Zanilli*[®], *Pasa Extracto Natural*[®], *Pro-Gourmet*[®] y *The mexican vainilla*[®] se caracterizaron por presentar los atributos de olor de jarabe/medicamento, madera, amargo y alcohólico; las mismas muestras se caracterizaron por tener un sabor amargo, astringente, picante, a alcohol y a madera, así como las características de resabio amargo y metálico principalmente resalta estos atributos en la muestra comercial *The mexican vainilla*[®].

En el caso de las marcas *Altea*[®], *Molina natural*[®], *Mamima*[®], *La Anita*[®], *Pasa Natural*[®] y *Sweetleaf*[®] estas se correlacionaron de manera negativa con el componente 1 (F1). El grupo de muestras formadas por las marcas *Mamima*[®], *Pasa extracto Natural*[®], *SweetLeaf*[®] y *Bakey Cake*[®] están caracterizadas por un olor a tostado y un sabor dulce. Grupo de muestras conformado por las muestras *Altea*[®], *Molina*[®] y *La Anita*[®] se caracterizan por un olor a miel, caramelo, azúcar quemada, dulce y a vainilla y con sabor a vainilla.



Gráfica 5. ACP de olor, sabor y resabio de 12 muestras comerciales de "extractos y saborizantes naturales y artificiales" de vainilla.

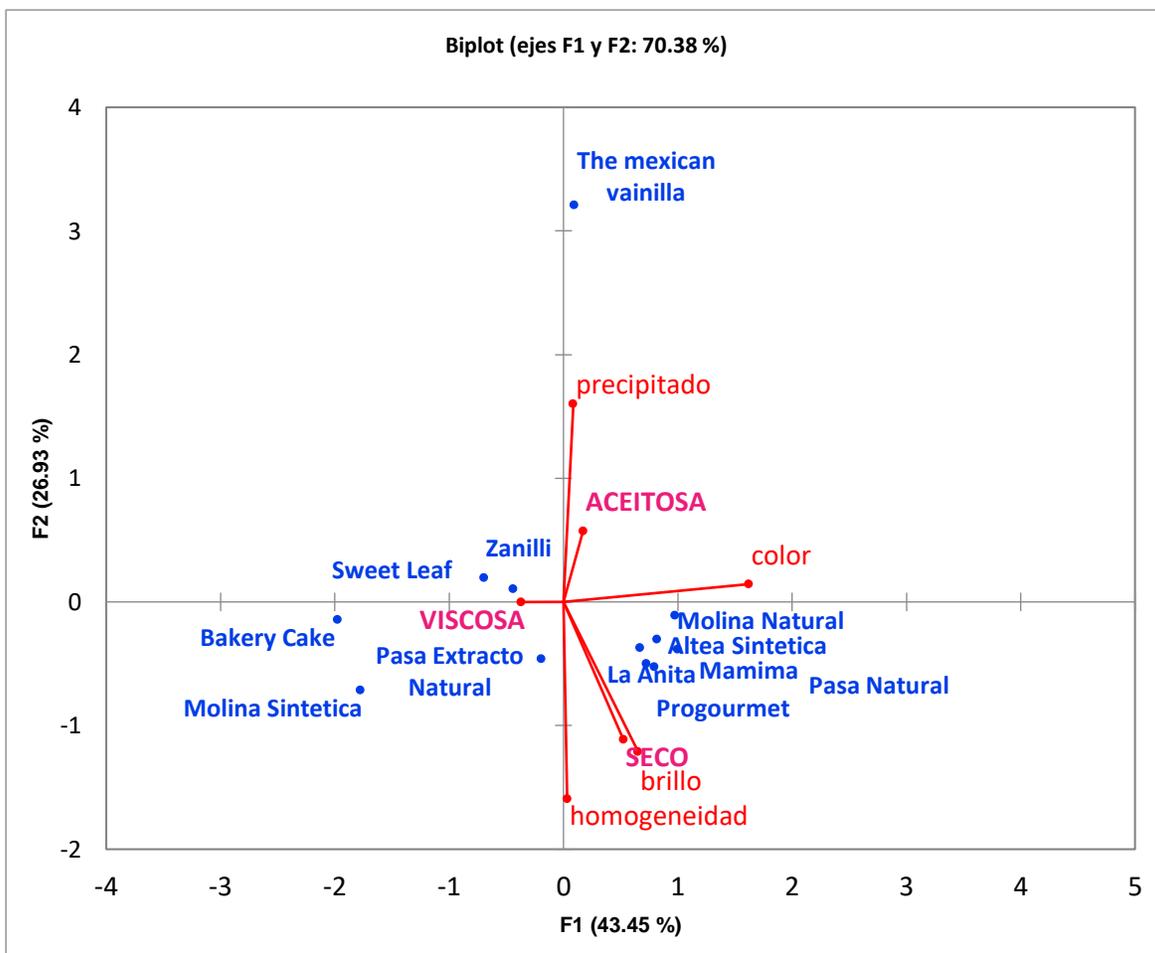
En la gráfica 6 se muestran resaltados en color rojo los atributos de aspecto, en rosa los correspondientes a la textura y en color azul el nombre de las muestras comerciales evaluadas.

En la gráfica 6 se muestra la representación gráfica de los resultados del ACP (Análisis de Componentes Principales) en el que se visualizan el posicionamiento sensorial de los atributos de textura y la apariencia de 12 muestras comerciales: *Zanilli*[®], *The mexican vainilla*[®], *Pro-Gourmet*[®],

Mamima[®], *La Anita*[®], *Molina sintética*[®], *Molina natural*[®], *Pasa natural*[®], *Altea sintética*[®], *Pasa extracto natural*[®], *SweetLeaf*[®] y *Bakery cake*[®] (no se evaluó la marca *LOL-TUN*[®] debido a que no se contaba ya con muestra suficiente), donde el componente 1 (F1) explicó el 43.45% de la variabilidad de las muestras, y el componente 2 (F2) el 26.93%, explicando entre ambos componentes el 70.38% de la variabilidad total.

De manera positiva, para las muestras *Molina Natural*[®], *Altea*[®], *Pasa Natural*[®], *Mamima*[®], *La Anita*[®], *The mexican vainilla*[®] y *Pro-Gourmet*[®] se encontraron correlación con el componente 1 (F1). Este grupo de muestras se caracteriza por presentar un aspecto brillante, homogéneo y con una presencia de color fuerte (diferente a una muestra traslúcida), mismas muestras se caracterizan por tener una textura denominada seca. En el caso de la muestra *The mexican vainilla*[®] ésta presenta un aspecto de precipitado con una presencia de color fuerte y una textura aceitosa.

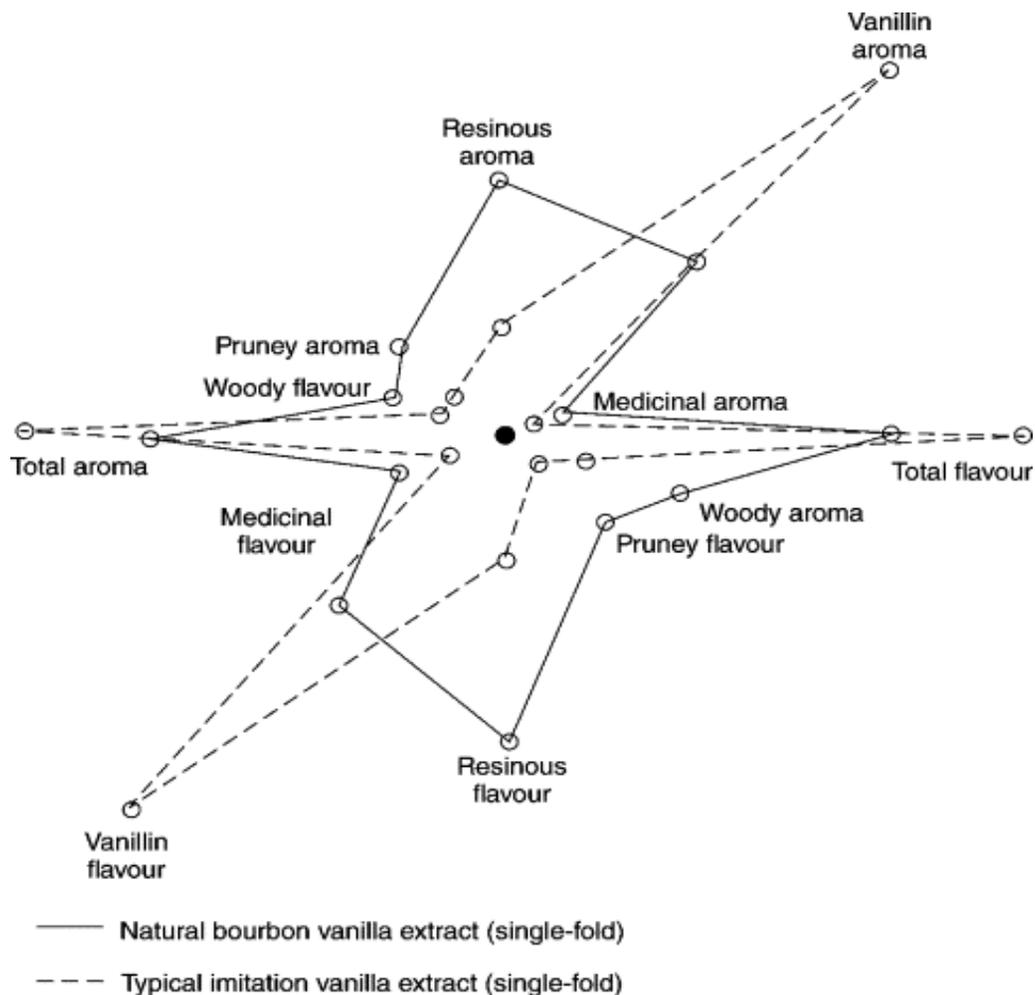
En el caso del grupo de muestras conformado por las marcas *Zanilli*[®], *Molina sintética*[®], *Bakery Cake*[®], *SweetLeaf*[®] y *Pasa Extracto Natural*[®], estas se correlacionaron de manera negativa con el componente 1 (F1). Este grupo se caracteriza por una textura viscosa. En el caso de las muestras *Bakery Cake*[®] y *Molina Sintética*[®], el atributo de presencia de color relacionado con el aspecto es bajo, además, también presentar los atributos; seco, brillo y homogéneo en menor intensidad que el resto de las muestras. Sin embargo, las muestras que corresponden a las marcas *Zanilli*[®], *SweetLeaf*[®] y *Pasa Extracto Natural*[®] que se encuentran correlacionadas positivamente con el componente 2 (F2) se caracterizan por la presencia baja de color, presencia de precipitado y una textura aceitosa.



Gráfica 6. ACP de aspecto y textura de 12 muestras comerciales de “extractos y saborizantes naturales y artificiales” de vainilla.

De acuerdo a los resultados del ACP (Análisis de Componentes Principales) que caracterizaron a cada una de las 12 muestras comerciales de vainilla evaluados (*Zanilli*[®], *The mexican vainilla*[®], *Pro-Gourmet*[®], *Mamima*[®], *La Anita*[®], *Molina Sintética*[®], *Pasa natural*[®], *Altea sintética*[®], *Pasa extracto natural*[®], *SweetLeaf*[®] y *Bakery Cake*[®]), se pudo observar que ciertas muestras contienen perfiles sensoriales similares, esto hace posible considerar que dichos grupos de muestras contienen la presencia de los mismos componentes químicos, los cuales son los responsables de estas características organolépticas.

Los perfiles sensoriales obtenidos para las muestras de las marcas *Zanilli*[®], *The mexican vainilla*[®], *Pro-Gourment*[®] y *Pasa natural*[®] tienen un comportamiento similar de acuerdo con los perfiles sensoriales de aroma y sabor de extractos de vainilla natural reportados por Gillette y Hoffman (1992) (gráfica 7). En el caso de las muestras de las marcas *Mamima*[®], *La Anita*[®], *Molina sintética*[®], *Molina natural*[®], *Altea sintética*[®], *Pasa extracto natural*[®], *SweetLeaf*[®] y *Bakery cake*[®] tienen un comportamiento similar al perfil sensorial de aroma y sabor de los extractos de vainilla sintética reportados también por Gillette y Hoffman (1992) (Gráfica 7).



Gráfica 7. Perfiles sensoriales de extractos de vainilla natural y sintética
 Fuente: Gillente MH y Hoffman PG 1992. "Food Science and Technology, vol 4".

Lo anterior concuerda con mencionando por De Guzman (2012) sobre que la calidad organoléptica de los extractos de vainilla natural se considera un conjunto de varios atributos relacionados con notas aromáticas y de sabor característicamente leñosas, de ciruela pasa, resinosas, correosas, florales, afrutadas, medicinales y alcohólicas.

Con estos resultados queda demostrado que los extractos comerciales de las marcas *Zanilli*[®], *The mexican vainilla*[®], *Pro-Gourment*[®] y *Pasa natural*[®] son únicamente las que contienen el mismo perfil sensorial que un extracto natural de vainilla. De la misma manera, estas mismas marcas comerciales, exceptuando la marca *Pasa natural*[®], son las mismas que por cromatografía de líquidos (HPLC) resultaron ser productos comerciales de extractos de vainilla 100% naturales. Se puede deducir que la detección de ciertos compuestos presentes en los extractos de vainas de vainilla elaborados en el laboratorio y en las muestras comerciales por HPLC se encuentra estrechamente correlacionada con su perfil sensorial.

Se consideró, entonces, que los componentes químicos presentes de los extractos naturales, identificados y cuantificados por HPLC, y mediante una evaluación sensorial, juegan un papel importante en el perfil de sabor y aroma de los extractos y en una probable elección final del consumidor.

Capítulo 9. Conclusiones

- El método analítico de cromatografía de líquidos de alta eficiencia propuesto permitió identificar y cuantificar los principales componentes de los extractos naturales de vainilla (*Vanilla planifolia*) y determinar la adulteración de algunos extractos mexicanos comerciales.
- Las condiciones instrumentales del método propuesto son adecuadas para la separación y cuantificación de los ocho compuestos objeto de estudio del presente trabajo.
- De los 8 compuestos, el eugenol y la cumarina son los que tienen la menor sensibilidad analítica en este método propuesto.
- El perfil y las concentraciones de los componentes principales de la vainilla natural están conformados por la vainillina, el ácido 4-hidroxibenzoico, el 4-hidroxibenzaldehído y el ácido vainillínico en un porcentaje respectivo de 82, 2, 8 y 6%.
- Se identificaron subproductos de la síntesis orgánica de la vainillina, cumarina, guayacol y eugenol, en muestras comerciales etiquetadas como "extractos naturales" o "saborizantes naturales" en concentraciones superiores a las presentes en los extractos naturales. Asimismo, se identificó el agente adulterante etilvainillina en extractos y saborizantes "naturales".
- Las marcas *The mexican vainillina*®, *Pro-Gourmet*® y *Zanilli*® son las únicas que tienen el mismo perfil de componentes presentes en

la vainilla natural, por lo que cumplen la legislación de etiquetado de la NOM vigente de etiquetado NOM-139-SCFI-2012, NOM-182-SCFI-2011 y NOM-030-SCFI-2006 para productos de vainilla y derivados.

- En las marcas *Molina natural*®, *Mamima*®, *SweetLeaf*®, *Pasa*® y *Bankey Cake*®, las cuales declaran ser extractos y/o saborizantes 100% naturales, se tiene la presencia de etilvainillina, guayacol y eugenol, por lo que son productos que infringen las NOM vigentes de etiquetado, NOM-182-SCFI-2011 y NOM-030-SCFI-2006 para productos de vainilla y derivados.
- Se encontraron diferencias significativas en las características sensoriales entre las marcas comerciales *Mamima*®, *Molina natural*®, *Pasa extracto natural*®, *SweetLeaf*® y *Bakery cake*® y las marcas *Zanilli*®, *The mexican vainilla*®, *Pro-Groument*® y *Pasa natural*® a pesar de que declaran ser “extractos naturales”.
- El perfil sensorial de las marcas *Zanilli*®, *The mexican vainilla*®, *Pro-Groument*® y *Pasa natural*® concuerda con el reportado con los perfiles sensoriales de aroma y sabor de un extracto de vainilla natural reportados por Gillette y Hoffman (1992).
- Fue posible correlacionar la presencia de la vainillina, el ácido 4-hidroxibenzoico, el 4-hidroxibenzaldehído y el ácido vainillínico con el perfil sensorial de las marcas *Zanilli*®, *The mexican vainilla*®, *Pro-Groument*® y *Pasa natural*®, por lo que se considera entonces, que los componentes químicos presentes en extractos naturales juegan un papel importante en su perfil de sabor.

Bibliografía

1. Agilent, Inc. (2011). *The LC Handbook*. USA. Publication number 7595EN. October.
2. Anilkumar, A., (2004). Vanilla cultivation: A profitable agri-based enterprise. *Kerala Calling* 24, 26-30.
3. Albert, A., Varela, A., Salvador, G., Hough, S. Fiszman., (2011). Overcoming the issues in the sensory decription of hot served foof with a complex textura. Aplicacion of QDA®, flash profiling and projective mapping using panels with different degrees of training. *Food Quality and Preference*, 22, 463-473.
4. Bory, S., Grisoni, M., Duval, M-F., Besse, P., (2008). Biodiversity and preservation of vanilla: Present state of knowledge. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55 (4): 551-571. DOI: 10.1007/s10722-007-9260-3.
5. Carmona, R., (2008). Perfil sensorial y círculo aromático del tequila. Tesis de licenciatura Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma De México (UNAM).
6. Carpenter R., David H. Lyon, T., Hasdell, A., (2002). Análisis sensorial en el desarrollo y control de calidad de alimentos. Zaragoza: Acribia.
7. Cid-Pérez, T., López, A., (2011). Extractos de vainilla: una mezcla de componentes químicos de aroma y sabor. En: T., Cid-Pérez, A., López

- eds. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos. México: Noriega, 5. 51-63
8. Consejo Veracruzano de la Vainilla., (2006). (eds) Actas del congreso Internacional de productores de Vainilla, Papantla Veracruz, mayo de (2006).
 9. Consuelo, S., (1988). Del herbario, Revista de cultura científica de difusión Facultad de Ciencia. Universidad Nacional Autónoma De México. (13), 51.
 10. Chenatu V., (2010) Totonacas. En: Florescano, E y Ortiz Escamilla. Atlas del patrimonio natural, histórico y cultural de Veracruz. Tomo III. Patrimonio cultural. Veracruz: Limusa, 2.
 11. Cortez, M., (2011). Identificación de alimentos adulterados mediante espectroscopia de infrarrojo. Revista Fuente, año 3 (6), 5, 6.
 12. Dairou, V. & Sieffermann J.M., (2002). A comparison of 14 jams characterized by conventional profile and a quick original method, the Flash Profile. Journal of Food Science, 67(2): 826–834. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2002.tb10685.x
 13. Damásio, M., (1999). Análisis descriptivo: Metodología de perfil libre versus metodologías tradicionales. Avances en análisis sensorial. CYTED, En; M. Damásio., Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, Sao Paulo, Brasil: Vareala, 35-48.
 14. De Guzman, R., Zara, K., (2012), Handbook of herbs and spices (second edition), Woodhead Publishing Ltd, UK, 547-589.

15. Dignum, M. J. W., Kerler, J., & Verpoorte, R., (2007). Vanilla production: Technological, chemical, and biosynthetic aspects. *Food Reviews International*, 17(2), 119-120. DOI: 10.1081/FRI-100000269
16. DOF., (2011). NORMA Oficial Mexicana NOM-182-SCFI-2011, Vainilla de Papantla, extractos y derivados-Especificaciones, información comercial y métodos de ensayo (prueba). México
17. DOF., (2012). NORMA Oficial Mexicana NOM-139-SCFI-2012, Información comercial-Etiquetado de extracto natural de vainilla (*Vanilla spp*), derivados y sustitutos. México
18. Ecott, T., (2004). Vanilla travels. En: T., Ecott. Search of the luscious substance. Inglaterra: Penguin Group.
19. EFSA., (2008). Scientific opinión of the panel on food additives, flavourings, processing aids and material sincontact with food on a request from the European Commission on coumarinin flavourings and other food ingredients with flavouring properties. questionNo.EFSA-Q-2008-677, *EFSA J.*, 793. 1-15.
20. Faith et al., W.L. Faith, D.B. Keyes, R.L. Clark., (1957). Vanillin, *Industrial Chemicals Wiley*, New York. 787-93
21. FAO., (2009). Vainilla: post-harvest operations. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Internet http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/inpho/docs/Post_Harvest_Compendium_-_Vanilla.pdf.

22. FAOSTAT, Vanilla producer prices statistics, 2014-2016 period, 2016. (<http://www.fao.org/faostat/en/#data/PP>).
23. García, A., (2007). Desarrollo de la metodología de evaluación de procesos olfativos, Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma De México (UNAM).
24. Gigant, R., S. Bory, M. Grisoni, y P. Besse., (2011). Biodiversity and evolution in the Vanilla genus. En: O. Grillo, y G. Venora, editores, The dynamical processes of biodiversity., Case studies of evolution and spatial distribution. InTech, FR. 1-26.
25. Gillette, M.H., Hoffman, P.G., (1992). Vanilla extract En: Hui, Y.H. Ed., Encyclopedia of Food Science and Technology, New York, 4, 2641-2657.
26. González, F. (1999). Monocotiledóneas y dicotiledóneas: Un sistema de clasificación que acaba con el siglo. Revista Académica Colombiana de Ciencias, 23(87), 195-204.
27. Gower, J. C., (1975). Generalized Procrustes Analysis. Psychometrika, 40, 33-51.
28. Gutiérrez, H., De La Vara, R., (2013). Elementos de inferencia estadística: experimentos con uno y dos tratamientos, Experimentos con un solo factor (análisis de varianza). En: H, Gutiérrez, R, De La Vara., Análisis y diseño de experimentos. México: Mc Graw Hill, 23, 24 y 25.

29. Harris, D., (2013). Introducción a las separaciones analíticas, Cromatografía de gases y Cromatografía de líquidos de alta eficiencia. En: D. Harris ed. Análisis cuantitativo. Barcelona: Reverté, 23, 24 y 25.
30. Havkin-Frenkel, D. & Belanger, F., (2007). Biotechnological production of vainillin. In: Havkin-Frenkel, D. & Belanger, F. eds. Biotechnology in flavor producción Blackweel Publishisng Ltd. Iowa, Estados Unidos Pp. 83-103.
31. Herrmann A., Stockli M., (1982). Rapid control of vanilla-containing products using highperformance liquid chromatography, Journal Chromatogr., 246: 313-16.
32. Hernández-Hernández, J., (2011). Mexican Vanilla Production. En: Havkin-Freenkel, D. & Belanger, F., eds. Handbook of vanilla science and technology. Wiley-Publishing Co. West Sussex. 3-25.
33. Herrera-Cabrera, B. E., Salazar-Rojas, V. M., Delgado-Alvarado, A: Campos-Contreras, J., Cervantes-Vargas, J., (2012). Use and conservation of Vanilla planifolia J. in the Totonacapan Region, México. European Journal of Environmental Sciences, 2(1), 43-50. DOI: 10.14712/23361964.2015.37.
34. Hough, G. y Fisman, S., (2005). Estimación de la vida útil sensorial de los alimentos. CYTED, España, 18-23.
35. Huesgen, A., (2011). Analysis of natural and artificial vanilla preparations. Agilent Technologies, Inc. Estados Unidos.

36. Ibañez, F. y Barcina Y., (2001). Análisis sensorial de los alimentos, métodos y aplicaciones. En: Taylor & Francis. Análisis sensorial de los alimentos, métodos y aplicaciones. España 180. 2-6.
37. IFT., (1975). Institute of food technologist, Minutes of Sensory Evaluation Division Bussines Meeting at 35th Annual Meeting, Institute of food technolgists, Chicago.
38. IUPAC., International Union Pure and Applied Chemistry., (1995). Nomenclatura para cromatografía, Primera edición. España.
39. De Jager, L., S., Perfetti, G., A., & Diachenko, G. W., (2007). Determination of coumarin, vanillin and ethyl vanillin in vanilla extract products: liquid chromatography mass spectrometry method development and validation studies. Journal of Chromatography A, 1145(1-2), 83-88. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.01.039.
40. Jagerdeo et al., (2000). "Liquid Chromatographic Determination of Vanillin and Related Aromatic Compounds,": Journal of AOAC international. 83, 1.
41. Lamprecht, F. Pichlmayer, E. Schmid J., (1994). Determination of the Authenticity of Vanilla Extracts by Stable Isotope Ratio Analysis and Component Analysis by HPLC. Agric. Food Chem., 42, 1722.
42. Lubinsky, P., Bory, S., Hernández-Hernández, J., Seung-Chul, K., & Gómez-Pompa, A., (2008). Origins and Dispersal of Cultivated Vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. [Orchidaceae]). Economic Botany, 62(2),127–138. DOI: 10.1007/s12231-008-9014-y

43. Mangufás, E., (2007). Evaluación Sensorial de los Alimentos. La Habana: Universitaria.
44. McNair, H. y Miller J., 1997. *Basic Gas Chromatography*. New York. Wiley.
45. Montgomery, D., 2004. *Experimentos comparativos simples, Experimentos de un solo factor: el análisis de varianza*. En: D. Montgomery ed. Diseño y análisis de experimentos. México: Limusa, 2 y 3.
46. Moreno-Ley, C., Hernández-Martínez, D., Osorio-Revilla, G., Tapia-Ochoategui, A. P., Dávila-Ortiz, G., & Gallardo-Velázquez, T., (2019). Prediction of coumarina an ethyl vanillin in pure vanilla extracts using MID-FTIR spectroscopy and chemometrics. *Talanta*, 197, 264-269. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.01.033.
47. Moussaoui, K., Varela, P., (2010). Exploring consumer product profiling techniques and their linkage to a quantitative descriptive analysis. *Food Quality and Preference*, 21 (8), 1088-1099.
48. Odoux E., (2011). Vanilla curing. Medicinal and aromatic plants. Industrial profiles. Vanilla Ed. Odoux E. and Grisoni M. Florida. 173.
49. Paniagua, A & Azofeifa, B., (2014). Importancia de vainilla spp. Boletín Informativo N°6 Aprovainilla, Costa Rica. Página electrónica consultada:
http://media.wix.com/udg/c42f76_00caf6ddec824283bed5df4ddcdacda3.pdf. Consultada el 30 de octubre de 2019.

50. Perez-Silva, E. Odoux, P. Brat, F. Ribeyre, G. Rodriguez-Jimenes, V. Robles-Olvera, M.A. Garcia-Alvarado, Z., 2006. Günata GC-MS and GC-olfactometry analysis of aroma compounds in a representative organic aroma extract from cured vanilla (*Vanilla planifolia* G. Jackson) beans. *Food Chem.*, 99, 728-735.
51. Peña-Alvarez, A., Cervera-Flores, E & Labastida-Rubio, C., (2017). *Ejercicios de Análisis Cuantitativo para Cromatografía Gases y Líquidos*. Ciudad de México, Coyoacán: Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).
52. Ranadive, A. J., (1922). Vanillin and Related Flavor Compounds in Vanilla Extracts Made from Beans of Various Global Origins. *Agric. Food Chem.*, 40, 1992-1924.
53. Rao, S. & Ravishankar, G., (2000). Vanilla flavor by conventional and biotechnological routes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80 (3): 289-304.
54. Rhodia. S., (2014). Los procesos sintéticos hacia la vainillina. *Food Ingredients. Brasil*. (Nº 3), 81-84.
55. Rosengarten, F., (1969). *Rosengarten The Book of Spices* Livingston, Wynnewood. PA.
56. Rubinson, K., Rubinson, J., (2001). Introducción general a las separaciones y a la cromatografía, *Cromatografía líquida, Cromatografía de gases y cromatografía de fluidos supercríticos*. En:

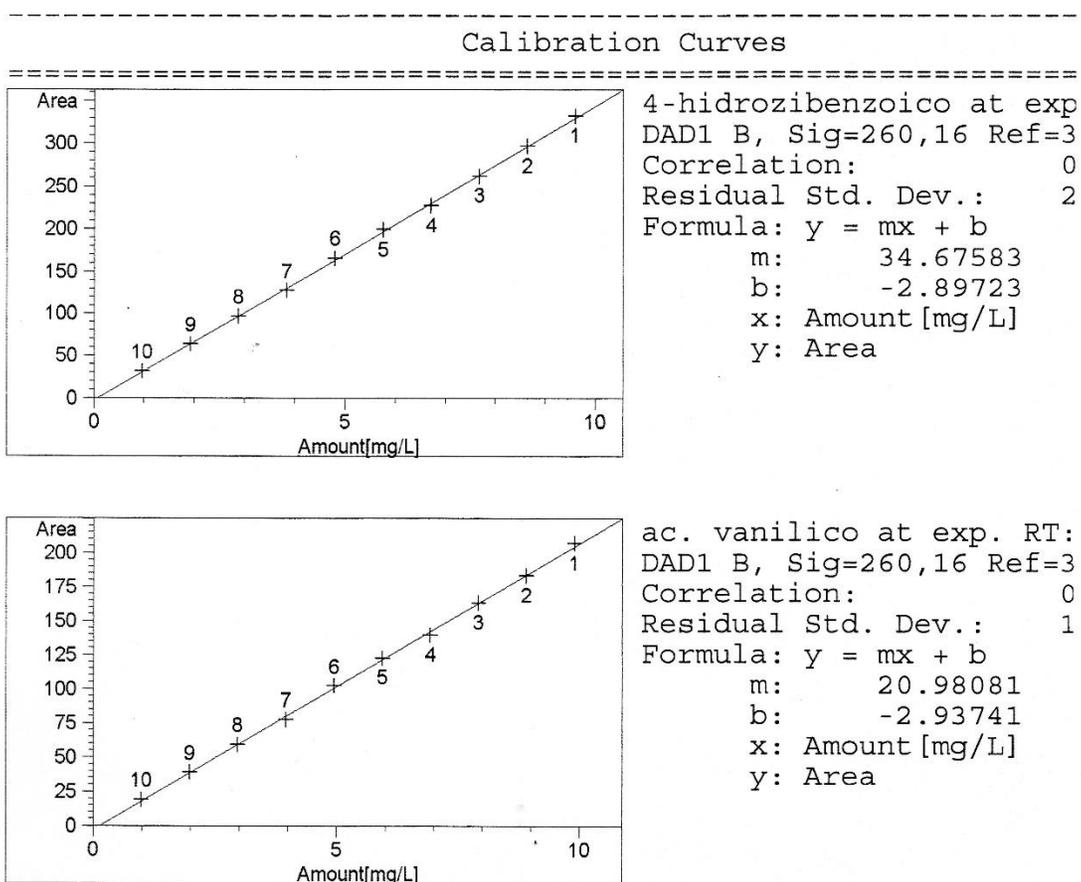
- K, Rubinson, J, Rubinson ed. Análisis instrumental. Madrid: Pearson educación, 13, 14 y 15.
57. Ruiz-Terán, F., Pérez-Amador, I., & López-Munguía, A., (2001). Enzymatic extraction and transformation of glucovanillin from vanilla green pods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5207-5209. DOI: 10.1021/jf010723h.
58. SAGARPA., (2010). Secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación. Estudio de oportunidades de mercado internacional para la vainilla mexicana. Consultado: el 30 de octubre 2019. En: http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios_pro_mercado/VAINILLA.pdf.
59. SHCP., (2014). Secretaria de Hacienda y Crédito Público. Panorama de la Vainilla. [http://www.financierarural.gob.mx/informacionseconomicas/Panoramas/Panorama%20Vainilla%20\(jul%202014\).pdf](http://www.financierarural.gob.mx/informacionseconomicas/Panoramas/Panorama%20Vainilla%20(jul%202014).pdf) Verificado en 14/09/2015.
60. Severiano-Pérez, P., Gómez, D., Méndez, C., Pedro, D., Gómez, C., Ríos, S., Escamilla, A., Utrera, M., (2016). Manual de Evaluación sensorial. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. México: Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).
61. Sinha, A., Verma, S. C., & Sharma, U. K., (2007). Development and validation of an RP-HPLC method for quantitative determination of vanillin and related phenolic compounds in *Vanilla planifolia*. *Journal of Separation Science*, 30(1), 15-20. DOI: 10.1002/jssc.200600193.

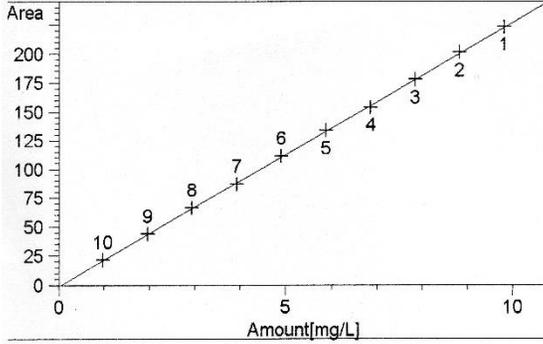
62. Sinha, K., Sharma, K. & Sharma N., (2008). A comprehensive review on vanilla flavor: Extraction, isolation and quantification of vanillin and others constituents. *International Journal of food Sciences and Nutrition*, 59 (4), 299-326.
63. Snyder. L., 2010. *Introduction to modern liquid chromatography*. 3^{era} Edición. New Jersey. Wiley.
64. Soto-Arenas, M., (2003). Vanilla. En: Pridgeon, AM; Cribb, PJ; Chase, MW; Rasmussen, FN. eds. *Genera Orchidacearum*, Vol. 3, Orchidoideae (Part 2) Vanilloideae, New York, US: Oxford University Press, 402.
65. Stone, H., Sidel, J. L., (2004). *Sensory Evaluation Practices*. Food Science and technology international series, 3^a Ed. Academic Press Inc. Academic Press Inc.
66. Tanaka, N., Goodell, H., & Karger, B.L., (1978) *Journal Chromatogr.* 158, 233–248.
67. Varela, p. y Ares, G., (2012). Sensory profiling, the blurred line between sensory and consumer science. A review of novel methods for producto characterization. *Food Research International*, 48: 893-908.
68. Väkeväinen, K., Hernández, J., Simontaival, A., Severiano-Pérez, P., Díaz-Ruiz, G., (2020). Effect of different starter cultures on the sensory properties and microbiological quality of Atole agrio, a fermented maize producto. *Food Control* 109, 1-7.

69. Vogelgesang, J. & Hädrich J., (1998). Limits of detection, identification and determination: a statistical approach for practitioners. *Accred Qual Assur.* 3, 242-255.
70. Williams, A. A., & Langron, S. P., (1984). The use of free-choice profiling for the evaluation of commercial ports. *Journal of Science of Food Agriculture*, 35, 558-568. DOI: 10.1002/jsfa.2740350513.

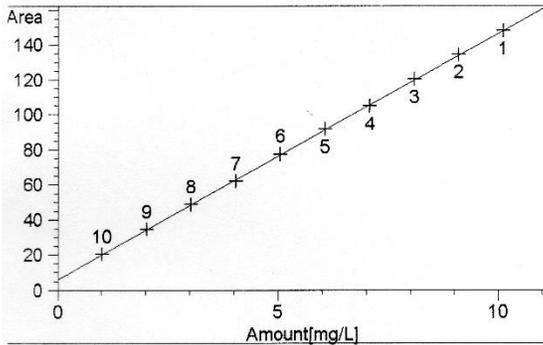
Anexo A

Curvas de calibración para la determinación y cuantificación por la técnica de patrón externo de los 8 compuestos utilizados; Vainillina, Ácido 4-hidroxibenzoico, 4-hidroxibenzaldehido, Ácido vainillínico, Cumarina, Guayacol, Eugenol y Etilvainillina.

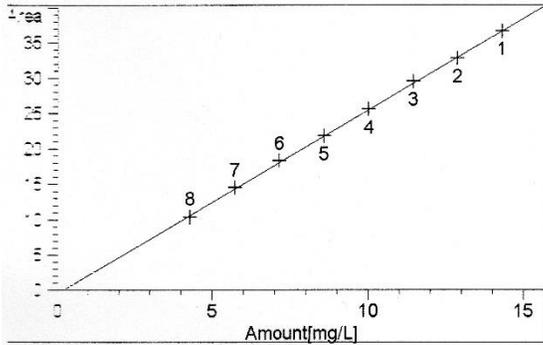




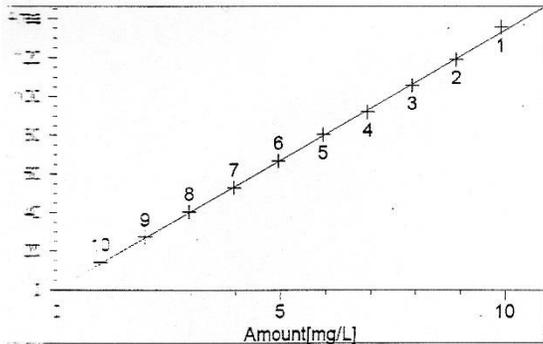
4-hidroxibenzaldehido at exp. RT:
 DAD1 B, Sig=260,16 Ref=360,100
 Correlation: 0.99992
 Residual Std. Dev.: 0.89692
 Formula: $y = mx + b$
 m: 22.85054
 b: -1.17552
 x: Amount [mg/L]
 y: Area



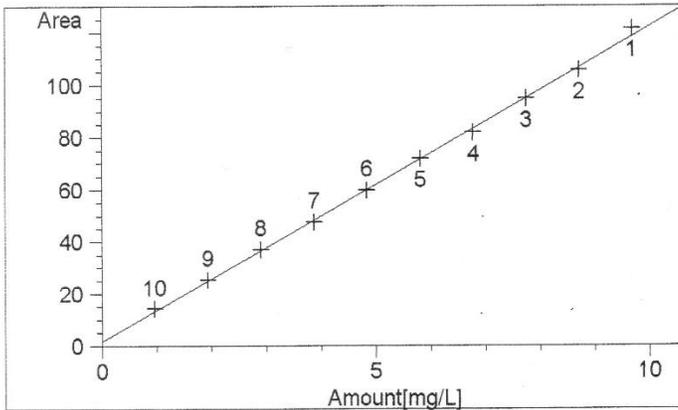
vainillina at exp. RT: 7.545
 DAD1 A, Sig=280,100 Ref=360,100
 Correlation: 0.99993
 Residual Std. Dev.: 0.55476
 Formula: $y = mx + b$
 m: 14.10204
 b: 5.84552
 x: Amount [mg/L]
 y: Area



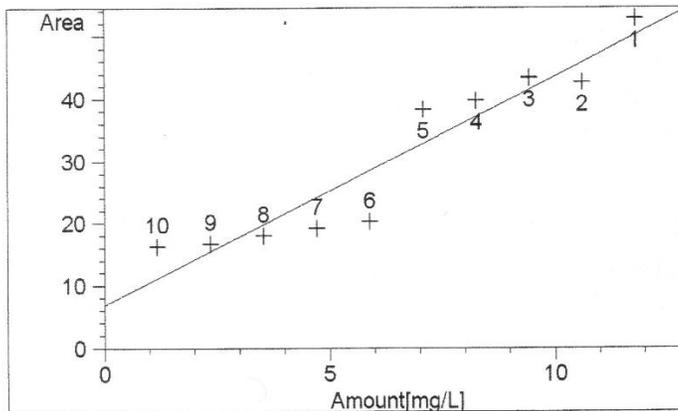
guayacol at exp. RT: 8.470
 DAD1 B, Sig=260,16 Ref=360,100
 Correlation: 0.99981
 Residual Std. Dev.: 0.18993
 Formula: $y = mx + b$
 m: 2.60401
 b: -5.23730e-1
 x: Amount [mg/L]
 y: Area



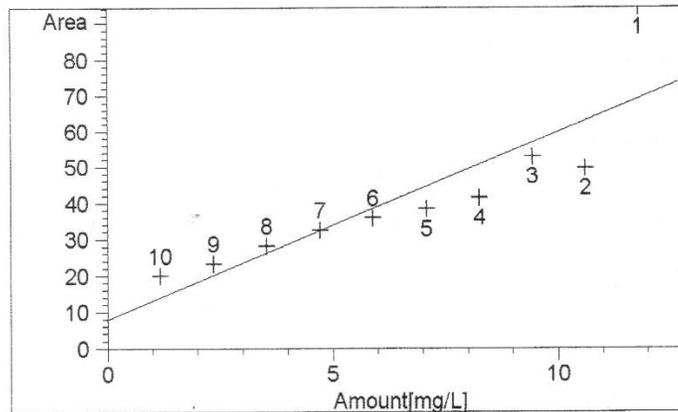
etil-vainillina at exp. RT: 9.003
 DAD1 A, Sig=280,100 Ref=360,100
 Correlation: 0.99967
 Residual Std. Dev.: 1.09668
 Formula: $y = mx + b$
 m: 13.38883
 b: 4.06733e-1
 x: Amount [mg/L]
 y: Area



cumarina at exp. RT:
 DAD1 A, Sig=280,100
 Correlation:
 Residual Std. Dev.:
 Formula: $y = mx + b$
 m: 12.0445
 b: 1.7164
 x: Amount [mg/L]
 y: Area



eugenol at exp. RT:
 DAD1 B, Sig=260,16 F
 Correlation:
 Residual Std. Dev.:
 Formula: $y = mx + b$
 m: 3.6728
 b: 6.8416
 x: Amount [mg/L]
 y: Area



eugenol at exp. RT:
 DAD1 A, Sig=280,100
 Correlation:
 Residual Std. Dev.:
 Formula: $y = mx + b$
 m: 5.1790
 b: 7.9940
 x: Amount [mg/L]
 y: Area

Anexo B

Método de mínimos cuadrados

Si existe una relación lineal entre la señal analítica (y) y la concentración del analito (x), la "mejor" línea recta que pasa a través de los puntos de la gráfica de calibración se calcula por el método de los mínimos cuadrados.

Cada uno de los puntos de la gráfica está sujeto a un error experimental. El método de mínimos cuadrados supone que todos los errores se encuentran en y, lo que provoca que haya desviaciones en esta dirección entre los puntos experimentales y la recta calculada.

Algunas de estas desviaciones (conocidas como residuos de y) serán positivas y otras negativas, por lo que se intenta minimizar la suma de los cuadrados de los residuos. La recta se calcula basándose en el principio de que "la linealidad debe pasar por el centro de los puntos $(\bar{x}, \bar{y})^n$.

Para la recta:

$$y = A + Bx \quad \text{Ecuación 1}$$

$$B = \frac{\sum_i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \quad \text{Ecuación 2}$$

$$A = \bar{y} - B \bar{x} \quad \text{Ecuación 3}$$

Para calcular los errores aleatorios de los valores de la pendiente y de la ordenada al origen, primero se calcula el valor de $S_{\bar{y}/x}$ (desviación estándar sobre la regresión) con la relación:

$$S_{\bar{y}/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - y_{cal})^2}{n-2}}$$

Ecuación 4

Las desviaciones estándar sobre la pendiente (b) y sobre la ordenada al origen (a) están dadas por:

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

Ecuación 5

$$S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

Ecuación 6

Para estimar si los puntos experimentales se ajustan bien o no a una línea recta, se calcula el coeficiente de correlación momento-producto, r:

$$r = \frac{\sum_i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sqrt{(\sum_i (x_i - \bar{x})^2)(\sum_i (y_i - \bar{y})^2)}}$$

Ecuación 7

Límite de detección (LD) y de cuantificación (LC)

Un análisis químico por cromatografía debe producir resultados con una gran precisión y exactitud sobre la cantidad de un analito que se encuentra presente en una muestra.

El límite de detección es la menor concentración en la cual un analito puede ser determinado, con confianza, de que está presente en una muestra y el cual es significativamente "distinto" del blanco (Harris, 2013; Snyder, 2010).

El límite de cuantificación se considera que es la concentración más pequeña de analito presente en una muestra que puede ser reportado con un valor "cuantitativo" ya que este puede determinarse con una precisión y exactitud aceptable (Harris, 2013; Snyder, 2010).

Para calcular el límite de detección es necesario conocer los intervalos de confianza sobre la recta calculada:

$$y_i = \bar{y} + B(x_i - \bar{x}) \pm tS_{y/x} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(x_i - \bar{x})^2}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Ecuación 8}$$

En donde t es el valor de la "t de student", a dos colas, con un nivel de confianza del 95% con n-2 grados de libertad.

Se calcula primero el valor de y_+ , para $x_i = 0$. Con este valor se calcula el valor correspondiente de x en la recta y_- . Para despejar el valor de x de las ecuaciones de las rectas y_{\pm} se utiliza un término auxiliar:

$$C = \frac{B^2 (t * S_{y/x})^2}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \quad \text{Ecuación 9}$$

por lo que y+

$$x_1 = \bar{x} - \frac{B}{C} (\bar{y} - y_0) - \frac{t S_{y/x}}{C} \sqrt{\left(1 + \frac{1}{n}\right) C + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Ecuación 10}$$

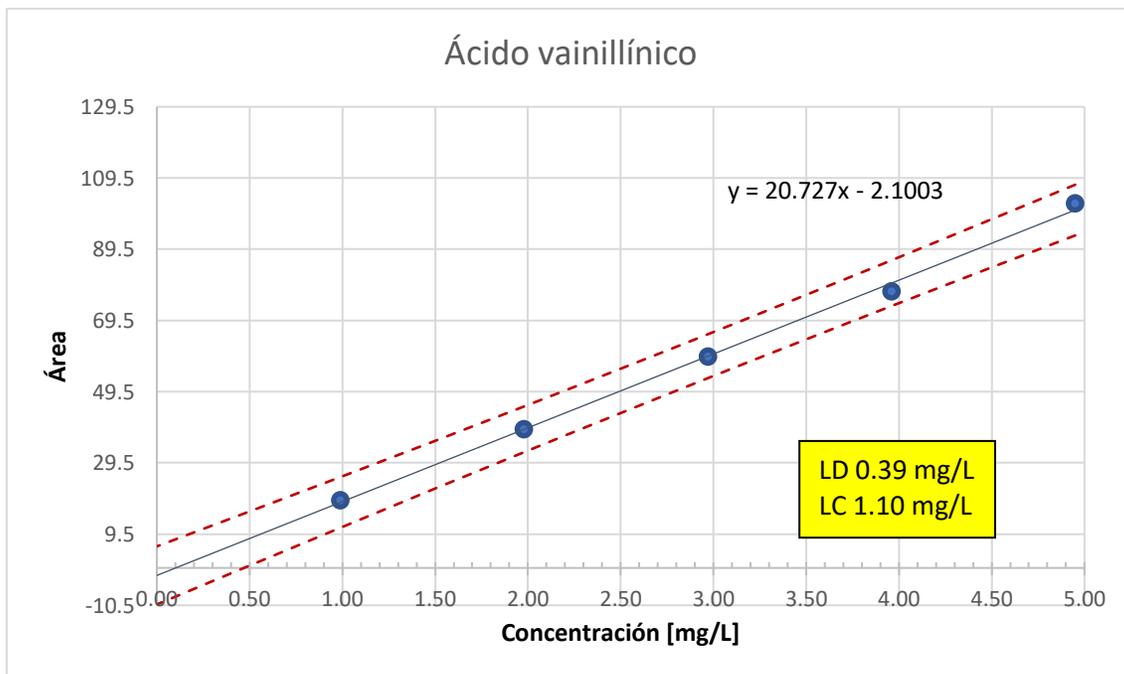
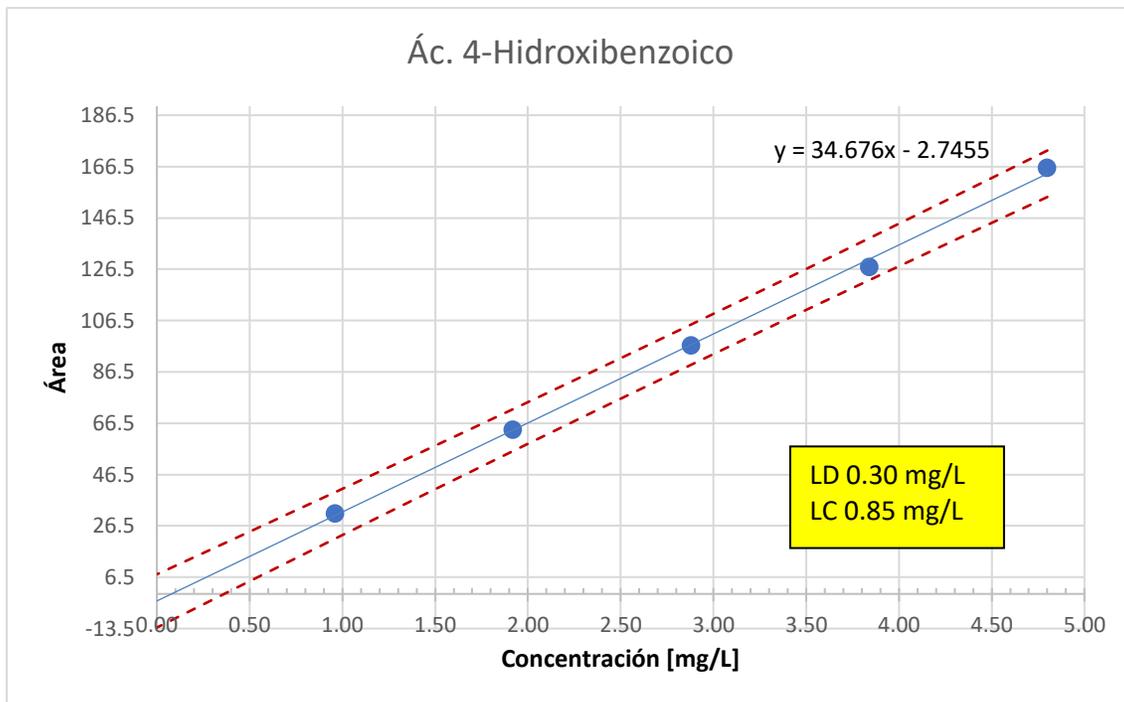
Por lo que y -

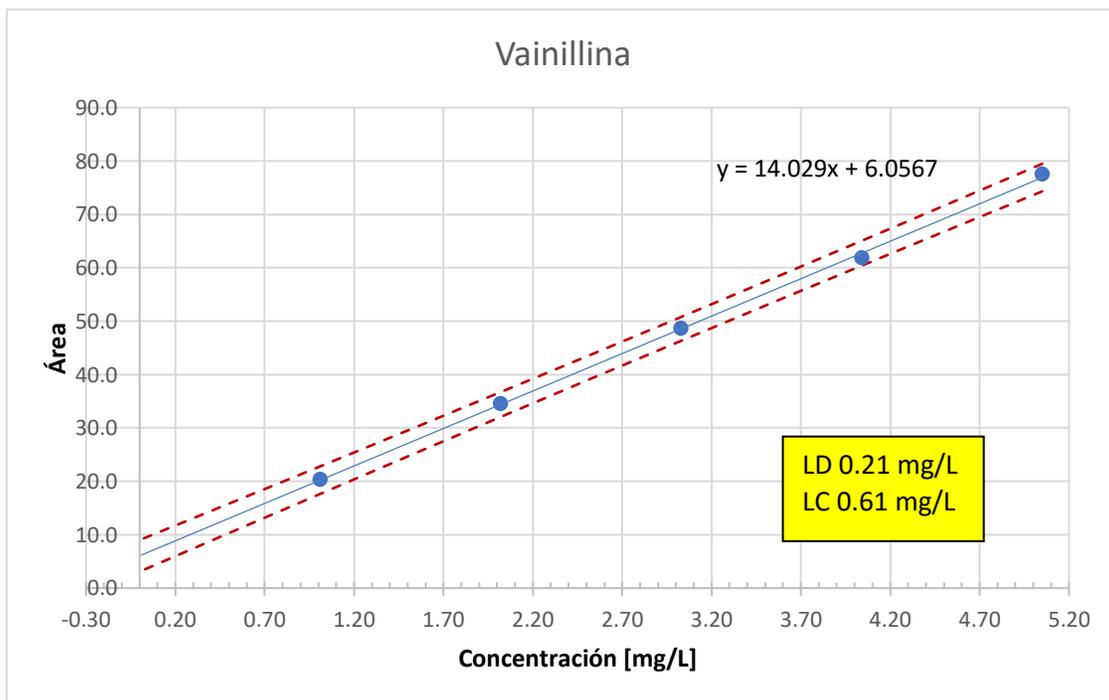
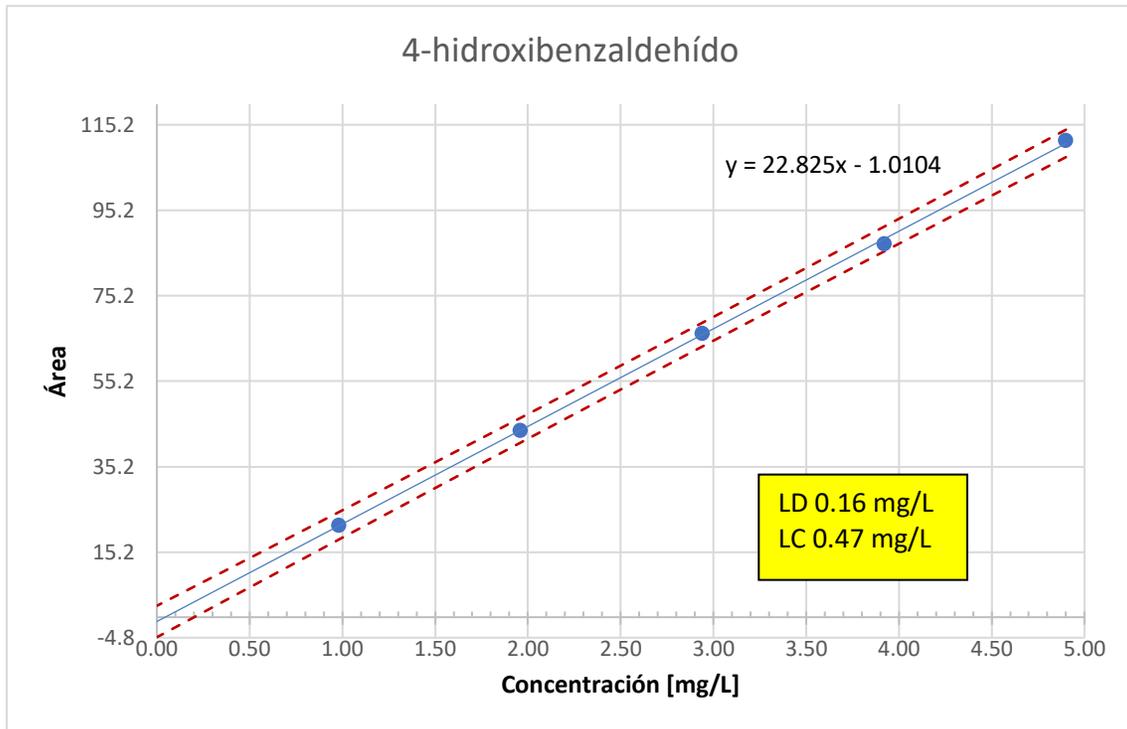
$$x_2 = \bar{x} - \frac{B}{C} (\bar{y} - y_0) + \frac{t S_{y/x}}{C} \sqrt{\left(1 + \frac{1}{n}\right) C + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Ecuación 11}$$

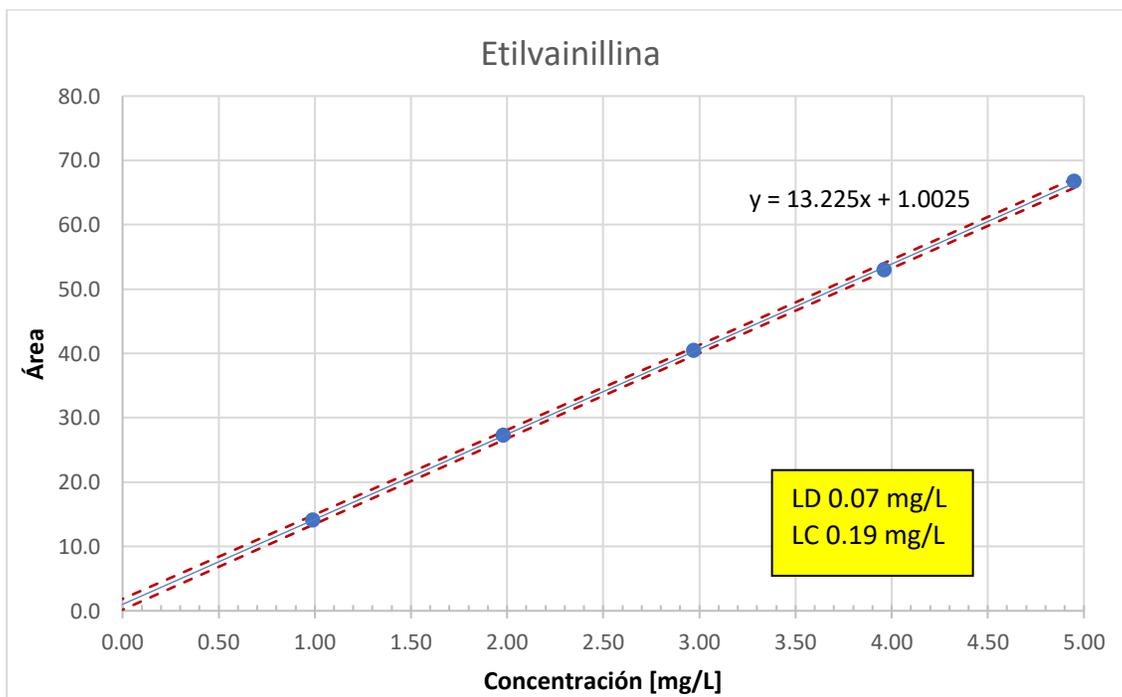
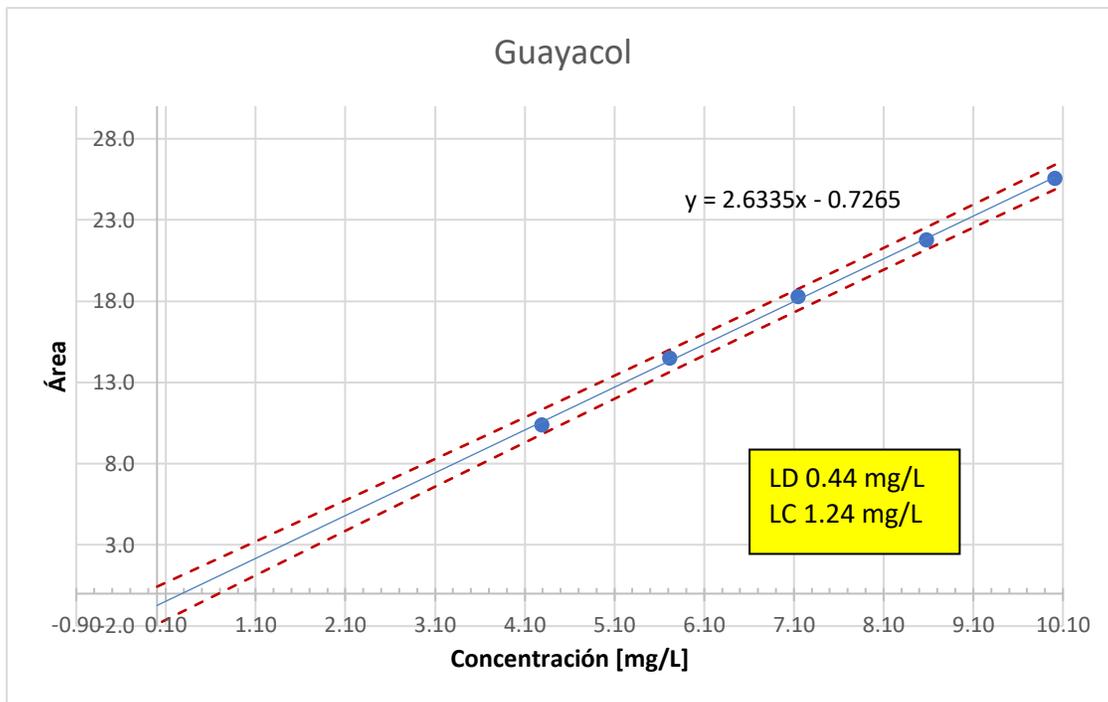
Entonces, el límite de detección se obtiene sustituyendo el valor de y₊ para x = 0 en la ecuación 11.

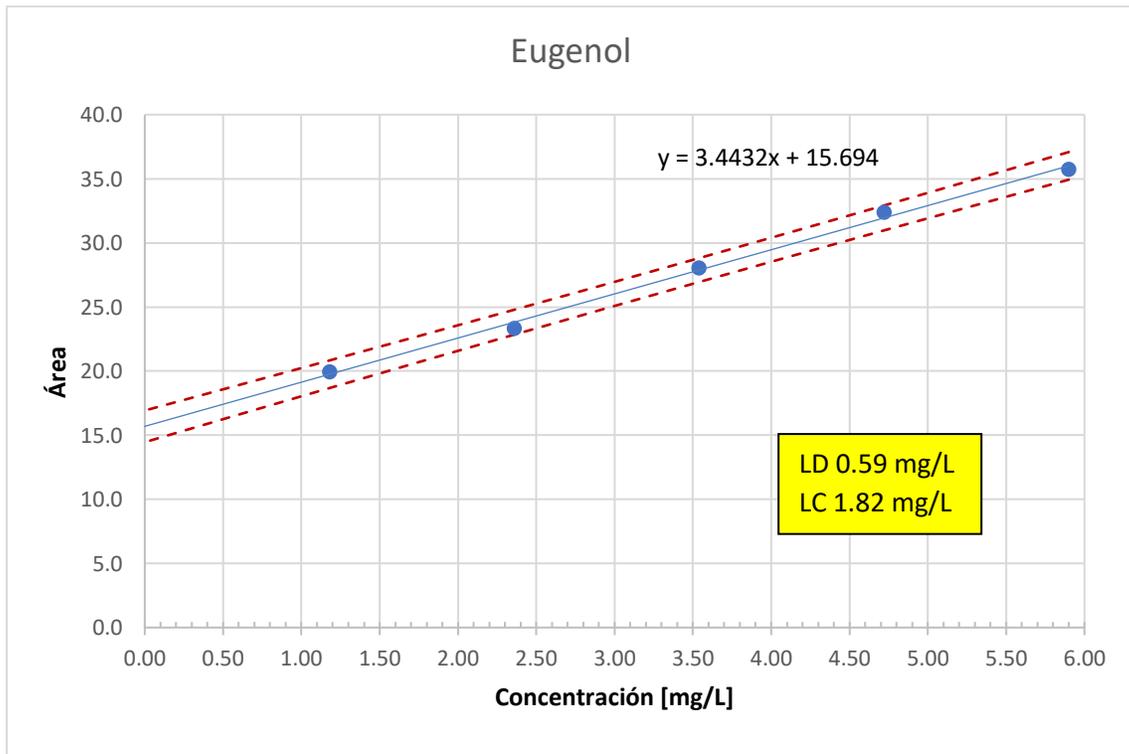
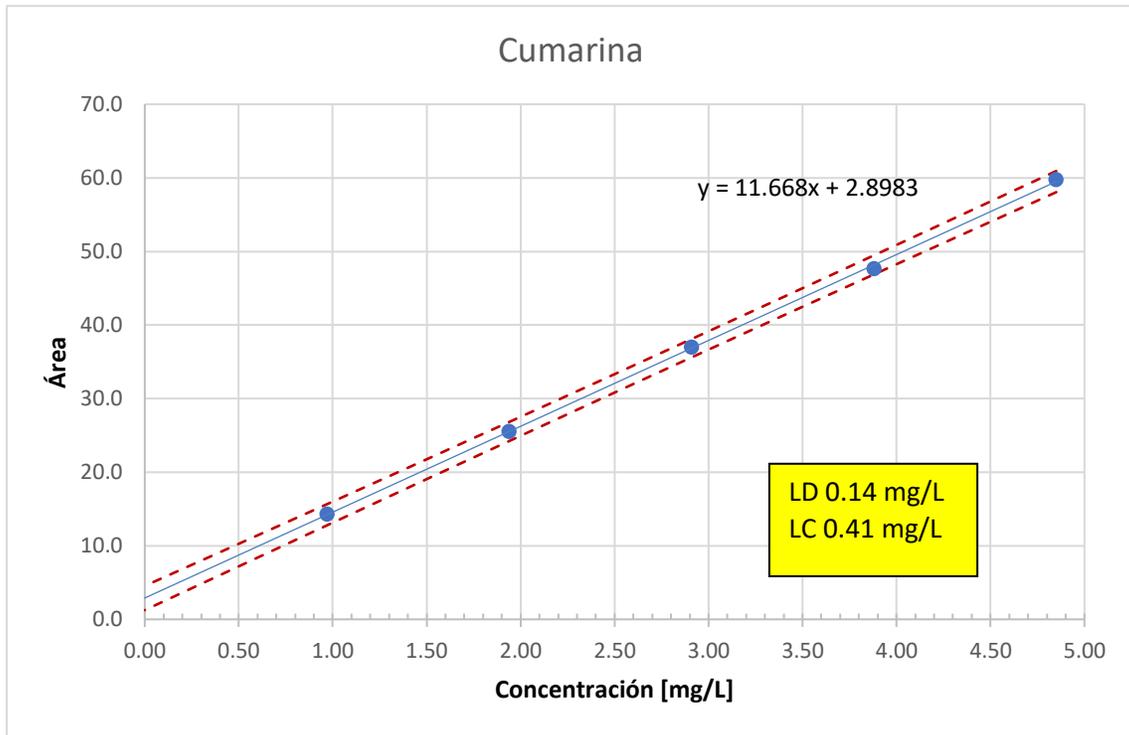
Para calcular el límite de cuantificación, se calcula ahora el valor de y₊ para x = límite de detección, y nuevamente con este valor se calcula el valor de x en la recta y₋. Este valor corresponde al límite de cuantificación.

La "mejor" línea recta que pasa a través de los puntos de la gráfica de calibración de los ocho de los 8 compuestos utilizados (Vainillina, Ácido 4-hidroxibenzoico, 4-hidroxibenzaldehído, Ácido vainillínico, Cumarina, Guayacol, Eugenol y Etilvainillina) y la determinación de los intervalos de confianza sobre la recta calculada para determinar los límites de detección y cuantificación se muestran a continuación.





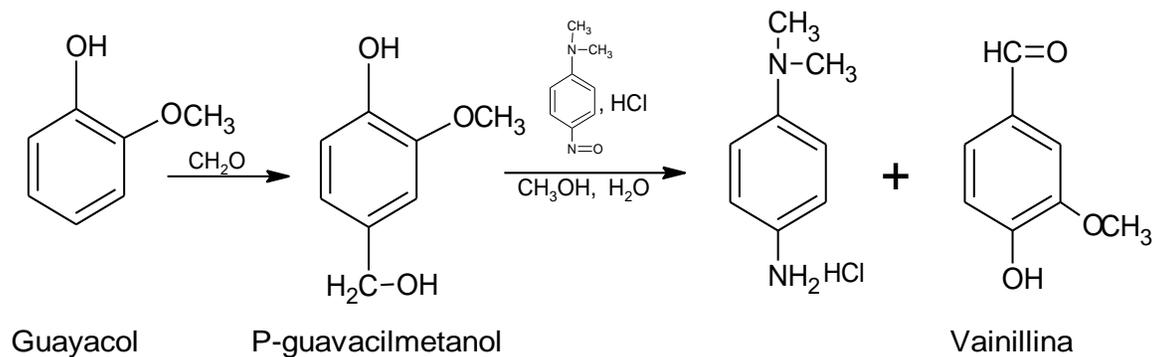




Anexo C

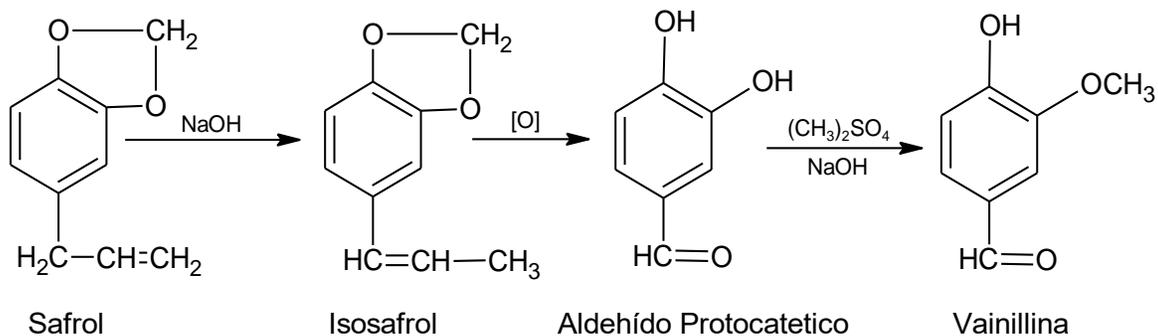
Mecanismo de reacción de las principales rutas de la síntesis industrial para la elaboración de vainilla sintética reportada por Faith et al. 1957.

1.- A partir del Guayacol obtenido anteriormente del fenol.



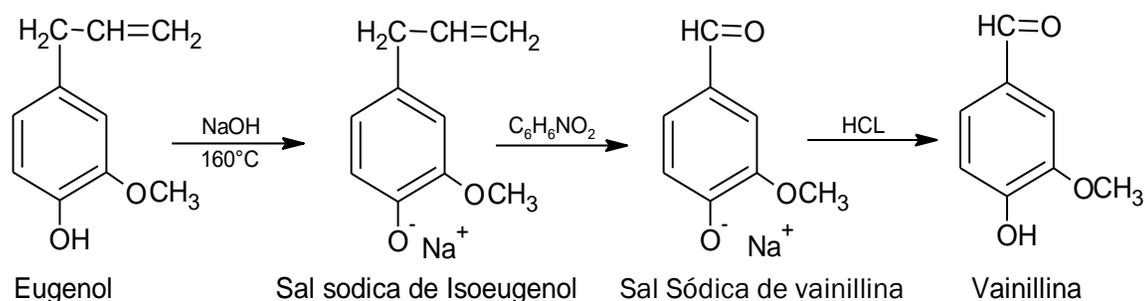
Una vez obtenido el guayacol, se trata con formaldehído y *p*-nitroso-*N,N*-dimetilanilina en presencia de metanol, agua y ácido clorhídrico. El metanol se separa por destilación del producto de la reacción, el que después se trata con benceno para extraer la vainillina. Después de separar el benceno, la vainillina se filtra y seca.

2.- Síntesis de Williamson a partir del safrol.



Se trata con álcali para producir el isosafrol, este se oxida (generalmente con permanganato o con un flujo constante de O₂) a aldehído protocatóquico, que se metila para obtener vainillina. El rendimiento es del 50%.

3.- Síntesis de Vainillina, a partir de Eugenol.



El eugenol se isomeriza por la acción de la potasa alcohólica en ebullición, posteriormente se realiza la oxidación con nitrobenceno, agregando una molécula de nitrobenceno por cada molécula de eugenol original, todo esto se realiza bajo presión controlada. Terminada la reacción, la masa de reacción se acidifica para producir cristales de vainillina, los que posteriormente se purifican. El rendimiento es aproximadamente 80% del teórico.