

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ

Facultad de Ciencias e Ingeniería



*Vanilla pompona* (Orchidaceae), especie de orquídea de los humedales de Madre de Dios: cuantificación por HPLC de la Vainillina y otros componentes aromáticos

Tesis para optar el título de:  
Licenciada en Química

Presentada por:  
Angelica Mariko Naka Kishimoto

LIMA – PERU

2008

## RESUMEN

Las vainas de vainilla, debido a su refinado sabor y apreciado aroma, se utilizan desde hace mucho tiempo para aromatizar alimentos, especialmente postres y bebidas.

El extracto de vainas de vainilla es una mezcla extremadamente complicada de cientos de compuestos diferentes, entre los que se encuentran alcoholes, ácidos, ésteres, éteres, terpenoides, entre otros. De todos ellos, la vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído) es el componente mayoritario y el principal responsable del característico aroma y sabor del extracto.

En el mercado, se comercializa tanto vainas de vainilla curadas como extracto de vainas de vainilla. Sin embargo, debido a que éstas no pueden cubrir la gran demanda (más de 12 000 toneladas anuales), existe también la esencia sintética, de muy bajo precio, pero que consiste únicamente en una solución etanólica de vainillina. La desventaja de esta esencia es que no posee todos los componentes de aroma y sabor característicos del extracto de vainas de vainilla.

Dada la gran demanda actual de vainillina y las ventajas que ofrece el extracto natural, surgió el interés en evaluar el perfil aromático de *Vanilla pompona*, especie poco estudiada pero abundante en los humedales del departamento de Madre de Dios.

Diversos extractos de vainas de *Vanilla pompona*, preparadas por hidrólisis enzimática (empleando Viscozima y Celuclast), fueron analizados mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Se cuantificó el contenido de alcohol p-hidroxibencílico, alcohol-4-hidroxi-3-metoxibencílico, ácido p-hidroxibenzoico, p-hidroxibenzaldehído, ácido vainílico y vainillina.

El perfil aromático de *Vanilla pompona* se comparó con el de la vainilla de Madagascar (*Vanilla planifolia*) obtenida comercialmente, especie muy importante a nivel internacional.

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DEL PERU  
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERIA**

**TEMA DE TESIS**

Para optar al            Título de Licenciado en Química

Alumno            :            Angelica Mariko Naka Kishimoto

Código            :            2002.4046.4.12

Propuesto por :            Helena Maruenda Castillo

Asesor            :            Helena Maruenda Castillo

Tema            :            Vanilla pompona (Orchidaceae), especie de orquídea de los  
humedales de Madre de Dios: cuantificación por HPLC de la  
Vainillina y otros componentes aromáticos.

Nº            131



Descripción del tema u objetivos:

El extracto natural de vainilla, constituido por más de 180 compuestos químicos, volátiles y no volátiles, es un producto muy apreciado en el mercado farmacéutico, de alimentos y cosmética. Entre los volátiles aromáticos, la vainillina es el principal componente asociado al sabor y aroma de la vainilla.

Las especie con importancia comercial es la *Vainilla planifolia* proveniente de Madagascar, Indonesia, Tonga y México. En el Perú, si bien se conocen siete especies de *vainilla*, la más importante, por encontrarse ampliamente distribuida en el territorio nacional (Amazonas, Loreto, Cajamarca, San Martín, Ucayali y Madre de Dios), es la *Vainilla pompona*. Por ello, y dada la demanda actual por vainilla natural se han iniciado estudios con la *Vainilla pompona* silvestre de Madre de Dios (CICRA).

El trabajo consistirá en implementar la metodología necesaria para determinar el contenido de vainillina y otros componentes aromáticos presentes en el fruto de la *Vanilla pompona*. Se optimizarán las condiciones de extracción, digestión enzimática (hidrólisis de glucósidos) y cuantificación por HPLC. Se compararán los resultados con los de un producto comercial (vainilla de Madagascar).

Extensión: máximo 100 páginas.

Lima, 9 de Octubre del 2007

Original y 4 copias



## AGRADECIMIENTO

Deseo expresar mi agradecimiento a quienes me apoyaron para la realización de este trabajo de investigación.

A mi asesora, Dra. Helena Maruenda, por haberme guiado con su compañía durante el desarrollo del presente estudio. Su gran nivel de exigencia, sus oportunos consejos y su insistencia para no perder el entusiasmo me han permitido concluir con éxito este trabajo de investigación.

A John Janovec y su equipo de investigación por haber proporcionado las vainas de *Vanilla pompona* y facilitado datos de la investigación realizada por él y sus colaboradores en los humedales de Madre de Dios.

A los profesores de la Sección Química, por la formación que recibí a lo largo de estos cinco años, en especial al Dr. Javier Nakamatsu por los momentos de conversaciones químicas, académicas y de la vida que me ayudaron a continuar con alegría mis estudios.

Al personal no docente de la Sección Química, por las facilidades prestadas con total desprendimiento.

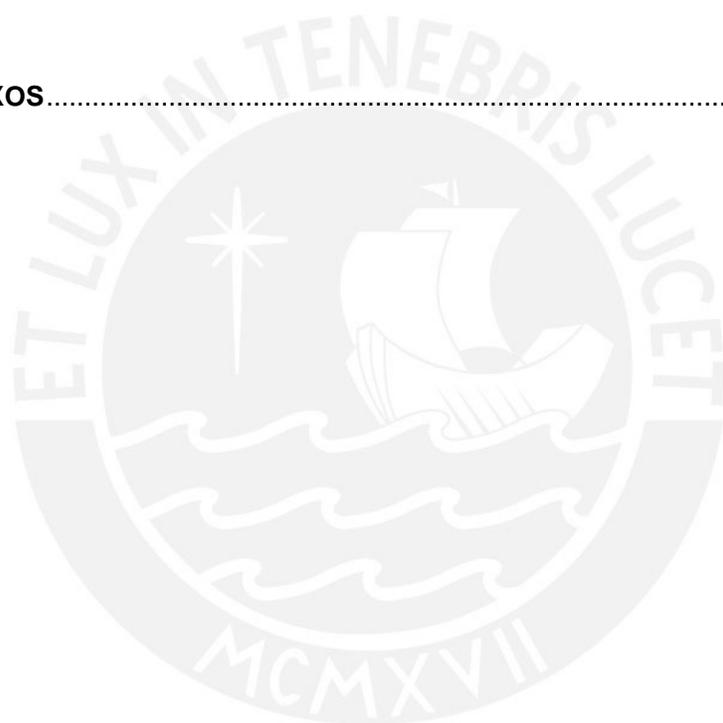
A mis compañeros de laboratorio, por el independiente tiempo compartido bajo el sueño común de la finalización de nuestros respectivos trabajos de investigación.

Y de manera especial a mis padres y hermanas por haberme brindado su ayuda, cariño y comprensión que fueron la fuerza necesaria para iniciar, desarrollar y culminar la tesis.

# ÍNDICE GENERAL

	Página
<b>1 LA VAINILLA</b> .....	1
1.1 Especies de vainilla .....	4
1.2 El fruto de la vainilla: descripción y composición química .....	8
1.3 Biosíntesis de compuestos del fruto de vainilla .....	11
1.4 Maneras de sustituir a la vainilla natural.....	14
<b>2 DETERMINACIÓN DEL PERFIL AROMÁTICO DEL FRUTO DE LA VAINILLA</b> .....	18
2.1 Proceso de curado de la vainilla .....	18
2.2 Extracción de los componentes del fruto de la vainilla .....	21
2.2.1 Extracción a partir de vainas curadas .....	21
2.2.2 Extracción a partir de vainas frescas .....	22
2.3 Cuantificación de los componentes del fruto de la vainilla mediante HPLC.....	26
<b>3 PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	28
3.1 Equipos y Materiales.....	28
3.2 Metodología .....	30
3.2.1 Medición de actividad $\beta$ -D-glucosidasa de las enzimas.....	30
3.2.2 Determinación de humedad .....	31
3.2.3 Extracción de los componentes de vainilla .....	31
3.2.4 Cuantificación de los componentes del extracto mediante HPLC.....	33
<b>4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	34

4.1	Actividad $\beta$ -D-glucosidasa de las enzimas .....	34
4.2	Humedad de los frutos de <i>Vanilla pompona</i> y de <i>Vanilla planifolia</i> .....	38
4.3	Análisis y cuantificación por HPLC .....	38
4.4	Hidrólisis enzimática y determinación del perfil aromático .....	46
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	<b>52</b>
<b>6</b>	<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>54</b>
<b>7</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>60</b>



## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Polinización manual de la vainilla .....	3
Figura 2: Distribución de las especies de <i>Vanilla</i> en el Perú: <i>Vanilla hamata</i> , <i>Vanilla pompona</i> , <i>Vanilla planifolia</i> (Loreto: Maynas), <i>Vanilla ruiziana</i> , <i>Vanilla weberbaueriana</i> (Amazonas: Río Cenepa, Yamayakat).....	7
Figura 3: <i>Vanilla pompona</i> Schiede subsp. <i>grandiflora</i> (Lindl.) Soto-Arenas.....	8
Figura 4: Algunos componentes del extracto de vainilla .....	9
Figura 5: Ruta biosintética de los componentes de la vainilla.....	12
Figura 6: Algunas de las principales fuentes de vainillina.....	15
Figura 7: Producción biotecnológica de la vainillina.....	16
Figura 8: Ubicación de vainillina y glucovainillina dentro del tejido celular. Concentración de glucovainillina y actividad de la enzima $\beta$ -D-glucosidasa en las diferentes zonas .....	23
Figura 9: Método del ácido 3,5-dinitrosalicílico para cuantificar glucosa liberada luego de la hidrólisis de la celobiosa por acción de las glucosidasas .....	25
Figura 10: Proceso completo (extracción, separación y cuantificación) para la determinación del perfil aromático de <i>Vanilla pompona</i> de los humedales de Madre de Dios .....	27
Figura 11: Espectro UV-VIS del ácido 3,5-dinitrosalicílico .....	34

Figura 12:	Curva estándar de la glucosa .....	35
Figura 13:	Actividad de Viscozima empleando celobiosa como sustrato.....	36
Figura 14:	Actividad de Celuclast empleando celobiosa como sustrato.....	37
Figura 15:	Espectro UV del alcohol p-hidroxibencílico en etanol (0.006 mg/mL) y del alcohol 4-hidroxi-3-metoxibencílico en etanol (0.006 mg/mL) .....	39
Figura 16:	Espectro UV del ácido p-hidroxibenzoico en etanol (0.006 mg/mL) y del p-hidroxibenzaldehído en etanol (0.006 mg/mL) .....	40
Figura 17:	Espectro UV del ácido vainílico en etanol (0.006 mg/mL) y de la vainillina en etanol (0.006 mg/mL).....	40
Figura 18:	Cromatograma del ácido p-hidroxibenzoico ( $t_R = 10.89$ min), p-hidroxibenzaldehído ( $t_R = 12.47$ min), ácido vainílico ( $t_R = 13.21$ min) y vainillina ( $t_R = 14.71$ min), monitoreado a $\lambda = 254$ nm .....	41
Figura 19:	Cromatograma de alcohol p-hidroxibencílico ( $t_R = 5.29$ min) y alcohol 4-hidroxi-3-metoxibencílico ( $t_R = 8.52$ min), monitoreado a $\lambda = 230$ nm .....	42
Figura 20:	Curva estándar del alcohol p-hidroxibencílico .....	43
Figura 21:	Curva estándar del alcohol 4-hidroxi-3-metoxibencílico .....	43
Figura 22:	Curva estándar del ácido p-hidroxibenzoico.....	44
Figura 23:	Curva estándar del p-hidroxibenzaldehído .....	44
Figura 24:	Curva estándar del ácido vainílico .....	45
Figura 25:	Curva estándar de la vainillina .....	45

## LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1: Rangos actualizados de las razones en masa entre componentes aromáticos del fruto de la vainilla .....	10
Tabla 2: Procedimientos realizados para extraer los componentes de interés de la vainilla, con los distintos tipos de vainas .....	32
Tabla 3: Validación de la curva estándar de glucosa.....	35
Tabla 4: Sistema de gradiente ácido fosfórico 0.001 M – metanol .....	38
Tabla 5: Concentraciones teóricas y experimentales de los componentes de la vainilla para la validación de las curvas estándar .....	46
Tabla 6: Resultados de experimentos realizados para determinar la cantidad óptima de enzimas (Viscozima y Celuclast) a utilizar.....	47
Tabla 7: Perfil aromático de vainas de <i>Vanilla pompona</i> de los humedales de Madre de Dios (inmaduras y maduras) y de vainas curadas de <i>Vanilla planifolia</i> obtenidas comercialmente.....	48
Tabla 8: Relación entre los componentes de aroma y sabor (R1 – R5) de vainas de <i>Vanilla pompona</i> de los humedales de Madre de Dios y de vainas de <i>Vanilla planifolia</i> curadas obtenidas comercialmente.....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución

$t_R$ : Tiempo de retención



## LISTA DE ANEXOS

	Página
Anexo 1: Lista de países importadores de vainilla en el año 2006 .....	60
Anexo 2: Lista de países exportadores de vainilla en el año 2006 .....	61
Anexo 3: Lista de países importadores de vainillina en el año 2006.....	62
Anexo 4: Lista de países exportadores de vainillina en el 2006.....	63
Anexo 5 – 24: Cromatogramas de los experimentos realizados con vainas de <i>Vanilla pompona</i> de prueba para determinar la cantidad óptima de enzimas a emplear y el tiempo necesario de incubación enzimática (extracción en medio acuoso).....	64
Anexo 25 – 28: Cromatogramas de los experimentos realizados con vainas de <i>Vanilla pompona</i> inmaduras (extracción en medio acuoso).....	84
Anexo 29 – 36: Cromatogramas de los experimentos realizados con vainas de <i>Vanilla pompona</i> de prueba (extracción etanólica y extracción Soxhlet por 7 horas) .....	88
Anexo 37 – 44: Cromatogramas de los experimentos realizados con vainas de <i>Vanilla pompona</i> maduras (extracción en medio acuoso y extracción Soxhlet por 24 horas) .....	96
Anexo 45 – 48: Cromatogramas de los experimentos realizados con vainas de <i>Vanilla planifolia</i> curadas obtenidas comercialmente en marzo del 2006 (extracción en medio acuoso).....	104

Anexo 49 – 52: Cromatogramas de los experimentos realizados con vainas de *Vanilla planifolia* curadas obtenidas comercialmente en setiembre del 2007 (extracción en medio acuoso).....108



## 1 LA VAINILLA

La vainilla (Orchidaceae: subtribu Vanillinae) es un arbusto herbáceo que pertenece a un género de orquídea que engloba a más de cien especies de plantas epífitas, hemiepífitas y terrestres (1). Las epífitas, a diferencia de las terrestres, son aquellas plantas que no han enraizado en el suelo, por lo que viven adheridas a troncos y ramas de otros árboles, pero sin parasitarlas (2). Las hemiepífitas son aquellas que en una etapa de desarrollo son estrictamente epífitas, pero que en otra puede llegar a producir raíces capaces de llegar al suelo y absorber de ella los nutrientes que necesita (3).

La vainilla se cultiva entre 0 y 600 msnm, preferentemente en suelos arenosos y arcillosos, con buen drenaje natural y rico en materia orgánica (4, 5). Crece en zonas con climas cálidos, subtropicales y tropicales (4), cuyas temperaturas oscilan entre 20 y 30 °C, tanto diurnas como nocturnas. Las precipitaciones deben ser abundantes y bien distribuidas (3 000 mm a lo largo de las estaciones) (6) y la humedad relativa debe ser inferior al 80% (7).

La vainilla es una planta perenne (conserva sus tallos y hojas durante todo el año), de tallo flexible, cilíndrico, simple o ramificado (5), que puede llegar a alcanzar 100 metros de altura (8). Posee largas y fuertes raíces aéreas o adventicias que nacen de cada nódulo, con las que se fija en los troncos. Presenta hojas distribuidas de manera alterna a lo largo del tallo. Son oblongas, agudas en el ápice, sésiles, enteras, carnosas coriáceas, simples, de limbo ondulado y de color verde oscuro (4).

Las flores de la vainilla son generalmente grandes (de 5 a 8 cm), fragantes y muy vistosas (4). Se presentan en inflorescencia o racimos y brotan de las axilas de las hojas; cada vainilla puede tener entre 10 y 15 racimos, compuestas por más de 10 flores individuales (5, 9). Estas flores presentan cáliz con tres sépalos coloreados; corola con tres pétalos blanco-verdosos: dos laterales y uno inferior denominado labelo (o pétalo modificado), que es de mayor tamaño y en forma de bolsa o saco (4, 9). Presenta uno, o raramente, dos estambres; el polen se encuentra reunido en polinias, formando una masa alargada y claviforme (4). Debajo de las anteras están los estigmas y entre éstos, por lo general, se encuentra una membrana más o menos prolongada llamada rostelo, que dificulta la autofecundación (4).

La fecundación de la flor de la vainilla puede ocurrir como consecuencia de la polinización natural o artificial. La fecundación natural ocurre a través de determinados insectos y colibríes. Este proceso es sumamente complicado porque está regido por un factor de casualidad y más aún por el hecho de que las flores solo permanecen abiertas durante ocho horas del día aproximadamente (5, 9, 10). Por ello, para asegurar la eficiencia en la fecundación de la vainilla es necesario polinizarla artificialmente, es decir, asistida por la mano del hombre.

A partir de la flor fecundada, luego de unas cuatro o seis semanas, se desarrollan los frutos, que son unas vainas verdes, largas, gruesas, lisas y generalmente dehiscentes (se abren al madurar). Estas vainas deben permanecer en la planta entre ocho y nueve meses hasta alcanzar la madurez. Una planta de vainilla produce, con una manipulación adecuada, aproximadamente 150 vainas en cada cosecha (10).

La vainilla es considerada como originaria de México (Veracruz). Los indígenas de Centroamérica (aztecas y mayas) la usaban desde épocas precolombinas (4). El pueblo Totonaca, en el antiguo México, figura en la historia como el mejor productor de vainilla. Ellos la cultivaban con devoción religiosa pues la consideraban un regalo de los dioses (8, 11). Las condiciones climáticas y geográficas adecuadas de esta zona de México, como altitud sobre el nivel del mar (500 metros), clima cálido húmedo, así como su técnica de polinización asistida, permitieron el desarrollo de la vainilla (11) e hicieron que México mantuviera el monopolio de la producción de frutos de vainilla hasta mediados del siglo XIX, con una producción no mayor a 2 toneladas (12, 6).

Al llegar los españoles a México (1519) y luego de la conquista, la vainilla fue llevada a Europa (a Inglaterra y a los jardines botánicos franceses) y también a varias islas del Océano Índico, lugares en donde no se pudo obtener los frutos, a pesar de los esfuerzos realizados.

Los primeros estudios científicos en torno a este problema fueron presentados en el año 1836 por un botánico belga llamado Charles Morren, quien realizó experimentos de fertilización con una vainilla que no había producido frutos por más de 15 años. Mediante un tratamiento especial de horticultura, Morren logró que la vainilla desarrollara 54 flores, las cuales luego fecundó manualmente y obtuvo el mismo número de frutos. Un año después, realizó el mismo procedimiento y obtuvo 100 frutos en una planta distinta. Los estudios de Morren confirmaron que para producir frutos, la vainilla debe tener por lo menos cinco o seis años de desarrollo y para

producir flores, se requería condiciones adecuadas de sombra, calor y humedad. El problema con el método de Morren es que la fecundación fue realizada con unas tijeras, con las que cortó el rostelo de la flor. Esta técnica resulta importante dentro del ámbito académico y en condiciones de invernadero pero no a gran escala (6).

A finales del año 1841 y luego de 20 años de esterilidad, la vainilla de Reunión (departamento de ultramar de Francia) dio por primera vez frutos. El éxito se produjo gracias a que un esclavo de 12 años de edad llamado Edmond Albius descubrió un método de polinización artificial, el cual es utilizado aún hoy en día (6, 9). La técnica consiste en inclinar o llevar hacia atrás el labelo con ayuda del pulgar. Luego, utilizando un palo pequeño se levanta el rostelo, se junta la antera y el estigma y se presionan (6). En la Figura 1 se esquematiza la polinización artificial de la flor de la vainilla, desarrollada por Edmond Albius.

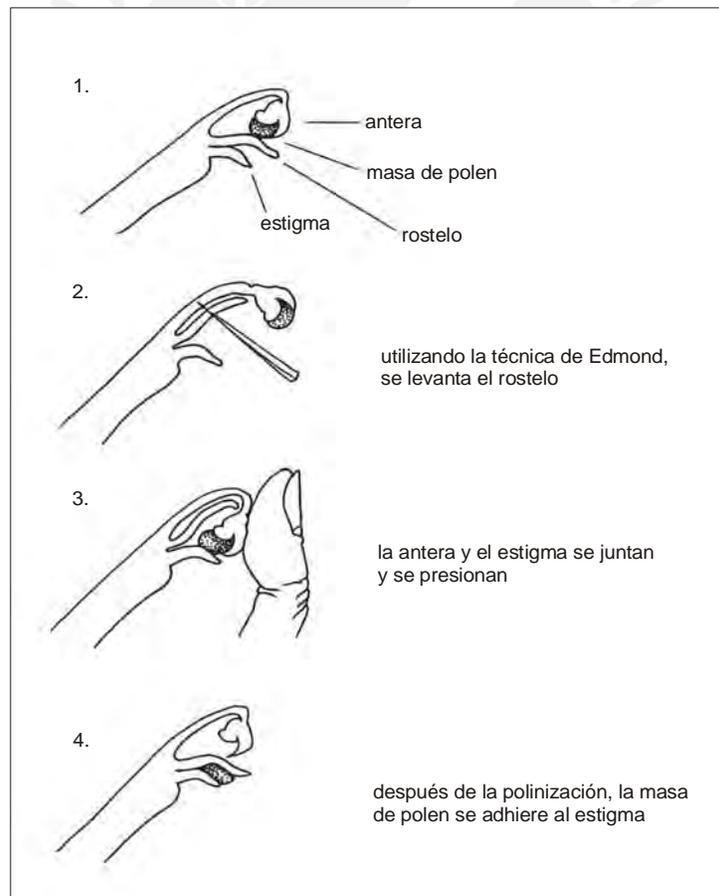


Figura 1: Polinización manual de la vainilla (6)

Luego de este descubrimiento, se inició la propagación de la vainilla por los distintos estados de Reunión y en las islas vecinas del Océano Índico, terminándose de esta manera el monopolio mexicano. Durante el primer cuarto del siglo XX, la producción mundial de vainilla llegaba a 600 toneladas anuales, de las cuales el 25% provenían de América, 40% de Asia y 35% de África. En pocos años después, la producción llegó a 900 toneladas, de las cuales 75% provenían de África, 15% de América y 10% de Asia. Alrededor de 1970, Madagascar produjo el 90% de toda la producción mundial de vainilla natural (12). Hoy en día, el 65 – 70% de la producción anual proviene de las Islas Bourbon (Madagascar, Comores, Reunión, Seychelles), el 25 – 30% de Indonesia y únicamente una parte proviene de México y otros países (10).

A lo largo del tiempo se le ha atribuido diversos usos y propiedades a la vainilla. La medicina folklórica, por ejemplo, sugiere propiedades terapéuticas. Se dice que las hojas se utilizan para curar afecciones de la piel o borrar pecas; la raíz se emplea como antiespasmódico y el fruto, como antifebrífugo, afrodisíaco, estimulante y emenagogo (4, 13). A nivel mundial, la importancia del fruto de la vainilla se concentra en la industria alimentaria (para aromatizar y refinar diversos alimentos, especialmente postres y bebidas), así como en la industria farmacéutica y de perfumería (12).

### **1.1 Especies de vainilla**

A pesar de la importancia comercial que representa el fruto de la vainilla, las investigaciones taxonómicas de esta planta son escasas e incompletas, lo cual ha llevado a confusiones, sinonimia e incorrecta identificación de las especies. Además de ello, aún falta realizar estudios genéticos que provean de herramientas necesarias para obtener especies resistentes a los patógenos virales y fúngicos, muy comunes en estas especies (1).

De las más de cien especies del género *Vanilla* (aproximadamente 110 especies) se sabe que cada una posee frutos con apariencia, aroma y perfil de sabor único. De todas ellas solo tres son cultivadas por su importancia comercial: *Vanilla planifolia* Andrews (*Vanilla fragans* Salisbury Ames), *Vanilla tahitensis* Moore y *Vanilla pompona* Schiede (8).

*Vanilla planifolia* Andrews: Los cultivos más importantes se encuentran en las islas Bourbon (Madagascar, Comores, Reunión, Seychelles), Indonesia (Bali), México. Se cultiva también en India, Tonga, Papúa Nueva Guinea y Uganda (14). El extracto de vainas de *Vanilla planifolia* de las islas Bourbon destaca por sus notas suaves, mantecosas-cremosas, mientras que las notas fenólicas o florales son muy débiles. Por otro lado, el extracto de vainilla procedente de Bali, presenta fuerte notas fenólicas-ahumadas de ciruela pero débiles notas mantecosas y cremosas. El extracto de vainas de vainilla procedente de México posee unas cualidades sensoriales únicas ya que representa el perfil de sabor más completo de entre todos los extractos de vainas de vainilla (10).

*Vanilla tahitensis* Moore: Se producen en las islas de Tahití, Moorea y Papúa Nueva Guinea. Según el botánico mexicano Miguel Soto, la *Vanilla tahitensis* probablemente es un híbrido de las especies *Vanilla planifolia* y *Vanilla odorata* (6). Los frutos de la *Vanilla tahitensis* son más pequeños y redondeados que los de la *Vanilla planifolia* (14) y presentan un menor número de semillas; poseen una capa externa muy dura, por lo que no se rajan incluso después de la madurez (6). El extracto es relativamente dulce y mantecoso y destaca por su nota floral y frutal (ciruela y cereza) (14). Tiene gran aceptación en el mercado francés e italiano, principalmente para aromatizar helados. La producción anual de vainas curadas de *Vanilla tahitensis* es muy pequeña, entre 7 y 8 toneladas, por lo que es muy valorada (6).

*Vanilla pompona* Schiede: Se cultiva casi exclusivamente en Guadalupe y Martinica, ambos territorios de ultramar de la República Francesa. El fruto presenta un olor muy peculiar que puede describirse como una mezcla entre azúcar fermentado y fruta dulce (14). Su principal campo de aplicación son los perfumes y los productos farmacéuticos (10).

Existe muy poca información acerca de las vainillas en el Perú. Algunas fuentes (15, 16, 17) reportan que en el Perú existen 6 especies de Vanilla: *Vanilla hamata* Klotzsch, *Vanilla mexicana* Miller, *Vanilla planifolia* Andrews o *Vanilla fragans*, *Vanilla pompona* Schiede, *Vanilla ruiziana* Klotzsch y *Vanilla weberbaueriana* Kraenzlin (15, 16). De estas, algunas poseen vainas con aroma, por lo que son potencialmente útiles para repostería y bebidas (17).

La *Vanilla hamaca* Klotzsch crece en el departamento de Huánuco. En cuanto a la *Vanilla mexicana* Miller, no se conoce exactamente su distribución pero se sabe que

crece en tierras bajas y pantanosas del Perú, entre 500 y 1 000 m de altitud. La *Vanilla planifolia* Andrews crece en tierras bajas tropicales, entre 0 y 1470 m de altitud o en bosques inundables del Perú (Maynas, Loreto). La *Vanilla pompona* Schiede crece en tierras bajas tropicales, entre 15 -1150 m de altitud y en el Perú se encuentra ampliamente distribuida en los departamentos de Amazonas, Loreto, Cajamarca, San Martín, Ucayali y Madre de Dios. La *Vanilla ruiziana* Klotzsch crece entre los 300 y 350 m de altitud y se encuentra distribuido en los departamentos de Huánuco y Amazonas. La *Vanilla weberbaueriana* Kraenzlin crece entre los 240 y 500 m de altura y se encuentra distribuido en el departamento de Amazonas (Río Cenepa, Yamayakat) y en Junín (15). En la Figura 2 se detalla la distribución en el Perú de cada una de las especies de vainilla mencionadas.

Además de estas especies, los estudios del Programa Botánico de los Andes a la Amazonía (AABP) del Botanical Research Institute of Texas (BRIT), llevado a cabo por John Janovec y su equipo en los humedales del departamento de Madre de Dios, han reportado cuatro especies de *Vanilla* adicionales (1, 18): *Vanilla bicolor* Lindl., *Vanilla guianensis* Split., *Vanilla ribeiroi* Hoehne y *Vanilla sp 4*, esta última, una nueva especie aún no asignada. En esta zona, la *Vanilla pompona* Schiede *subsp. grandiflora* (Lindl.) Soto-Arenas (Figura 3) abunda. Como parte del estudio se han realizado experimentos de polinización natural (interacción con abejas) y artificial, así como determinación de los factores que afectan la calidad del fruto (19).

El departamento de Madre de Dios se encuentra ubicado al sur este del Perú. Posee una extensión de 85 182 km<sup>2</sup>, una altitud mínima de 183 msnm (Puerto Maldonado) y una máxima de 500 msnm (Boca Manu) (20). En este departamento predomina el clima tropical y húmedo con precipitaciones durante el verano. La temperatura promedio anual del departamento es de 26.5 °C, y una máxima de 38.5 °C. Se distinguen dos estaciones, una seca entre mayo y octubre y otra lluviosa entre noviembre y abril. En ciertas épocas del año, el departamento de Madre de Dios es azotado súbitamente por masas de aire frío (denominadas friajes) que provienen del sur del continente. Esto hace que la temperatura de la zona descienda en ciertas épocas del año hasta 9 °C (21).

En el departamento de Madre de Dios, las vainillas crecen casi exclusivamente en humedales, comúnmente llamados “aguajales” por la presencia de la palmera aguaje (*Mauritia flexuosa*) (1). Esta palmera acoge a la vainilla, es decir que constituye su soporte y a la vez le brinda protección frente al sol y al viento. Es importante que el

árbol de soporte tenga raíces profundas para que no extraiga los nutrientes de las capas superiores del terreno, que es donde anidan las raíces superficiales de la vainilla (10).



Figura 2: Distribución de las especies de Vanilla en el Perú: *Vanilla hamata*, *Vanilla pompona*, *Vanilla planifolia* (Loreto: Maynas), *Vanilla ruiziana* y *Vanilla weberbaueriana* (Amazonas: Río Cenepa, Yamayakat). No se han encontrado datos de la ubicación exacta de Vanilla mexicana.



Figura 3: *Vanilla pompona*  
Schiede *subsp. grandiflora*  
(Lindl.) Soto-Arenas (1)

## 1.2 El fruto de la vainilla: descripción y composición química

La importancia comercial de la vainilla radica en el fruto, el cual constituye una de las más caras especias a nivel mundial. El fruto maduro de la vainilla, dependiendo de la especie, es una vaina que puede medir entre 10 y 25 cm de longitud (5, 10) y entre 10 y 15 mm de diámetro (5), carece de aroma, generalmente contiene una pulpa oleosa y numerosas semillas pequeñas. A pesar del gran número de semillas que posee una vaina, la mayor parte de estas no germinan luego de ser sembradas porque, al igual que muchas orquídeas, requieren de una simbiosis específica con un tipo de hongo (6). Este tipo de relación se denomina micorriza y es beneficiosa tanto para el desarrollo de la vainilla como para la del hongo.

Las vainas de la vainilla son de color verde brillante cuando están inmaduras y a medida que maduran se tornan amarillas. Generalmente se recolectan cuando están de color verde amarillento (pero no rajadas o abiertas) (5), aunque en algunos lugares se cosecha cuando están aún de color verde (6). Luego de pasar por un complicado proceso de “curado” (descrito en el capítulo 2), las vainas adquieren un color castaño oscuro, se tornan flexibles, su superficie externa se vuelve rugosa y desprenden un agradable aroma.

Los componentes del fruto de la vainilla, responsables del olor y sabor, constituyen una mezcla extremadamente compleja (6). Se han identificado más de 180 compuestos químicos, volátiles y no volátiles en las vainas. Entre ellos se encuentran carbonilos aromáticos (7 compuestos), alcoholes aromáticos (6 tipos), ácidos aromáticos (6 tipos), ésteres aromáticos (23 diferentes), éteres fenólicos y fenoles (18 diferentes), alcoholes alifáticos (13 diferentes), carbonilos alifáticos (15 diferentes), ácidos alifáticos (15 diferentes), ésteres y lactonas alifáticas (27 diferentes), hidrocarburos aromáticos (9 diferentes), terpenoides (19 diferentes), hidrocarburos alifáticos (14 diferentes) y heterocíclicos (12 diferentes) (16). Además, las vainas contienen proteína, azúcares, celulosa, resina, taninos y minerales (6).

De los grupos de componentes mencionados, más de un tercio corresponden únicamente a volátiles aromáticos. Entre ellos destacan la vainillina (A, Figura 4), el p-hidroxibenzaldehído (B, Figura 4), el ácido p-hidroxibenzoico (C, Figura 4), el ácido vainílico (D, Figura 4), el alcohol p-hidroxibencílico (E, Figura 4), el y el alcohol 4-hidroxi-3-metoxibencílico (F, Figura 4). La vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído) es el componente mayoritario y el principal responsable del sabor y aroma de las vainas de vainilla.

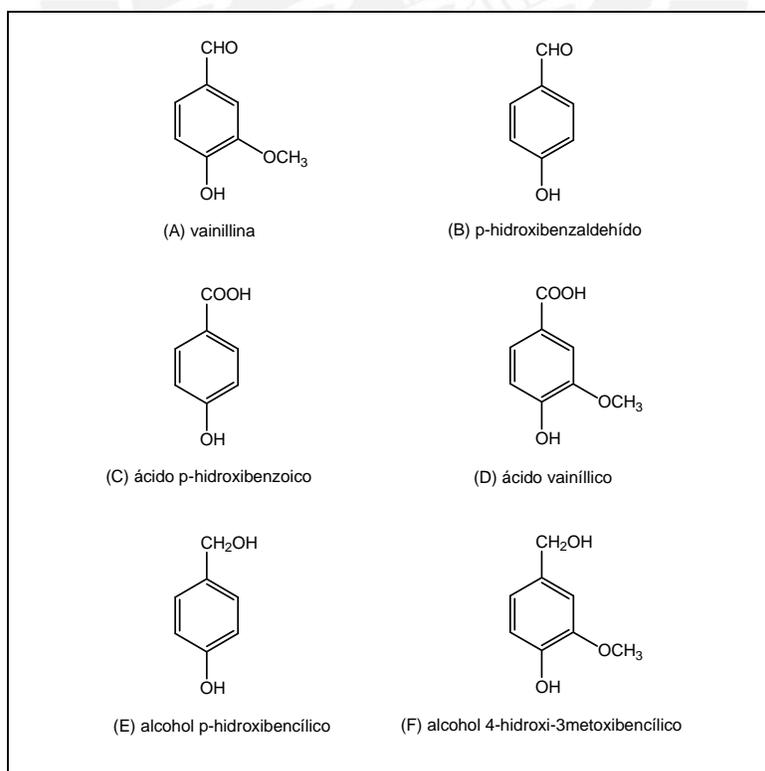


Figura 4: Algunos componentes del extracto de vainilla

De todos los componentes de la vainilla, el alcohol 4-hidroxi-3-metoxibencílico y el alcohol p-hidroxibencílico muestran actividad antioxidante muy elevada, mientras que la vainillina, el ácido vainílico y el p-hidroxibenzaldehído, actividad media o relativamente baja (22). Otros beneficios atribuidos a la vainillina son sus propiedades antimutagénicas, antioxidantes y antifúngicas (23). La actividad antifúngica que presenta es atribuida al grupo aldehído que posee y ha sido ampliamente estudiada por Fitzgerald y su equipo de investigación (23).

En el año 1988, el Gobierno Francés publicó el documento DGCCRF N.S. 5387 en el que se especificaba el rango de las razones estándar entre los componentes mayoritarios del extracto de vaina de vainilla. Este documento ha sido adaptado por la International Organization of the Flavor Industry (IOFI) y se utiliza a nivel mundial como una guía para comprobar la autenticidad de los extractos de vainilla (*Vanilla planifolia* específicamente). Los rangos de las razones en masa entre componentes se indican en la Tabla 1. Esta tabla fue construida en base a resultados obtenidos luego de analizar vainas curadas en laboratorio, vainas maduras e inmaduras mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) (24).

Tabla 1: Rangos actualizados de las razones en masa entre componentes aromáticos del fruto de la vainilla, donde pHB = p-hidroxibenzaldehído y ácido pHB = ácido p-hidroxibenzoico. Documento DGCCRF N.S. 2003-61 (24)

Razón entre componentes de sabor y aroma	Rango de las razones en masa entre los componentes
R1 = vainillina / pHB	10 – 20
R2 = ácido vainílico / pHB	0.53 – 1.5
R3 = ácido pHB / pHB	0.15 – 0.35
R4 = vainillina / ácido vainílico	12 – 29
R5 = vainillina / ácido pHB	40 – 110

Existen otros métodos para analizar y determinar la autenticidad de un extracto de vainilla natural comercial. Este tipo de análisis resulta necesario pues existen en el mercado extractos adulterados (por adición de vainillina sintética o etil vainillina,

principalmente). De todos los métodos desarrollados, el análisis isotópico resulta ser el más efectivo. Esta técnica se basa en el hecho de que la distribución de los isótopos a lo largo de la molécula depende del origen del precursor o del tipo de proceso al que fue sometida la molécula precursora (25). En la bibliografía se han reportado rangos de la relación  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  realizados mediante espectroscopía  $^{13}\text{C}$  NMR o espectrometría de masas de isótopos estables (IRMS), con lo cual es posible determinar si la vainillina proviene de síntesis a partir de guayacol, ácido ferúlico, lignina, o de biotransformación de ácido ferúlico, entre otros (25). Otros estudios indican que no es suficiente con analizar la vainillina debido a que actualmente se comercializa vainillina sintética enriquecida con  $^{13}\text{C}$ . Para solucionar este problema, existen diversas propuestas, entre las que se encuentra la determinación de razón de  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  de los otros componentes aromáticos presentes en las vainas o la obtención de las relaciones entre deuterio e hidrógeno (D/H) por resonancia magnética nuclear (SNIF-NMR) (26).

### **1.3 Biosíntesis de compuestos del fruto de la vainilla**

La mayoría de los compuestos fenólicos de bajo peso molecular se presentan en las células vivas en forma combinada, generalmente como O-glucósidos (aglicona – monosacárido, disacárido, o polisacárido) (27). En las plantas, los glucósidos cumplen funciones diversas tales como: almacenamiento de sustancias, aumento de solubilidad de las agliconas en agua (facilita el transporte de agliconas), protección contra los rayos UV-B, movimiento de las hojas en algunas plantas (cierre o apertura de las hojas) y como precursores de los aromas, principalmente de las flores (28).

En el caso del fruto de la vainilla, los compuestos responsables del sabor y aroma del fruto se encuentran como glucósidos (aglicona – glucosa) y son liberados solo después de la hidrólisis por acción de enzimas  $\beta$ -D-glucosidasas.

Negishi y Ozawa (29) propusieron una ruta biosintética basada en diversas fuentes bibliográficas. En ella intervienen principalmente glucósidos de 3 ácidos hidroxicinámicos, 3 ácidos hidroxibenzoicos, 3 hidroxibenzaldehídos y 3 alcoholes hidroxibencílicos, Figura 5.

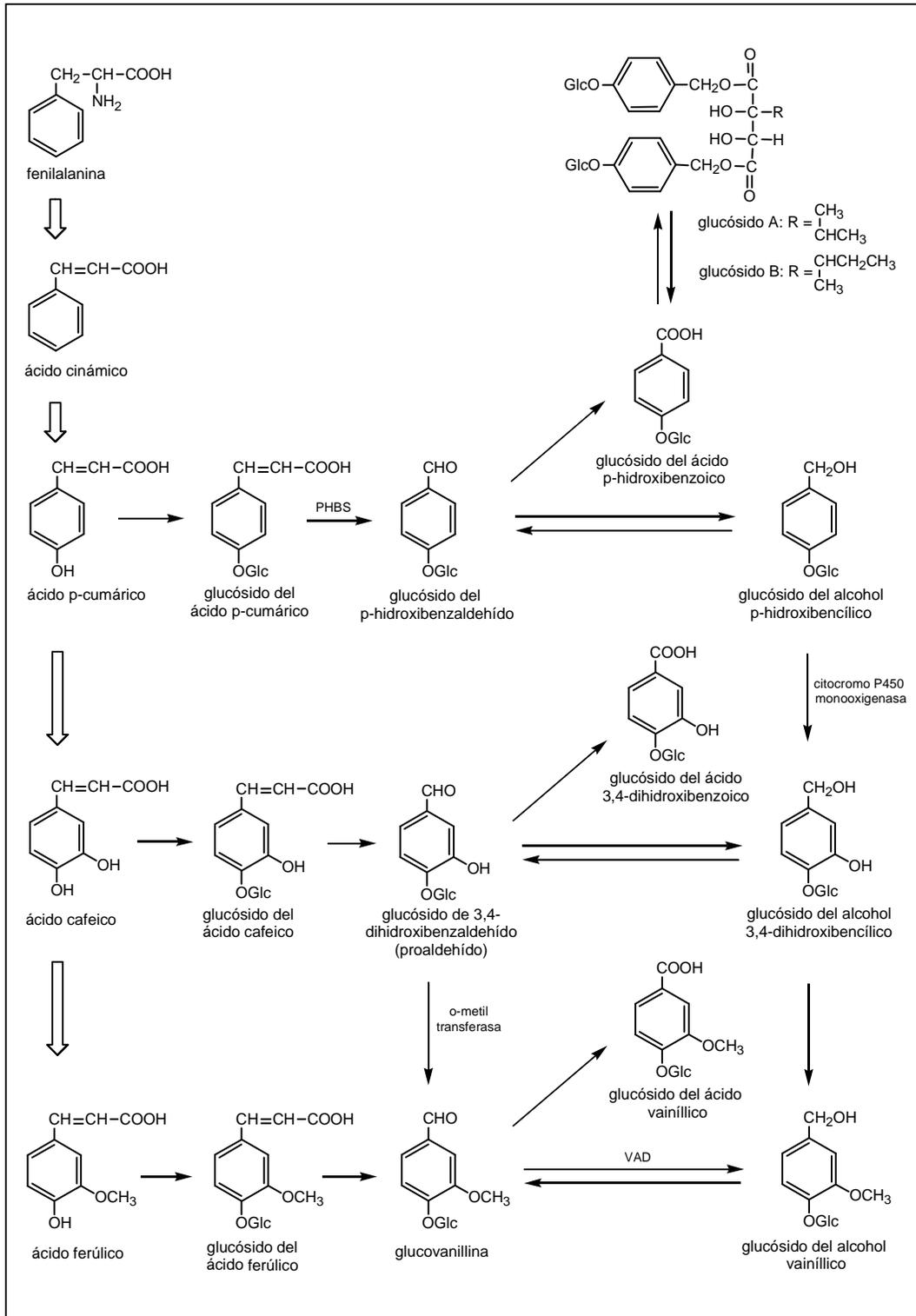


Figura 5: Ruta biosintética de los componentes de la vainilla (29, 30)

La ruta biosintética se inicia con la deaminación de L-fenilalanina para formar ácido p-cumárico (30). El ácido p-cumárico (compuesto C6-C3) se convierte mediante un acortamiento de cadena, catalizada por la enzima p-hidroxibenzaldehído sintasa (PHBS), a p-hidroxibenzaldehído (compuesto C6-C1); y éste, a su vez, a alcohol p-hidroxibencílico (30). El siguiente paso consiste en una hidroxilación del alcohol p-hidroxibencílico para formar alcohol 3,4-dihidroxibencílico. Este paso es el limitante de la velocidad y está catalizado por la enzima citocromo P450 monooxigenasa (30). A partir del alcohol 3,4-dihidroxibencílico se obtiene 3,4-dihidroxibenzaldehído (conocido también como proaldehído). La siguiente etapa consiste en una metilación del proaldehído para formar la vainillina, catalizada por la enzima o-metil transferasa. En cultivos celulares realizados, se ha observado que parte de la vainillina producida se reduce a alcohol vainílico. Esta etapa está catalizada por la enzima alcohol vainílico dehidrogenasa (VAD) (30).

Se ha podido separar e identificar por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), los 12 glucósidos así como sus respectivas agliconas (29). Al analizar mediante este método un extracto natural de vainilla, obtenido del fruto maduro de *Vanilla planifolia*, se ha identificado gran cantidad de glucovainillina y glucósido de p-hidroxibenzaldehído, así como de vainillina y p-hidroxibenzaldehído, corroborando en parte, la ruta biosintética propuesta (29, 30).

Estos estudios han permitido el desarrollo de cultivos tisulares comercialmente viables, que presenta una producción de vainillina en un alto rendimiento junto con los otros componentes aromáticos de interés (B – F, Figura 4, principalmente). Con los cultivos tisulares se desea también mejorar la calidad y producción del extracto de vainilla, además de encontrar solución a algunos problemas relacionados con el crecimiento de esta planta (30). Por ejemplo, los resultados obtenidos por Havkin-Frenkel y Podstolski permitieron identificar al ácido málico (entre 0.01 y 5% peso), 3,4-dihidroxibenzaldehído (entre 0.1 y 5 mM), ácido cítrico (0.01 a 5% peso), ácido pirúvico (0.01 a 5% peso), ácido oxaloacético (0.01 a 5% peso), ácido succínico (0.01 a 5% peso), lisozima glicosilada (1 a 100 µg/mL) o una combinación de ellos, como compuestos inductores, que incrementan considerablemente la producción de vainillina en estos cultivos (30).

Adicionalmente, se ha demostrado que la manipulación genética, aumento o disminución de ciertas enzimas involucradas en la biosíntesis de la vainillina, permite optimizar la producción de ésta y otros componentes aromáticos (B – F, Figura 4) (30).

#### 1.4 Maneras de sustituir a la vainilla natural

Según los cálculos realizados por el Centro de Comercio Internacional (CCI) basados en la información proporcionada por United Nations Commodity Trade Statistics Database (UN Comtrade) y publicados en el Perú por la Comisión de Promoción del Perú para la Exportación y el Turismo (PROMPERU), durante el año 2006 las importaciones de vainilla natural fueron de 4 972 toneladas aproximadamente, de las cuales, 1 554 toneladas corresponden a los Estados Unidos, 789 toneladas a Francia, 527 toneladas a Holanda, 422 toneladas a Alemania, 248 toneladas a Canadá, y el resto, a otros países del mundo (Anexo 1). Actualmente, el principal productor de vainilla natural es Madagascar, que en el año 2006 exportó alrededor de 1 679 toneladas de vainilla, seguido de Indonesia, que exportó 499 toneladas. México por su parte exportó solo 32 toneladas (Anexo 2).

Por otro lado, la cantidad de vainillina (vainillina sintética principalmente) requerida en todo el mundo durante el 2006 fue de 12 439 toneladas (Anexo 3). China y los Estados Unidos son los principales exportadores de vainillina. En el 2006 China exportó alrededor de 6 945 toneladas, mientras que Estados Unidos, 1 237 toneladas (Anexo 4).

A partir de estos datos queda claro que la cantidad de vainilla natural no es suficiente y que gran parte de la demanda de vainilla está siendo cubierta por una esencia de vainilla sintética, de muy bajo precio, pero que consiste únicamente en vainillina. Ésta se produce a nivel industrial a partir de coniferina (glucósido del alcohol coniferílico) (*i*, Figura 6), eugenol (*ii*, Figura 6), ácido ferúlico (*iii*, Figura 6), lignina (*iv*, Figura 6) y guayacol (*v*, Figura 6), (25, 31).

Debido al creciente interés de los últimos años por consumir productos naturales y utilizar procesos naturales de extracción y de mayor eficacia, se están estudiando procedimientos alternativos para obtener “vainillina de origen natural”. El término “natural”, según la Legislación de Alimentos de la Unión Europea (EU Flavor Directive 88/388/EEC) y de los Estados Unidos, se puede extender a saborizantes o esencias que derivan de otras fuentes naturales (distintas de las vainas de vainilla), ya sea animal o vegetal, pero que han sido transformados por métodos biosintéticos (o bioconversión) (32). Esto significa que en lugar de utilizar vainas de vainilla curadas (*vi*, Figura 6), es posible emplear moléculas precursoras disponibles ampliamente en la naturaleza y convertirlas luego en las moléculas de sabor y aroma deseadas, mediante

determinadas enzimas, microorganismos o cultivos celulares. Por lo tanto, esta regulación representa una alternativa para suplir la gran demanda de vainilla natural. Se ha desarrollado, por ejemplo una serie de métodos utilizando precursores ampliamente disponibles, como los estilbenos fenólicos (de la corteza de la picea); (a), en Figura 7, el eugenol (principal constituyente del clavo de olor); (b), en Figura 7, el ácido ferúlico (abundante en las plantas); (c), en Figura 7, entre otros procesos (d – g), en Figura 7 (32).

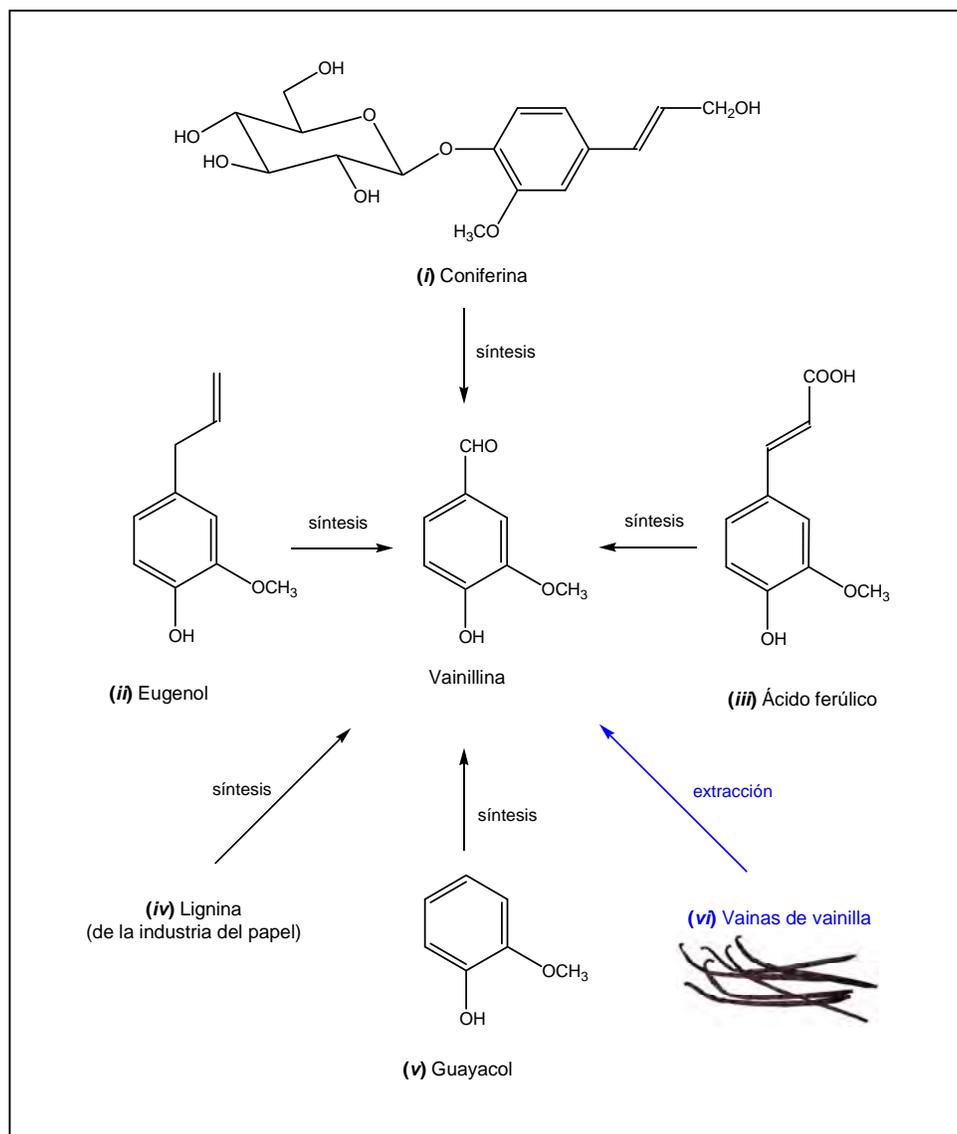


Figura 6: Algunas de las principales fuentes de vainillina (adaptación de 25)

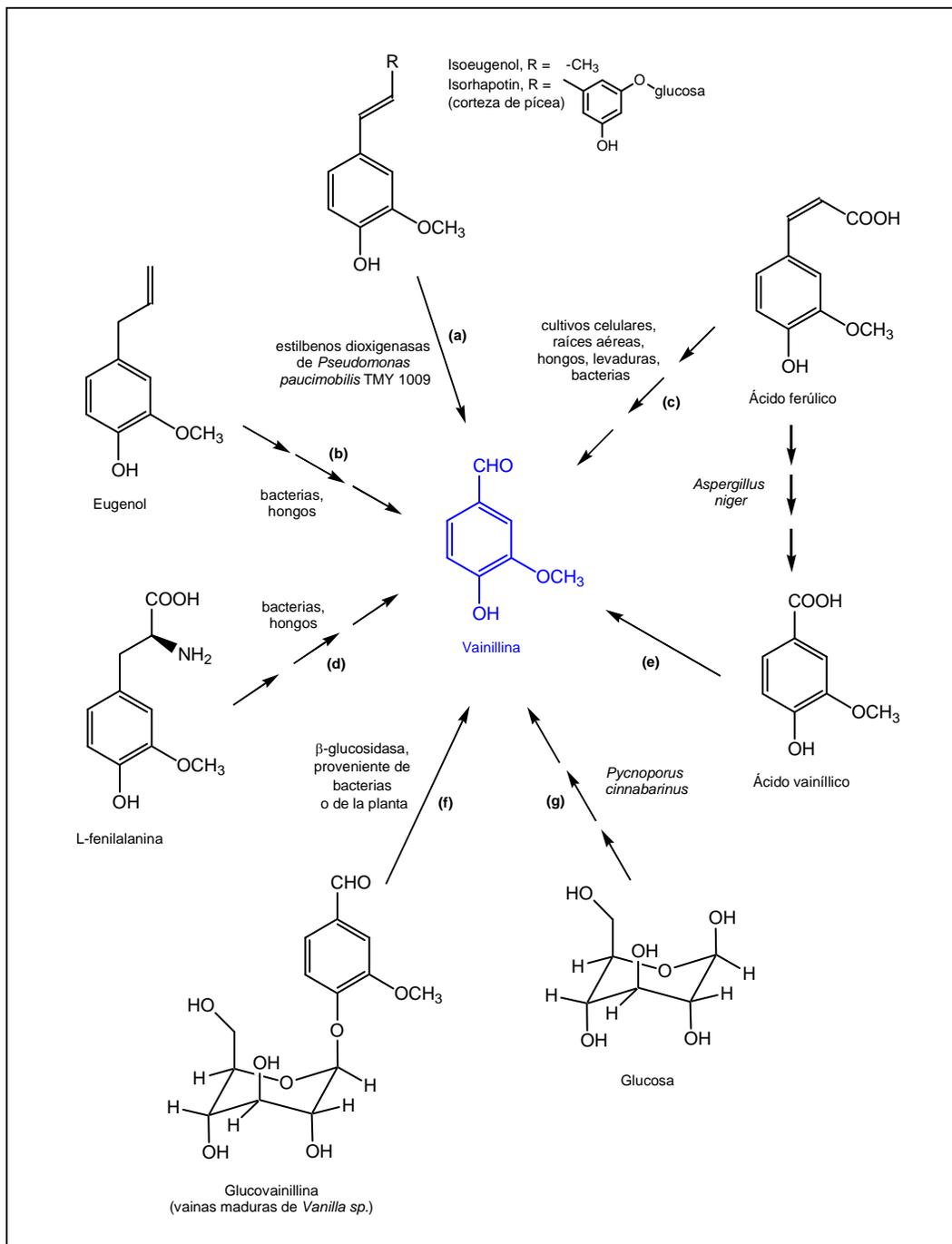


Figura 7: Producción biotecnológica de la vainillina. Además de la fuente tradicional (vainas de vainilla), la vainillina se puede obtener por biotransformación de algunos otros precursores (32).

Sin embargo, estas nuevas propuestas no son aún económicamente factibles (presentan bajo rendimiento) y en muchos casos no se obtiene un producto con todos los componentes secundarios de aroma y sabor que posee la vainilla natural (32). En el caso de cultivos celulares, la mayor dificultad radica en encontrar células o tejidos

que puedan desarrollarse de manera adecuada en cultivos y por tiempo prolongado. Además, la extracción de estos componentes a partir de los distintos cultivos celulares, resulta ser un proceso poco eficiente (33).

A pesar del esfuerzo por obtener vainillina mediante biotransformación, la Food and Drug Administration (FDA) señala que solo es posible rotular como “vainilla natural” aquellos extractos o vainillina que provienen del fruto de la vainilla. Los provenientes de biotransformación necesariamente deben rotularse como “sabor natural” pero dentro de la categoría de saborizantes distintos del extracto natural de vainilla (30).

En cuanto al precio de la vainilla que se ofrece hoy en día en el mercado, éste varía considerablemente, dependiendo de su origen. La vainilla natural o extracto de vainilla obtenido a partir de las vainas puede llegar a costar entre 1 500 y 3 000 dólares americanos por kilogramo. La vainillina obtenida por biotransformación se vende aproximadamente a 1 000 dólares americanos por kilogramo. Por su parte, un kilogramo de vainillina sintetizada de manera química se vende a 15 dólares americanos (30).

A pesar del menor precio, la desventaja de emplear tanto vainillina sintética como vainillina proveniente de otras fuentes naturales procesadas por métodos biosintéticos, es que el producto carece de los demás componentes responsables del sabor y aroma que posee la vainilla natural.

## 2 DETERMINACIÓN DEL PERFIL AROMÁTICO DEL FRUTO DE LA VAINILLA

### 2.1 Proceso de curado de la vainilla

La cosecha de los frutos de vainilla se realiza cuando las vainas han perdido su forma angular y sus bordes se tornaron redondeados. En este estado, las vainas no están aún abiertas, son de color verde brillante y sus extremos, de color amarillo. Se recolectan en canastos e inmediatamente se realiza una clasificación de los frutos, separando las vainas de primera clase de las de calidad inferior. Las vainas de calidad inferior son aquellas que miden menos de 12 cm de longitud o que fueron cosechadas tardíamente y que se encuentran abiertas. Las vainas de calidad inferior se procesan por separado (34).

A nivel comercial, el extracto natural de vainilla no se prepara a partir del fruto recién cosechado, sino con vainas que han sido sometidas a un tratamiento previo llamado "proceso de curado". Mediante este proceso los glucósidos de vainillina y otros componentes son liberados o hidrolizados por acción de la enzima endo- $\beta$ -D-glucosidasa. De esta manera se logra que el fruto adquiera el aroma característico, al liberar a las agliconas respectivas (A – F, Figura 4).

El proceso de curado difiere según el país e incluso entre las diversas áreas de producción. Esta diferencia puede tener una influencia muy importante en la variación de la calidad y del perfil aromático de las vainas que se comercializan (34). El curado sigue siendo una técnica tradicional y artesanal que consiste básicamente en cuatro etapas: marchitamiento, sudado, secado y acondicionamiento (6, 34, 35, 36).

El curado se inicia sumergiendo las vainas frescas en baño de agua caliente (60 – 75 °C) por 1, 2 ó 3 minutos (etapa de marchitamiento). Con esta temperatura se logra detener el proceso vegetativo natural del fruto (o evitar la dehiscencia) y perturbar la estructura celular, pero no inactivar las enzimas responsables de la hidrólisis de glucósidos. El proceso de curado mexicano inicialmente no contaba con esta etapa, pero se sabe que actualmente sí la incluyen en su proceso (6). Luego de este paso, se escurren las vainas, se envuelven en frazadas y se colocan en unas cajas cerradas herméticamente por 24 horas, para que se enfríen muy lentamente. A continuación se lleva a cabo la etapa de soleado y transpiración (sudado). Esta consiste en exponer las vainas al sol durante la hora más caliente del día (generalmente cubiertas con frazadas) por un período de 2 a 3 horas y por las noches guardarlas en cajas

herméticamente cerradas para que continúe el proceso de transpiración. En el proceso de sudado se eleva la temperatura para promover las reacciones enzimáticas, provocar un secado inicial rápido y evitar fermentaciones dañinas (34). Gran parte del aroma se desarrolla en esta etapa debido a la actividad de las enzimas propias del fruto (36). Este procedimiento se repite todos los días por un período de 2 a 3 semanas. Al cabo de este tiempo las vainas se tornan de un color café.

Durante esta etapa, se deben inspeccionar cuidadosamente las vainas y en caso de que se observe crecimiento de hongos, se realiza uno de los siguientes procedimientos, según la gravedad del problema (34):

- Leve: Se limpia las vainas afectadas con una tela empapada de alcohol.
- Moderado: Las vainas afectadas se limpian con alcohol y además se hierven por 1 hora.
- Severo: Si el daño no es superficial sino que es interno, se corta y desecha la parte dañada y la otra parte se limpia con alcohol y se hierve por 1 hora.

Siguiendo con el proceso de curado, las vainas se alisan y estiran una por una. A continuación se lleva a cabo el proceso de secado, el cual se realiza a temperatura ambiente y en lugares bien ventilados y libres de humedad. El secado dura aproximadamente 1 mes y culmina cuando las vainas reduzcan su peso inicial a un tercio (contenido final de humedad de 18 – 30% humedad). El fin del proceso de secado se caracteriza por el cambio de color café, que presenta luego del proceso de sudado, a negro (34) así como por la flexibilidad, suavidad y aroma de las vainas (35).

El proceso de curado finaliza con la etapa de acondicionamiento, el cual puede extenderse algunos meses (entre tres y cuatro meses aproximadamente). Durante este periodo se hace más notable el desarrollo de las características sensoriales del fruto de la vainilla, es decir, su sabor y agradable aroma (36). En el proceso de acondicionamiento, las vainas son atadas en grupos de 50 unidades, se envuelven en papel encerado y se almacenan en recipientes cerrados. Son conservados en ambientes ventilados, a temperaturas entre 35 y 40 °C. Cada semana las vainas son inspeccionadas (34).

Una vez concluido el proceso de acondicionamiento, se procede a la clasificación de las vainas según su color, calidad y tamaño. Se atan en grupos de 50 vainas utilizando ligas de hule o pabilo, se envuelven en papel cera, se colocan en bolsas de polietileno y estas a su vez se colocan en cajas de cartón selladas. Finalmente, las vainas están listas para ser exportadas o comercializadas (34).

Al finalizar el extenso proceso de curado, se obtienen unas vainas delgadas, oscuras y flexibles, con una superficie ligeramente oleosa y con la inconfundible fragancia de la vainilla (10).

Dado que el proceso de curado puede durar incluso hasta nueve meses, se han realizado esfuerzos para acelerar este proceso mediante el uso de hornos. Esta práctica se realiza especialmente en algunas zonas de Indonesia. Sin embargo, las vainas que se obtienen por este método, a pesar de tener suficiente cantidad de vainillina, presentan algunas diferencias físicas (aspecto y humedad, principalmente) lo cual hace que sean consideradas como vainas de menor calidad (6).

En el proceso de curado están involucrados procesos térmicos, reacciones enzimáticas y actividad microbiana. Dentro de las reacciones enzimáticas, no solo participa la enzima  $\beta$ -D glucosidasa sino también otras, como las polifenol oxidasas y peroxidasas, responsables del cambio de color de verde a marrón, así como de la producción del aroma (36). Aparte del proceso enzimático, se sabe que existe una contribución microbiana en la obtención del sabor y aroma de la vainilla. Esta contribución ha sido muchas veces sugerida pero muy poco investigada. Se sabe que en la degradación microbiana de la celulosa y hemicelulosa están involucrados  $\beta$ -glucosidasas; que la degradación de la lignina por microorganismos (hongo blanco, actinomicetas y otras bacterias) pueden producir compuestos aromáticos; y que la actividad microbiana en las paredes celulares produce ácido ferúlico, el cual por acción de bacterias y hongos puede transformarse en componentes de aroma y sabor (36). Roling y su equipo de investigación (36) realizaron estudios de la comunidad microbiana en vainas de vainilla a lo largo de todo el proceso de curado. Ellos detectaron la presencia de gran cantidad de bacilos termofílicos y termotolerantes (*B. smithi*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumilis* y *B. firmus*) en vainas curadas y demostraron también que estos eran escasos en vainas frescas. Los resultados mostraron que el mayor cambio en la comunidad microbiana se produce durante las dos primeras etapas de curado (36).

Sin embargo, a pesar del extenso proceso, se ha comprobado que en el caso de las vainas curadas de manera artesanal, la transformación enzimática no es eficiente (37). Se ha demostrado que recurriendo a enzimas exo- $\beta$ -D-glucosidasas, el contenido de la vainillina y de los otros componentes aromáticos aumenta (37, 38). El proceso enzimático, en el cual se produce la hidrólisis de los glucósidos o liberación de las agliconas respectivas, se describe en la sección 2.2.2 para el caso de vainas frescas.

Ranadive y su equipo de investigación (38) encontraron que este tratamiento puede incrementar en 24% el contenido de vainillina. Esto se demostró en el caso de vainillas curadas de Tahití, Tonga, Jamaica y Madagascar. Otras investigaciones reportan un incremento de más de 14% en el contenido de vainillina al tratar vainillas curadas con exo pectinasa y exo- $\beta$ -gucosidasa (37).

## **2.2 Extracción de los componentes del fruto de la vainilla**

A continuación se va a detallar los procesos involucrados en la extracción de los distintos componentes aromáticos (A – F, Figura 4) en vainas curadas y frescas de vainilla.

### **2.2.1 Extracción a partir de vainas curadas**

Una vez concluido el proceso de curado artesanal, el extracto de vainilla se obtiene mediante un simple tratamiento alcohólico de las vainas. A nivel comercial, se cortan o trituran las vainas curadas y se maceran en una solución de etanol – agua por unos días, semanas e incluso meses, hasta obtener un líquido marrón con fuerte olor y sabor a vainilla. Se puede acelerar este proceso calentado la mezcla en reactores y a altas temperaturas (39). Según la Food and Drug Administration (FDA), un extracto de vainilla debe contener 100 g de vainas curadas (cuya humedad sea menor de 25%) en 1 L de alcohol acuoso de concentración no menor a 35%.

Otra manera de realizar la extracción de los componentes aromáticos es mediante solventes (hidrocarburos) o utilizando fluidos supercríticos (40, 41, 42), generalmente CO<sub>2</sub>. Mediante este último, se obtiene un extracto de vainilla denominado “vainilla absoluta”, cuyo precio está alrededor de 5 000 dólares americanos por kilogramo (6).

Se trata de una técnica selectiva puesto que el extracto contiene únicamente los componentes responsables del sabor y aroma (42). Este extracto se utiliza únicamente en las fragancias de más alta calidad.

A nivel de laboratorio, el extracto se obtiene mediante extracción Soxhlet de las vainas curadas, con una solución de etanol acuoso 47.5% v/v durante 24 horas (37, 43).

En estos extractos alcohólicos, la vainillina es el componente más abundante. Su porcentaje es por lo general de 2% en peso del material seco, pero en ocasiones puede llegar a 3 – 4% en peso. Se sabe que las vainas que han sido curadas de manera inadecuada presentan una ligera disminución en el contenido de vainillina (6), y que el contenido de los otros componentes aromáticos presentes en el extracto (alcohol p-hidroxibencílico, alcohol 4-hidroxi-3-metoxibencílico, ácido p-hidroxibenzoico, p-hidroxibenzaldehído y ácido vainílico, en la Figura 4) también varía según el tipo de tratamiento al que fueron sometidas las vainas.

### **2.2.2 Extracción a partir de vainas frescas**

Como se mencionó anteriormente, la vainillina y otros componentes aromáticos no se encuentran como tales en las vainas frescas, sino como  $\beta$ -D-glucósidos.

La hidrólisis de la glucovainillina y los otros glucósidos se inicia de manera natural, ya sea en una etapa tardía de maduración o en una etapa temprana del proceso de curado (44). Se sabe que en vainas maduras (antes de la dehiscencia) tanto la glucovainillina como la enzima  $\beta$ -D-glucosidasa coexisten pero sin que se produzca la hidrólisis (44). Este fenómeno no ha sido aún totalmente esclarecido, pero existen dos hipótesis al respecto. La primera es que la enzima y el sustrato no se encuentran en el mismo tejido o, si lo están, se encuentran en diferentes compartimientos (44, 45). La segunda posibilidad es que la enzima y el sustrato se encuentran en contacto pero existen otros factores como la presencia de inhibidores (inhibidores  $\beta$ -D-glucosidasa, por ejemplo) que impiden la hidrólisis (44).

Dado que la hidrólisis de glucósidos es un paso muy importante en la obtención del sabor y aroma de la vaina y debido a que no existe información completa de la morfología, anatomía e histología de la vaina, Odoux y su equipo de investigación (44) realizaron los estudios correspondientes. Mediante microscopía electrónica analizaron

las distintas zonas de una vaina fresca, las cuales se presentan en la Figura 8. En cada una de ellas se midió la concentración del sustrato (glucovainillina) y la actividad de la enzima  $\beta$ -D-glucosidasa. Se observó que la glucovainillina no está presente en las zonas 1 y 2 pero sí en las zonas 3, 4 y 5 (Figura 8A, i). En otro experimento en el que se congeló la vaina, se encontró que la mayor concentración de glucovainillina se encuentra alrededor de la zona 7, la cual presenta color blanquecino debido a que la glucovainillina es insoluble a bajas temperaturas (Figura 8B). La actividad de la  $\beta$ -D-glucosidasa se midió utilizando dos sustratos distintos, p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucósido (Figura 8ii) y glucovainillina (Figura 8iii) y se observó que en ambos casos la distribución de la enzima es similar a lo obtenido en la Figura 8i al cuantificar la glucovainillina. La mayor actividad se encuentra en las zonas 3 y 4. Se estudió también el comportamiento de las enzimas en presencia (barras blancas) y ausencia (barras negras) de una determinada concentración de glucona- $\delta$ -lactona, un inhibidor competitivo  $\beta$ -D-glucosidasa.

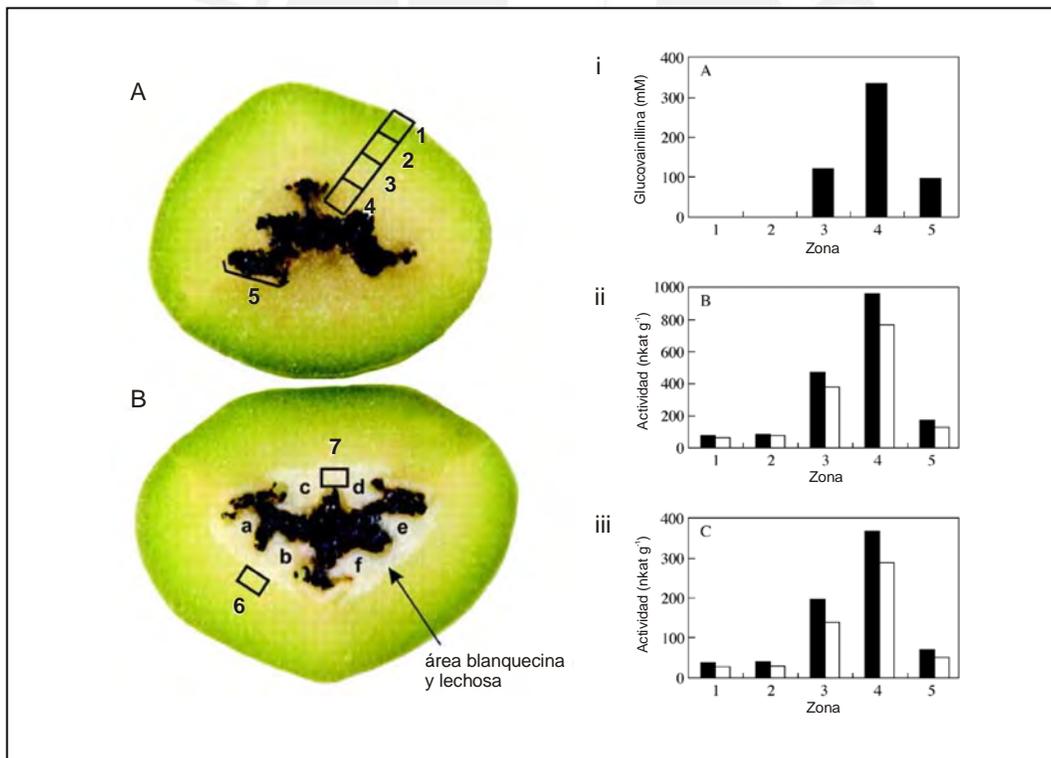


Figura 8: Los gráficos de la izquierda muestran la distribución de la vainilla en zonas. (A) Vaina a temperatura ambiente y (B) vaina congelada. Los gráficos de la derecha detallan la concentración de glucovainillina (8i) y la actividad de la enzima en las diferentes zonas utilizando como sustrato p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucósido (8ii) y glucovainillina (8iii) (44).

Los resultados de la investigación de Odoux y su equipo (44) revelaron que el sustrato y la enzima se encuentran en los mismos tejidos, pero esto no significa que ambos se encuentran en el mismo compartimiento subcelular. Probablemente la enzima  $\beta$ -D-glucosidasa se encuentra en el compartimiento citoplásmico y/o periplásmico y la glucovainillina, en el vacuolar (44). La hidrólisis de los glucósidos presentes en las vainas frescas ocurre en una etapa tardía de maduración o durante el proceso de curado (44), debido a que en estas etapas se producen alteraciones en la estructura celular.

Dado que la hidrólisis de glucósidos no se produce de manera espontánea en vainas frescas y teniendo en cuenta que el proceso de curado es muy extenso, diversos estudios muestran que es posible realizar una hidrólisis enzimática de vainas frescas en el laboratorio. Se realiza generalmente añadiendo una o más enzimas que muestran actividad glucosidasa (enzimas exo- $\beta$ -D-glucosidasa) (46). Estas enzimas mayormente consisten en una mezcla de enzimas que poseen actividad celulasa, hemicelulasa, xilanasas, pectinasas y/o  $\beta$ -glucosidasas, en particular  $\beta$ -D-glucosidasa. Comercialmente existe una serie de enzimas adecuadas para llevar a cabo la hidrólisis, tales como Viscozima (Novo), Celuclast (Novo), Depol 40L (Biocatalysts Limited, Wales UK), Cristalzyme Concord (Valley Research, Inc., South Bend, Ind.), entre otros (39).

Con el objetivo de evaluar el perfil aromático del fruto de *Vanilla pompona* de los humedales de Madre de Dios y demostrar que posee suficiente cantidad de vainillina, se decidió evaluar vainas frescas. Con ello, se evitó realizar el extenso proceso de curado tradicional y en su lugar las vainas se sometieron a hidrólisis enzimática, utilizando una mezcla de enzimas comerciales (Viscozima y Celuclast).

El éxito de un tratamiento enzimático depende de las condiciones a las que se trabajen. Las condiciones óptimas incluyen, mínimo grado de alcohol en la solución acuosa utilizada (no mayor de 10 % v/v), pH entre 3 y 7, agitación constante y temperatura no mayor de 82 °C. El tratamiento o incubación se realiza por lo general por un tiempo no mayor de 10 horas (39) y se requiere por lo menos una enzima que presente entre 10 y 1 000 unidades  $\beta$ -glucosidasa por gramo de vaina de vainilla (46).

Otro factor muy importante a considerar en una extracción enzimática es la actividad específica  $\beta$ -D-glucosidasa de cada una de las enzimas con las que se va a trabajar.

La medición de la actividad  $\beta$ -D-glucosidasa de las enzimas se puede realizar de diversas maneras. Uno de los métodos más comunes es el colorimétrico, en el que por lo general se detecta la cantidad de glucosa liberada luego de la hidrólisis de un determinado glucósido, por acción de las enzimas  $\beta$ -D-glucosidasas.

Un método muy utilizado por diversos grupos de investigadores para determinar glucosa es el del ácido 3,5-dinitrosalicílico, desarrollado por Miller (47). La glucosa es un azúcar reductor, que en medio alcalino es capaz de reducir el ácido 3,5-dinitrosalicílico (amarillo,  $\lambda_{\text{máx}} = 360 \text{ nm}$ ) a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (rojo-marrón,  $\lambda_{\text{abs}} = 550 \text{ nm}$ ). Sin embargo, Cañizares-Macías y su equipo (48) indican que la reducción no ocurre a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico sino a ácido 3,5-diaminosalicílico (rojo-marrón,  $\lambda_{\text{máx}} = 480 \text{ nm}$ ). La reacción se esquematiza en la Figura 9, en donde el sustrato a hidrolizar por los complejos enzimáticos es la celobiosa.

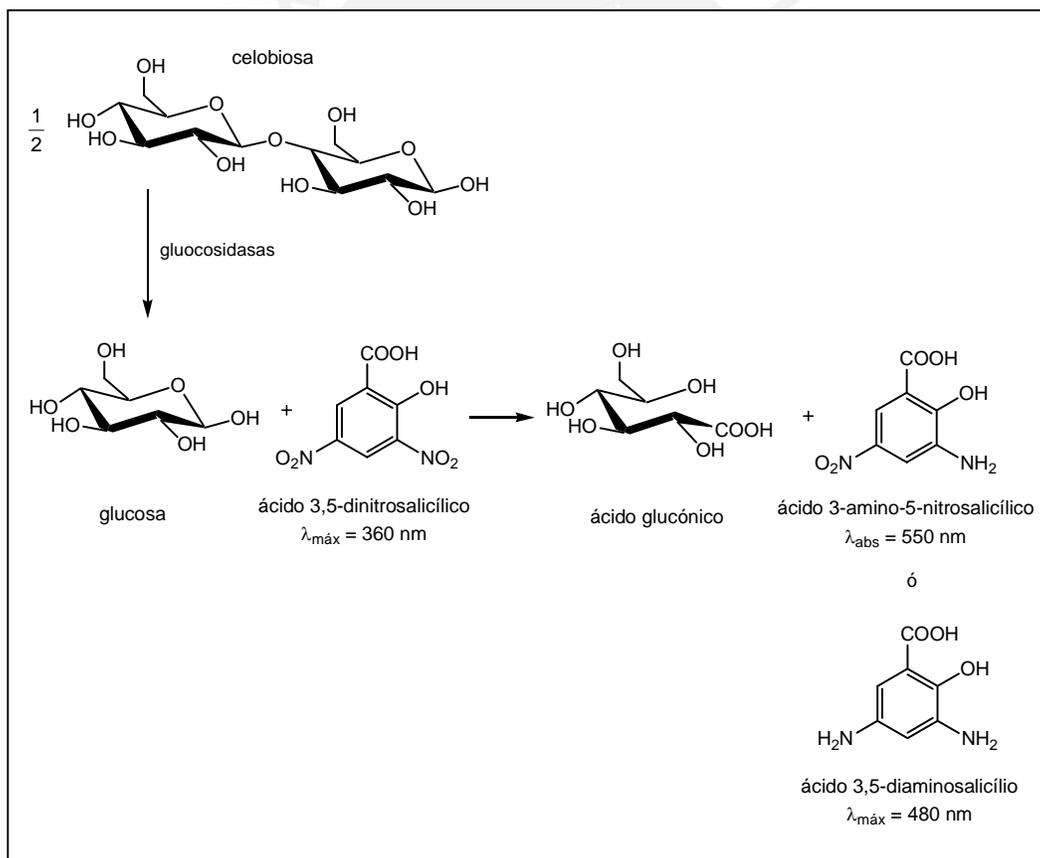


Figura 9: Método del ácido 3,5-dinitrosalicílico para cuantificar glucosa liberada luego de la hidrólisis de la celobiosa por acción de las glucosidasas. Algunas fuentes indican que el ácido 3,5-dinitrosalicílico se reduce a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (47) mientras que otras aseguran que se forma el ácido 3,5-diaminosalicílico (48).

Utilizando esta metodología, la actividad de estas enzimas se define como mg de glucosa liberada por mL de enzima por minuto (mg glucosa / mL enzima x minuto).

### **2.3 Cuantificación de los componentes del fruto de la vainilla mediante HPLC**

Según la AOAC International, el método oficial para analizar un extracto de vainilla y/o un saborizante artificial de vainilla es mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Se trata del método N° 990.25 e incluye el análisis de ácido p-hidroxibenzoico, ácido vainílico, vainillina, p-hidroxibenzaldehído y etil vainillina (49).

Por ello, el análisis de los extractos de vainas de *Vanilla pompona* de los humedales de Madre de Dios, preparado siguiendo los pasos ilustrados en la Figura 10 (extracción Soxhlet, extracción etanólica y extracción en medio acuoso), se realizó mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Mediante los seis estándares (vainillina, p-hidroxibenzaldehído, ácido p-hidroxibenzoico, ácido vainílico, alcohol p-hidroxibencílico y alcohol 4-hidroxi-3-metoxibencílico, A – F, en la Figura 4) se prepararon las curvas correspondientes que permitieron cuantificar cada componente.

El presente estudio consistió, entonces, en evaluar el perfil aromático de vainas de *Vanilla pompona* de los humedales de Madre de Dios. Para ello, fue necesario determinar las condiciones adecuadas de separación por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) de cada uno de los seis componentes (A – F, Figura 4), así como cuantificar su contenido mediante las curvas estándar preparadas. Este perfil aromático se comparó con el de la vainilla de Madagascar (*Vanilla planifolia* Andrews), especie de gran importancia a nivel comercial.

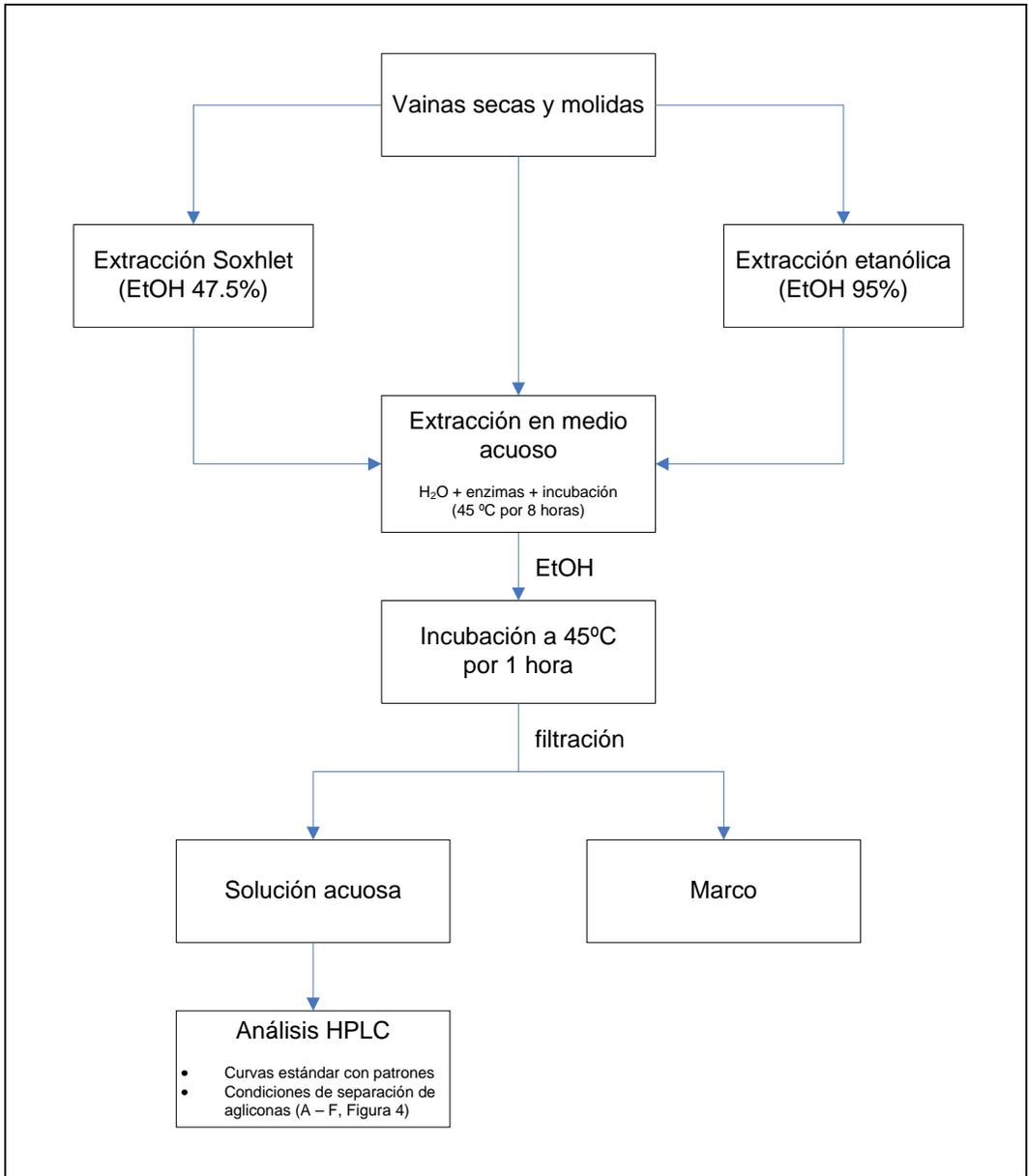


Figura 10: Esquema de trabajo

### **3 PARTE EXPERIMENTAL**

#### **3.1 Equipos y Materiales**

Los análisis por HPLC fueron realizados en un sistema de HPLC LaChrom D-7000 Merck-Hitachi, con software HSM 7000 (versión 4.0, Merck-Hitachi) y columna Lichrospher C18 125x4 mm. Los componentes con los que cuenta el equipo son: degasificador de solvente en línea Merck L-7612, interfase D-7000 Merck-Hitachi, bomba cuaternaria LaChrom L-7100 Merck-Hitachi, horno para columna L-7350, inyector Rheodyne 9125 y detector de arreglo de diodos UV-VIS L-7450A.

Los espectros UV-VIS se realizaron en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 2, con software UV WinLab – versión 2.80.03 Perkin Elmer 1994–1999, Perkin Elmer Corp.

Los ensayos para determinar la actividad de las enzimas (Viscozima y Celuclast) se realizaron en un Molecular Devices Versamax Tunable Microplate Reader, cuyo rango de longitud de onda es de 340 a 850 nm. El software empleado fue SoftMax® Pro.

El sistema de liofilización LABCONCO, Freeze Dry System / Freezone 4.5, se utilizó para el secado del material vegetal.

La pulverización del material seco se realizó con un molino eléctrico IKA® MF 10.1.

El calentamiento y agitación constante durante la extracción enzimática se realizó en una incubadora Heidolph Instruments, INKUBATOR 1000 / UNIMAX 1010.

Los reactivos Viscozima (código V2010, lote 085K1587), Celuclast (código C2730, lote 074K1156), ácido 3,5-dinitrosalicílico, D-(+)-glucosa, celobiosa, alcohol p-hidroxibencílico, alcohol 4-hidroxi-3-metoxibencílico, ácido p-hidroxibenzoico, p-hidroxibenzaldehído, ácido vainílico y vainillina fueron adquiridos de Sigma – Aldrich, mientras que dihidrógenofosfato de potasio e hidróxido de sodio en lentejas de Merck; etanol 99.9% de J.T. Baker y fosfato dibásico de sodio anhidro de Mallinckrodt AR. El agua Milli-Q fue proporcionado por el Instituto de Corrosión y Protección de la Pontificia Universidad Católica del Perú.

El estudio químico que se presenta en este trabajo se centra en la *Vanilla pompona* Schiede *subsp. grandiflora* (Lindl.) Soto-Arenas, especie abundante en los humedales de Madre de Dios. Los frutos fueron obtenidos mediante polinización asistida realizada por Ethan Householder, participante del equipo de John Janovec – BRIT (Botanical Research Institute of Texas). Estas fueron recolectadas específicamente de un humedal que se encuentra a 2 km de la estación biológica CICRA (Centro de Investigación y Capacitación Río de los Amigos), en Madre de Dios.

Se cuenta con cuatro tipos de vainas de vainilla:

1. Vainas de *Vanilla pompona* maduras, recolectadas aproximadamente en el sétimo mes de crecimiento, cuando presentaban color amarillo, pero aún sin que se hayan abierto.
2. Vainas de *Vanilla pompona* inmaduras, recolectadas entre el tercer y cuarto mes de crecimiento, de color verde (antes de su maduración).
3. Vainas de *Vanilla pompona* de prueba: Un lote de vainas maduras enviadas a Lima fueron sometidas a condiciones inadecuadas durante el viaje. Estos frutos fueron almacenados en bolsas de plástico cerradas. Con estas vainas se realizaron las pruebas preliminares para determinar las condiciones óptimas de tiempo y temperatura de incubación enzimática, proporción adecuada de enzimas, entre otros.
4. Vainas de *Vanilla planifolia* curadas, obtenidas de un mercado de Lima.

Las vainas maduras e inmaduras de *Vanilla pompona* fueron recolectadas en el año 2006, pero en épocas distintas. Una vez recibidas, todas las vainas se colocaron en nitrógeno líquido por 10 minutos y se almacenaron en el congelador a  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Las vainas congeladas fueron liofilizadas y una vez secas, molidas finamente ( $\varnothing = 2\text{ mm}$ ).

Las vainas de *Vanilla planifolia* curadas fueron adquiridas en el Mercado de Surquillo. Fueron compradas a diferentes vendedores y en diferentes épocas. Unas fueron adquiridas en marzo del 2006 y otras, en setiembre del 2007. El precio actual de una vaina de *Vanilla planifolia* curada en el mercado peruano es de 20 soles. Estas vainas fueron tratadas de manera similar a las vainas de *Vanilla pompona*: congelamiento con nitrógeno líquido, liofilizado y molienda.

## 3.2 Metodología

### 3.2.1 Medición de actividad $\beta$ -D-glucosidasa de las enzimas

Se determinó la actividad de las enzimas comerciales Viscozima y Celuclast, las cuales se utilizaron durante la hidrólisis enzimática. La Viscozima (densidad: 1.2 g/mL), obtenida del *Aspergillus sp.*, es una mezcla multienzimática compuesta por arabinasas, celulasas, hemicelulasas, xilanasas y  $\beta$ -glucanasas, con rango de pH para actividad óptima entre 3.3 y 5.5, a una temperatura entre 50 y 60 °C. El Celuclast (densidad: 1.2 g/mL), obtenido del *Trichoderma reesei*, cataliza la hidrólisis de celobiosa, celulosa y otros carbohidratos, con rango de pH de actividad óptima entre 4.5 y 4.8 a temperatura entre 48 y 60 °C.

La actividad  $\beta$ -D-glucosidasa de ambas enzimas (Viscozima y Celuclast) se determinó utilizando el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (47, 48), esquematizado en la Figura 9. Se empleó celobiosa como sustrato y la incubación se llevó a cabo en buffer fosfato pH = 5.00. Este buffer se preparó disolviendo  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (4.5 g) y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0.04 g) en agua Milli-Q (1 L). Se ajustó el pH añadiendo  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .

Para determinar el contenido de glucosa liberada por acción de cada una de las enzimas (Viscozima y Celuclast) en un determinado tiempo es necesario contar con una curva estándar de glucosa que permita cuantificar la glucosa liberada mediante el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (47, 48). La curva estándar se preparó con disoluciones de glucosa de 16, 10, 5, 2, 1 y 0.5 mM en buffer fosfato pH = 5.00. Para la validación de la curva estándar se preparó 3 soluciones de glucosa de 4.32, 8.42 y 12.28 mM en buffer fosfato pH = 5.00.

Se preparó una solución 8.7 mM de ácido 3,5-dinitrosalicílico disolviendo el ácido 3,5-dinitrosalicílico (0.2 g) en una solución de NaOH 0.8 M (100 mL).

Se mezcló la solución de glucosa (2 mL) con la solución de ácido 3,5-dinitrosalicílico (2 mL). Se colocó en el termostato a 80 °C por 30 minutos. Al cabo de este tiempo, se dejó enfriar en baño de hielo por 2 minutos. Se tomó 200  $\mu\text{L}$  de la solución, se colocó en una microplaca y se leyó la absorbancia a 550 nm en el Versamax. Se procedió de manera secuencial con cada solución de glucosa. El blanco (solución buffer) se trabajó de la misma manera. Cada concentración de glucosa se realizó por triplicado y la absorbancia reportada en cada caso es el promedio de ocho lecturas.

Para medir la actividad de las enzimas, se preparó una solución 4 mM de celobiosa (0.07 g de celobiosa en 50 mL de solución buffer fosfato pH = 5.00). Se colocó 24 mL de esta solución en una fiola de 25 mL, se añadió 150 µL de Viscozima ó 300 µL de Celuclast, según la enzima a estudiar, y se enrasó con buffer fosfato. Se colocó 2 mL de la solución en cuatro viales etiquetados como 0, 5, 20 y 30 minutos respectivamente. Se taparon los viales, se cubrieron con papel aluminio y se colocaron en la incubadora a 45 °C, por el tiempo indicado en las etiquetas. Luego de la incubación, se añadió la solución de ácido 3,5-dinitrosalicílico (2 mL) para oxidar la glucosa liberada y se colocó en el termostato a 80 °C por 30 minutos. Se dejó enfriar en baño de hielo por 2 minutos, se colocó en una microplaca (200 µL) y se midió la absorbancia de cada una de las muestras a 550 nm, usando el Versamax. De manera paralela se preparó un blanco, en el cual se realizó todo el procedimiento anterior excepto la adición de alguna de las enzimas. El proceso se realizó por duplicado y cada medida de absorción fue realizada ocho veces.

### **3.2.2 Determinación de humedad**

Para determinar la humedad de las vainas, primero se pesó el material vegetal fresco. Luego, se congeló con nitrógeno líquido por 30 minutos y se liofilizó por 3 días. Al cabo de este tiempo el material vegetal seco se pesó. El contenido de humedad se reportó como la diferencia entre el peso inicial y final por gramo de vaina de vainilla fresca. Este proceso se realizó por cuadruplicado.

### **3.2.3 Extracción de los componentes de vainilla (A – F, Figura 4)**

Los componentes de la vainilla fueron extraídos de las vainas siguiendo los tres procesos de extracción mencionados en la Figura 10. Los métodos utilizados para cada tipo de vaina se indican en la Tabla 2.

Tabla 2: Procedimientos realizados para extraer los componentes de interés de la vainilla, con los diferentes tipos de vainas

Vaina	En medio acuoso	Etanólica	Soxhlet
<i>Vanilla pompona</i> madura	✓		✓
<i>Vanilla pompona</i> inmadura	✓		
<i>Vanilla pompona</i> de prueba	✓	✓	✓
<i>Vanilla planifolia</i>	✓		

Extracción en medio acuoso: Se pesó 1 g del material vegetal seco y finamente molido. Se añadió agua Milli-Q (10 mL), Viscozima (150 µL) y Celuclast (300 µL). Se dejó bajo agitación constante a 45 °C por 8 horas. Luego de este tiempo se agregó etanol 99.9% (10 mL) y se dejó bajo agitación constante a 45 °C por 1 hora más. La suspensión se filtró al vacío. El sólido se lavó dos veces con agua Milli-Q (1.5 mL aproximadamente). La solución se llevó a una fiola de 25 mL y se enrasó con agua Milli-Q. De esta última solución se tomó 7.5 mL, se colocó en una fiola de 10 mL y se enrasó con agua Milli-Q (porcentaje final de etanol, 30%). Se tomó 20 µL de esta solución final y se analizó por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) tanto a 230 como a 254 nm. De manera paralela se realizó un blanco, con el objetivo de evaluar el perfil aromático de la vainilla antes de la hidrólisis enzimática. Se realizó todo el procedimiento descrito anteriormente, excepto la adición de las enzimas. Todos los experimentos se realizaron por duplicado y cada una de las muestras se analizó dos veces por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

Extracción etanólica: Se pesó 1 g del material vegetal seco y finamente molido. Se añadió etanol 95% (5 mL) y se dejó reflujar por 1 hora (50). Se rotaevaporó todo el etanol y se siguió el procedimiento descrito para el caso de una extracción en medio acuoso.

Extracción Soxhlet: Se pesó y se envolvió en papel filtro de filtración rápida 2 g del material vegetal seco y finamente molido. Esta extracción se realizó siguiendo estrictamente el procedimiento propuesto por Voisine y su equipo de investigadores (43). En este caso, la extracción Soxhlet se realizó con una solución de etanol al 47.5% v/v (200 mL), durante 24 horas. Se rotaevaporó a menos de 100 mL de solución (remoción total del EtOH), se llevó a una fiola de 100 mL y se enrasó. Se

tomó 10 mL de la solución, se añadió Viscozima (150  $\mu$ L) y Celuclast (300  $\mu$ L) y se siguió el mismo procedimiento descrito en el caso de la extracción en medio acuoso. De manera similar se trabajó un blanco.

Teniendo como referencia el protocolo de Ruiz-Terán y colaboradores (37), se realizó además la extracción Soxhlet de 2 g de vainas de *Vanilla pompona* secas y finamente molidas con etanol 47.5% v/v (50 mL) pero durante 7 horas. Se enrasó a 50 mL, se tomó 25 mL de esa solución y se rotaevaporó todo el etanol. Esta última solución (10 mL) se sometió a extracción en medio acuoso para llevar a cabo la hidrólisis enzimática. De manera similar se trabajó un blanco.

### **3.2.4 Cuantificación de los componentes del extracto mediante HPLC**

Los componentes de la vainilla se separaron por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). En la bibliografía utilizada (29, 37, 43) se describen diversos sistemas para la fase móvil. Después de realizar varios ensayos se optó por trabajar con un sistema de gradiente ácido fosfórico 0.001 M – metanol, de varias etapas, resultados que se describen en la siguiente sección.

Para cuantificar los seis componentes de interés de la vainilla se elaboraron curvas estándar de alcohol p-hidroxibencílico, alcohol 4-hidroxi-3-metoxibencílico, ácido p-hidroxibenzoico, p-hidroxibenzaldehído, ácido vainílico y vainillina. Para ello, se disolvió alcohol p-hidroxibencílico (0.06 g), alcohol 4-hidroxi-3-metoxibencílico (0.09 g), ácido p-hidroxibenzoico (0.04 g), p-hidroxibenzaldehído (0.11 g), ácido vainílico (0.07 g) y vainillina (0.23 g) en etanol 99.9% (100 mL). A partir de esta solución se realizan 7 diluciones a 100 mL con alícuotas de: 30, 22.5, 15, 7.5, 3, 0.3 y 0.03 mL. En todas ellas la concentración de EtOH fue del 30% v/v. Las soluciones se analizaron por HPLC a 230 y a 254 nm. En todos los casos, el volumen inyectado fue de 20  $\mu$ L. Se graficó área (obtenido de los cromatogramas) versus concentración de cada componente en mM. Cada curva se realizó por triplicado. Para la validación de las curvas estándar se preparó una solución en EtOH 99.9% (100 mL) que contenía alcohol p-hidroxibencílico (0.02 g), alcohol 4-hidroxi-3-metoxibencílico (0.03 g), ácido p-hidroxibenzoico (0.02 g), p-hidroxibenzaldehído (0.01 g), ácido vainílico (0.01 g) y vainillina (0.09 g). De la solución anterior se tomó una alícuota de 3 mL, se llevó a una fiola de 10 mL y se enrasó con agua Milli-Q. Se analizó por HPLC.

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Actividad $\beta$ -D-glucosidasa de las enzimas

La longitud de onda a la que se monitorea la reacción entre el ácido 3,5-dinitrosalicílico y un azúcar reductor (glucosa o celobiosa) es 550 nm, debido a que a esta longitud de onda tanto el azúcar reductor como el ácido 3,5-dinitrosalicílico no presentan absorbancia. En la Figura 11 se presenta el espectro UV-VIS del ácido 3,5-dinitrosalicílico.

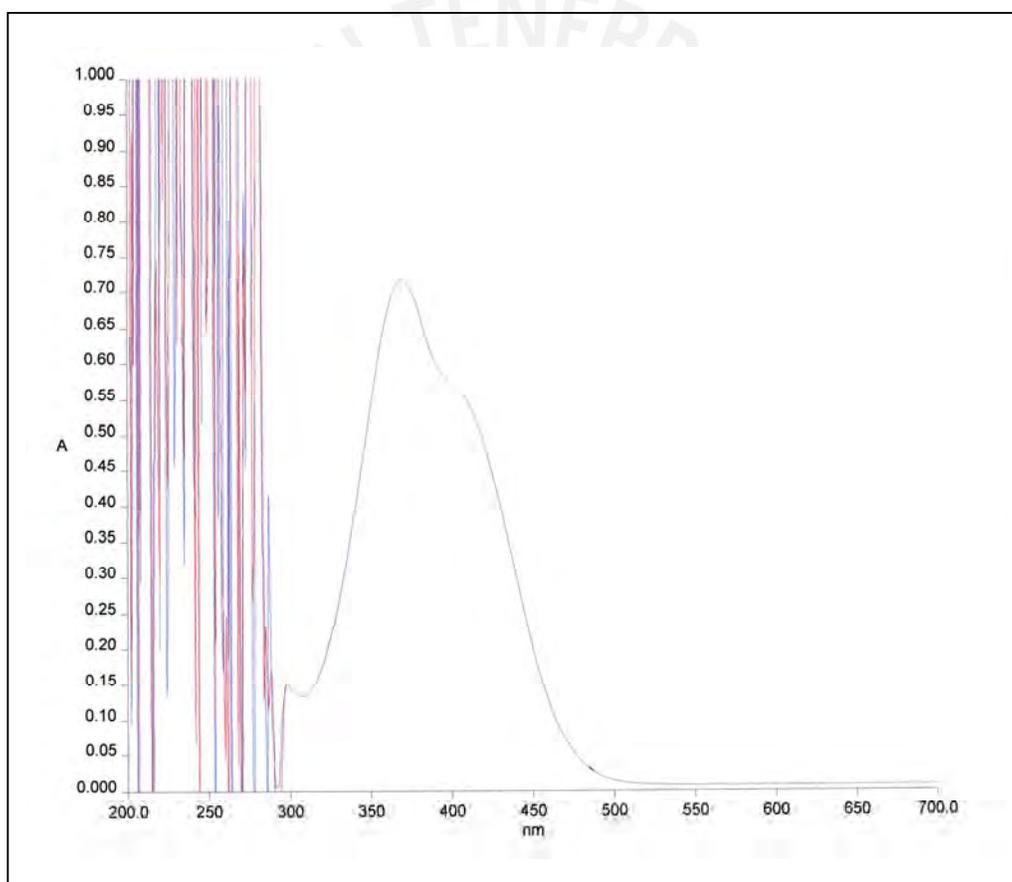


Figura 11: Espectro UV-VIS del ácido 3,5-dinitrosalicílico

La curva estándar de glucosa obtenida siguiendo la metodología descrita en 3.2 se presenta en la Figura 12. Esta ha sido obtenida del resultado de tres distintos

experimentos. La cuantificación de algunas soluciones problema, con distintas concentraciones de glucosa (Tabla 3), permitieron validar dicha curva.

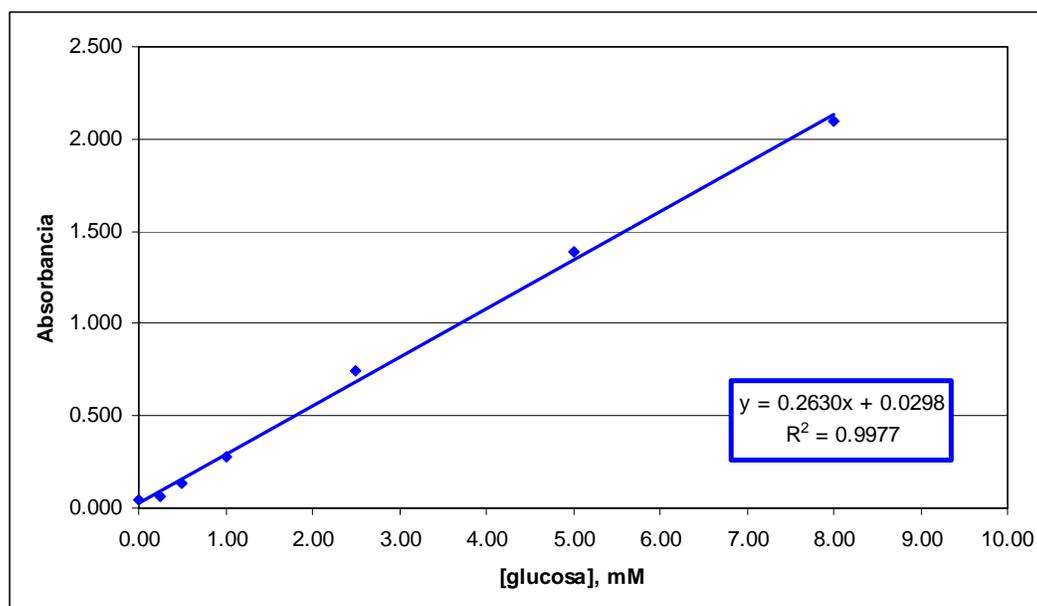


Figura 12: Curva estándar de glucosa (promedio de tres diferentes experimentos)

Tabla 3: Validación de la curva estándar de glucosa

Muestra problema	[teórico], mM	[experimental], mM *	% error
Muestra 1	2.160	2.270 ± 0.080	5.1
Muestra 2	4.210	4.400 ± 0.140	4.5
Muestra 3	6.140	6.260 ± 0.080	2.0

(\*) Los resultados son promedio de dos experimentos independientes

En cuanto a la actividad de las enzimas, no ha sido posible determinar la actividad de Viscosima y Celuclast utilizando celobiosa como sustrato, a pesar de que Ruiz-Terán y su equipo (37) reportan, con este mismo sustrato, que Viscosima puede liberar  $5.8 \pm 1$  mg glucosa / mL producto x minuto y Celuclast,  $5.0 \pm 0.4$  mg glucosa / mL producto x minuto. En nuestro caso hemos observado que las enzimas hidrolizan la celobiosa tan rápido que no es posible observar un cambio gradual del contenido de glucosa a lo

largo del tiempo. Se probó variando las concentraciones de sustrato y enzima e incluso trabajando a temperaturas muy bajas, pero no se logró observar la hidrólisis gradual. Sin embargo, se puede afirmar que ambas enzimas cumplen su función correctamente ya que se observó la absorbancia esperada para 4 mM de glucosa (absorbancia alrededor de 1.1, según la curva estándar de glucosa presentada en la Figura 12) a partir de una solución 2 mM de celobiosa. En las Figuras 13 y 14 se puede verificar lo mencionado. En ambos casos se observa que no hay variación considerable de absorbancia a lo largo del tiempo, ya que desde un inicio se observa la absorbancia máxima esperada (1.1 aproximadamente).

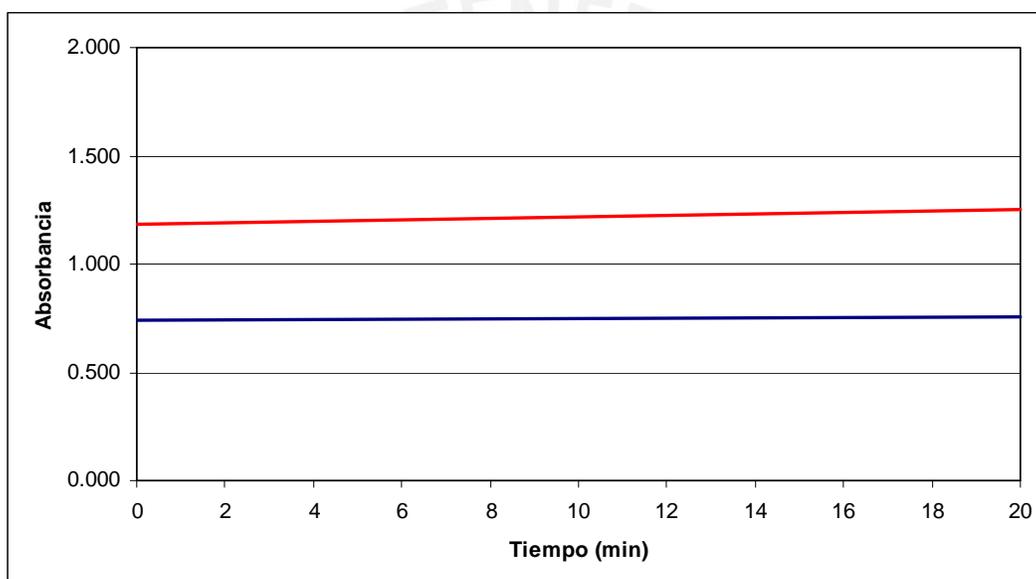


Figura 13: Actividad de Viscozima empleando celobiosa como sustrato. La línea azul representa el blanco, es decir, la absorbancia debido a la reacción entre celobiosa (azúcar reductor) y ácido 3,5-dinitrosalicílico, en la que se produce la reducción de este último a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (47) o ácido 3,5-diaminosalicílico (48). La línea roja indica la absorbancia debido a la reacción entre el ácido 3,5-dinitrosalicílico y la glucosa liberada (azúcar reductor) por acción de Viscozima a lo largo del tiempo.

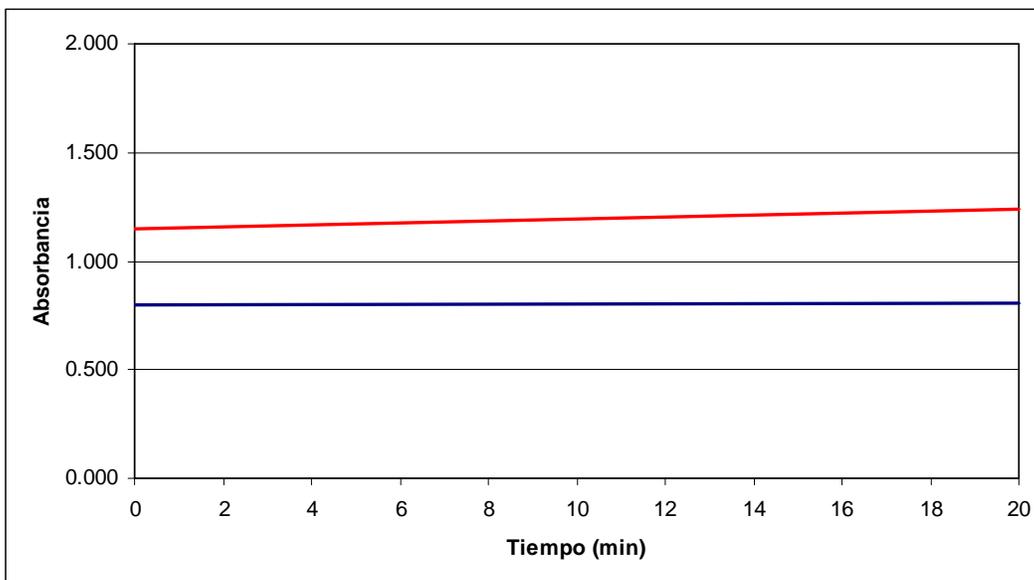


Figura 14: Actividad de Celuclast empleando celobiosa como sustrato. La línea azul representa el blanco, es decir, la absorbancia debido a la reacción entre celobiosa (azúcar reductor) y ácido 3,5-dinitrosalicílico, en la que se produce la reducción de este último a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (47) o ácido 3,5-diaminosalicílico (48). La línea roja indica la absorbancia debido a la reacción entre el ácido 3,5-dinitrosalicílico y la glucosa liberada (azúcar reductor) por acción de Celuclast a lo largo del tiempo.

El hecho de que Ruiz-Terán y su equipo de investigación (37) pudieran observar la actividad de ambas enzimas utilizando celobiosa como sustrato podría deberse a que sus complejos enzimáticos posiblemente presentaban menor actividad que el utilizado por nosotros. El proveedor de ambas enzimas (Sigma – Aldrich) indica que la actividad de Viscozima es 122.4 unidades por mL, utilizando carboximetilcelulosa como sustrato y que la actividad de Celuclast es 957.6 unidades por mL, utilizando beta glucan como sustrato. Dado que no se contaba con ninguno de estos sustratos y que Ranadive (38) emplea enzimas comerciales con actividad  $\beta$ -glucosidasa para curar vainas frescas y maduras en el laboratorio en una determinada proporción (0.5 mg de enzima por gramo de vaina de vainilla seca), se procedió a trabajar con las enzimas mencionadas sin importar su actividad específica, pero esperando obtener experimentalmente la cantidad óptima a utilizar.

#### 4.2 Humedad de los frutos de *Vanilla pompona* y de *Vanilla planifolia*

En cuanto a la humedad de los frutos de *Vanilla pompona* de los humedales de Madre de Dios, se determinó que el porcentaje de humedad es de 85%. Este valor se determinó utilizando vainas inmaduras de *Vanilla pompona* y es el promedio de cuatro distintos experimentos en los que se obtuvo 85.7, 85.4, 85.1 y 85.4 % de humedad respectivamente. El porcentaje de humedad de las vainas de *Vanilla planifolia* curadas adquiridas en el mercado es del 10%.

Nuestros resultados son corroborados por los obtenidos por Graves y su equipo de investigación (51), quienes afirman que el contenido de humedad de las vainas de vainilla es por lo general alrededor de 85%. En el caso de vainas curadas, algunas fuentes, señalan que el porcentaje de humedad oscila entre 25 y 30%, por lo que se puede afirmar que nuestras vainas, obtenidas comercialmente, se encuentran mucho más secas.

#### 4.3 Análisis y cuantificación por HPLC

El sistema de gradiente (Tabla 4) utilizado para finalmente lograr una adecuada separación de los componentes (A – F, Figura 4) requirió varias etapas.

Tabla 4: Sistema de gradiente ácido fosfórico 0.001 M – metanol

Tiempo (min)	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (0.001 M)	Metanol
0	90	10
5	90	10
15	60	40
20	60	40
30	90	10
40	90	10

Este sistema permitió separar al alcohol p-hidroxibencílico ( $t_R = 5.3$  minutos) del alcohol 4-hidroxi-3-metoxibencílico ( $t_R = 8.5$  minutos), mientras que el ácido p-hidroxibenzoico eluyó a 10.9 minutos, el p-hidroxibenzaldehído a 12.5 minutos, el ácido vainílico a 13.4 minutos y la vainillina a 14.8 minutos.

El alcohol p-hidroxibencílico y el alcohol 4-hidroxi-3-metoxibencílico se evalúan a 230 nm, mientras que el ácido p-hidroxibenzoico, el p-hidroxibenzaldehído, el ácido vainílico y la vainillina, a 254 nm. A pesar de que todos los estudios previos indican que la longitud de onda adecuada es 254 nm, se decidió trabajar con dos lambdas distintos pues al analizar los espectros UV-VIS de cada uno de los componentes, los cuales se presentan en las Figuras 15 – 17, queda claro que los  $\lambda_{m\acute{a}x}$  de absorción del alcohol p-hidroxibencílico y del alcohol 4-hidroxi-3-metoxibencílico se encuentran alrededor de 230 nm, presentando muy poca absorbancia a 254 nm, mientras que, el ácido p-hidroxibenzoico, el p-hidroxibenzaldehído, el ácido vainílico y la vainillina sí presentan una considerable absorbancia a 254 nm.

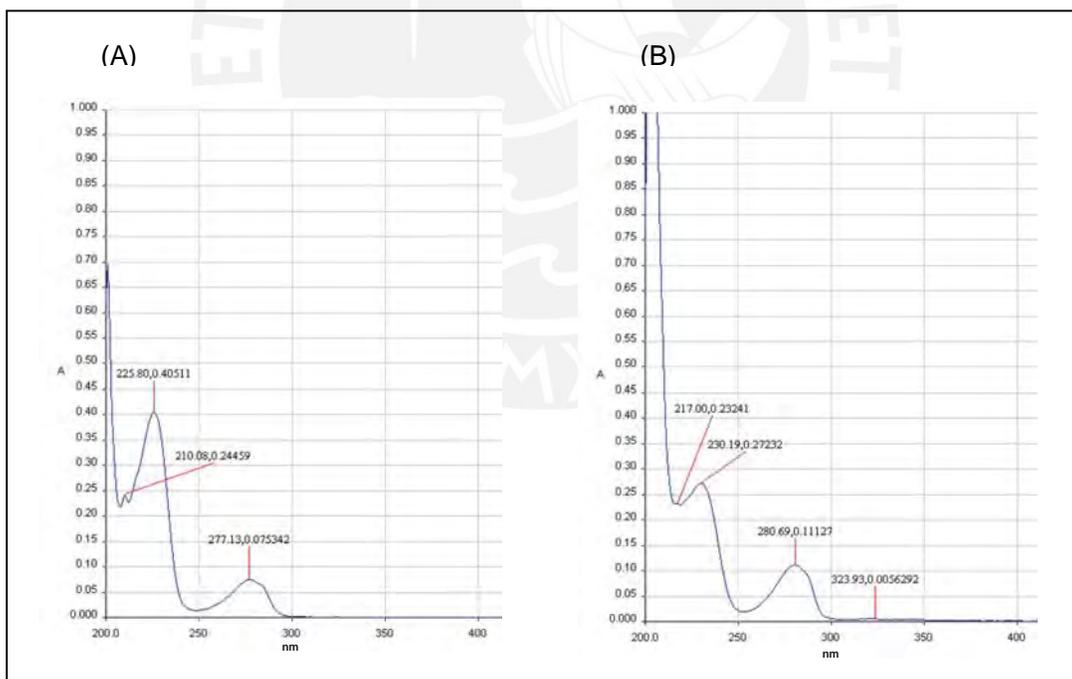


Figura 15: Espectro UV de (A) alcohol p-hidroxibencílico en etanol (0.006 mg/mL) y (B) alcohol 4-hidroxi-3-metoxibencílico en etanol (0.006 mg/mL)

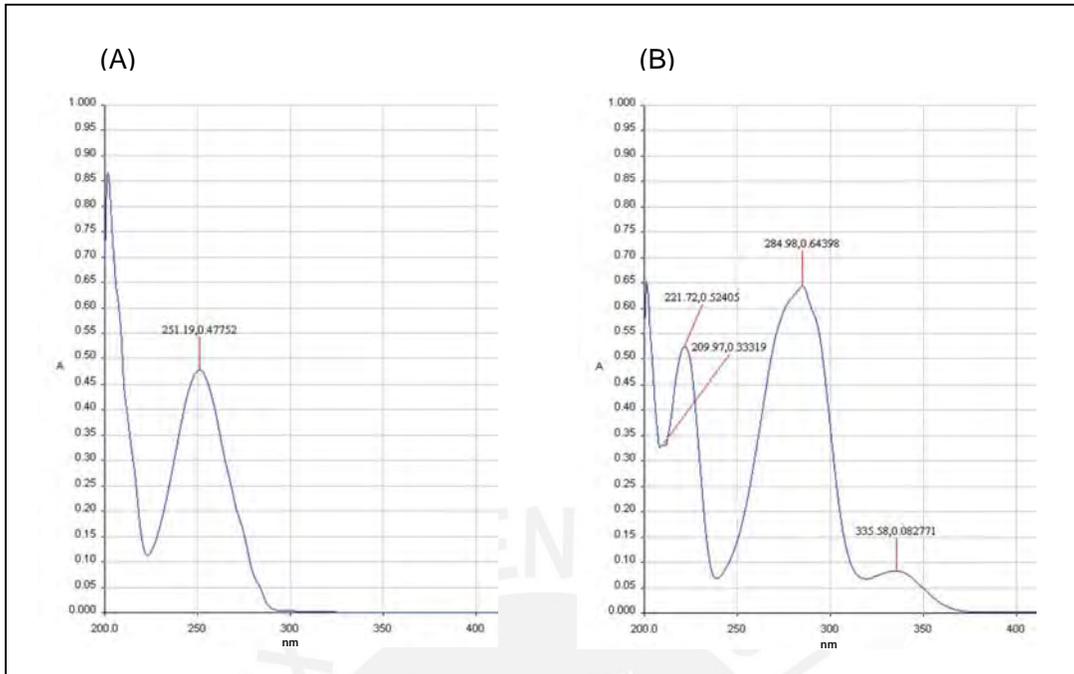


Figura 16: Espectro UV de (A) ácido p-hidroxibenzoico en etanol (0.006 mg/mL) y (B) p-hidroxibenzaldehído en etanol (0.006 mg/mL)

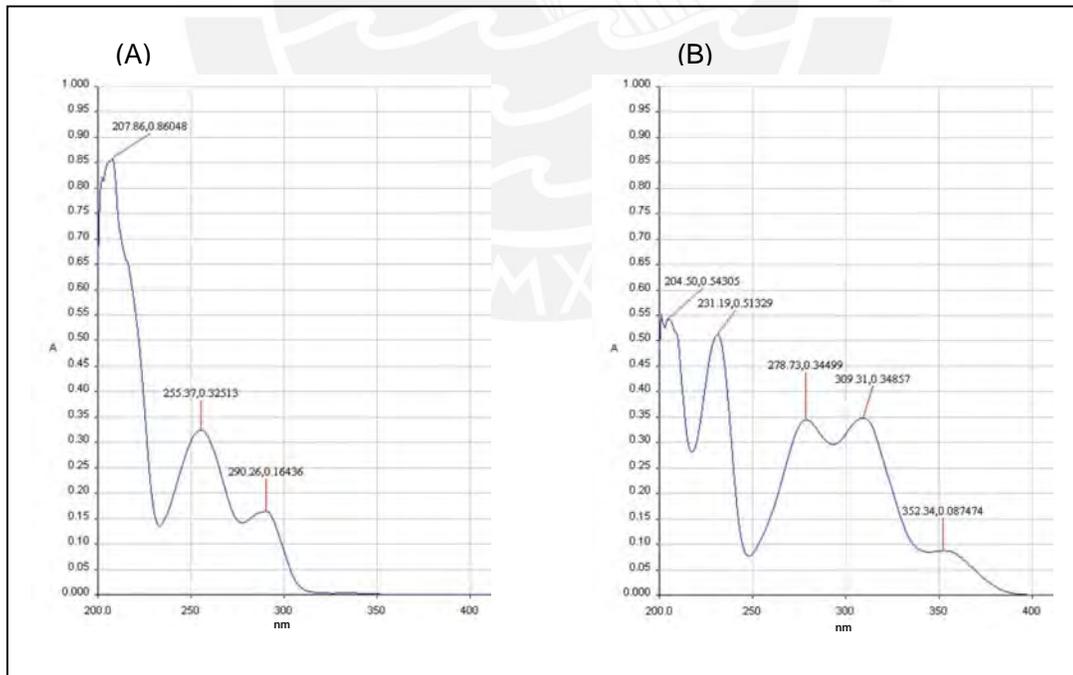


Figura 17: Espectro UV de (A) ácido vainílico en etanol (0.006 mg/mL) y (B) vainillina en etanol (0.006 mg/mL)

Estos resultados son muy importantes, pues resulta ser el primer estudio en donde se reporta el contenido de alcohol p-hidroxibencílico y de alcohol 4-hidroxi-3-metoxibencílico. Investigaciones previas indican que la separación inadecuada de estos dos componentes ha sido una limitación para su estudio. Al respecto, Ranadive (38) menciona que se sabe que el alcohol p-hidroxibencílico y el alcohol 4-hidroxi-3-metoxibencílico están también presentes en los extractos de *Vanilla planifolia* y *tahitensis* analizados por él y su equipo de investigación, pero debido a que no se ha podido lograr una separación adecuada mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), no ha sido posible cuantificarlos.

Tanto nuestro gradiente como el monitoreo a dos longitudes de onda (230 y 254 nm) simultáneamente han permitido detectar y cuantificar exitosamente los seis componentes aromáticos del extracto de vainilla.

En la Figura 18 se muestra el perfil de una mezcla de alcohol p-hidroxibencílico, alcohol 4-hidroxi-3-metoxibencílico, p-hidroxibenzoico, p-hidroxibenzaldehído, ácido vainílico y vainillina (componentes puros) a 254 nm. En la Figura 19 se muestra la misma mezcla de compuestos pero a 230 nm.

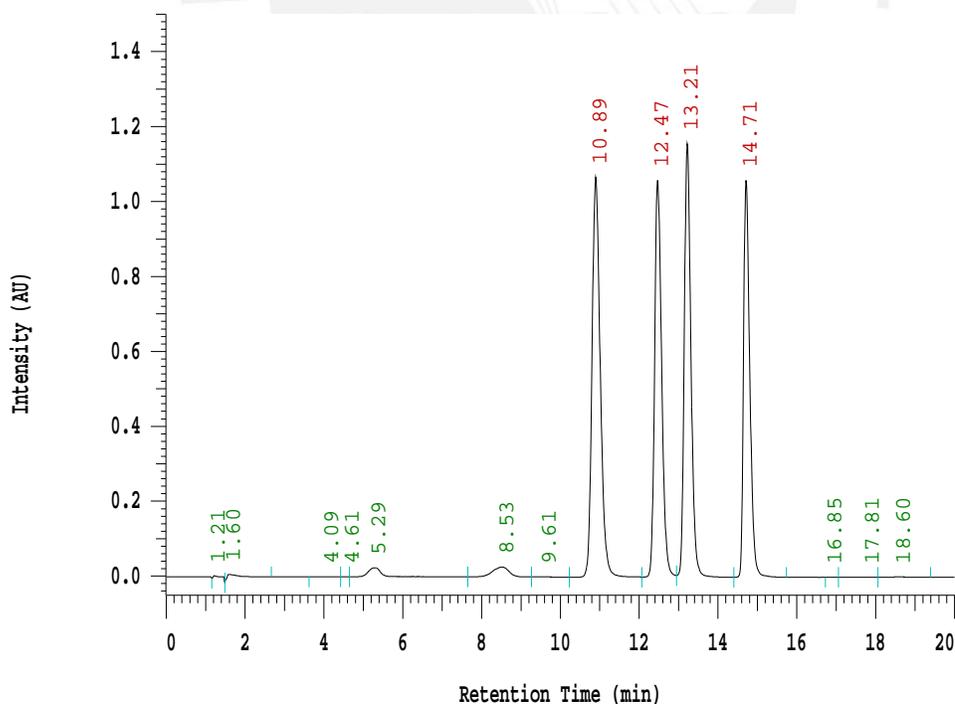


Figura 18: Cromatograma del ácido p-hidroxibenzoico ( $t_R = 10.89$  min), p-hidroxibenzaldehído ( $t_R = 12.47$  min), ácido vainílico ( $t_R = 13.21$  min) y vainillina ( $t_R = 14.71$  min), monitoreado a  $\lambda = 254$  nm

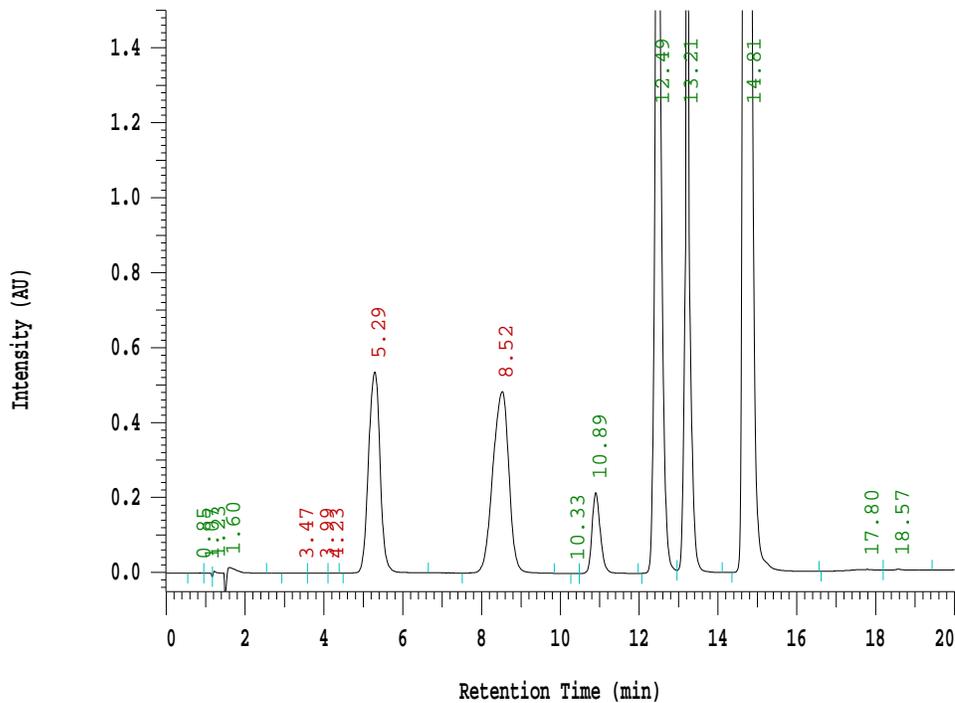


Figura 19: Cromatograma de alcohol p-hidroxibencílico ( $t_R = 5.29$  min) y alcohol 4-hidroxi-3-metoxibencílico ( $t_R = 8.52$  min), monitoreado a  $\lambda = 230$  nm

Las curvas estándar obtenidas para cada uno de los componentes (alcohol p-hidroxibencílico, alcohol 4-hidroxi-3-metoxibencílico, p-hidroxibenzoico, p-hidroxibenzaldehído, ácido vainílico y vainillina) se presentan en las Figuras 20 – 25.

Todas las curvas son resultado de 3 distintos experimentos. Para validar cada una de las curvas se preparó una solución problema con determinada concentración de cada componente. En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos. La concentración teórica se calculó a partir del peso de cada componente añadido en la solución problema y la concentración experimental se calculó a partir de las ecuaciones de recta respectivas.

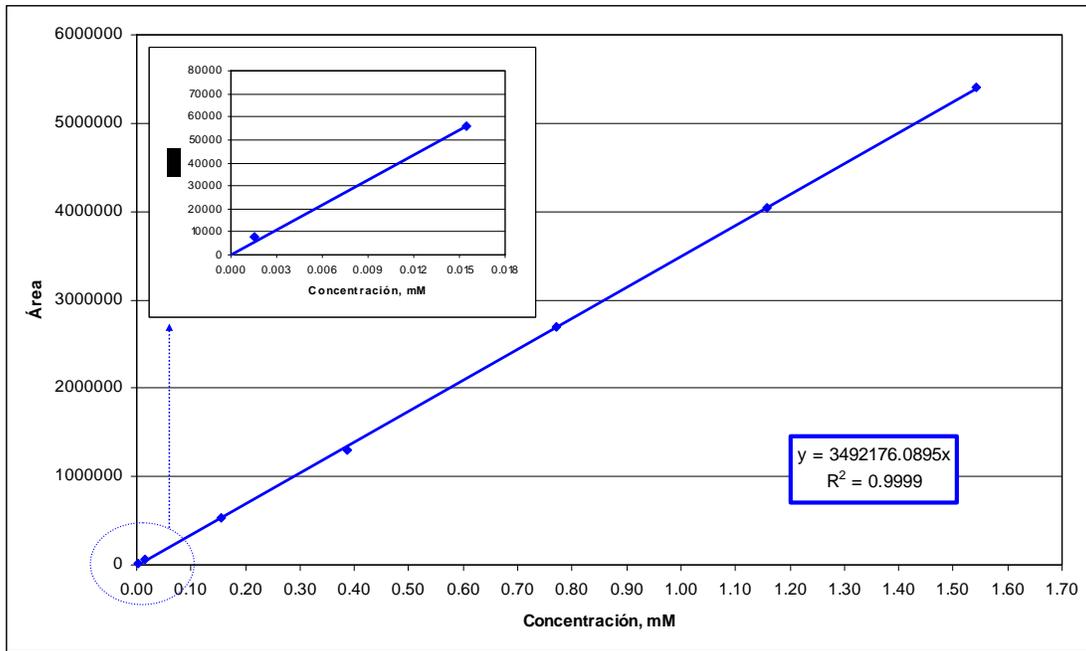


Figura 20: Curva estándar del alcohol p-hidroxibencílico medida a  $\lambda = 230$  nm (promedio de tres diferentes experimentos)

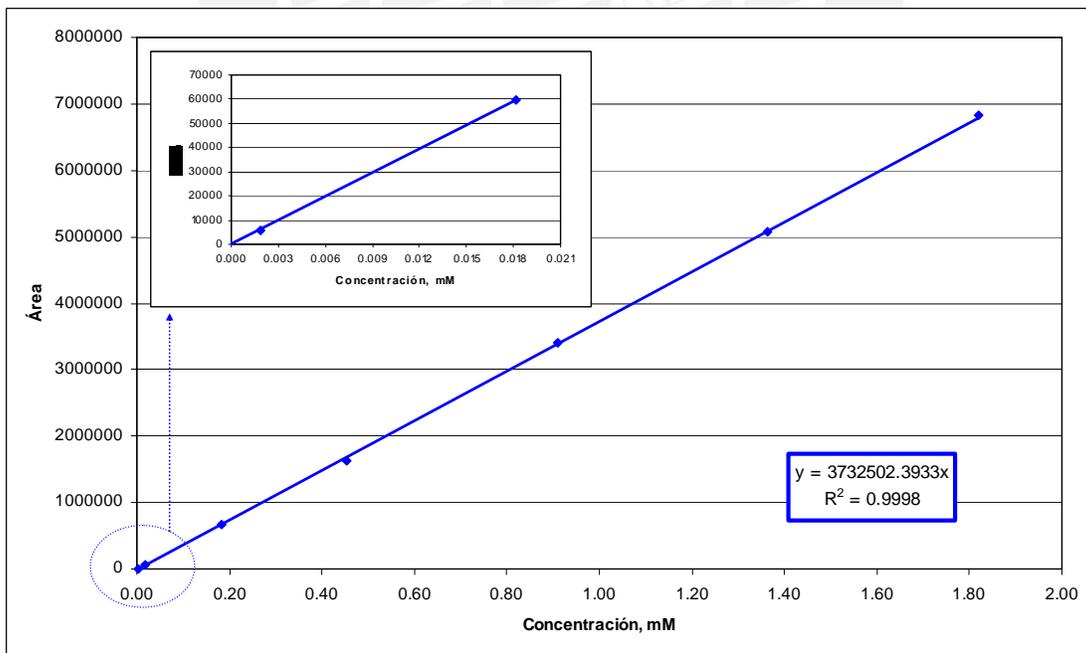


Figura 21: Curva estándar del alcohol 4-hidroxi-3-metoxibencílico medida a  $\lambda = 230$  nm (promedio de tres diferentes experimentos)

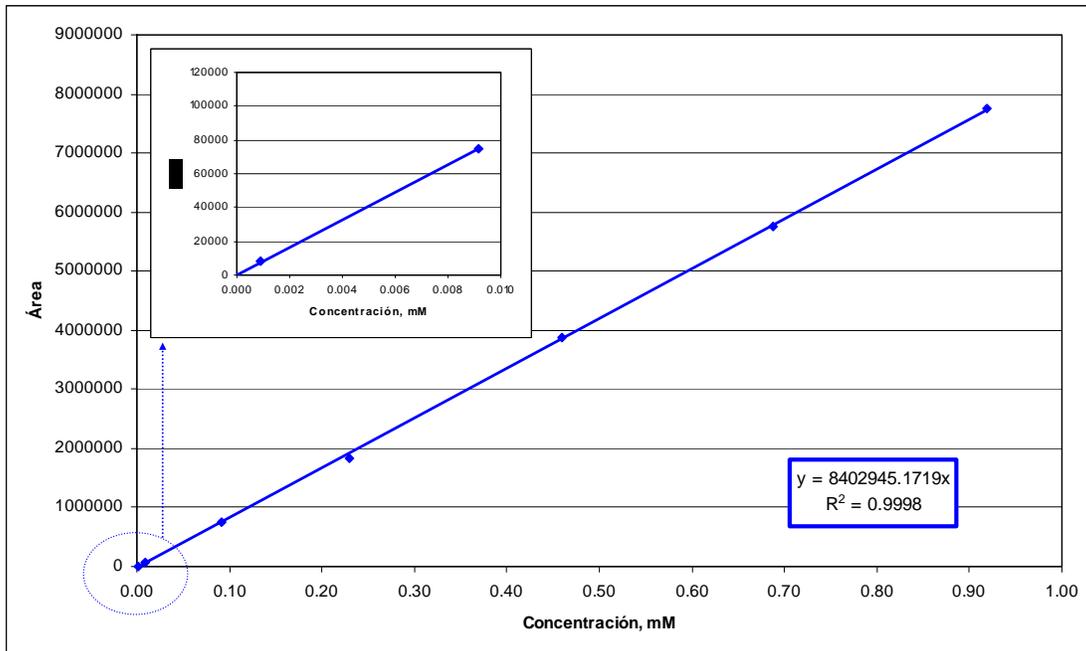


Figura 22: Curva estándar del ácido p-hidroxibenzoico medida a  $\lambda = 254 \text{ nm}$  (promedio de tres diferentes experimentos)

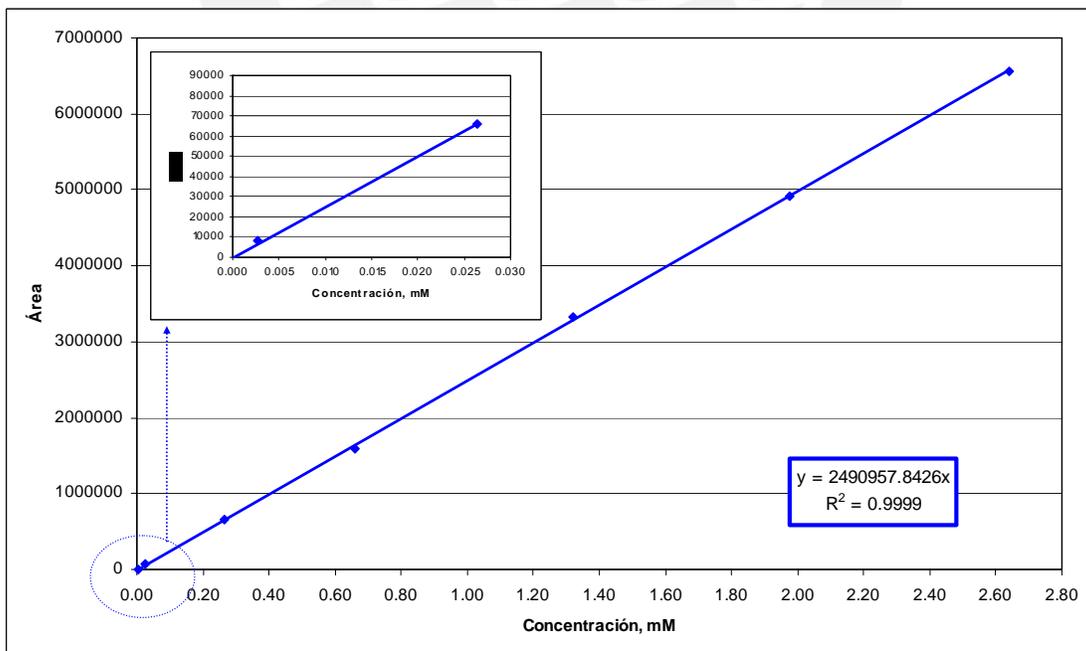


Figura 23: Curva estándar del p-hidroxibenzaldehído medida a  $\lambda = 254 \text{ nm}$  (promedio de tres diferentes experimentos)

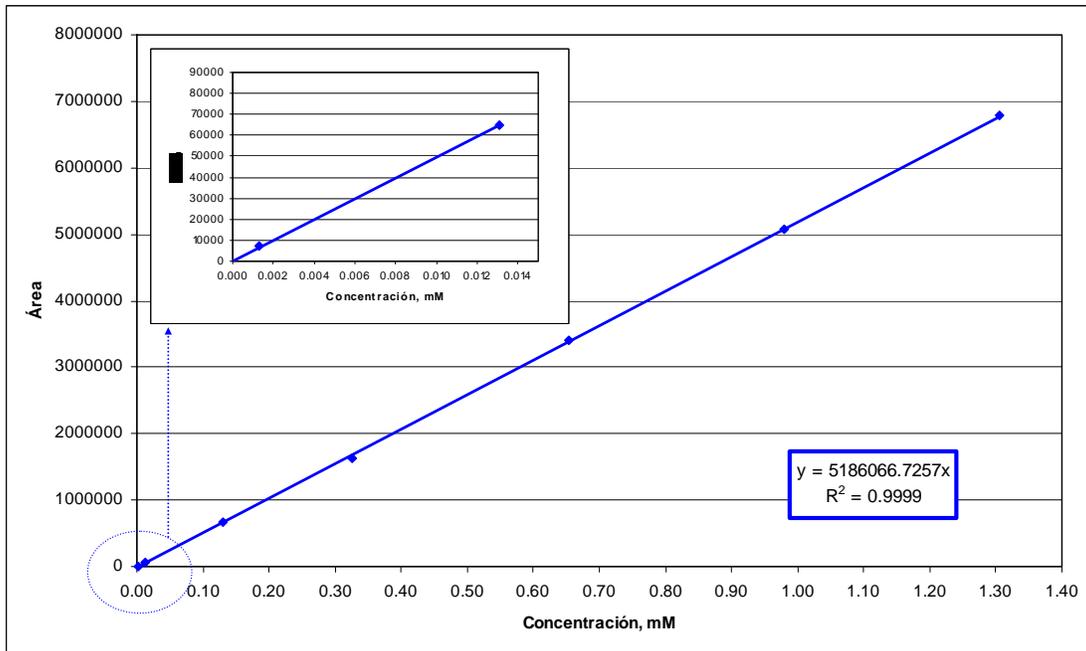


Figura 24: Curva estándar del ácido vainílico medida a  $\lambda = 254$  nm (promedio de tres diferentes experimentos)

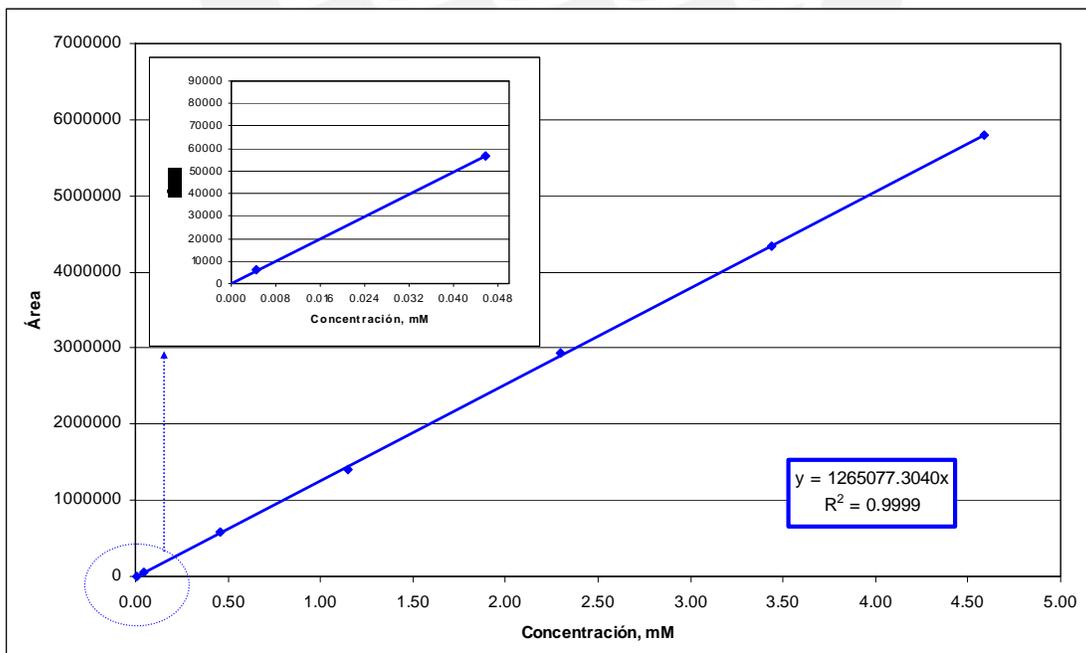


Figura 25: Curva estándar de la vainillina medida a  $\lambda = 254$  nm (promedio de tres diferentes experimentos)

Tabla 5: Concentraciones teóricas y experimentales de los componentes de la vainilla (A – F, Figura 4) para la validación de las curvas estándar

Compuesto	[teórico], mM	[experimental], mM *	% error
Alcohol p-hidroxibencílico	0.396	0.388 ± 0.008	2.2
Alcohol 4-hidroxi-3-metoxibencílico	0.479	0.467 ± 0.004	2.5
Ácido p-hidroxibenzoico	0.428	0.419 ± 0.005	2.2
p-hidroxibenzaldehído	0.339	0.339 ± 0.001	0.2
Ácido vainílico	0.221	0.215 ± 0.001	2.8
Vainillina	1.801	1.790 ± 0.011	0.6

(\*) Los resultados son promedio de tres experimentos independientes analizados por HPLC por duplicado

#### 4.4 Hidrólisis enzimática y determinación del perfil aromático

La proporción adecuada de cada enzima (150 µL de Viscozima y 300 µL de Celuclast en 10 mL ó 0.18 g de Viscozima y 0.36 g de Celuclast por gramo de vaina seca) fue determinada luego de distintos experimentos utilizando vainas de prueba en los que se trabajó con 1.5 mL de Viscozima (B, Tabla 6), 1.5 mL de Celuclast (C, Tabla 6), 150 µL de Viscozima (E, Tabla 6), 600 µL de Viscozima (G, Tabla 6), 150 µL de Viscozima con 150 µL de Celuclast (H, Tabla 6), 300 µL de Viscozima con 300 µL de Celuclast (I, Tabla 6) y 150 µL de Viscozima con 300 µL de Celuclast (J, Tabla 6). A partir de estos resultados se pudo verificar que la cantidad óptima y mínima necesaria para hidrolizar todos los glucósidos es 150 µL de Viscozima y 300 µL de Celuclast (J, Tabla 6) pues a estas concentraciones de cada enzima, el porcentaje de componentes es el máximo esperado.

Se realizaron, además, algunas pruebas para determinar el tiempo adecuado para hidrolizar todos los glucósidos. Se observó que utilizando 150 µL de Viscozima, tanto a 8 horas como a 16 horas (F, Tabla 6) de incubación se obtienen resultados similares. Sin embargo, a 4 horas de incubación (D, Tabla 6), la cantidad de alcohol p-hidroxibencílico, ácido p-hidroxibenzoico, p-hidroxibenzaldehído y vainillina es menor. Por ello, se define como tiempo mínimo = 8 horas de incubación.

El resultado de todos los experimentos realizados (Tabla 6) se reporta en porcentaje en peso (gramo por 100 gramos de vaina seca). Todas las muestras se realizaron por duplicado (experimentos independientes) y cada una de ellas fue analizada mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) por duplicado. Los cromatogramas obtenidos de cada experimento, tanto a 230 nm como a 254 nm, se presentan en los Anexos 5 – 24.

Tabla 6: Resultados de experimentos realizados para determinar la cantidad óptima de enzimas (Viscozima y Celuclast) a utilizar

Descripción	Alcohol p-hidroxibencílico (% peso)	Alcohol 4-hidroxi-3-metoxibencílico (% peso)	Ácido p-hidroxibenzoico (% peso)	p-hidroxibenzaldehído (% peso)	Ácido vainílico (% peso)	Vainillina (% peso)
A Blanco (sin enzimas)	0.13	0.18	0.01	0.02	0.06	1.26
B 1.5 mL de Viscozima, 8 horas	0.81	0.20	0.02	0.03	0.08	1.44
C 1.5 mL de Celuclast, 8 horas	0.83	0.22	0.02	0.03	0.08	1.38
D 150 µL de Viscozima, 4 horas	0.24	0.19	0.01	0.02	0.07	1.32
E 150 µL de Viscozima, 8 horas	0.43	0.18	0.02	0.03	0.07	1.37
F 150 µL de Viscozima, 16 horas	0.42	0.19	0.02	0.03	0.07	1.40
G 600 µL de Viscozima, 8 horas	0.62	0.20	0.02	0.03	0.07	1.41
H 150 µL de Viscozima + 150 µL de Celuclast, 8 horas	0.61	0.19	0.02	0.03	0.07	1.41
I 300 µL de Viscozima + 300 µL de Celuclast, 8 horas	0.76	0.19	0.02	0.03	0.07	1.44
J 150 µL de Viscozima + 300 µL de Celuclast, 8 horas	0.71	0.20	0.02	0.03	0.07	1.45

Una vez validados los métodos de hidrólisis enzimática y de separación y cuantificación, se procedió a analizar el perfil aromático de los diferentes extractos de vainas maduras e inmaduras de *Vanilla pompona* de los humedales de Madre de Dios y de las vainas curadas de *Vanilla planifolia*. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 7. El contenido de cada uno de los componentes del fruto se reporta en porcentaje en peso (gramo por 100 gramos de material vegetal seco). Todas las muestras se realizaron por duplicado (experimentos independientes) y cada una de

ellas fue analizada mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) por duplicado. Los cromatogramas obtenidos de los blancos y de las muestras, tanto a 230 nm como a 254 nm, se presentan en los Anexos 5 – 6 y 23 – 52. La cantidad de enzimas utilizada en cada experimento fue 150  $\mu$ L de Viscozima y 300  $\mu$ L de Celuclast.

Tabla 7: Contenido de los componentes de la vainilla en distintos tipos de vainas

Descripción	Alcohol p-hidroxibencílico (% peso)		Alcohol 4-hidroxi-3-metoxibencílico (% peso)		Ácido p-hidroxibenzoico (% peso)		p-hidroxibenzaldehído (% peso)		Ácido vainílico (% peso)		Vainillina (% peso)	
	Blanco	Muestra	Blanco	Muestra	Blanco	Muestra	Blanco	Muestra	Blanco	Muestra	Blanco	Muestra
I <i>Vanilla pompona</i> inmadura, extracción acuosa	2.32	3.81	0.00	0.03	0.01	0.03	0.02	0.02	0.01	0.02	0.16	0.28
II <i>Vanilla pompona</i> de prueba, extracción acuosa	0.13	0.71	0.18	0.20	0.01	0.02	0.02	0.03	0.06	0.07	1.26	1.45
III <i>Vanilla pompona</i> de prueba, extracción etanólica	0.11	0.52	0.18	0.19	0.01	0.02	0.02	0.03	0.06	0.08	1.33	1.46
IV <i>Vanilla pompona</i> de prueba, Soxhlet 7 horas	0.09	0.75	0.14	0.15	0.01	0.01	0.03	0.03	0.07	0.07	1.50	1.57
V <i>Vanilla pompona</i> madura, extracción acuosa	0.61	0.71	0.13	0.14	0.01	0.02	0.04	0.05	0.06	0.07	2.54	2.70
VI <i>Vanilla pompona</i> madura, Soxhlet 24 horas	0.18	0.54	0.00	0.10	0.01	0.02	0.05	0.06	0.06	0.08	2.72	3.28
VII <i>Vanilla planifolia</i> curada, adquirida en marzo del 2006, extracción acuosa	0.06	0.38	0.04	0.11	0.03	0.05	0.09	0.10	0.16	0.23	1.64	1.85
VIII <i>Vanilla planifolia</i> curada, adquirida en setiembre del 2007, extracción acuosa	0.04	0.16	0.01	0.02	0.03	0.03	0.12	0.12	0.11	0.13	1.30	1.46

Los resultados de la Tabla 7 indican que las vainas inmaduras (I, Tabla 7) presentan un bajo contenido de todos los componentes, excepto de alcohol p-hidroxibencílico, que se encuentra en muy alta proporción. Esto se debe probablemente a que la vainillina y los otros componentes son biosintetizados a partir del alcohol p-hidroxibencílico.

Las vainas que fueron sometidas a condiciones inadecuadas durante el viaje (vainas de prueba) (II, Tabla 7) presentan un menor contenido de vainillina con respecto a las vainas maduras (V, Tabla 7). Esto se debe a que ésta puede haberse disuelto en el

agua que las rodeó por varios días, dentro de las bolsas de plástico cerradas en la que llegaron a la Pontificia Universidad Católica del Perú.

El perfil aromático de las vainas maduras (V, Tabla 7) es de lo más promisorio pues al compararlo con el perfil aromático de la vainilla comercial (VII y VIII, Tabla 7) se observa mucho mayor contenido de vainillina. El contenido de vainillina de las vainas curadas de *Vanilla planifolia* es de 1.85 % peso, mientras que el de *Vanilla pompona* madura, 2.70 % peso. Sin embargo, el contenido de los otros componentes es menor. Esto se debe probablemente a una característica entre especies (*Vanilla pompona* en nuestro caso y *Vanilla planifolia* en el caso de las vainas comerciales) aún no precisada por ningún otro trabajo científico.

No se observa gran diferencia entre una extracción en solución acuosa (II, Tabla 7) y una extracción etanólica previa a una acuosa (III, Tabla 7). Sin embargo sí se observa gran diferencia entre una extracción en solución acuosa y una extracción Soxhlet previa a una acuosa (II versus IV y V versus VI en Tabla 7). Los resultados muestran que la extracción Soxhlet es más eficiente que la extracción en solución acuosa, debido a que en este caso se puede lograr maximizar la extracción de los glucósidos presentes en las vainas.

Mediante extracción Soxhlet se puede obtener alrededor de 8% más de vainillina, observado en el caso de vainas de prueba (IV, Tabla 7) y 20 % más de vainillina, en el caso de vainas maduras (VI, Tabla 7). Esta diferencia puede deberse a que las vainas maduras fueron sometidas a extracción Soxhlet por 24 horas, mientras que las vainas de prueba solo por 7 horas. A partir de estos resultados, se puede afirmar entonces que la extracción Soxhlet por tiempo prolongado maximiza la extracción de los componentes de interés, y que la *Vanilla pompona* de los humedales de Madre de Dios presenta un alto porcentaje de vainillina (3.28 % peso) con respecto a la *Vanilla planifolia* curada comercial.

En cuanto a las vainas curadas de *Vanilla planifolia* (VII y VIII, Tabla 7) se observa que hay una ligera diferencia en el contenido de algunos componentes aromáticos, entre las adquiridas en marzo del 2006 y las obtenidas en setiembre del 2007. Al respecto, algunos estudios han demostrado que los componentes se encuentran asociados al grado de madurez del fruto, al origen geográfico (38), así como al proceso de curado al que cada cual ha sido sometido, el cual varía dependiendo del país, territorio o comunidad (6). Dado que se desconoce el origen real de estas vainas curadas de

*Vanilla planifolia*, adquiridas en un mercado de Lima no es posible comentar más al respecto.

En la Tabla 8 se presentan las razones entre los componentes de sabor y aroma (R1 – R5) de la *Vanilla pompona* de los humedales de Madre de Dios y de las vainas de *Vanilla planifolia* curadas adquiridas en un mercado de Lima, según la International Organization of the Flavor Industry (IOFI).

Tabla 8: Relación entre los componentes de aroma y sabor (R1 – R5) de vainas de *Vanilla pompona* de los humedales de Madre de Dios y de vainas de *Vanilla planifolia* curadas obtenidas comercialmente

Relación	<i>Vanilla pompona</i> madura	<i>Vanilla pompona</i> madura (Soxhlet 24 horas)	<i>Vanilla planifolia</i> curada (marzo 2006)	<i>Vanilla planifolia</i> curada (setiembre 2007)
R1 = vainillina/pHB	59.4	59.6	18.5	11.9
R2 = ácido vainílico/pHB	1.5	1.4	2.3	1.1
R3 = ácido pHB/pHB	0.4	0.4	0.5	0.2
R4 = vainillina/ácido vainílico	39.9	42.5	8.2	11.2
R5 = vainillina/ácido pHB	168.9	165.6	35.9	48.6

En el caso de vainas maduras de *Vanilla pompona*, se observa claramente que R2 y R3 están dentro del rango establecido por la International Organization of the Flavor Industry (IOFI), ver Tabla 1, página 10. Sin embargo, sabemos que estas proporciones no tienen por qué coincidir pues estos valores han sido establecidos para la *Vanilla planifolia*. Si bien existen estudios similares para la *Vanilla tahitensis*, para la *Vanilla pompona* no se ha reportado rangos de este tipo.

La mayoría de las razones entre componentes (R1 – R5) de *Vanilla planifolia* curadas obtenidas comercialmente están dentro del rango esperado por la International Organization of the Flavor Industry (IOFI). En el caso de las vainas curadas de *Vanilla planifolia* adquiridas en marzo del 2006, se observa que R2, R3 y R4 no están comprendidas dentro de los rangos esperados. Estos resultados indican que probablemente no se trate de *Vanilla planifolia*. Sin embargo, las vainas curadas comerciales adquiridas en setiembre del 2007 sí encajan dentro de los rangos esperados, corroborándose así, la especie *Vanilla planifolia*.

El trabajo aquí presentado forma parte de los primeros estudios que se están realizando entre la Pontificia Universidad Católica del Perú y el Botanical Research Institute of Texas (BRIT), con el objetivo de encontrar las condiciones óptimas de cosecha, curado y determinación del perfil aromático de la *Vanilla pompona* de los humedales de Madre de Dios. Los resultados han demostrado que las vainas maduras de *Vanilla pompona* de los humedales de Madre de Dios contienen un elevado porcentaje de vainillina (VI en Tabla 7), mucho mayor al de las vainas curadas comerciales de *Vanilla planifolia*. Esto hace que la *Vanilla pompona* de los humedales de Madre de Dios sea considerada como un producto con gran potencial económico. Los resultados obtenidos del perfil aromático de la *Vanilla pompona* de los humedales de Madre de Dios justifican continuar realizando los esfuerzos necesarios para identificar el tiempo de cosecha adecuado y establecer las condiciones propicias para llevar a cabo el proceso de curado.



## 5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- No fue posible determinar la actividad de las enzimas comerciales Viscozima y Celuclast, pues la celobiosa no resultó ser el sustrato apropiado: la hidrólisis fue inmediata. Se recomienda utilizar carboximetilcelulosa para determinar la actividad de Viscozima y beta glucan para determinar la actividad de Celuclast, tal como lo indica Sigma – Aldrich. Sin embargo, la correcta actividad de ambas enzimas ha quedado demostrada tanto mediante los experimentos realizados con la celobiosa, así como por los resultados obtenidos con diferentes proporciones de enzimas (Tabla 6).
- Se ha determinado las condiciones cromatográficas adecuadas para la correcta separación de los seis componentes aromáticos de importancia de las vainas de vainilla, a saber, alcohol p-hidroxibencílico, alcohol 4-hidroxi-3-metoxibencílico, ácido p-hidroxibenzoico, p-hidroxibenzaldehído, ácido vainílico y vainillina. Este es el primer estudio de la separación cromatográfica y debida cuantificación del alcohol p-hidroxibencílico y del alcohol 4-hidroxi-3-metoxibencílico en extractos de vainilla.
- El contenido de vainillina en *Vanilla pompona* madura luego de una hidrólisis enzimática (extracción en medio acuoso) fue de 2.70% en peso. El contenido en porcentaje en peso de los otros componentes fue el siguiente: alcohol p-hidroxibencílico (0.71%), alcohol 4-hidroxi-3-metoxibencílico (0.14%), ácido p-hidroxibenzoico (0.02%), p-hidroxibenzaldehído (0.05%), y ácido vainílico (0.07%).
- El contenido de vainillina en *Vanilla pompona* de prueba y *Vanilla pompona* madura luego de la extracción Soxhlet, 7 horas y 24 horas, seguida de hidrólisis enzimática (extracción en medio acuoso) fue de 1.57% y 3.28% en peso, respectivamente. En cuanto a los otros componentes, el contenido hallado fue, alcohol p-hidroxibencílico (0.75% y 0.54%), alcohol 4-hidroxi-3-metoxibencílico (0.15 y 0.10%), ácido p-hidroxibenzoico (0.01 y 0.02%), p-hidroxibenzaldehído (0.03% y 0.06%), y ácido vainílico (0.07 y 0.08%), respectivamente. Se concluye, por lo tanto, que mediante extracción Soxhlet es posible obtener entre 8% (extracción Soxhlet durante 7 horas) y 20% (extracción Soxhlet durante 24 horas) más de vainillina que sin ella. Por ello, el método recomendado para futuros estudios es extraer 2 g de material vegetal

seco (finamente molido) mediante Soxhlet por 24 horas y luego tratar el extracto con las enzimas correspondientes (150 µL de Viscozima y 300 µL de Celuclast en 10 mL de solución, por 8 horas a 45 °C), seguido el proceso por una incubación en etanol al 50 %, por 1 hora.

- El contenido de vainillina y otros componentes (alcohol 4-hidroxi-3-metoxibencílico, ácido p-hidroxibenzoico, p-hidroxibenzaldehído y ácido vainílico) en las vainas inmaduras de *Vanilla pompona* es muy bajo con respecto al contenido observado en vainas maduras de *Vanilla pompona*. En el caso del alcohol p-hidroxibencílico éste resultó ser mucho mayor. Esto demuestra que el tiempo para que se desarrollen los precursores de aroma y sabor (glucósidos) no ha sido el suficiente. Se recomienda, por tanto, definir adecuadamente el mejor momento de cosecha, el cual tendrá que ser superior a los 4 meses de formado el fruto.
- El contenido de vainillina en *Vanilla planifolia* curada (adquiridas en marzo del 2006 y setiembre del 2007) fue 1.85% y 1.46% peso, respectivamente. En cuanto a los otros componentes: alcohol p-hidroxibencílico (0.38% y 0.16%), alcohol 4-hidroxi-3-metoxibencílico (0.11% y 0.02%), ácido p-hidroxibenzoico (0.05% y 0.03%), p-hidroxibenzaldehído (0.10% y 0.12%), y ácido vainílico (0.23% y 0.13%), respectivamente. Dado que las razones entre los componentes (R1 – R5) para el caso de las vainas de *Vanilla planifolia* curadas adquiridas en setiembre del 2007 están comprendidas dentro del rango establecido por la International Organization of the Flavor Industry (IOFI), quedó demostrado que este producto sí corresponde a la especie *Vanilla planifolia*.
- Los resultados obtenidos justifican plenamente continuar realizando esfuerzos para identificar el tiempo de cosecha adecuado y para establecer las condiciones propicias de curado de la *Vainilla pompona* de los humedales de Madre de Dios.

## 6 REFERENCIAS

1. Householder, E. Diversity, natural history of *Vanilla* in wetlands of Madre de Dios, Peru, Capítulo 1 en Diversity and Natural History of *Vanilla* of Madre de Dios, Peru, Tesis de Maestría de Texas Christian University, 2007.
2. Royal Botanic Gardens, KEW. Epiphytes: adaptations to an aerial habitat. Disponible en: <http://www.kew.org/ksheets/epiphytes.html>. Consultada el 5 de diciembre del 2007.
3. The Mildred E. Mathias Botanical Garden. Epiphytes and Hemiepiphytes Disponible en: <http://www.botgard.ucla.edu>. Consultada el 5 de diciembre del 2007.
4. Palacios, J. Plantas medicinales naturales del Perú. **1997**. Lima: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC), p 259-262.
5. Proyecto Desarrollo Social Integrado y Sostenible. Vainilla de la Lacandonia: Manual de Asistencia Técnica para la producción de vainilla en parcela agroforestal y acahuals en Chiapas, México. Disponible en: [www.prodesis.chiapas.gob.mx/?download=2005-037.pdf](http://www.prodesis.chiapas.gob.mx/?download=2005-037.pdf). Consultada el 7 de diciembre del 2007.
6. Ecott, T. **2004**. *Vanilla, Travels in Search of the Ice Cream Orchid*. New York: Grove Press.
7. Tecnologías de cultivo y poscosecha de plantas medicinales, aromáticas y tintóreas. Vainilla. Disponible en: [www.herbotecnia.com.ar](http://www.herbotecnia.com.ar). Consultada el 25 de octubre del 2007.
8. Sun, R., Sacalis, J., Chin. C., Still, C. **2001**. Bioactive Aromatic Compounds from Leaves and Steams of *Vanilla fragans*. *J. Agric. Food Chem.* 49, 5161-5164.
9. Australian Orchid Council Inc. VANILLA: The World's "flavourite" Orchid. Disponible en: <http://www.orchidsaustralia.com/vanilla.htm>. Consultada el 7 de diciembre del 2007.

10. Asociación de Promoción Agraria. La Vainilla. Disponible en: <http://www.aspaperu.org/boletines/bolmar/index.htm>. Consultada el 5 de noviembre del 2007.
11. Productos Uvaviña. La vainilla. Disponible en: <http://www.vainilla-molina.com.mx/esp-lavainilla.html>. Consultada el 20 de junio del 2006.
12. Cabieses, F. **1995**. Cien siglos de Pan. Lima: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, p 162-165.
13. Soukup, J. **1970**. Vocabulario de los nombres vulgares de la Flora Peruana. Lima: Colegio Salesiano, p 363.
14. Tripper: From Harvest to your Home. Vanilla Information. Disponible en <http://www.tripper.con>. Consultada el 29 de octubre del 2006.
15. Club peruano de orquídeas. Vanilla. Disponible en <http://www.peruorchids.com>. Consultada el 15 de diciembre del 2007.
16. Brako, L., Zarucchi, J. **1996**. Catalogue of the Flowering Plants and Gymnosperms of Peru. St. Louis: Missouri Botanical Garden, p 865.
17. Brack, A. **1999**. Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú. Cusco: Centro de Estudios Regionales Andinos "Bartolomé de las Casas" (CBC), p 519-520.
18. Householder E. Fruiting and flowering dynamics of *V. pompona* Schiede *subsp. grandiflora* (Lindl.) Soto-Arenas (Orchidaceae) during a single flowering season, Capítulo 3 en Diversity and Natural History of *Vanilla* of Madre de Dios, Peru, Tesis de Maestría de Texas Christian University, 2007.
19. Andes to Amazon Biodiversity Program. Wetlands. Disponible en: <http://www.andesamazon.org>. Consultada el 5 de diciembre del 2007.
20. Información turística de Madre de Dios, Promperú. Disponible en: <http://www.peru.info/temario/attach/1308.PDF>. Consultada el 16 de noviembre del 2007.

21. Madre de Dios: El Perú Desconocido. Explora Madre de Dios. Disponible en <http://madrededios.net>. Consultada el 13 de diciembre del 2007.
22. Shyamala, B., Madhava, M., Sulochanamma, G., Srinivas, P. **2007**. Studies on the Antioxidant Activities of Natural Vanilla Extract and Its Constituent Compounds through *in Vitro* Models. *J. Agric. Food Chem.* 55, 7738–7743.
23. Fitzgerald, D. Stratford, M., Gasson, M., Narrad, A. **2005**. Structure-Function Analysis of the Vanillin Molecule and Its Antifungal Properties. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1769-1775.
24. John, T., Jamin, E. **2004**. Chemical Investigation and Authenticity of Indian Vanilla Beans. *J. Agric. Food Chem.* 52, 7644-7650.
25. Tenailleau, E., Lancelin, P., Robins, R., Akoka, S. **2004**. Authentication of the Origin of Vanillin Using Quantitative Natural Abundance <sup>13</sup>C NMR. *J. Agric. Food Chem.* 52, 7782-7787.
26. Lamprecht, G., Pichlmayer, F., Schmid, E. **1994**. Determination of the Autenticity of Vanilla Extracts by Stable Isotope Ratio Analysis and Component Analysis by HPLC. *J. Agric. Food. Chem.* 42, 1722-1727.
27. Facultad de Química de la Universidad de la República Oriental del Uruguay. Compuestos aromáticos. Disponible en: <http://mail.fq.edu.uy/~planta/pdf/FarmacognosiaPE80/bolilla7.pdf>. Consultada el 10 de diciembre del 2007.
28. De Roode, B., Franssen, M., Van der Padt, A., Boom, R. **2003**. Perspective for the Industrial Enzymatic Production of Glycosides. *Biotechnol. Prog.* 19, 1391-1402.
29. Negishi, O., Osamu, T. **1996**. Determination of hydrocinnamic acids, hydroxybenzoic acids, hydroxybenzaldehydes, hydroxybenzyl alcohols and their glucosides by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A.* 759, 129-136.
30. Havkin-Frenkel, D., Podstolski, A. **2007**. Vanillin Production. United States Patent N° US 7,226,783 B1

31. Van den Heuvel, R., Fraaije, M., Laane, C., Van Berkel, J. **2001**. Enzymatic Synthesis of Vanillin. *J. Agric. Food Chem.* 49, 2954-2958.
32. Gabor, E. **2004**. Mining the metagenome for glucovanillin glucosidases. Chapter 7. Disponible en: [dissertations.ub.rug.nl/FILES/faculties/science/2004/e.m.gabor/c7.pdf](http://dissertations.ub.rug.nl/FILES/faculties/science/2004/e.m.gabor/c7.pdf). Consultada el 23 de junio del 2006.
33. Knuth, M., Sahai, O. **1991**. Flavor composition and Method. United States Patent N° 5,057,424.
34. Consejo Nacional de Producción, Dirección de Mercadeo e Industria. Ficha Técnica de Industrialización de Vainilla. Disponible en: [http://www.mercanet.cnp.go.cr/Desarrollo\\_Agroid/documentospdf/Vainilla\\_FTP.pdf](http://www.mercanet.cnp.go.cr/Desarrollo_Agroid/documentospdf/Vainilla_FTP.pdf). Consultada el 5 de diciembre del 2007.
35. Agricultura Orgánica en el Trópico y Subtrópico. Vainilla. Disponible en: [www.naturland.de](http://www.naturland.de). Consultada el 25 de noviembre del 2007.
36. Roling, W., Kerler, J., Braster, M., Apriyantono, A., Stam, H., Verseveld, H. **2001**. Microorganisms with a Taste of Vanilla: Microbial Ecology of Traditional Indonesian Vanilla Curing. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1995-2003.
37. Ruiz-Terán, F., Perez-Amador, I., López-Munguía, A. **2001**. Enzymatic Extraction and Transformation of Glucovanillin to Vanillin from Vanilla Green Pods. *J. Agric. Food Chem.* 49, 5207-5209.
38. Ranadive, A. **1992**. Vanillin and Related Flavor Compounds in Vanilla Extracts Made from Beans of Various Global Origins. *J. Agric. Food. Chem.* 40, 1922-1924.
39. Bartnick, D., Moler, C., Thomas, G. **2005**. Methods for the production of natural botanical extracts. United States Patent 20050074520.
40. Schutz, E. Heinz-Rudiger, V., Sand, T. Muhlnickel, P. **1984**. Method for Extracting the Flavoring Substances from the Vanilla Capsule. United States Patent N° 4,470,927.

41. Vizthum, O., Hubert, P. **1980**. Process for the Production of Spice Extracts. United States Patent N° 4,198,432.
42. Guinness Chemical Products Limited. CO<sub>2</sub> VANILLA EXTRACTS: New multipurpose flavour ingredients. Disponible en: [http://www.guinness-p.com/html/co2\\_-\\_vanilla\\_extract.html](http://www.guinness-p.com/html/co2_-_vanilla_extract.html). Consultada el 9 de diciembre del 2007.
43. Voisine, R., Carmichael, L., Chalier, P., Cormier, F., Morin, A. **1995**. Determination of Glucovanillin and Vanillin in Cured Vanilla Pods. *J. Agric. Food Chem.* 43, 2658-2661.
44. Odoux, E., Escoute, J., Verdeil, L., Brillouet, M. **2003**. Localization of  $\beta$ -D-Glucosidase Activity and Glucovanillin in Vanilla Bean (*Vanilla planifolia* Andrews). *Annals of Botany.* 92, 437-444.
45. Havkin-Frenkel, D., Michael, D., French, J., Graft, N., Pak, F., Frenkel, C., Joel, D. **2004**. Interrelation of Curing and Botany in Vanilla (*Vanilla planifolia*) Bean. ISHS Acta Horticulturae 629, XXVI International Horticultural Congress: The Future for Medicinal and Aromatic Plants.
46. Brunerie, P. **1998**. Process for the Production of Natural Vanilla Extract by Enzymatic Processing of Green Vanilla Pods, and Extract thereby obtained. United States Patent 5,705,205.
47. Miller, G. **1959**. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry.* 31, 426-428.
48. Cañizares-Macías, P. Hernández-Garciadiego, L. Gómez-Ruiz, H. **2001**. An Automated Flow Injection Analysis Procedure for the Determination of Reducing Sugar by DNSA Method. *Journal of Food Science.* 66, 407-411.
49. AOAC International. Official Methods of Analysis: Vanillin, Vanillic Acid, p-Hydroxybenzaldehyde, and p-Hydroxybenzoic Acid and Ethyl Vanillin in Vanilla Extract and Artificial Vanilla Flavor. Método N° 990.25 Disponible en: <http://eoma.aoac.org/methods/info.asp?ID=20310>. Consultada el 5 de enero del 2008.

50. Odoux, E., Chauwin, A., Brillouet, J. 2003. Purification and Characterization of Vanilla Bean (*Vanilla planifolia* Andrews)  $\beta$ -D-Glucosidase. *J. Agric. Food Chem.* 51, 3168-3173.
51. Graves, R., Hall, R., Karas, A. **1958**. Method of Producing Cured Vanilla Extract from Green Vanilla Beans. United States Patent N° 2,835,591.



Anexo 1: Lista de países importadores de vainilla en el año 2006

Lista de los países importadores del producto seleccionado en 2006

Producto: 0905 Vainilla



Importadores	Total importado en 2006, en miles de US\$	Cantidad importada en 2006	Unidad de medida	Valor de unidad (US\$/unidad)	Crecimiento anual en valor entre 2002-2006, %	Crecimiento anual en cantidad entre 2002-2006, %	Crecimiento anual en valor entre 2005-2006, %	Participación en las importaciones mundiales, %	Incluido en Comtrade en 2006
Estimación Mundo	122,021	4,972	Toneladas	24,542	-28	2	-3	100	
Estados Unidos de América	44,387	1,554	Toneladas	28,563	-36	7	-11	36	
Francia	25,868	789	Toneladas	32,786	-26	14	24	21	
Alemania	14,132	422	Toneladas	33,488	-19	21	3	11	
Japón	7,583	118	Toneladas	64,263	-22	7	-9	6	
Canadá	5,446	248	Toneladas	21960	1	39	72	4	
Países Bajos (Holanda)	3,521	527	Toneladas	6,681	2	15	-25	2	
Reino Unido	2,525	171	Toneladas	14,766	-40	5	-33	2	
Bélgica	2,402	96	Toneladas	25,021	1	20	22	1	
Dinamarca	2,205	34	Toneladas	64,853	-6	-10	-11	1	
Suiza y Liechtenstein	2,188	43	Toneladas	50,884	-24	-1	-36	1	
Italia	1,529	21	Toneladas	72810	-18	-1	-10	1	
Singapur	1,234	114	Toneladas	10,825	-23	12	-42	1	
Austria	875	38	Toneladas	23,026	-16	-30	-21	0	
Suecia	820	26	Toneladas	31,538	-2	-1	-12	0	
España	671	18	Toneladas	37,278	-1	5	20	0	
Australia	670	39	Toneladas	17,179	-28	20	-45	0	
Madagascar	614	28	Toneladas	21,929		41	527	0	
Irlanda	563	73	Toneladas	7,712	-8	7	-32	0	
Noruega	475	3	Toneladas	158,333	-8	-4	-10	0	
Polonia	403	2	Toneladas	201500	-8	-2	-49	0	
Indonesia	275	57	Toneladas	4,825	-46	-52	34	0	
México	236	27	Toneladas	8,741	-25	-16	84	0	
Malasia	209	46	Toneladas	4,543	-8	-12	43	0	
Georgia	179	69	Toneladas	2,594	108	38	348	0	
República de Corea	168	3	Toneladas	56000	-22	16	-44	0	
Luxemburgo	162	2	Toneladas	81000	-5	-11	7	0	
Sudafrica	149	8	Toneladas	18,625	44	44	-1	0	
Mauricio	148	5	Toneladas	29600	-35	-17	-23	0	
Portugal	146	6	Toneladas	24,333	-15	-16	-66	0	
Nueva Zelandia	144	5	Toneladas	28800	-11	10	-48	0	
Hong Kong (RAEC)	131	12	Toneladas	10,917	-21	30	52	0	
Finlandia	121	2	Toneladas	60500	14	-9	-12	0	
Barbados	101	16	Toneladas	6,313	33	36	621	0	
Uganda	99	6	Toneladas	16500	118		4850	0	
Rumania	84	1	Toneladas	84000	37		58	0	
República Dominicana	82	4	Toneladas	20500	94			0	
Armenia	76	10	Toneladas	7600	25	-20	-8	0	
Brasil	73	1	Toneladas	73000	-49	-32	-47	0	
China	67	3	Toneladas	22,333	9		-44	0	

Fuente: Cálculos del CCI basados en estadísticas de COMTRADE

Anexo 2: Lista de países exportadores de vainilla en el año 2006

Lista de los países exportadores del producto seleccionado en 2006

Producto: 0905 Vainilla



Exportadores	Total exportado en 2006, en miles de US\$	Cantidad exportada en 2006	Unidad de medida	Valor de unidad (US\$/unidad)	Crecimiento anual en valor entre 2002-2006, %	Crecimiento anual en cantidad entre 2002-2006, %	Crecimiento anual en valor entre 2005-2006, %	Participación en las exportaciones mundiales, %	Incluido en Comtrade en 2006
Estimación Mundo	116,525	4,323	Toneladas	26,955	-28	-72	-4	100	
Madagascar	47,373	1,679	Toneladas	28,215	-34	15	3	40	Y
Francia	17,740	480	Toneladas	36,958	-12	30	36	15	Y
Alemania	10,346	215	Toneladas	48,121	-17	13	-18	8	Y
India	6,504	168	Toneladas	38,714	-5	33	171	5	
Indonesia	5,892	499	Toneladas	11,808	-31	-84	10	5	Y
Uganda	4,808	191	Toneladas	25,173	1	71	-22	4	Y
Canadá	4,499	129	Toneladas	34,876	-1	55	96	3	Y
Estados Unidos de América	4,056	170	Toneladas	23,859	-25	-2	-48	3	Y
Papua Nueva Guinea	3,929	246	Toneladas	15,972	-23	40	-23	3	
Comoras	3,796	67	Toneladas	56,657	-35	-9	-43	3	
Polinesia Francesa	1,815	9	Toneladas	201,667	-7	-6	-13	1	Y
Singapur	1,029	55	Toneladas	18,709	-31	23	-53	0	Y
Bélgica	605	44	Toneladas	13750	-12	2	21	0	Y
Países Bajos (Holanda)	545	19	Toneladas	28,684	-2	-29	-86	0	Y
Austria	477	6	Toneladas	79500	-1	-48	-2	0	Y
Reino Unido	315	19	Toneladas	16,579	-65	-29	-48	0	Y
México	289	32	Toneladas	9,031	-46	-45	-25	0	Y
Polonia	280	2	Toneladas	140000		12	-43	0	Y
Dinamarca	252	15	Toneladas	16800	-8	-6	76	0	Y
Suecia	245	24	Toneladas	10,208	27	137	-27	0	Y
Australia	226	35	Toneladas	6,457	16	20	-54	0	Y
Suiza y Liechtenstein	219	2	Toneladas	109500	-7	3	-64	0	Y
Japón	194	2	Toneladas	97000	-26	-7	48	0	Y
Turquía	177	47	Toneladas	3,766	-25	-28	-36	0	Y
Sudafrica	117	14	Toneladas	8,357	66	61	-44	0	Y
Italia	77	7	Toneladas	11000	5	-17	126	0	Y
Malasia	70	15	Toneladas	4,667	8	-16	67	0	Y
Tonga	62	0	Toneladas		-65		-69	0	
Guinea	56	3	Toneladas	18,667	-30		-77	0	
Jamaica	56	33	Toneladas	1,697	20	106	93	0	
Vanuatu	54	0	Toneladas		-14		-57	0	
Otros Africa	53	2	Toneladas	26500				0	
Filipinas	45	18	Toneladas	2500	-7	0	15	0	Y
Fiji	38	2	Toneladas	19000	27		3	0	Y
Nueva Zelandia	37	12	Toneladas	3,083	-6	74	-54	0	Y
Tierras Australes Francesas	32	0	Toneladas				10	0	
Mauricio	30	3	Toneladas	10000	-64		173	0	Y
República Dominicana	28	4	Toneladas	7000	-42			0	
Hong Kong (RAEC)	23	11	Toneladas	2,091	-55		53	0	Y

Fuente: Cálculos del CCI basados en estadísticas de COMTRADE

Anexo 3: Lista de países importadores de vainillina en el año 2006

Lista de los países importadores del producto seleccionado en 2006

Producto: 291241 vainillina (aldehído metilprotocatéuico)



Importadores	Total importado en 2006, en miles de US\$	Cantidad importada en 2006	Unidad de medida	Valor de unidad (US\$/unidad)	Crecimiento anual en valor entre 2002-2006, %	Crecimiento anual en cantidad entre 2002-2006, %	Crecimiento anual en valor entre 2005-2006, %	Participación en las importaciones mundiales, %	Información sobre las medidas arancelarias
Estimación Mundo	155,158	12,439	Toneladas	12,474	8	1	3	100	
Alemania	20,837	1,735	Toneladas	12010	13	7	18	13	<u>BANA</u>
Estados Unidos de América	20,507	1,764	Toneladas	11,625	7	2	-8	13	<u>BANA</u>
Suecia	10,260	707	Toneladas	14,512	16	8	21	7	<u>BANA</u>
Italia	9,946	950	Toneladas	10,469	12	2	-4	6	<u>BANA</u>
Suiza y Liechtenstein	5,971	417	Toneladas	14,319	21	14	34	4	<u>BANA</u>
Japón	5,566	373	Toneladas	14,922	16	9	28	4	<u>BANA</u>
Reino Unido	5,523	442	Toneladas	12,495	8	2	16	4	<u>BANA</u>
Brasil	5,161	424	Toneladas	12,172	16	8	8	3	<u>BANA</u>
Francia	4,920	348	Toneladas	14,138	-7	-13	-41	3	<u>BANA</u>
Singapur	4,846	414	Toneladas	11,705	18	10	-27	3	<u>BANA</u>
México	4,342	324	Toneladas	13,401	15	-5	3	3	<u>BANA</u>
Países Bajos (Holanda)	3,546	256	Toneladas	13,852	-10	-15	6	2	<u>BANA</u>
España	3,346	289	Toneladas	11,578	31	21	3	2	<u>BANA</u>
Turquía	3,302	244	Toneladas	13,533	23	14	16	2	<u>BANA</u>
Grecia	2,750	197	Toneladas	13,959	-7	6	10	2	<u>BANA</u>
India	2,571	224	Toneladas	11,478	2	-4	37	2	<u>BANA</u>
China	2,461	180	Toneladas	13,672	4	2	141	2	<u>BANA</u>
Egipto	2,441	210	Toneladas	11,624	24	19	1	2	<u>BANA</u>
Irán (República Islámica del)	2,352	191	Toneladas	12,314	20	16	-2	2	<u>BANA</u>
Canadá	2,013	137	Toneladas	14,693	-3	-4	13	1	<u>BANA</u>
Bélgica	1,946	141	Toneladas	13,801	-2	-11	-7	1	<u>BANA</u>
Malasia	1,805	146	Toneladas	12,363	25	13	24	1	<u>BANA</u>
Australia	1,686	125	Toneladas	13,488	7	-2	96	1	<u>BANA</u>
Indonesia	1,645	174	Toneladas	9,454	11	7	-7	1	<u>BANA</u>
Emiratos Árabes Unidos	1,586	133	Toneladas	11,925	43	53	42	1	<u>BANA</u>
Austria	1,440	123	Toneladas	11,707	23	3	34	1	<u>BANA</u>
Polonia	1,363	124	Toneladas	10,992	12	9	28	1	<u>BANA</u>
Hungría	1,362	101	Toneladas	13,485	-27	-31	-30	1	<u>BANA</u>
Filipinas	1,206	111	Toneladas	10,865	15	9	4	1	<u>BANA</u>
Tailandia	1,055	81	Toneladas	13,025	24	17	1	1	<u>BANA</u>
Ucrania	999	72	Toneladas	13,875	5	-12	15	1	<u>BANA</u>
República de Corea	996	70	Toneladas	14,229	9	2	3	1	<u>BANA</u>
Viet Nam	976	82	Toneladas	11,902	-13	-7	-35	1	<u>BANA</u>
República Árabe Siria	916	77	Toneladas	11,896	7	0	30	1	<u>BANA</u>
Bulgaria	756	46	Toneladas	16,435	339	75	13	0	<u>BANA</u>
Hong Kong (RAEC)	679	56	Toneladas	12,125	-22	-28	-48	0	<u>BANA</u>
Rumania	662	45	Toneladas	14,711	14	7	4	0	<u>BANA</u>
Argentina	648	56	Toneladas	11,571	20	20	1	0	<u>BANA</u>
Sudafrica	611	46	Toneladas	13,283	8	0	-3	0	<u>BANA</u>

Fuente: Cálculos del CCI basados en estadísticas de COMTRADE

Anexo 4: Lista de países exportadores de vainillina en el 2006

Lista de los países exportadores del producto seleccionado en 2006

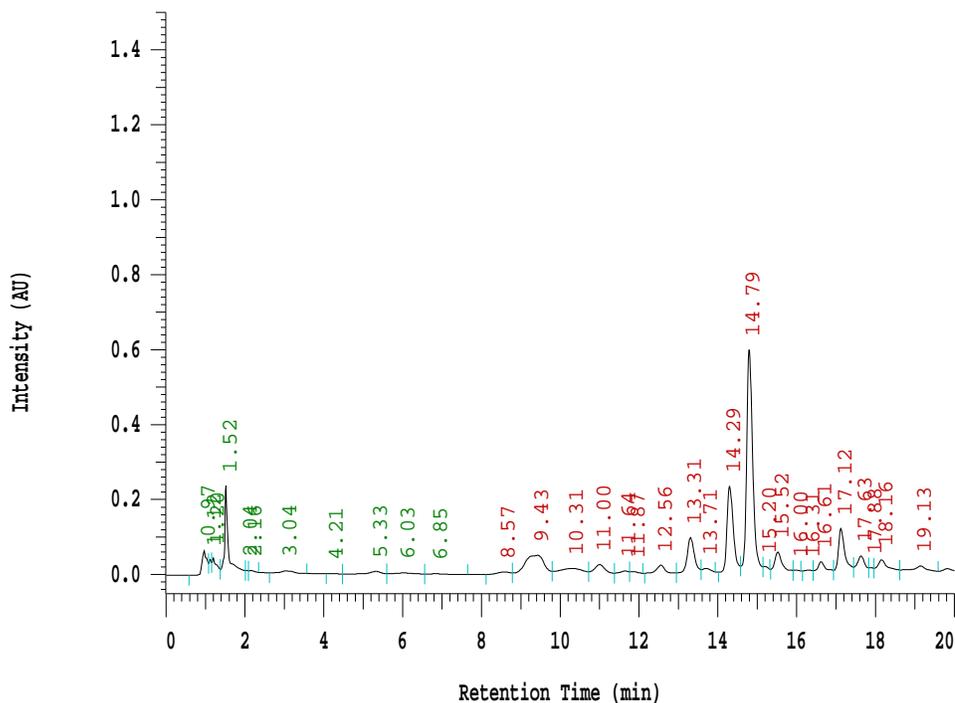
Producto: 291241 vainillina (aldehído metilprotocatéuico)



Exportadores	Total exportado en 2006, en miles de US\$	Cantidad exportada en 2006	Unidad de medida	Valor de unidad (US\$/unidad)	Crecimiento anual en valor entre 2002-2006, %	Crecimiento anual en cantidad entre 2002-2006, %	Crecimiento anual en valor entre 2005-2006, %	Participación en las exportaciones mundiales, %	Incluido en Comtrade en 2006
Estimación Mundo	126,700	10,638	Toneladas	11910	14	-5	20	100	
China	82,896	6,945	Toneladas	11,936	24	15	25	65	Y
Estados Unidos de América	14,223	1,237	Toneladas	11,498	-7	-12	21	11	Y
Suecia	8,258	569	Toneladas	14,513	10	3	23	7	Y
Alemania	7,669	546	Toneladas	14,046	17	11	43	6	Y
Singapur	3,784	283	Toneladas	13,371	36	23	-3	3	Y
Reino Unido	1,800	251	Toneladas	7,171	18	28	34	1	Y
España	1,187	273	Toneladas	4,348	17	0	-54	1	
Grecia	1,038	62	Toneladas	16,742	88	91	14	1	Y
Italia	1,005	65	Toneladas	15,462	5	-12	-22	1	Y
Austria	842	66	Toneladas	12,758	93	85	33	1	Y
Hong Kong (RAEC)	768	69	Toneladas	11130	-3	-5	107	1	Y
Países Bajos (Holanda)	652	84	Toneladas	7,762	7	11	-29	1	Y
Bélgica	512	39	Toneladas	13,128	-20	-25	-38	0	Y
Suiza y Liechtenstein	506	25	Toneladas	20240	7	7	-2	0	Y
Federación de Rusia	282	19	Toneladas	14,842	31	-8	46	0	Y
Malta	276	10	Toneladas	27600	-1	-6	-49	0	Y
India	191	6	Toneladas	31,833	-30	-43	-75	0	
Taiwan, Provincia de China	158	23	Toneladas	6870	74	198	123	0	
Ucrania	87	5	Toneladas	17400	13	13	-6	0	Y
Dinamarca	56	2	Toneladas	28000	-17	-30	-16	0	Y
Eslovaquia	53	13	Toneladas	4,077				0	
México	50	3	Toneladas	16,667	-56	-83	35	0	Y
Australia	46	3	Toneladas	15,333	-20	-23	667	0	Y
Estonia	45	3	Toneladas	15000	-1		-53	0	Y
Polonia	44	4	Toneladas	11000			47	0	Y
Sudafrica	39	2	Toneladas	19500	21	3	129	0	Y
Jamaica	30	9	Toneladas	3,333	-11	-13	-51	0	
Côte d'Ivoire (Costa de Marfil)	28	1	Toneladas	28000			600	0	Y
Irlanda	26	10	Toneladas	2600				0	Y
Tailandia	24	2	Toneladas	12000			-33	0	Y
Portugal	19	1	Toneladas	19000	52		111	0	Y
Lituania	16	1	Toneladas	16000	12	-3	-63	0	Y
Guatemala	15	1	Toneladas	15000	-18			0	
Indonesia	14	1	Toneladas	14000	41	15	-80	0	Y
Canadá	13	1	Toneladas	13000	-77	-80	-41	0	Y
Brasil	11	1	Toneladas	11000	37	-10	-8	0	Y
Croacia	11	1	Toneladas	11000			-76	0	Y
Trinidad y Tobago	10	1	Toneladas	10000	6	0	11	0	

Fuente: Cálculos del CCI basados en estadísticas de COMTRADE

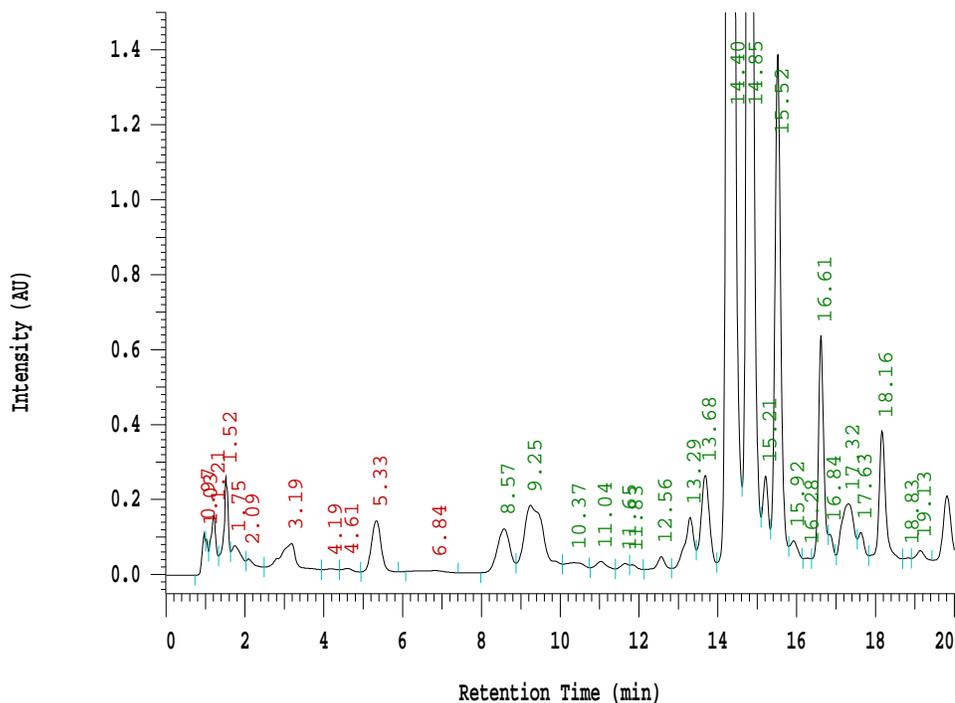
Anexo 5 *Vanilla pompona* de prueba (blanco, extracción en medio acuoso: sin enzimas),  
254 nm



No.	RT	Area	Area %	Height
1	0.97	260095	2.442	32502
2	1.12	88122	0.828	20634
3	1.2	192901	1.811	22799
4	1.52	1319620	12.392	119209
5	2.04	1550	0.015	307
6	2.16	9299	0.087	1051
7	3.04	64010	0.601	3013
8	4.21	5640	0.053	456
9	5.33	74468	0.699	3574
10	6.03	59617	0.56	1666
11	6.85	20654	0.194	786
12	8.57	66139	0.621	3184
13	9.43	828746	7.782	24924
14	10.31	282341	2.651	7003
15	11	216536	2.033	11861
16	11.64	41170	0.387	3091
17	11.87	26485	0.249	2195
18	12.56	138180	1.298	10485
19	13.31	582260	5.468	46714
20	13.71	78374	0.736	5319
21	14.29	1271360	11.938	114438
22	14.79	3159121	29.665	295538
23	15.2	58852	0.553	6832
24	15.52	316696	2.974	25706
25	16	9574	0.09	1017
26	16.31	10683	0.1	1094
27	16.61	137110	1.288	12332
28	17.12	624646	5.866	56720
29	17.63	259461	2.436	20057
30	17.88	34046	0.32	4464
31	18.16	253784	2.383	15098
32	19.13	157708	1.481	7018
		10649248	100	881087

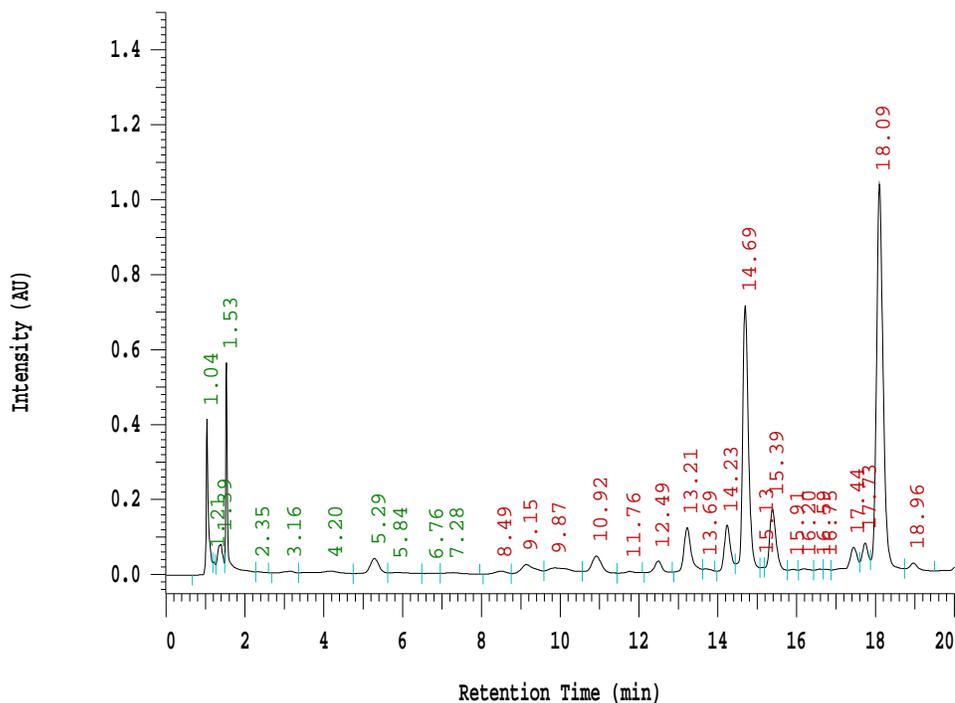
Nota: Las señales en rojo indican corrección en la línea base.

Anexo 6 *Vanilla pompona* de prueba (blanco, extracción en medio acuoso: sin enzimas),  
230 nm



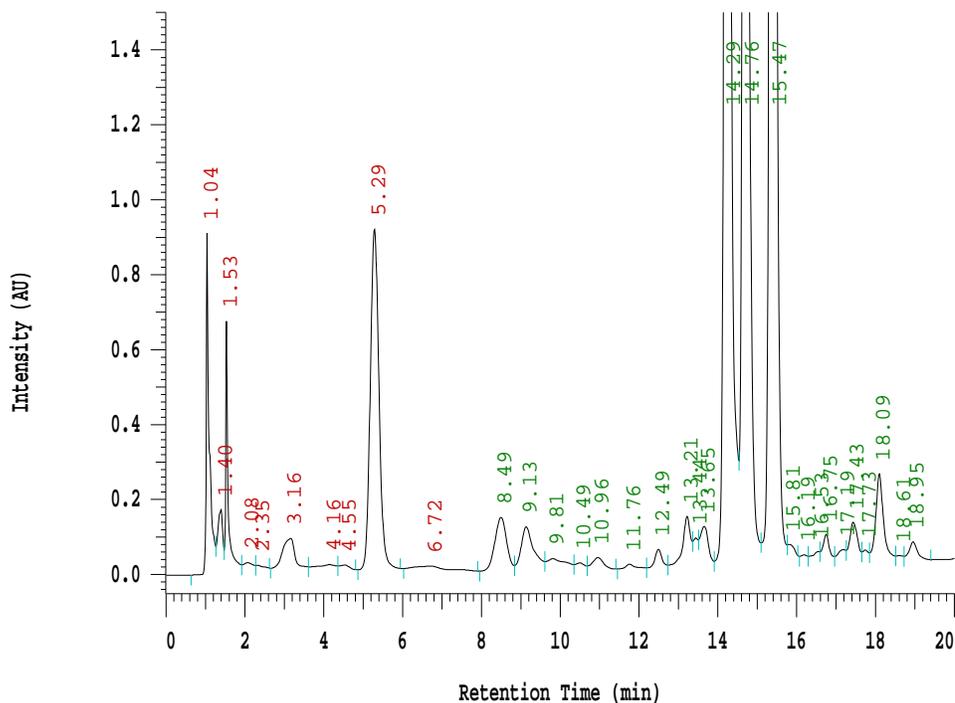
No.	RT	Area	Area %	Height
1	0.97	264488	0.356	54905
2	1.03	204721	0.275	47876
3	1.21	770936	1.037	79486
4	1.52	1112751	1.497	129224
5	1.75	687124	0.924	38318
6	2.09	380510	0.512	20315
7	3.19	1380170	1.856	39553
8	4.19	115341	0.155	5010
9	4.61	88805	0.119	4900
<b>10</b>	<b>5.33</b>	<b>1133850</b>	<b>1.525</b>	<b>68053</b>
11	6.84	83960	0.113	2176
<b>12</b>	<b>8.57</b>	<b>1292342</b>	<b>1.738</b>	<b>58055</b>
13	9.25	3321385	4.468	88387
14	10.37	104710	0.141	4000
15	11.04	241644	0.325	11701
16	11.65	114531	0.154	8428
17	11.83	71926	0.097	6520
18	12.56	193544	0.26	16330
19	13.29	1040327	1.399	67417
20	13.68	1835573	2.469	122740
21	14.4	24274192	32.652	1373975
22	14.85	19665864	26.453	1373210
23	15.21	447120	0.601	62787
24	15.52	7580154	10.196	680710
25	15.92	139270	0.187	13164
26	16.28	4780	0.006	653
27	16.61	3172851	4.268	304140
28	16.84	57300	0.077	6688
29	17.32	1722140	2.316	78922
30	17.63	470444	0.633	39955
31	18.16	2200361	2.96	174105
32	18.83	13102	0.018	1439
33	19.13	156617	0.211	12046
		74342833	100	4995188

Anexo 7 *Vanilla pompona* de prueba (extracción en medio acuoso: 1.5 mL Viscozima, 8 horas), 254 nm



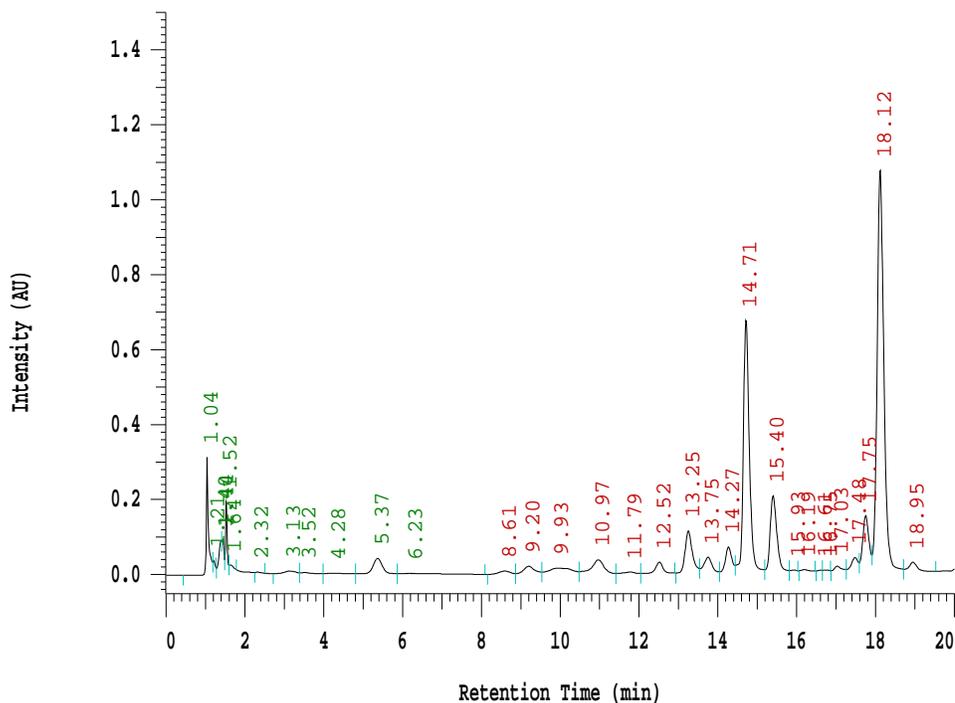
No.	RT	Area	Area %	Height
1	1.04	905098	5.062	208105
2	1.21	5560	0.031	2050
3	1.39	393544	2.201	41140
4	1.53	1421461	7.95	282838
5	2.35	3720	0.021	498
6	3.16	40857	0.229	2191
7	4.2	99892	0.559	2906
8	5.29	524496	2.933	21334
9	5.84	17360	0.097	684
10	6.76	6846	0.038	404
11	7.28	40173	0.225	1580
12	8.49	72204	0.404	3720
13	9.15	300780	1.682	12160
14	9.87	305550	1.709	7599
15	<b>10.92</b>	<b>411424</b>	<b>2.301</b>	<b>23006</b>
16	11.76	21280	0.119	1875
17	<b>12.49</b>	<b>180210</b>	<b>1.008</b>	<b>15079</b>
18	<b>13.21</b>	<b>747099</b>	<b>4.178</b>	<b>58728</b>
19	13.69	45985	0.257	3274
20	14.23	666153	3.726	61230
21	<b>14.69</b>	<b>3638455</b>	<b>20.348</b>	<b>353785</b>
22	15.13	27307	0.153	4410
23	15.39	931844	5.211	81523
24	15.91	9616	0.054	1188
25	16.2	19686	0.11	1770
26	16.59	14519	0.081	1629
27	16.75	13741	0.077	1474
28	17.44	414824	2.32	30820
29	17.73	392149	2.193	36678
30	18.09	6052040	33.847	515029
31	18.96	156827	0.877	10149
		17880700	100	1788856

Anexo 8 *Vanilla pompona* de prueba (extracción en medio acuoso: 1.5 mL Viscozima, 8 horas), 230 nm



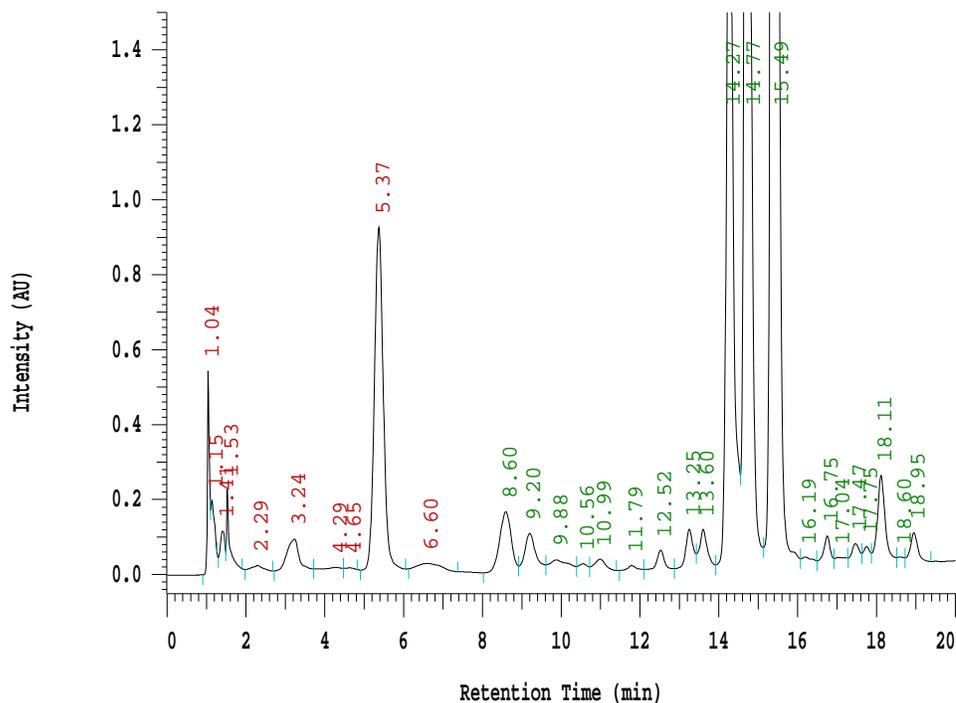
No.	RT	Area	Area %	Height
1	1.04	2423613	2.866	455130
2	1.4	792493	0.937	85929
3	1.53	1539005	1.82	337223
4	2.08	266875	0.316	14148
5	2.35	175216	0.207	10185
6	3.16	1119667	1.324	44572
7	4.16	296377	0.35	7860
8	4.55	121030	0.143	6763
9	5.29	<b>6935430</b>	<b>8.2</b>	<b>453054</b>
10	6.72	203450	0.241	4606
11	8.49	<b>1476575</b>	<b>1.746</b>	<b>70938</b>
12	9.13	1315960	1.556	58165
13	9.81	502111	0.594	15159
14	10.49	145404	0.172	8952
15	10.96	313757	0.371	15596
16	11.76	92417	0.109	6124
17	12.49	305389	0.361	24537
18	13.21	943822	1.116	67595
19	13.44	320236	0.379	38193
20	13.65	811503	0.959	53363
21	14.29	19705238	23.299	1369895
22	14.76	19299102	22.818	1369171
23	15.47	21780494	25.752	1368075
24	15.81	56440	0.067	3560
25	16.19	16300	0.019	2250
26	16.53	54180	0.064	6575
27	16.75	288560	0.341	29600
28	17.19	240041	0.284	16758
29	17.43	771441	0.912	52935
30	17.73	156759	0.185	15435
31	18.09	1726777	2.042	116401
32	18.61	5340	0.006	775
33	18.95	375734	0.444	24603
		84576736	100	6154125

Anexo 9 *Vanilla pompona* de prueba (extracción en medio acuoso: 1.5 mL Celuclast, 8 horas), 254 nm



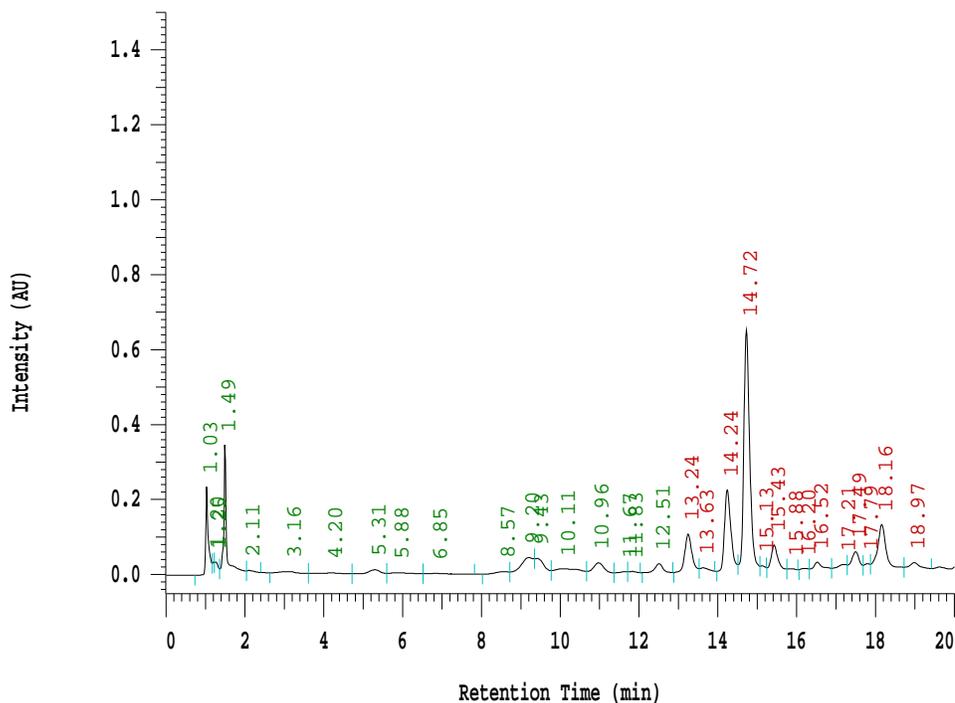
No.	RT	Area	Area %	Height
1	1.04	671534	3.85	157221
2	1.21	14020	0.08	4316
3	1.4	207652	1.19	45649
4	1.44	198624	1.139	47319
5	1.52	906609	5.198	98309
6	1.64	12300	0.071	1767
7	2.32	5350	0.031	582
8	3.13	65015	0.373	3365
9	3.52	27169	0.156	1599
10	4.28	23981	0.137	916
11	5.37	344768	1.977	20630
12	6.23	75114	0.431	941
13	8.61	84357	0.484	4255
14	9.2	204943	1.175	10386
15	9.93	307536	1.763	7712
16	<b>10.97</b>	<b>395284</b>	<b>2.266</b>	<b>18398</b>
17	11.79	27811	0.159	1944
18	<b>12.52</b>	<b>177966</b>	<b>1.02</b>	<b>14619</b>
19	<b>13.25</b>	<b>703093</b>	<b>4.031</b>	<b>55842</b>
20	13.75	286151	1.64	20318
21	14.27	368599	2.113	33692
22	<b>14.71</b>	<b>3505418</b>	<b>20.096</b>	<b>335494</b>
23	15.4	1158505	6.642	100602
24	15.93	10053	0.058	1265
25	16.19	15820	0.091	1489
26	16.61	6459	0.037	1046
27	16.75	12966	0.074	1421
28	17.03	79428	0.455	6596
29	17.48	208747	1.197	18054
30	17.75	816972	4.684	74202
31	18.12	6343136	36.365	533945
32	18.95	177633	1.018	12120
		17443013	100	1636014

Anexo 10 *Vanilla pompona* de prueba (extracción en medio acuoso: 1.5 mL Celuclast, 8 horas), 230 nm



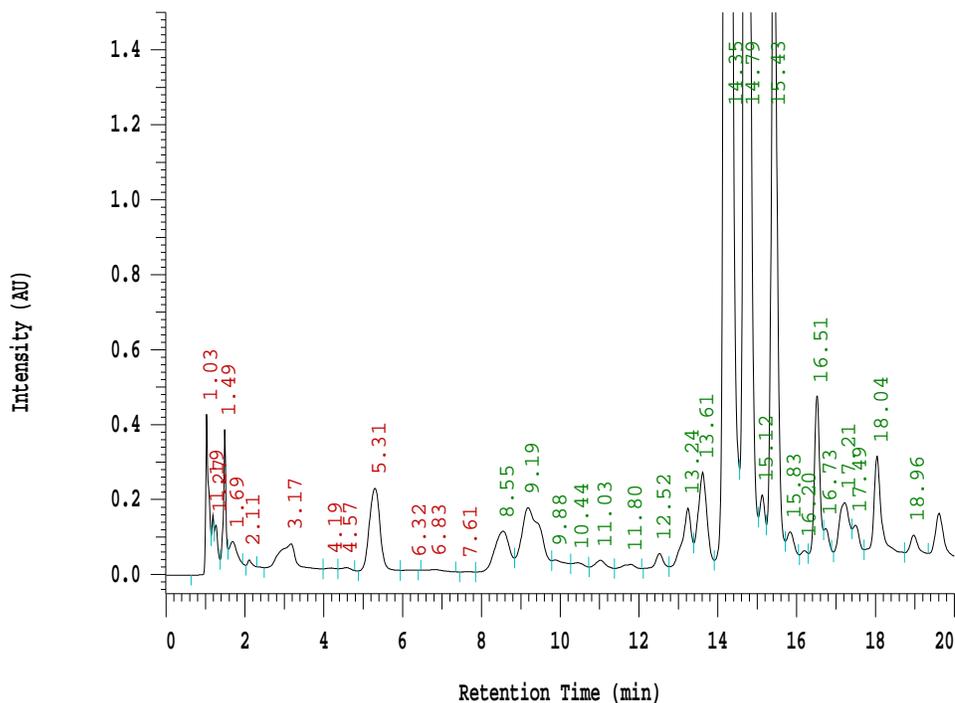
No.	RT	Area	Area %	Height
1	1.04	959703	1.252	271781
2	1.15	719520	0.939	98560
3	1.41	489726	0.639	57622
4	1.53	726588	0.948	112803
5	2.29	264129	0.345	10362
6	3.24	980346	1.279	43604
7	4.29	138690	0.181	4051
8	4.65	42719	0.056	2667
9	5.37	7113100	9.282	455772
10	6.6	343650	0.448	8720
11	8.6	1663846	2.171	80835
12	9.2	1032548	1.347	51520
13	9.88	520860	0.68	15455
14	10.56	154337	0.201	9640
15	10.99	308376	0.402	15414
16	11.79	80477	0.105	6089
17	12.52	310981	0.406	25413
18	13.25	668849	0.873	52413
19	13.6	734213	0.958	51692
20	14.27	13119080	17.12	1195991
21	14.77	18937302	24.712	1373856
22	15.49	23750262	30.993	1372775
23	16.19	37890	0.049	3139
24	16.75	464926	0.607	38093
25	17.04	173196	0.226	8928
26	17.47	374574	0.489	26637
27	17.75	259885	0.339	22542
28	18.11	1731574	2.26	116851
29	18.6	6120	0.008	920
30	18.95	524004	0.684	38940
		76631471	100	5573085

Anexo 11 *Vanilla pompona* de prueba (extracción en medio acuoso: 150 µL Viscozima, 4 horas), 254 nm



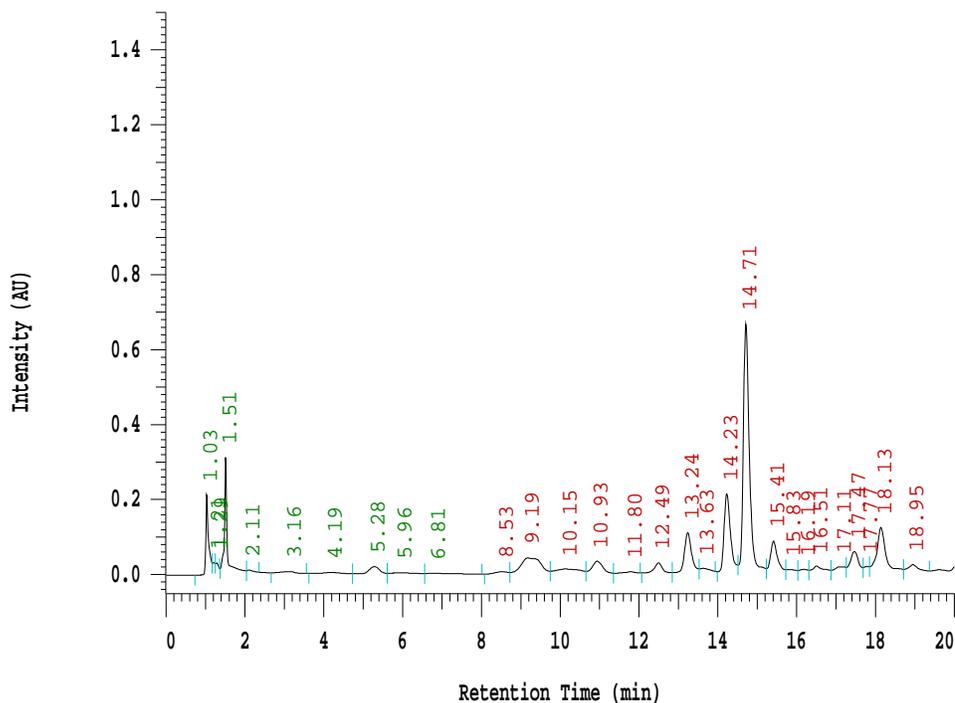
No.	RT	Area	Area %	Height
1	1.03	665838	5.876	117744
2	1.2	7111	0.063	2978
3	1.25	30648	0.27	4510
4	1.49	1394591	12.306	173856
5	2.11	12360	0.109	1395
6	3.16	48756	0.43	1925
7	4.2	22963	0.203	875
8	5.31	104539	0.922	5294
9	5.88	53944	0.476	1486
10	6.85	28816	0.254	868
11	8.57	66619	0.588	3030
12	9.2	470491	4.152	21470
13	9.43	333318	2.941	20158
14	10.11	262553	2.317	6098
15	<b>10.96</b>	<b>253193</b>	<b>2.234</b>	<b>13651</b>
16	11.67	17566	0.155	1552
17	11.83	21276	0.188	1698
18	<b>12.51</b>	<b>154020</b>	<b>1.359</b>	<b>11776</b>
19	<b>13.24</b>	<b>626732</b>	<b>5.531</b>	<b>50499</b>
20	13.63	79276	0.7	5219
21	14.24	1222273	10.786	108037
22	<b>14.72</b>	<b>3325282</b>	<b>29.344</b>	<b>320753</b>
23	15.13	52876	0.467	6168
24	15.43	392493	3.464	33617
25	15.88	15716	0.139	1263
26	16.2	15947	0.141	1534
27	16.52	135140	1.193	9666
28	17.21	99000	0.874	6382
29	17.49	315954	2.788	23207
30	17.79	70760	0.624	7076
31	18.16	893720	7.887	59034
32	18.97	138378	1.221	8046
		11332149	100	1030865

Anexo 12 *Vanilla pompona* de prueba (extracción en medio acuoso: 150 µL Viscozima, 4 horas), 230 nm



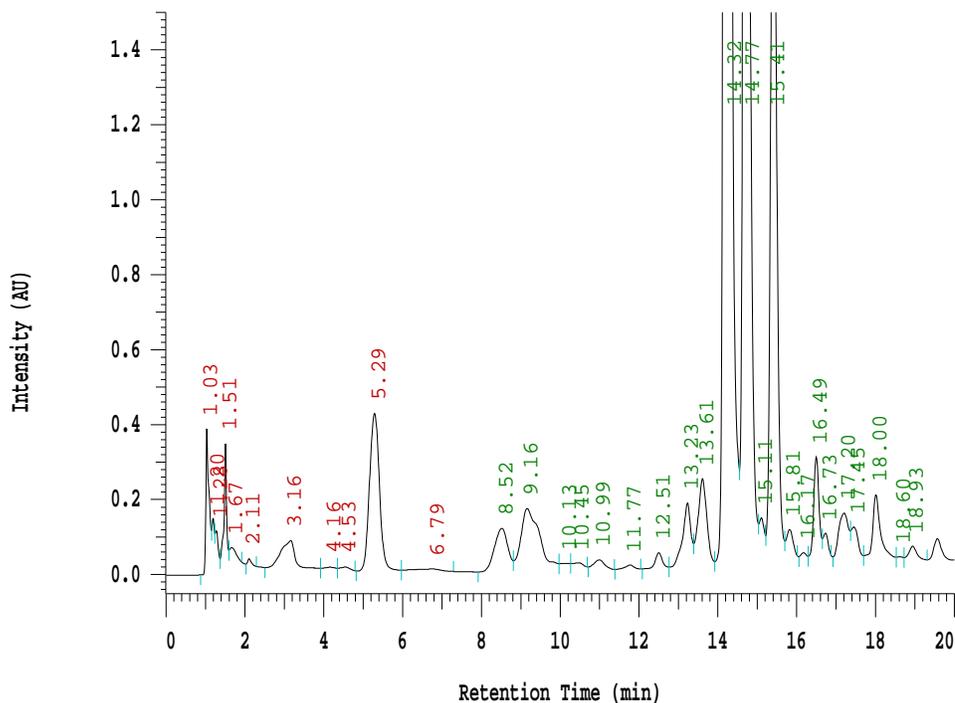
No.	RT	Area	Area %	Height
1	1.03	1094223	1.418	213961
2	1.19	312971	0.405	78877
3	1.27	420366	0.545	65485
4	1.49	878810	1.138	192805
5	1.69	697216	0.903	43488
6	2.11	217739	0.282	18385
7	3.17	1368610	1.773	38079
8	4.19	87164	0.113	4475
9	4.57	78228	0.101	4461
<b>10</b>	<b>5.31</b>	<b>2038280</b>	<b>2.641</b>	<b>109810</b>
11	6.32	0	0	0
12	6.83	35610	0.046	1547
13	7.61	0	0	0
<b>14</b>	<b>8.55</b>	<b>1371234</b>	<b>1.776</b>	<b>53718</b>
15	9.19	3252678	4.214	84297
16	9.88	17174	0.022	1737
17	10.44	49665	0.064	3087
18	11.03	239968	0.311	12047
19	11.8	121178	0.157	5675
20	12.52	221969	0.288	18634
21	13.24	1167481	1.512	77121
22	13.61	1940598	2.514	123665
23	14.35	24296604	31.476	1367366
24	14.79	19668030	25.48	1366151
25	15.12	225150	0.292	34496
26	15.43	10442593	13.528	1029285
27	15.83	195550	0.253	18763
28	16.2	136509	0.177	12275
29	16.51	2457200	3.183	217678
30	16.73	80200	0.104	8996
31	17.21	1330336	1.723	73477
32	17.49	540375	0.7	42629
33	18.04	1867846	2.42	132920
34	18.96	339534	0.44	25505
		<b>77191089</b>	<b>100</b>	<b>5480895</b>

Anexo 13 *Vanilla pompona* de prueba (extracción en medio acuoso: 150 µL Viscozima, 8 horas), 254 nm



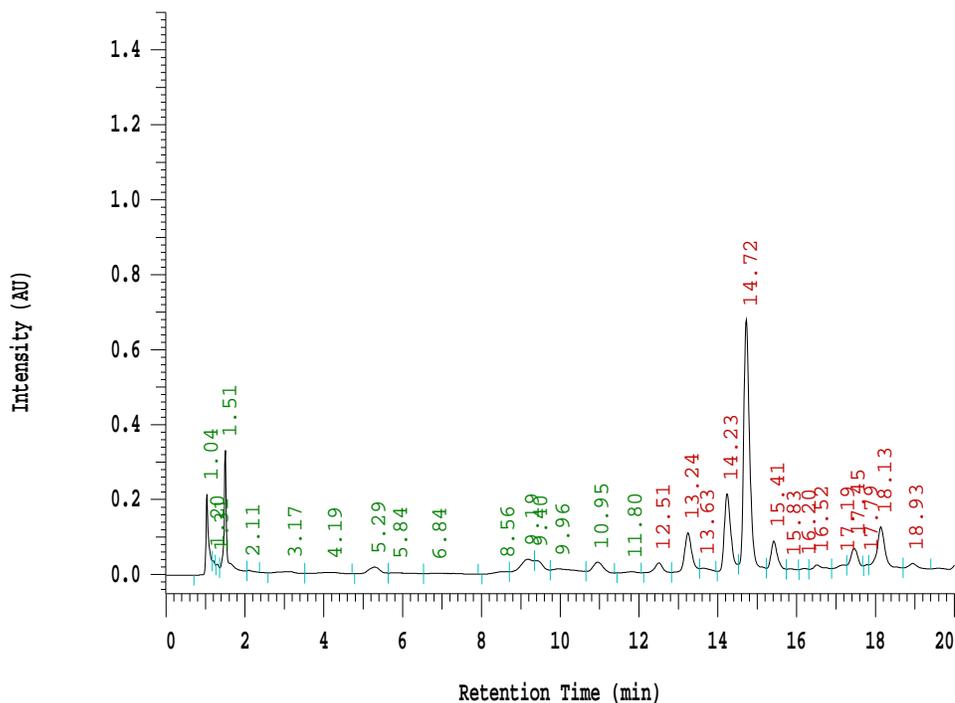
No.	RT	Area	Area %	Height
1	1.03	662999	5.824	107219
2	1.21	9505	0.083	2517
3	1.29	22074	0.194	4828
4	1.51	1348010	11.84	157054
5	2.11	11380	0.1	1451
6	3.16	43550	0.383	1970
7	4.19	41320	0.363	1578
8	5.28	173895	1.527	9666
9	5.96	60409	0.531	1555
10	6.81	49814	0.438	1123
11	8.53	64614	0.568	3047
12	9.19	735997	6.465	21065
13	10.15	251326	2.208	5938
<b>14</b>	<b>10.93</b>	<b>291413</b>	<b>2.56</b>	<b>16054</b>
15	11.8	24968	0.219	1639
<b>16</b>	<b>12.49</b>	<b>169860</b>	<b>1.492</b>	<b>12974</b>
<b>17</b>	<b>13.24</b>	<b>646701</b>	<b>5.68</b>	<b>52898</b>
18	13.63	84938	0.746	5058
19	14.23	1163891	10.223	103768
<b>20</b>	<b>14.71</b>	<b>3461866</b>	<b>30.408</b>	<b>329352</b>
21	15.41	463143	4.068	39675
22	15.83	17881	0.157	1413
23	16.19	16079	0.141	1570
24	16.51	85359	0.75	6086
25	17.11	84736	0.744	5212
26	17.47	348900	3.065	25608
27	17.77	50261	0.441	5797
28	18.13	866395	7.61	58143
29	18.95	133547	1.173	8222
		<b>11384831</b>	<b>100</b>	<b>992480</b>

Anexo 14 *Vanilla pompona* de prueba (extracción en medio acuoso: 150 µL Viscozima, 8 horas), 230 nm



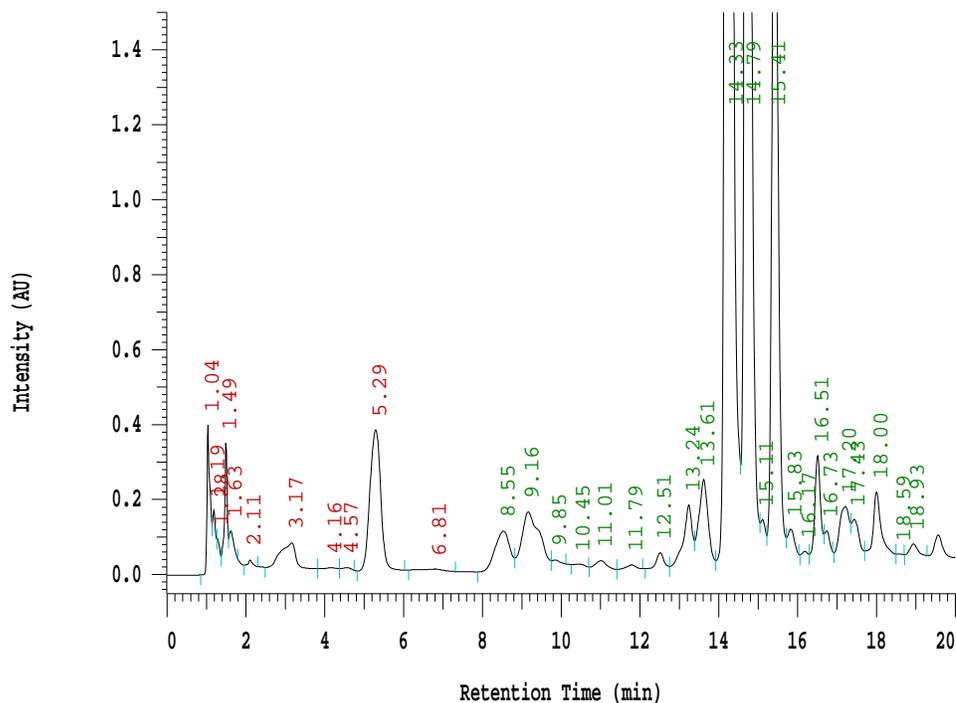
No.	RT	Area	Area %	Height
1	1.03	1111630	1.395	194421
2	1.2	319764	0.401	74630
3	1.28	364354	0.457	58269
4	1.51	870989	1.093	174128
5	1.67	533069	0.669	35206
6	2.11	227866	0.286	19794
7	3.16	1380464	1.732	42480
8	4.16	132167	0.166	5840
9	4.53	100491	0.126	5420
<b>10</b>	<b>5.29</b>	<b>3643860</b>	<b>4.572</b>	<b>209527</b>
11	6.79	96080	0.121	2659
<b>12</b>	<b>8.52</b>	<b>1356715</b>	<b>1.702</b>	<b>57606</b>
13	9.16	3056980	3.836	83524
14	10.13	21493	0.027	1506
15	10.45	64496	0.081	3894
16	10.99	268184	0.337	13191
17	11.77	84230	0.106	5661
18	12.51	253533	0.318	20585
19	13.23	1260864	1.582	86055
20	13.61	1884021	2.364	117857
21	14.32	23889376	29.975	1371199
22	14.77	19758451	24.792	1370440
23	15.11	90340	0.113	14926
24	15.41	13247802	16.623	1300494
25	15.81	225140	0.282	22731
26	16.17	176506	0.221	14771
27	16.49	1712920	2.149	142060
28	16.73	116020	0.146	15821
29	17.2	1154013	1.448	65877
30	17.45	629147	0.789	46728
31	18	1391514	1.746	88388
32	18.6	4420	0.006	620
33	18.93	270728	0.34	18700
		79697627	100	5685008

Anexo 15 *Vanilla pompona* de prueba (extracción en medio acuoso: 150 µL Viscozima, 16 horas), 254 nm



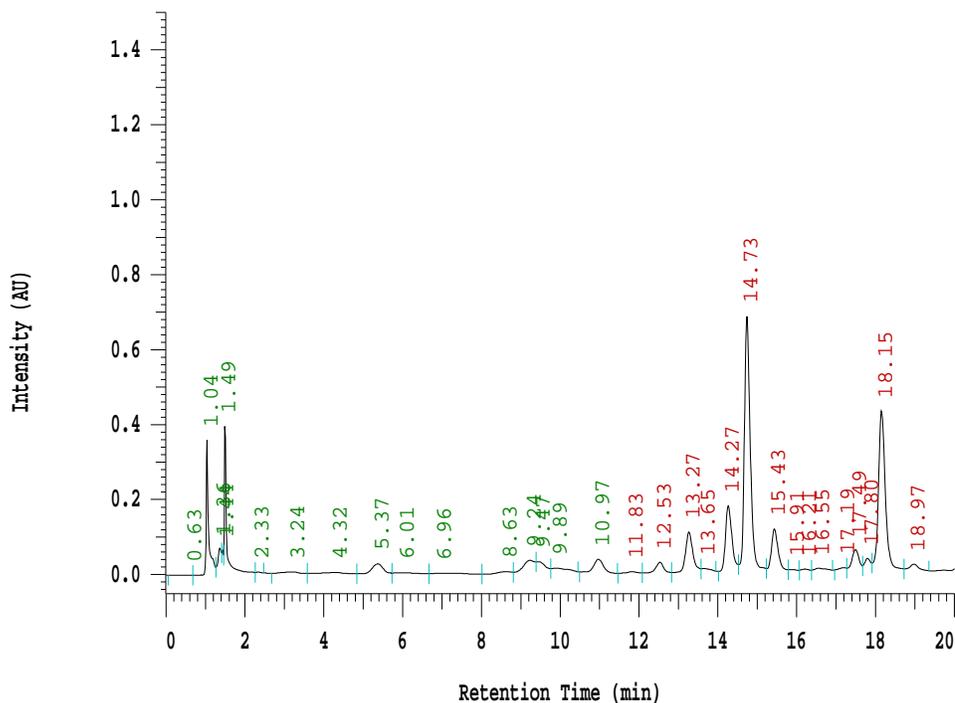
No.	RT	Area	Area %	Height
1	1.04	672676	5.859	107916
2	1.2	7960	0.069	2316
3	1.31	9760	0.085	2782
4	1.51	1382913	12.046	166108
5	2.11	7740	0.067	1187
6	3.17	46880	0.408	1837
7	4.19	51220	0.446	1641
8	5.29	180414	1.571	8963
9	5.84	51191	0.446	1284
10	6.84	53654	0.467	1185
11	8.56	72829	0.634	3285
12	9.19	446158	3.886	19360
13	9.4	280125	2.44	17566
14	9.96	250940	2.186	6070
15	<b>10.95</b>	<b>278787</b>	<b>2.428</b>	<b>14812</b>
16	11.8	25360	0.221	1625
17	<b>12.51</b>	<b>165170</b>	<b>1.439</b>	<b>12715</b>
18	<b>13.24</b>	<b>654921</b>	<b>5.705</b>	<b>52194</b>
19	13.63	78345	0.682	4841
20	14.23	1182945	10.304	103015
21	<b>14.72</b>	<b>3520730</b>	<b>30.667</b>	<b>335026</b>
22	15.41	453288	3.948	38853
23	15.83	15161	0.132	1222
24	16.2	13436	0.117	1411
25	16.52	99043	0.863	6228
26	17.19	91612	0.798	5953
27	17.45	374331	3.261	27934
28	17.79	45170	0.393	6072
29	18.13	842199	7.336	56256
30	18.93	125716	1.095	7497
		11480674	100	1017154

Anexo 16 *Vanilla pompona* de prueba (extracción en medio acuoso: 150 µL Viscozima, 16 horas), 230 nm



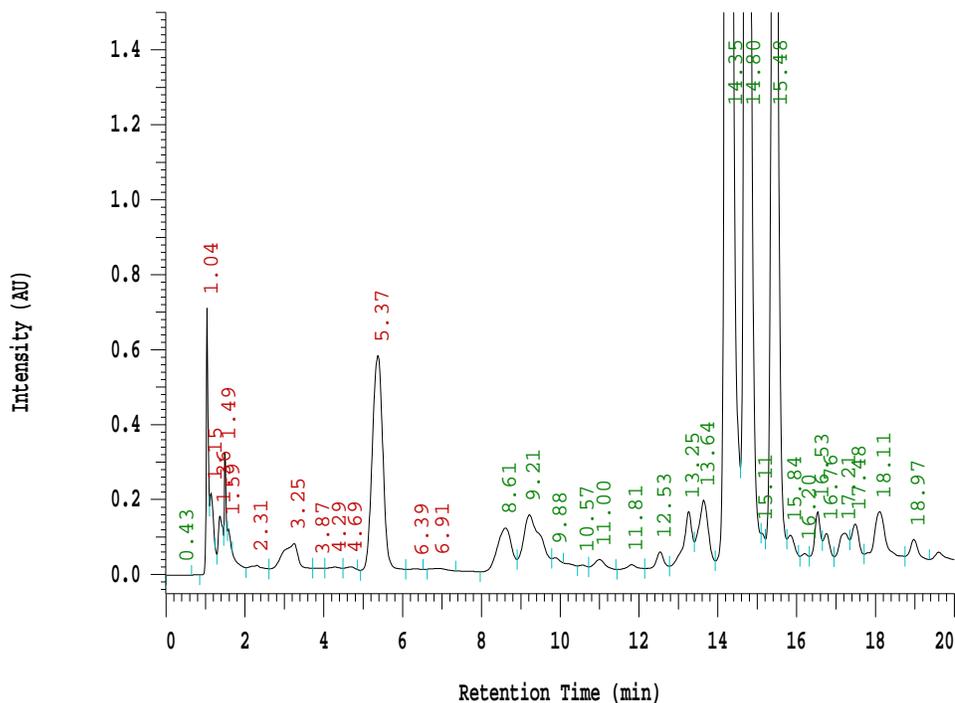
No.	RT	Area	Area %	Height
1	1.04	1069902	1.336	199130
2	1.19	492881	0.616	85373
3	1.28	252982	0.316	47476
4	1.49	848489	1.06	174389
5	1.63	607076	0.758	57078
6	2.11	261624	0.327	17920
7	3.17	1315426	1.643	38985
8	4.16	123504	0.154	4426
9	4.57	63824	0.08	3874
<b>10</b>	<b>5.29</b>	<b>3551580</b>	<b>4.436</b>	<b>187678</b>
11	6.81	71980	0.09	2346
<b>12</b>	<b>8.55</b>	<b>1407069</b>	<b>1.757</b>	<b>53783</b>
13	9.16	2994105	3.74	78593
14	9.85	20460	0.026	1953
15	10.45	32370	0.04	1884
16	11.01	254116	0.317	12085
17	11.79	83080	0.104	5468
18	12.51	241498	0.302	20028
19	13.24	1256868	1.57	81990
20	13.61	1902407	2.376	115293
21	14.33	24263841	30.305	1369088
22	14.79	19976996	24.95	1367998
23	15.11	70010	0.087	10973
24	15.41	13119392	16.386	1284742
25	15.83	193320	0.241	19678
26	16.17	156530	0.196	13066
27	16.51	1773225	2.215	139615
28	16.73	92200	0.115	11684
29	17.2	1222328	1.527	70323
30	17.43	733777	0.916	52679
31	18	1370234	1.711	88051
32	18.59	3630	0.005	516
33	18.93	239798	0.299	16408
		80066522	100	5634573

Anexo 17 *Vanilla pompona* de prueba (extracción en medio acuoso: 600 µL Viscozima, 8 horas), 254 nm



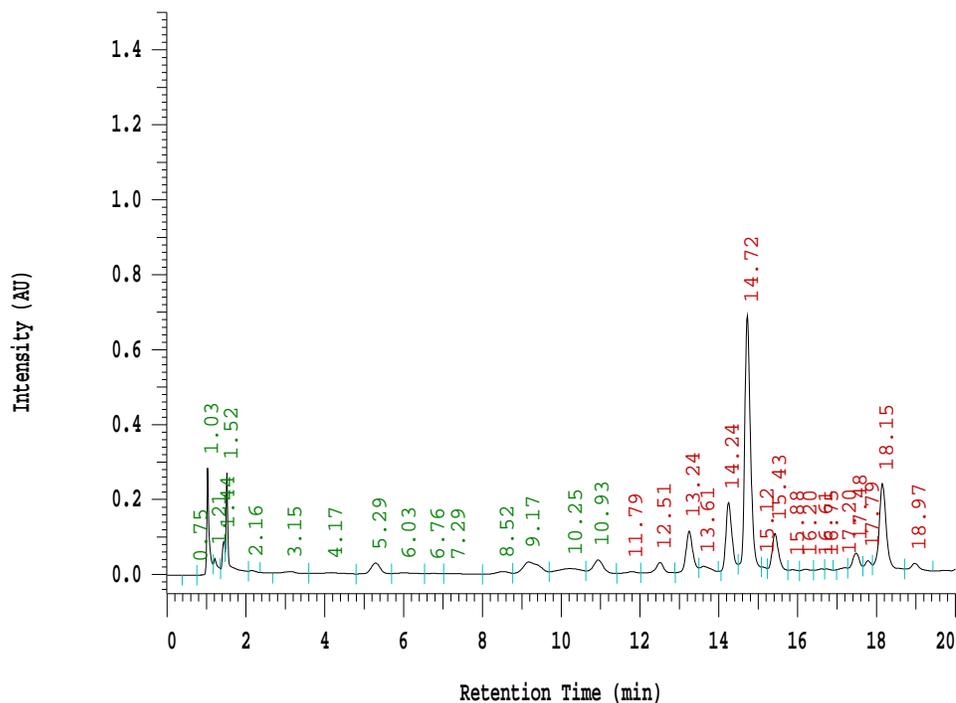
No.	RT	Area	Area %	Height
1	0.63	2250	0.016	102
2	1.04	776209	5.52	180161
3	1.36	206190	1.466	35929
4	1.44	101168	0.719	33490
5	1.49	1246371	8.863	197981
6	2.33	4600	0.033	650
7	3.24	48901	0.348	1968
8	4.32	52218	0.371	1618
9	5.37	254146	1.807	13225
10	6.01	57740	0.411	1496
11	6.96	59373	0.422	1200
12	8.63	74404	0.529	3218
13	9.24	376173	2.675	18086
14	9.47	465274	3.309	15901
15	9.89	48940	0.348	1662
16	10.97	351908	2.502	18931
17	11.83	27933	0.199	1874
18	12.53	189128	1.345	14028
19	13.27	704700	5.011	54046
20	13.65	91946	0.654	5359
21	14.27	1034753	7.358	88852
22	14.73	3576410	25.433	340757
23	15.43	700132	4.979	57466
24	15.91	41620	0.296	2940
25	16.21	50312	0.358	3462
26	16.55	102572	0.729	4622
27	17.19	69249	0.492	4804
28	17.49	372615	2.65	28601
29	17.8	186227	1.324	16972
30	18.15	2638237	18.761	213227
31	18.97	150593	1.071	9031
		14062292	100	1371659

Anexo 18 *Vanilla pompona* de prueba (extracción en medio acuoso: 600 µL Viscozima, 8 horas), 230 nm



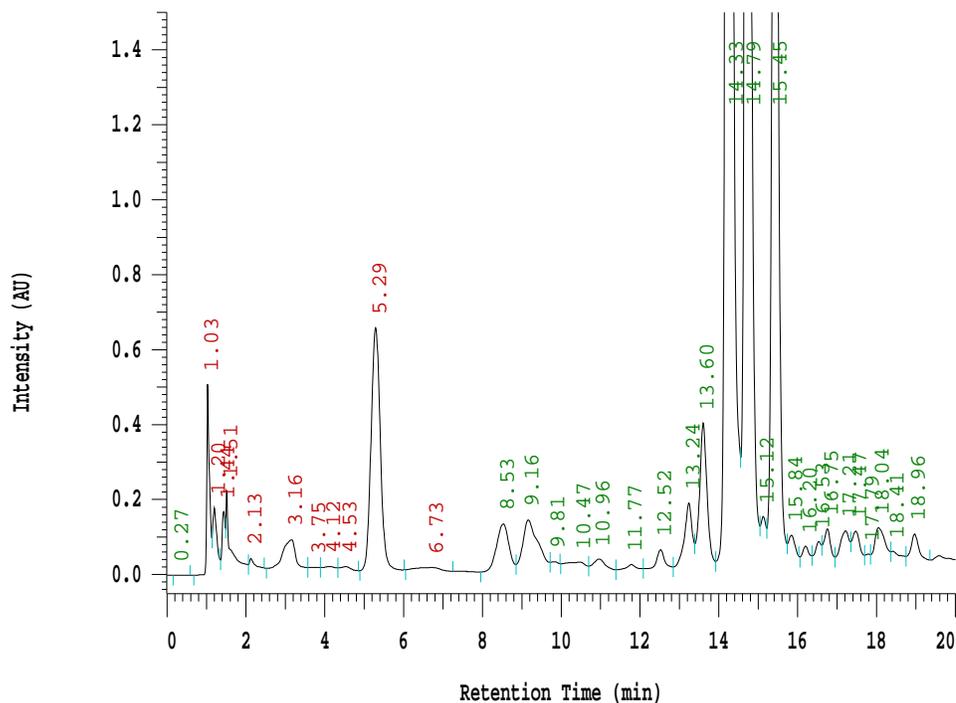
No.	RT	Area	Area %	Height
1	0.43	2230	0.003	108
2	1.04	1232750	1.485	355223
3	1.15	726629	0.876	107861
4	1.36	612394	0.738	77288
5	1.49	536552	0.647	161605
6	1.59	358720	0.432	59841
7	2.31	270513	0.326	10181
8	3.25	1132030	1.364	37475
9	3.87	70016	0.084	3926
10	4.29	100793	0.121	4380
11	4.69	62024	0.075	3980
12	5.37	5337950	6.432	286457
13	6.39	51358	0.062	2086
14	6.91	83207	0.1	3017
15	8.61	1440429	1.736	57882
16	9.21	2777274	3.346	74900
17	9.88	29140	0.035	2723
18	10.57	14710	0.018	1577
19	11	274106	0.33	13566
20	11.81	85492	0.103	5768
21	12.53	269311	0.325	21650
22	13.25	1124605	1.355	74382
23	13.64	1574125	1.897	88553
24	14.35	23076499	27.806	1370982
25	14.8	19394035	23.369	1370215
26	15.11	11940	0.014	1125
27	15.48	18631672	22.45	1369064
28	15.84	121100	0.146	11877
29	16.2	28713	0.035	3725
30	16.53	553068	0.666	59520
31	16.76	328316	0.396	31455
32	17.21	492835	0.594	32325
33	17.48	585398	0.705	44785
34	18.11	1243941	1.499	61998
35	18.97	357407	0.431	26338
		82991282	100	5837838

Anexo 19 *Vanilla pompona* de prueba (extracción en medio acuoso: 150  $\mu$ L Viscozima + 150  $\mu$ L Celuclast, 8 horas), 254 nm



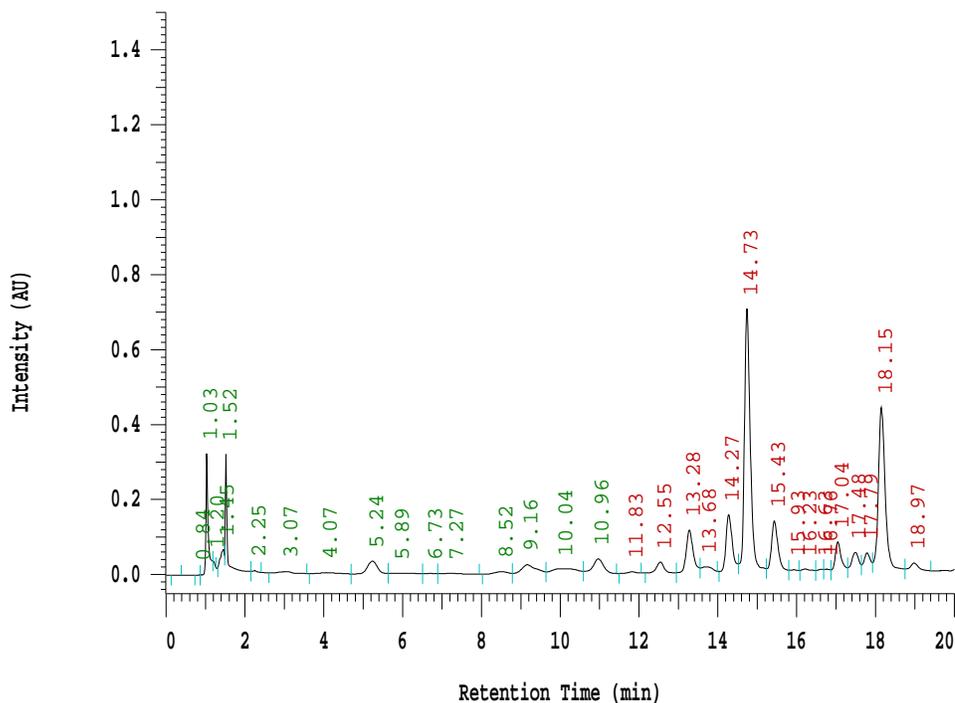
No.	RT	Area	Area %	Height
1	0.75	1000	0.008	101
2	1.03	704395	5.701	142704
3	1.21	34420	0.279	8563
4	1.44	208399	1.687	44857
5	1.52	977176	7.908	135994
6	2.16	14020	0.113	1502
7	3.15	43975	0.356	2061
8	4.17	40154	0.325	1332
9	5.29	380358	3.078	15317
10	6.03	28738	0.233	962
11	6.76	13630	0.11	689
12	7.29	16951	0.137	633
13	8.52	72207	0.584	3441
14	9.17	469871	3.803	15861
15	10.25	281268	2.276	6629
16	<b>10.93</b>	<b>330312</b>	<b>2.673</b>	<b>18164</b>
17	11.79	30836	0.25	2152
18	<b>12.51</b>	<b>180883</b>	<b>1.464</b>	<b>13722</b>
19	<b>13.24</b>	<b>667175</b>	<b>5.399</b>	<b>55425</b>
20	13.61	156785	1.269	8316
21	14.24	1033435	8.363	93265
22	<b>14.72</b>	<b>3554728</b>	<b>28.768</b>	<b>342143</b>
23	15.12	54426	0.44	6774
24	15.43	615616	4.982	51339
25	15.88	41888	0.339	2750
26	16.2	54393	0.44	3510
27	16.61	48283	0.391	3612
28	16.75	37674	0.305	3464
29	17.2	68658	0.556	5051
30	17.48	324591	2.627	24450
31	17.79	158183	1.28	14315
32	18.15	1544656	12.501	116610
33	18.97	167613	1.356	10363
		12356697	100	1156071

Anexo 20 *Vanilla pompona* de prueba (extracción en medio acuoso: 150 µL Viscozima + 150 µL Celuclast, 8 horas), 230 nm



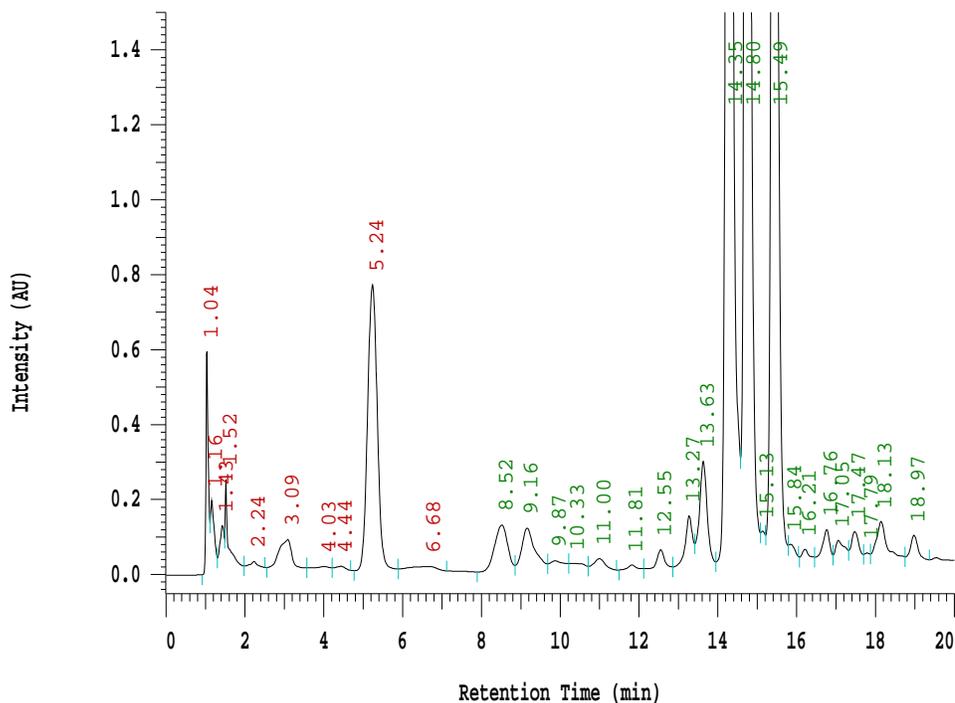
No.	RT	Area	Area %	Height
1	0.27	1300	0.002	100
2	1.03	1185202	1.446	253812
3	1.2	662750	0.809	88593
4	1.44	467191	0.57	83780
5	1.51	952810	1.163	111611
6	2.13	282372	0.345	20129
7	3.16	1177078	1.436	43734
8	3.75	114052	0.139	6033
9	4.12	154221	0.188	6682
10	4.53	112719	0.138	5925
11	5.29	5251660	6.409	323577
12	6.73	160440	0.196	4218
13	8.53	1390369	1.697	63581
14	9.16	2338165	2.853	68317
15	9.81	13970	0.017	1585
16	10.47	94700	0.116	4139
17	10.96	307655	0.375	14767
18	11.77	90331	0.11	6347
19	12.52	325706	0.397	25009
20	13.24	1173092	1.432	86339
21	13.6	2589403	3.16	191854
22	14.33	22763652	27.778	1371013
23	14.79	19778321	24.135	1370276
24	15.12	79670	0.097	14371
25	15.45	17205371	20.996	1369193
26	15.84	163220	0.199	17459
27	16.2	131623	0.161	14950
28	16.53	188140	0.23	21375
29	16.75	414911	0.506	38581
30	17.21	521392	0.636	36391
31	17.47	468909	0.572	36020
32	17.79	47703	0.058	6003
33	18.04	734428	0.896	41607
34	18.41	156984	0.192	10405
35	18.96	447766	0.546	34136
		81947276	100	5791912

Anexo 21 *Vanilla pompona* de prueba (extracción en medio acuoso: 300 µL Viscozima + 300 µL Celuclast, 8 horas), 254 nm



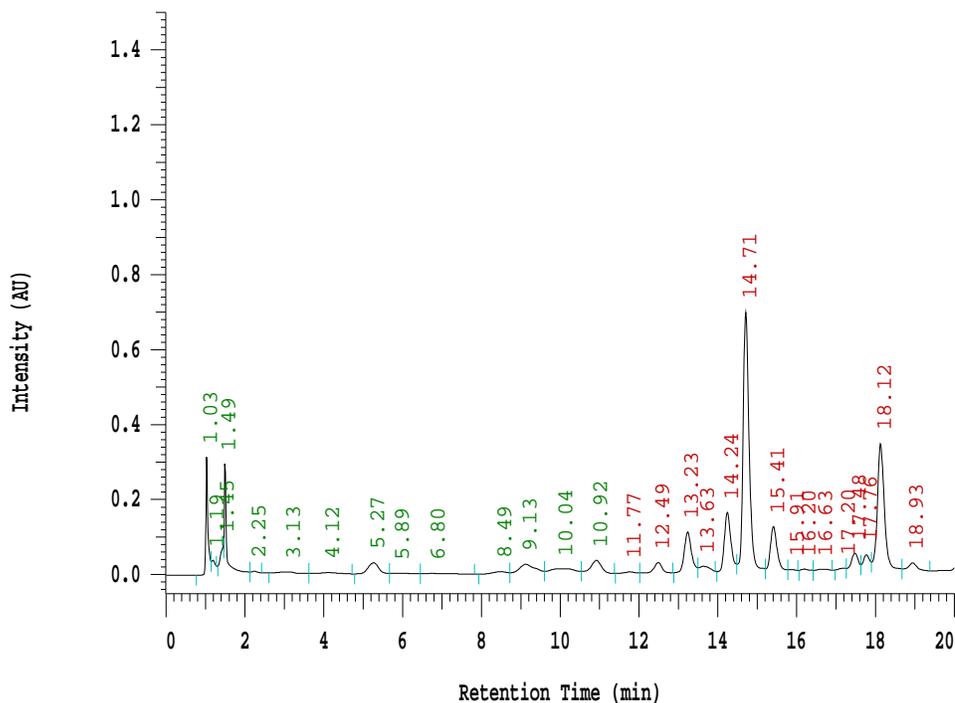
No.	RT	Area	Area %	Height
1	0.2	770	0.005	118
2	0.84	470	0.003	157
3	1.03	741032	5.278	162375
4	1.2	10240	0.073	1704
5	1.45	259001	1.845	33754
6	1.52	989543	7.047	160942
7	2.25	9830	0.07	1501
8	3.07	42560	0.303	1964
9	4.07	38140	0.272	1377
10	5.24	453081	3.227	17916
11	5.89	18045	0.129	545
12	6.73	8987	0.064	496
13	7.27	24266	0.173	850
14	8.52	74076	0.528	3301
15	9.16	318703	2.27	12233
16	10.04	293848	2.093	6593
17	10.96	377361	2.688	19615
18	11.83	25064	0.179	1890
19	12.55	183713	1.308	14407
20	13.28	684836	4.877	56546
21	13.68	150633	1.073	7466
22	14.27	871787	6.209	76963
23	14.73	3656673	26.042	351358
24	15.43	799075	5.691	67689
25	15.93	34192	0.244	2618
26	16.23	58688	0.418	3479
27	16.63	30509	0.217	3274
28	16.76	32596	0.232	3247
29	17.04	417328	2.972	39314
30	17.48	319958	2.279	25319
31	17.79	278883	1.986	24425
32	18.15	2677075	19.066	218010
33	18.97	160260	1.141	10415
		14041223	100	1331861

Anexo 22 *Vanilla pompona* de prueba (extracción en medio acuoso: 300 µL Viscozima + 300 µL Celuclast, 8 horas), 230 nm



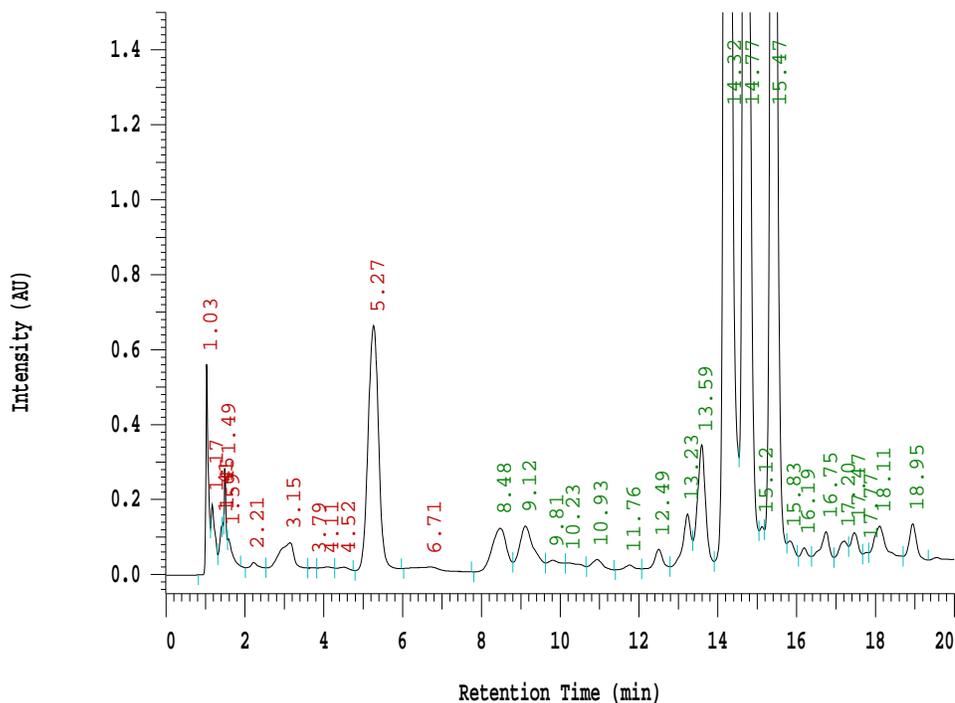
No.	RT	Area	Area %	Height
1	1.04	1205601	1.454	297735
2	1.16	706121	0.852	98870
3	1.43	516812	0.623	64848
4	1.52	895670	1.08	126450
5	2.24	350939	0.423	15836
6	3.09	1165703	1.406	43511
7	4.03	204762	0.247	6234
8	4.44	110638	0.133	5805
9	5.24	<b>6525802</b>	<b>7.871</b>	<b>380844</b>
10	6.68	289631	0.349	5907
11	8.52	<b>1439672</b>	<b>1.736</b>	<b>62046</b>
12	9.16	1397748	1.686	57557
13	9.87	355110	0.428	13417
14	10.33	257944	0.311	9660
15	11	326724	0.394	15401
16	11.81	84332	0.102	5997
17	12.55	328899	0.397	24954
18	13.27	896375	1.081	68834
19	13.63	2016489	2.432	141337
20	14.35	21487737	25.916	1373617
21	14.8	19509336	23.53	1372833
22	15.13	16690	0.02	3722
23	15.49	20023180	24.149	1371634
24	15.84	56210	0.068	4438
25	16.21	95792	0.116	10804
26	16.76	425077	0.513	37631
27	17.05	363474	0.438	23341
28	17.47	458555	0.553	35752
29	17.79	68021	0.082	7414
30	18.13	914656	1.103	49980
31	18.97	420092	0.507	32442
		82913792	100	5768851

Anexo 23 *Vanilla pompona* de prueba (extracción en medio acuoso: 150 µL Viscozima + 300 µL Celuclast, 8 horas), 254 nm



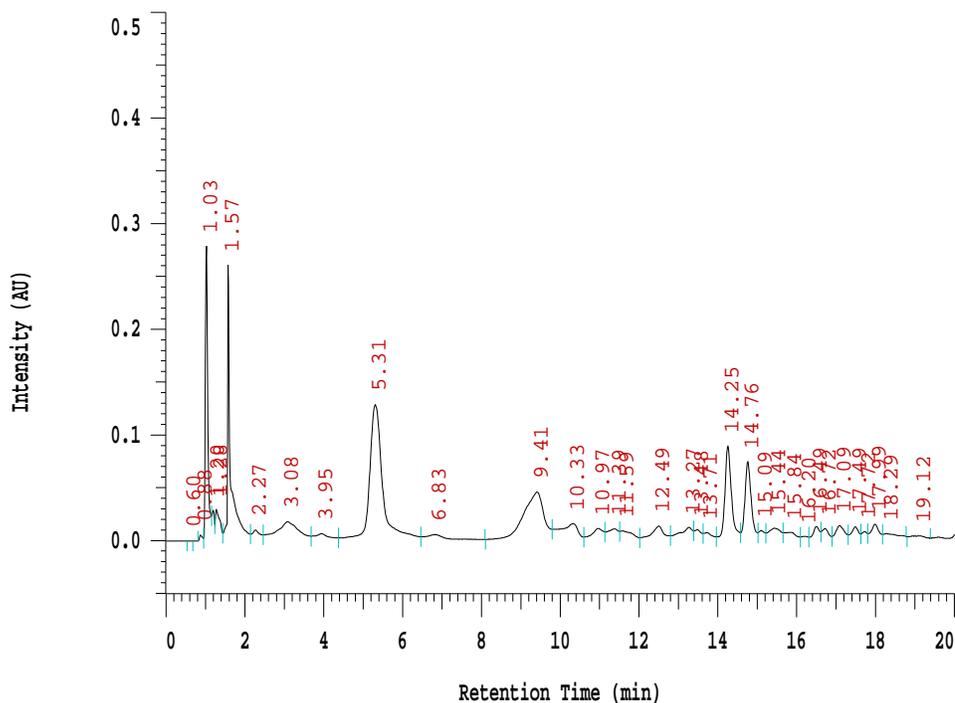
No.	RT	Area	Area %	Height
1	1.03	725399	5.638	157454
2	1.19	16620	0.129	3155
3	1.45	226793	1.763	39052
4	1.49	1094816	8.508	148470
5	2.25	10900	0.085	1359
6	3.13	44736	0.348	1733
7	4.12	40503	0.315	1397
8	5.27	280898	2.183	14821
9	5.89	39956	0.311	1088
10	6.8	43784	0.34	923
11	8.49	77368	0.601	3158
12	9.13	372001	2.891	12917
13	10.04	291383	2.265	6497
<b>14</b>	<b>10.92</b>	<b>341127</b>	<b>2.651</b>	<b>17685</b>
15	11.77	27305	0.212	1825
<b>16</b>	<b>12.49</b>	<b>184804</b>	<b>1.436</b>	<b>13816</b>
<b>17</b>	<b>13.23</b>	<b>680790</b>	<b>5.291</b>	<b>53847</b>
18	13.63	149620	1.163	7869
19	14.24	920514	7.154	79064
<b>20</b>	<b>14.71</b>	<b>3672127</b>	<b>28.538</b>	<b>345423</b>
21	15.41	693502	5.39	59305
22	15.91	12940	0.101	1113
23	16.2	18273	0.142	1750
24	16.63	32052	0.249	1774
25	17.2	38324	0.298	3173
26	17.48	284779	2.213	23072
27	17.76	240789	1.871	21295
28	18.12	2135993	16.6	169507
29	18.93	169225	1.315	10423
		<b>12867321</b>	<b>100</b>	<b>1202965</b>

*Vanilla pompona* de prueba (extracción en medio acuoso: 150 µL Viscozima + 300 µL Celuclast, 8 horas), 230 nm



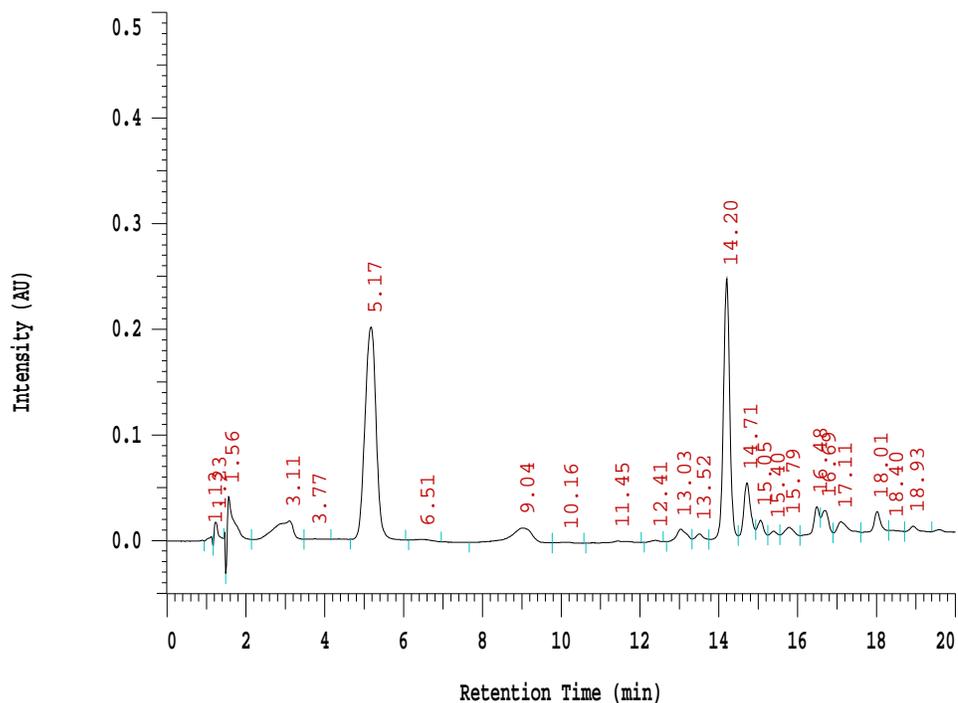
No.	RT	Area	Area %	Height
1	1.03	1197709	1.41	280314
2	1.17	669894	0.789	92835
3	1.41	286495	0.337	63987
4	1.45	157384	0.185	68475
5	1.49	482496	0.568	140837
6	1.59	515469	0.607	47167
7	2.21	300442	0.354	14192
8	3.15	1189474	1.401	39365
9	3.79	65868	0.078	4769
10	4.11	132486	0.156	5596
11	4.52	91426	0.108	4652
12	5.27	<b>6079989</b>	<b>7.16</b>	<b>326960</b>
13	6.71	293784	0.346	5864
14	<b>8.48</b>	<b>1470858</b>	<b>1.732</b>	<b>57702</b>
15	9.12	2054186	2.419	60048
16	9.81	73961	0.087	4445
17	10.23	59618	0.07	2517
18	10.93	289935	0.341	14169
19	11.76	88051	0.104	5923
20	12.49	348864	0.411	25449
21	13.23	1006040	1.185	71449
22	13.59	2421534	2.852	162898
23	14.32	22706828	26.74	1373373
24	14.77	19727148	23.231	1372616
25	15.12	392213	0.462	51612
26	15.47	19865848	23.395	1371458
27	15.83	83260	0.098	7982
28	16.19	100421	0.118	11655
29	16.75	438452	0.516	33942
30	17.2	301313	0.355	22179
31	17.47	439072	0.517	33828
32	17.77	67668	0.08	7859
33	18.11	898818	1.058	43227
34	18.95	619603	0.73	47706
		84916607	100	5877050

Anexo 25: *Vanilla pompona* inmadura (blanco, extracción en medio acuoso: sin enzimas),  
254 nm



No.	RT	Area	Area %	Height
1	0.6	0		0
2	0.88	13994	0.215	2779
3	1.03	599063	9.224	139414
4	1.2	61539	0.948	14395
5	1.28	123392	1.9	14787
6	1.57	730865	11.254	130581
7	2.27	71354	1.099	5034
8	3.08	352605	5.429	8899
9	3.95	82845	1.276	3133
10	5.31	1478421	22.765	63991
11	6.83	75418	1.161	2432
12	9.41	777848	11.977	22225
13	10.33	227256	3.499	7177
<b>14</b>	<b>10.97</b>	<b>89641</b>	<b>1.38</b>	<b>4892</b>
15	11.39	86144	1.326	4612
16	11.59	72942	1.123	3635
<b>17</b>	<b>12.49</b>	<b>105965</b>	<b>1.632</b>	<b>5689</b>
<b>18</b>	<b>13.27</b>	<b>100770</b>	<b>1.552</b>	<b>5010</b>
19	13.48	45791	0.705	3907
20	13.71	31645	0.487	2377
21	14.25	487055	7.5	43254
<b>22</b>	<b>14.76</b>	<b>389656</b>	<b>6</b>	<b>35936</b>
23	15.09	32827	0.505	3266
24	15.44	86339	1.329	4320
25	15.84	42447	0.654	2342
26	16.2	3120	0.048	469
27	16.49	44746	0.689	5004
28	16.72	41693	0.642	3999
29	17.09	69503	1.07	5324
30	17.49	50331	0.775	4621
31	17.72	19932	0.307	2390
32	17.99	69934	1.077	5830
33	18.29	29262	0.451	1364
34	19.12	0	0	0
		<b>6494343</b>	<b>100</b>	<b>563088</b>

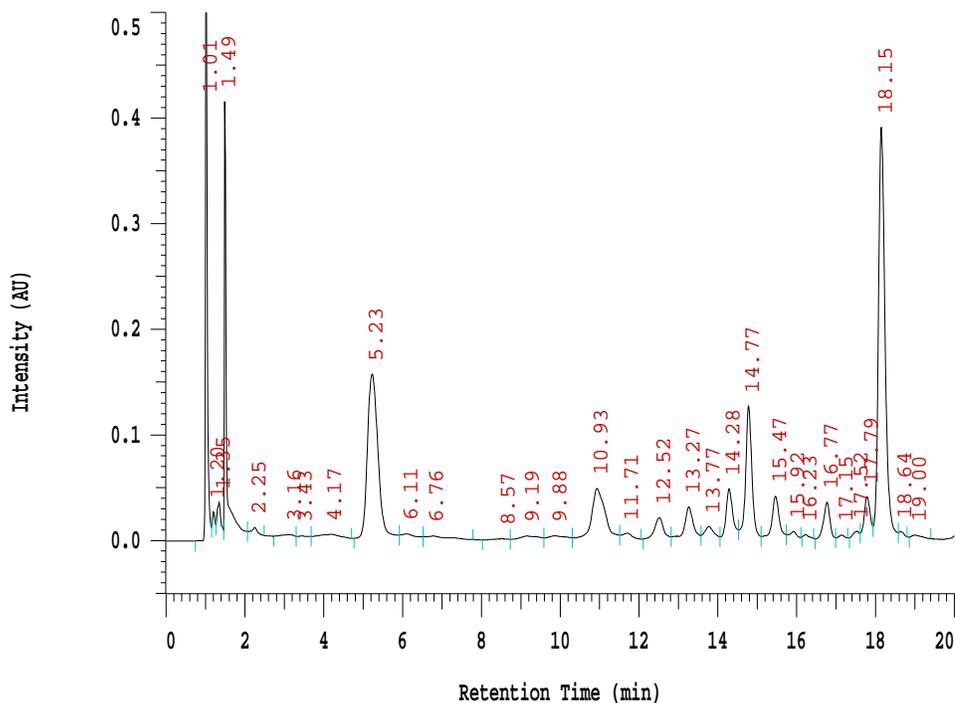
Anexo 26: *Vanilla pompona* inmadura (blanco, extracción en medio acuoso: sin enzimas),  
230 nm



No.	RT	Area	Area %	Height
1	1.13	10906	0.198	1905
2	1.23	58860	1.069	8832
3	1.56	204355	3.712	20799
4	3.11	301922	5.484	8914
5	3.77	4315	0.078	223
<b>6</b>	<b>5.17</b>	<b>1970060</b>	<b>35.781</b>	<b>100455</b>
7	6.51	15380	0.279	633
8	9.04	255937	4.648	6924
9	10.16	9702	0.176	482
10	11.45	21250	0.386	753
11	12.41	8921	0.162	690
12	13.03	92571	1.681	5619
13	13.52	39101	0.71	2931
14	14.2	1355864	24.626	123315
15	14.71	319222	5.798	26367
16	15.05	94069	1.709	8380
17	15.4	37581	0.683	2942
18	15.79	78007	1.417	4577
19	16.48	136441	2.478	13802
20	16.69	153620	2.79	11955
21	17.11	128292	2.33	6272
22	18.01	143151	2.6	10425
23	18.4	24798	0.45	1360
24	18.93	41586	0.755	2945
		5505911	100	371500

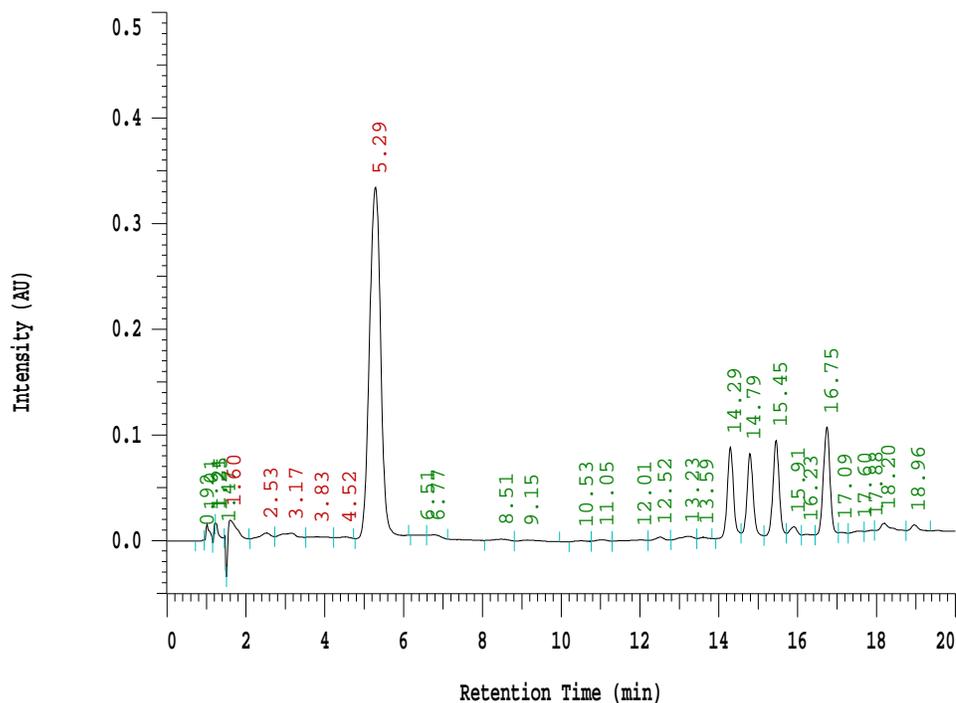
Observación: Dado que la señal alrededor de  $t_R = 5$  min era muy alta, se diluyó el blanco 10 veces.

Anexo 27: *Vanilla pompona* inmadura (extracción en medio acuoso: 150 µL Viscozima + 300 µL Celuclast, 8 horas), 254 nm



No.	RT	Area	Area %	Height
1	1.01	904843	9.779	300352
2	1.2	67845	0.733	13586
3	1.35	135765	1.467	18074
4	1.49	794970	8.592	207886
5	2.25	108994	1.178	6296
6	3.16	84315	0.911	2794
7	3.43	44896	0.485	2171
8	4.17	129905	1.404	2808
9	5.23	1501547	16.228	78568
10	6.11	77706	0.84	2868
11	6.76	72162	0.78	1837
12	8.57	7217	0.078	377
13	9.19	50956	0.551	1624
14	9.88	51970	0.562	1739
15	10.93	565376	6.11	23947
16	11.71	48919	0.529	2755
17	12.52	154205	1.667	10045
18	13.27	230450	2.491	15088
19	13.77	96554	1.044	5833
20	14.28	283992	3.069	23627
21	14.77	699744	7.563	62847
22	15.47	260794	2.819	20215
23	15.92	48041	0.519	3386
24	16.23	20944	0.226	1957
25	16.77	189677	2.05	17252
26	17.15	18687	0.202	1698
27	17.52	39512	0.427	3544
28	17.79	216301	2.338	20016
29	18.15	2279752	24.639	194788
30	18.64	34639	0.374	3383
31	19	31992	0.346	1729
		9252670	100	1053090

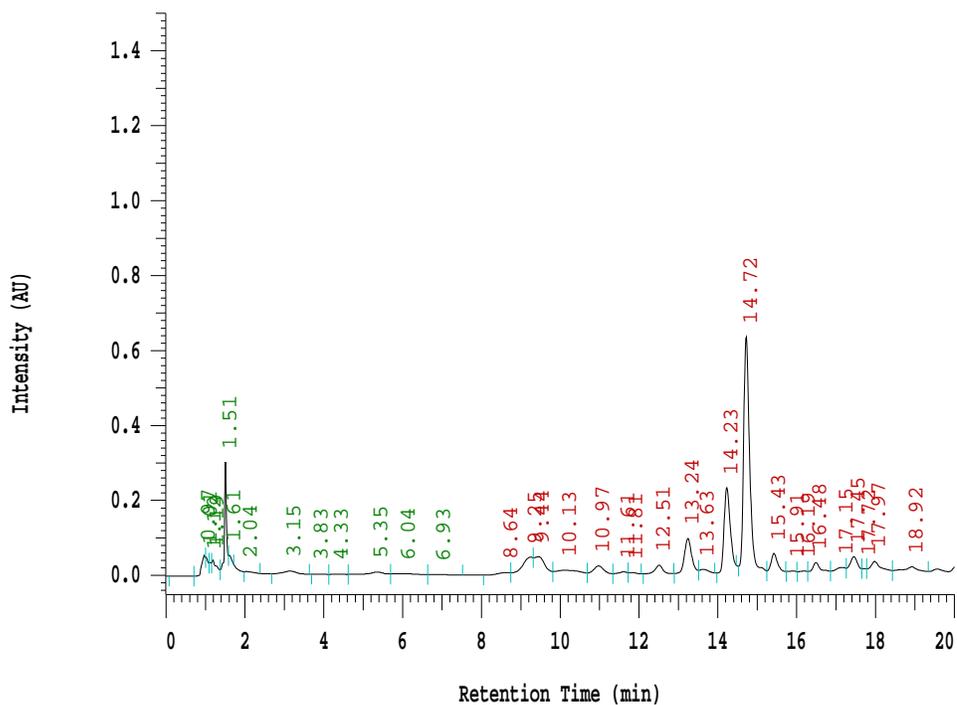
Anexo 28: *Vanilla pompona* inmadura (extracción en medio acuoso: 150  $\mu$ L Viscozima + 300  $\mu$ L Celuclast, 8 horas), 230 nm



No.	RT	Area	Area %	Height
1	0.92	34483	0.511	4740
2	1.01	140225	2.079	14217
3	1.21	55214	0.819	19057
4	1.25	232417	3.446	19815
5	1.47	46049	0.683	18466
6	1.6	396280	5.875	23819
7	2.53	51415	0.762	2771
8	3.17	78272	1.16	2579
9	3.83	29509	0.437	835
10	4.52	15673	0.232	764
<b>11</b>	<b>5.29</b>	<b>3239440</b>	<b>48.026</b>	<b>165613</b>
12	6.51	11076	0.164	726
13	6.77	28563	0.423	1372
<b>14</b>	<b>8.51</b>	<b>20078</b>	<b>0.298</b>	<b>805</b>
15	9.15	18101	0.268	590
16	10.53	8674	0.129	446
17	11.05	16245	0.241	838
18	12.01	13320	0.197	412
19	12.52	19180	0.284	1457
20	13.23	31564	0.468	1460
21	13.59	9055	0.134	794
22	14.29	470670	6.978	43023
23	14.79	439397	6.514	39640
24	15.45	500448	7.419	45465
25	15.91	57091	0.846	4260
26	16.23	5852	0.087	494
27	16.75	600156	8.898	50900
28	17.09	2010	0.03	247
29	17.6	19298	0.286	1095
30	17.88	17242	0.256	1338
31	18.2	94409	1.4	4480
32	18.96	43723	0.648	3185
		6745129	100	475703

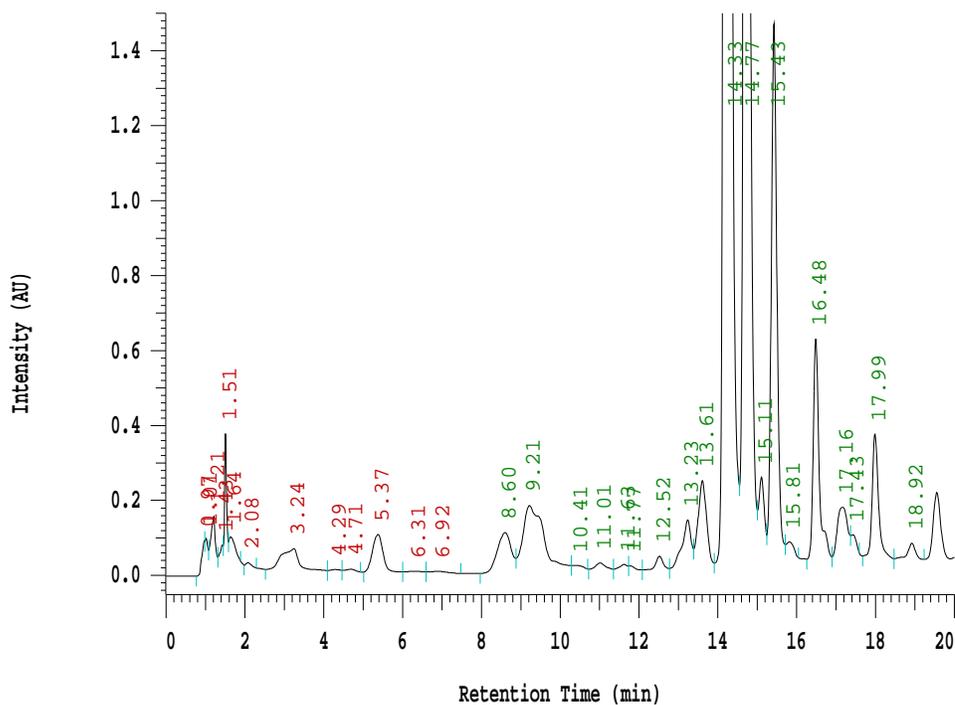
Observación: Dado que la señal alrededor de  $t_R = 5$  min era muy alta, se diluyó la muestra 10 veces.

Anexo 29: *Vanilla pompona* de prueba (blanco, extracción etanólica), 254 nm



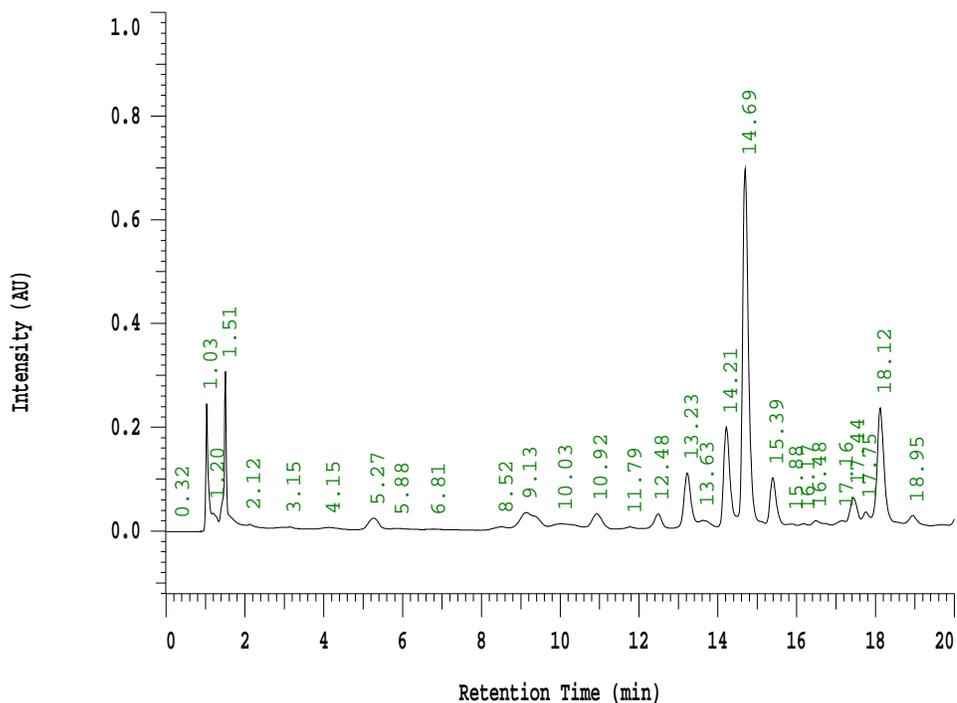
No.	RT	Area	Area %	Height
1	0.16	1800	0.018	100
2	0.97	149690	1.462	27601
3	1.01	122513	1.197	24919
4	1.12	70394	0.688	18050
5	1.19	183175	1.789	21237
6	1.51	1383736	13.516	152054
7	1.61	18320	0.179	2950
8	2.04	9780	0.096	635
9	3.15	86880	0.849	4002
10	3.83	3750	0.037	237
11	4.33	8280	0.081	528
12	5.35	88441	0.864	3372
13	6.04	60172	0.588	1581
14	6.93	17666	0.173	744
15	8.64	62370	0.609	3193
16	9.25	425531	4.156	23200
17	9.44	463942	4.532	23893
18	10.13	221161	2.16	5540
19	<b>10.97</b>	<b>196810</b>	<b>1.922</b>	<b>10772</b>
20	11.61	37365	0.365	2767
21	11.81	21398	0.209	1780
22	<b>12.51</b>	<b>145760</b>	<b>1.424</b>	<b>11108</b>
23	<b>13.24</b>	<b>589058</b>	<b>5.754</b>	<b>46671</b>
24	13.63	75675	0.739	5085
25	14.23	1261379	12.321	113227
26	<b>14.72</b>	<b>3330915</b>	<b>32.535</b>	<b>313955</b>
27	15.43	278311	2.718	24986
28	15.91	9416	0.092	1000
29	16.19	6923	0.068	842
30	16.48	139180	1.359	12079
31	17.15	86772	0.848	5549
32	17.45	268758	2.625	19960
33	17.72	28766	0.281	4098
34	17.97	237624	2.321	13686
35	18.92	146294	1.429	6468
		10238005	100	907869

Anexo 30: *Vanilla pompona* de prueba (blanco, extracción etanólica), 230 nm



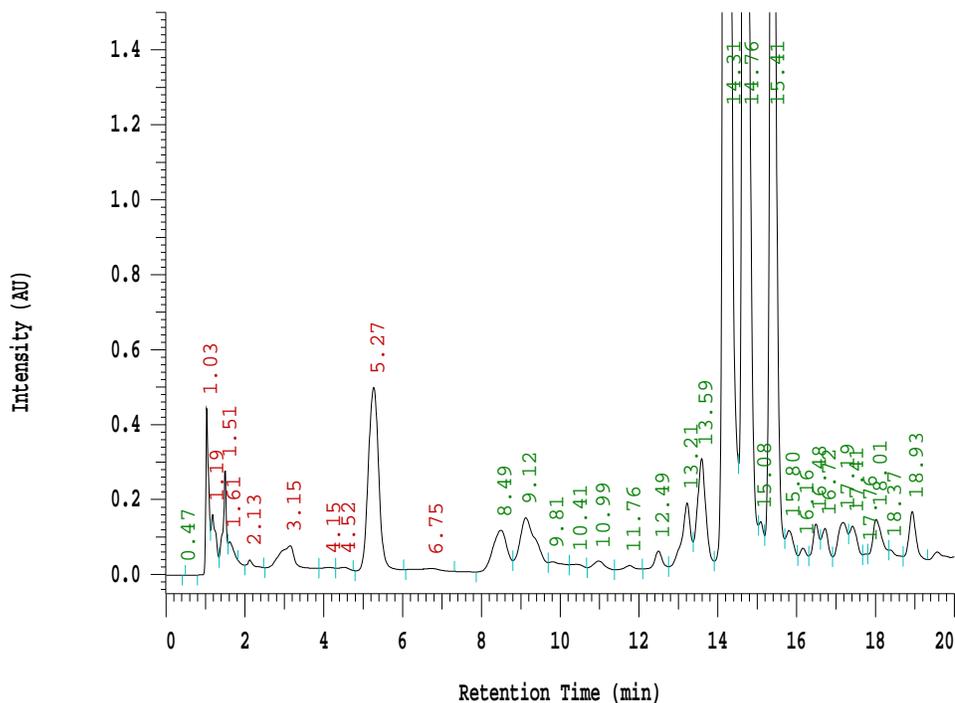
No.	RT	Area	Area %	Height
1	0.97	214052	0.29	46594
2	1.01	248736	0.337	49893
3	1.21	722595	0.98	78662
4	1.43	259939	0.353	40663
5	1.51	739013	1.002	188986
6	1.64	698592	0.948	51065
7	2.08	240131	0.326	16002
8	3.24	1292500	1.753	33367
9	4.29	79573	0.108	4144
10	4.71	76262	0.103	4090
11	5.37	<b>899180</b>	<b>1.22</b>	<b>49799</b>
12	6.31	24936	0.034	911
13	6.92	54493	0.074	1858
14	<b>8.6</b>	<b>1311476</b>	<b>1.779</b>	<b>53688</b>
15	9.21	3466410	4.702	88991
16	10.41	31590	0.043	1586
17	11.01	211984	0.288	10494
18	11.63	116167	0.158	7872
19	11.77	56750	0.077	5661
20	12.52	206387	0.28	17457
21	13.23	1028415	1.395	64637
22	13.61	1799182	2.44	116125
23	14.33	24397326	33.093	1370629
24	14.77	19720936	26.75	1369761
25	15.11	421880	0.572	58825
26	15.43	7857374	10.658	722222
27	15.81	119150	0.162	9201
28	16.48	3254359	4.414	299494
29	17.16	1730937	2.348	73577
30	17.43	83310	0.113	7975
31	17.99	2027133	2.75	169371
32	18.92	332227	0.451	22230
		73722995	100	5035830

Anexo 31: *Vanilla pompona* de prueba (extracción etanólica y extracción en medio acuoso: 150 µL Viscozima + 300 µL Celuclast, 8 horas), 254 nm



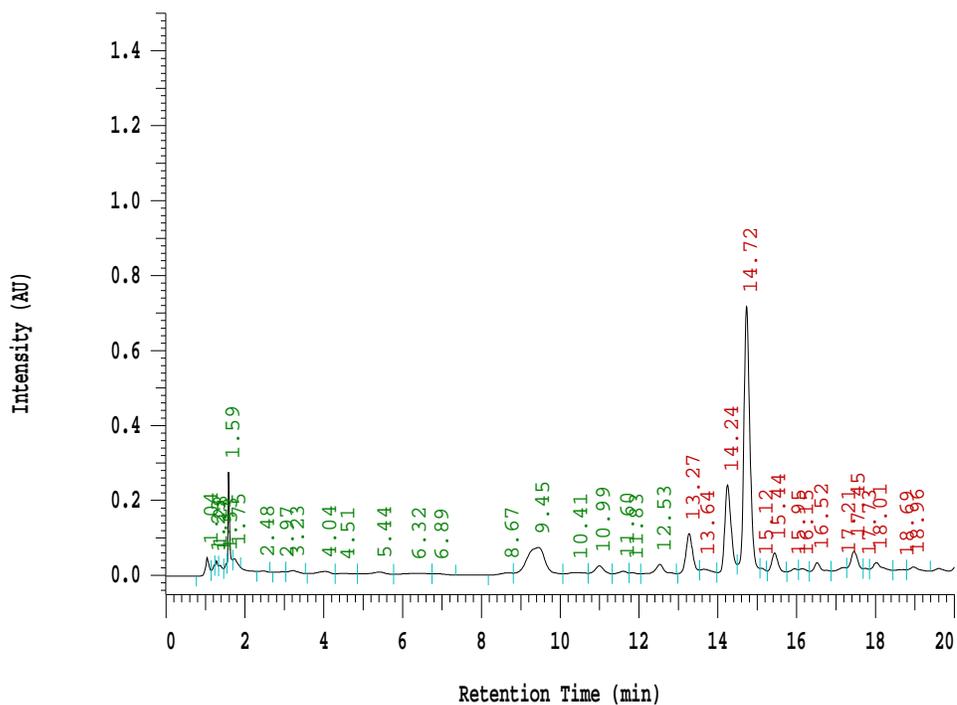
No.	RT	Area	Area %	Height
1	0.32	1080	0.009	100
2	1.03	682729	5.426	123202
3	1.2	21060	0.167	2392
4	1.51	1296556	10.304	154196
5	2.12	10160	0.081	1465
6	3.15	35610	0.283	1492
7	4.15	50100	0.398	1794
8	5.27	388213	3.085	12234
9	5.88	9970	0.079	468
10	6.81	21760	0.173	660
11	8.52	72039	0.572	3098
12	9.13	556502	4.422	16697
13	10.03	235204	1.869	5517
<b>14</b>	<b>10.92</b>	<b>280273</b>	<b>2.227</b>	<b>14837</b>
15	11.79	28526	0.227	1776
<b>16</b>	<b>12.48</b>	<b>191782</b>	<b>1.524</b>	<b>14050</b>
<b>17</b>	<b>13.23</b>	<b>782330</b>	<b>6.217</b>	<b>53253</b>
18	13.63	43570	0.346	2772
19	14.21	1123824	8.931	97185
<b>20</b>	<b>14.69</b>	<b>3675572</b>	<b>29.209</b>	<b>345869</b>
21	15.39	607377	4.827	47918
22	15.88	9520	0.076	1028
23	16.17	45729	0.363	3104
24	16.48	120543	0.958	6082
25	17.16	87352	0.694	5486
26	17.44	374085	2.973	27700
27	17.75	157703	1.253	14003
28	18.12	1508717	11.99	113979
29	18.95	165702	1.317	10025
		<b>12583588</b>	<b>100</b>	<b>1082382</b>

Anexo 32: *Vanilla pompona* de prueba (extracción etanólica y extracción en medio acuoso: 150 µL Viscozima + 300 µL Celuclast, 8 horas), 230 nm



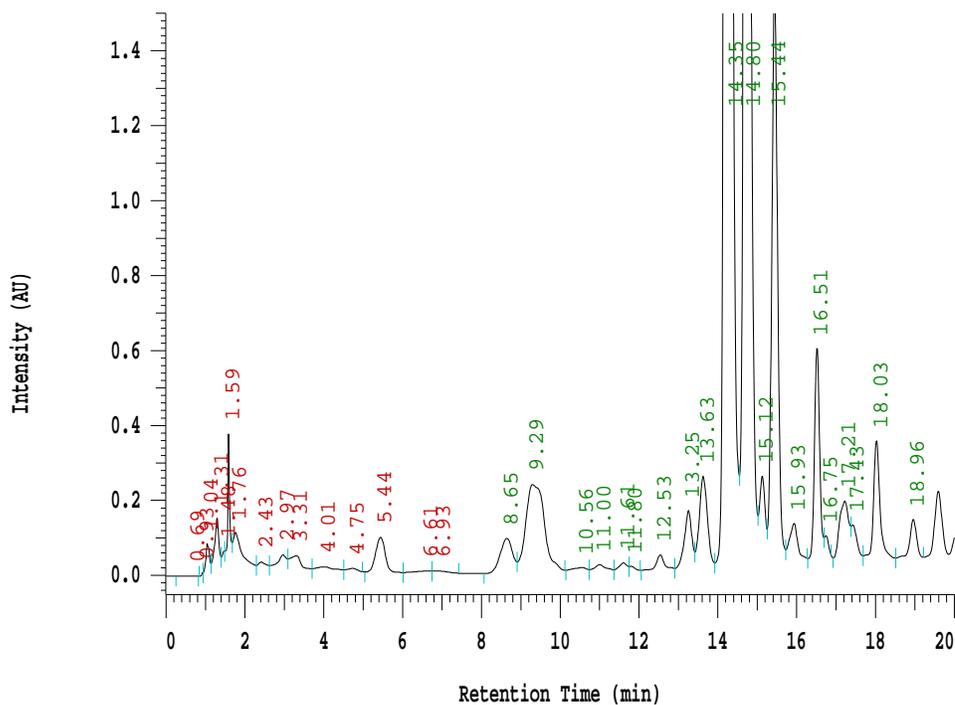
No.	RT	Area	Area %	Height
1	0.47	260	0.0003166	100
2	1.03	1095925	1.335	221772
3	1.19	714543	0.87	79622
4	1.51	872472	1.063	137449
5	1.61	504622	0.615	42857
6	2.13	324035	0.395	18072
7	3.15	1218231	1.484	35343
8	4.15	117942	0.144	5210
9	4.52	87130	0.106	4678
<b>10</b>	<b>5.27</b>	<b>4438100</b>	<b>5.405</b>	<b>243795</b>
11	6.75	82410	0.1	2709
<b>12</b>	<b>8.49</b>	<b>1388374</b>	<b>1.691</b>	<b>55161</b>
13	9.12	2508922	3.056	71222
14	9.81	27060	0.033	1897
15	10.41	44709	0.054	2562
16	10.99	252563	0.308	12167
17	11.76	74710	0.091	5134
18	12.49	295403	0.36	23212
19	13.21	1323288	1.612	86024
20	13.59	2206624	2.688	144807
21	14.31	23320244	28.402	1371144
22	14.76	20140916	24.53	1370365
23	15.08	57690	0.07	9472
24	15.41	16912371	20.598	1369242
25	15.8	195140	0.238	18225
26	16.16	76216	0.093	9992
27	16.48	394173	0.48	42749
28	16.72	403950	0.492	37385
29	17.19	699835	0.852	46114
30	17.41	541365	0.659	41414
31	17.76	36941	0.045	5039
32	18.01	827644	1.008	51409
33	18.37	143220	0.174	11280
34	18.93	779852	0.95	63359
		82106880	100	5640982

Anexo 33: *Vanilla pompona* de prueba (blanco, extracción Soxhlet 7 horas), 254 nm



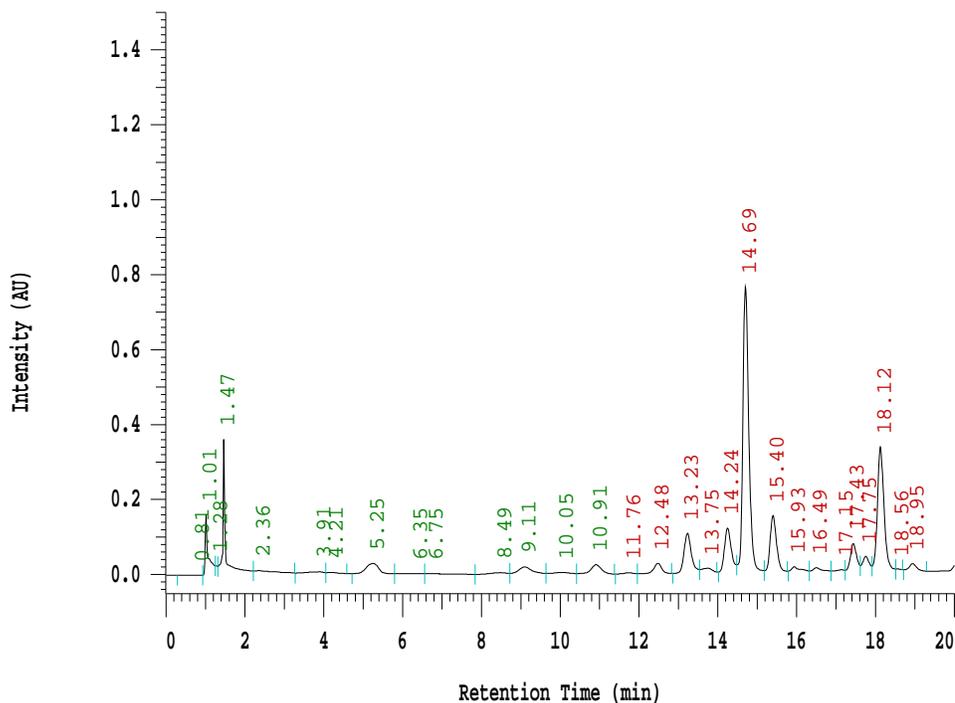
No.	RT	Area	Area %	Height
1	1.04	154031	1.383	24524
2	1.23	58716	0.527	14464
3	1.28	92798	0.833	20354
4	1.37	99134	0.89	14162
5	1.53	61776	0.555	16781
6	1.59	1544802	13.873	138821
7	1.75	26090	0.234	3876
8	2.48	12560	0.113	1268
9	2.97	12645	0.114	1259
10	3.23	48054	0.432	3246
11	4.04	52300	0.47	2824
12	4.51	9729	0.087	536
13	5.44	59744	0.537	2750
14	6.32	63465	0.57	1537
15	6.89	26120	0.235	1262
16	8.67	54097	0.486	2759
17	9.45	1148302	10.312	36304
18	10.41	70839	0.636	2482
19	<b>10.99</b>	<b>181834</b>	<b>1.633</b>	<b>11159</b>
20	11.6	53322	0.479	3822
21	11.83	18125	0.163	1684
22	<b>12.53</b>	<b>179937</b>	<b>1.616</b>	<b>12410</b>
23	<b>13.27</b>	<b>629640</b>	<b>5.654</b>	<b>53078</b>
24	13.64	90192	0.81	5257
25	14.24	1320599	11.859	117232
26	<b>14.72</b>	<b>3758349</b>	<b>33.751</b>	<b>354177</b>
27	15.12	41679	0.374	5310
28	15.44	273493	2.456	25582
29	15.95	39064	0.351	4174
30	16.15	47870	0.43	4123
31	16.52	131802	1.184	11903
32	17.21	73729	0.662	5352
33	17.45	343718	3.087	26766
34	17.73	36168	0.325	4120
35	18.01	195004	1.751	11749
36	18.69	38487	0.346	2226
37	18.96	87184	0.783	5733
		11135398	100	955066

Anexo 34: *Vanilla pompona* de prueba (blanco, extracción Soxhlet 7 horas), 230 nm



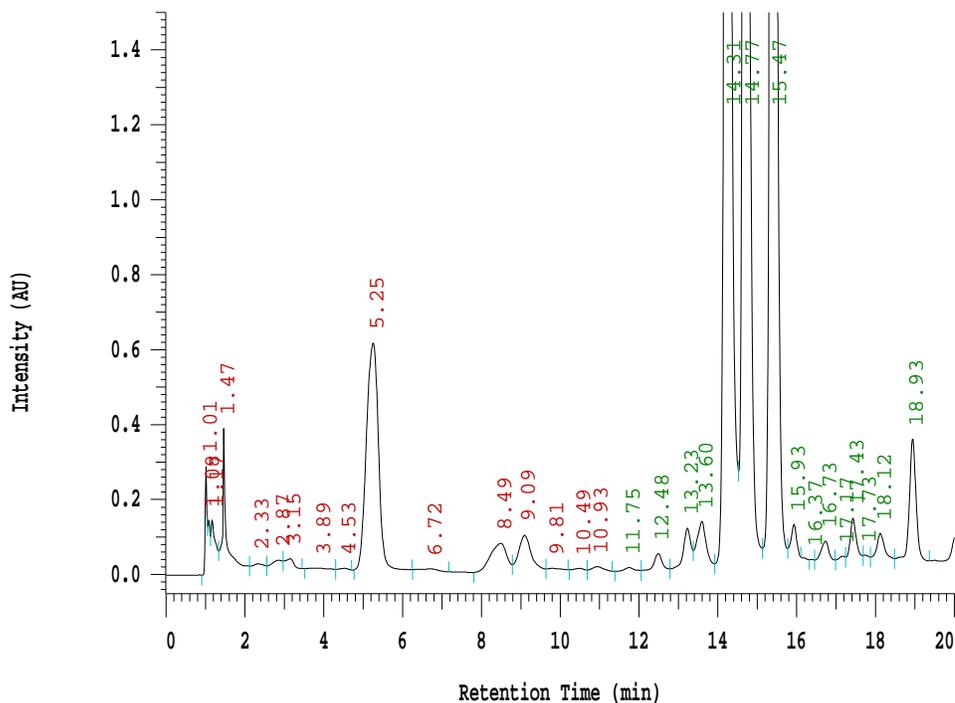
No.	RT	Area	Area %	Height
1	0.69	0	0	0
2	0.93	8573	0.011	4480
3	1.04	287414	0.377	42410
4	1.31	644778	0.847	76373
5	1.48	158964	0.209	32162
6	1.59	801819	1.053	188243
7	1.76	1085882	1.426	57007
8	2.43	279473	0.367	16552
9	2.97	489054	0.642	25409
10	3.31	549122	0.721	23706
11	4.01	287929	0.378	7897
12	4.75	95847	0.126	5001
<b>13</b>	<b>5.44</b>	<b>769691</b>	<b>1.011</b>	<b>46772</b>
14	6.61	59643	0.078	2346
15	6.93	65075	0.085	2514
<b>16</b>	<b>8.65</b>	<b>1001600</b>	<b>1.315</b>	<b>46234</b>
17	9.29	3887135	5.104	117410
18	10.56	135518	0.178	5352
19	11	173084	0.227	8521
20	11.61	143593	0.189	10451
21	11.8	52908	0.069	5522
22	12.53	246767	0.324	19453
23	13.25	997852	1.31	76609
24	13.63	1772686	2.328	121592
25	14.35	24581059	32.275	1372073
26	14.8	20979777	27.546	1370990
27	15.12	431960	0.567	61077
28	15.44	8488695	11.146	785611
29	15.93	453650	0.596	39475
30	16.51	2885827	3.789	284564
31	16.75	66720	0.088	9636
32	17.21	1324152	1.739	79801
33	17.43	513299	0.674	47392
34	18.03	1826373	2.398	158134
35	18.96	615419	0.808	51355
		76161338	100	5202124

Anexo 35: *Vanilla pompona* de prueba (extracción Soxhlet 7 horas y extracción en medio acuoso: 150 µL Viscozima + 300 µL Celuclast, 8 horas), 254 nm



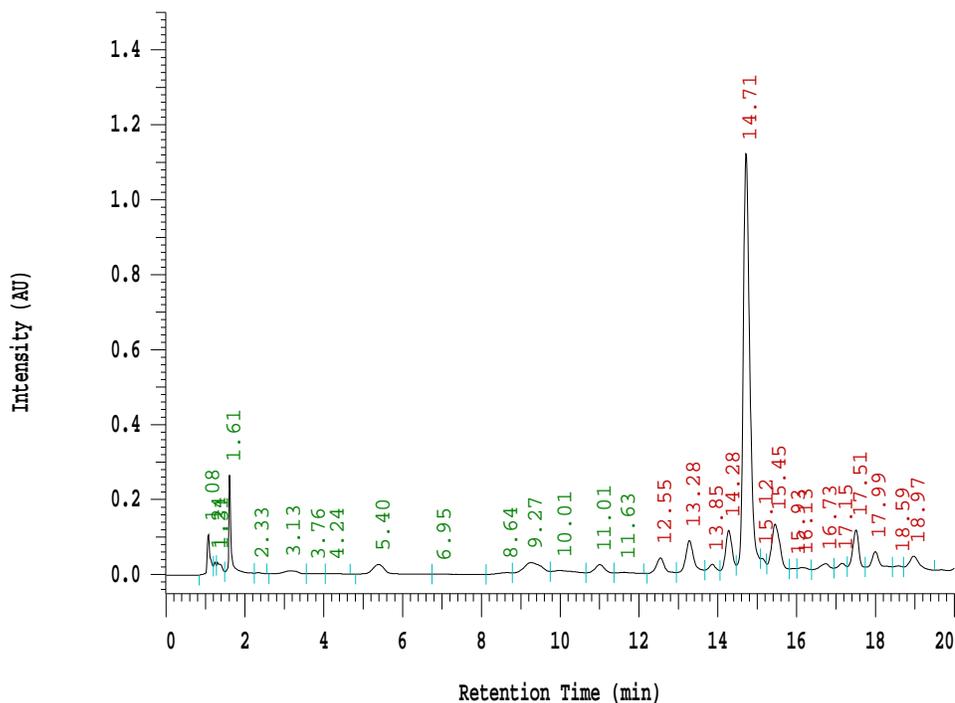
No.	RT	Area	Area %	Height
1	0.81	2580	0.021	129
2	1.01	468433	3.771	81188
3	1.28	1610	0.013	590
4	1.47	1349061	10.861	181244
5	2.36	23760	0.191	987
6	3.91	50164	0.404	1961
7	4.21	23275	0.187	1439
8	5.25	457722	3.685	15048
9	6.35	12764	0.103	516
10	6.75	19935	0.16	567
11	8.49	61440	0.495	2209
12	9.11	246345	1.983	9842
13	10.05	71226	0.573	2324
<b>14</b>	<b>10.91</b>	<b>234851</b>	<b>1.891</b>	<b>12420</b>
15	11.76	20414	0.164	1460
<b>16</b>	<b>12.48</b>	<b>181365</b>	<b>1.46</b>	<b>13556</b>
<b>17</b>	<b>13.23</b>	<b>684015</b>	<b>5.507</b>	<b>53122</b>
18	13.75	112580	0.906	6130
19	14.24	717589	5.777	59013
<b>20</b>	<b>14.69</b>	<b>3943254</b>	<b>31.745</b>	<b>380159</b>
21	15.4	827788	6.664	74415
22	15.93	76565	0.616	5831
23	16.49	60191	0.485	4680
24	17.15	22704	0.183	1833
25	17.43	405420	3.264	36720
26	17.75	229345	1.846	19733
27	18.12	1947486	15.678	165299
28	18.56	27728	0.223	2893
29	18.95	141998	1.143	10110
		12421608	100	1145418

Anexo 36: *Vanilla pompona* de prueba (extracción Soxhlet 7 horas y extracción en medio acuoso: 150 µL Viscozima + 300 µL Celuclast, 8 horas), 230 nm



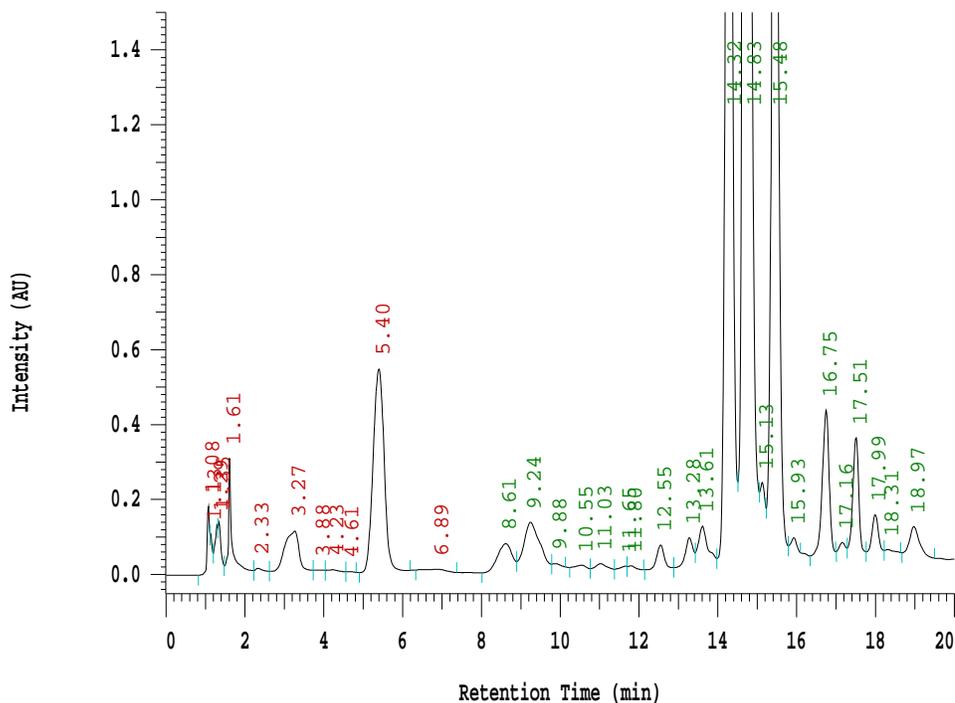
No.	RT	Area	Area %	Height
1	1.01	375562	0.462	144562
2	1.08	270110	0.332	72144
3	1.17	601908	0.74	71955
4	1.47	1484778	1.826	194537
5	2.33	288762	0.355	12284
6	2.87	335029	0.412	16119
7	3.15	336129	0.413	17600
8	3.89	158562	0.195	3984
9	4.53	42663	0.052	2605
<b>10</b>	<b>5.25</b>	<b>6377460</b>	<b>7.843</b>	<b>302252</b>
11	6.72	59120	0.073	2346
<b>12</b>	<b>8.49</b>	<b>1102858</b>	<b>1.356</b>	<b>38363</b>
13	9.09	1134544	1.395	48907
14	9.81	126709	0.156	4755
15	10.49	88375	0.109	4368
16	10.93	134150	0.165	6399
17	11.75	69430	0.085	4681
18	12.48	291941	0.359	21971
19	13.23	716872	0.882	54311
20	13.6	1074297	1.321	62719
21	14.31	20427785	25.121	1374831
22	14.77	20214273	24.859	1373997
23	15.47	21240260	26.12	1372758
24	15.93	333570	0.41	37503
25	16.37	2480	0.003	515
26	16.73	490960	0.604	30744
27	17.17	123551	0.152	9708
28	17.43	730186	0.898	59880
29	17.73	106599	0.131	10432
30	18.12	614246	0.755	38866
31	18.93	1963900	2.415	162762
		81317069	100	5558858

Anexo 37: *Vanilla pompona* madura (blanco, extracción en medio acuoso: sin enzimas),  
254 nm



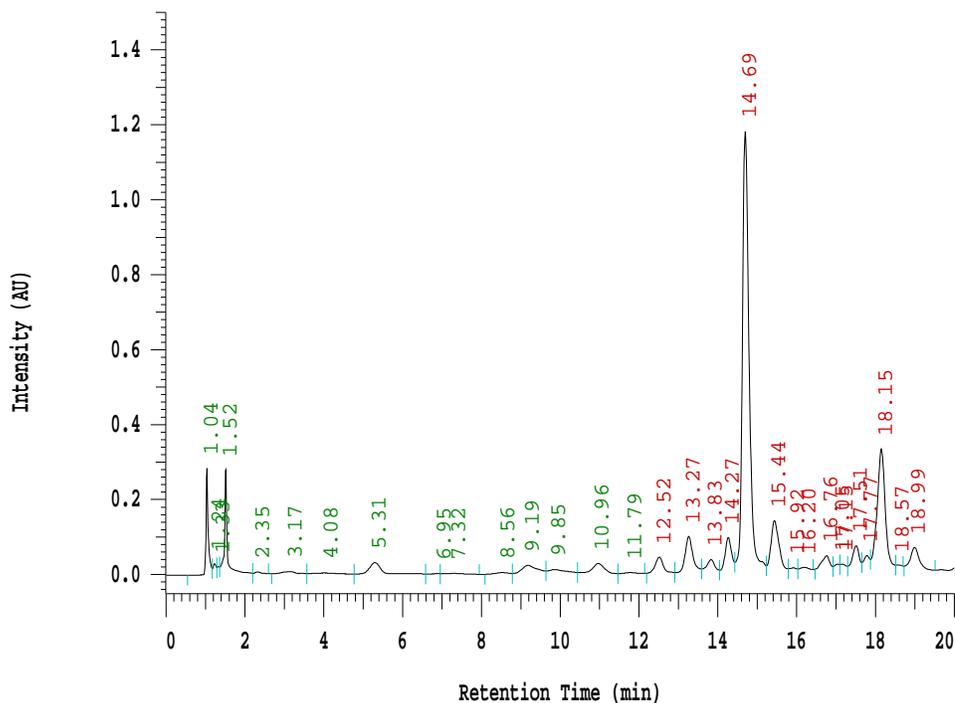
No.	RT	Area	Area %	Height
1	1.08	303759	2.222	53793
2	1.24	69902	0.511	17046
3	1.31	155802	1.14	17112
4	1.61	875203	6.402	133196
5	2.33	7440	0.054	953
6	3.13	89272	0.653	3838
7	3.76	6489	0.047	401
8	4.24	6878	0.05	381
9	5.4	381621	2.792	13614
10	6.95	6610	0.048	197
11	8.64	50586	0.37	2281
12	9.27	500194	3.659	15527
13	10.01	175965	1.287	4559
<b>14</b>	<b>11.01</b>	<b>227921</b>	<b>1.667</b>	<b>12059</b>
15	11.63	41391	0.303	1760
<b>16</b>	<b>12.55</b>	<b>276275</b>	<b>2.021</b>	<b>20225</b>
<b>17</b>	<b>13.28</b>	<b>583609</b>	<b>4.269</b>	<b>42401</b>
18	13.85	128745	0.942	10048
19	14.28	624348	4.567	54625
<b>20</b>	<b>14.71</b>	<b>6394883</b>	<b>46.781</b>	<b>556527</b>
21	15.12	127838	0.935	16395
22	15.45	911704	6.669	61711
23	15.93	20624	0.151	2048
24	16.13	43286	0.317	3028
25	16.73	130524	0.955	8053
26	17.15	110929	0.811	8473
27	17.51	595212	4.354	52901
28	17.99	395040	2.89	24290
29	18.59	84129	0.615	5713
30	18.97	343564	2.513	18675
		13669743	100	1161830

Anexo 38: *Vanilla pompona* madura (blanco, extracción en medio acuoso: sin enzimas),  
230 nm



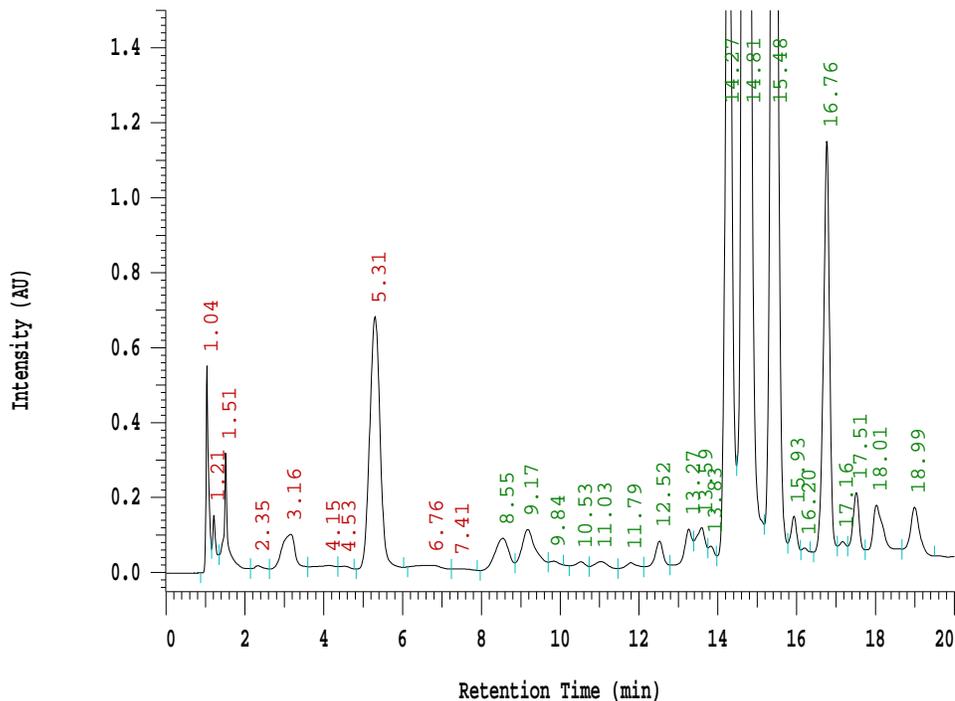
No.	RT	Area	Area %	Height
1	1.08	372860	0.442	91137
2	1.13	213880	0.253	55237
3	1.29	340755	0.404	66612
4	1.35	389980	0.462	70062
5	1.61	1039560	1.232	155212
6	2.33	128500	0.152	7637
7	3.27	1506185	1.785	56237
8	3.88	69055	0.082	3887
9	4.23	86665	0.103	3837
10	4.61	13100	0.016	1200
<b>11</b>	<b>5.4</b>	<b>5218760</b>	<b>6.185</b>	<b>270322</b>
12	6.89	82560	0.098	2775
<b>13</b>	<b>8.61</b>	<b>985732</b>	<b>1.168</b>	<b>38319</b>
14	9.24	2273048	2.694	66487
15	9.88	19260	0.023	1582
16	10.55	61410	0.073	3955
17	11.03	199999	0.237	9333
18	11.65	67422	0.08	5301
19	11.8	78946	0.094	5759
20	12.55	431542	0.511	32545
21	13.28	559918	0.664	40478
22	13.61	994320	1.178	55090
23	14.32	18519088	21.948	1372805
24	14.83	25948252	30.753	1371723
25	15.13	130520	0.155	23112
26	15.48	17524016	20.769	1370326
27	15.93	135520	0.161	15132
28	16.75	2703332	3.204	202844
29	17.16	349549	0.414	25561
30	17.51	1916971	2.272	164695
31	17.99	1146685	1.359	61070
32	18.31	22700	0.027	1803
33	18.97	847011	1.004	43261
		<b>84377101</b>	<b>100</b>	<b>5695336</b>

Anexo 39: *Vanilla pompona* madura (extracción en medio acuoso: 150  $\mu$ L Viscozima + 300  $\mu$ L Celuclast, 8 horas), 254 nm



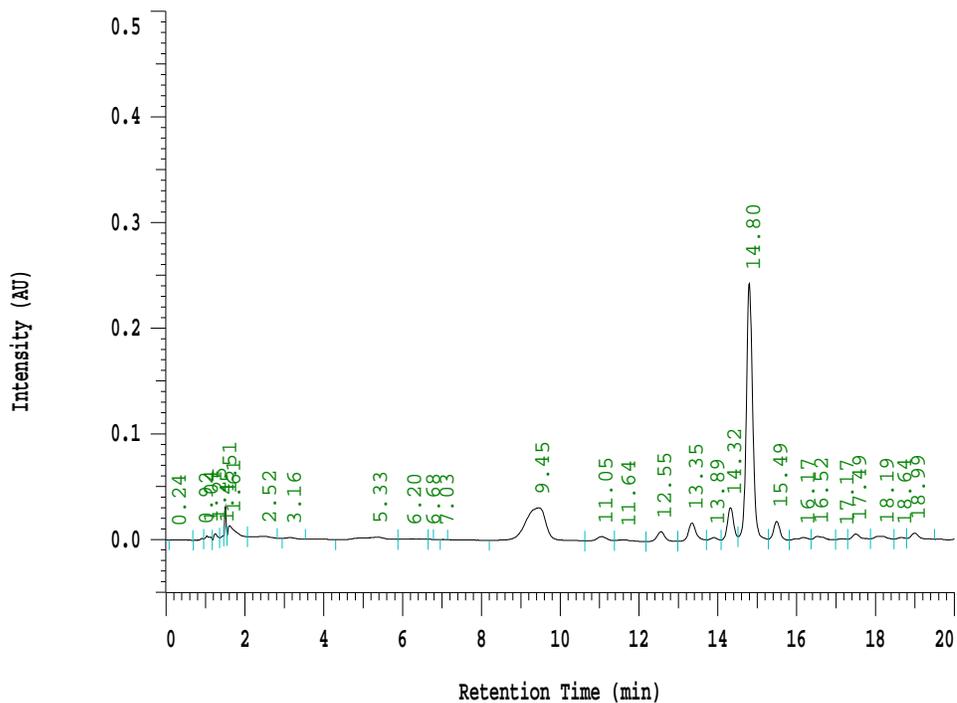
No.	RT	Area	Area %	Height
1	1.04	549564	3.338	142300
2	1.24	88595	0.538	14970
3	1.33	42969	0.261	11406
4	1.52	962600	5.846	140778
5	2.35	13100	0.08	1563
6	3.17	63130	0.383	2654
7	4.08	44149	0.268	1192
8	5.31	414150	2.515	15958
9	6.95	4077	0.025	357
10	7.32	30262	0.184	994
11	8.56	50671	0.308	2179
12	9.19	324210	1.969	11584
13	9.85	186835	1.135	5702
<b>14</b>	<b>10.96</b>	<b>297242</b>	<b>1.805</b>	<b>13732</b>
15	11.79	19260	0.117	1259
<b>16</b>	<b>12.52</b>	<b>283726</b>	<b>1.723</b>	<b>21034</b>
<b>17</b>	<b>13.27</b>	<b>638530</b>	<b>3.878</b>	<b>47960</b>
18	13.83	228982	1.391	16179
19	14.27	511351	3.106	45414
<b>20</b>	<b>14.69</b>	<b>6864653</b>	<b>41.692</b>	<b>585864</b>
21	15.44	922257	5.601	66315
22	15.92	31164	0.189	2828
23	16.2	41652	0.253	3150
24	16.76	248812	1.511	18260
25	17.05	61264	0.372	6971
26	17.15	72858	0.442	6907
27	17.51	377945	2.295	31643
28	17.77	191702	1.164	18819
29	18.15	2344625	14.24	160835
30	18.57	71058	0.432	6721
31	18.99	483836	2.939	30203
		16465229	100	1435731

Anexo 40: *Vanilla pompona* madura (extracción en medio acuoso: 150  $\mu$ L Viscozima + 300  $\mu$ L Celuclast, 8 horas), 230 nm



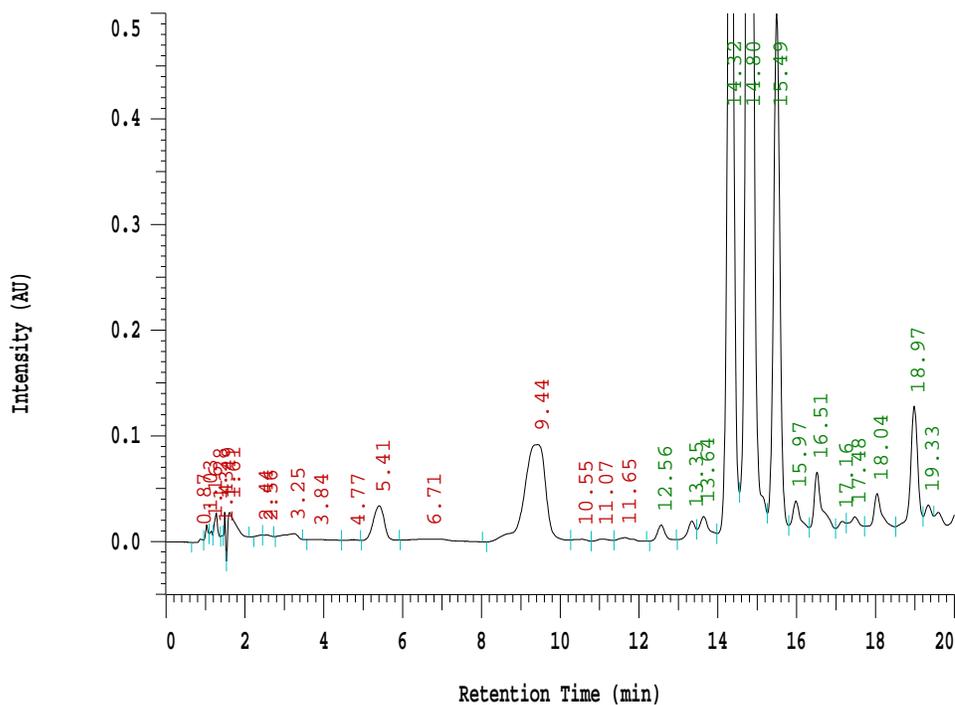
No.	RT	Area	Area %	Height
1	1.04	1239118	1.431	276107
2	1.21	481167	0.555	76896
3	1.51	1211129	1.398	159247
4	2.35	147710	0.171	7778
5	3.16	1204870	1.391	48496
6	4.15	217466	0.251	5553
7	4.53	71797	0.083	4051
<b>8</b>	<b>5.31</b>	<b>6107540</b>	<b>7.051</b>	<b>335220</b>
9	6.76	135012	0.156	3930
10	7.41	22107	0.026	681
<b>11</b>	<b>8.55</b>	<b>1040589</b>	<b>1.201</b>	<b>42498</b>
12	9.17	1610989	1.86	53757
13	9.84	33350	0.039	2731
14	10.53	196204	0.227	9519
15	11.03	217067	0.251	9477
16	11.79	116897	0.135	6957
17	12.52	471001	0.544	34377
18	13.27	650078	0.75	48519
19	13.59	1068999	1.234	50101
20	13.83	46900	0.054	6337
21	14.27	13181489	15.217	1208707
22	14.81	26038616	30.06	1371391
23	15.48	20281854	23.415	1370000
24	15.93	354640	0.409	40400
25	16.2	24570	0.028	3444
26	16.76	6580671	7.597	558704
27	17.16	44040	0.051	5775
28	17.51	1119380	1.292	88396
29	18.01	1550599	1.79	70888
30	18.99	1155042	1.333	66132
		86620891	100	5966069

Anexo 41: *Vanilla pompona* madura (blanco, extracción Soxhlet 24 horas), 254 nm



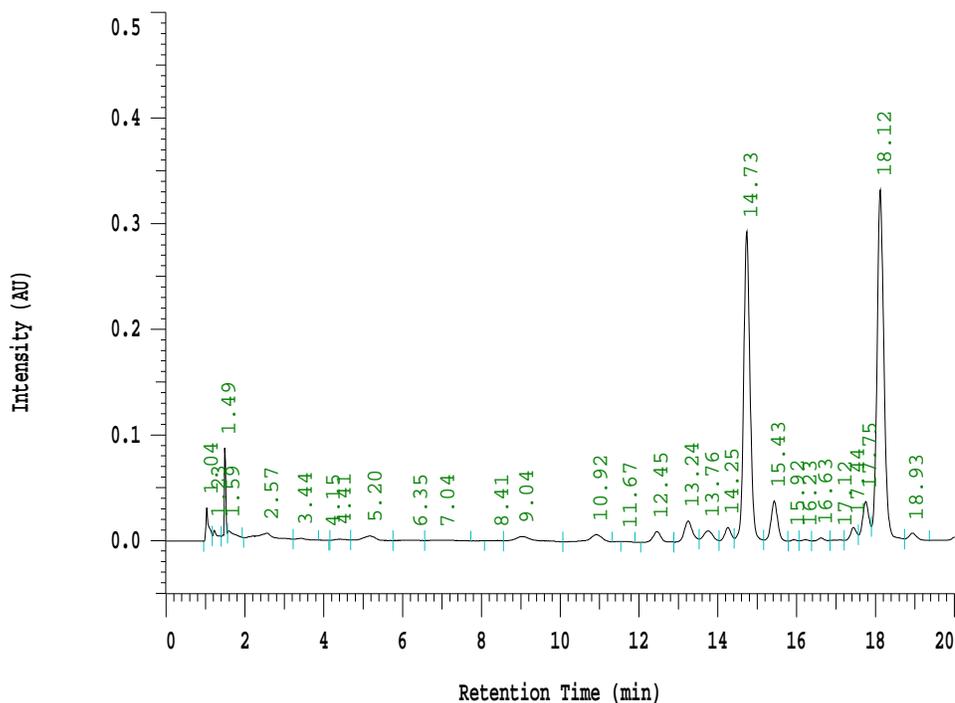
No.	RT	Area	Area %	Height
1	0.24	3140	0.102	151
2	0.92	4326	0.141	813
3	1.04	17145	0.559	2031
4	1.25	20597	0.672	3020
5	1.45	9894	0.323	2059
6	1.51	41251	1.345	15731
7	1.61	206523	6.736	6876
8	2.52	12850	0.419	597
9	3.16	7560	0.247	538
10	5.33	54385	1.774	1227
11	6.2	12066	0.394	356
12	6.68	888	0.029	180
13	7.03	560	0.018	87
14	9.45	567570	18.511	15632
15	<b>11.05</b>	<b>41445</b>	<b>1.352</b>	<b>2209</b>
16	11.64	17963	0.586	782
17	<b>12.55</b>	<b>63265</b>	<b>2.063</b>	<b>4670</b>
18	<b>13.35</b>	<b>117956</b>	<b>3.847</b>	<b>8552</b>
19	13.89	22881	0.746	1672
20	14.32	174569	5.694	15684
21	<b>14.8</b>	<b>1360645</b>	<b>44.377</b>	<b>121689</b>
22	15.49	105747	3.449	9012
23	16.17	26129	0.852	1337
24	16.52	33391	1.089	1761
25	17.17	8439	0.275	665
26	17.49	42625	1.39	2768
27	18.19	36733	1.198	1642
28	18.64	12583	0.41	950
29	18.99	42980	1.402	2999
		<b>3066106</b>	<b>100</b>	<b>225690</b>

Anexo 42: *Vanilla pompona* madura (blanco, extracción Soxhlet 24 horas), 230 nm



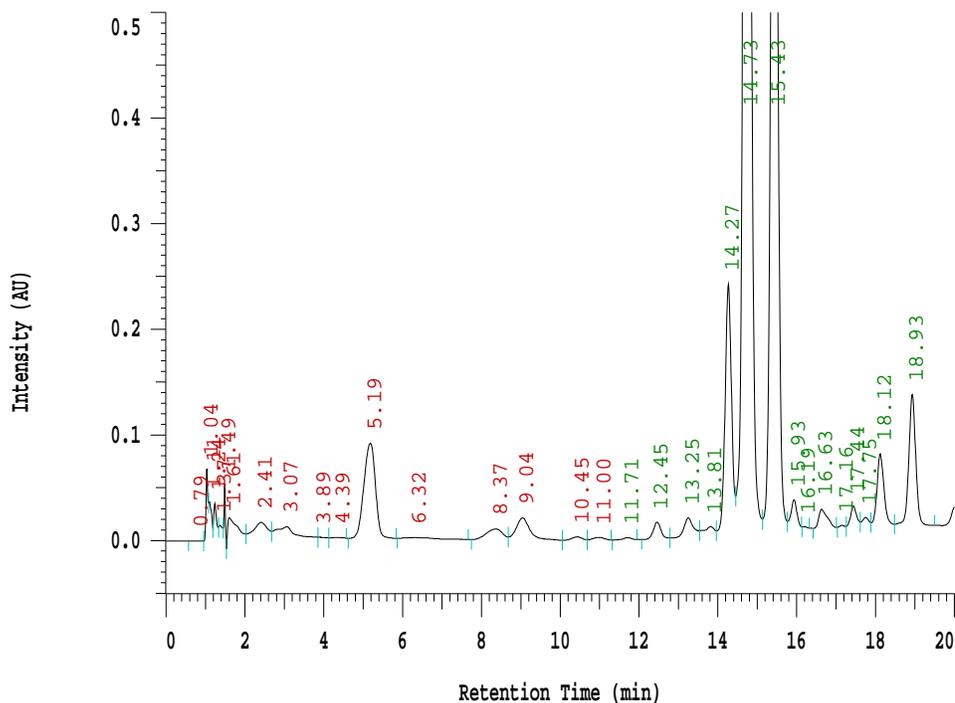
No.	RT	Area	Area %	Height
1	0.87	8370	0.039	1454
2	1.03	36114	0.169	8169
3	1.16	24650	0.115	5115
4	1.28	86963	0.407	13664
5	1.43	11497	0.054	3058
6	1.49	18088	0.085	14168
7	1.61	208686	0.976	13992
8	2.44	37722	0.176	3089
9	2.56	47756	0.223	3188
10	3.25	111623	0.522	3513
11	3.84	24378	0.114	661
12	4.77	5253	0.025	359
<b>13</b>	<b>5.41</b>	<b>308100</b>	<b>1.442</b>	<b>16305</b>
14	6.71	46740	0.219	778
15	9.44	1747394	8.176	45953
16	10.55	25593	0.12	1096
17	11.07	24854	0.116	1183
18	11.65	42457	0.199	1764
19	12.56	94780	0.443	7348
20	13.35	103638	0.485	8356
21	13.64	166266	0.778	10228
22	14.32	4544866	21.264	418141
23	14.8	9200347	43.046	828453
24	15.49	2878513	13.468	246126
25	15.97	134740	0.63	11891
26	16.51	395705	1.851	27866
27	17.16	43659	0.204	3984
28	17.48	94920	0.444	5775
29	18.04	215202	1.007	16148
30	18.97	630908	2.952	54489
31	19.33	53461	0.25	5924
		21373243	100	1782238

Anexo 43: *Vanilla pompona* madura (extracción Soxhlet 24 horas y extracción en medio acuoso: 150 µL Viscozima + 300 µL Celuclast, 8 horas), 254 nm



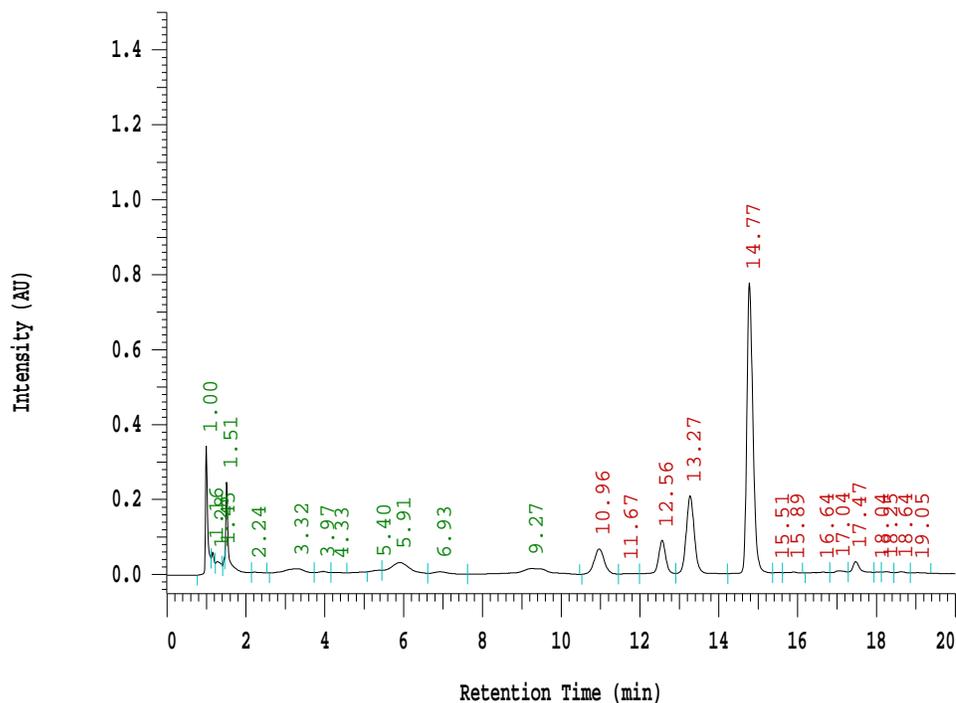
No.	RT	Area	Area %	Height
1	1.04	82424	1.519	15798
2	1.23	43985	0.811	5218
3	1.49	356770	6.574	44136
4	1.59	11640	0.214	1221
5	2.57	62203	1.146	2539
6	3.44	8556	0.158	640
7	4.15	81	0.002	101
8	4.41	10523	0.194	571
9	5.2	47799	0.881	2106
10	6.35	6571	0.121	219
11	7.04	11905	0.219	322
12	8.41	3059	0.056	208
13	9.04	63900	1.177	2241
<b>14</b>	<b>10.92</b>	<b>72480</b>	<b>1.336</b>	<b>3425</b>
15	11.67	2000	0.037	161
<b>16</b>	<b>12.45</b>	<b>67514</b>	<b>1.244</b>	<b>5053</b>
<b>17</b>	<b>13.24</b>	<b>143179</b>	<b>2.638</b>	<b>9965</b>
18	13.76	89001	1.64	5131
19	14.25	77919	1.436	6750
<b>20</b>	<b>14.73</b>	<b>1638671</b>	<b>30.196</b>	<b>146671</b>
21	15.43	224867	4.144	19068
22	15.92	7443	0.137	787
23	16.23	8809	0.162	753
24	16.63	18088	0.333	1483
25	17.12	9836	0.181	552
26	17.44	67980	1.253	6416
27	17.75	213721	3.938	18607
28	18.12	2038543	37.564	166015
29	18.93	37350	0.688	3031
		5426817	100	469188

Anexo 44: *Vanilla pompona* madura (extracción Soxhlet 24 horas y extracción en medio acuoso: 150 µL Viscozima + 300 µL Celuclast, 8 horas), 230 nm



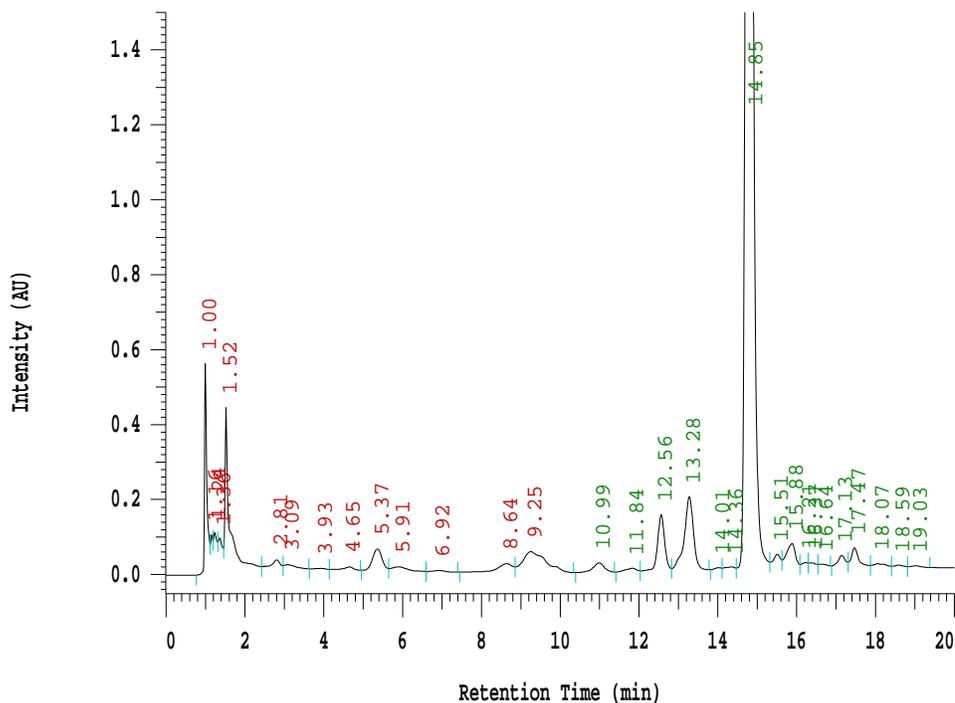
No.	RT	Area	Area %	Height
1	0.79	0	0	0
2	1.04	105234	0.456	33876
3	1.11	97957	0.424	18280
4	1.24	96333	0.417	17337
5	1.37	46698	0.202	7145
6	1.49	52432	0.227	26731
7	1.61	178095	0.771	10593
8	2.41	211878	0.918	8213
9	3.07	206381	0.894	5880
10	3.89	8845	0.038	741
11	4.39	8211	0.036	459
12	5.19	911120	3.946	44896
13	6.32	19710	0.085	482
14	8.37	146445	0.634	5095
15	9.04	255974	1.109	10471
16	10.45	26712	0.116	1559
17	11	24697	0.107	1279
18	11.71	15410	0.067	1005
19	12.45	103497	0.448	7950
20	13.25	155686	0.674	9250
21	13.81	87875	0.381	4593
22	14.27	1379480	5.975	118858
23	14.73	10906682	47.241	988160
24	15.43	6287933	27.235	549107
25	15.93	107110	0.464	11491
26	16.19	2220	0.01	300
27	16.63	178783	0.774	10221
28	17.16	23921	0.104	2088
29	17.44	129992	0.563	11034
30	17.75	66886	0.29	5356
31	18.12	456973	1.979	35043
32	18.93	788194	3.414	62457
		23087364	100	2009950

Anexo 45: *Vanilla planifolia* curada de marzo del 2006 (blanco, extracción en medio acuoso: sin enzimas), 254 nm



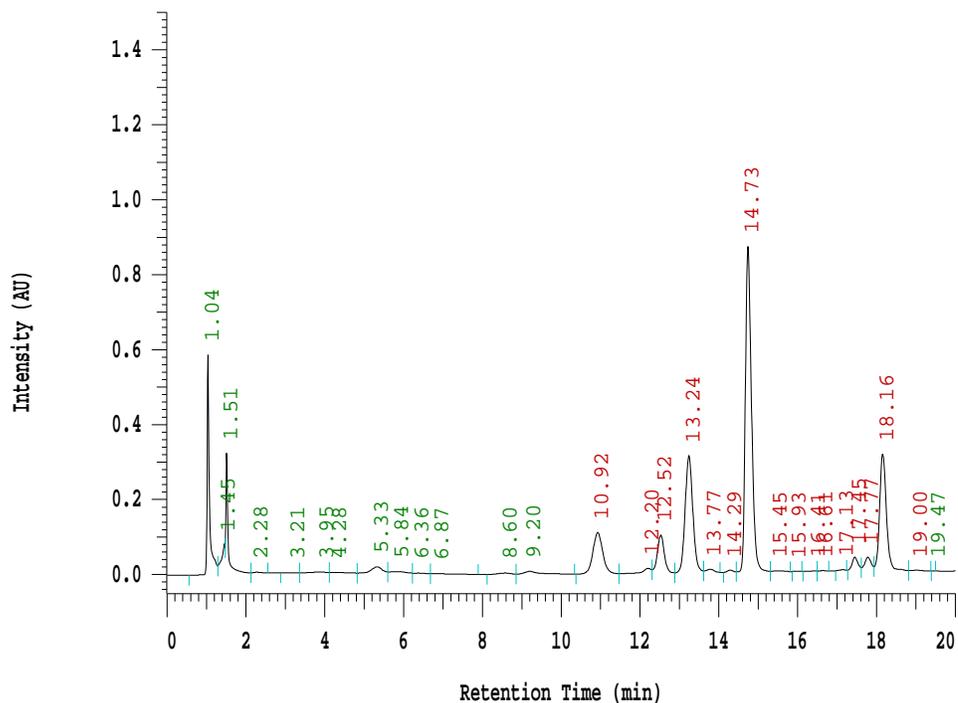
No.	RT	Area	Area %	Height
1	1	929192	8.577	172473
2	1.16	30060	0.277	10660
3	1.28	24270	0.224	3305
4	1.45	56346	0.52	22944
5	1.51	764815	7.059	124188
6	2.24	6480	0.06	532
7	3.32	366612	3.384	8273
8	3.97	96882	0.894	4620
9	4.33	72867	0.673	3202
10	5.4	118838	1.097	6051
11	5.91	594827	5.49	16316
12	6.93	123400	1.139	3819
13	9.27	449646	4.15	7842
<b>14</b>	<b>10.96</b>	<b>600291</b>	<b>5.541</b>	<b>33693</b>
15	11.67	12002	0.111	570
<b>16</b>	<b>12.56</b>	<b>559603</b>	<b>5.165</b>	<b>44853</b>
<b>17</b>	<b>13.27</b>	<b>1477341</b>	<b>13.636</b>	<b>103805</b>
<b>18</b>	<b>14.77</b>	<b>4155898</b>	<b>38.36</b>	<b>387794</b>
19	15.51	13967	0.129	1184
20	15.89	22834	0.211	1196
21	16.64	21678	0.2	1206
22	17.04	53442	0.493	3107
23	17.47	198467	1.832	15360
24	18.04	14106	0.13	1382
25	18.25	28125	0.26	2109
26	18.64	27557	0.254	1832
27	19.05	14401	0.133	834
		10833947	100	983150

Anexo 46: *Vanilla planifolia* curada de marzo del 2006 (blanco, extracción en medio acuoso: sin enzimas), 230 nm



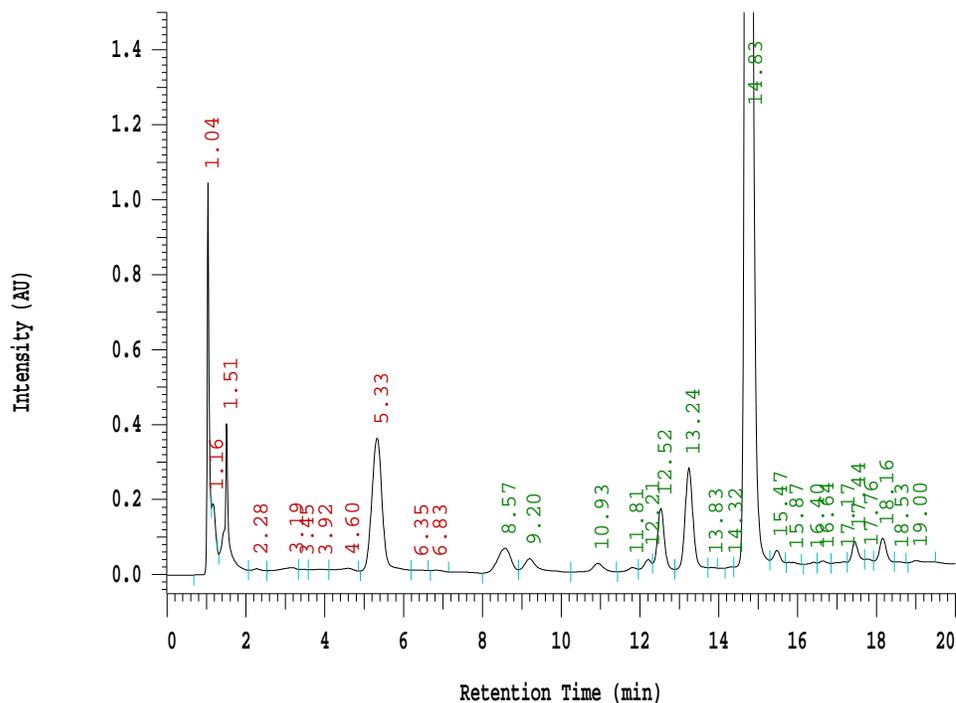
No.	RT	Area	Area %	Height
1	1	1123821	3.36	281841
2	1.16	186637	0.558	52939
3	1.24	394230	1.179	55812
4	1.36	372336	1.113	48323
5	1.52	2022421	6.047	222370
6	2.81	379179	1.134	17275
7	3.09	288936	0.864	10333
8	3.93	113970	0.341	4205
9	4.65	124483	0.372	4867
<b>10</b>	<b>5.37</b>	<b>489943</b>	<b>1.465</b>	<b>28827</b>
11	5.91	150995	0.451	5604
12	6.92	34131	0.102	1803
<b>13</b>	<b>8.64</b>	<b>306798</b>	<b>0.917</b>	<b>11466</b>
14	9.25	1141481	3.413	27853
15	10.99	241680	0.723	12189
16	11.84	91075	0.272	4929
17	12.56	962969	2.879	75438
18	13.28	1660849	4.966	98921
19	14.01	50920	0.152	3970
20	14.36	86556	0.259	4734
21	14.85	22018672	65.834	1378813
22	15.51	104915	0.314	11205
23	15.88	378954	1.133	27115
24	16.21	21222	0.063	2661
25	16.37	31383	0.094	2689
26	16.64	24113	0.072	1912
27	17.13	175159	0.524	14213
28	17.47	308318	0.922	24619
29	18.07	83759	0.25	3774
30	18.59	40826	0.122	2487
31	19.03	34856	0.104	2083
		33445587	100	2445270

Anexo 47: *Vanilla planifolia* curada de marzo del 2006 (extracción en medio acuoso: 150  $\mu$ L Viscozima + 300  $\mu$ L Celuclast, 8 horas), 254 nm



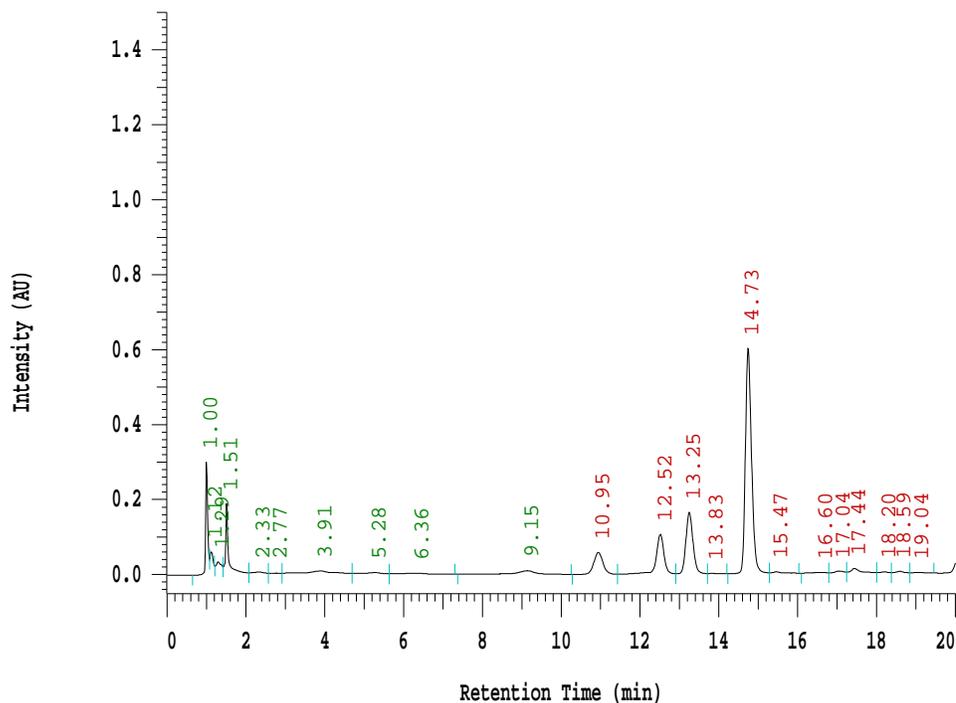
No.	RT	Area	Area %	Height
1	1.04	1229409	8.643	293639
2	1.45	263894	1.855	41212
3	1.51	1227096	8.627	162881
4	2.28	9740	0.068	919
5	3.21	8830	0.062	498
6	3.95	49371	0.347	1618
7	4.28	44929	0.316	1341
8	5.33	188972	1.329	8980
9	5.84	88407	0.622	3017
10	6.36	26826	0.189	1259
11	6.87	21962	0.154	771
12	8.6	40702	0.286	1783
13	9.2	108677	0.764	3842
<b>14</b>	<b>10.92</b>	<b>949751</b>	<b>6.677</b>	<b>54986</b>
15	12.2	84860	0.597	6516
<b>16</b>	<b>12.52</b>	<b>618940</b>	<b>4.351</b>	<b>50393</b>
<b>17</b>	<b>13.24</b>	<b>2120384</b>	<b>14.907</b>	<b>155846</b>
18	13.77	60809	0.428	4390
19	14.29	26304	0.185	2793
<b>20</b>	<b>14.73</b>	<b>4654665</b>	<b>32.723</b>	<b>434170</b>
21	15.45	22077	0.155	1223
22	15.93	2364	0.017	335
23	16.41	5465	0.038	471
24	16.61	11763	0.083	1009
25	17.13	24952	0.175	2013
26	17.45	201245	1.415	18504
27	17.77	219572	1.544	18595
28	18.16	1894350	13.318	156024
29	19	17717	0.125	1119
30	19.47	200	0.001	75
		14224233	100	1430222

Anexo 48: *Vanilla planifolia* curada de marzo del 2006 (extracción en medio acuoso: 150  $\mu$ L Viscozima + 300  $\mu$ L Celuclast, 8 horas), 230 nm



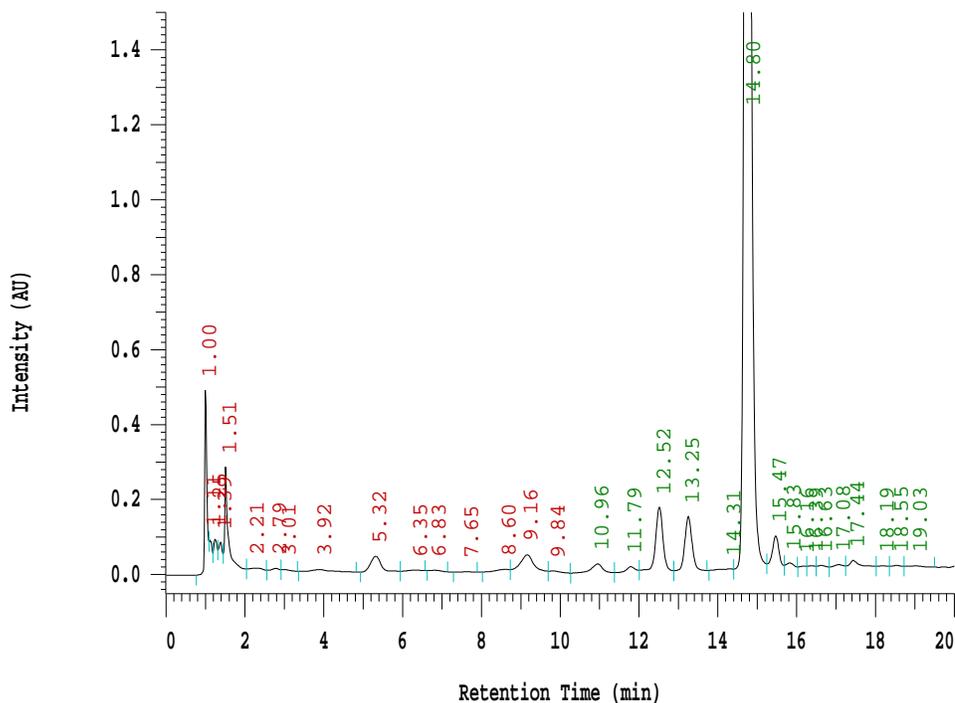
No.	RT	Area	Area %	Height
1	1.04	1889031	5.245	522602
2	1.16	664339	1.844	94420
3	1.51	1518343	4.215	201040
4	2.28	137192	0.381	6426
5	3.19	234524	0.651	6736
6	3.45	60124	0.167	4261
7	3.92	100744	0.28	3449
8	4.6	116721	0.324	3982
9	5.33	<b>3225136</b>	<b>8.954</b>	<b>176801</b>
10	6.35	14743	0.041	839
11	6.83	15820	0.044	928
12	8.57	<b>777763</b>	<b>2.159</b>	<b>32938</b>
13	9.2	449851	1.249	18447
14	10.93	218164	0.606	11554
15	11.81	68554	0.19	5053
16	12.21	193476	0.537	14959
17	12.52	1030767	2.862	82791
18	13.24	1909869	5.302	135233
19	13.83	3260	0.009	438
20	14.32	18008	0.05	1971
21	14.83	22009216	61.104	1374406
22	15.47	145750	0.405	14525
23	15.87	16290	0.045	1254
24	16.4	68027	0.189	4550
25	16.64	89129	0.247	6089
26	17.17	78037	0.217	3906
27	17.44	378696	1.051	30677
28	17.76	80896	0.225	6863
29	18.16	441675	1.226	33869
30	18.53	23349	0.065	1869
31	19	41696	0.116	2768
		36019190	100	2805644

Anexo 49: *Vanilla planifolia* curada de setiembre del 2007 (blanco, extracción en medio acuoso: sin enzimas), 254 nm



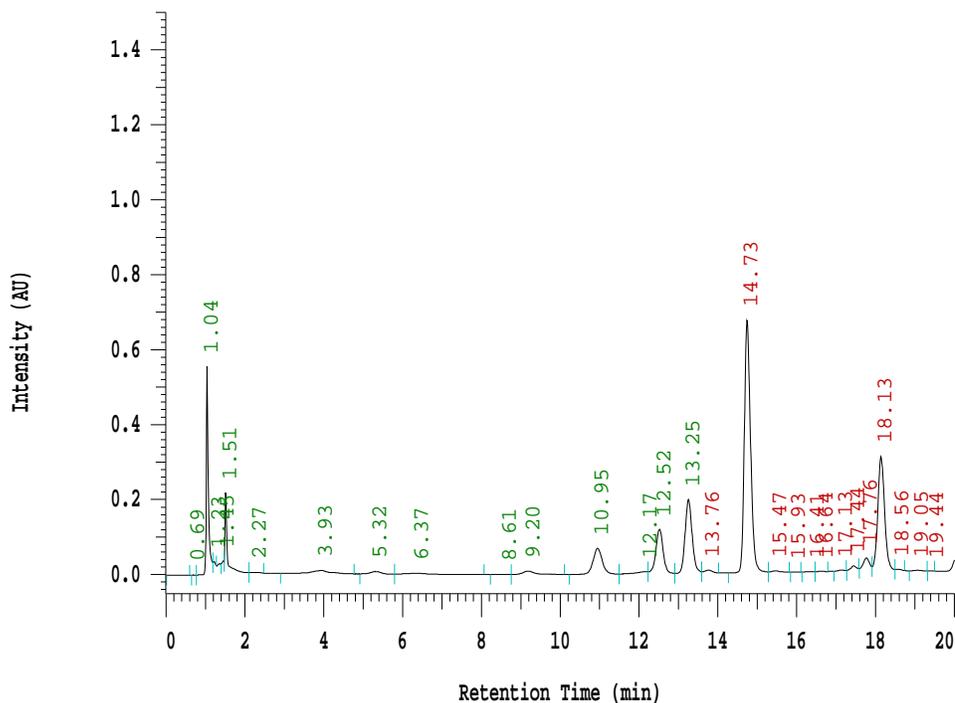
No.	RT	Area	Area %	Height
1	1	790331	9.636	150722
2	1.12	55900	0.682	12258
3	1.29	38340	0.467	6437
4	1.51	1112748	13.567	95656
5	2.33	17160	0.209	1157
6	2.77	3119	0.038	280
7	3.91	139712	1.703	3319
8	5.28	42868	0.523	1600
9	6.36	38140	0.465	1019
10	9.15	187780	2.289	4957
11	<b>10.95</b>	<b>479033</b>	<b>5.84</b>	<b>29391</b>
12	<b>12.52</b>	<b>718125</b>	<b>8.755</b>	<b>52625</b>
13	<b>13.25</b>	<b>1024280</b>	<b>12.488</b>	<b>82021</b>
14	13.83	8041	0.098	466
15	<b>14.73</b>	<b>3251914</b>	<b>39.647</b>	<b>299843</b>
16	15.47	41528	0.506	2164
17	16.6	33022	0.403	1275
18	17.04	48127	0.587	2833
19	17.44	108554	1.323	6148
20	18.2	22651	0.276	1589
21	18.59	30049	0.366	2157
22	19.04	10655	0.13	712
		8202077	100	758629

Anexo 50: *Vanilla planifolia* curada de setiembre del 2007 (blanco, extracción en medio acuoso: sin enzimas), 254 nm



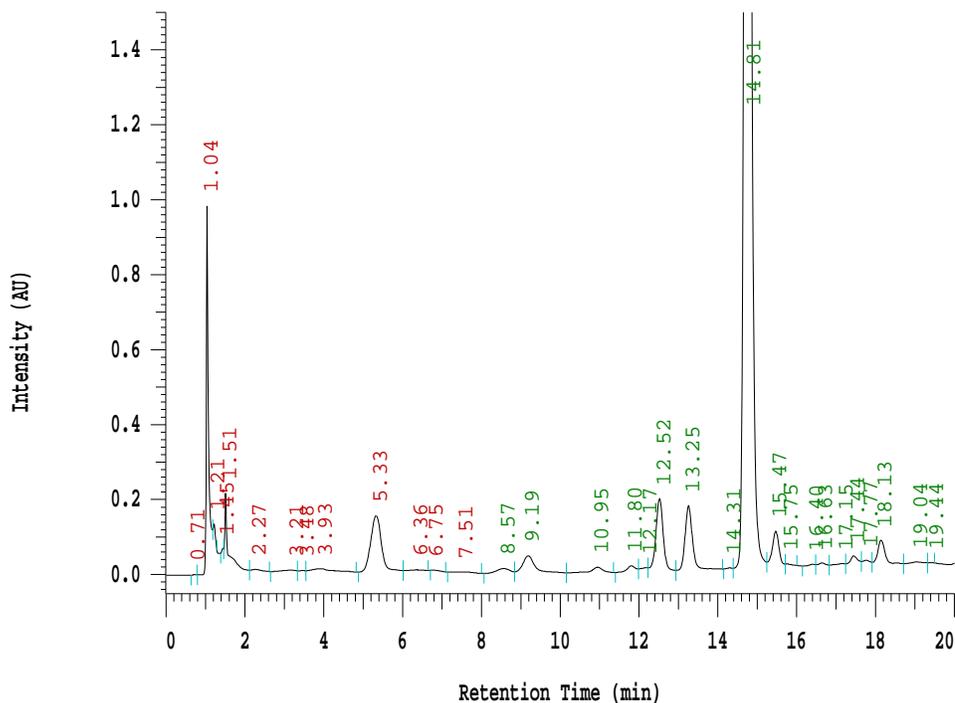
No.	RT	Area	Area %	Height
1	1	923022	3.373	246434
2	1.11	236809	0.865	46558
3	1.25	321212	1.174	47144
4	1.39	293319	1.072	43467
5	1.51	1026497	3.751	143528
6	2.21	214090	0.782	7907
7	2.79	123650	0.452	7087
8	3.01	99145	0.362	4972
9	3.92	197476	0.722	4186
<b>10</b>	<b>5.32</b>	<b>366064</b>	<b>1.338</b>	<b>20599</b>
11	6.35	18685	0.068	918
12	6.83	18450	0.067	1130
13	7.65	6080	0.022	350
<b>14</b>	<b>8.6</b>	<b>86607</b>	<b>0.316</b>	<b>3841</b>
15	9.16	591703	2.162	23475
16	9.84	46659	0.17	2535
17	10.96	228750	0.836	11765
18	11.79	113494	0.415	7619
19	12.52	1146273	4.189	86319
20	13.25	955189	3.49	73144
21	14.31	63542	0.232	2324
22	14.8	19500460	71.257	1377895
23	15.47	399110	1.458	38668
24	15.83	44809	0.164	4158
25	16.16	10635	0.039	1229
26	16.39	19060	0.07	1737
27	16.63	24636	0.09	2171
28	17.08	44080	0.161	3012
29	17.44	148236	0.542	8850
30	18.19	26192	0.096	1627
31	18.55	33544	0.123	2040
32	19.03	38853	0.142	1583
		27366331	100	2228272

Anexo 51: *Vanilla planifolia* curada de setiembre del 2007 (extracción en medio acuoso: 150 µL Viscozima + 300 µL Celuclast, 8 horas), 254 nm



No.	RT	Area	Area %	Height
1	0.05	1000	0.009	125
2	0.69	718	0.006	196
3	1.04	1204160	10.696	278263
4	1.23	10700	0.095	3214
5	1.45	82938	0.737	19273
6	1.51	984962	8.749	109968
7	2.27	9440	0.084	675
8	3.93	143600	1.276	4205
9	5.32	60493	0.537	3345
10	6.37	48126	0.427	1363
11	8.61	4032	0.036	234
12	9.2	100507	0.893	4471
13	<b>10.95</b>	<b>552930</b>	<b>4.912</b>	<b>34516</b>
14	12.17	51915	0.461	2740
15	<b>12.52</b>	<b>758115</b>	<b>6.734</b>	<b>59219</b>
16	<b>13.25</b>	<b>1219573</b>	<b>10.833</b>	<b>98658</b>
17	13.76	58442	0.519	3959
18	<b>14.73</b>	<b>3671419</b>	<b>32.613</b>	<b>336398</b>
19	15.47	30600	0.272	2108
20	15.93	2390	0.021	307
21	16.41	6980	0.062	639
22	16.64	11897	0.106	836
23	17.13	29606	0.263	2312
24	17.44	89791	0.798	7748
25	17.76	214488	1.905	18327
26	18.13	1863598	16.554	153058
27	18.56	29056	0.258	2564
28	19.05	16121	0.143	1090
29	19.44	0	0	0
		11257597	100	1149811

Anexo 52: *Vanilla planifolia* curada de setiembre del 2007 (extracción en medio acuoso: 150 µL Viscozima + 300 µL Celuclast, 8 horas), 230 nm



No.	RT	Area	Area %	Height
1	0.71	0	0	0
2	1.04	1935943	6.425	491394
3	1.21	361610	1.2	67127
4	1.45	153125	0.508	34946
5	1.51	806688	2.677	108195
6	2.27	141452	0.469	6088
7	3.21	141122	0.468	4027
8	3.48	39480	0.131	3146
9	3.93	209720	0.696	5209
<b>10</b>	<b>5.33</b>	<b>1380522</b>	<b>4.582</b>	<b>74412</b>
11	6.36	21537	0.071	980
12	6.75	9320	0.031	297
13	7.51	28120	0.093	927
<b>14</b>	<b>8.57</b>	<b>144658</b>	<b>0.48</b>	<b>6237</b>
15	9.19	496771	1.649	23055
16	10.95	130469	0.433	7167
17	11.8	117597	0.39	8128
18	12.17	63929	0.212	4948
19	12.52	1243702	4.128	96610
20	13.25	1111493	3.689	85995
21	14.31	14081	0.047	1484
22	14.81	20248054	67.199	1375496
23	15.47	447074	1.484	42452
24	15.75	5585	0.019	541
25	16.4	39358	0.131	3106
26	16.63	61143	0.203	4429
27	17.15	51511	0.171	2821
28	17.44	172228	0.572	12590
29	17.77	83679	0.278	6322
30	18.13	429681	1.426	32613
31	19.04	38665	0.128	1979
32	19.44	3320	0.011	333
		30131637	100	2513054