



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

POSGRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

**EXTRACCIÓN DE VAINILLINA MEDIANTE DISOLVENTES EUTÉCTICOS
CON PRETRATAMIENTO ENZIMÁTICO EN VAINAS BENEFICIADAS**

TESIS

Que como requisito para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

Presenta:

ESTELA GÓMEZ GONZÁLEZ

Bajo la supervisión de:

BLANCA ELIZABETH HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ, DRA.



**Maestría en
Ciencia y Tecnología
Agroalimentaria**



APROBADA



Chapingo, Estado de México, noviembre de 2025

**EXTRACCIÓN DE VAINILLINA MEDIANTE DISOLVENTES EUTÉCTICOS
CON PRETRATAMIENTO ENZIMÁTICO EN VAINAS BENEFICIADAS**

Tesis realizada por Estela Gómez González bajo la supervisión del Comité Asesor
indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener
el grado de:

MAESTRA EN CIENCIA Y TÉCNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

DIRECTOR: _____


Dra. Blanca Elizabeth Hernández Rodríguez

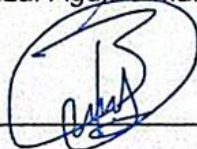
CODIRECTOR: _____


Dra. Lilia Arely de Jesús Prado Barragán

ASESOR: _____


Dr. Eleazar Aguirre Mandujano

ASESOR: _____


Dr. José Basilio Heredia

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
DEDICATORIAS	ix
AGRADECIMIENTOS.....	x
DATOS BIOGRÁFICOS	xi
RESUMEN GENERAL	xii
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	14
1.1 Objetivos	15
1.1.1 General	15
1.1.2 Específicos.....	15
1.2 Hipótesis	16
1.3 Organización de la tesis.....	16
1.4 Literatura citada	16
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	17
2.1 La vainilla: Origen, cultivo e importancia económica	17
2.2 Composición química de las vainas de vainilla	17
2.3 Polisacáridos estructurales en la vainilla.....	19
2.3.1 Hemicelulosa	19
2.3.2 Celulosa.....	20
2.3.3 Pectina.....	20
2.4 Morfología y anatomía de las vainas verdes de vainilla	20
2.5 Distribución de la vainillina	21
2.6 Aplicaciones de la vainillina	22
2.7 Métodos de extracción de vainillina	23

2.8 Fundamentos de la actividad enzimática y su relevancia en la industria alimentaria.....	26
2.9 Uso de enzimas en la extracción de vainillina	27
2.10 Enzimas hidrolíticas aplicadas en la degradación de la pared celular	28
2.10.1 Hemicelulasa	28
2.10.2 Celulasa.....	29
2.10.3 Pectinasa	30
2.11 Disolventes eutécticos profundos y su mecanismo de acción	30
2.12 Ventajas del uso de DES sobre disolventes convencionales	33
2.13 DES utilizados en la extracción de compuestos bioactivos	33
2.14 Aplicación de ultrasonido para la extracción de compuestos bioactivos...	34
2.15 Literatura citada	35
3. EXTRACCIÓN DE VAINILLINA Y FENOLES TOTALES CON UN PRETRATAMIENTO ENZIMÁTICO Y DISOLVENTES EUTÉCTICOS PROFUNDOS.....	42
RESUMEN	42
ABSTRACT	43
3.1 Introducción	44
3.2 Materiales y métodos	45
3.2.1 Vainas de vainilla beneficiadas	45
3.2.2 Reactivos analíticos	45
3.2.3 Preparación de las vainas beneficiadas	46
3.2.4 Análisis químico proximal y fisicoquímico	46
3.2.5 Determinación del contenido de fibra insoluble	46
3.2.6 Determinación del contenido de pectina	48
3.2.7 Pretratamientos enzimáticos en vainas beneficiadas de vainilla	48
3.2.8 Micrografías de vainas beneficiadas con pretratamientos enzimáticos	50
3.2.9 Liofilización de vainas con pretratamiento enzimático	51
3.2.10 Preparación de los disolventes eutécticos profundos (DES)	51
3.2.11 Obtención de extractos con DES	51

3.2.12 Obtención de los extractos alcohólicos	52
3.2.13 Determinación del contenido de vainillina	52
3.2.14 Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales en extractos de vainilla.....	52
3.2.15 Determinación de azúcares reductores en extractos de vainilla	53
3.2.16 Actividad antioxidante por inhibición del radical ABTS ⁺ en extractos de vainilla	54
3.2.17 Capacidad reductora de iones férricos (FRAP) extractos de vainilla ...	55
3.2.18 Análisis estadístico	55
3.3 Resultados y Discusión.....	56
3.3.1 Análisis fisicoquímico y químico proximal de vainas beneficiadas de vainilla	56
3.3.2 Contenido de fibra insoluble y pectina en vainas beneficiadas de vainilla	57
3.3.3 Pretratamientos enzimáticos en vainas beneficiadas de vainilla	59
3.3.4 Micrografías de vainas beneficiadas con pretratamientos enzimáticos	62
3.3.5 Uso de DES para la extracción de vainillina y compuestos fenólicos totales.....	63
3.3.6 Capacidad antioxidante ABTS ⁺ y FRAP	67
3.4 Conclusiones.....	68
3.5 Literatura citada	70
4. CONCLUSIONES GENERALES	76
5. ANEXOS.....	77

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Determinación de pH y composición químico proximal en vainas beneficiadas de vainilla.	57
Cuadro 2. Contenido de fibra insoluble y pectina en vainas beneficiadas de vainilla.	59
Cuadro 3. Contenido de vainillina y fenoles totales en extractos de vainilla. ...	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales compuestos fenólicos en vainas de vainilla.....	19
Figura 2. Esquema de la sección transversal de una vaina verde de vainilla. Líneas punteadas en color rojo señalan los carpelos (A, B, C).	21
Figura 3. Hidrólisis de glucovainillina.	22
Figura 4. Reacción catalizada por la enzima endo-1,4-beta-xilanasasa (3.2.1.8).29	
Figura 5. Reacción catalizada por manano endo-1,4-beta-manosidasa (3.2.1.78).	29
Figura 6. Reacción catalizada por alfa-L-arabinofuranosidasa final no reductora (3.2.1.55).	29
Figura 7. Reacción catalizada por la enzima celulasa (3.2.1.4).....	30
Figura 8. Reacción catalizada por endo-poligalacturonasa (3.2.1.15).	30
Figura 9. Diagrama de fases para una mezcla eutéctica (DES).	31
Figura 10. Estructura general para una mezcla eutéctica (DES).	32
Figura 11. Liberación de vainillina mediante el uso de carbohidrasas.	60
Figura 13. Liberación de azúcares reductores mediante el uso de carbohidrasas.	62
Figura 14. Micrografías de vainas beneficiadas con pretratamiento enzimático.	63

Figura 15. Disolventes eutécticos profundos.	64
Figura 16. Extractos de vainilla.	64
Figura 17. Capacidad antioxidante ABTS ⁺ y FRAP en extractos de vainilla.....	68
Figura 18. Curva estándar de vainillina.	77
Figura 19. Curva estándar de ácido gálico.	77
Figura 20. Curva estándar de glucosa.....	78
Figura 21. Curva estándar de Trolox.	78

DEDICATORIAS

A mis padres, por todo en esta vida y su fe constante en mí.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo otorgado para la realización de este trabajo de tesis a las siguientes instituciones:

- Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI)
- Universidad Autónoma Chapingo (UACH), Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria.
- Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Unidad Culiacán, México.

A mi directora de tesis, por acompañarme con sabiduría y dedicación en cada etapa, por su constante apoyo y por compartir generosamente su conocimiento y experiencia.

A Kalid, por todo su amor, apoyo incondicional, comprensión y confianza en mí.

A mis asesores, Dra. Lilia Arely y Dr. Eleazar, por su conocimiento y orientación brindada.

Al Dr. José Basilio Heredia, por facilitar la estancia académica que amplió mi visión del mundo de la investigación.

Al Dr. Anastasio y la Dra. Ariadna por proporcionarnos la vainilla que fue fundamental para el desarrollo de este proyecto.

A los compañeros del Laboratorio de Alimentos Funcionales y Nutraceuticos, en especial a Grizel, quien me orientó en todo momento.

A los compañeros que se convirtieron en amigos, gracias.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre: Estela Gómez González

Fecha de nacimiento: 4 de diciembre de 1996

Lugar de nacimiento: Texcoco, Estado de México.

CURP: GOG961204MMCMNS06

Profesión: Ingeniera Agrónoma Especialista en Fitotecnia

Cedula profesional: 13103627



Desarrollo académico

Bachillerato: Escuela preparatoria oficial No. 100

Licenciatura: Universidad Autónoma Chapingo

RESUMEN GENERAL

EXTRACCIÓN DE VAINILLINA MEDIANTE DISOLVENTES EUTÉCTICOS CON PRETRATAMIENTO ENZIMÁTICO EN VAINAS BENEFICIADAS

La preferencia creciente de los consumidores por productos naturales y con baja huella de carbono motivó la realización de este estudio, cuyo objetivo fue desarrollar un método de extracción eficiente y ambientalmente responsable de vainillina a partir de vainas beneficiadas. Lo anterior, mediante la combinación de un pretratamiento enzimático y el uso de disolventes eutéticos. Se emplearon enzimas hidrolíticas: hemicelulasa, celulasa, pectinasa y β -glucosidasa para degradar los componentes de la pared celular de las vainas, así como disolventes eutéticos profundos: ácido láctico-fructosa y cloruro de colina-glicerol, por su capacidad para disolver biomoléculas bajo condiciones suaves, con baja volatilidad y favorable biocompatibilidad. Los resultados mostraron a la hemicelulasa como la enzima con mayor capacidad de liberación de vainillina, permitiendo incrementar la extracción con el disolvente eutético conformado por cloruro de colina-glicerol, superando el rendimiento de extracción con etanol (5.77 g/100 g) y metanol (6.06 g/100 g) y comprobando su interacción sinérgica para incrementar la extracción de vainillina (7.35 g/100 g). Esto representa una innovación metodológica frente a los métodos tradicionales, ofreciendo una alternativa competitiva para la extracción de compuestos bioactivos y contribuye a reducir la dependencia de disolventes volátiles.

Palabras clave: *Vanilla planifolia*, proceso de beneficiado, vainillina, enzimas hidrolíticas, disolventes eutéticos profundos.

GENERAL ABSTRACT

VANILLIN EXTRACTION USING DEEP EUTECTIC SOLVENTS WITH ENZYMATIC PRETREATMENT IN CURED VANILLA PODS

The growing consumer preference for natural products with low carbon footprint motivated this study, which aimed to develop an efficient and environmentally responsible method for extracting vanillin from cured vanilla pods. This was achieved through the combination of enzymatic pretreatment and the use of eutectic solvents. Hydrolytic enzymes: hemicellulase, cellulase, pectinase, and β -glucosidase, were employed to degrade the cell wall components of the pods, along with deep eutectic solvents such as lactic acid–fructose and choline chloride–glycerol, selected for their ability to dissolve biomolecules under mild conditions, with low volatility and favorable biocompatibility. The results showed hemicellulase as the enzyme with the highest vanillin-releasing capacity, enhancing extraction when paired with the choline chloride–glycerol eutectic solvent. This combination outperformed traditional solvents such as ethanol (5.77 g/100 g) and methanol (6.06 g/100 g), demonstrating a synergistic interaction that increased vanillin yield to 7.35 g/100 g. This represents a methodological innovation over conventional approaches, offering a competitive alternative for the extraction of bioactive compounds and contributing to the reduction of reliance on volatile solvents.

Key words: *Vanilla planifolia*, curing process, vanillin, hydrolytic enzymes, deep eutectic solvents.

Master of Science Thesis, Graduate Program in Agri-Food Science and Technology,
Universidad Autónoma Chapingo.

Author: Estela Gómez González.

Thesis advisor: Blanca Elizabeth Hernández Rodríguez, Dra.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La vainillina es el compuesto aromático de mayor valor comercial extraído de las vainas de la planta *Vanilla planifolia* y otras especies del género *Vanilla*. Dada su alta demanda en las industrias alimentarias, cosméticas y farmacéuticas, se ha intensificado la investigación sobre métodos más eficientes, selectivos y amigables con el ambiente para su obtención. Además, la extracción tradicional con disolventes orgánicos presenta desventajas como toxicidad, volatilidad, bajo desempeño selectivo y altos costos ambientales. La búsqueda de métodos sostenibles para la obtención de compuestos de alto valor comercial como la vainillina responde a la necesidad de reducir el impacto ambiental de los procesos industriales, mejorar la eficiencia de extracción y aprovechar mejor los recursos vegetales (Liaqat et al., 2023).

En ese contexto, los disolventes eutécticos profundos (DES, por sus siglas en inglés) han emergido como alternativas prometedoras para procesos de extracción y valorización de biomoléculas. Estos disolventes se obtienen combinando dos o más componentes, por ejemplo, un donador y un aceptor de puentes de hidrógeno en proporciones molares específicas, de modo que el punto de fusión de la mezcla resultante es considerablemente menor que el de los componentes puros. Esto les confiere propiedades como baja volatilidad, alta capacidad de solvatación, biodegradabilidad y modularidad, es decir, se pueden ajustar sus propiedades modificando las especies químicas y sus proporciones (Dai et al., 2013). En particular, los DES se han considerado “disolventes verdes” por su origen natural (azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos, etc.) y por su biocompatibilidad (Liaqat et al., 2023).

En el ámbito de la extracción de vainillina, algunos estudios han mostrado que sistemas DES presentan cantidades sustanciales del compuesto de interés. Por

ejemplo, Xu et al. (2024) optimizaron la extracción con un sistema DES, obteniendo un contenido de vainillina de hasta 18.5 mg/g en condiciones controladas, con recuperación y reúso del disolvente (manteniendo aproximadamente el 43 % de eficiencia en tres ciclos). Esto demuestra el potencial de los DES como disolventes alternativos a los disolventes orgánicos convencionales.

No obstante, uno de los retos principales en la extracción de compuestos a partir de matrices vegetales, es la resistencia estructural de la materia lignocelulósica, donde la lignina, la hemicelulosa, la celulosa y pectina interactúan en una red compleja. Por lo anterior, cobra relevancia el pretratamiento enzimático, específicamente empleando—ligninasas, celulasas, xilanasas u otras enzimas hidrolíticas, que pueden modificar la estructura de la matriz vegetal, degradando ciertos componentes o rompiendo enlaces que facilitan la liberación de vainillina en este caso, o bien, de sus precursores. La combinación de un pretratamiento enzimático con la acción de un disolvente puede mejorar significativamente la eficiencia de extracción, pues reduce las barreras físicas y químicas que limitan la difusión del compuesto objetivo (Liaqat et al., 2023).

1.1 Objetivos

1.1.1 General

Desarrollar un método de extracción eficiente y amigable con el ambiente para la obtención de un extracto rico en vainillina a partir de vainas beneficiadas, mediante la incorporación de un pretratamiento enzimático y el uso de disolventes eutécticos.

1.1.2 Específicos

Aplicar un pretratamiento enzimático en vainas beneficiadas para favorecer la liberación de vainillina a partir de la hidrólisis de la pared celular vegetal.

Determinar la eficiencia de la extracción de vainillina utilizando disolventes eutécticos con referencia a un método convencional.

1.2 Hipótesis

La incorporación de un pretratamiento enzimático en el proceso de extracción de vainillina incrementará su liberación a partir de las matrices celulares de las vainas. Además, el uso de disolventes eutécticos profundos mejorará de manera significativa la eficiencia de extracción de vainillina en comparación con los métodos convencionales.

1.3 Organización de la tesis

La investigación se estructura en cinco capítulos. El primer capítulo muestra la introducción general. El segundo capítulo presenta en una revisión de literatura que aborda los fundamentos teóricos relacionados con la vainillina, los disolventes eutécticos profundos, los pretratamientos enzimáticos y las metodologías de extracción y análisis de compuestos bioactivos. El tercer capítulo titulado “Extracción de vainillina y fenoles totales con un pretratamiento enzimático y disolventes eutécticos profundos”, expone los resultados experimentales obtenidos, su análisis y discusión, así como conclusiones derivadas del estudio. El cuarto capítulo resume las conclusiones generales. Finalmente, el quinto capítulo correspondiente a anexos incluye figuras complementarias relevantes para la comprensión del estudio.

1.4 Literatura citada

- Dai, Y., Van Spronsen, J., Witkamp, G., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2013). Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica Chimica Acta*, 766, 61-68. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.019>
- Liaqat, F., Xu, L., Khazi, M. I., Ali, S., Rahman, M. U., & Zhu, D. (2023). Extraction, purification, and applications of vanillin: a review of recent advances and challenges. *Industrial Crops and Products*, 204, 117372. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.117372>
- Xu, L., Liaqat, F., Khazi, M. I., Sun, J., & Zhu, D. (2024). Natural deep eutectic solvents-based green extraction of vanillin: optimization, purification, and bioactivity assessment. *Frontiers In Nutrition*, 10. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1279552>

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 La vainilla: Origen, cultivo e importancia económica

La especie *Vanilla planifolia* Andrews es una orquídea nativa de México y la única cultivada para consumo humano. De acuerdo con la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural de México (SADER, 2023), el país se posiciona entre los cinco principales productores de vainilla, pero no se encuentra entre los principales exportadores. Para el año 2024, Madagascar (53.8 %), Francia (9.8 %) y Uganda (5.1 %) lideraron las exportaciones, mientras que México se situó en el lugar 36 con valor de 0.1 % (ITC, 2024). Sin embargo, la vainilla mexicana tiene un alto potencial en el mercado al ser caracterizada como una de las mejores del mundo e incluso contar con la Denominación de Origen “Vainilla de Papantla, Veracruz”, sitio que contribuye el 70 % de la producción nacional, seguido de Puebla y Oaxaca (30 %) (Baqueiro-Peña & Guerrero-Beltrán, 2016). Actualmente, México satisface el 100 % de su demanda con producción interna, y solo un 5.97 % se destina a exportaciones, principalmente a los Estados Unidos (SAGARPA, 2017). Hoy en día, las vainas curadas siguen siendo la fuente principal de vainillina natural, compuesto altamente utilizado en alimentos, bebidas, confitería y productos farmacéuticos. En este sentido, se pronostica que el mercado de vainillina natural experimente una tasa de crecimiento anual compuesta del 8.4 % de 2022 a 2027, impulsado por la preferencia de los consumidores por productos alimenticios naturales, orgánicos y de etiqueta limpia (baja huella de carbono) (Harshvardhan et al., 2017).

2.2 Composición química de las vainas de vainilla

La constitución química de la vainilla es diversa, para conocer la concentración de sus componentes, es preciso considerar varios factores, entre ellos: la especie

cultivada, las condiciones de cultivo, la composición del suelo, el grado de madurez al momento de la cosecha y, sobre todo, el método de beneficiado. Todos estos aspectos influyen directamente en el contenido y proporción de los compuestos químicos, lo que dificulta establecer una constitución general (De La Cruz et al., 2009; Ramachandra & Ravishankar, 2000).

Las vainas se constituyen de lípidos (ácido palmítico y linoleico), azúcares (fructosa y glucosa), proteínas, pigmentos, celulosa, hemicelulosa, lignina, ácidos orgánicos, minerales, diversos compuestos aromáticos y aceites esenciales (Ramachandra & Ravishankar, 2000). Su sabor lo confiere la parte no volátil, como los taninos, polifenoles, resinas y aminoácidos libres. Mientras que los compuestos volátiles aportan tanto sabor como aroma, y pertenecen a distintos grupos: compuestos heterocíclicos, hidrocarburos, ésteres, ácidos, aldehídos, cetonas, lactonas, terpenoides, y fenoles (Odoux, 2011).

Los compuestos mayoritarios en la porción volátil son los fenoles, en ocasiones presentan una función de aldehído (3-metoxi-4-hidroxibenzaldehído o vainillina), o bien, una función ácido carboxílico (ácido 4-hidroxibenzoico), función alcohol (alcohol 4- hidroxibencilico) e incluso cetonas (acetovanillona) y son considerados metabolitos secundarios (Odoux, 2011). Existen cuatro compuestos fenólicos usados como indicador de calidad en las vainas, como el p-hidroxibenzaldehído, ácido vanílico, ácido p-hidroxibenzoico y la vainillina (Figura 1) (Pérez-Silva et al., 2005), siendo este último, el compuesto volátil principal y el más abundante en las vainas (1 -2 % (m/m)) (Odoux, 2000). La vainillina es un aldehído fenólico, que derivada de la ruta del ácido shikímico, la cual se encuentra atrapada en la matriz de la pared celular del fruto y es liberada durante el proceso de beneficiado (Anuradha et al., 2013).

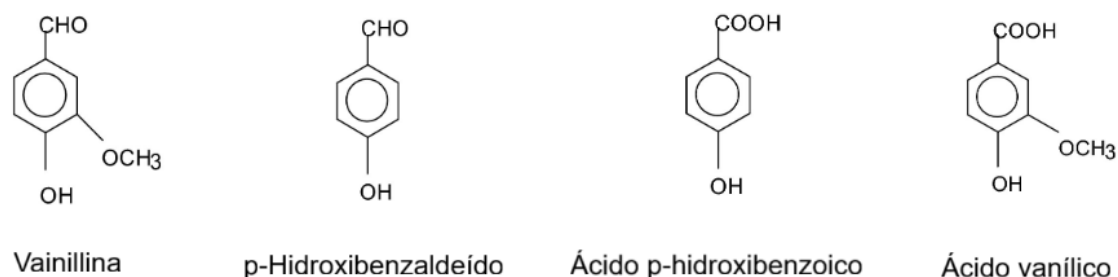


Figura 1. Principales compuestos fenólicos en vainas de vainilla.

2.3 Polisacáridos estructurales en la vainilla

En general, las materias primas vegetales son ricas en polisacáridos. En las vainas de vainilla, el epicarpio, la parte externa de una vaina, está compuesto de hemicelulosa, celulosa y sustancias pécticas. Sin embargo, el porcentaje de cada componente está influenciado por factores como la especie, madurez a la cosecha y método de beneficiado (Odoux, 2003). Las vainas beneficiadas se componen de hasta un 70 % de carbohidratos, donde el 50 % corresponde a la fibra insoluble: lignina (26.42 %), hemicelulosa (12.71 %) y celulosa (11.06 %), polisacáridos que confieren estructura y protección a las vainas (Pérez-Silva et al., 2025).

2.3.1 Hemicelulosa

La hemicelulosa es un polisacárido presente en la pared vegetal de las plantas, caracterizadas por poseer una columna vertebral ligada α (1 $\rightarrow$ 4) con una configuración ecuatorial. Las hemicelulosas incluyen xilanos, mananos, xiloglucanos y glucomananos. La estructura y composición de las hemicelulosas varían entre especies vegetales. Su función biológica principal consiste en contribuir al refuerzo de la pared celular mediante interacciones con la celulosa y lignina (Scheller & Ulvskov, 2010).

2.3.2 Celulosa

La celulosa es un polímero lineal constituido por unidades de D-glucosa, conectadas entre sí mediante enlaces glucosídicos α (1 $\rightarrow$ 4), puentes de hidrógeno y fuerzas de van de Waals entre las cadenas que se extienden en paralelo, proporcionando una estructura tridimensional de fibrillas. Sus propiedades están relacionadas con el grado de polimerización de la cadena (González-González & Miranda-López, 2022).

2.3.3 Pectina

La pectina es un polisacárido abundante en la pared celular con funciones esenciales en diversos procesos biológicos. Inicialmente se consideraba que la pectina funcionaba principalmente en la adhesión intercelular (Caffall & Mohnen, 2009). Sin embargo, la pectina está involucrada en una variedad de procesos celulares, incluidos la especificación del destino celular, la morfogénesis, la comunicación intercelular y la detección ambiental (Haas et al., 2020). La matriz de pectina está compuesta por polímeros heterogéneos con diversos polisacáridos pécticos, entre los cuales predomina el ácido galacturónico. Las cadenas de ácido galacturónico formadas por enlaces α (1 $\rightarrow$ 4), se pueden clasificar en líneales (homogalacturonanos) y ramificadas con otros monosacáridos como xilosa y arabinosa (galacturonanos sustituidos, ramnogalacturonano-I y II) (Caffall & Mohnen, 2009).

2.4 Morfología y anatomía de las vainas verdes de vainilla

Las flores de la vainilla poseen un ovario ínfero unilocular con tres carpelos unidos que, posterior a la fecundación, se fusionan y convierten en una vaina. Del exterior al interior, las vainas se constituyen del epicarpio que presenta paredes celulares gruesas compuestas de celulosa, hemicelulosa y sustancias pécticas. El mesocarpio es un parénquima de células crecientes de la periferia al interior. El endocarpio, conformado por una a dos capas de células pequeñas.

Finalmente, las láminas placentarias donde se contienen a las semillas (Figura 2) (Odoux, 2003).

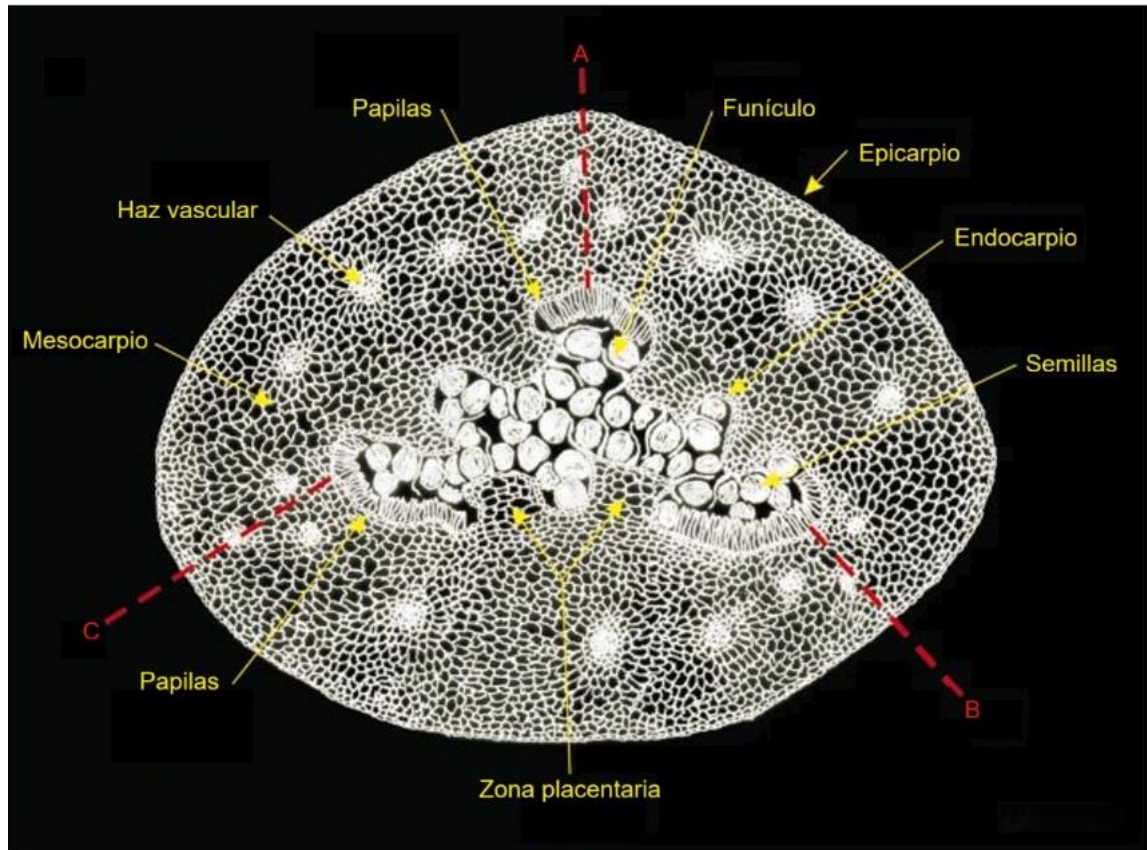


Figura 2. Esquema de la sección transversal de una vaina verde de vainilla. Líneas punteadas en color rojo señalan los carpelos (A, B, C).
Fuente: Odoux (2003).

2.5 Distribución de la vainillina

Las vainas verdes de vainilla no poseen el sabor característico por sí solas, debido a que la vainillina se encuentra en su forma glucosilada (glucovainillina), este precursor se hidroliza por la actividad de la). La enzima β -glucosidasa (CE 3.2.1.21) lleva a cabo la hidrólisis de residuos terminales de β -D-glucosil no reductores con liberación de β -D-glucosa (BRENDA Enzyme Database, 2025) en el precursor glucovainillina durante el proceso conocido como beneficiado o curado, lo que deriva en la liberación de vainillina (Figura 3), tornándose las

vainas flexibles, oscuras y aromáticas (Leong et al., 1989; Odoux, 2000). La enzima β -glucosidasa

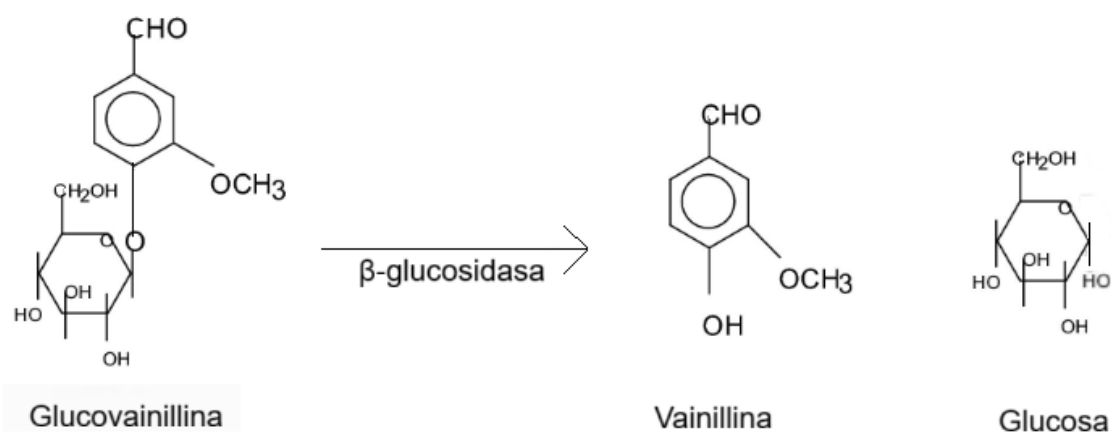


Figura 3. Hidrólisis de glucovainillina.

Odoux (2003) examinó mediante microscopía óptica la localización subcelular *in situ* de la β -glucosidasa en las vainas verdes maduras, encontrando que su actividad aumenta desde el epicarpio hasta la zona placentaria, sin embargo, al seccionar los tejidos y analizar el contenido de glucovainillina, se encontró la ausencia de ésta en el epicarpio y área externa del mesocarpio, detectando glucovainillina en el área interna del mesocarpio y mayormente en la zona placentaria, de esta forma se determinaron los tejidos en donde se encuentra la glucovainillina y por ende, la vainillina libre. Cabe mencionar que no se encuentra glucovainillina en las semillas.

2.6 Aplicaciones de la vainillina

La vainillina (4-hidroxí-3-metoxibenzaldehído) es el compuesto principal que confiere el conocido aroma y sabor a vainilla. Es ampliamente utilizada como saborizante y conservante biológico en las industrias de alimentos y bebidas. A menudo se utiliza como intermediario farmacéutico en la síntesis de dopamina, papaverina, levodopa y otros medicamentos. También se emplea como fragancia en cosméticos y perfumes, y en menor frecuencia como agente promotor del

crecimiento en la agricultura y como agente antiespumante en algunas industrias (Kaur & Chakraborty, 2013; Banerjee & Chattopadhyay, 2018; Galadima et al., 2019). Actualmente se han explorado otras aplicaciones de la vainillina en la ingeniería biomédica y la ciencia de los materiales, como en apósitos para heridas, medicamentos antitumorales, sistemas de administración de medicamentos y almacenamiento de energía en baterías (Huang et al., 2021; Karakurt et al., 2021; Zhang et al., 2020).

Se han reportado sus beneficios para la salud, como actividad antioxidante, antimutagénica, hipolipidémica, así como potencial anticancerígeno y conservador de alimentos (Jadhav et al., 2009). Además, ayuda a combatir la ansiedad (Wang et al., 2017), la inflamación (Cheng et al., 2017) y a aumentar el apetito (Ogawa et al., 2018), siempre que sea de origen natural. En contraste, la vainillina sintética se relaciona con desventajas como el alto impacto ambiental del proceso de obtención y un producto final de baja calidad con efectos negativos en la salud. Como consecuencia, la utilización de vainilla sintética está restringida en los sectores farmacéutico y alimentario por motivos de seguridad (Banerjee & Chattopadhyay, 2018), por ejemplo, la vainillina obtenida a partir de la bioconversión de eugenol se encuentra prohibida en la industria alimentaria con base en los lineamientos del Standing Committee on the Food Chain and Animal Health de la Unión Europea, por lo que el tipo de vainillina debe seleccionarse tomando en cuenta el propósito final (Priefert et al., 2001).

2.7 Métodos de extracción de vainillina

La extracción de la vainillina natural ha traído un gran interés debido a sus aplicaciones. Tradicionalmente la vainillina se extrae por maceración con alcohol, sin embargo, se han desarrollado varios métodos de extracción con líquidos iónicos, disolventes eutécticos profundos (González et al., 2017) y fluidos supercríticos (Panyadee et al., 2018), en combinación con la estimulación de microondas (Carpentieri et al., 2022) y con enzimas (Pardío et al., 2018).

Los líquidos iónicos se han empleado en la extracción acuosa de vainillina debido a sus propiedades distintivas, como baja volatilidad, no inflamabilidad, elevada estabilidad térmica y una selectividad excepcional. Aunque estos solventes han despertado interés por sus ventajas técnicas, presentan una limitación importante: su costo es considerablemente más alto que el de los solventes convencionales (Chen & Mu, 2021). Esto se debe a que su síntesis y producción requieren procesos más complejos, lo que incrementa los costos asociados a la extracción.

La extracción con fluidos supercríticos es una técnica ambientalmente amigable ampliamente utilizada en la industria alimentaria para la obtención de compuestos naturales. Este método emplea dióxido de carbono (CO_2) en estado supercrítico, aprovechando la relación entre su solubilidad y densidad, así como la influencia de la presión y la temperatura sobre dichas propiedades, lo que permite una extracción y separación eficiente de sustancias específicas (Dias et al., 2021). Gracias a sus condiciones operativas suaves, la extracción con fluido supercrítico resulta especialmente adecuado para la recuperación de compuestos termo sensibles como la vainillina. No obstante, esta técnica presenta ciertas limitaciones, como el riesgo de daño a los materiales de extracción bajo alta presión y un consumo energético elevado (Tyśkiewicz et al., 2018). En un estudio realizado por Fujii et al. (2018), se empleó CO_2 para extraer vainillina de la fase acuosa mediante un sistema de presión diferencial constante. Este procedimiento alcanzó una tasa de recuperación del 81.3 %, considerada moderada. Sin embargo, el método de contacto gas-líquido aún enfrenta desafíos técnicos, entre ellos la formación de espuma durante el proceso.

Los disolventes eutécticos profundos (DES) representan una nueva generación de solventes con alto potencial para promover el aprovechamiento sostenible de la bioenergía. Se caracterizan por su baja volatilidad e inflamabilidad, elevada solubilidad, baja toxicidad, costo accesible, síntesis directa y barata, que requiere materias primas disponibles de fuentes renovables. Generalmente, los DES se elaboran a partir de compuestos naturales y biomoléculas como cloruro de colina,

ácido láctico, urea, aminoácidos y fructosa, lo que los hace seguros para su uso en sectores como el alimentario, farmacéutico, cosmético y médico (Pätzold et al., 2019). En el caso de la extracción de vainillina a partir de vainas de vainilla, González et al. (2017) emplearon combinaciones de ácido láctico, fructosa y cloruro de colina para formular distintas soluciones de DES, obteniendo una tasa de extracción del 2.18 %. Aunque este rendimiento es inferior al de otros disolventes convencionales, se ha observado que su integración con métodos complementarios puede mejorar significativamente la eficiencia del proceso. Por otro lado, el rendimiento eficiente de los disolventes DES proporciona una perspectiva prometedora para la extracción de compuestos aromáticos como la vainillina (Cañadas et al., 2021).

La extracción asistida por microondas es una tecnología rápida y eficiente que ha demostrado gran utilidad en procesos de extracción vegetal. Este método emplea ondas electromagnéticas de alta frecuencia (300 MHz–300 GHz), cuya elevada penetrabilidad, selectividad y capacidad de calentamiento inducen presión intracelular, acelerando el movimiento molecular dentro y fuera de la célula. Como consecuencia, se produce la ruptura celular y la liberación efectiva de sus componentes (Delazar et al., 2012). En el caso de la vainillina, se ha reportado que la aplicación de MAE incrementa la eficiencia de extracción en aproximadamente 1.5 veces respecto al uso de disolventes convencionales como el etanol (Sharma et al., 2006). Existen métodos auxiliares como la extracción asistida por ultrasonido, que utiliza ondas sonoras de alta frecuencia para generar cavitación, es decir, formación y colapso de microburbujas, provocando la disrupción de las estructuras celulares. Esta técnica representa otra alternativa viable para futuras investigaciones (Sharma et al., 2006).

La extracción asistida con enzimas es otra alternativa prometedora, se basa en que la pared celular de las vainas contiene cantidades significativas de lignina, hemicelulosa, celulosa, pectina y varias otras sustancias. La clave para una extracción enzimática eficiente de vainillina radica en seleccionar las enzimas de pretratamiento adecuadas. Ciertas enzimas de alta calidad, como las enzimas

alimentarias, se utilizan en la extracción de vainillina. Incluso una pequeña cantidad de estas enzimas alimentarias puede producir una mayor concentración de vainillina (Pardío et al., 2018).

La extracción de fuentes naturales presenta varios desafíos., el bajo contenido de vainillina en las vainas es uno de ellos. La cantidad de vainillina teóricamente disponible en las vainas es del 2%, lo que la convierte en una fuente de extracción de bajo rendimiento (Sinha et al., 2008). Por otro lado, las matrices vegetales presentan una barrera estructural compleja, atribuida a su composición lignocelulósica, lo que dificulta la penetración y difusión eficiente del disolvente durante los procesos de extracción. Por lo cual, la extracción de vainillina requiere una cuidadosa consideración de varios factores para incrementar su rendimiento, por ejemplo, la fuente de vainillina y la eficiencia del método de extracción, sin omitir el impacto ambiental y los costos (Pardío et al., 2018).

2.8 Fundamentos de la actividad enzimática y su relevancia en la industria alimentaria

Las enzimas son un conjunto de proteínas que actúan como catalizadores biológicos que aceleran las reacciones bioquímicas en los organismos vivos. Por lo general, describimos la actividad enzimática como la conversión de moléculas de sustrato en moléculas de producto. Poseen una notable especificidad porque generalmente catalizan la conversión de un solo tipo (o como máximo una gama de tipos similares) de molécula de sustrato en moléculas de producto. Como catalizadores, las enzimas solo se requieren en concentraciones muy bajas y aceleran las reacciones sin que se consuman durante la reacción. Debido a su enorme actividad catalítica se emplea una constante, k_{cat} , que se conoce como número de recambio y representa el número de moléculas de sustrato que una molécula de enzima puede convertir en producto por segundo. Por ejemplo, una sola molécula de anhidrasa carbónica puede catalizar la conversión de más de medio millón de moléculas de sus sustratos, dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O), en el producto, bicarbonato (HCO_3^-), cada segundo (Robinson, 2015).

El uso de enzimas en la industria alimentaria representa una estrategia eficiente y sustentable, al permitir procesos más específicos, seguros y menos agresivos para el medio ambiente. Gracias a su alta selectividad, las enzimas minimizan la formación de subproductos no deseados y mejoran la calidad del producto final (Robinson, 2015). Además, operan bajo condiciones suaves de temperatura y pH, lo que favorece la inocuidad y reduce el consumo energético. Estas características han impulsado su aplicación en procesos como la clarificación de jugos, la hidrólisis de proteínas y la extracción de compuestos bioactivos. En conjunto, las enzimas contribuyen al desarrollo de tecnologías verdes dentro del sector alimentario (Del Moral, Pérez & Sánchez, 2015).

2.9 Uso de enzimas en la extracción de vainillina

La estructura de la pared celular en la vaina de vainilla está compuesta principalmente por lignina, hemicelulosa, celulosa, pectina y otros polisacáridos estructurales que confieren rigidez y resistencia al tejido vegetal. Esta estructura representa una barrera física importante durante los procesos de extracción, por lo que la elección de un tratamiento enzimático adecuado resulta esencial para favorecer la liberación de vainillina. El uso de enzimas específicas, particularmente celulasas y pectinasas, permite la degradación de la pared celular liberando vainillina y, por lo tanto, mejorando el proceso de extracción. (Gallage & Møller, 2015).

Investigaciones más recientes reportan que el uso de pectinasa combinada con otras enzimas endógenas mejora significativamente la eficiencia del proceso, elevando la extracción de vainillina del 2.4 al 4.8 % (Naidu et al., 2009). Otro ejemplo notable es el trabajo de Pardío et al. (2018) en donde se reporta la aplicación del complejo enzimático Crystal PML-MX[®], lo que permitió liberar un 82.57 % de la vainillina teóricamente disponible, alcanzando una recuperación de 5.78 g por cada 100 g de vainas verdes. Lo anterior pone en evidencia la eficacia de un pretratamiento enzimático en la obtención de vainillina natural.

El pretratamiento enzimático se considera una alternativa ambiental sostenible, ya que se realiza bajo condiciones de reacción suaves, en comparación con los métodos convencionales que emplean disolventes orgánicos o altas temperaturas, además, es compatible con diversos métodos de extracción como la extracción asistida por ultrasonido (UAE) donde las ondas ultrasónicas generan cavitación que rompe estructuras celulares, facilitando el acceso de las enzimas a sus sustratos, y con la extracción asistida por microondas (MAE) donde el calentamiento localizado genera la ruptura de la matriz vegetal, lo que complementa la acción enzimática sin desnaturalizarla si se controla la temperatura (Choi et al., 2011; Nadar et al., 2018).

2.10 Enzimas hidrolíticas aplicadas en la degradación de la pared celular

2.10.1 Hemicelulasa

El término hemicelulasa no se encuentra en la CE, debido a que la hemicelulosa es una mezcla de polisacáridos presentes en la pared celular, por lo cual se requieren enzimas específicas para hidrolizar cada tipo de enlace. El complejo de posibles enzimas presentes en la hemicelulasa comprende: xilanasa (CE 3.2.1.8) que lleva a cabo una endohidrólisis de enlaces (1→4)-β-D-xilósido en xilanos (Figura 4), obteniendo como producto xilooligosacáridos (fragmentos de 2 a 10 unidades de xilosa) y xilosa libre (D-xilosa); mananasa (CE 3.2.1.78) que hidroliza aleatoriamente enlaces (1→4)-β-D-mananósidos en mananos, galactomananos y glucomananos (Figura 5) obteniendo como producto manooligosacáridos (cadenas cortas de manosa), manosa libre (D-manosa) y, galactosa y glucosa.; arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55) lleva a cabo la hidrólisis de residuos terminales no reductores de α-L-arabinofuranósido en α-L-arabinósidos (Figura 6) obteniendo como producto arabinosa libre (L-arabinosa); entre otras enzimas minoritarias (BRENDA Enzyme Database, 2025).

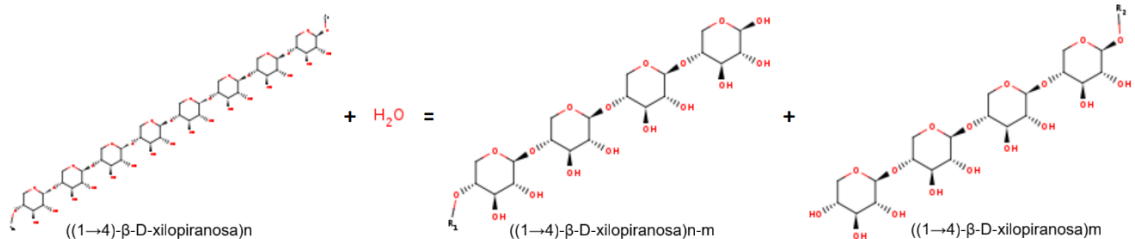


Figura 4. Reacción catalizada por la enzima endo-1,4-beta-xilanasas (3.2.1.8).
Fuente: BRENDA Enzyme Database (2025).

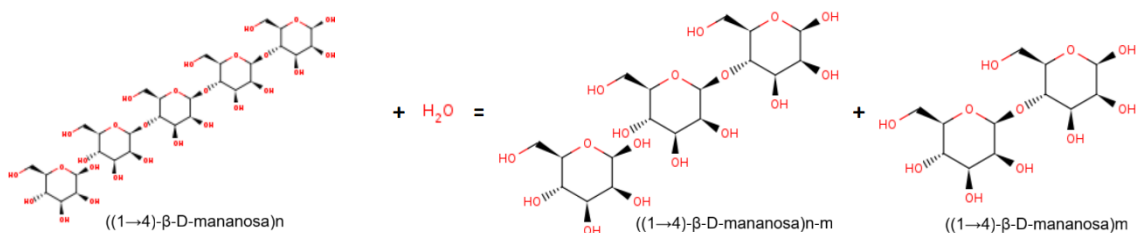


Figura 5. Reacción catalizada por manano endo-1,4-beta-manosidasa (3.2.1.78).
Fuente: BRENDA Enzyme Database (2025).

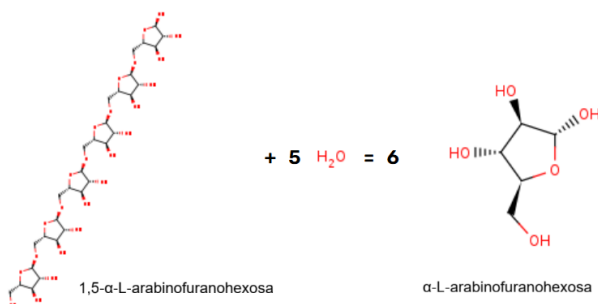


Figura 6. Reacción catalizada por alfa-L-arabinofuranosidasa final no reductora (3.2.1.55).
Fuente: BRENDA Enzyme Database (2025).

2.10.2 Celulasa

La celulosa está presente en la pared celular, para ser hidrolizada se requiere la enzima celulasa (CE 3.2.1.4) lleva a cabo la endohidrólisis de enlaces (1→4)-β-D-glucosídicos (Figura 7) en celulosa, liquenina y β-D-glucanos de cereales. También hidroliza enlaces 1,4 en β-D-glucanos que también presentan enlaces 1,3 (BRENDA Enzyme Database, 2025).

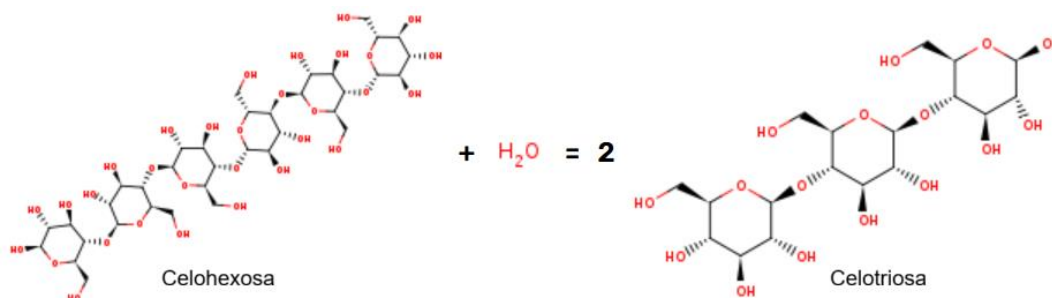


Figura 7. Reacción catalizada por la enzima celulasa (3.2.1.4).
Fuente: BRENDA Enzyme Database (2025).

2.10.3 Pectinasa

La pectinasa (CE 3.2.1.15) corresponde a la endo-poligalacturonasa y lleva a cabo la hidrólisis aleatoria de los enlaces (1 $\rightarrow$ 4)- α -D-galactosidurónico en pectato y otros galacturonanos (Figura 8) (BRENDA Enzyme Database, 2025).

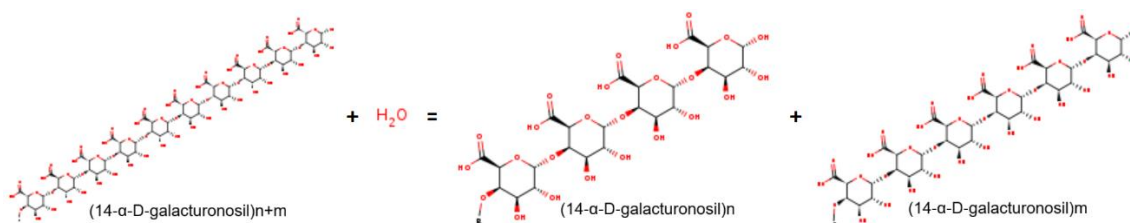


Figura 8. Reacción catalizada por endo-poligalacturonasa (3.2.1.15).
Fuente: BRENDA Enzyme Database (2025).

2.11 Disolventes eutécticos profundos y su mecanismo de acción

Las mezclas eutécticas de bajo punto de fusión, conocidas en inglés como Deep Eutectic Solvents (DES) se forman al calentar dos o más sólidos inmiscibles en proporción determinada que sufren un cambio de fase sólido-líquido a una temperatura determinada, llamada punto eutéctico y se comportan como si fuesen un líquido puro (Figura 9) (Alonso et al., 2018).

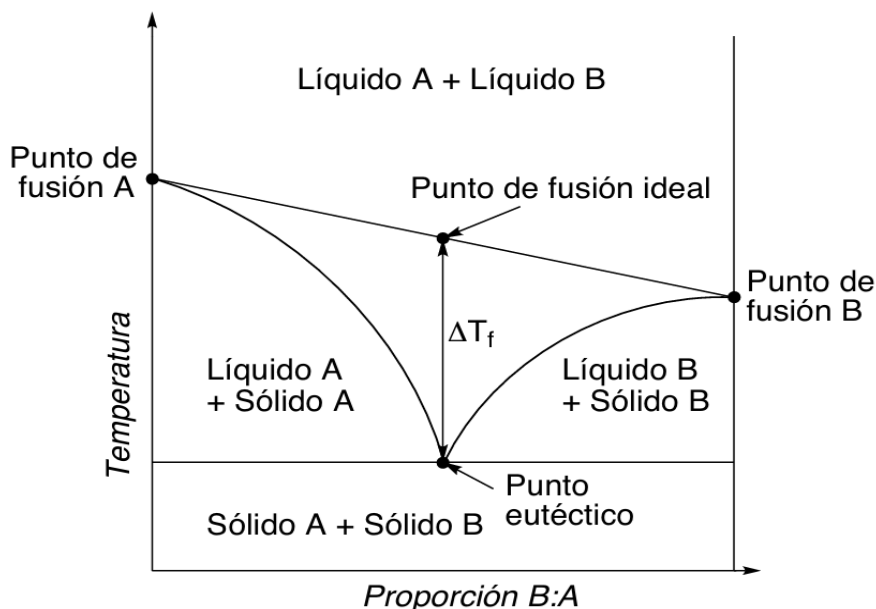


Figura 9. Diagrama de fases para una mezcla eutéctica (DES).
Fuente: Alonso et al. (2018)

Aunque las mezclas eutécticas ya eran muy conocidas, fue hasta principios de este siglo cuando comenzaron a considerarse como posibles medios de reacción. Existen cuatro tipos de DES, clasificados con base en sus propiedades y composición. Los DES son importantes desde el punto de vista químico orgánico, debido a su facilidad de preparación y uso potencial como disolventes sostenibles. Son obtenidos al mezclar un compuesto con carácter aceptor de puentes de hidrógeno (APH), como el cloruro de colina, betaína, sales de amonio cuaternario, con una sustancia que actúe como donadora de puentes de hidrógeno (DPH) como el ácido láctico, urea, glicerol, ácido cítrico, glucosa y fructosa. Sin embargo, un mismo compuesto puede actuar como APH o DPH según el sistema que se formule (Suthar et al., 2023). La incorporación de este último genera la formación de puentes de hidrógeno entre ambos, de manera que la carga del anión del APH se deslocaliza, disminuyendo la fuerza del enlace iónico entre el catión y el anión de la sal y, por tanto, la energía de la red cristalina hasta distorsionarla totalmente. Esta disrupción de la estructura cristalina (Figura 10) da lugar a una disminución del punto de fusión de la mezcla. La nueva estructura formada está constituida por una red extensa de puentes de hidrógeno

entre los componentes, en donde existen huecos o agujeros. Esta estructura está menos ordenada y su densidad disminuye (Alonso et al., 2018). Por ejemplo, en el esquema de aceptores/donadores de puente de hidrógeno, el Cl^- del cloruro de colina acepta puentes de hidrógeno desde los grupos OH de glicerol, ácido láctico, fructosa, formando una “red distribuida” de puentes de hidrógeno (Latirin et al., 2022).

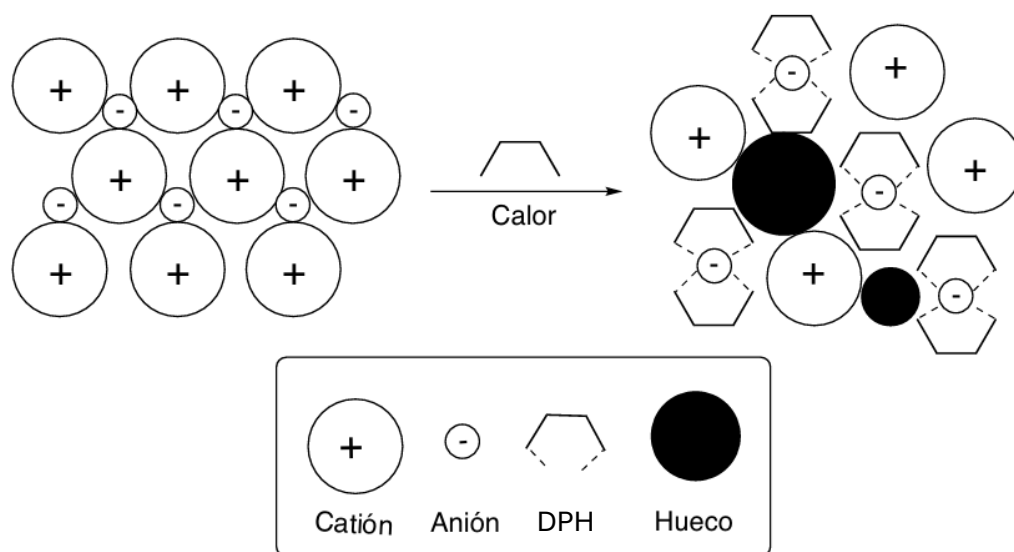


Figura 10. Estructura general para una mezcla eutéctica (DES).
Fuente: Alonso et al. (2018).

Cuanto más fuerte es la interacción entre los componentes, mayor es la depresión del punto de fusión (PF). Por ejemplo, la urea (PF 134 °C) en combinación con cloruro de colina (PF 302 °C) en una proporción 1:2, presentan una interacción tan fuerte que el punto de fusión en el eutéctico es de 12 °C, lo que supone una disminución de 122 °C respecto al ideal (Alonso et al., 2018).

Ferreira et al. (2021) mencionan que cuando se añade agua al sistema, incluso en pocas cantidades, puede alterar la red de puentes de hidrógeno modificando la viscosidad, donde el agua puede actuar como puente adicional entre el aceptor y donador de puentes de hidrógeno, debilitar interacciones directas al competir como donador/aceptor de hidrógeno), con ello, aumentar la movilidad molecular.

Cuando se incorpora agua arriba del 35 % (m/m) comienza a producirse la solvatación de los componentes del DES, la estructura se interrumpe y el sistema pasa a una solución de DES en el agua.

Existen diversos sistemas de DES probados, como cloruro de colina-ácido cítrico, cloruro de colina-ácido málico, cloruro de colina-glicerol, fructosa-glucosa, ácido málico-glucosa, ácido cítrico-fructosa, betaína-sacarosa, ácido láctico-1,2-propanodiol, ácido láctico-fructosa, entre otros. Sin embargo, cloruro de colina es el más reportado como APH por su alta disponibilidad y bajo costo, biocompatibilidad, estructura iónica estable y versatilidad. Mientras que, el glicerol es el más usado como DPH por su alta solubilidad, seguridad y sostenibilidad (Suthar et al., 2023)

2.12 Ventajas del uso de DES sobre disolventes convencionales

Una de las principales desventajas de los disolventes convencionales es que son inflamables, no degradables y tóxicos. En contraparte, la toxicidad de los DES es inexistente o prácticamente nula, sobre todo en aquellos que provienen de fuentes naturales (Dai et al., 2013). La formación del DES es sencilla, no genera subproductos y no necesita ninguna etapa de purificación, por lo que su huella ecológica es idónea. Por otro lado, su polaridad va de valores semejantes a los del cloroformo (4) a superiores a la del agua (80), permitiendo una fácil solubilidad de diversos compuestos orgánicos e inorgánicos (Florindo et al., 2018). A pesar de todas las ventajas, también poseen inconvenientes, como su alta densidad y viscosidad, lo que puede ser una limitante sobre todo a escala industrial (Yadav & Pandey, 2014). Sin embargo, diversos autores han probado la incorporación de agua (25-30 % m/m) para disminuir la viscosidad y facilidad de manipulación (González et al., 2017; Fu et al., 2021).

2.13 DES utilizados en la extracción de compuestos bioactivos

El uso extensivo de disolventes orgánicos como el n-hexano, el metanol, el cloroformo y la acetona ha sido asociado significativamente para la salud humana

y el ambiente, debido a su toxicidad, volatilidad y baja biodegradabilidad. En este contexto, los DES emergen como una alternativa más segura y sostenible, ofreciendo ventajas notables en términos de eficiencia de extracción, reducción del impacto ambiental y mejora en el rendimiento de compuestos bioactivos. Las técnicas tradicionales, además de requerir grandes volúmenes de solvente y tiempos prolongados de procesamiento, suelen presentar bajos rendimientos en la recuperación de metabolitos de interés (Iftikhar et al., 2025). En un estudio reciente, S. Wang et al. (2024) evaluaron distintos sistemas de DES para la extracción de compuestos fenólicos y flavonoides a partir de pétalos de peonía. Los resultados mostraron que el sistema cloruro de colina–ácido láctico fue el más eficiente en términos de rendimiento y selectividad para fenoles, mientras que el sistema cloruro de colina–etilenglicol presentó mayor eficiencia en la recuperación de flavonoides. Ambos sistemas superaron significativamente la extracción con agua y etanol. Esto se debe a que los fenoles contienen grupos hidroxilo –OH unidos a anillos aromáticos, que en contacto con un DES basado en cloruro de colina / ácido láctico (o alguno similar), el fenol donará su hidrógeno del –OH al aceptor del DES, o el fenol actuará como aceptor dependiendo de la geometría del enlace. Esto estabiliza al fenol en la fase líquida del DES (Ferreira et al., 2021).

2.14 Aplicación de ultrasonido para la extracción de compuestos bioactivos

El ultrasonido es una técnica novedosa y ecológica que ha demostrado eficacia en la extracción de compuestos bioactivos, gracias a su capacidad para acelerar el proceso, reducir costos operativos y aumentar el rendimiento. Además, su fácil implementación y adaptabilidad a distintas escalas la convierten en una herramienta prometedora para satisfacer demandas industriales. Durante la aplicación de ultrasonido, el proceso de cavitación contribuye a la ruptura de la pared celular de los materiales vegetales, debilitando así la limitación de la transferencia de masa causada por la estructura celular. Por otro lado, las turbulencias violentas alrededor de la superficie de los materiales vegetales durante la sonicación facilitarán la mezcla de sólidos con disolventes,

disminuyendo las capas límite de difusión y mejorando la transferencia de masa en procesos de extracción sólido-líquido (Fu et al., 2021; Tao & Sun, 2013). Por ejemplo, en la extracción de polifenoles de la flor de té azul (*Clitoria ternatea* L.) utilizando DES, Mehmood et al. (2018) demostraron que el uso de ultrasonido incrementa notablemente la eficiencia del proceso frente a condiciones sin asistencia sonora.

2.15 Literatura citada

- Alonso D. A., Baeza A., Chinchilla R., Gómez C., Guillena G., Marset X., ... & Saavedra B. (2018). Mezclas eutécticas como alternativa sostenible a los disolventes convencionales en química orgánica. *Anales de Química*, 114(2), 79–87. <https://analesdequimica.es/index.php/AnalesQuimica/article/view/1072>
- Anuradha, K., Shyamala, B. N., & Naidu, M. M. (2013). Vanilla- its science of cultivation, curing, chemistry, and nutraceutical properties. *Critical Reviews In Food Science and Nutrition*, 53(12), 1250-1276. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.563879>
- Banerjee, G., & Chattopadhyay, P. (2018). Vanillin biotechnology: the perspectives and future. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 99(2), 499-506. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9303>
- Baqueiro-Peña, I., & Guerrero-Beltrán, J. Á. (2016). Vanilla (*Vanilla planifolia* Andr.), its residues and other industrial by-products for recovering high value flavor molecules: a review. *Journal of Applied Research On Medicinal and Aromatic Plants*, 6, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2016.10.003>
- BRENDA Enzyme Database. (2025). EC 3.2.1.55 α -L-arabinofuranosidase. Recuperado de: <https://www.brenda-enzymes.org/ecexplorer2.php?browser=1&name=3.2.1.55>
- BRENDA Enzyme Database. (2025). EC 3.2.1.78 β -mannanase. Recuperado de: <https://www.brenda-enzymes.org/ecexplorer2.php?browser=1&name=3.2.1.78>
- BRENDA Enzyme Database. (2025). EC 3.2.1.8 endo-1,4- β -xylanase. Recuperado de: <https://www.brenda-enzymes.org/ecexplorer2.php?browser=1&name=3.2.1.8>
- BRENDA Enzyme Database. (2025). EC 3.2.1.4 endo-1,4- β -glucanase. Recuperado de: <https://www.brenda-enzymes.org/ecexplorer2.php?browser=1&name=3.2.1.4>

- BRENDA Enzyme Database. (2025). *EC 3.2.1.15 β -glucosidase*. Recuperado de: <https://www.brenda-enzymes.org/ecexplorer2.php?browser=1&name=3.2.1.15>
- BRENDA Enzyme Database. (2025). *EC 3.2.1.21 α -glucosidase*. Recuperado de: <https://www.brenda-enzymes.org/ecexplorer2.php?browser=1&name=3.2.1.21>
- Caffall, K. H., & Mohnen, D. (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 344(14), 1879-1900. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.05.021>
- Cañadas, R., González-Miquel, M., González, E. J., De Prado, A. N., Díaz, I., & Rodríguez, M. (2021). Sustainable recovery of high added-value vanilla compounds from wastewater using green solvents. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 9(13), 4850-4862. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c00168>
- Carpentieri, S., Jambrak, A. R., Ferrari, G., & Pataro, G. (2022). Pulsed electric field-assisted extraction of aroma and bioactive compounds from aromatic plants and food by-products. *Frontiers In Nutrition*, 8. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.792203>
- Cheng, H., Chen, F., Li, C., Lo, H., Liao, Y., Ho, T., & Hsiang, C. (2017). Oral administration of vanillin improves imiquimod-induced psoriatic skin inflammation in mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(47), 10233-10242. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04259>
- Chen, Y., & Mu, T. (2021). Revisiting greenness of ionic liquids and deep eutectic solvents. *Green Chemical Engineering*, 2(2), 174-186. <https://doi.org/10.1016/j.gce.2021.01.004>
- Choi, Y. H., Van Spronsen, J., Dai, Y., Verberne, M., Hollmann, F., Arends, I. W., ... & Verpoorte, R. (2011). Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology?. *Plant Physiology*, 156(4), 1701-1705. <https://doi.org/10.1104/pp.111.178426>
- Dai, Y., Van Spronsen, J., Witkamp, G., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2013). Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica Chimica Acta*, 766, 61-68. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.019>
- De La Cruz Medina, J., Rodríguez Jiménez, G. C., & García, H. S. (2009). *Vanilla: post-harvest operations*. In *Post-harvest compendium*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Recuperado de: https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/inpho/docs/Post_Harvest_Compendium_-_Vanilla.pdf
- Delazar, A., Nahar, L., Hamedeyazdan, S., & Sarker, S. D. (2012). Microwave-assisted extraction in natural products isolation. *Methods In Molecular Biology*, 89-115. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1_5

- Del Moral, A., Pérez, L., & Sánchez, M. (2015). Aspectos relevantes del uso de enzimas en la industria de los alimentos. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 2(5), 45–52. Recuperado de <https://www.reibci.org/publicados/2015/mayo/1000102.pdf>
- Dias, A. L. B., De Aguiar, A. C., & Rostagno, M. A. (2021). Extraction of natural products using supercritical fluids and pressurized liquids assisted by ultrasound: current status and trends. *Ultrasonics Sonochemistry*, 74, 105584. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105584>
- Ferreira, A. S., Craveiro, R., Duarte, A. R., Barreiros, S., Cabrita, E. J., & Paiva, A. (2021). Effect of water on the structure and dynamics of choline chloride/glycerol eutectic systems. *Journal of Molecular Liquids*, 342, 117463. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.117463>
- Florindo, C., Romero, L., Rintoul, I., Branco, L. C., & Marrucho, I. M. (2018). From phase change materials to green solvents: hydrophobic low viscous fatty acid-based deep eutectic solvents. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 6(3), 3888-3895. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b04235>
- Fujii, T., Matsuo, Y., & Kawasaki, S. (2018). Rapid continuous supercritical CO₂ extraction and separation of organic compounds from liquid solutions. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 57(16), 5717-5721. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.8b00812>
- Fu, X., Belwal, T., Cravotto, G., & Luo, Z. (2019). Sono-physical and sono-chemical effects of ultrasound: primary applications in extraction and freezing operations and influence on food components. *Ultrasonics Sonochemistry*, 60, 104726. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104726>
- Fu, X., Wang, D., Belwal, T., Xu, Y., Li, L., & Luo, Z. (2021). Sonication-synergistic natural deep eutectic solvent as a green and efficient approach for extraction of phenolic compounds from peels of *Carya cathayensis* Sarg. *Food Chemistry*, 355, 129577. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129577>
- Galadima, A. I., Salleh, M. M., Hussin, H., Chong, C. S., Yahya, A., Mohamad, S. E., Abd-Aziz, S., Yusof, N. N. M., Naser, M. A., & Al-Junid, A. F. M. (2019). Biovanillin: production concepts and prevention of side product formation. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 10(2), 589-609. <https://doi.org/10.1007/s13399-019-00418-0>
- Gallage, N. J., & Møller, B. L. (2015). Vanillin–bioconversion and bioengineering of the most popular plant flavor and its de novo biosynthesis in the vanilla orchid. *Molecular Plant*, 8(1), 40-57. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.11.008>
- González, C. G., Mustafa, N. R., Wilson, E. G., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2017). Application of natural deep eutectic solvents for the “green” extraction of vanillin from vanilla pods. *Flavour and Fragrance Journal*, 33(1), 91-96. <https://doi.org/10.1002/ffj.3425>

González-González, M. del R., & Miranda-López, R. (2022). *Cellulases, hemicellulases and ligninolytic enzymes: mechanism of action, optimal processing conditions and obtaining value-added compounds in plant matrices*. *MOJ Food Processing & Technology*, 10(1), 15–22.

Haas, K. T., Wightman, R., Meyerowitz, E. M., & Peaucelle, A. (2020). Pectin homogalacturonan nanofilament expansion drives morphogenesis in plant epidermal cells. *Science*, 367(6481), 1003-1007. <https://doi.org/10.1126/science.aaz5103>

Harshvardhan, K., Suri, M., Goswami, A., & Goswami, T. (2017). Biological approach for the production of vanillin from lignocellulosic biomass (*Bambusa tulda*). *Journal of Cleaner Production*, 149, 485-490. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.02.125>

Huang, C., Liao, H., Liu, X., Xiao, M., Liao, S., Gong, S., ... & Zhou, X. (2021). Preparation and characterization of vanillin-chitosan. Schiff base zinc complex for a novel Zn²⁺ sustained released system. *International Journal of Biological Macromolecules*, 194, 611-618. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.11.104>

Kaur, B., & Chakraborty, D. (2013). Biotechnological and molecular approaches for vanillin production: a review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169(4), 1353-1372. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-0066-1>

Karakurt, I., Ozaltin, K., Vargun, E., Kucerova, L., Suly, P., Harea, E., ... & Mozetic, M. (2021). Controlled release of enrofloxacin by vanillin-crosslinked chitosan-polyvinyl alcohol blends. *Materials Science and Engineering C*, 126, 112-125. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112125>

Iftikhar, H., Akram, S., Khalid, N., Khan, M. H., Malhat, F., Ahmed, D., ... & Mushtaq, M. (2025). Process optimization for DES-ultrasound-assisted extraction of phenolic bioactives from *Strychnos potatorum* L.f. seeds. *Microchemical Journal*, 213, 113758. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2025.113758>

International Trade Centre (ITC). (2024). Trade map - list of exporters for the selected product (Vainilla). Copyright© 2008-2014 International Trade Centre. All Rights Reserved. Recuperado de: https://www.trademap.org/Country_SelProduct_TS.aspx?nvpm=3%7c%7c%7c%7c%7c0905%7c%7c%7c4%7c1%7c1%7c2%7c2%7c1%7c2%7c4%7c1%7c1

Latirin, M. A. M., Mustaffa, A. A., Basar, N., & Jamil, S. (2022). Computational analysis on the microstructure of natural deep eutectic solvent – a review. *Directory of Open Access Journals*. <https://doi.org/10.3303/cet2297078>

Leong, G., Archavlis, A., & Derbesy, M. (1989). Research on the glucoside fraction of the vanilla bean. *Journal of Essential Oil Research*, 1, 33–41.

Mehmood, A., Ishaq, M., Zhao, L., Yaqoob, S., Safdar, B., Nadeem, M., ... & Wang, C. (2018). Impact of ultrasound and conventional extraction techniques on bioactive compounds and biological activities of blue butterfly

- pea flower (*Clitoria ternatea* L.). *Ultrasonics Sonochemistry*, 51, 12-19. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.10.013>
- Nadar, S. S., Rao, P., & Rathod, V. K. (2018). Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: a review. *Food Research International*, 108, 309-330. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.006>
- Naidu, M. M., Kumar, P. V. S., Shyamala, B. N., Sulochanamma, G., Prakash, M., & Thakur, M. S. (2009). Enzyme-assisted process for production of superior quality vanilla extracts from green vanilla pods using tea leaf enzymes. *Food and Bioprocess Technology*, 5(2), 527-532. <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0291-y>
- Odoux, E. (2000). Changes in vanillin and glucovanillin concentrations during the various stages of the process traditionally used for curing *Vanilla fragrans* beans in Réunion. *Fruits*, 55, 119–125.
- Odoux, E. (2003). Localization of -D-glucosidase activity and glucovanillin in vanilla bean (*Vanilla planifolia* Andrews). *Annals of Botany*, 92(3), 437-444. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg150>
- Odoux, E., & Grisoni, M. (2010). Vanilla. En *CRC Press eBooks*. <https://doi.org/10.1201/ebk1420083378>
- Ogawa, K., Tashima, A., Sadakata, M., & Morinaga, O. (2018). Appetite-enhancing effects of vanilla flavours such as vanillin. *Journal of Natural Medicines*, 72(3), 798-802. <https://doi.org/10.1007/s11418-018-1206-x>
- Panyadee, R., Posoknistakul, P., Jonglertjunya, W., Kim-Lohsoontorn, P., Laosiripojana, N., Matsagar, B. M., Wu, K. C., & Sakdaronnarong, C. (2018). Sequential fractionation of palm empty fruit bunch and microwave-assisted depolymerization of lignin for producing monophenolic compounds. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 6(12), 16896-16906. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b04246>
- Pardío, V. T., Flores, A., López, K. M., Martínez, D. I., Márquez, O., & Waliszewski, K. N. (2018). Effect of endogenous and exogenous enzymatic treatment of green vanilla beans on extraction of vanillin and main aromatic compounds. *Journal of Food Science and Technology*, 55(6), 2059-2067. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3120-3>
- Pätzold, M., Siebenhaller, S., Kara, S., Liese, A., Syldatk, C., & Holtmann, D. (2019). Deep eutectic solvents as efficient solvents in biocatalysis. *Trends In Biotechnology*, 37(9), 943-959. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.03.007>
- Peña-Barrientos, A., De J Perea-Flores, M., Martínez-Gutiérrez, H., Patrón-Soberano, O. A., González-Jiménez, F. E., Vega-Cuellar, M. Á., & Dávila-Ortiz, G. (2022). Physicochemical, microbiological, and structural relationship of vanilla beans (*Vanilla planifolia* Andrews) during traditional curing process and use of its waste. *Journal of Applied Research On*

- Pérez-Silva, A., Odoux, E., Brat, P., Ribeyre, F., Rodriguez-Jimenes, G., Robles-Olvera, V., ... & Günata, Z. (2005). GC–MS and GC–olfactometry analysis of aroma compounds in a representative organic aroma extract from cured vanilla (*Vanilla planifolia* G. Jackson) beans. *Food Chemistry*, 99(4), 728-735. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.08.050>
- Priefert, H., Rabenhorst, J., & Steinbüchel, A. (2001). Biotechnological production of vanillin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(3-4), 296-314. <https://doi.org/10.1007/s002530100687>
- Ramachandra Rao, S., & Ravishankar, G. A. (2000). Vanilla flavour: Production by conventional and biotechnological routes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(3), 289–304.
- Robinson, P. K. (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays In Biochemistry*, 59, 1-41. <https://doi.org/10.1042/bse0590001>
- Scheller, H. V., & Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, 61(1), 263-289. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112315>
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2023). Vainilla mexicana, con amplio potencial productivo y preferencia en los mercados internacionales: Agricultura. Gobierno de México. Recuperado de: <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/vainilla-mexicana-con-amplio-potencial-productivo-y-preferencia-en-los-mercados-internacionales-agricultura?idiom=es>
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). (2017). *Potencial vainilla*. Planeación Agrícola Nacional 2017-2030. Gobierno de México. Recuperado de: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257086/Potencial-Vainilla.pdf>
- Sharma, A., Verma, S. C., Saxena, N., Chadda, N., Singh, N. P., & Sinha, A. K. (2006). Microwave- and ultrasound-assisted extraction of vanillin and its quantification by high-performance liquid chromatography in *Vanilla planifolia*. *Journal of Separation Science*, 29(5), 613-619. <https://doi.org/10.1002/jssc.200500339>
- Sinha, A. K., Sharma, U. 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. <https://doi.org/10.1080/09687630701539350>
- Suthar, P., Kaushal, M., Vaidya, D., Thakur, M., Chauhan, P., Angmo, D., ... & Negi, N. (2023). Deep eutectic solvents (DES): An update on the applications in food sectors. *Journal of Agriculture and Food Research*, 14, 100678. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2023.100678>

- Tao, Y., & Sun, D. (2013). Enhancement of food processes by ultrasound: a review. *Critical Reviews In Food Science and Nutrition*, 55(4), 570-594. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.667849>
- Tyśkiewicz, K., Konkol, M., & Rój, E. (2018). The Application of supercritical fluid extraction in phenolic compounds isolation from natural plant materials. *Molecules*, 23(10), 2625. <https://doi.org/10.3390/molecules23102625>
- Yadav, A., & Pandey, S. (2014). Densities and viscosities of (choline chloride + urea) deep eutectic solvent and its aqueous mixtures in the temperature range 293.15 K to 363.15 K. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 59(7), 2221-2229. <https://doi.org/10.1021/je5001796>
- Wang, S., Wei, J., Ge, H., Xu, Y., Zhu, B., Yang, Y., Zhai, K., ... & Xu, H. (2024). Mechanism of deep eutectic solvents based extraction of phenolic and flavonoid compounds from peony petals. *Industrial Crops and Products*, 222, 119947. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.119947>
- Wang, X., Chen, Y., Wang, Q., Sun, L., Li, G., Zhang, C., ... & Zhai, H. (2017). Support for natural small-molecule phenols as anxiolytics. *Molecules*, 22(12), 2138. <https://doi.org/10.3390/molecules22122138>
- Zhang, Y., Long, Y., Yu, S., Li, D., Yang, M., Guan, Y., ... & Peng, W. (2020). Natural volatile oils derived from herbal medicines: A promising therapy way for treating depressive disorder. *Pharmacological Research*, 164, 105376. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105376>

3. EXTRACCIÓN DE VAINILLINA Y FENOLES TOTALES CON UN PRETRATAMIENTO ENZIMÁTICO Y DISOLVENTES EUTÉCTICOS PROFUNDOS

RESUMEN

La vainillina es un compuesto fenólico aromático y saborizante de alto valor comercial, cuya obtención a partir de fuentes naturales se ve limitada por el uso de disolventes orgánicos convencionales. Este estudio evaluó una estrategia combinada de pretratamiento enzimático y extracción con disolventes eutécticos profundos, aplicada a vainas beneficiadas de vainilla, en comparación con etanol y metanol. Se realizaron cinéticas enzimáticas con hemicelulasa, celulasa, pectinasa y β -glucosidasa para determinar el tratamiento más eficiente en la liberación de vainillina. Posteriormente, se emplearon los sistemas ácido láctico-fructosa y cloruro de colina-glicerol, con y sin asistencia de ultrasonido. La hemicelulasa presentó su mayor actividad a las 4 h, y su combinación con cloruro de colina-glicerol permitió obtener 7.25 g de vainillina y 21.82 g de fenoles totales por cada 100 g de vaina seca, superando el rendimiento del etanol y metanol sin pretratamiento enzimático. La aplicación de ultrasonido no mostró mejoras significativas. Los resultados evidencian una sinergia efectiva entre enzimas y disolventes verdes como alternativa sostenible para la obtención de extractos naturales con alto contenido de vainillina.

Palabras clave: *Vanilla planifolia*, enzimas hidrolíticas, extracto natural, compuestos fenólicos, vainillina, disolventes eutécticos profundos.

Tesis de Maestría en Ciencias. Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria,
Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Estela Gómez González.

Directora de Tesis: Blanca Elizabeth Hernández Rodríguez, Dra.

EXTRACTION OF VANILLIN AND TOTAL PHENOLS USING ENZYMATIC PRETREATMENT AND DEEP EUTECTIC SOLVENTS

ABSTRACT

Vanillin is an aromatic phenolic compound and flavoring agent of high commercial value, whose extraction from natural sources is limited using conventional organic solvents. This study evaluated a combined strategy of enzymatic pretreatment and extraction using deep eutectic solvents (DES), applied to cured vanilla pods and compared against ethanol and methanol. Enzymatic kinetics were conducted with hemicellulase, cellulase, pectinase, and β -glucosidase to determine the most effective treatment for vanillin release. Subsequently, lactic acid–fructose and choline chloride–glycerol systems were employed, with and without ultrasound assistance. Hemicellulase showed its highest activity at 4 hours, and its combination with choline chloride–glycerol yielded 7.25 g of vanillin and 21.82 g of total phenolics per 100 g of dry pod, outperforming ethanol and methanol extractions without enzymatic pretreatment. Ultrasound application did not result in significant improvements. The findings demonstrate an effective synergy between enzymes and green solvents as a sustainable alternative for obtaining natural extracts with high vanillin content.

Key words: *Vanilla planifolia*, hydrolytic enzymes, natural extract, phenolic compounds, vanillin, deep eutectic solvents.

Master of Science Thesis, Graduate Program in Agri-Food Science and Technology,
Universidad Autónoma Chapingo.

Author: Estela Gómez González.

Thesis advisor: Blanca Elizabeth Hernández Rodríguez, Dra

3.1 Introducción

La vainillina es el principal compuesto aromático de la vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews) y uno de los saborizantes naturales más demandados a nivel mundial por las industrias alimentarias, cosméticas y farmacéuticas (Liaqat et al., 2023). Tradicionalmente, su extracción se ha realizado mediante disolventes orgánicos como etanol o metanol; sin embargo, estos presentan inconvenientes asociados a su toxicidad, volatilidad, baja selectividad y alto impacto ambiental, lo que ha impulsado la búsqueda de métodos más sostenibles y eficientes (Babío Núñez, 2019).

En los últimos años, los disolventes eutécticos profundos (DES) han surgido como una alternativa verde para la extracción de biomoléculas. Estos sistemas se forman al combinar un aceptor y un donador de puentes de hidrógeno en proporciones molares definidas, dando lugar a mezclas con puntos de fusión inferiores a los de sus componentes individuales. Los DES destacan por su baja volatilidad, biodegradabilidad, capacidad de solvatación ajustable y bajo costo. Además, su origen a partir de componentes naturales como ácidos orgánicos, azúcares y aminoácidos refuerza su carácter ambientalmente amigable (Dai et al., 2013; Florindo et al., 2018).

Pese a estos avances, la eficiencia de extracción de vainillina a partir de vainas beneficiadas sigue limitada por la resistencia estructural de la matriz lignocelulósica, donde celulosa, hemicelulosa, lignina y pectinas forman una red compacta que restringe la liberación de compuestos fenólicos. En este contexto, el uso de enzimas hidrolíticas se plantea como una estrategia eficaz para modificar la arquitectura de la pared celular y favorecer la accesibilidad del disolvente. Enzimas como celulasas, hemicelulasas, pectinasas o β -glucosidasas pueden degradar componentes específicos, romper enlaces glucosídicos y liberar vainillina o sus precursores (Gallage & Møller, 2015).

En este estudio se evaluó la eficiencia de distintos pretratamientos enzimáticos (hemicelulasa, celulasa, pectinasa y β -glucosidasa) y su posterior combinación

con sistemas DES de ácido láctico–fructosa y cloruro de colina–glicerol, con y sin asistencia de ultrasonido. El objetivo fue determinar las condiciones que favorecen la liberación de vainillina y compuestos fenólicos totales, aportando evidencia sobre el potencial de las enzimas hidrolíticas y los DES como herramientas sostenibles para la obtención de extractos naturales de vainilla.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Vainas de vainilla beneficiadas

Las vainas de vainilla empleadas fueron obtenidas y beneficiadas mediante un proceso tradicional en Jalpilla, San Luis Potosí, México, ubicado en el rango de latitud norte de 21° 31' a 21° 20', y el rango de longitud oeste de 98° 46' a 98° 58'. El muestreo de las vainas no fue estadístico, sino dirigido.

3.2.2 Reactivos analíticos

Los reactivos utilizados como: carbonato de sodio (Na_2CO_3), ácido clorhídrico (HCl), etanol 95 % ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$), ácido sulfúrico (H_2SO_4) y metanol (CH_3OH) fueron adquiridos de J.T.Baker® (Phillipsburg, NJ, USA); el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$), ácido tánico, quercetina, ácido gálico, Folin-Ciocalteu, decanol ($\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{OH}$), α -amilasa, bromuro de cetiltrimetil amonio (CTAB) ($\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Br}$), ácido acético (CH_3COOH), ácido láctico, cloruro de colina, fructosa, glicerol, y las enzimas: hemicelulasa (H2125), celulasa (C2730), pectinasa (P4716) y β -glucosidasa (G0395) fueron adquiridas de Sigma–Aldrich® (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA); mientras que en Química Meyer® (Química Suastes S.A. de C.V., CDMX, México) se obtuvieron los reactivos: lauril sulfato sodio ($\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{SO}_3^-\text{Na}^+$), borato de sodio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$), fosfato disódico (Na_2HPO_4), ácido sulfúrico (H_2SO_4), hidróxido de sodio (NaOH), ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), acetato de sodio ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$), 3,5 dinitrosalicílico (DNS), tartrato de sodio y potasio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), nitrato de sodio (NaNO_3) y cloruro de aluminio (AlCl_3).

3.2.3 Preparación de las vainas beneficiadas

Las vainas de vainilla se pulverizaron empleando un molino eléctrico (modelo NB-101B, Nutribullet®, China) durante 2 min para disminuir el tamaño de partícula. Posteriormente, se distribuyeron en recipientes de vidrio y desecadas en estufa (modelo HCF-62, RIOSSA, CDMX, México) a 40 °C hasta que su peso permaneció constante. Finalmente, se pulverizaron por segunda vez, obteniendo de esta manera el polvo de vainilla seca (VS).

3.2.4 Análisis químico proximal y fisicoquímico

La composición química proximal de la VS se obtuvo de acuerdo con las siguientes metodologías: humedad (NMX-F- 83-1986); proteína (945.01, AOAC 2002), lípidos (920.35, AOAC 2002); fibra cruda (NMX-F-613-2017); cenizas (NMX-F-066-S-1978); el contenido de carbohidratos se determinó por diferencia. El valor de pH se obtuvo de acuerdo con la NOM-F-317-S-1978. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y el resultado se reportó como el contenido promedio de materia seca $\pm$ desviación estándar.

3.2.5 Determinación del contenido de fibra insoluble

Se realizó un análisis secuencial de fibra siguiendo la metodología descrita por Van Soest y Robertson (1979) con adaptaciones. Se inició con la determinación de fibra detergente neutro (FDN), compuesta de hemicelulosa, celulosa y lignina. Se pesó 1 g de VS (W_o) en una balanza (modelo Adventurer Pro AV313, Ohaus Corporation, Pine Brook, NJ, USA) y se dispersó en 100 mL de solución detergente neutro (DN) pH 7 y la mezcla se mantuvo en agitación constante a 37 °C durante 1 h con 10 mg de enzima α -amilasa. Posteriormente, se incrementó la temperatura a 100 °C durante 75 min en una parrilla (modelo SP131635, Thermo SCIENTIFIC, China). Transcurrido este tiempo, la mezcla se filtró con papel Whatman No. 41 para recuperar el residuo insoluble y se enjuagó con 1 L de agua destilada a 60° C, repitiendo el enjuague 2 veces. Finalmente, el residuo se deshidrató en estufa (modelo HCF-62, RIOSSA, CDMX, México.) a 105 °C

hasta peso constante y se registró como W_{FDN} . Para la preparación de DN se emplearon 30 g de lauril sulfato de sodio, 18.61 g de EDTA, 6.81 g de borato de sodio, 4.56 g de fosfato disódico, 10 mL de decanol y se aforó a 1 L con agua destilada.

Posteriormente, se realizó la determinación de fibra detergente ácido (FDA) donde se solubiliza hemicelulosa y se retiene celulosa y lignina; para ello se empleó el residuo W_{FDN} , el cual se dispersó en 100 mL de disolución detergente ácido (DA). La mezcla se mantuvo en agitación constante a 100 °C durante 60 min en una parrilla (modelo SP131635, Thermo SCIENTIFIC, China). Transcurrido este tiempo, la mezcla se filtró con papel Whatman No. 41 para recuperar el residuo insoluble y se enjuagó con 1 L de agua a 60° C, repitiendo el enjuague 2 veces; posteriormente, se midió el pH de la solución con un potenciómetro (modelo Hi 8424, HANNA, Rumanía), si es ácido se continúan los enjuagues hasta alcanzar un pH neutro. Finalmente, se deshidrató en estufa (modelo HCF-62, RIOSSA, CDMX, México) a 105 °C hasta peso constante y se registró como W_{FDA} . Para la preparación de DA se emplearon 20 g de bromuro de cetiltrimetil amonio (CTAB), 15 ml de ácido sulfúrico 1 N y se aforó a 1 L con agua destilada. El porcentaje de hemicelulosa se calculó empleando la ecuación 1.

$$\% \text{ Hemicelulosa} = (W_{FDN} - W_{FDA}) \times 100 \quad (Ec. 1)$$

Finalmente, se solubilizó la celulosa y se retuvo la lignina, para lo cual se empleó el residuo W_{FDA} y se dispersó en 50 mL de ácido sulfúrico al 72 % (v/v), la mezcla se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente durante 3 h en una parrilla (modelo SP131635, Thermo SCIENTIFIC, China). Transcurrido este tiempo, la mezcla se filtró con papel Whatman No. 41 para recuperar el residuo insoluble y se enjuagó con 1 L de agua a 60 °C, repitiendo el enjuague 2 veces. Finalmente se secó en estufa (modelo HCF-62, RIOSSA, CDMX, México) a 105 °C hasta peso constante y se registró como W_{LIG} . Los porcentajes de celulosa y lignina se calcularon empleando las ecuaciones 2 y 3.

$$\% Celulosa = (W_{FDA} - W_{LIG}) \times 100 \quad (Ec. 2)$$

$$\% Lignina = W_{LIG} \times 100 \quad (Ec. 3)$$

3.2.6 Determinación del contenido de pectina

La pectina se determinó siguiendo la metodología descrita por Kamal et al. (2021). Se pesó 1 g de VS en una balanza (modelo Adventurer Pro AV313, Ohaus Corporation, Pine Brook, NJ, USA) y se dispersó en 50 mL de agua destilada con 30 mL de ácido sulfúrico 0.05 M (pH 2). La mezcla se mantuvo en baño maría a 80 ± 1 °C con agitación constante durante 90 min en una parrilla (modelo SP131635, Thermo SCIENTIFIC, China). Transcurrido este tiempo, la mezcla se filtró con papel Whatman No. 41, separando la fase líquida que contenía la pectina. A dicha fase se le adicionó etanol al 95 % (v/v) en una proporción 1:2 (v/v), agitando suavemente por 3 min y dejando reposar por 1 h para promover la precipitación de pectina, la cual se recuperó por filtración con papel Whatman No. 41 y se enjuagó con 50 mL de agua destilada. Después, se deshidrató empleando una estufa (modelo HCF-62, RIOSSA, CDMX, México) a 50 °C hasta peso constante. Finalmente, se pesó la pectina obtenida y su porcentaje se calculó empleando la ecuación 4.

$$\% Pectina = \left(\frac{\text{peso de la pectina (g)}}{\text{peso de la VS (g)}} \right) \times 100 \quad (Ec. 4)$$

3.2.7 Pretratamientos enzimáticos en vainas beneficiadas de vainilla

Los procesos enzimáticos incluyeron el uso de hemicelulasa, celulasa, pectinasa y β -glucosidasa para incrementar la disponibilidad de la vainillina. Las enzimas se emplearon de acuerdo con las especificaciones indicadas por el proveedor. Las cinéticas de hidrólisis fueron monitoreadas a los tiempos 0, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5 y 6 h, conservando las alícuotas (10 mL) a -20 ± 1 °C. En todos los casos se realizó un tratamiento control sin adición de enzima. Posterior a cada tratamiento enzimático, se realizaron determinaciones espectrofotométricas para cuantificar la vainillina, el contenido de fenoles totales y los azúcares reductores, siguiendo

las metodologías descritas en los apartados 3.3.13, 3.3.14 y 3.3.15, respectivamente. La medición de estos últimos tuvo como propósito verificar la actividad enzimática, evidenciada por la liberación de azúcares como producto de la hidrólisis de la pared celular vegetal.

Hidrólisis con hemicelulasa

Se pesaron 2 g de VS en una balanza (modelo Adventurer Pro AV313, Ohaus Corporation, Pine Brook, NJ, USA) y se dispersaron en 200 mL de amortiguador de citratos pH 4.5 (0.5 M) y en caso necesario se realizó un ajuste de pH con NaOH o HCl 1 M. Una vez que la mezcla alcanzó una temperatura de 40 ± 1 °C, se adicionaron 0.125 g de hemicelulasa por g de VS y la reacción transcurrió por 6 h con agitación continua en una parrilla (modelo SP131635, Thermo SCIENTIFIC, China). Con la finalidad de detener la reacción enzimática, en cada alícuota (10 mL) se adicionó 1.2 mL de HCl 1 M y enseguida se almacenó en congelación hasta el momento de su análisis.

Hidrólisis con celulasa

Se pesaron 2 g de VS en una balanza (modelo Adventurer Pro AV313, Ohaus Corporation, Pine Brook, NJ, USA) y se dispersaron en 200 mL de amortiguador de acetatos 0.5 M (pH 5.5), y en caso necesario, se realizó un ajuste de pH con NaOH o HCl 1M. Una vez que la mezcla alcanzó una temperatura de 37 ± 1 °C, se adicionó 0.1 g de celulasa (CE 3.2.1.4) por g de VS. La reacción transcurrió por 6 h con agitación continua en una parrilla (modelo SP131635, Thermo SCIENTIFIC, China). Con la finalidad de detener la reacción enzimática, en cada alícuota (10 mL) se adicionó 1 mL de HCl 1 M y enseguida se almacenó en congelación hasta el momento de su análisis.

Hidrólisis con pectinasa

Se pesaron 2 g de VS en una balanza (modelo Adventurer Pro AV313, Ohaus Corporation, Pine Brook, NJ, USA) y se dispersaron en 200 mL de amortiguador de citratos 0.5 M (pH 4), y en caso necesario se realizó un ajuste de pH con NaOH

o HCl 1M. Una vez que la mezcla alcanzó una temperatura de 30 ± 1 °C, se adicionaron 0.5 g de pectinasa (CE 3.2.1.15) por g de VS y la reacción transcurrió por 6 h con agitación en una parrilla (modelo SP131635, Thermo SCIENTIFIC, China). Con la finalidad de detener la reacción enzimática, en cada alícuota (10 mL) se adicionó 1.2 mL de HCl 1 M y enseguida se almacenó en congelación hasta el momento de su análisis.

Hidrólisis con β -glucosidasa

Se pesaron 2 g de VS en una balanza (modelo Adventurer Pro AV313, Ohaus Corporation, Pine Brook, NJ, USA) y se dispersaron en 200 mL de amortiguador de acetatos 0.1 M (pH 5) y en caso necesario se realizó un ajuste de pH con NaOH o HCl 1 M. Una vez que la mezcla alcanzó una temperatura de 37 ± 1 °C, se adicionaron 0.025 g de β -glucosidasa (CE 3.2.1.21) por g de VS y la reacción transcurrió por 6 h con agitación continua en una parrilla (modelo SP131635, Thermo SCIENTIFIC, China). Con la finalidad de detener la reacción enzimática, en cada alícuota (10 mL) se adicionó 1 mL de HCl 1 M y enseguida se almacenó en congelación hasta el momento de su análisis.

3.2.8 Micrografías de vainas beneficiadas con pretratamientos enzimáticos

El procedimiento descrito fue realizado en el Laboratorio de Microscopía de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), siguiendo protocolos internos de preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido (SEM). Las muestras fueron colocadas sobre la superficie de soportes de aluminio previamente cubiertos con cinta conductora de carbono. Posteriormente, se recubrieron con una fina capa de oro para mejorar la conductividad eléctrica. Las micrografías se obtuvieron utilizando un microscopio electrónico de barrido (modelo JSM-6360, JEOL, Tokio, Japón), operado a un voltaje de aceleración de 13 kV.

3.2.9 Liofilización de vainas con pretratamiento enzimático

Las muestras se introdujeron en un liofilizador (modelo 7755040, LABCONCO CORPORATION, Kansas City, U.S.A.) a una presión de 0.070 mBar y una temperatura de -53 °C, con la finalidad de preservar los compuestos fenólicos totales de la VS y eliminar el contenido de humedad del amortiguador empleado en el pretratamiento enzimático.

3.2.10 Preparación de los disolventes eutécticos profundos (DES)

Los Disolventes Eutécticos Profundos (DES) se formularon siguiendo las metodologías descritas por González et al. (2017) y Barbieri et al. (2019), con modificaciones. Para su preparación se utilizaron dos aceptores de puentes de hidrógeno - ácido láctico (AL) y cloruro de colina (CC) - y dos donadores de puentes de hidrógeno - fructosa (F) y glicerol (G) -. Los DES obtenidos fueron AL-F (5:1) y CC-G (1:4). En ambos sistemas se adicionó agua en una concentración del 25 % (v/v). Los tratamientos se mantuvieron en agitación continua a 50 °C durante 15 min y posteriormente, se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

3.2.11 Obtención de extractos con DES

La extracción de vainillina con DES se realizó siguiendo la metodología descrita por Barbieri et al. (2019) con modificaciones. En un volumen de 15 mL de disolvente (AL-F, CC-G), se adicionaron 0.75 g de VS con pretratamiento enzimático (liofilizada) o sin pretratamiento enzimático, y la mezcla se maceró en movimiento constante durante 2 h. En ambos casos, se probó el efecto del ultrasonido empleando un sonicador de sonda (modelo Vibracell VC 505, Sonics & Marials, EUA) 6 mm a una amplitud del 40 %, utilizando un baño de hielo para disipar el calor generado en la muestra. Finalmente, la mezcla se centrifugó a 10000 rpm durante 15 min a 4 °C, el sobrenadante se recolectó y almacenó a 4±1 °C hasta su análisis.

3.2.12 Obtención de los extractos alcohólicos

El extracto natural de vainilla se obtuvo con base en la NOM-182-SCFI-2011. Se adicionaron 0.75 g de VS con pretratamiento enzimático (lío-filizada) o sin pretratamiento enzimático, a un volumen de 15 mL de etanol al 75 % (v/v), y la mezcla se maceró con agitación constante durante 2 h. Posteriormente, el extracto se centrifugó a 10 000 rpm durante 15 min a 4 °C, el sobrenadante se recolectó y almacenó a 4 ± 1 °C hasta su análisis. El extracto metanólico se obtuvo de acuerdo con la metodología del extracto etanólico.

3.2.13 Determinación del contenido de vainillina

El contenido de vainillina se determinó siguiendo la metodología descrita por la AOAC 966.12 (1990). Se depositaron 65 µL de cada extracto en un tubo de ensayo y se adicionaron 20 µL de hidróxido de sodio 0.1 N. La mezcla se agitó en vórtex (modelo Genie 2, Scientific Industries SI-0236, EUA) por 3 s. Posteriormente, se realizó lectura a 347 nm con un espectrofotómetro para medir la absorbancia (modelo Genesys 10S UV-VIS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Previamente, fue elaborada una curva estándar de vainillina ($0 - 20 \mu\text{g mL}^{-1}$; $y = 0.0759x + 0.0257$; $R^2 = 0.9959$, en el cual “y” representa la absorbancia medida a 348 nm, y “x” el contenido de vainillina en $\mu\text{g mL}^{-1}$). La concentración de vainillina se presentó como g de vainillina/100 g de vaina seca. Para la determinación de vainillina en los extractos obtenidos con DES, etanol y metanol, se empleó un lector de microplacas Synergy HT (BioTek, Inc., Winooski, VT, EE. UU.).

3.2.14 Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales en extractos de vainilla

Los compuestos fenólicos totales (CFT) se determinaron siguiendo la metodología de Singleton y Rossi (1965), modificada por Gómez-Maldonado et al. (2020). En un tubo de ensayo se colocaron 200 µL de cada uno de los extractos, 1200 µL de agua destilada, 150 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu, y se

reposó durante 3 min. Después, se agregaron 250 μL de carbonato de sodio (15 % p/v), agitándose en vórtex (modelo Genie 2, Scientific Industries SI-0236, EUA) por 3 s y se mantuvo en la oscuridad durante 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, se realizó la lectura con espectrofotómetro a 760 nm (Genesys 10S UV–VIS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Para ello, previamente, se construyó una curva estándar de ácido gálico ($0 - 60 \text{ mg L}^{-1}$; $y = 0.0043x - 0.0434$; $R^2 = 0.99$, siendo “y” la absorbancia medida a 760 nm y “x” el contenido de ácido gálico en mg L^{-1}). La concentración de fenoles totales se presentó en g equivalentes de ácido gálico (EAG)/100 g de vaina. Para la determinación de CFT en los extractos obtenidos con DES, etanol y metanol, se empleó un lector de microplacas Synergy HT (BioTek, Inc., Winooski, VT, EE. UU.).

3.2.15 Determinación de azúcares reductores en extractos de vainilla

Los azúcares reductores se determinaron siguiendo la metodología descrita por Miller (1959). Se mezclaron 100 μL de cada extracto de vainilla en un tubo de ensayo con 100 μL del reactivo DNS. La mezcla se agitó en vórtex (modelo Genie 2, Scientific Industries SI-0236, EUA) por 3 s y se mantuvo en ebullición por 5 min en una parrilla (modelo SP131635, Thermo SCIENTIFIC, China). Transcurrido el tiempo, se sumergió en agua con hielo para generar un choque térmico. Posteriormente, se realizó lectura con espectrofotómetro a 540 nm con un (modelo Genesys 10S UV–VIS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). El reactivo DNS fue elaborado pesando 8 g de hidróxido de sodio en una balanza (modelo Adventurer Pro AV313, Ohaus Corporation, Pine Brook, NJ, USA) y se disolvieron en 200 mL de agua destilada, se agregaron lentamente 150 g de tartrato de sodio y potasio, una vez disuelto, se agregaron 5 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS), manteniendo en agitación durante 12 h. Finalmente, la disolución fue aforada 500 mL y filtrada con papel Whatman No. 41. Para ello, previamente, se preparó una curva estándar de glucosa ($0 - 1 \text{ mg mL}^{-1}$; $y = 2.4672x + 0.1042$; $R^2 = 0.996$, siendo “y” la absorbancia medida a 540 nm, mientras que “x” representa la concentración de glucosa en mg mL^{-1}). Los azúcares reductores contenidos se expresaron en g de glucosa/100 g de vaina

seca. Para la determinación de azúcares reductores en los extractos obtenidos con DES, etanol y metanol, se empleó un lector de microplacas Synergy HT (BioTek, Inc., Winooski, VT, EE. UU).

3.2.16 Actividad antioxidante por inhibición del radical ABTS⁺ en extractos de vainilla

La actividad antioxidante de los extractos de vainilla se determinó siguiendo la metodología descrita por Re et al. (1999) con modificaciones, con base en la estabilidad del catión radical ABTS⁺ (2,2'azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)). Para la generación del radical, se preparó una mezcla de 88 µL de persulfato de potasio 140 mM y 5 mL de ABTS, 7 mM y, la cual fue incubada durante 16 h en oscuridad previo a su uso. Trascurrido el tiempo, la mezcla fue diluida con etanol absoluto, para conseguir una absorbancia a 734 nm de 0.700 ± 0.002 en espectrofotómetro Genesys 10S UV-VIS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Para los estudios, se combinaron 40 µL del extracto de vainilla obtenido en cada tratamiento, y 960 µL de la disolución del radical ABTS⁺. La mezcla reaccionó por 6 min y se realizó la lectura de absorbancia a 734 nm. Se elaboró un blanco constituido por 960 µL de etanol y 40 µL de cada disolvente: etanol, metanol o DES, así como el control que contenía 40 µL de cada disolvente: etanol, metanol o DES, y 960 µL de la disolución del radical ABTS y. El porcentaje de inhibición del radical ABTS⁺ se calculó empleando la ecuación 5. Los resultados se reportaron como el promedio del porcentaje de inhibición del radical ABTS⁺ $\pm$ desviación estándar.

$$\% \text{ Inhibición ABTS} = \left(\frac{A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{control}}} \right) \times 100 \quad (\text{Ec. 5})$$

Donde:

A_{control} = valor del control menos el valor del blanco

A_{muestra} = valor de la muestra menos el valor del blanco

3.2.17 Capacidad reductora de iones férricos (FRAP) extractos de vainilla

La actividad antioxidante de los extractos de vainilla se determinó siguiendo la metodología descrita por Abi-Ayad et al. (2011) con algunas modificaciones. Lo anterior, con base en la reducción de iones férricos (Fe^{3+}) a iones ferrosos (Fe^{2+}) de color azul intenso, en presencia del reactivo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina). El reactivo para medir la capacidad reductora de iones férricos (FRAP), se preparó mezclando 1 mL de TPTZ 30 mM, 1 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 60 μM y 10 mL de amortiguador de acetatos 0.4 M (pH 5). En placas de 96 pocillos se adicionaron 30 μL de extracto de vainilla obtenido en cada tratamiento y 120 μL de reactivo FRAP. Las muestras se incubaron en oscuridad durante 4 min a temperatura ambiente y se realizó la lectura de absorbancia a 590 nm en un lector de microplacas Synergy HT (BioTek, Inc., Winooski, VT, EE. UU.). Se elaboró un blanco con 30 μL de disolvente: etanol, metanol o DES, y 120 μL de Trolox, así como un control con 30 μL de disolvente: metano, etanol, o DES, y 120 μL de reactivo FRAP. Previamente, se elaboró una curva estándar de Trolox ($0 - 1 \mu\text{g mL}^{-1}$; $y = 3.78x - 0.0599$; $R^2 = 0.997$, siendo “y” la absorbancia obtenida a 540 nm, mientras que “x” es la concentración de Trolox en $\mu\text{g mL}^{-1}$). El contenido de actividad antioxidante se obtuvo en equivalentes de Trolox y se reportó en porcentaje.

3.2.18 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado usando un diseño lineal mixto para el análisis de los pretratamientos enzimáticos, un diseño factorial 2x6 para el análisis de los extractos de vainilla, y un diseño completamente al azar (DCA) para el análisis de la capacidad antioxidante (ABTS⁺ y FRAP). Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) y cuando fue pertinente, se aplicó una prueba de Tukey para comparar las medias. Se consideró significativo un $p \leq 0.05$ y todo el procedimiento estadístico se realizó con el software SAS®.

3.3 Resultados y Discusión

3.3.1 Análisis fisicoquímico y químico proximal de vainas beneficiadas de vainilla

El valor de pH obtenido en las vainas de vainilla indica ligera acidez (Cuadro 1) y es coherente con lo reportado por Pérez-Viveros et al. (2025), quienes obtuvieron valores de 3.96 a 5.03 en vainas de cinco regiones de México, incluyendo Jalpilla, SLP, con un rango de pH entre 4.73 y 4.88. Adicionalmente, Luna-Guevara et al. (2016) asocian valores de pH inferiores a 5.5 con vainas de menor calidad, debido a que el beneficiado implica reacciones enzimáticas para desarrollar el perfil aromático deseado, donde la β -glucosidasa es la enzima esencial para la liberación de vainillina y presenta su máxima actividad a pH 6.5, por lo que a valores inferiores disminuye su actividad (Márquez & Waliszewski, 2008).

El contenido de humedad (Cuadro 1) se encuentra dentro del rango establecido por la NOM-182-SCFI-2011 (25–38 % m/m) y es coherente con el 31 % reportado por Pérez-Viveros et al. (2025) para vainas del mismo sitio. Aunque la humedad puede ser variable debido al peso, tamaño, grosor del fruto y su beneficiado, es crucial para su conservación, aroma, flexibilidad y brillo, dado que un alto contenido favorece el desarrollo de microorganismos indeseables, por el contrario, a valores inferiores, se generan vainas quebradizas y opacas (Peña-Barrientos et al., 2022).

El contenido de proteína (Cuadro 1) fue inferior en comparación con el estudio realizado por Pérez-Viveros et al. (2025), quienes reportaron un contenido de proteína para vainas beneficiadas de Jalpilla, SLP, del 9 % (m/m). Mientras que Pérez-Silva et al. (2025), encontraron un contenido inferior (4 % m/m) con respecto a este trabajo en la especie *Vanilla cribbiana*. Esta variabilidad puede estar influenciada por la especie (Pérez-Silva et al., 2025).

El contenido de lípidos (Cuadro 1) es similar a los valores reportados por Pérez-Viveros et al. (2025) para vainas de Jalpilla, SLP, con uno (13 % m/m) y tres

ciclos (16 % m/m) de beneficiado, lo que sugiere un aumento significativo tras los ciclos de beneficiado. Tal incremento ha sido atribuido a las enzimas que catalizan la descomposición de lípidos complejos, liberando ácidos grasos como el oleico, linoleico y palmítico, y con ellos la formación de oleorresinas durante el beneficiado (Ramachandra Rao & Ravishankar, 2000).

El contenido de cenizas (Cuadro 1) se encuentra dentro del rango reportado (7-13 % m/m) por Pérez-Viveros et al. (2025). Las diferencias se atribuyen a la especie, condiciones de crecimiento, características geográficas, composición del suelo y uso de fertilizantes en el manejo agronómico, ya que el contenido de cenizas es proporcional al contenido mineral del fruto (Datta et al., 2019).

El contenido de carbohidratos (Cuadro 1) obtenido es el componente mayoritario de las vainas. Sin embargo, existen pocos reportes sobre la composición químico proximal en donde se mencione este componente. Peña-Barrientos et al. (2022) mencionan que los componentes principales de las vainas son azúcares y fibra.

Cuadro 1. Determinación de pH y composición químico proximal en vainas beneficiadas de vainilla.

pH	Humedad	Proteína*	Lípidos*	Cenizas*	Carbohidratos**
		(g/100 g)			
4.92 ± 0.01	35.68 ± 2.36	6.95 ± 0.15	14.57 ± 0.46	11.03 ± 1.507	67.45 ± 3.65

Los resultados obtenidos son el promedio de 3 repeticiones ± desviación estándar.

*Los resultados se reportan por cada 100 g de materia seca.

**El contenido de carbohidratos se determinó por diferencia.

3.3.2 Contenido de fibra insoluble y pectina en vainas beneficiadas de vainilla

El contenido de polisacáridos (Cuadro 2) representa el 45 % (m/m) del total de carbohidratos obtenidos en este estudio; valor coherente con lo reportado por Pérez-Silva et al. (2025) para la especie *Vanilla cribbiana* (50 % m/m), sin

embargo, se observa que los porcentajes de lignina (14.87 %), hemicelulosa (7.83 %) y celulosa (6.67 %) obtenidos en este trabajo son inferiores a los reportados por dichos autores (26 %, 12 % y 11 %, respectivamente). Esta diferencia puede atribuirse a factores como la madurez fisiológica de los frutos y el proceso de beneficiado, ya que se ha documentado que la deshidratación incrementa la concentración de lignina, reforzando su función de protección estructural y estabilización de compuestos fenólicos (Frei, 2013; Balk et al., 2023; Jung & Deetz, 2013).

La proporción relativamente alta de lignina en comparación con hemicelulosa y celulosa respalda su papel dominante en la arquitectura de la pared celular vegetal. Las hemicelulosas, aunque presentes en menor cantidad, desempeñan un rol clave como agentes acopladores entre las microfibrillas de celulosa, mediante puentes de hidrógeno y enlaces no covalentes. Además, facilitan la interacción entre lignina y celulosa, contribuyendo a la integridad estructural del tejido (Scheller & Ulvskov, 2010). Su heterogeneidad molecular permite modular la resistencia mecánica de la pared celular, otorgando flexibilidad, estabilidad y capacidad de retención hídrica (Berglund et al., 2020), aspectos que podrían estar influenciados por las condiciones de extracción y el estado fisiológico de la muestra analizada.

El bajo contenido de pectina obtenido (0.97 %) se asocia con un estado de madurez avanzado. Las pectinas forman parte de los carbohidratos solubles, tienden a degradarse durante procesos de maduración y deshidratación, tal como ocurre durante el beneficiado. En frutos carnosos son clave para conferir su textura, la concentración es mayor previo al deshidratado, posteriormente, los frutos se tornan más rígidos (Sañudo-Barajas et al., 2008).

Estos análisis sientan las bases sobre la composición estructural de las vainas beneficiadas, así como su impacto en la arquitectura celular y en la funcionalidad del tejido vegetal.

Cuadro 2. Contenido de fibra insoluble y pectina en vainas beneficiadas de vainilla.

Hemicelulosa	Celulosa	Lignina	Pectina
(g / 100 g)			
7.83 ± 0.004	6.67 ± 0.004	14.87 ± 0.029	0.97 ± 0.001

Los resultados obtenidos son el promedio de 3 repeticiones ± desviación estándar.

Los resultados se reportan por cada 100 g de materia seca.

3.3.3 Pretratamientos enzimáticos en vainas beneficiadas de vainilla

Al evaluar el efecto individual de las enzimas: hemicelulasa, celulasa, pectinasa y β-glucosidasa, sobre la liberación de vainillina y compuestos fenólicos totales, se observaron diferencias significativas ($\alpha < 0.05$) con respecto a los tratamientos sin enzimas.

La concentración de vainillina (Figura 11) y de fenoles totales (Figura 12) en el medio de reacción, se incrementó notablemente por el uso de hemicelulasa, en donde se observó a las 4 h de reacción la mayor liberación de estos compuestos. Lo anterior puede atribuirse a la hidrólisis de la hemicelulosa, que actúa como “adherente” entre la lignina y la celulosa, por lo que, al debilitarse la unión, se ve disminuida la resistencia de la pared celular, permitiendo una mayor liberación de los compuestos bioactivos (Scheller & Ulvskov, 2010). Los fenoles interactúan con macromoléculas como proteínas, lípidos y carbohidratos (específicamente polisacáridos) afectando algunas propiedades fisiológicas de los alimentos, incluidas su biodisponibilidad y estabilidad (Shahidi & Athiyappan, 2025). Adicionalmente, diversos estudios han comprobado que los polifenoles pueden adsorberse en la pared celular, debido a la presencia de cadenas laterales de azúcares neutros, al romper estas estructuras, los fenoles quedan libres y aprovechables. Las interacciones entre polisacáridos y compuestos fenólicos se dan principalmente mediante puentes de hidrógeno, así como interacciones electrostáticas e hidrofóbicas (Liu et al., 2021). Aunque los fenoles se localizan principalmente en las vacuolas, separadas de la pared celular por membranas,

Liu et al. (2021), observaron que estas interacciones polisacáridos-fenoles, se intensifican cuando hay daño físico o cuando el fruto entra a la etapa de senescencia. Esto sugiere que, durante el proceso de beneficiado, la vainillina libre puede unirse a los polisacáridos.

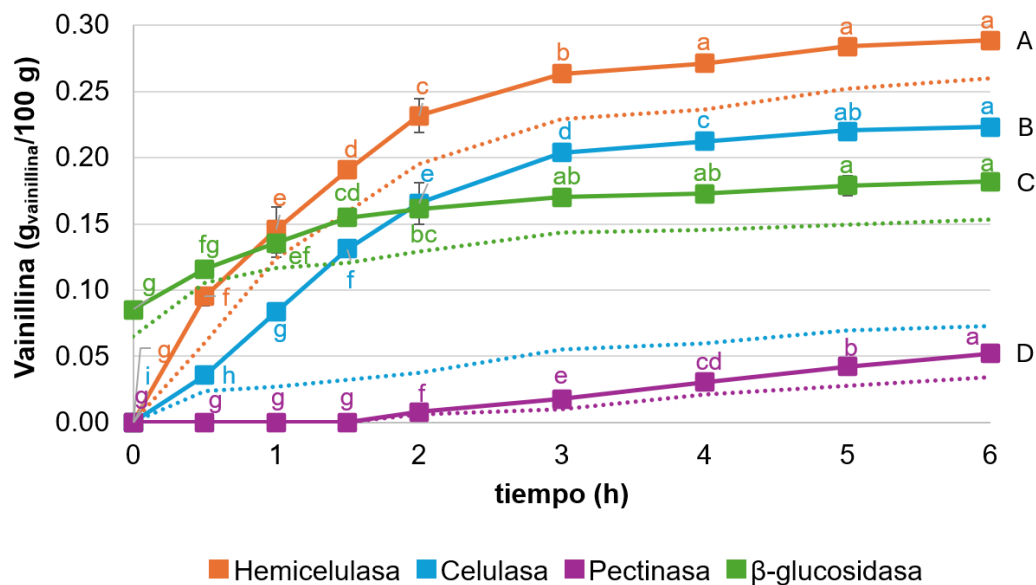


Figura 11. Liberación de vainillina mediante el uso de carbohidrasas. Letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa ($\alpha < 0.05$) entre los tratamientos enzimáticos. Letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa ($\alpha < 0.05$) entre los tiempos de hidrólisis con cada enzima. Líneas punteadas representan el control para cada proceso enzimático.

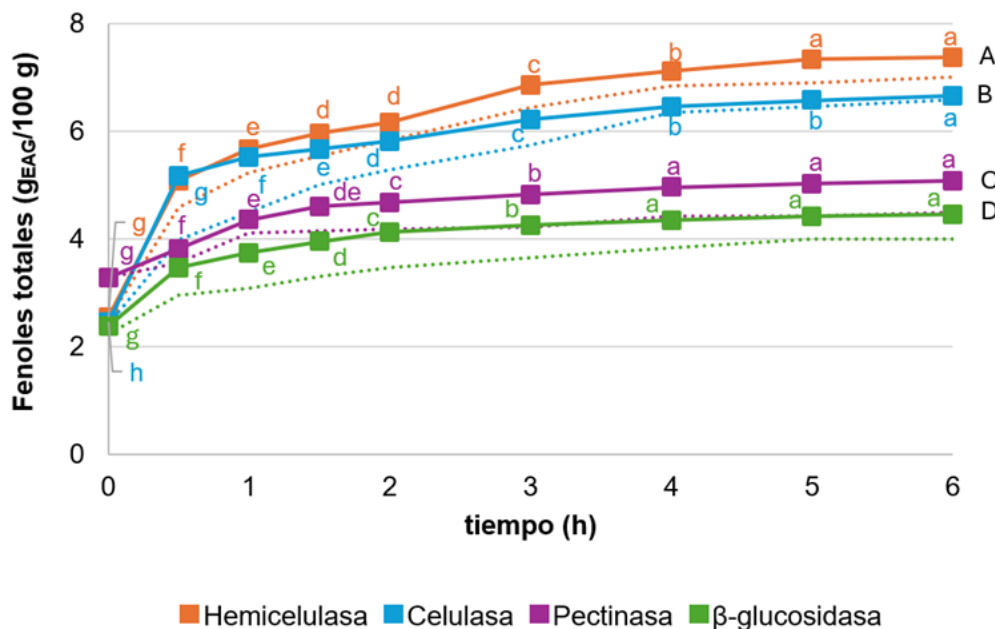


Figura 12. Liberación de fenoles totales mediante el uso de carbohidrasas. Letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa ($\alpha < 0.05$) entre los tratamientos enzimáticos. Letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa ($\alpha < 0.05$) entre los tiempos de hidrólisis con cada enzima. Líneas punteadas representan el control para cada proceso enzimático.

La aplicación de pretratamientos enzimáticos mostró un incremento significativo ($\alpha < 0.05$) en la liberación de azúcares reductores totales, destacando los resultados obtenidos con hemicelulasa (Figura 13). Según Scheller & Ulvskov (2010), este efecto sobre la biomasa lignocelulósica se debe a la actividad de la hemicelulasa sobre los enlaces glicosídicos, lo que permite la liberación de oligosacáridos y monosacáridos reductores como xilosa, arabinosa, manosa, galactosa, glucosa y ramanosa.

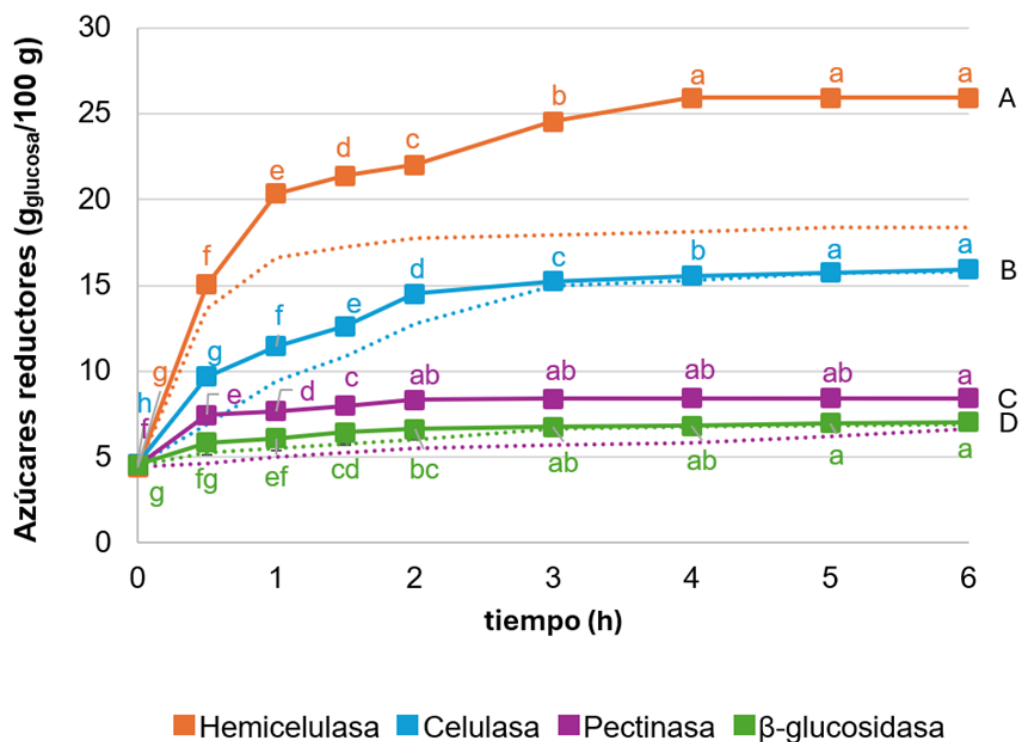


Figura 13. Liberación de azúcares reductores mediante el uso de carbohidrasas. Letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa ($\alpha < 0.05$) entre los tratamientos enzimáticos. Letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa ($\alpha < 0.05$) entre los tiempos de hidrólisis con cada enzima. Líneas punteadas representan el control para cada proceso enzimático.

3.3.4 Micrografías de vainas beneficiadas con pretratamientos enzimáticos

Las micrografías obtenidas de las vainas tratadas con diferentes enzimas (Figura 14) evidenciaron fisuras y desorganización en el epicarpio, en comparación con la muestra sin tratamiento que presentó una superficie lisa y compacta. Estas observaciones sugieren que las enzimas promovieron una ruptura parcial de la pared celular por la degradación de componentes estructurales como hemicelulosas, celulosas y pectinas.

Aunque no existen reportes previos de micrografías de vainas tratadas enzimáticamente, los resultados pueden compararse con los cambios estructurales observados durante el beneficiado tradicional de las vainas. En los estudios de Odoux (2003) y Tapia-Ochoategui et al. (2011), las micrografías de

tejidos: epicarpio, mesocarpio y haz vascular, mostraron encogimiento y colapso celular asociados al tratamiento térmico inicial (marchitamiento) y a la deshidratación durante los ciclos de soleado y sudoración que se dan en el proceso de beneficiado, esto por efecto físico y térmico. Mientras que las enzimas actúan por hidrólisis selectiva de polisacáridos, lo que explica la pérdida de la continuidad en la superficie y la presencia de fisuras.

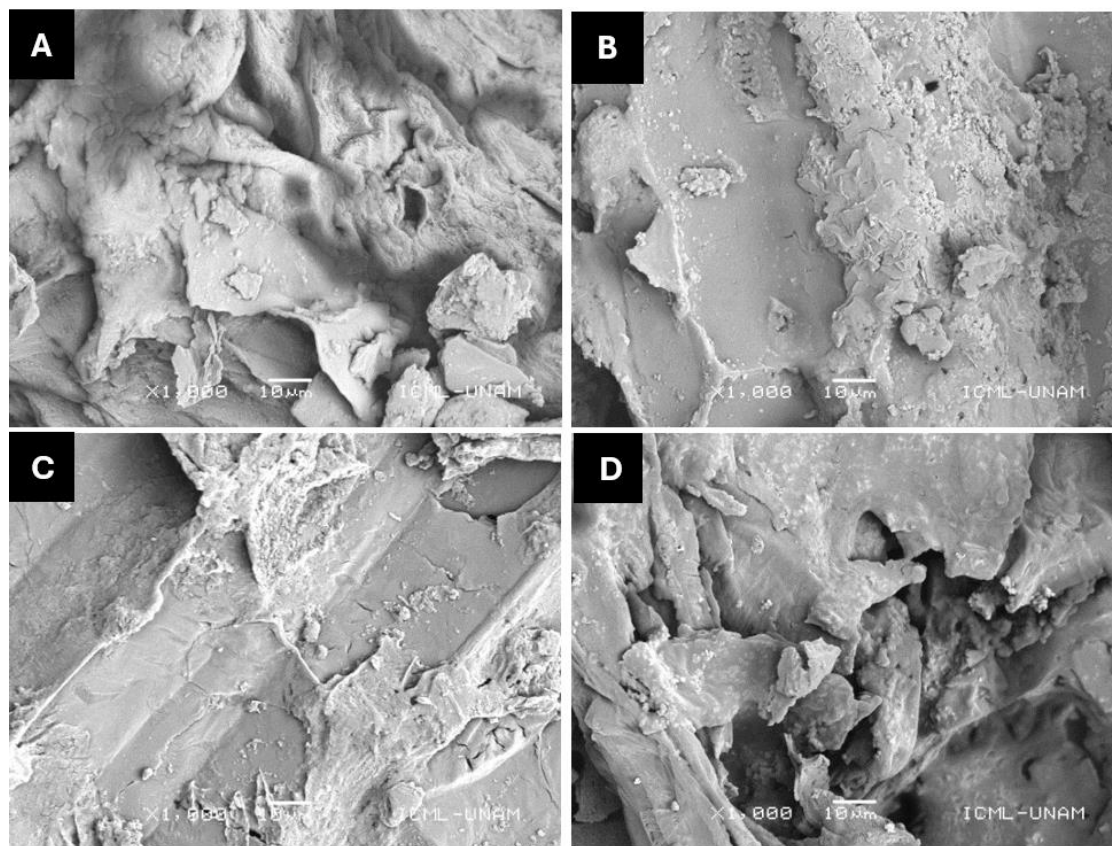


Figura 14. Micrografías de vainas beneficiadas con pretratamiento enzimático. Micrografías obtenidas con SEM. Escala de la barra 10 µm. Sin enzima (A), con hemicelulasa (B), con celulasa (C), con pectinasa (D).

3.3.5 Uso de DES para la extracción de vainillina y compuestos fenólicos totales

Los DES elaborados fueron ácido láctico–fructosa y cloruro de colina–glicerol (Figura 15), a partir de los cuales se obtuvieron los extractos: ácido láctico–

fructosa (AL-F), ácido láctico–fructosa con ultrasonido (AL-F + U), cloruro de colina–glicerol (CC-G) y cloruro de colina–glicerol con ultrasonido (CC-G + U). Asimismo, se obtuvieron extractos alcohólicos con etanol (EtOH) y metanol (MtOH) (Figura 16). Todos los extractos se obtuvieron con y sin pretratamiento enzimático con hemicelulasa.

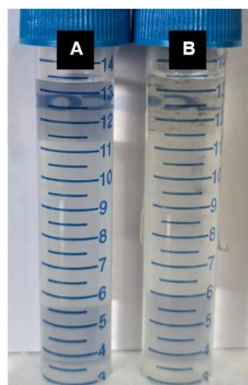


Figura 15. Disolventes eutécticos profundos. Cloruro de colina-glicerol (A), ácido láctico-fructosa (B).

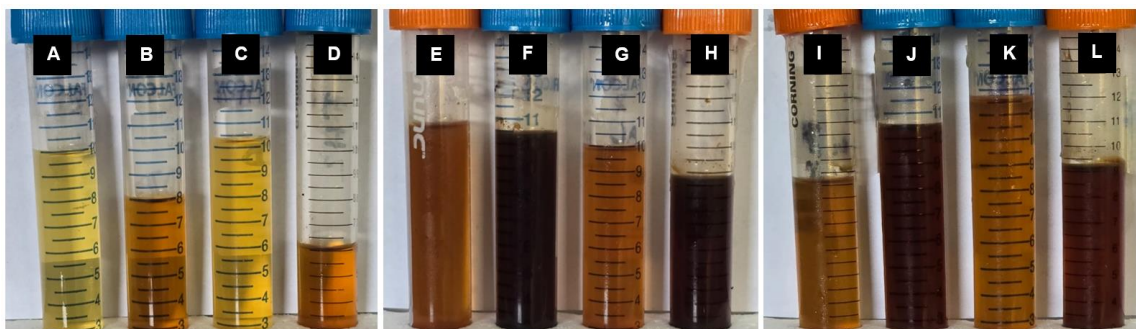


Figura 16. Extractos de vainilla. Etanol sin hemicelulasa (A), etanol con hemicelulasa (B), metanol sin hemicelulasa (C), metanol con hemicelulasa (D), ácido láctico-fructosa sin hemicelulasa (E), ácido láctico-fructosa con hemicelulasa (F), ácido láctico-fructosa sin hemicelulasa con ultrasonido (G), ácido láctico-fructosa con hemicelulasa y ultrasonido (H), cloruro de colina-fructosa sin hemicelulasa (I), cloruro de colina-fructosa con hemicelulasa (J), cloruro de colina-fructosa sin hemicelulasa con ultrasonido (K), cloruro de colina-fructosa con hemicelulasa y ultrasonido (L).

Al probar el efecto de los disolventes sobre la extracción de vainillina y compuestos fenólicos totales, se observó que los extractos obtenidos (Cuadro 3)

presentaron diferencias significativas ($\alpha < 0.05$) con respecto a los controles y entre ellos. En general, aquellos extractos obtenidos a partir de vainas sin pretratamiento enzimático mostraron menor concentración de vainillina y fenoles totales en comparación con los obtenidos de vainas pretratadas con hemicelulasa. La concentración de vainillina obtenida (1.15 %) empleando etanol (EtOH) como medio de extracción en vainas sin pretratamiento con hemicelulasa (método convencional) fue inferior al valor reportado por Pérez-Viveros et al. (2025) (2.17 %) para vainas del sitio Jalpilla, SLP. Por otro lado, el metanol (MtOH), reconocido por su alta polaridad y eficacia de extracción, mostró concentraciones de vainillina (1.40 %) cercanas a las reportadas por González et al. (2017) (1.7 %). Estos datos se tomaron como referencia para comparar la capacidad de extracción de los DES probados en este estudio, mostrando que pueden igualar al EtOH y MtOH en la extracción de vainillina, y superarlos en lo que se refiere a la extracción de fenoles totales (Cuadro 3).

Los resultados obtenidos con DES no concuerdan con González et al. (2017) quienes reportaron al sistema AL-F como el más eficiente para extraer vainillina (2.3 % m/m) y al sistema CC-G con menor eficiencia (1.6 % m/m). Estas diferencias se atribuyen a la distinta relación molar que emplearon para CC-G (1:1) y la ausencia de agua en ambos DES, la cual disminuye la viscosidad del medio e incrementa la capacidad de difusión hacia la matriz vegetal (Lazović et al., 2022). Además, se observó que el pretratamiento enzimático con hemicelulasa, contribuyó en el proceso de extracción, lo que confirma un efecto sinérgico entre la acción enzimática y el disolvente.

En cuanto al uso de ultrasonido, los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas ($\alpha < 0.05$) entre los tratamientos aplicados con y sin esta técnica. Si bien, el ultrasonido se considera una técnica no térmica, el colapso de burbujas genera microzonas de alta temperatura que degradan a los compuestos fenólicos si el tiempo de uso no es adecuado (Kobus et al., 2021; Anaya-Esparza et al., 2018).

Cuadro 3. Contenido de vainillina y fenoles totales en extractos de vainilla.

Pretratamiento	Disolvente	Vainillina	Fenoles Totales
		(g _{vainillina} /100 g)	(g _{EAG} /100 g)**
Sin hemicelulasa	EtOH	1.15 ± 0.00 bc	3.35 ± 0.57 f
	MtOH	1.40 ± 0.02 bc	3.21 ± 0.57 f
	AL-F	0.51 ± 0.03 c	2.23 ± 0.42 ghi
	AL-F + U	0.50 ± 0.02 c	2.69 ± 0.09 fgh
	CC-G	0.33 ± 0.02 c	1.65 ± 0.55 i
	CC-G + U	0.37 ± 0.00 c	2.75 ± 0.00 fg
	EtOH	5.77 ± 0.03 a	15.13 ± 0.47 c
Con hemicelulasa*	MtOH	6.06 ± 0.02 a	12.56 ± 0.15 d
	AL-F	2.12 ± 0.03 bc	4.18 ± 0.07 e
	AL-F + U	2.65 ± 0.07 b	4.54 ± 0.39 e
	CC-G	7.35 ± 0.07 a	21.82 ± 0.16 a
	CC-G + U	6.79 ± 0.16 a	19.43 ± 0.44 b

Los resultados obtenidos son el promedio de 3 repeticiones ± desviación estándar.

Los resultados se reportan por cada 100 g de materia seca.

*La hidrólisis enzimática se desarrolló durante 4 h en amortiguador de citratos, pH 4.5 (0.5 M).

EtOH: etanol, MtOH: metanol, AL-F: ácido láctico-fructosa, ácido láctico-fructosa con ultrasonido: AL-F + U, cloruro de colina-glicerol: CC-G, cloruro de colina-glicerol con ultrasonido: CC-G + U

**EAG: Equivalentes de ácido gálico.

Los resultados obtenidos confirman el potencial de los DES como una alternativa sustentable y eficaz para la extracción de vainillina y compuestos fenólicos totales a partir de vainas beneficiadas de *Vanilla planifolia*. Los DES evaluados mostraron un desempeño comparable o superior al de disolventes convencionales, y en combinación con el pretratamiento enzimático, evidenció un efecto sinérgico que favorece la liberación de compuestos bioactivos, representando un avance tecnológico en el aprovechamiento de matrices vegetales complejas. Desde el punto de vista ambiental y de salud, el empleo de DES formulados con componentes biodegradables y de baja toxicidad reduce la

exposición a solventes nocivos, mientras que, en términos económicos, su bajo costo y disponibilidad los posicionan como una alternativa viable para el desarrollo de procesos extractivos más limpios y sostenibles.

3.3.6 Capacidad antioxidante ABTS⁺ y FRAP

Al evaluar la capacidad antioxidante de los extractos de vainilla (Figura 17), se observaron diferencias significativas ($\alpha < 0.05$) entre los extractos y los métodos de ensayo (ABTS⁺ y FRAP). En el ensayo ABTS⁺, los mayores porcentajes de inhibición se obtuvieron con MtOH con y sin pretratamiento enzimático, y con AL-F, alcanzando 97 %, 94 % y 96 %, respectivamente. En el ensayo FRAP, el valor más alto correspondió a MtOH con pretratamiento enzimático (73 %), seguido de AL-F + U y AL-F (57 % y 56 %, respectivamente). Los extractos obtenidos con CC-G mostraron los valores más bajos en ambos ensayos. Estos resultados difieren de lo reportado por De Jesús Bernal-Millán et al. (2023) en extractos de vainilla, quienes reportaron para CC-G una inhibición del 50 % frente al radical ABTS⁺ y una capacidad reductora (FRAP) del 15 %, valores considerablemente mayores a los obtenidos en el presente estudio (7 % para ambos ensayos).

Ivanović et al. (2022), señalaron que los propios DES pueden intervenir en los mecanismos de acción antioxidante y afectar la medición de los compuestos extraídos. Por ello, se evaluó la capacidad antioxidante de los controles, observándose que los DES por sí solos presentaron actividad antioxidante. En el ensayo ABTS⁺ los valores obtenidos fueron de 0.67 %, 0.67 %, 0.64 % y 0.36 % de inhibición para MtOH, AL-F, EtOH y CC-G, respectivamente. En el ensayo FRAP, se registraron 0.95 %, 0.87 %, 0.80 % y 0.05 % de capacidad reductora para MtOH, AL-F, EtOH y CC-G, respectivamente, lo que demuestra que los DES influyen en la capacidad antioxidante del extracto. Estos resultados son coherentes con lo señalado por Ivanović et al. (2022), quienes mencionan que los DES formados por ácido láctico tienden a mostrar mayor capacidad antioxidante en el ensayo FRAP, debido al pH ácido del medio de reacción, entorno que favorece la reducción del hierro (III)-tripiridiltriazina (Fe³⁺-TPTZ) a hierro (II)-tripiridiltriazina (Fe²⁺-TPTZ), incrementando la respuesta antioxidante.

Estos ensayos se emplearon debido a que ambos se basan en mecanismos distintos y complementarios, de esta manera se obtiene una visión mas amplia del comportamiento antioxidante de los extractos, no solo se considera la inhibición de radicales con ABTS, sino también la capacidad de los compuestos para actuar como agentes reductores mediante FRAP, un aspecto relevante en sistemas alimentarios donde los procesos oxidativos involucran múltiples reacciones redox (Prior et al., 2005).

De manera general, no se observó correlación entre el contenido de vainillina, los fenoles totales y la capacidad antioxidante de los extractos.

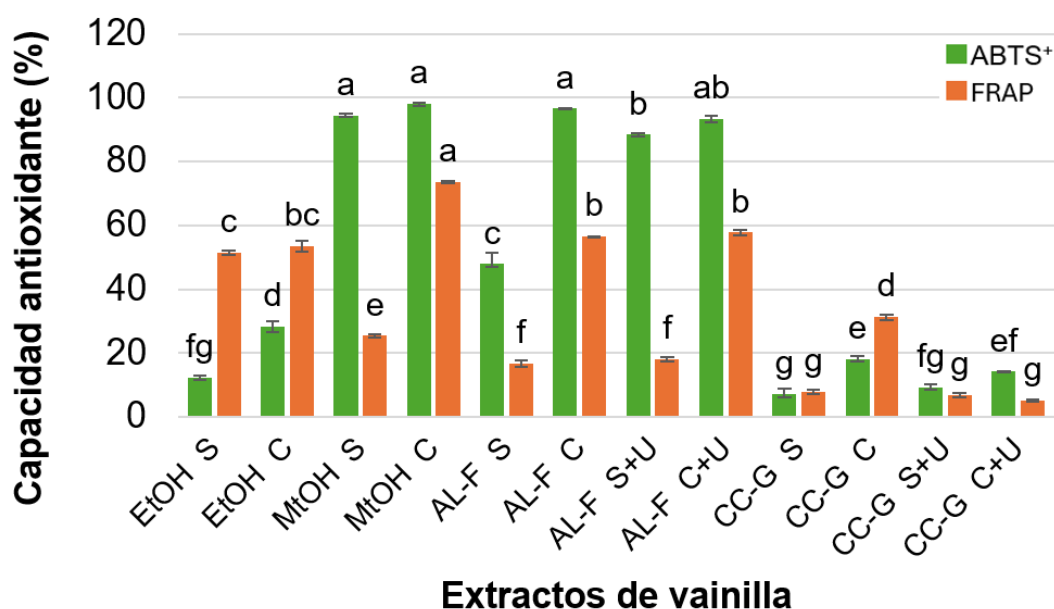


Figura 17. Capacidad antioxidante ABTS⁺ y FRAP en extractos de vainilla. Letras diferentes indican diferencia significativa ($\alpha < 0.05$) entre la capacidad antioxidante de cada extracto.

3.4 Conclusiones

Las vainas beneficiadas de vainilla presentaron un valor de pH ligeramente ácido, no deseable porque sugiere una actividad enzimática (β -glucosidasa) limitada durante el proceso de beneficiado, con posibles implicaciones en la liberación de

compuestos aromáticos como la vainillina. No obstante, este valor de pH coincide con lo reportado en estudios previos para vainilla en distintas regiones de México. El contenido de humedad se mantuvo dentro del rango permitido por normativas nacionales, favoreciendo tanto la conservación como la calidad física del producto. En cuanto a la composición químico-proximal, se observaron diferencias respecto a investigaciones similares, atribuibles a variaciones en la especie, condiciones de cultivo y proceso de beneficiado. Los carbohidratos son los constituyentes mayoritarios en las vainas, especialmente la fibra insoluble conformada por lignina, hemicelulosa y celulosa. En conjunto, estos resultados aportan conocimiento sobre la composición de la pared celular, lo que representa una base fundamental para desarrollar procesos de extracción de compuestos bioactivos.

Los pretratamientos enzimáticos demostraron ser una estrategia efectiva para favorecer la liberación de vainillina y compuestos fenólicos presentes en las vainas beneficiadas. La hemicelulasa destacó por su capacidad para desestabilizar la estructura lignocelulósica, promoviendo una mayor disponibilidad de los metabolitos de interés.

Los disolventes eutécticos profundos (DES) empleados en combinación con el pretratamiento con hemicelulasa, representan un método eficaz y sustentable para la extracción de vainillina y compuestos fenólicos totales en *Vanilla planifolia*. El sistema cloruro de colina-glicerol mostró una eficiencia de extracción comparable al metanol y superior al etanol, mientras que el efecto sinérgico entre enzimas y DES confirmó su potencial en procesos extractivos más eficientes, seguros y ambientalmente responsables.

Adicionalmente, el metanol (MtOH) y el ácido láctico-fructosa (AL-F) fueron los disolventes que permitieron obtener los extractos con mayor actividad antioxidante. Es importante mencionar que los DES mostraron actividad antioxidante intrínseca, especialmente los formulados con ácido láctico. Además, no se observó correlación directa entre el contenido de vainillina, fenoles totales

y la capacidad antioxidante, lo que sugiere que existen otros factores que influyen en la respuesta antioxidante.

En términos generales, tenemos el compromiso de desarrollar procesos que sean ambientalmente responsables y funcionales para la industria. En términos generales, tenemos el compromiso de desarrollar procesos que sean ambientalmente responsables y funcionales para la industria. Las enzimas, por su carácter biodegradable, representan una herramienta eficaz para optimizar procesos, reducir la cantidad de subproductos y mejorar la calidad de los ingredientes de la industria de alimentos sin recurrir al uso de sustancias químicas tóxicas o que tengan repercusiones en el medio ambiente. En el contexto de la sostenibilidad alimentaria, su aplicación permite transformaciones bioquímicas limpias y eficientes. Por otro lado, la generación de residuos derivados del uso de disolventes orgánicos volátiles puede mitigarse mediante el empleo de disolventes sostenibles y biorenovables. Las mezclas eutécticas de bajo punto de fusión destacan por su baja toxicidad, alta biodegradabilidad y mínima huella ecológica, además de ofrecer una gran versatilidad composicional. No obstante, su aplicación en síntesis orgánica aún requiere mayor investigación para comprender su interacción con compuestos bioactivos.

3.5 Literatura citada

- Abi-Ayad, M., Abi-Ayad, F. Z., Lazzouni, H. A., Rebiahi, S. A., Ziani_Chérif, C., & Bessiere. (2011). Chemical composition and antifungal activity of aleppo pine essential oil. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(22), 5433-5436. <https://doi.org/10.5897/jmpr.9000340>
- Anaya-Esparza, L. M., Ramos-Aguirre, D., Zamora-Gasga, V. M., Yahia, E., & Montalvo-González, E. (2018). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from *Justicia spicigera* leaves. *Food Science and Biotechnology*, 27(4), 1093-1102. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0350-0>
- AOAC 966.12 (1990). *Official methods of analysis* (16th ed.). Association of Official Analytical Chemists.

- AOAC International. (2002). *Official methods of analysis* (17th ed.). Association of Official Analytical Chemists.
- Babío Núñez, B. (2019). Extracción de vainillina y ácido vainílico empleando disolventes eutécticos profundos (Tesis de maestría, Universidad Politécnica de Madrid). Recuperado de: <https://oa.upm.es/id/eprint/65458/>
- Balk, M., Sofia, P., Neffe, A. T., & Tirelli, N. (2023). Lignin, the lignification process, and advanced, lignin-based materials. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(14), 11668. <https://doi.org/10.3390/ijms241411668>
- Barbieri, J. B., Goltz, C., Cavaleiro, F. B., Toci, A. T., Igarashi-Mafra, L., & Mafra, M. R. (2019). Deep eutectic solvents applied in the extraction and stabilization of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) phenolic compounds. *Industrial Crops and Products*, 144, 112049. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.112049>
- Beckman, C. H. (2000). Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defense responses in plants? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57(3), 101-110. <https://doi.org/10.1006/pmpp.2000.0287>
- Berglund, J., Mikkelsen, D., Flanagan, B. M., Dhital, S., Gaunitz, S., Henriksson, G., ... & Vilaplana, F. (2020). Wood hemicelluloses exert distinct biomechanical contributions to cellulose fibrillar networks. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18390-z>
- Buitimea-Cantúa, G. V., Chávez-Leal, V., Soto-Caballero, M. C., Tellez-Medina, D. I., Welti-Chanes, J., & Escobedo-Avellaneda, Z. (2023). Enzymatic activity and its relationships with the total phenolic content and color change in the high hydrostatic pressure-assisted curing of vanilla bean (*Vanilla planifolia*). *Molecules*, 28(22), 7606. <https://doi.org/10.3390/molecules28227606>
- Dai, Y., Van Spronsen, J., Witkamp, G., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2013). Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica Chimica Acta*, 766, 61-68. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.019>
- Datta, S., Sinha, B., Bhattacharjee, S., & Seal, T. (2019). Nutritional composition, mineral content, antioxidant activity and quantitative estimation of water soluble vitamins and phenolics by RP-HPLC in some lesser used wild edible plants. *Heliyon*, 5(3), e01431. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01431>
- De Jesús Bernal-Millán, M., Del Carmen Carrasco-Portugal, M., Heredia, J. B., De Jesús Bastidas-Bastidas, P., Gutiérrez-Grijalva, E. P., León-Félix, J., & Angulo-Escalante, M. Á. (2023). Green extracts and UPLC-TQS-MS/MS profiling of flavonoids from mexican oregano (*Lippia graveolens*) using natural deep eutectic solvents/ultrasound-assisted and supercritical fluids. *Plants*, 12(8), 1692. <https://doi.org/10.3390/plants12081692>

- Florindo, C., Romero, L., Rintoul, I., Branco, L. C., & Marrucho, I. M. (2018). From phase change materials to green solvents: hydrophobic low viscous fatty acid-based deep eutectic solvents. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 6(3), 3888-3895. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b04235>
- Frei, M. (2013). Lignin: characterization of a multifaceted crop component. *The Scientific World Journal*, 2013(1). <https://doi.org/10.1155/2013/436517>
- Gallage, N. J., & Møller, B. L. (2015). Vanillin—bioconversion and bioengineering of the most popular plant flavor and its de novo biosynthesis in the vanilla orchid. *Molecular Plant*, 8(1), 40-57. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.11.008>
- Gómez-Maldonado, D., Lobato-Calleros, C., Aguirre-Mandujano, E., Leyva-Mir, S. G., Robles-Yerena, L., & Vernon-Carter, E. J. (2020). Antifungal activity of mango kernel polyphenols on mango fruit infected by anthracnose. *LWT*, 126, 109337. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109337>
- González, C. G., Mustafa, N. R., Wilson, E. G., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2017). Application of natural deep eutectic solvents for the “green” extraction of vanillin from vanilla pods. *Flavour and Fragrance Journal*, 33(1), 91-96. <https://doi.org/10.1002/ffj.3425>
- Ivanović, M., Grujić, D., Cerar, J., Razboršek, M. I., Topalić-Trivunović, L., Savić, A., Kočar, D., & Kolar, M. (2022). Extraction of bioactive metabolites from achillea millefolium L. with choline chloride based natural deep eutectic solvents: a study of the antioxidant and antimicrobial activity. *Antioxidants*, 11(4), 724. <https://doi.org/10.3390/antiox11040724>
- Jadhav, D., BN, R., Gogate, P. R., & Rathod, V. K. (2009). Extraction of vanillin from vanilla pods: a comparison study of conventional Soxhlet and ultrasound assisted extraction. *Journal of Food Engineering*, 93(4), 421-426. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.02.007>
- Jung, H. G., & Deetz, D. A. (2013). Cell wall lignification and degradability. *En ASSA, CSSA and SSSA*, 315-346. <https://doi.org/10.2134/1993.foragecellwall.c13>
- Kuras, M., Stefanowska-Wronka, M., Lynch, J. M., & Zobel, A. M. (1999). Cytochemical localization of phenolic compounds in columella cells of the root cap in seeds of brassica napus—changes in the localization of phenolic compounds during germination. *Annals of Botany*, 84(2), 135-143. <https://doi.org/10.1006/anbo.1999.0884>
- Kamal, M. M., Kumar, J., Mamun, M. A. H., Ahmed, M. N. U., Shishir, M. R. I., & Mondal, S. C. (2021). Extraction and characterization of pectin from *Citrus sinensis* peel. *Journal of Biosystems Engineering*, 46(1), 16-25. <https://doi.org/10.1007/s42853-021-00084-z>
- Kobus, Z., Krzywicka, M., Pecyna, A., & Buczaj, A. (2021). Process efficiency and energy consumption during the ultrasound-assisted extraction of bioactive

- substances from hawthorn berries. *Energies*, 14(22), 7638. <https://doi.org/10.3390/en14227638>
- Lazović, M., Cvijetić, I., Jankov, M., Milojković-Opsenica, D., Trifković, J., & Ristivojević, P. (2022). Efficiency of natural deep eutectic solvents to extract phenolic compounds from *Agrimonia eupatoria*: experimental study and in silico modelling. *Plants*, 11(18), 2346. <https://doi.org/10.3390/plants11182346>
- Liaqat, F., Xu, L., Khazi, M. I., Ali, S., Rahman, M. U., & Zhu, D. (2023). Extraction, purification, and applications of vanillin: a review of recent advances and challenges. *Industrial Crops and Products*, 204, 117372. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.117372>
- Liu, W., Feng, Y., Yu, S., Fan, Z., Li, X., Li, J., & Yin, H. (2021). The Flavonoid Biosynthesis Network in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12824. <https://doi.org/10.3390/ijms222312824>
- Luna-Guevara, J. J., Luna-Guevara, M. L., Amador-Espejo, G. G., Herrera-Cabrera, B. E., Arévalo-Galarza, M. L., & Ruiz-Espinosa, H. (2016). Caracterización fisicoquímica y sensorial de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews con diferentes esquemas de beneficiado. *Agroproductividad*, 9(1), 34–40.
- Márquez, O., & Waliszewski, K. N. (2008). The effect of thermal treatment on β -glucosidase inactivation in vanilla bean (*Vanilla planifolia* Andrews). *International Journal of Food Science & Technology*, 43(11), 1993-1999. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2008.01804.x>
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- NMX-F-066-S-1978. Determinación de cenizas en alimentos.
- NMX-F-613-2017. Determinación de fibra cruda en alimentos.
- NMX-F-083-1986. Determinación de humedad en productos alimenticios.
- NOM-F-317-S-1978. Determinación de pH en Alimentos.
- NOM-182-SCFI-2011. Vainilla de Papantla, extractos y derivados-especificaciones, información comercial y métodos de ensayo.
- Odoux, E. (2003). Localization of -D-glucosidase activity and glucovanillin in vanilla bean (*Vanilla planifolia* Andrews). *Annals of Botany*, 92(3), 437-444. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg150>
- Peña-Barrientos, A., De J Perea-Flores, M., Martínez-Gutiérrez, H., Patrón-Soberano, O. A., González-Jiménez, F. E., Vega-Cuellar, M. Á., & Dávila-Ortiz, G. (2022). Physicochemical, microbiological, and structural relationship of vanilla beans (*Vanilla planifolia* Andrews) during traditional curing process and use of its waste. *Journal of Applied Research On*

- Pérez-Silva, A., Peña-Mojica, E., Ortega-Galeana, A., López-Cruz, J. I., Ledesma-Escobar, C. A., Rivera-Rivera, M., & Paz-Gamboa, E. (2025). Maya vanilla (*Vanilla cribbiana* Soto Arenas): a new species in commerce. *Plants*, 14(3), 300. <https://doi.org/10.3390/plants14030300>
- Pérez Viveros, I. J. (2023). *Atributos de valorización y diferenciación en vainilla (Vanilla planifolia Andrews), de regiones productoras de México* (Tesis de maestría, Universidad Autónoma Chapingo).
- Perez-Viveros, I. J., García-Barrón, S. E., Hernández-Rodríguez, B. E., Barrera-Rodríguez, A. I., Acero-Ortega, C. A., & Espejel-García, A. (2025). Influence of traditional vanilla curing on its physicochemical properties and aromatic profile. *Foods*, 14(9), 1652. <https://doi.org/10.3390/foods14091652>
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290-4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>
- Ramachandra Rao, S., & Ravishankar, G. (2000). Sabor a vainilla: producción por rutas convencionales y biotecnológicas. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(3), 289–304. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(200002\)80:33.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(200002)80:33.0.CO;2-3)
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3)
- Sañudo-Barajas, J. A., Siller-Cepeda, J., Osuna-Enciso, T., Muy-Rangel, D., López-Álvarez, G., Osuna-Castro, J. A., Greve, C., & Labavitch, J. (2008). Solubilización y despolimerización de pectinas durante el ablandamiento de frutos de papaya. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 31(2), 149. <https://doi.org/10.35196/rfm.2008.2.149>
- Scheller, H. V., & Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, 61(1), 263-289. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112315>
- Shahidi, F., & Athiyappan, K. D. (2025). Polyphenol-polysaccharide interactions: molecular mechanisms and potential applications in food systems – a comprehensive review. *Food Production Processing and Nutrition*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s43014-025-00322-3>
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144.
- Tapia-Ochoategui, A. P., Camacho-Díaz, B. H., Perea-Flores, M. J., Ordóñez-Ruíz, I. M., Gutiérrez-López, G. F., & Dávila-Ortiz, G. (2011). *Cambios*

morfométricos durante el beneficio tradicional de las vainas de vainilla (Vanilla planifolia; Orchidaceae) en México. Revista Mexicana de Ingeniería Química, 10(1), 105–115. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/620/62019843011.pdf>

- Van Soest, P., & Robertson, J. (1979). *Systems of analysis for evaluating fibrous feeds*. En W. J. Pigden, C. C. Balch, & M. Graham (Eds.), *Standardization of analytical methodology for feeds: Proceedings of a workshop held in Ottawa, Canada, 12–14 March 1979* (pp. 58–60). International Development Research Centre (IDRC).
- Wink, M. (1999). Compartmentation of secondary metabolites and xenobiotics in plant vacuoles. In *Advances in Botanical Research* (Vol. 25, pp. 141–169). Academic Press.

4. CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados obtenidos en esta investigación aportan evidencia sólida sobre el potencial de estrategias combinadas para la extracción eficiente y sustentable de compuestos bioactivos en *Vanilla planifolia*. La caracterización químico-proximal reveló que los carbohidratos, especialmente la fibra insoluble compuesta por lignina, hemicelulosa y celulosa, son los principales constituyentes de las vainas. Este hallazgo proporciona una base estructural clave para comprender las barreras físicas en la liberación de metabolitos, y orienta el diseño de procesos extractivos más eficaces.

Los pretratamientos enzimáticos demostraron ser una herramienta valiosa para modificar la matriz lignocelulósica y facilitar la liberación de vainillina y compuestos fenólicos. En particular, la hemicelulasa mostró una alta capacidad para desestabilizar la estructura vegetal, incrementando la disponibilidad de los compuestos de interés.

La combinación de enzimas con disolventes eutécticos profundos (DES) demostró ser una estrategia eficaz y sostenible para la extracción de compuestos bioactivos. El sistema cloruro de colina-glicerol mostró una eficiencia similar al metanol y superior al etanol, mientras que el efecto sinérgico con enzimas reforzó su potencial como alternativa verde. Los DES con ácido láctico también aportaron actividad antioxidante propia, aunque no se evidenció una relación directa entre la vainillina, los fenoles totales y dicha actividad, lo que indica la posible participación de otros compuestos.

Desde una perspectiva integral, esta tesis reafirma el compromiso con el desarrollo de tecnologías limpias, funcionales y alineadas con los principios de sostenibilidad alimentaria. Las enzimas, por su carácter biodegradable, ofrecen ventajas significativas en la optimización de procesos sin recurrir a sustancias tóxicas. Por su parte, los DES destacan por su baja toxicidad, alta biodegradabilidad y versatilidad composicional, lo que los posiciona como disolventes biorenovables con gran potencial. No obstante, su aplicación en síntesis orgánica requiere mayor investigación para comprender plenamente sus interacciones con compuestos bioactivos.

5. ANEXOS

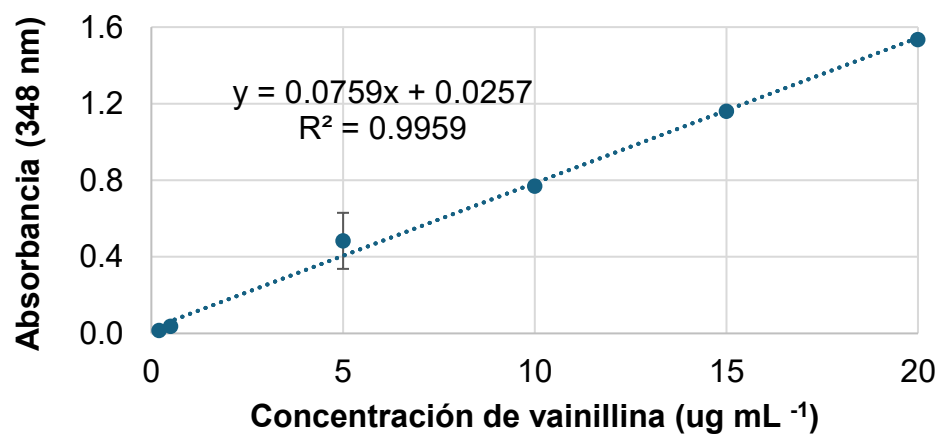


Figura 18. Curva estándar de vainillina.

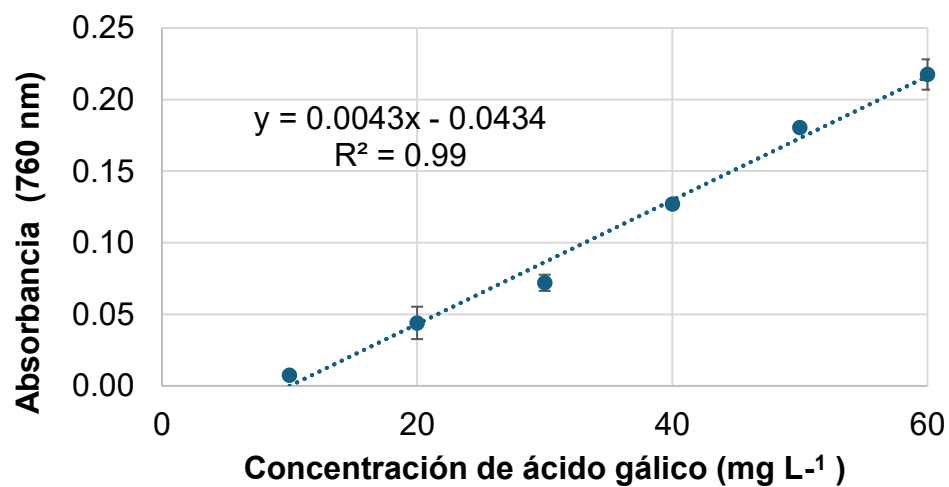


Figura 19. Curva estándar de ácido gálico.

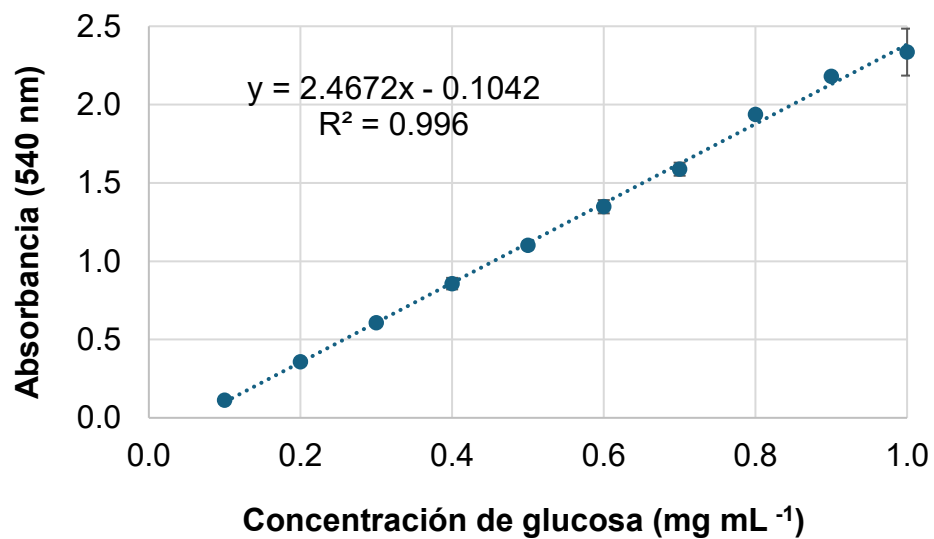


Figura 20. Curva estándar de glucosa.

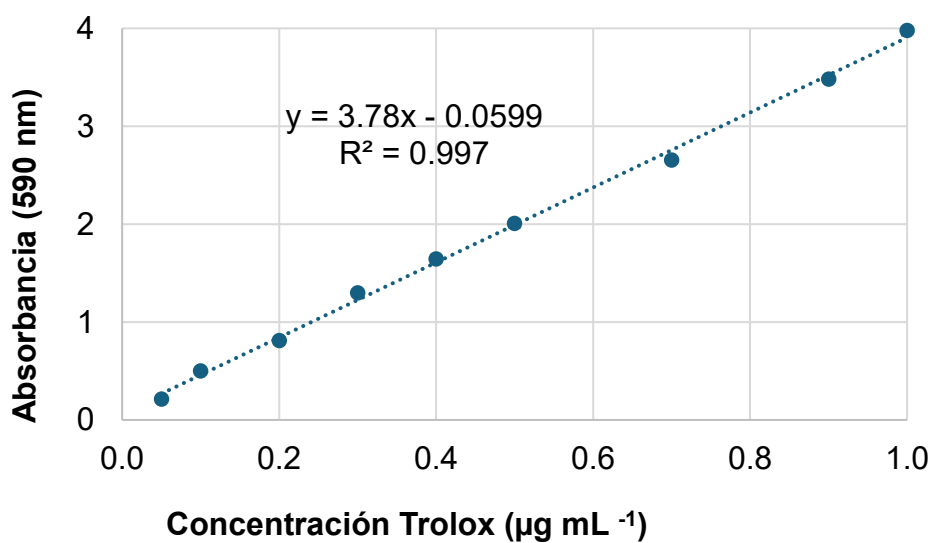


Figura 21. Curva estándar de Trolox.