



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

---

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

## CAMPUS PUEBLA

POSTGRADO EN ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

**ESTUDIO DEL CONTENIDO DE COMPUESTOS  
FITOQUÍMICOS EN HOJA, TALLO, FLOR, FRUTO VERDE Y  
BENEFICIADO DE *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews DE  
LA REGIÓN DEL TONACAPAN, MÉXICO**

**DIEGO IBARRA CANTÚN**

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PUEBLA, PUEBLA

2017

---



## COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS  
CAMPECHE-CÓRDOBA-MONTECILLO-PUEBLA-SAN LUIS POTOSÍ-TABASCO-VERACRUZ

CAMPUE- 43-2-03

### CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe **Diego Ibarra Cantún** alumno de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta Institución, bajo la dirección de la Profesora **Dra. Adriana Delgado Alvarado** por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **Estudio del contenido de compuestos fitoquímicos en hoja, tallo, flor, fruto verde y beneficiado de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews de la región del Totonacapan, México** y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, el Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Puebla, Puebla, 11 de diciembre 2017.

Diego Ibarra Cantún

Dra. Adriana Delgado Alvarado  
Vo. Bo. Profesora Consejera

La presente tesis, titulada: **Estudio del contenido de compuestos fitoquímicos en hoja, tallo, flor, fruto verde y beneficiado de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews de la región del Totonacapan, México**, realizada por el alumno: **Diego Ibarra Cantún**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS

ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA:



---

DRA. ADRIANA DELGADO ALVARADO

ASESOR:



---

DR. BRAULIO EDGAR HERRERA CABRERA

ASESOR:



---

DR. RAMÓN MARCOS SOTO HERNÁNDEZ

ASESOR:



---

DR. VÍCTOR MANUEL SALAZAR ROJAS

ASESORA:



---

DRA. MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS

Puebla, Puebla, 11 de diciembre 2017

ESTUDIO DEL CONTENIDO DE COMPUESTOS FITOQUÍMICOS EN HOJA, TALLO,  
FLOR, FRUTO VERDE Y BENEFICIADO DE *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews DE LA  
REGIÓN DEL TOTONACAPAN, MÉXICO

Diego Ibarra Cantún, D.C.

Colegio de Postgraduados, 2017

En la región del Totonacapan coexisten diferentes sistemas de manejo en el cultivo de vainilla, cada uno de ellos con características ambientales específicas. Por lo que la presente investigación tuvo como objetivo analizar el efecto de dos sistemas de manejo de cultivo de dos quimiotipos (QI y QVI) de vainilla de la región del Totonacapan, sobre los atributos fisicoquímicos, aroma, compuestos fitoquímicos y actividad antioxidante en hoja tallo, flor, fruto verde y fruto beneficiado, además de la motilidad gastrointestinal en fruto beneficiado. De cada sistema de manejo de cultivo y quimiotipo se obtuvieron tejidos vegetales y frutos beneficiados de 32 semanas de maduración. En los frutos beneficiados se determinó sus características fisicoquímicas y la concentración de cuatro compuestos del aroma. En todos los tejidos se analizó la actividad antioxidante por los métodos de DPPH, ABTS y ORAC. Se determinó la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) y la actividad del extracto acuoso y de metanol del fruto beneficiado sobre la motilidad gastrointestinal. Las propiedades fisicoquímicas de los frutos beneficiados mostraron variación en relación con el sistema de manejo. Los frutos cultivados en sistema de acahual tuvieron valores altos de azúcares solubles totales, glucosa, fructosa, sacarosa y, flexibilidad, mientras que los frutos en el sistema de malla sombra tuvieron valores altos de pH y Croma. La calidad del aroma en el quimiotipo QVI fue similar en ambos sistemas de manejo, mientras que el quimiotipo QI mostro diferencias en función del sistema de manejo. El sistema de acahual favoreció en los tejidos de la planta de vainilla, la acumulación de compuestos fenólicos totales, taninos totales, taninos hidrolizables, taninos condensados y triterpenos totales, y la malla sombra propicio una concentración mayor de saponinas. La capacidad antioxidante obtenida como concentración inhibitoria ( $CI_{50}$ ) por DPPH, ABTS y por los valores de ORAC fue mayor en los frutos beneficiados. La dosis letal media ( $DL_{50}$ ) de los extractos de frutos beneficiados fue débilmente tóxica, el extracto de metanol mostro una disminución en el avance de contenido gastrointestinal en ratón.

Palabras clave: Acahual, aroma, características fisicoquímicos, fitoquímicos, malla sombra, *Vanilla planifolia*.

STUDY OF THE CONTENT OF PHYTOCHEMICAL COMPOUNDS IN LEAVE, STEM,  
FLOWER, GREEN AND CURED FRUIT OF *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews FROM  
THE TONACAPAN REGION, MEXICO

Diego Ibarra Cantún, D.C.

Colegio de Postgraduados, 2017

In the Totonacapan region different management systems coexist in vanilla cultivation, each of them with specific environmental characteristics. thus, this research aimed to analyze the effect of two systems of crop management of two chemotypes (QI and QVI) of vanilla from the totonacapan region, on the physicochemical attributes, aroma, phytochemical compounds and antioxidant activity in stem leaf, flower, green fruit and cured fruit, in addition to the gastrointestinal motility in cured fruit. From each crop management system and each chemotype, vegetable tissues and cured fruits from 32 weeks of maturation were obtained. The physicochemical characteristics and the concentration of four aroma compounds were determined in the cured fruits. In all tissues, the antioxidant activity was analyzed by the DPPH, ABTS and ORAC methods. The mean lethal dose (LD<sub>50</sub>) and the activity of the aqueous and methanol extract of the cured fruit on gastrointestinal motility were determined. The physicochemical properties of the benefited fruits showed variation in relation to the management system. The fruits grown in acahual system had high values of total soluble sugars, glucose, fructose, sucrose and, flexibility, while fruits in the shade mesh system had high values of pH and Chroma. The aroma quality in the QVI chemotype was similar in both management systems, while the QI chemotype showed differences depending on the management system. The acahual system favored in the tissues of the vanilla plant, the accumulation of total phenolic compounds, total tannins, hydrolysable tannins, condensed tannins and total triterpenes, and the shade mesh propitiated a higher concentration of saponins. The antioxidant capacity obtained as inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) by DPPH and ABTS, and by ORAC values was higher in the cured fruits. The mean lethal dose (LD<sub>50</sub>) of the extracts of the cured fruits was weakly toxic, the methanol extract showed a decrease in the advance of gastrointestinal content in the mouse.

Key words: Acahual, aroma, physicochemical characteristics, phytochemicals, shade mesh, *Vanilla planifolia*.

## DEDICATORIAS

*Para Madai, Eliana y Sofía*

*Mi Sol y mis estrellas*

## AGRADECIMIENTOS

A los mexicanos y mexicanas que pagan impuestos y quienes a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) me brindaron el apoyo financiero para realizar mis estudios de doctorado.

Al Colegio de Postgraduados, por la formación académica a través del Posgrado de Estrategias para el Desarrollo Agrícola Regional.

Al Subproyecto (SP-14): “Estudio del contenido y propiedades nutraceuticas de los fitoquímicos presentes en las hojas, tallos y vainas de *Vanilla spp.* en poblaciones silvestres y cultivadas de México” perteneciente al Macroproyecto (2012-04-190442) SAGARPA-CONACyT: Estrategia de investigación aplicada para el fortalecimiento, innovación y competitividad de la producción de vainilla en México”, por el apoyo para la realización de esta tesis.

A la Dra. Adriana Delgado Alvarado por la dirección de este tema de investigación, por su confianza y apoyo en este camino de formación.

Al Dr. Braulio Edgar Herrera Cabrera por orientarme en cada etapa de este proyecto, pero sobretodo por su amistad.

Al Dr. Ramón Marcos Soto Hernández por sus invaluable conocimientos para el desarrollo de este trabajo, así como a su equipo de colaboradores el M.C. Rubén San Miguel y el Sr. Domingo González quienes me apoyaron durante mi estancia en el Campus Montecillo.

A la Dra. María Isabel Aguilar Laurents por los conocimientos aportados y su calidez humana.

Al Dr. Víctor Manuel Salazar por sus valiosos consejos y apoyo a lo largo de esta investigación.

A la Dra. Adela Astudillo y la M.C. Nohemí Dávalos quienes con sus conocimientos me ayudaron a concluir el último capítulo de este proyecto.

A la Mtra. Madai G. Sánchez por las facilidades otorgadas para la realización de las pruebas físicas en frutos beneficiados.

A Don Veremundo Rodríguez Morales, Don Miguel Angel Acosta Carmona, Don Edilberto Gallegos Huerta y Ing. Juan Pérez Atzin, productores de vainilla de la Región del Totonacapan ya que sin sus conocimientos y su gran disposición no se hubiera podido realizar este trabajo.

A mis amigos del colegio, por las charlas y el buen recuerdo que llevo de ellos.



Esta investigación fue financiada por:



**Colegio de Postgraduados**  
**Fideicomiso Revocable de Administración No. 167304**



**CONACYT**

**Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**  
**(CONACYT: Beca de doctorado)**



**Sistema Nacional de Investigación y Transferencia Tecnológica**  
**para el Desarrollo Rural y Sustentable**



**Proyecto 2012-04-190442 “Estrategia de investigación aplicada para el fortalecimiento, innovación y competitividad de la producción de vainilla en México”**

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>CAPÍTULO I</b>	
INTRODUCCIÓN GENERAL .....	1
1.1 JUSTIFICACIÓN .....	3
1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	5
1.3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	6
1.3.1 HIPÓTESIS GENERAL.....	6
1.3.1.1 HIPÓTESIS PARTICULARES .....	6
1.3.2 OBJETIVO GENERAL.....	7
1.3.2.1 OBJETIVOS PARTICULARES .....	7
1.4 LITERATURA CITADA .....	9
<b>CAPÍTULO II</b>	
CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS Y AROMÁTICAS EN FRUTOS BENEFICIADOS DE <i>Vanilla planifolia</i> Jacks. Ex Andrews DE LA REGIÓN DEL TOTONACAPAN.....	13
2.1 Introducción .....	15
2.2 Materiales y métodos.....	16
2.3 Resultados y discusión .....	23
2.4 Conclusiones .....	45
2.5 Literatura citada .....	46
<b>CAPÍTULO III</b>	
COMPONENTES QUÍMICOS DE <i>Vanilla planifolia</i> Jacks. ex Andrews EN DOS SISTEMAS DE CULTIVO DE LA REGIÓN DEL TOTONACAPAN, MÉXICO .....	50
3.1 Introducción .....	52

3.2 Materiales y métodos.....	54
3.3 Resultados y discusión .....	61
3.4 Conclusiones .....	75
3.5 Literatura citada .....	75
<b>CAPÍTULO IV</b>	
CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE DOS QUIMIOTIPOS DE <i>Vanilla planifolia</i> Jacks. ex Andrews DE LA REGIÓN DEL TONACAPAN, MÉXICO .....	
	83
4.1 Introducción .....	85
4.2 Materiales y métodos.....	86
4.3 Resultados y discusión .....	91
4.4 Conclusiones .....	102
4.5 Literatura citada .....	102
<b>CAPÍTULO V</b>	
TOXICIDAD AGUDA (DL <sub>50</sub> ) Y MOTILIDAD GASTROINTESTINAL DE EXTRACTOS ACUOSO Y METANÓLICO DE FRUTOS BENEFICIADOS DE <i>Vanilla</i> <i>planifolia</i> Jacks. ex Andrews .....	
	108
5.1 Introducción .....	110
5.2 Materiales y métodos.....	111
5.3 Resultados y discusión .....	114
5.4 Conclusiones .....	117
5.5 Literatura citada .....	118
DISCUSIÓN GENERAL .....	121
CONCLUSIONES GENERALES .....	137

ANEXOS ..... 140

## LISTA DE CUADROS

	<b>Página</b>
Cuadro 2.1 Ubicación de localidades de recolecta de vainilla en la región del Totonacapan, México.....	18
Cuadro 2.2 Medias, coeficientes de variación y cuadrados medios de las características fisicoquímicas de frutos beneficiados de <i>Vanilla planifolia</i> de la región del Totonacapan, México.....	25
Cuadro 2.3 Promedio de características fisicoquímicas de frutos beneficiados de dos quimiotipos de <i>Vanilla planifolia</i> en dos sistemas de manejo de cultivo de la región del Totonacapan, México .....	29
Cuadro 2.4 Promedio de características físicas de frutos beneficiados de dos quimiotipos de <i>Vanilla planifolia</i> en dos sistemas de manejo de cultivo de la región del Totonacapan, México.....	29
Cuadro 2.5 Valores propios, vectores propios y proporción acumulada de la variación explicada por cada variable en las primeras tres primeras dimensiones de la caracterización de las propiedades fisicoquímicas de los cuatro tratamientos de <i>V. planifolia</i> .....	31
Cuadro 2.6 Medias, coeficientes de variación y cuadrados medios de compuestos del aroma e índices de proporción y propiedades fisicoquímicas de frutos beneficiados de <i>Vanilla planifolia</i> de la región del Totonacapan, México .....	35
Cuadro 2.7 Promedio de los compuestos del aroma e índices de proporción de frutos beneficiados de <i>Vanilla planifolia</i> de la región del Totonacapan, México .....	37
Cuadro 2.8 Valores propios, vectores propios y proporción acumulada de la variación explicada por cada variable en las primeras tres dimensiones de compuestos aromáticos .....	40
Cuadro 3.1 Ubicación de localidades de recolecta de dos sistemas de manejo de <i>Vanilla planifolia</i> Jacks. ex Andrew en diferente manejo de cultivo en la región del Totonacapan, México.....	57
Cuadro 3.2 Número de bandas de fitoquímicos detectados por cromatografía en capa fina en los extractos de hoja, tallo, flor, fruto verde (Fv) y fruto beneficiado (Fb) de dos quimiotipos de <i>Vanilla planifolia</i> J. de la región del Totonacapan, México .....	64
Cuadro 3.3 Medias, coeficientes de variación y cuadrados medios de metabolitos secundarios de <i>Vanilla planifolia</i> de la región del Totonacapan, México .....	67

Cuadro 3.4 Promedio de compuestos fitoquímicos en sistema de manejo, quimiotipo y tejido vegetal de <i>Vanilla planifolia</i> J. de la región del Totonacapan, México .....	70
Cuadro 3.5 Compuestos fitoquímicos en estructuras vegetales de <i>Vanilla planifolia</i> J. cultivada en diferente sistema de manejo de la región del Totonacapan, México .....	74
Cuadro 4.1 Rendimiento de extracciones sucesivas en disolventes de polaridad creciente de hoja, tallo, flor, fruto verde y beneficiado de <i>Vanilla planifolia</i> J.....	92
Cuadro 4.2 Actividad antioxidante (IC <sub>50</sub> ) de extracción sucesiva en metanol frentes al radical DPPH y ABTS de diferentes tejidos de <i>Vanilla planifolia</i> .....	93
Cuadro 4.3 Actividad antioxidante (IC <sub>50</sub> ) frente al radical DPPH y ABTS de diferentes tejido de dos quimiotipos de <i>Vanilla planifolia</i> .....	94
Cuadro 4.4 Actividad antioxidante (IC <sub>50</sub> ) frente al radical DPPH y ABTS de estándares de referencia utilizados en el análisis de antioxidantes .....	96
Cuadro 4.5 Actividad antioxidante por el método de ORAC de diferentes tejidos de dos quimiotipos de <i>Vanilla planifolia</i> de la región del Totonacapan, México .....	99
Cuadro 4.6 Análisis de correlación (R) entre la actividad antioxidante y compuestos fitoquímicos en los diferentes tejidos de <i>Vanilla planifolia</i> .....	101
Cuadro 5.1 Rendimientos de extractos de <i>Vanilla planifolia</i> .....	114
Cuadro 5.2 Dosis letal media de extractos totales de <i>Vanilla planifolia</i> (DL <sub>50</sub> ). .....	115
Cuadro 3.1A Sistema cromatográfico y reveladores para la identificación de compuestos fitoquímicos en <i>Vanilla planifolia</i> de la región del Totonacapan .....	140

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 2.1 Dispersión de los sistemas de manejo de cultivo y quimiotipos de <i>Vanilla planifolia</i> con base en los tres primeros componentes principales del análisis de 12 variables agrupadas por medias .....	32
Figura 2.2 Dendograma de los sistemas de manejo de cultivo y quimiotipos de <i>Vanilla planifolia</i> con base en las propiedades fisicoquímicas en la Región del Totonacapan, México.....	33
Figura 2.3 Concentración de compuestos minoritarios en dos quimiotipos (QI y QVI) de <i>Vanilla planifolia</i> cultivados en acahual y malla sombra en la Región del Totonacapan, México.....	38
Figura 2.4 Concentración de vainillina en dos quimiotipos (QI y QVI) de <i>Vanilla planifolia</i> cultivados en acahual (Ac) y malla sombra (Ms) en la Región del Totonacapan, México.....	39
Figura 2.5 Dispersión de los sistemas de manejo y quimiotipos de <i>Vanilla planifolia</i> , con base a los tres primeros componentes principales del análisis de 10 variables agrupadas por medias.....	42
Figura 2.6 Dendograma de los sistemas de manejo de cultivo y quimiotipos de <i>Vanilla planifolia</i> con base en los compuestos aromáticos .....	44
Figura 5.1 Extracto acuoso (A) y extracto metanólico (B) de frutos beneficiados de <i>Vanilla planifolia</i> . .....	114
Figura 5.2 Actividad del extracto metanólico de <i>V. planifolia</i> J. SSI (solución salina isotónica), loperamida (referencia) y las diferentes dosis del extracto metanólico de <i>Vanilla planifolia</i> .....	116
Figura 5.3 Actividad del extracto acuoso de <i>V. planifolia</i> J. SSI (solución salina isotónica), loperamida (referencia) y las diferentes dosis del extracto metanólico de <i>Vanilla planifolia</i> .....	117
Figura 3.1A Identificación de compuestos fenólicos totales por cromatografía en capa fina en extracto metanólico .....	141
Figura 3.2A Identificación de taninos totales por cromatografía en capa fina en extracto metanólico .....	142
Figura 3.3A Identificación de flavonoides por cromatografía en capa fina en extracto metanólico .....	143

Figura 3.4A Identificación de saponinas por cromatografía en capa fina en extracto metanólico .....	144
Figura 3.5A Identificación de triterpenos totales por cromatografía en capa fina en extracto hexánico .....	145
Figura 3.6A Identificación de alcaloides por cromatografía en capa fina en extracto metanólico .....	146



## CAPITULO I.

### INTRODUCCION GENERAL

La vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) es originaria de las regiones húmedas tropicales de México y América Central (Besse *et al.*, 2004), y desde la época prehispánica ha sido considerada como un afrodisiaco, carminativo y estimulante, en Venezuela los frutos beneficiados se utilizan para el tratamiento de fiebre y espasmos, en Palau es usada para curar la dismenorrea, la fiebre e histeria (Duke *et al.*, 2003), e inclusive existe una patente de la vainilla que se utiliza para proteger a la piel contra los radicales libres (Sophie y François, 2003). Respecto a los extractos de vainilla principalmente se utilizan en diversos alimentos como en helados, pasteles y galletas, y también en distintas formulaciones de perfumería y nutracéutica (Ranadive, 1994). Otros estudios señalan que los extractos de vainilla, particularmente la vainillina, tiene efectos multifuncionales tales como: anticarcinogénico (Imanishi *et al.*, 1990; Ferguson, 1994), antimutagénico (Cerruti *et al.*, 1997; Bythrow, 2005), como agente hipolipidémico-hipotrigliceridémico en el tratamiento de la diabetes (tipo 2), trastornos cardiovasculares y de obesidad (Mokshagundam y Mokshagundam, 2003), antimicrobiano (Cerruti *et al.*, 1997; Fitzgerald *et al.*, 2005; Shanmugavalli *et al.*, 2009) y también posee una alta capacidad antioxidante (Teissedre y Waterhouse, 2000; Devasagayam *et al.*, 2004; Shyamala *et al.*, 2007; Tai *et al.*, 2011).

Actualmente, la vainilla es uno de los productos de mayor rentabilidad económica de nuestro país al ser el principal aromatizante de la industria alimentaria, como base de muchos dulces, helados y bebidas sabor cola (Soto, 2006; Hilmer *et al.*, 2010). Esto la hace una de las plantas de mayor importancia social, económica y cultural en las zonas donde habita, debido al gran mercado que representa. Aunado a ser un cultivo perenne presenta la desventaja del tiempo

necesario para recuperar la inversión, los riesgos agronómicos y la inestabilidad de los mercados. La superficie cultivada con vainilla en México, para el año 2013 se estimó en 1,225.8 hectáreas, con un volumen de producción de 419.3 toneladas de vainilla verde, es decir una capacidad de obtener aproximadamente 83.9 toneladas de vainilla beneficiada (seca). Sin embargo, según datos de Financiera Nacional de Desarrollo Agropecuario, Rural, Forestal y Pesquero, la falta de certeza de mercado, el productor pierde interés, lo que disminuye el potencial de producción del cultivo (FND, 2014). La Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación reporta al estado de Veracruz como el principal estado productor con 957.05 hectáreas (70% de la superficie) y en los cuales participan 1,700 productores (SAGARPA, 2011). En esta entidad la zona productora se localiza al norte del estado, en la región conocida como Totonacapan, la cual conforma el centro de comercialización más grande de este producto en toda la República Mexicana ya que concentra la mayor parte de la producción nacional y de igual manera, el mayor número de beneficios. El destino de la vainilla beneficiada es el mercado internacional en 90% aproximadamente y el 10% restante se distribuye en el territorio nacional en el mercado de artesanías y en las industrias de extractos (SAGARPA, 2011).

En la actualidad existe una gran cantidad de información que se correlaciona con una dieta alta en productos de origen vegetal con la prevención y mantenimiento de la salud. Este tipo de alimentos son conocidos como alimentos funcionales, debido a sus diversos efectos positivos a la salud de quien los consume (Oomah, 2001; Stacewicz-Sapuntzakis, 2001; Robbins, 2003). Una de las características de los alimentos funcionales es su capacidad de inhibición del daño oxidativo de enfermedades tales como cardíacas, cerebrovascular y cáncer (Block *et al.*, 1992; Jacob y Burri, 1996; Rafter, 2002).

Ante los efectos multifuncionales de la vainilla, surge la necesidad de generar conocimiento y acciones que permitan a pequeños productores de vainilla, competir en nuevos mercados de productos con actividad biológica, funcionales y/o nutraceuticos, para lo cual se propone realizar un estudio en el que se identifiquen en las diferentes partes de la planta de vainilla, los fitoquímicos que presenten actividad biológica, y potenciales propiedades funcionales y/o nutraceuticas.

## **1.1 JUSTIFICACIÓN**

México es reconocido como centro de origen de la vainilla (*Vainilla planifolia*) (Soto-Arenas, 2003; Verporte, 2011), particularmente la región del Totonacapan, que incluye el germoplasma de mayor importancia biológica y comercial. Sin embargo, la producción de vainilla dentro del país se ha reducido, principalmente por la baja productividad que tienen los productores nacionales. El comercio internacional de vainilla, es abastecido en gran medida por la producción de Madagascar. México por su parte, a pesar de exportar cerca del 100% de la producción nacional, es baja su participación en el mercado mundial. La competencia internacional en el mercado de la vainilla está definida por el nivel tecnológico y el grado de organización en la producción, entre otros factores. Además de la competencia entre productores de vainilla natural, se encuentra en el mercado vainilla sintética, la cual es un sustituto perfecto con un precio en el mercado mucho menor. Sin embargo, algunas investigaciones señalan que entre las sustancias que componen a la vainilla sintética existe un compuesto considerada cancerígeno. Los estudios realizados indican que la vainilla sintética contiene en bajas cantidades cumarina, sustancia derivada de la warfarina, la cual es utilizada como veneno para ratas y a las cuáles les provoca hemorragia al destrozarles el hígado, matándolas casi de manera inmediata. Por ello, la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA, Food and Drug

Administration) ha prohibido la utilización de coumarina en los productos alimenticios en los Estados Unidos (FDA, 2009; García *et al.*, 2012).

Por el lado de la demanda, se observa que la compra de vainilla está dominada por países con nivel de ingreso elevado, tales como Estados Unidos, Francia, Alemania y Japón, entre otros. Además de estos países, en la mayoría del mundo en los últimos años se ha detectado una tendencia hacia la compra de productos de alta calidad nutracéutica. Esta situación permite ubicar nichos de mercado, principalmente para los productores como industrias o empresas comercializadoras (SAGARPA, 2011). Ante este escenario, se considera oportuno para la vainilla mexicana, específicamente la producida en la zona del Totonacapan, un estudio sobre el contenido de compuestos fitoquímicos que permita mostrar su potencial en los estratos de demanda con alto valor agregado, además de darle un uso integral a todas las estructuras de la planta de vainilla.

La presente investigación considero como región de estudio la zona productora del Totonacapan, misma que integra municipios del estado de Puebla y Veracruz, donde se ha identificado heterogeneidad en los sistema de manejo del cultivo de la vainilla, representados principalmente por el acahual (tradicional), donde las plantas de vainilla se establecen en tutores vivos como árboles de cítricos (*Citrus sinensis*), pichoco (*Erythrina* sp.), cocuite (*Gliricidia* sp.), entre otros; y en malla sombra (con 50-80 % de luminosidad) con un manejo intensivo, riego y aplicación de agroquímicos. En donde se han identificado seis quimiotipos definidos por la proporción de los cuatro principales compuestos responsables del aroma de la vainilla (*p*-hidroxibenzaldehído, ácido vanílico y ácido *p*-hidroxibenzóico y vainillina. Por lo que la presente investigación pretende distinguir si el aroma y en el contenido de compuestos fitoquímicos en las diferentes

estructuras vegetales de la planta de vainilla, están siendo influenciados por las prácticas de manejo en la región del Totonacapan.

## **1.2 PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA**

Uno de los factores de aceptación de un producto funcional y/o nutracéutico, como es la vainilla, está relacionado con su capacidad de otorgar beneficios a la salud del humano, ya que esta propiedad puede abrir nuevos mercados. Diariamente consumimos una gran variedad de alimentos que nos proporcionan energía, macronutrientes (carbohidratos, proteínas y grasas), y micronutrientes (vitaminas, minerales) que son necesarios para el correcto funcionamiento de nuestro cuerpo. Sin embargo, el reciente descubrimiento de otros compuestos fisiológicamente activos presentes en los alimentos, como los fitoquímicos (presentes en alimentos de origen vegetal) han modificado el rol clásico que tenía la dieta en el ámbito de la salud como un elemento de prevención de estados carenciales (Mangini y Menéndez, 2002). Además que es cada vez más común el uso de ciertos alimentos o ingredientes potencialmente saludables orientados a promover, no solo un estado de salud óptimo, sino también a contribuir en forma específica a reducir el riesgo de padecer ciertas enfermedades crónico-degenerativas, estos son llamados alimentos funcionales.

Por otra parte es factible que las estructuras vegetales y reproductivas del género *Vanilla*, escasamente estudiadas, contengan sustancias de gran importancia para la medicina y que aún estén por descubrirse. En este sentido, muchas especies son estudiadas con frecuencia para hallar en ellas su posible valor farmacológico, en especial por sus propiedades estrogénicas, antipiréticas, astringentes, amebicidas, fungicidas, antibióticas, entre otras. De ahí surge el interés y la importancia de identificar los principales compuestos fitoquímicos de las diferentes estructuras de la planta de vainilla (tallo, hoja, flor, fruto verde y beneficiado). Ya que hasta

ahora la mayoría de las investigaciones realizadas en vainilla se han hecho sobre frutos beneficiados y extractos de vainilla beneficiada. Con el planteamiento de este trabajo se pretende conocer la variación y contenido de compuestos fitoquímicos de la vainilla de la región del Totonacapan y su posible actividad biológica permitiendo un aprovechamiento integral de todas las estructuras de la planta de vainilla y darle otro valor agregado.

### **1.3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **1.3.1 HIPÓTESIS GENERAL**

Las condiciones de manejo en acahual y malla sombra de dos quimiotipos (QI y QVI) de *Vanilla planifolia* Jacks ex Andrews de la región del Totonacapan, propicia variación en la presencia y cantidad de los atributos fisicoquímicos y la composición química: afectando el aroma, contenido de compuestos fitoquímicos y su actividad biológica en hoja tallo, flor, fruto verde y fruto beneficiado.

##### **1.3.1.1 Hipótesis particulares**

- Existe influencia del sistema de manejo de la vainilla en los atributos de calidad fisicoquímica y aromática en frutos beneficiados de *Vanilla planifolia* Jacks ex Andrews provenientes de la región del Totonacapan.
- El sistema de manejo del cultivo de la vainilla determina el tipo y la cantidad de compuestos fitoquímicos presentes en las diferentes estructuras vegetales (hoja, tallo, flor, fruto verde y fruto beneficiado) de *Vanilla planifolia* Jacks ex Andrews de la región del Totonacapan.

- El quimiotipo de vainilla determina el tipo y la cantidad de compuestos fitoquímicos presentes en las diferentes estructuras vegetales (hoja, tallo, flor, fruto verde y fruto beneficiado) de *Vainilla planifolia* Jacks ex Andrews de la región del Totonacapan.
- La presencia de compuestos fitoquímicos en las diferentes estructuras (hoja, tallo, flor, fruto verde y fruto beneficiado) de *Vainilla planifolia* Jacks ex Andrews de la región del Totonacapan se encuentra en cantidad suficiente para tener actividad biológica.
- Los extractos crudos de las diversas estructuras vegetales (hoja, tallo, flor, fruto verde y fruto beneficiado) de *Vainilla planifolia* Jacks ex Andrews de la región del Totonacapan presentan capacidad antioxidante y motilidad gastrointestinal.

### **1.3.2 OBJETIVO GENERAL**

Analizar el efecto de dos sistemas de manejo de cultivo de dos quimiotipos (QI y QVI) de *Vanilla planifolia* Jacks ex Andrews de la región del Totonacapan, sobre los atributos fisicoquímicos, la composición química (aroma y compuestos fitoquímicos) y actividad biológica en hoja tallo, flor, fruto verde y fruto beneficiado.

#### **1.3.2.1 Objetivos particulares**

- Evaluar la influencia de los sistemas de manejo en acahual y en malla sombra, sobre las características fisicoquímicas y aromáticas de frutos beneficiados de dos quimiotipos de *Vainilla planifolia* Jacks ex Andrews con diferente contenido de vainillina de la región del Totonacapan.
- Realizar un tamizaje fitoquímico por medio de agentes cromógenos en las diferentes estructuras (hoja, tallo, flor, fruto verde y fruto beneficiado) de dos quimiotipos (QI y

QVI) de *Vainilla planifolia* Jacks ex Andrews cultivados en acahual y malla sombra procedentes de la región del Totonacapan, México.

- Confirmar por cromatografía en capa fina la presencia de compuestos fitoquímicos en las diferentes estructuras (hoja, tallo, flor, fruto verde y fruto beneficiado) de dos quimiotipos (QI y QVI) de *Vainilla planifolia* Jacks ex Andrews cultivados en acahual y malla sombra procedentes de la región del Totonacapan, México.
- Determinar la variación y cantidad total de flavonoides, taninos, taninos condensados, saponinas, compuestos fenólicos solubles y triterpenos de las diferentes estructuras de la planta: tallo, hoja, flor fruto verde y fruto beneficiado, de dos quimiotipos (QI y QVI) de *Vainilla planifolia* Jacks ex Andrews cultivados en acahual y malla sombra procedentes de la región del Totonacapan, México.
- Analizar la capacidad antioxidante de extractos crudos de hoja, tallo, flor, fruto verde y fruto beneficiado y la motilidad gastrointestinal en fruto beneficiado, de dos quimiotipos (QI y QVI) de *Vainilla planifolia* Jacks ex Andrews cultivados en acahual y malla sombra procedentes de la región del Totonacapan, México.

El trabajo se estructuró por capítulos para probar las hipótesis acerca del efecto de las condiciones de manejo en sistemas de manejo en acahual y malla sombra, sobre los atributos fisicoquímicos y la composición química de hoja tallo, flor, fruto verde y fruto beneficiado de dos quimiotipos (QI y QVI) de *Vanilla planifolia* Jacks ex Andrews de la región del Totonacapan. En el capítulo II se presenta la influencia de los sistemas de manejo de la vainilla sobre las propiedades fisicoquímicas y del aroma en fruto beneficiado por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución HPLC por sus siglas en inglés. El capítulo III, muestra la presencia de compuestos fitoquímicos por medio de agentes cromógenos y



cromatografía en capa fina (CCF), así como explica variación en el contenido de compuestos fitoquímicos en los tejidos vegetales de vainilla por métodos espectrométricos. El capítulo IV exhibe la capacidad antioxidante de extractos de tejidos vegetales de vainilla mediante tres métodos: DPPH, ABTS y ORAC. Mientras en el capítulo V menciona la dosis letal media y la motilidad gastrointestinal de extractos de fruto beneficiado sobre ratones. Finalmente, se presenta una discusión general y las perspectivas futuras de las condiciones de manejo en vainilla.

#### **1.4 LITERATURA CITADA**

- Besse P, Da Silva D, Bory S, Grisoni M, Le Bellec F., Duval MF. 2004. RAPD genetic diversity in cultivated vanilla: *Vanilla planifolia*, and relationships with *V. tahitensis* and *V. pompona*. *Plant Science*. 167: 379-385.
- Block G, Patterson B, Subar A. 1992. Fruit, vegetables and cancer prevention. A review of the epidemiological evidence. *Nutrition and Cancer*. 18: 1-29.
- Bythrow JD. 2005 Historical Perspective: Vanilla as a Medicinal plant. *Seminars in integrative medicine*. 3: 129-131.
- Cerruti P, Alzamora SM, Vidales SL. 1997. Vanillin as an antimicrobial for producing shelf-stable strawberry puree. *Journal of Food Sciences*. 62: 608-610.
- Devasagayam TPA, Tilak JC, Boloor KK, Ketaki S, Ghaskadbi SS, Lele RD. 2004. Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. *Journal of The Association of Physicians of India*. 52: 794-804.
- Duke JA, Bogenschutz-Godwin MJ, duCellier J, Duke PK. 2003. *CRC Handbook of Medicinal Spice*. Ed. CRC Press. Boca Raton, FL. pp 303-308.

- FDA (Federation of Drug Administration). 2009. Algunos "extractos de vainilla" producidos en México no son una buena oferta. Food and Drug Administration <http://www.fda.gov/ForConsumers/ConsumerUpdates/ucm161239.htm>. Consultado: 09 de febrero 2015.
- Ferguson LR. 1994. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. *Mutation Research*. 307:395-410.
- Fitzgerald DJ, Stratford M, Gasson MJ, Narbad A. 2005. Structure function analysis of the vanillin molecule and its antifungal properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53:1769-1775.
- FND (Financiera Nacional de Desarrollo Agropecuario, Rural, Forestal y Pesquero). 2014. Panorama de la Vainilla. Secretaria de Hacienda y Crédito Público. México. 1 p.
- García A, González M, Martínez R. 2012. Seguridad del haba tonka. Cartas a la Directora – *Gaceta Sanitaria*. 26: 193-194.
- Hilmer JM, Hammerschmidt FJ, Lösing G. 2010. Authentication of Vanilla Products. In: *Vanilla (Medicinal and Aromatic Plants)*. Odoux E, Grisoni M. (eds). Ed. CRC Press Taylor and Francis Group. EUA. 237 p.
- Imanishi H, Sasaki YF, Matsumoto K, Watanabe M, Ohta T, Shirasu Y, Tutikawa K. 1990. Suppression of 6-TG-resistant mutations in V79 cells and recessive spot formations in mice by vanillin. *Mutation Research*. 243: 151-158.
- Jacob RA, Burri BJ. 1996. Oxidative damage and defense. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 63: 985-990.
- Mangini J, Menéndez P. 2002. Nutrientes funcionales, aparato digestivo y beneficios potenciales para el niño. *Gastroenterología*. 22: 69-73.

- Mokshagundam LRV, Mokshagundam SL. 2003. Triglyceride reducing agent. US Patent. 6: 522-599.
- Oomah BD. 2001. Flaxseed as functional food source. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 81: 889-904.
- Rafter JJ. 2002. Scientific basis of biomarkers and benefits of functional foods for reduction of disease risk: cancer. *British Journal of Nutrition*. 88: 219-224.
- Ranadive AS. 1994. Vanilla-cultivation, curing, chemistry, technology and commercial products. In: Charalambous G. (ed). *Spices, herbs and edible fungi*. Ed. Elsevier. Amsterdam. pp 517-577.
- Robbins RJ. 2003. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 2866-2887.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2011. Estudio de oportunidades de mercado internacional para la vainilla. Comité Estatal Sistema Producto Vainilla de Puebla, AC. México. 11 p.
- Shanmugavalli N, Umashankar V, Raheem A. 2009. Antimicrobial activity of *Vanilla planifolia*. *Indian Journal of Science and Technology*. 2: 37-40.
- Shyamala BN, Naidu MM, Sulochanamma G, Srinivas P. 2007. Studies on the antioxidant activities of natural vanilla extract and its constituent compounds through in vitro models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 7738-7743.
- Sophie L, Francois MJ. 2003. Use of a composition containing a vanilla extract to protect the skin against superoxide radicals or to limit the appearance of sunburn cells. French patent FR 2837384.
- Soto MA. 2006. La vainilla: retos y perspectivas de su cultivo CONABIO. *Biodiversitas*. 66: 1-9.

- Soto-Arenas MA. 2003. Vanilla. In: Genera Orchidacearum Orchidoideae (Part 2) Vanilloideae. Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN (eds). Oxford University Press. 402 p.
- Stacewicz-Sapuntzakis M, Bowen PE, Hussain EA, Damayanti-Wood BI, Farnsworth NR. 2001. Chemical composition and potential health effects of prunes: a functional food?. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 41:251-286.
- Tai A, Sawano T, Yazama F, Ito H. 2011. Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assays. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1810:170-177.
- Teissedre PL, Waterhouse AL. 2000. Inhibition of oxidation of human low-density lipoproteins by phenolic substances in different essential oils varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 3801-3805.
- Verpoorte R. 2011. Prologue. In: *Vanilla (medicinal and aromatic plants-industrial profiles)*. Odoux E, Grisoni M (eds). Ed. CRC Press Taylor and Francis Group. EUA.

## CAPITULO II

### CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS Y AROMATICAS EN FRUTOS

#### BENEFICIADOS DE *Vanilla planifolia* Jacks. Ex Andrews DE LA REGIÓN DEL TOTONACAPAN, MÉXICO

##### Resumen

En la región del Totonacapan existen diferentes aromas y sistemas de manejo para el cultivo de la vainilla. El trabajo tuvo como objetivo evaluar la influencia del sistema de manejo de cultivo, en acahual y malla sombra de dos quimiotipos (QI y QVI) de vainilla sobre las propiedades fisicoquímicas y de aroma en frutos beneficiados de la región del Totonacapan, México. De cada sistema de manejo y quimiotipo se obtuvieron frutos de 32 semanas y se beneficiaron por un mismo maestro beneficiador durante 14 semanas. En los frutos beneficiados se determinaron sus propiedades fisicoquímicas: largo, ancho, grosor, color, flexibilidad, actividad de agua, humedad, pH, azúcares solubles totales, glucosa, fructosa y sacarosa. Además se cuantificó la concentración del ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido vanílico, *p*-hidroxibenzaldehído y vainillina, por cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Los resultados mostraron variación en frutos beneficiados en relación a sus propiedades fisicoquímicas. Los frutos del quimiotipo QVI cultivados en sistema de manejo de acahual tuvieron las dimensiones mayores. El contenido de vainillina presento mayor concentración en el sistema de manejo acahual. El sistema de manejo de acahual manifestó mejores condiciones de luminosidad, temperatura y humedad para el cultivo de la vainilla en la región del Totonacapan. La calidad del aroma de los frutos beneficiados de vainilla está determinada por el genotipo que define al quimiotipo a que pertenece el cultivar, y no por el manejo. Es decir, los frutos beneficiados de vainilla son más similares por su genética que determina la calidad del aroma que por el sistema de manejo en que se cultiven. El manejo afecta la intensidad de la calidad del aroma, así el fruto beneficiado del quimiotipo QI, que ha estado sometido a cultivo por un menor tiempo, mostró variación en las características de aroma en función del sistema de manejo. El quimiotipo QVI, que ha sido cultivado con mayor frecuencia, expresó su aroma de forma similar en diferentes ambientes.

Palabras clave: Aroma, características fisicoquímicas, frutos, sistema de manejo, *Vanilla planifolia*.

PHYSICOCHEMICAL AND AROMATIC CHARACTERISTICS IN CURED FRUITS OF  
*Vanilla planifolia* Jacks. Ex Andrews FROM THE TOTONACAPAN REGION, MEXICO.

Abstract

In the region of Totonacapan there are different aromas and management systems for the growing vanilla. The study aimed to evaluate the influence of the crop management system, in acahual and mesh shade of two vanilla chemotypes (QI and QVI) on the physicochemical and aromatic properties of the fruits of the Totonacapan region, México. From each management system and chemotype, fruits of 32 weeks were obtained and the same curing master cured them during 14 weeks. In the cured fruits, their physicochemical properties were determined: length, width, thickness, color, flexibility, water activity, humidity, pH, total soluble sugars, glucose, fructose and sucrose. In addition, the concentration of *p*-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, *p*-hydroxybenzaldehyde and vanillin was quantified by high-pressure liquid chromatography (HPLC). The data showed variation in cured fruits in relation to their physicochemical properties. The fruits of QVI chemotype grown in acahual management system had the highest dimensions. The vanillin content showed greater concentration in the acahual management system. The acahual management system showed better conditions of luminosity, temperature and humidity for the cultivation of vanilla in the Totonacapan region. The aroma quality of the cured vanilla fruits is determined by the genotype that defines the chemotype to which the cultivar belongs, and not by the management. Thereby, the cured vanilla fruits are more similar because of their genetics that determine the quality of the aroma than the management system in which they are grown. The management affects the intensity of the quality of the aroma, thus the cured fruit of the QI chemotype, which has been subjected to cultivation for a shorter time, showed variation in the aroma characteristics depending on the management system. The QVI chemotype, which has been cultivated most frequently, expressed its aroma similarly in different environments.

Key words: Aroma, physicochemical characteristics, fruits, management system, *Vanilla planifolia*.

## 2.1 INTRODUCCIÓN

En la naturaleza las plantas están expuestas a factores bióticos y abióticos con los cuales han co-evolucionado, y la presión ejercida a lo largo del proceso evolutivo desarrolla rutas de biosíntesis a través de las cuales sintetizan y acumulan en sus órganos una gran variedad de metabolitos secundarios, a partir de los cuales se logra la base del rendimiento y calidad de productos cultivados, principal criterio para su selección y mejora (Radušienė *et al.*, 2012). Los olores en las plantas son un rasgo evolutivo, que realizan mediante la expresión de determinadas enzimas implicadas en la biosíntesis de una compleja mezcla de compuestos volátiles de bajo peso molecular (Dudareva *et al.*, 2004). Muchos de ellos desempeñan una importante función en las interacciones entre las plantas y el medio que las rodea (Austin y Ballaré, 2014).

Durante el proceso de beneficiado de la vainilla se han identificado alrededor de 200 compuestos volátiles, incluyendo ácidos, éteres, alcoholes, ésteres, fenoles, entre otros (Sinha *et al.*, 2008). De estos compuestos volátiles cuatro fenoles son reconocidos como indicadores de calidad comercial a causa de sus altas concentraciones y papel importante en el aroma: (1) la vainillina, (2) *p*-hidroxibenzaldehído, (3) ácido vanílico y (4) ácido *p*-hidroxibenzóico (Wescott *et al.*, 1994; Sostaric *et al.*, 2000; Pérez-Silva *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2006). En el beneficiado no solo se modifican propiedades químicas del fruto de vainilla sino también propiedades fisicoquímicas como color, flexibilidad, pH, actividad de agua, azúcares, entre otras (Sharma *et al.*, 2006; Luna-Guevara *et al.*, 2016).

Las propiedades fisicoquímicas y aromáticas de frutos beneficiados de vainilla han sido utilizadas como indicadores de la calidad física y organoléptica, por quien la consume tanto en fruto como alguno de los diversos subproductos, como extracto, artesanía, molida, etc. (Xochipa-

Morante *et al.*, 2016). El conocimiento de las condiciones de manejo, así como el proceso de beneficiado influyen en el aroma, ya que la variación en la calidad organoléptica está determinada por el método de curado de los frutos de vainilla (Bory *et al.*, 2008; Lubinsky *et al.*, 2008; Xochipa-Morante *et al.*, 2016).

Dentro de la región del Totonacapan el aroma ha sido el factor de selección a través de los años, lo que originó variación quimiotípica (Salazar-Rojas *et al.*, 2010) identificada con variación genética a nivel infraespecífica en el germoplasma de vainilla (Herrera-Cabrera *et al.*, 2012). En la variación equiparada el genotipo GVI correspondió al quimiotipo QI, el genotipo GV al quimiotipo QII y quimiotipo QIII, el genotipo GIV al quimiotipo QIV, el genotipo GIII al quimiotipo QVI y el genotipo GII al quimiotipo QV (Herrera-Cabrera *et al.*, 2016).

Por lo que el presente estudio tuvo como objetivo determinar la influencia del manejo de cultivo en acahual y en malla sombra en las características fisicoquímicas y aromáticas de los frutos beneficiados de dos quimiotipos (QI y QVI) de *V. planifolia* de la región del Totonacapan.

## **2.2 MATERIALES Y METODOS**

### **Material vegetal**

Se utilizaron los frutos de dos quimiotipos de vainilla (*Vanilla planifolia* J.) diferentes por sus componentes del aroma y su variación genotípica, el quimiotipo QI perteneciente al genotipo GVI caracterizado por la alta participación de los compuestos minoritarios (ácido vanílico, *p*-hidroxibenzaldehído y ácido *p*-hidroxibenzoico) y baja participación de vainillina; y el quimiotipo QVI perteneciente al genotipo GIII que se destaca por notas intensas de vainillina con una participación de medio a alto de los compuestos menores (ácido vanílico, *p*-



hidroxibenzaldehído y ácido *p*-hidroxibenzóico) (Salazar-Rojas *et al.*, 2011; Herrera-Cabrera *et al.*, 2012).

Se colectaron frutos de *V. planifolia* de 32 semanas de madurez provenientes de las localidades de la región del Totonacapan: 1° de Mayo (Quimiotipo QVI) y Puntilla Aldama (Quimiotipo QVI) del Estado de Veracruz; Finca 20 Soles (Quimiotipo QI) en Veracruz y Pantepec (Quimiotipo QI) del Estado de Puebla. Todos los frutos se sometieron a un mismo proceso de beneficiado tradicional por 14 semanas, realizado por el maestro beneficiador Don Veremundo Rodríguez para el posterior análisis de las propiedades fisicoquímicas y compuestos aromáticos (ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido vanílico, *p*-hidroxibenzaldehído y vainillina).

En el Cuadro 2.1 se describe la ubicación de recolecta de material vegetal (genotipo/quimiotipo) y condiciones ambientales en cada sistema de manejo de la vainilla en la región del Totonacapan, México.

Cuadro 2.1 Ubicación de localidades de recolecta de vainilla en la región del Totonacapan, México.

Sistema de manejo	Quimiotipo /Genotipo	Localidad/ municipio/ estado/ Coordenadas geográficas	Altitud (msnm)	Temperatura promedio (°C)	Humedad relativa (%)	Radiación interceptada (%)
Acahual	QI / GVI	Finca 20 Soles, Papantla, Veracruz. 20° 25'38.91"N, 97°18'44.47"O	180	23.5	75	79
	QVI / GIII	1° de Mayo, Papantla, Veracruz. 20°17'45.18"N, 97°15'51.96"O	100	27.5	72	60
Malla sombra	QI / GVI	Pantepec, Puebla. 20°30'17.63"N, 97°53'22.70"O	290	29.0	66	30
	QVI / GIII	Puntilla Aldama, San Rafael, Veracruz. 20°14'4.49"N, 96°54'13.75"O	12	22.5	90	45

### Características fisicoquímicas de frutos beneficiados

Los frutos beneficiados fueron evaluados en sus características fisicoquímicas de acuerdo a los siguientes procedimientos:

Dimensiones (largo, ancho y grosor en milímetros). Se determinó en nueve frutos de cada quimiotipo y sistema de manejo, con un vernier digital (Digimatic Caliper Mitutoyo/ZEROABS).

Color ( $L^*$ , ángulo hue y croma). Se determinó de la parte media de nueve frutos de cada quimiotipo y sistema de manejo, utilizando un colorímetro (Hunterlab, ColorFlex-45, VA, EUA) (Francis y Clydesdale 1975; McLaren 1976). Con los valores de  $a^*$  y  $b^*$  se calculó el ángulo hue ( $h^\circ$ ) y la pureza del color representado por croma ( $C^*$ ), mediante las formulas de las ecuaciones 1 y 2:

Ángulo hue ( $h^\circ$ ), corresponde al atributo cualitativo de la coloración, y se calculó por la ecuación (1):

$$h^\circ = \tan^{-1} \left( \frac{b^*}{a^*} \right) \text{ (Ecuación 1)}$$

Croma ( $C^*$ ), es el grado de diferencia de un tono en comparación con un color gris con la luminosidad, se calculó con la ecuación (2):

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \text{ (Ecuación 2)}$$

Flexibilidad. Se determinó como la fuerza necesaria para doblar el fruto ( $\text{Kg}^F$ ) utilizando un texturómetro TA.XT plus (Texture Technologies, Surrey, UK) y un punzón cilíndrico de 20 mm de diámetro TA-212. Las pruebas se realizaron en cuatro frutos enteros de cada quimiotipo y sistema de manejo a una velocidad de  $5.0 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$  con un recorrido final de 10 mm.

Actividad de agua. Se determinó en cuatro frutos de cada quimiotipo y sistema de manejo de cultivo, a partir de un corte de la sección media de fruto beneficiado, a través de un higrómetro de punto de rocío Decagon Aqualab Serie 3 (Decagon Lab).

pH. Se determinó directamente en la parte media de cuatros frutos beneficiados de cada quimiotipo y sistema de manejo, mediante un electrodo de contacto (HANNA Instruments, WPA CD310).

Porcentaje de humedad. Se determinó en cuatros frutos beneficiados de cada quimiotipo y sistema de manejo por medio del método de estufa de aire (AOAC 930.15).

Azúcares solubles totales (AST). Se determinaron por medio del método de Antrona de acuerdo con Montreuil *et al.* (1997) con modificaciones para un micro-método. Se utilizaron seis frutos de cada quimiotipo y sistema de manejo. De cada fruto se pesaron 100 mg, y se adiciono 5 ml de etanol al 80 %, y se llevó a baño maría con temperatura de 70 °C, este proceso se repitió cinco veces sucesivamente y los extractos obtenidos se conjuntaron en un frasco y se colocaron en una estufa a 50 °C por 24 h hasta sequedad del extracto, el cual posteriormente se re-suspendió en 1 mL de agua destilada. Esta muestra se mantuvo en almacenamiento a -20 °C hasta el análisis.

Para el ensayo del análisis se realizaron diluciones de 1:100 (12 µL de extractos y 1188 µL de agua destilada) de los extractos, con la finalidad de que la concentración quedara dentro de la curva de calibración realizada con glucosa. Posteriormente se tomaron 600 µL de las diluciones y se agregaron 600 µL de agua destilada. Para realizar el ensayo se tomaron 3 mL de reactivo de antrona y se agregaron a los extractos en hielo por 5 min para después transferirlos a baño maría por 10 min. Por último antes de la lectura se colocaron los extractos nuevamente en hielo por 5 min. Las determinaciones de azúcares solubles totales se detectaron mediante un

espectrofotómetro UV-Vis (Evolution 300, Thermo Scientific) a una absorbancia de 625 nm, utilizando glucosa como estándar para la curva de calibración en un rango de concentración de 0-250  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Los contenidos de azúcares fueron expresados en  $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  de MS.

Determinación de glucosa, fructosa y sacarosa por método enzimático. Se utilizó el mismo extracto que para azúcares solubles totales. Glucosa, fructosa y sacarosa se cuantificaron de manera secuencial mediante curvas estándares de calibración preparadas previamente (Scholes *et al.*, 1994). Para su lectura se realizaron diluciones de 1:10 de las extracciones para que estas quedaran dentro de la curva de calibración. Para cada estándar de glucosa, fructosa y sacarosa se hizo una solución stock con 15 mg de cada azúcar que se disolvieron en 6 mL de agua destilada para tener una concentración de  $2.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . De esta solución se colocaron 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100  $\mu\text{L}$  en tubos eppendorf, los cuales se aforaron a 1000  $\mu\text{L}$  con agua destilada. Para obtener las concentraciones de 0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225 y 250  $\mu\text{g}$ .

Para medir los azúcares solubles de cada ensayo se colocaron 200  $\mu\text{L}$  de amortiguador HEPES 100 mM (pH 7.5), 10  $\mu\text{L}$  de NAD 40 mM (Sigma), 10  $\mu\text{L}$  de ATP 100 mM pH 7 (Sigma), 10  $\mu\text{L}$  de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Roche), y 10  $\mu\text{L}$  de la muestra del extracto de cada muestra o 10  $\mu\text{L}$  de la solución de estándares.

Para la evaluación de glucosa, a cada ensayo se adicionó 10  $\mu\text{L}$  de hexocinasa (0.05 U por 1  $\mu\text{L}$  de amortiguador HEPES) (Roche) y se dejó actuar durante 20 min antes de hacer la lectura a 340 nm. El contenido de fructosa se determinó después de agregarle 10  $\mu\text{L}$  de fosfoglucoisomerasa (0.06 U por 1  $\mu\text{L}$  de amortiguador HEPES) (Roche) y 20 min después se tomó la lectura. Finalmente para la determinación de sacarosa se adicionaron 10  $\mu\text{L}$  de invertasa (0.8 U por 1  $\mu\text{L}$  de amortiguador HEPES) (Sigma) y se dejó 20 min a temperatura ambiente antes de registrar la

lectura. Para todas las lecturas se utilizó un espectrofotómetro lector de microplacas (Multiskan Ascent, Labasystem, Thermo). Los resultados obtenidos se expresaron en porcentaje (%) con base a materia seca ( $\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$  de MS).

### **Componentes del aroma de frutos beneficiados.**

Se realizó la cuantificación de los principales compuestos aromáticos responsables del aroma de la vainilla: ácido *p*-hidroxibenzóico (C1), ácido vanílico (C2), *p*-hidroxibenzaldehído (C3) y vainillina (C4), por medio de HPLC de los frutos beneficiados provenientes del ejido 1° Mayo, Papantla, Veracruz, finca 20 Soles, Papantla, Veracruz, Puntilla Aldama Veracruz y Pantepec, Puebla; de acuerdo con el procedimiento de Cicchetti y Chaintreau (2009). Así como los índices propuestos por Salazar-Rojas *et al.* (2012) que relacionan el contenido de compuestos minoritarios con la vainillina para inferir si existe relación entre la concentración de los diferentes compuestos: la sumatoria de compuestos minoritarios ( $\sum\text{CM} = \text{C1} + \text{C2} + \text{C3}$ ); la interacción de los compuestos minoritarios en proporción al contenido de vainillina ( $\text{C1}/\text{C4}$ ,  $\text{C2}/\text{C4}$ ,  $\text{C3}/\text{C4}$ ,  $\text{C1} + \text{C2}/\text{C4}$ ) y la proporción total de los compuestos minoritarios entre el contenido de vainillina ( $\sum\text{CM}/\text{C4}$ ).

La extracción consistió en triturar individualmente cuatro frutos secos beneficiados de cada quimiotipo y sistema de manejo en un molino marca Kurps Gx4100 con 25000 rpm. Posterior se pesó 0.05 g de cada muestra molida agregando 18 mL de solución etanol-agua (1:1) grado HPLC, agitarlo, 24 horas después se toma 1 mL del extracto con un jeringa, se filtra con un acrodisco de 0.45  $\mu\text{m}$  (PALL Life Sciences, membrana GHP, 13 mm), y 10  $\mu\text{L}$  de cada muestra se inyecta a un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) serie 200 marca Perkin Elmer, utilizando una fase móvil de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0.01M: metanol (75:25). Se usó el software

TotalChrom® Chromatography Data System (CDS) con un tiempo de cada corrida de 28 minutos a una temperatura de 30 °C con una columna Perkin Elmer®, C18 5®, 250x4.6mm.

### **Análisis estadístico**

Se realizó un diseño estadístico donde se consideró a frutos beneficiados de cada quimiotipo y sistema de manejo, como fuente de variación. Se evaluaron las variables fisicoquímicas: azúcares solubles totales, sacarosa, fructosa y sacarosa, pH, % de humedad, Actividad de agua (Aw), Flexibilidad, Largo, Ancho, Grosor, relaciones Flexibilidad/Largo, Flexibilidad/Ancho y Flexibilidad/Grosor, variables referentes a color Luminosidad, Chroma y Hue, y compuestos aromáticos: ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido vanílico, *p*-hidroxibenzaldehído y vainillina. Los datos fueron analizados mediante un diseño completamente al azar, desbalanceado (PROC GLM, SAS, 2002).

La comparación de medias entre frutos beneficiados de cada quimiotipo y sistema de manejo se realizó mediante la prueba de Tukey. La estadística multivariada se realizó mediante los análisis de componentes principales (ACP) y conglomerados (clusters) con distancias euclidiana y ligamento promedio como medida de distancia y método de agrupamiento, por medio de paquete estadístico SAS V9.0 (SAS, 2002).

## **2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### ***Efecto del tratamiento sobre las propiedades fisicoquímicas***

El análisis de varianza realizado para valorar el efecto del sistema de manejo en las características fisicoquímicas de los frutos beneficiados del quimiotipo QI y quimiotipo QVI, indico que para la mayoría de las variables evaluadas hubo diferencias estadísticas ( $P < 0.05$ ),

entre sistemas de manejo, entre quimiotipos y en la interacción sistema de manejo x quimiotipo. Cabe destacar que los coeficientes de variación tuvieron en general valores bajos, en un rango entre 0.99 y 16.22 % (Cuadro 2.2).

Los frutos beneficiados tuvieron una amplia variación en relación con sus propiedades fisicoquímicas, ocasionados probablemente por la diversidad de ambiente y condiciones de manejo existentes dentro de los diferentes sistemas de manejo en la región del Totonacapan (Cuadro 2.3). Montoya (2010) menciona que un determinado quimiotipo puede tener una calidad aromática similar pero en cuanto a propiedades fisicoquímicas, éstas pueden variar por la condición propia del manejo como luz, temperatura, etc. En vainilla se debe tener en cuenta que la calidad aromática, especialmente el contenido del vainillina, está determinada genéticamente (Ranadive, 1992; Sánchez *et al.*, 2001; Salazar-Rojas *et al.*, 2012), sin embargo las propiedades fisicoquímicas de los frutos beneficiados pueden ser afectados por factores ambientales, en el caso del tamaño de los frutos (Hernández-Hernández *et al.*, 2011). Por lo que este cultivo depende en gran medida del manejo adecuado de la luz, ya que es el factor ambiental con mayor influencia sobre la fotosíntesis de las plantas y por lo tanto sobre su crecimiento, su supervivencia y, la adecuada aclimatación en diferentes hábitats (Puthur, 2005).



Cuadro 2.2 Medias, coeficientes de variación y cuadrados medios de las características fisicoquímicas de frutos beneficiados de *Vanilla planifolia* de la región del Totonacapan, México.

Variables	Media	CV (%)	Cuadrados medios			
			Sistema de manejo	Quimiotipo	SistMan * Quimiotipo	Error
AST (%)	23.32	13.98	171.27***	174.90***	169.46***	10.63
Glucosa (%)	12.05	13.77	29.26***	28.32*	29.74**	2.75
Fructosa (%)	5.97	16.22	9.05***	13.06**	7.05*	0.94
Sacarosa (%)	5.51	15.95	26.26***	9.46**	34.67***	0.87
pH	4.43	3.39	0.08*	0.09 <sup>NS</sup>	0.07 <sup>NS</sup>	0.02
Humedad (%)	41.09	7.73	13.73 <sup>NS</sup>	10.97 <sup>NS</sup>	15.12 <sup>NS</sup>	10.1
Aw	0.84	0.99	0.0002 <sup>NS</sup>	0.0004*	0.0001 <sup>NS</sup>	0.00007
Flexibilidad	111.34	7.87	1250.83**	406.02*	1673.24***	76.8
Largo (mm)	179.68	3.99	1034.52***	1740.97***	681.30**	51.6
Ancho (mm)	6.58	10.73	2.91*	3.27*	2.73*	0.49
Grosor (mm)	3.45	7.65	1.04**	1.45**	0.83**	0.07
Flexibilidad/Largo	0.62	8.23	0.01*	0.001 <sup>NS</sup>	0.01*	0.003
Flexibilidad/Ancho	17.05	11.64	13.16 <sup>NS</sup>	3.90 <sup>NS</sup>	17.78*	3.94
Flexibilidad/Grosor	32.42	11.44	24.03 <sup>NS</sup>	41.08 <sup>NS</sup>	15.51 <sup>NS</sup>	13.77
L*	19.37	4.73	7.37***	20.94***	0.59 <sup>NS</sup>	0.84
Croma	4.38	9.83	5.52***	6.94***	4.80***	0.18
Ángulo hue	230.51	1.72	28.09 <sup>NS</sup>	22.50 <sup>NS</sup>	30.89 <sup>NS</sup>	15.76

\* =  $P \leq 0.05$ ; \*\* =  $P \leq 0.001$  \*\*\* =  $P \leq 0.0001$ ; NS = no significativo. SisMan = Sistema de manejo, CV = coeficiente de variación.

Los valores más altos de azúcares solubles totales (AST) y de los azúcares glucosa, fructosa y sacarosa se presentaron en el sistema de manejo en acahual en el quimiotipo QI (Cuadro 2.3).

Los azúcares en las plantas se originan de la fotosíntesis y son los principales compuestos químicos que almacenan la energía radiante del sol (BeMiller y Huber, 2017). Sin embargo, las

temperaturas altas pueden dañar los componentes fotosintéticos de las hojas y reducir la tasa de asimilación de dióxido de carbono, en comparación con los ambientes que tienen temperaturas óptimas. La sensibilidad de la fotosíntesis al calor, se debe principalmente al daño de los componentes del fotosistema II (membranas de tilacoides del cloroplasto) y a la alteración en las propiedades de la membrana (Al-Khatib y Paulsen, 1999). Lo anterior se comprueba tomando como base la radiación interceptada en el sistema de malla sombra para el quimiotipo QI que fue de 30 % y para el quimiotipo QVI de 45 %, en comparación con el sistema de acahual que tuvo 79 % en el quimiotipo QI y 60 % en el quimiotipo VI (Cuadro 2.1). Esto pudo haber propiciado que los azúcares, fructosa y sacarosa, en el sistema de manejo de malla sombra que tuvo una intensidad mayor de radiación solar, afectará la síntesis de azúcares por la condición de estrés lumínico en el ambiente.

El pH presentó un rango estrecho de valores entre 4.23 y 4.57 (Cuadro 2.3), y aunque los frutos del quimiotipo QI cultivados en el sistema de manejo de malla sombra tuvieron el valor de pH más alto, solo fue significativamente superior al valor de pH del quimiotipo QVI cultivado también en malla sombra. Lo que muestra que este sistema de manejo afecta esta variable en función del quimiotipo.

El contenido de humedad no manifestó diferencia entre condiciones de manejo y quimiotipos, a pesar de que se obtuvieron valores altos con intervalo de 38.34 a 42.24 % (Cuadro 2.3), en relación con la norma NOM-182-SCFI-2011, que señala un intervalo en el porcentaje de humedad de 25-38 %. La  $A_w$  de los frutos beneficiados mostro un rango muy reducido (0.83 a 0.85) (Cuadro 2.3), solo los frutos del quimiotipo QI de sistema de manejo en malla sombra tuvieron una  $A_w$  menor que los del quimiotipo QVI de ambos sistemas de manejo de cultivo.

La flexibilidad de los frutos mostró un intervalo amplio (96.52-136.25 Kg<sup>F</sup>) (Cuadro 2.3), al igual que las dimensiones de largo (170.25-203.12 mm), ancho (5.77-7.78 mm) y grosor (2.97-4.17 mm) (Cuadro 2.4). Particularmente, los frutos beneficiados del quimiotipo QVI mostraron los valores más altos en el sistema de producción en acahual.

Por lo que el sistema de acahual al tener una cantidad de radiación interceptada mayor ocasiona condiciones óptimas para el proceso de fotosíntesis y un crecimiento adecuado de frutos en comparación con el sistema de producción en malla sombra. Esto coincide con lo mencionado por Diez *et al.* (2017), quienes plantean que las condiciones ambientales del sistema de acahual como la vegetación secundaria, la captura de agua, captura de carbono y luminosidad propician un adecuado crecimiento de la planta de vainilla en comparación con el sistema de producción en malla sombra.

Los índices flexibilidad en relación con largo, ancho y grosor (Cuadro 2.4), muestra indirectamente la deformación del fruto beneficiado y el retorno a su forma original en relación con sus dimensiones. Los índices flexibilidad/ancho y flexibilidad/grosor no mostraron diferencia significativa entre quimiotipos ni en las condiciones de manejo de cultivo evaluadas. El índice de flexibilidad/largo tuvo su valor más alto en el quimiotipo QVI cultivado en el sistema de acahual, a su vez cabe destacar que esta condición de manejo también mostro el valor de largo mayor entre las demás condiciones. Por lo que el sistema de acahual no solo propicio frutos más largos sino una flexibilidad adecuada.

El valor de luminosidad (Cuadro 2.4) fue mayor en los frutos beneficiados del quimiotipo QVI, en ambos sistemas de manejo, que refleja frutos con una apariencia de mayor brillo. La evaluación de Cromo, definido como el grado de diferencia de un tono en comparación con un

color gris con la luminosidad, es decir la saturación del color, mostró a los frutos del sistema de manejo de malla sombra de quimiotipo QVI como aquellos con mayor intensidad del color, mientras que los frutos de quimiotipo QI en el mismo sistema de manejo, manifestaron el valor más bajos, es decir, estos frutos tienen tonos más grises y por tanto, son frutos con color opaco (menos brillantes) (Cuadro 2.4).

La variable del ángulo Hue, definido como el ángulo de tono o la pureza del color, no manifestó variación en las diferentes condiciones de manejo en los quimiotipos, sin embargo, los valores medios de ambos quimiotipos en la condición de acahual fue menor en comparación con los frutos cultivados en el sistema de malla sombra, por lo que los frutos en acahual presentaron un color más claro (228.89-229.31), mientras que los frutos en malla sombra fueron más oscuros (230.20-233.65) (Cuadro 2.4).

Cuadro 2.3 Promedio de características fisicoquímicas de frutos beneficiados de dos quimiotipos de *Vanilla planifolia* en dos sistemas de manejo de cultivo de la región del Totonacapan, México.

Sistema de manejo	Quimiotipo	AST (%)	Glucosa (%)	Fructosa (%)	Sacarosa (%)	pH	Humedad (%)	Aw	Flexibilidad (Kg <sup>F</sup> )
Acahual	QI	29.56 <sup>a</sup>	14.46 <sup>a</sup>	7.44 <sup>a</sup>	7.88 <sup>a</sup>	4.44 <sup>ab</sup>	41.60 <sup>a</sup>	0.84 <sup>ab</sup>	101.44 <sup>b</sup>
	QVI	19.52 <sup>b</sup>	10.16 <sup>b</sup>	5.55 <sup>b</sup>	4.38 <sup>c</sup>	4.47 <sup>ab</sup>	38.34 <sup>ab</sup>	0.85 <sup>a</sup>	136.25 <sup>a</sup>
Malla sombra	QI	21.48 <sup>b</sup>	11.42 <sup>b</sup>	5.72 <sup>b</sup>	4.16 <sup>c</sup>	4.57 <sup>a</sup>	42.24 <sup>a</sup>	0.83 <sup>b</sup>	111.17 <sup>b</sup>
	QVI	22.70 <sup>b</sup>	12.16 <sup>b</sup>	5.18 <sup>b</sup>	5.61 <sup>b</sup>	4.23 <sup>b</sup>	41.18 <sup>a</sup>	0.85 <sup>a</sup>	96.52 <sup>b</sup>
	DMS	4.16	2.12	1.23	1.19	0.31	6.67	0.01	18.39

Letras diferentes en cada columna indican diferencia significativa Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

Cuadro 2.4 Promedio de características físicas de frutos beneficiados de dos quimiotipos de *Vanilla planifolia* en dos sistemas de manejo de cultivo de la región del Totonacapan, México.

Sistema de manejo	Quimiotipo	Largo (mm)	Ancho (mm)	Grosor (mm)	Flexibilidad / Largo	Flexibilidad / Ancho	Flexibilidad / Grosor	L*	Croma	Hue
Acahual	QI	168.25 <sup>b</sup>	6.48 <sup>ab</sup>	2.97 <sup>b</sup>	0.60 <sup>ab</sup>	15.79 <sup>a</sup>	34.64 <sup>a</sup>	18.42 <sup>b</sup>	4.57 <sup>b</sup>	228.89 <sup>a</sup>
	QVI	203.12 <sup>a</sup>	7.78 <sup>a</sup>	4.17 <sup>a</sup>	0.67 <sup>a</sup>	17.73 <sup>a</sup>	32.69 <sup>a</sup>	20.62 <sup>a</sup>	4.40 <sup>b</sup>	229.31 <sup>a</sup>
Malla sombra	QI	170.25 <sup>b</sup>	5.77 <sup>b</sup>	3.33 <sup>b</sup>	0.65 <sup>ab</sup>	19.30 <sup>a</sup>	33.41 <sup>a</sup>	18.46 <sup>b</sup>	3.12 <sup>c</sup>	230.20 <sup>a</sup>
	QVI	177.10 <sup>b</sup>	6.29 <sup>b</sup>	3.34 <sup>b</sup>	0.55 <sup>b</sup>	15.39 <sup>a</sup>	28.95 <sup>a</sup>	20.00 <sup>a</sup>	5.44 <sup>a</sup>	233.65 <sup>a</sup>
	DMS	15.08	1.48	0.55	0.10	4.17	7.79	1.48	0.69	6.41

Letras diferentes en cada columna indican diferencia significativa Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

### ***Distribución de la variación de las propiedades fisicoquímicas***

La dispersión de los cuatro tratamientos de sistema de manejo de cultivo y quimiotipos de *V. planifolia* representada en el espacio determinado por los tres primeros componentes principales, explicó en conjunto 100 % de la variación global acumulada para las 12 variables estudiadas (Cuadro 2.5). Con el primer componente (CP1) se explicó 46 % de la variación total de las propiedades fisicoquímicas relacionadas con el contenido de glucosa, flexibilidad, largo y grosor de los frutos beneficiados. El segundo componente (CP2) explicó 34 % de la variación total y estuvo determinado por el pH,  $A_w$ , relación flexibilidad/grosor, así como el valor del índice de color Croma. El tercer componente principal (CP3) explicó 20 % de la variación y se definió por el contenido de fructosa, sacarosa, ancho y el ángulo Hue (Cuadro 2.5).

De acuerdo con la distribución espacial de los primeros tres componentes principales, se distinguieron cuatro grupos (Figura 2.1). Con base en el CP1 el tratamiento con mayor proporción de azúcares solubles totales, glucosa, flexibilidad, largo y grosor se colocaron en el lado superior del gráfico (Grupo I), representando por el sistema de manejo de acahual del quimiotipo QVI; mientras que los grupos que presentaron una menor cantidad se colocaron en el lado negativo (Grupo II, III y IV). El CP2 reunió los valores de pH,  $A_w$ , la relación entre flexibilidad y grosor e índice de color Croma, en el cuadrante positivo donde se exhiben los valores positivos se localizaron los grupos III y IV, integrados por los sistemas de manejo en acahual y malla sombra del quimiotipo QI; mientras en el cuadrante negativo se apreciaron los grupos I y II compuestos por los sistemas de manejo de acahual y malla sombra del quimiotipo QVI. El CP3 representa los valores de fructosa, ancho y ángulo Hue donde los grupos I, III y IV en la sección positiva mostraron un mayor contenido de estas variables; mientras en el eje negativo el grupo II mostro un menor contenido.

Cuadro 2.5 Valores propios, vectores propios y proporción acumulada de la variación explicada por cada variable en las primeras tres primeras dimensiones de la caracterización de las propiedades fisicoquímicas de los cuatro tratamientos de *V. planifolia*.

Variables	Componente principal (CP)		
	CP1	CP2	CP3
AST (%)	-0.305182	0.077154	0.264907
Glucosa (%)	<b>-0.332151</b>	0.049945	0.188968
Fructosa (%)	-0.199167	0.204189	<b>0.365825</b>
Sacarosa (%)	-0.283161	-0.020562	<b>0.332182</b>
pH	0.123021	<b>0.38934</b>	-0.001182
Humedad (%)	-0.291761	0.043654	-0.310015
$A_w$	-0.006201	<b>-0.356561</b>	0.279649
Flexibilidad	<b>0.33605</b>	0.073806	0.156275
Largo (mm)	<b>0.31659</b>	-0.141267	0.170424
Ancho (mm)	0.242203	-0.122753	<b>0.368108</b>
Grosor (mm)	<b>0.345683</b>	-0.091922	0.060944
Flexibilidad/Largo	0.260465	0.272131	0.104948
Flexibilidad/Ancho	0.208783	0.28962	-0.225879
Flexibilidad/Grosor	-0.005937	<b>0.363718</b>	0.2631
$L^*$	0.239149	-0.303555	0.067536
Croma	-0.099354	<b>-0.376197</b>	0.173051
Ángulo hue	-0.080906	-0.309826	<b>-0.342316</b>
Autovalor	7.85380292	5.81277838	3.3334187
Proporción	0.462	0.3419	0.1961
Acumulada	0.462	0.8039	1

Los valores en negritas indican las variables que influyen más en cada uno de los componentes principales.

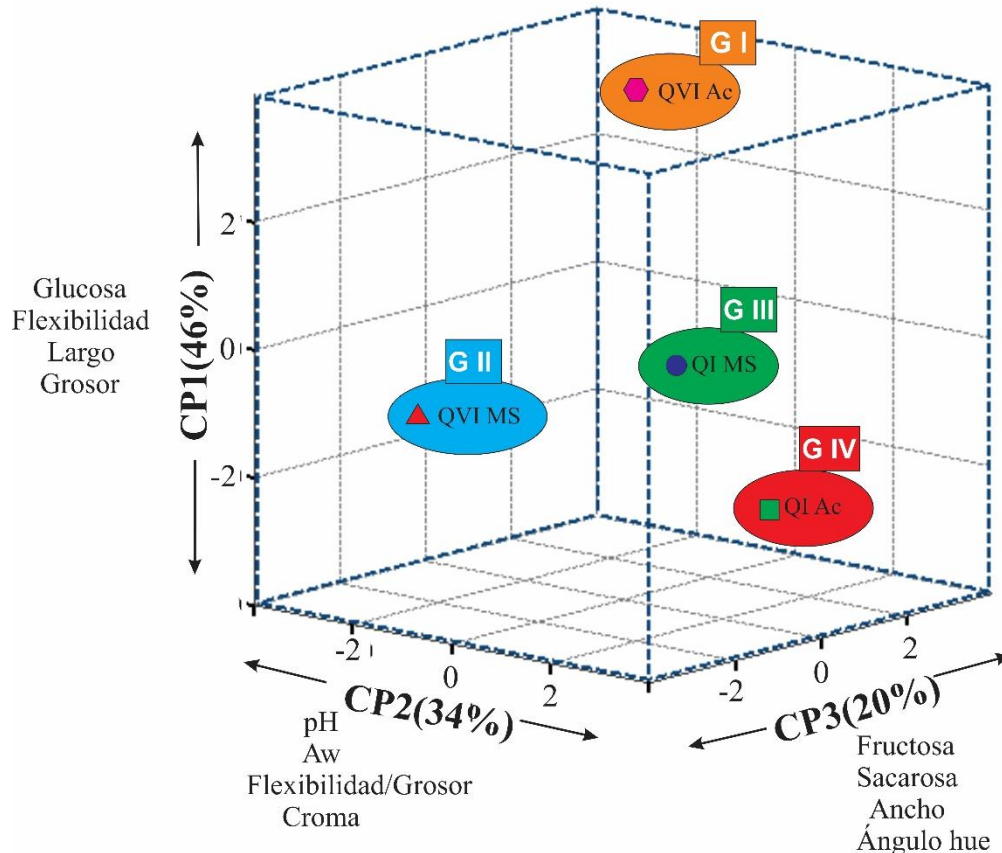


Figura 2.1 Dispersión de los sistemas de manejo de cultivo y quimiotipos de *Vanilla planifolia* con base en los tres primeros componentes principales del análisis de 12 variables agrupadas por medias. QI Ac: Quimiotipo QI en acahual, QI MS: Quimiotipo QI en malla sombra, QVI Ac: Quimiotipo QVI en acahual, QVI MS: Quimiotipo QVI en malla sombra.

### ***Agrupamiento de la variación***

El análisis de conglomerados mostró que los diferentes sistemas de manejo de cultivo y la variación de los quimiotipos de *V. planifolia* respondieron al patrón de agrupamiento observado mediante análisis de componentes principales. En conjunto con el diagrama de clúster con una línea de corte de 0.9 se muestra que fueron diferentes las propiedades fisicoquímicas de los frutos beneficiados provenientes de los diferentes sistemas de manejo (Figura 2.2). Se observó que lo que agrupa por similitud a los frutos beneficiados es el quimiotipo al que pertenece el



cultivar, y no el diferente manejo. Es decir los frutos beneficiados de vainilla son más similares por su genética que determina las propiedades fisicoquímicas, que por el sistema de manejo en que se cultiven.

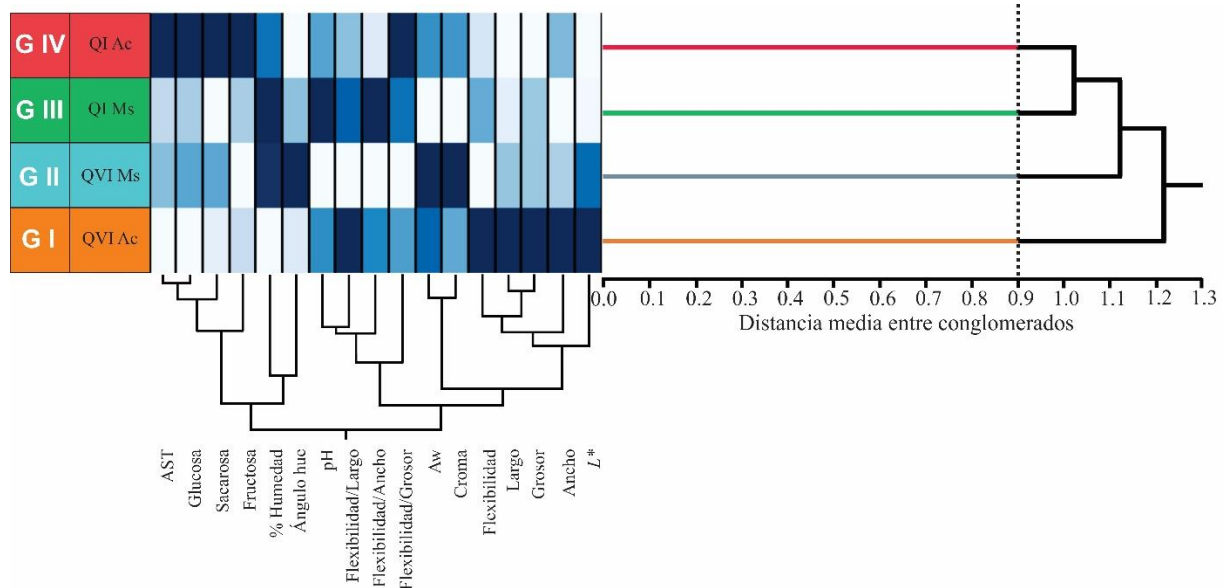


Figura 2.2 Dendrograma de los sistemas de manejo de cultivo y quimiotipos de *Vanilla planifolia* con base en las propiedades fisicoquímicas en la Región del Totonacapan, México. QI Ac: Quimiotipo QI en acahual, QI MS: Quimiotipo QI en malla sombra, QVI Ac: Quimiotipo QVI en acahual, QVI MS: Quimiotipo QVI en malla sombra.

### ***Efecto del tratamiento en la concentración de compuestos del aroma***

La calidad aromática comercial de la vainilla (*Vanilla planifolia* J.) está determinada por tres compuestos fenólicos minoritarios (CM): ácido *p*-hidroxibenzóico (C1), ácido vanílico (C2), *p*-hidroxibenzaldehído (C3), estos primeros tres son denominados compuestos minoritarios (CM); y la vainillina (C4).

El análisis del efecto del sistema de manejo de cultivo y quimiotipos de *V. planifolia* sobre la concentración de compuestos aromáticos mostró coeficientes de variación (CV) entre 6.3 y 14.5

%). En todas las variables analizadas se observaron diferencias significativas ( $p < 0.0001$ ) (Cuadro 2.6). Al respecto Ranadive (1992) señala que los compuestos responsables del aroma de la vainilla en los frutos beneficiados de vainilla son influenciados cuando se cultiva en diferentes regiones, y que el ácido vanílico y vainilla son los compuestos más sensibles a estos cambios.

Con respecto al quimiotipo el compuestos del aroma vainillina (C4) y el índice sumatoria de ácido *p*-hidroxibenzóico y ácido vanílico respecto a la vainillina ( $C1+C2/C4$ ) no presentaron diferencia significativa. Lo anterior pudo deberse a las características propias de cada quimiotipo que existe en la región del Totonacapan. La relación entre sistema de manejo y quimiotipo también mostró diferencia significativa en la mayoría de los compuestos responsables del aroma de la vainilla, con excepción en ácido *p*-hidroxibenzoico (C1), ácido vanílico (C2), sumatoria de compuestos minoritarios y su relación respecto a vainillina ( $\sum CM/C4$ ) y la relación de ácido *p*-hidroxibenzoico respecto a vainillina (C1/C4).

Cuadro 2.6 Medias, coeficientes de variación y cuadrados medios de compuestos del aroma e índices de proporción y propiedades fisicoquímicas de frutos beneficiados de *Vanilla planifolia* de la región del Totonacapan, México. C1: ácido *p*-hidroxibenzóico, C2: ácido vanílico, C3: *p*-hidroxibenzaldehído, C4: vainillina,  $\Sigma$ CM: Compuestos Minoritarios (C1+C2+C3).

Variables	Media (ppm)	CV (%)	Cuadrados medios			
			Sistema de manejo	Quimiotipo	SistMan* Quimiotipo	Error
<i>Compuestos del aroma e índices de proporción</i>						
C1	284.34	11.53	9992.42**	26122.80**	1927.23 <sup>NP</sup>	1076.49
C2	736.84	13.1	58017.86*	103334.12*	35359.73 <sup>NP</sup>	9319.51
C3	740.09	10.25	255994.81***	606932.14***	80526.15**	5765.35
C4	20274.15	6.5	21144433.51***	7572348.20 <sup>NS</sup>	27930476.16**	17412.64
$\Sigma$ CM	1761.28	6.31	161046.49***	383442.38***	49848.55*	12359.98
$\Sigma$ CM/C4	0.087	8.34	0.0006***	0.001***	0.0001 <sup>NP</sup>	0.00005
C1/C4	0.014	11.55	0.00003***	0.0001***	0.000004 <sup>NP</sup>	0.000002
C2/C4	0.036	14.57	0.0002**	0.0001*	0.0003**	0.00006
C3/C4	0.037	10.61	0.0006***	0.002***	0.00005*	0.00001
C1+C2/C4	0.05	11.8	0.0002*	0.00001 <sup>NP</sup>	0.0003**	0.00003

\* =  $P \leq 0.05$ ; \*\* =  $P \leq 0.001$  \*\*\* =  $P \leq 0.0001$ ; NS = no significativo. SisMan = Sistema de manejo, CV= coeficiente de variación.

De acuerdo con los resultados del análisis de Tukey (Cuadro 2.7), se observa que el compuesto en menor concentración fue el ácido *p*-hidroxibenzóico (C1) con valores promedios entre 222.51 a 329.53 ppm; el *p*-hidroxibenzaldehído (C3) presento los valores más altos en frutos pertenecientes a quimiotipo QVI en acahual y quimiotipo QVI en malla sombra. El valor más alto de vainillina (C4) lo presento los frutos de quimiotipo QI en acahual, seguido de quimiotipo QVI en acahual. Con estos resultados se debe tener en cuenta que la calidad aromática de la vainilla, especialmente el contenido del vainillina, está directamente relacionado con diversos

factores como el ambiente, madurez del fruto, tipo de beneficiado, pero sobre todo por los criterios de selección de los productores respecto al aroma y los diferentes sistemas de cultivo (Ranadive, 1992; Sánchez *et al.*, 2001; Salazar-Rojas *et al.*, 2012; Xochipa-Morante *et al.*, 2016; Diez *et al.*, 2017). Cabe destacar que los frutos beneficiados que presentaron un mayor contenido de compuestos minoritarios fueron los del quimiotipo QVI, en ambos sistemas producción, acahual y malla sombra (Cuadro 2.7).

Cuadro 2.7 Promedio de los compuestos del aroma e índices de proporción de frutos beneficiados de *Vanilla planifolia* de la región del Totonacapan, México.

Sistema de manejo	Quimiotipo	C1 (ppm)	C2 (ppm)	C3 (ppm)	C4 (ppm)	ΣCM (ppm)	ΣCM/C4	C1/C4	C2/C4	C3/C4	C1+C2/C4
Acahual	QI	265.36 <sup>ab</sup>	738.94 <sup>ab</sup>	684.38 <sup>b</sup>	23487.5 <sup>a</sup>	1688.68 <sup>bc</sup>	0.07 <sup>b</sup>	0.01 <sup>c</sup>	0.03 <sup>b</sup>	0.03 <sup>b</sup>	0.04 <sup>b</sup>
	QVI	319.97 <sup>a</sup>	708.57 <sup>ab</sup>	963.08 <sup>a</sup>	20363.9 <sup>b</sup>	1991.62 <sup>a</sup>	0.10 <sup>a</sup>	0.02 <sup>a</sup>	0.04 <sup>b</sup>	0.05 <sup>a</sup>	0.05 <sup>ab</sup>
Malla sombra	QI	222.51 <sup>b</sup>	895.49 <sup>a</sup>	406.28 <sup>c</sup>	18436.7 <sup>b</sup>	1524.28 <sup>c</sup>	0.08 <sup>ab</sup>	0.01 <sup>b</sup>	0.05 <sup>a</sup>	0.02 <sup>b</sup>	0.06 <sup>a</sup>
	QVI	329.53 <sup>a</sup>	604.40 <sup>b</sup>	906.63 <sup>a</sup>	18808.5 <sup>b</sup>	1840.56 <sup>ab</sup>	0.10 <sup>a</sup>	0.02 <sup>a</sup>	0.03 <sup>b</sup>	0.05 <sup>a</sup>	0.05 <sup>ab</sup>
	DMS	68.87	202.66	159.4	2770.1	233.39	0.01	0.003	0.01	0.008	0.01

Letras diferentes en cada columna indican diferencia significativa Tukey ( $P \leq 0.05$ ). C1: ácido *p*-hidroxibenzóico, C2: ácido vanílico, C3: *p*-hidroxibenzaldehído, C4: vainillina, ΣCM: Compuestos Minoritarios (C1+C2+C3).

Tanto en acahual como en malla sombra, el quimiotipo QVI tuvo la concentración mayor de *p*-hidroxibenzaldehído y ácido *p*-hidroxibenzóico, y el quimiotipo QI la concentración mayor de ácido vanílico (Figura 2.3). Esto concuerda con lo mencionado por Ranadive (1992) quien observó que el contenido de ácido vanílico es influenciado por la zona de cultivo de la vainilla. En conjunto los tres compuestos minoritarios se concentraron en mayor cantidad en quimiotipo QVI, independientemente del sistema de manejo, acahual y malla sombra (Figura 2.3).

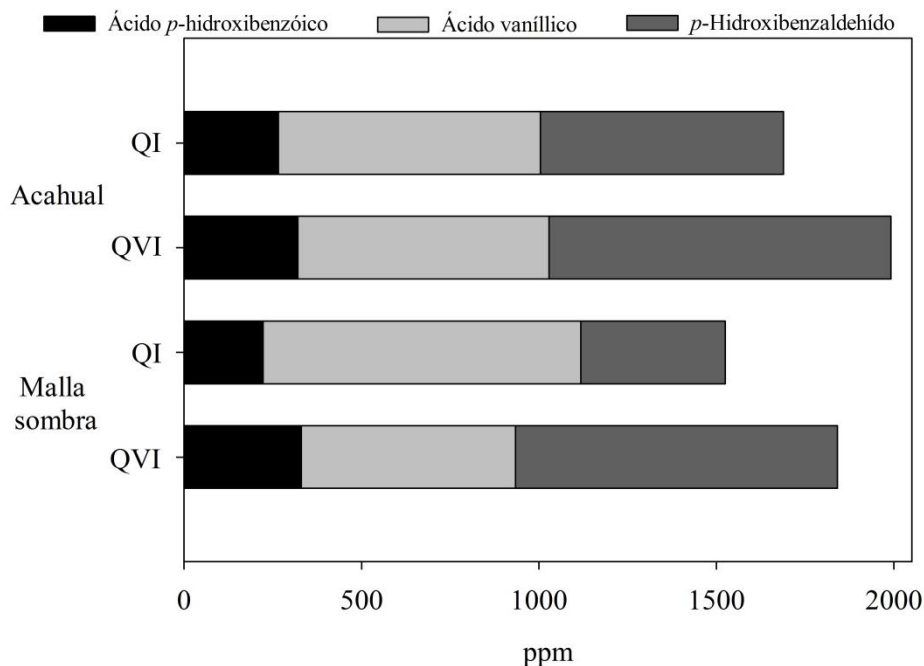


Figura 2.3 Concentración de compuestos minoritarios en dos quimiotipos (QI y QVI) de *Vanilla planifolia* cultivados en acahual y malla sombra en la Región del Totonacapan, México.

La concentración más alta de vainillina se detectó en los frutos beneficiados del sistema de acahual, quimiotipo QI seguido del quimiotipo QVI (Figura 2.4). Lo que sugiere que el sistema de manejo de producción de vainilla influye en el contenido de vainillina, que involucra factores ambientales adecuados para la expresión de este compuesto, además de la madurez del fruto, tipo

de beneficiado (Xochipa-Morante *et al.*, 2016), y de los criterios de selección de frutos por parte de los productores dependiendo del aroma (Salazar-Rojas *et al.*, 2012; Sánchez *et al.*, 2001). Ya que para el adecuado desarrollo de la planta de vainilla, se requiere de condiciones microecológicas constantes, que den como resultado un ambiente favorable, con cantidad adecuada de luz, de temperatura y de humedad (Puthur, 2005). En este trabajo, la radicación interceptada en el sistema de malla sombra para el quimiotipo QI fue de 30 % y para el quimiotipo QVI de 45 %, en comparación con el sistema de acahual que tuvo 79 % en el quimiotipo QI y 60 % en el quimiotipo VI (Cuadro 2.1). Por lo que en el sistema de malla sombra, pudo haber estrés lumínico e hídrico para la planta de vainilla y fluctuaciones amplias en la temperatura promedio.

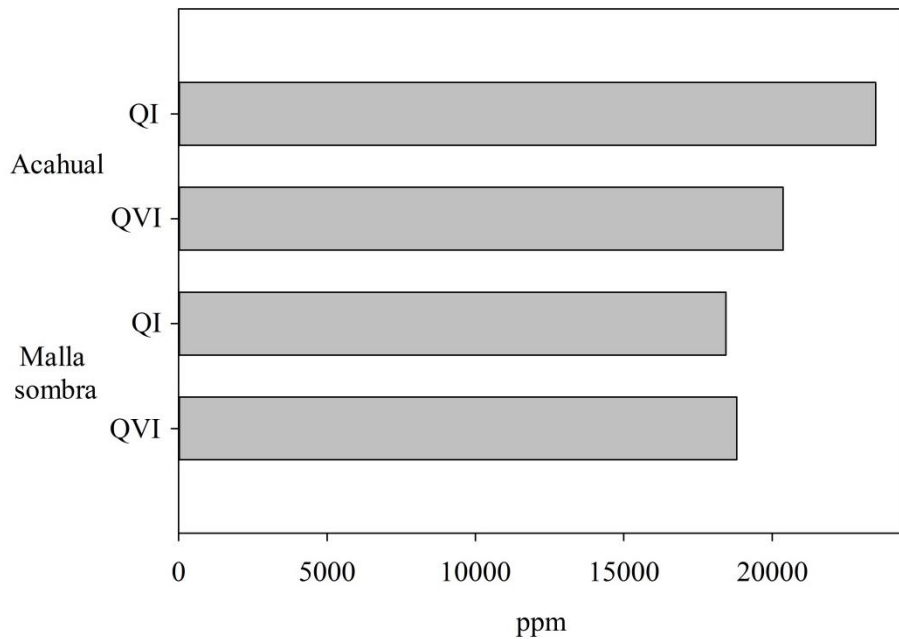


Figura 2.4 Concentración de vainillina en dos quimiotipos (QI y QVI) de *Vanilla planifolia* cultivados en acahual (Ac) y malla sombra (Ms) en la Región del Totonacapan, México.

### *Distribución de la variación de compuestos del aroma*

Mediante el análisis de componentes principales se observó que la distribución espacial de las muestras representada por los tres primeros componentes principales explicó 97 % de la variación total acumulada de las diez variables estudiadas referentes a los compuestos del aroma de la vainilla (Cuadro 2.8).

Cuadro 2.8 Valores propios, vectores propios y proporción acumulada de la variación explicada por cada variable en las primeras tres dimensiones de compuestos aromáticos. C1: ácido *p*-hidroxibenzóico, C2: ácido vanílico, C3: *p*-hidroxibenzaldehído, C4: vainillina, CM: Compuestos Minoritarios.

Variables	Componente principal (CP)		
	CP1	CP2	CP3
C1	0.314899	0.068489	<b>0.660432</b>
C2	<b>-0.375275</b>	0.092564	0.172296
C3	<b>0.391764</b>	-0.040148	-0.213413
C4	0.009141	<b>-0.568556</b>	0.328375
$\Sigma$ CM	<b>0.37655</b>	0.025163	0.024837
$\Sigma$ CM/C4	0.279399	<b>0.421795</b>	-0.210902
C1/C4	0.297435	0.304343	<b>0.460067</b>
C2/C4	-0.324074	0.35581	-0.012584
C3/C4	<b>0.383201</b>	0.103875	-0.290575
C1+C2/C4	-0.215075	<b>0.503302</b>	0.198541
Autovalor	6.1046	2.6707	0.8757
Proporción	0.6105	0.2671	0.0876
Acumulada	0.6105	0.8775	0.9651

Los valores en negritas indican las variables que influyen más en cada uno de los componentes principales.



El primer componente (CP1) explico 61 % de la variación total y se asoció con los atributos relacionados con el contenido del ácido vanílico (C2), *p*-Hidroxibenzaldehído (C3), sumatoria de compuestos minoritarios ( $\Sigma\text{CM}$ ), y la proporción del *p*-hidroxibenzaldehído y vainillina (C3/C4). El segundo componente (CP2) explico 27 % de la variación total y estuvo determinado por el contenido vainillina (C4), la relación de los compuestos minoritarios y vainillina ( $\Sigma\text{CM}/\text{C4}$ ) y la proporción de ácido *p*-hidroxibenzóico y ácido vanílico sobre el contenido de vainillina (C1+C2/C4). El tercer componente principal (PC3) expreso 9 % de la variación total, y estuvo definido por el ácido *p*- hidroxibenzóico (C1) y la proporción de hidroxibenzóico con vainillina (C1/C4) (Figura 2.5).

De acuerdo con la distribución espacial de los primeros tres componentes principales se distinguieron cuatro grupos (Figura 2.5). La distribución de los quimiotipos en los sistemas de manejo con base en el CP1, los tratamientos con mayor proporción de ácido vanílico (C2), *p*-Hidroxibenzaldehído (C3), sumatoria de componentes minoritarios ( $\Sigma\text{CM}$ ), proporción del *p*-hidroxibenzaldehído y vainillina (C3/C4) se colocaron en el lado superior del eje (Grupo I), integrado por el quimiotipo QVI cultivado en ambos sistemas de manejo, acahual y malla sombra. Mientras que los grupos que tuvieron una proporción menor se colocaron en el lado negativo (Grupo II y III), compuesto por el quimiotipo QI en sistemas acahual y de malla sombra. El CP2 reunió en el cuadrante positivo los tratamientos con la concentración de vainillina (C4), la relación de la sumatoria de los componentes minoritarios y vainillina ( $\Sigma\text{CM}/\text{C4}$ ) y la proporción de ácido *p*-hidroxibenzóico y ácido vanílico sobre el contenido de vainillina (C1+C2/C4) con los valores mayores (Grupo I y III), conformado por el quimiotipo QVI en los dos sistemas de manejo y quimiotipo QI en malla sombra. En el cuadrante negativo se apreció el grupo II formado por el quimiotipo QI en acahual. En el CP3 se representó los

valores de ácido *p*-hidroxibenzóico (C1) y la proporción de ácido *p*-hidroxibenzóico con vainillina (C1/C4) donde el quimiotipo QI en acahual perteneciente al grupo III se encontró en la parte central de este eje, y los grupos I y II se hallaron en el lado del eje positivo (Cuadro 2.5).

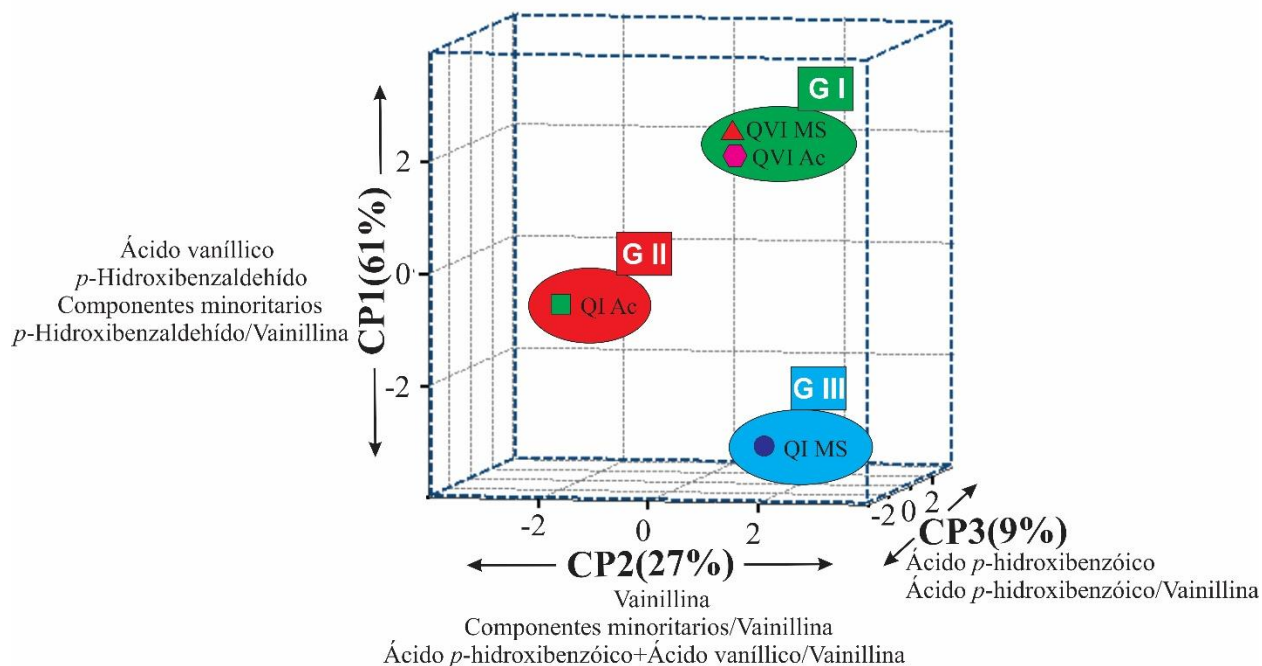


Figura 2.5 Dispersión de los sistemas de manejo y quimiotipos de *Vanilla planifolia*, con base a los tres primeros componentes principales del análisis de 10 variables agrupadas por medias. QI Ac: Quimiotipo QI en acahual, QI MS: Quimiotipo QI en malla sombra, QVI Ac: Quimiotipo QVI en acahual, QVI MS: Quimiotipo QVI en malla sombra.

### ***Agrupamiento de la variación***

A través del análisis de conglomerados se mostró que los tratamientos del sistema de manejo de cultivo y los quimiotipos de *V. planifolia* responden al patrón de agrupamiento observado mediante análisis de componentes principales. Con una distancia euclidiana media de 0.9 se definieron tres grupos de acuerdo con el grado de participación de compuestos menores (C1, C2, C3) y la relación de (C1, C2,  $\Sigma$ CM) con base en el contenido de vainillina (Figura 2.6).

El grupo G I (QVI Ac y Ms). Representado por el quimiotipo QVI tanto en acahual como en malla sombra. Se caracterizó por presentar altas concentraciones de ácido *p*-hidroxibenzóico, relación de *p*-hidroxibenzaldehído con vainillina, *p*-hidroxibenzaldehído, ácido *p*-hidroxibenzóico respecto a vainillina y la relación de compuestos minoritarios respecto a vainillina.

El grupo G II (QI Ac). Constituido por el quimiotipo QI en el sistema de acahual. Tuvó concentraciones importantes de vainillina, y de la sumatoria de compuestos minoritarios.

El grupo G III (QI Ms). Integrado por el quimiotipo QI en el sistema de malla sombra. Este grupo expresó cantidades importantes de ácido vanílico, ácido vanílico respecto a vainillina y la proporción de ácido *p*-hidroxibenzóico y ácido vanílico sobre el contenido de vainillina.

Se observó que el agrupamiento por similitud de los compuestos que definen la calidad del aroma de los frutos beneficiados de vainilla estuvo determinado por el genotipo que define al quimiotipo a que pertenece el cultivar, y no por el manejo. Es decir los frutos beneficiados de vainilla son más similares por su genética que determina la calidad del aroma que por el sistema de manejo en que se cultiven.

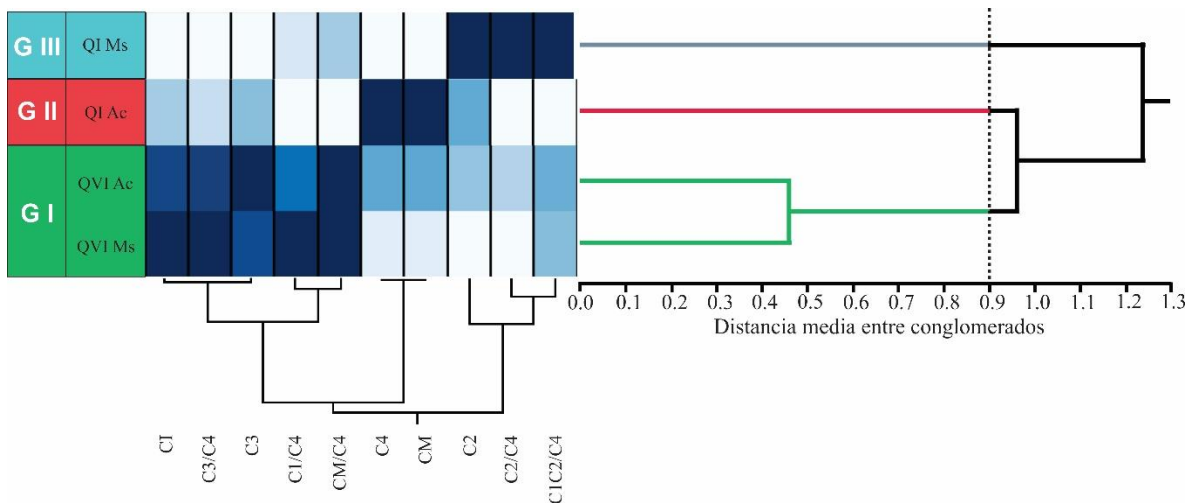


Figura 2.6 Dendrograma de los sistemas de manejo de cultivo y quimiotipos de *Vanilla planifolia* con base en los compuestos aromáticos. QI Ac: Quimiotipo QI en acahual, QI MS: Quimiotipo QI en malla sombra, QVI Ac: Quimiotipo QVI en acahual, QVI MS: Quimiotipo QVI en malla sombra.

Lo anterior coincide con lo propuesto por Herrera *et al.* (2012) y Salazar *et al.* (2012), quienes plantean que el patrón de distribución de los diferentes quimiotipos y genotipos de *V. planifolia* que existen en la región del Totonacapan no está condicionada por la variación ambiental, sino por el proceso de selección y domesticación que realizan los totonacas a las accesiones existentes en la región; y dentro de la domesticación se incluyen a las prácticas de manejo propias de cada sistema de producción. Esto es evidente en la asociación de quimiotipo QVI con sistemas de manejo diferentes y separados geográficamente, que se agrupan de acuerdo al aroma. Mientras que el quimiotipo QI se dispersa en forma individual. Lo que sugiere que este quimiotipo expresa características diferentes de los compuestos que definen la calidad del aroma de sus frutos beneficiados por causas del manejo, como la radiación solar interceptada, que en este caso la diferencia es de casi 38 % entre la condición de manejo en acahual y malla sombra (Cuadro 2.1).

Los sistemas de la agricultura tradicional se han generado a través de siglos de evolución biológica y cultural, representan experiencias acumuladas de interacción entre el ambiente y

agricultores (Díaz-Bautista *et al.*, 2008), se entiende que el sistema en malla sombra con acceso a insumos externos y capital, es un manejo que aún falta consolidarse en la producción del cultivo de la vainilla y por lo mismo requiere del análisis y caracterización (Barrera- Rodríguez *et al.*, 2009), ello puede estar ocasionando la separación de quimiotipo QI en los sistemas de producción de malla sombra y acahual con respecto a quimiotipo QVI.

## **2.4 CONCLUSIONES**

De acuerdo a los resultados se detectó una variación amplia en los valores de las características fisicoquímicas de los frutos beneficiados con relación en el quimiotipo y el sistema de manejo de cultivo de *V. planifolia* en la región del Totonacapan.

Los atributos fisicoquímicos en los frutos beneficiados: azúcares solubles totales (AST), glucosa, fructosa, sacarosa, flexibilidad, así como la flexibilidad y su relación con el largo de los frutos beneficiados, manifestaron tener valores más altos en el sistema de manejo de acahual. Mientras que el sistema de malla sombra, propició en los frutos beneficiados valores altos de pH y en color Croma. Las variables fisicoquímicas que no presentaron variación fueron: porcentaje de humedad,  $A_w$ , flexibilidad respecto a ancho y grosor y en color el ángulo Hue.

La calidad del aroma de los frutos beneficiados de vainilla estuvo determinada por el genotipo que define al quimiotipo a que pertenece el cultivar, y no por el manejo. Es decir, los frutos beneficiados de vainilla son más similares por su genética que determina la calidad del aroma que por el sistema de manejo en que se cultiven.

El manejo afecto la intensidad de la calidad del aroma, así los frutos beneficiados del quimiotipo QI, que ha estado sometido a cultivo por un menor tiempo, mostraron variación en las

características de aroma en función del sistema de manejo. El quimiotipo QVI, espécimen que ha sido cultivado con mayor frecuencia, su aroma se expresó de forma similar en diferentes ambientes.

## 2.5 LITERATURA CITADA

- Al-Khatib K, Paulsen GM. 1999. High-Temperature Effects on Photosynthetic Processes in Temperate and Tropical Cereals. *Crop Science*. 39: 119-125.
- Austin AT, Ballaré CL. 2014. Plant interactions with other organisms: molecules, ecology and evolution. *New Phytologist*. 204: 257-260.
- BeMiller JN, Huber KC. 2007. Carbohydrates. In: Fennema's Food Chemistry 4 th. Damodaran S, Parkin KL. Fennema OR. (eds). Ed. CRC Press. UK. 87 p.
- Bory S, Grisoni M, Duval MF, Besse P. 2008. Biodiversity and preservation of vanilla: present state of knowledge. *Genetic Resource and Crop Evolution*. 55: 551-571.
- Castro-Bonilla G, Martínez AJ, Martínez ML, García-Franco JG. 2011. Aplicación de riego localizado para aumentar la retención de frutos de *Vanilla planifolia* en el Totonacapan, Veracruz, México. *Agrociencia*. 45: 281-291.
- Cicchetti E, Chaintreau A. 2009. Quantitation of the main constituents of vanilla by reverse phase HPLC and ultra-high-pressure-liquid-chromatography with UV detection: Method validation and performance comparison. *Journal of Separation Science*. 32: 3043-3052.
- Díaz-Bautista M, Herrera-Cabrera BE, Ramírez-Juárez J, Aliphat-Fernández M, Delgado-Alvarado A. 2008. Conocimiento campesino en la selección de variedades de haba (*Vicia faba* L.) en la Sierra Norte de Puebla México. *Interciencia*. 33: 610-615.

- Diez MC, Moreno F, Gantiva E. 2017. Effects of light intensity on the morphology and CAM photosynthesis of *Vanilla planifolia* Andrews. Facultad Nacional de Agronomía. 70: 8023-8033.
- Dudareva N, Pichersky E, Gershenzon J. 2004 Biochemistry of plant volatiles. Plant Physiology. 135: 1893-1902.
- Hernández-Hernández J. 2011. Paquete Tecnológico Vainilla (*Vanilla planifolia* Jackson) - Programa Estratégico para el Desarrollo Rural Sustentable en la Región Sur-Sureste de México: Trópico Húmedo 2011. Ed. INIFAP SAGARPA. México. 17 p.
- Herrera-Cabrera BE, Delgado-Alvarado A, Salazar-Rojas VM, Sandoval-Zapotitla E, Campos-Contreras JE. 2016. La diversidad de Vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) en México: Recurso genético estratégico para el desarrollo rural. Agroproductividad Suplemento, noviembre: 5-6.
- Herrera-Cabrera BE, Salazar-Rojas VM, Delgado-Alvarado A, Campos-Contreras J, Cervantes-Vargas J. 2012. Use and conservation of *Vanilla planifolia* J. in the Totonacapan region, México. European Journal of Environmental Sciences. 2: 43-50.
- Lubinsky P, Van-Dam M, Van-Dam A. 2006. Pollination of Vanilla and evolution in Orchidaceae. Orchids. 75: 926-929.
- Montoya GJ. 2010. Aceites Esenciales, Una alternativa de diversificación para el eje cafetero. Ed. Universidad Nacional de Colombia. Colombia. 29 p.
- Montreuil J, Spik G, Fournet B, Toillier T. 1997. Nonenzymatic determinations of carbohydrates. In: Analysis of Food Constituents. Multon L. (ed). Ed. Wiley-VCH. EUA. pp 111-114.

- Norma Oficial Mexicana NOM-182-SCFI-2011. “Vainilla de Papantla, extractos y derivados – Especificaciones, información comercial y métodos de ensayo (prueba)”. Diario oficial de la Federación. México.
- Pérez-Silva A, Odoux E, Brat P, Riberyre F, Rodriguez-Jimenez G, Robles-Olvera V, García-Alvarado MA, Gunata Z. 2006. GC-MS and GC olfactometry analysis of aroma compounds in a representative aroma extract from cured Vanilla (*Vanilla planifolia*) beans. Food Chemistry. 99: 728-735.
- Puthur JT. 2005. Is no flowering on the vertically climbing branches of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) a mystery? Indian Journal of Arecanut, Spices and Medicinal Plants. 7: 100-115.
- Radušienė J, Karpavičienė B, Stanius Z. 2012. Effect of external and internal factors on secondary metabolites accumulation in St. John’s Worth. Botanica Lithuanica. 18: 101-108.
- Ranadive AS. 1992. Vanillin and related flavor compounds in vanilla extracts made from beans of various global origins. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 40: 1922-1924.
- Salazar-Rojas VM, Herrera-Cabrera BE, Delgado-Alvarado A, Soto-Hernández M, Castillo-González F, Cobos-Peralta M. 2012. Chemotypical variation in *Vanilla planifolia* Jack. (Orchidaceae) from the Puebla-Veracruz Totonacapan region. Genetic Resources and Crop Evolution. 59: 875-887.
- Sanchez A, Becerril A, Tijerina L, Santizo J. 2001. Crecimiento y desarrollo de vainilla en y tres sistemas de producción en Papantla, Veracruz. Revista Fitotecnia Mexicana. 24: 49-56.
- SAS. 2002. Statistical Analysis Software Versión 9.0. SAS Institute Inc. North Caroline. USA.



- Scholes JD, Lee PJ, Horton P, Lewis DH. 1994. Invertase: understanding changes in the photosynthetic and carbohydrate metabolism of barley leaves infected with powdery mildew. *New Phytologist*. 126: 213-222.
- Sharma A, Verma SC , Saxena N, Chadda N, Singh NP , Sinha AK. 2006. Microwave and ultrasound assisted extraction of vanillin and its quantification by high performance liquid chromatography in *Vanilla planifolia*. *Journal of Separation Science*. 29: 613-619.
- Sinha AK, Shama UK, Shama N. 2008. A comprehensive review on vanilla flavor: Extraction, isolation and quantification of vanillin and others constituents. *International Journal of Food Science and Nutrition*. 59: 299-326.
- Sinha AK, Shama UK, Shama N. 2008. A comprehensive review on vanilla flavor: Extraction, isolation and quantification of vanillin and others constituents. *International Journal of Food Science and Nutrition*. 59: 299-326.
- Sostaric T, Boyce MC, Spickett EE. 2000. Analysis of the volatile components in vanilla extracts and flavorings by solid-phase microextraction and gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 5802-5807.
- Wescott RJ, Cheetham PS J, Arraclough AJB. 1994. Use of organized viable vanilla plant aerial roots for the production of natural vanillin. *Phytochemistry*. 35: 135-138.
- Xochipa-Morante RC, Delgado-Alvarado A, Herrera-Cabrera BE, Escobedo-Garrido JS, Arévalo-Galarza L. 2016. Influencia del proceso de beneficiado tradicional mexicano en los compuestos del aroma de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews. *Agroproductividad*. 9: 55-62.

### CAPITULO III

## COMPONENTES QUIMICOS DE *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews EN DOS SISTEMAS DE CULTIVO DE LA REGIÓN DEL TOTONACAPAN, MÉXICO

### Resumen

Los componentes fitoquímicos de las plantas presentan variación con relación a cambios en el ambiente y con la condición de cultivo donde crecen. El presente estudio tuvo como objetivo detectar el tipo de fitoquímicos y cuantificar su variación en las estructuras de la planta de dos quimiotipos (QI y QVI) de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews cultivados en acahual y malla sombra. Los metabolitos secundarios se detectaron mediante cromatografía en capa fina (CCF) y la cuantificación se realizó por métodos espectrofotométricos. La CCF realizada con reactivos específicos de detección, mostró la presencia de fenoles, taninos, saponinas, flavonoides y terpenos en las diferentes estructuras de la planta de vainilla. Los resultados indicaron que el cultivo en acahual favoreció una cantidad mayor de compuestos fenólicos totales, taninos totales, taninos hidrolizables y condensados, así como de triterpenos totales. El cultivo de las plantas en malla sombra mostró una concentración mayor de saponinas. El quimiotipo QVI tuvo la mayor concentración de metabolitos secundarios.

Palabras clave: *Vanilla planifolia*, acahual, malla sombra, fitoquímicos.

CHEMICAL COMPONENTS OF *Vanilla planifolia* Jacks. Es Andrews IN TWO  
CULTIVATION SYSTEMS FROM THE TOTONACAPAN REGION, MEXICO

Abstract

The phytochemical constituents of the plants show variation from changes in the environment and the culture condition where they grow. The study aimed to detect the type of phytochemicals and to quantify their variation in the plant structures of two chemotypes (QI and QVI) of *Vanilla planifolia* Jacks. Es Andrews grown in acahual and mesh shade. Secondary metabolites were detected by thin-layer chromatography (TLC) and quantification was performed by spectrophotometric methods. TLC performed with specific detection reagents, showed the presence of phenols, tannins, saponins, flavonoids and terpenes in the different plant structures of vanilla plant. The results indicated that acahual cultivation favored a higher amount of total phenolic compounds, total tannins, hydrolysable and condensed tannins, as well as total triterpenes. The cultivation of plants in mesh shade showed a higher concentration of saponins. The QVI chemotype had the highest concentration of secondary metabolites.

Key words: *Vanilla planifolia*, acahual, mesh shade, phytochemicals.

### 3.1 INTRODUCCIÓN

La vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) es uno de los recursos genéticos más importantes del trópico mexicano (Bruman, 1948; Portères, 1954), desde la época prehispánica se ha utilizado en la medicina tradicional por sus diversas propiedades curativas, además de ser un agente conservador, saborizante y aromático de diversos alimentos (Tamura *et al.*, 2010). Los usos medicinales y propiedades funcionales que se le atribuyen a la vainilla son muy diversos, como anticarcinogénicos (Ferguson, 1994), antimutagénicos, antiinflamatorios (Bythrow, 2005), antimicrobianos (Shanmugavalli *et al.*, 2009), también con una alta capacidad antioxidante (Shyamala *et al.*, 2007; Tai *et al.*, 2011) entre otros. Sin embargo, los estudios de estas propiedades de la vainilla se restringen principalmente al fruto (vaina) y al extracto de vainilla beneficiada, donde se ha reportado la presencia de taninos, ácidos fenólicos, flavonoides, entre otros (Shanmugavalli *et al.*, 2009; Gurnani *et al.*, 2014). Por otra parte, en las estructuras de la planta, como hojas y tallos no hay estudios sobre el tema, pero podrían ser de interés biológico como lo señalan Shanmugavalli *et al.* (2009) y Palama *et al.* (2010). Ello haría de la vainilla una planta que podría contribuir a la salud humana por la presencia de compuestos bioactivos en sus abundantes partes vegetales.

Las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente, propician la síntesis de metabolitos secundarios, que ejercen funciones biológicas específicas, como respuesta a la adaptabilidad de su entorno (Pavarini *et al.*, 2012). Por lo que, la producción y acumulación de metabolitos secundarios en las plantas se determina por las condiciones ambientales y por el manejo que en ellas se ejerza durante su cultivo (Ramakrishna y Ravishankar, 2011).

En México, existen diferentes sistemas de manejo en el cultivo de la vainilla, dentro de la principal zona de producción en la región del Totonacapan. Representados por los sistemas de acahual (tradicional) donde las plantas de vainilla se establecen en tutores vivos como árboles de cítricos (*Citrus sinensis*), pichoco (*Erythrina* sp.), cocuite (*Gliricidia* sp.), entre otros. Este arreglo agroforestal brinda entre 50 y 70 % de sombra y la ventilación necesaria que requiere el cultivo de vainilla para su óptimo desarrollo (Barrera-Rodríguez *et al.*, 2009). El sistema de malla sombra (50-80 % de sombra); donde la producción es intensiva, eventualmente con riego y aplicación de agroquímicos. Para soporte de las plantas se utilizan tutores artificiales (poste de concreto) o tutores vivos (Barrera-Rodríguez *et al.*, 2011; Vargas-Hernández y Gamez-Vazquez, 2014). Dentro de esta región existen seis quimiotipos de *V. planifolia* caracterizados por su contenido de vainillina y de tres compuestos menores (*p*-hidroxibenzaldehído, ácido vanílico y ácido *p*-hidroxibenzóico) (Salazar-Rojas *et al.*, 2012), que definen la calidad comercial del aroma de la vainilla de México (Ranadive, 1992). Dichos quimiotipos se cultivan tanto en acahual como en malla sombra.

Bajo la hipótesis de que el sistema de manejo en el cultivo de vainilla determina la presencia y contenido de componentes fitoquímicos en las diferentes estructuras vegetales de la vainilla, el objetivo del trabajo fue identificar la presencia de saponinas, flavonoides, fenoles, taninos, alcaloides y terpenos; y cuantificar la variación de compuestos fenólicos totales, taninos totales, taninos hidrolizables, taninos condensados, flavonoides, saponinas y triterpenos totales, en hoja, tallo, flor, fruto (verde y beneficiado) de dos quimiotipos (QI y QVI) de vainilla cultivados en acahual y malla sombra en la región del Totonacapan, México.

## 3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Durante el periodo de floración (abril-mayo del 2013) se recolectaron esquejes de plantas de *V. planifolia*, de un metro de longitud a partir de la punta a la base de la planta, para obtener hojas, tallos y flores. Los frutos verdes se recolectaron de las plantas 32 semanas después de haber polinizado e identificado la flor. Para los frutos beneficiados, los frutos recolectados se sometieron a un mismo proceso de beneficiado tradicional, realizado por el maestro beneficiador Veremundo Rodríguez en el Beneficio Primero de Mayo, Papantla, Veracruz. Las actividades del beneficiado son descritas a detalle por Xochipa-Morante *et al.* (2016).

Las plantas utilizadas correspondieron a dos quimiotipos (QI y QVI) de genotipo diferente (Genotipo VI y Genotipo III, respectivamente), que fueron caracterizados previamente por los componentes del aroma de los frutos beneficiados (Herrera-Cabrera *et al.*, 2016). Los quimiotipos se recolectaron en acahual y malla sombra en localidades de la región del Totonacapan, México (Cuadro 3.1).

### Análisis cualitativo por cromatografía en capa fina (CCF)

#### Elaboración de extractos

La extracción de fitoquímicos se realizó a partir de material vegetal fresco (hoja, tallo, flor y fruto) y fruto beneficiado, que se cortó por separado en porciones de aproximadamente 0.5 cm. Posteriormente se les adiciono disolventes (metanol, cloroformo y hexano) en una proporción 1:5 (tejido: disolvente). Las muestras se colocaron en baño ultrasónico (AutoScience AS5150B) durante 30 minutos y se mantuvieron en maceración durante 24 horas. Posteriormente los

extractos se filtraron y almacenaron en viales de vidrio en condiciones de congelación (-20 °C) hasta el momento de su uso.

### **Análisis cualitativo por cromatografía en capa fina**

Para la identificación de saponinas, alcaloides, flavonoides, fenoles, taninos y terpenos, se utilizaron placas cromatográficas con soporte de aluminio (gel de sílice 60, F<sub>254</sub>, 5x10 cm, Sigma-Aldrich). Los extractos y el estándar se aplicaron manualmente con tubos capilares, posteriormente, las placas se colocaron en una cámara cromatográfica cilíndrica de vidrio de 6.5 cm x 10.5 cm marca Sigma-Aldrich. Se utilizaron eluyentes y agentes cromogénicos específicos para la detección de cada grupo de metabolito (Cuadro 3.1A, ver anexos) (Wagner y Bladt, 1996), en el caso de flavonoides las placas se visualizaron a una longitud de onda de 365 nm en una lámpara ultravioleta UVP (UVLMS-38 El series 3UV™ Lamp). La aplicación de los extractos en las placas cromatográficas tuvieron una concentración similar de aproximadamente 15-20 µL por muestra.

### **Análisis Cuantitativo**

#### **Preparación de extractos**

*Para análisis de compuestos fenólicos totales, taninos totales, taninos hidrolizables, taninos condensados y flavonoides*

De cada tejido en fresco (hoja, tallo, flor, fruto verde y fruto beneficiado) se prepararon extractos en metanol a una concentración de 50 mg/mL (p/v). Las muestras se colocaron en un baño ultrasónico (AutoScience AS5150B) por un lapso de 30 min y se maceraron por 24 h.

Posteriormente, los extractos se filtraron y almacenaron en viales de vidrio bajo condiciones de congelación (-20 °C) hasta el momento de su uso.



Cuadro 3.1 Ubicación de localidades de recolecta de dos sistemas de manejo de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrew en diferente manejo de cultivo en la región del Totonacapan, México.

Sistema de manejo	Quimiotipo/ Genotipo	Localidad/ municipio/ estado/ Coordenadas geográficas	Altitud (msnm)	Temperatura promedio (°C)	Humedad relativa (%)	Radiación interceptada (%)	Clima*
Acahual	QI / GVI	Finca 20 Soles, Papantla, Veracruz. 20° 25'38.91"N, 97°18'44.47"O	180	23.5	75	79	Aw1(x') Cálido subhúmedo, temperatura media anual mayor de 22°C y temperatura del mes más frío mayor de 18°C. Precipitación del mes más seco menor de 60 mm; lluvias de verano y porcentaje de lluvia invernal mayor al 10.2% del total anual.
	QVI / GIII	1° Mayo, Papantla, Veracruz. 20°17'45.18"N, 97°15'51.96"O	100	27.5	72	60	
Malla sombra	QI / GVI	Pantepec, Puebla. 20°30'17.63"N, 97°53'22.70"O	290	29.0	66	30	Am(f) Cálido húmedo, temperatura media anual mayor de 22°C y temperatura del mes más frío mayor de 18°C. Precipitación del mes más seco menor de 60 mm; lluvias de verano y porcentaje de lluvia invernal mayor al 10.2% del total anual.3
	QVI / GIII	Puntilla Aldama, San Rafael, Veracruz. 20°14'4.49"N, 96°54'13.75"O	12	22.5	90	45	

\*Fuente: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO, 2012).

### *Para análisis de saponinas*

A 1 g de muestra fresca de cada tejido se le agregó 5 mL de agua destilada, posteriormente se colocó en un baño ultrasónico (AutoScience AS5150B), por un tiempo de 20 min, con intervalos de 10 min con 5 min de reposo. Posteriormente, los extractos se filtraron y almacenaron en viales de vidrio bajo condiciones de congelación (-20 °C) hasta el momento de su uso.

### *Para análisis de triterpenos totales*

A 1 g de muestra fresca se le adicionó etanol a 70 % y se dejó en maceración por 10 h. El extracto de etanol se centrifugó a 3354 g por 5 min. El sobrenadante se evaporó en rotavapor, y posteriormente el residuo se extrajo 4 veces con butanol:agua (1:1) (v/v), la fase acuosa se descartó y la fase orgánica se evaporó en rotavapor. Al residuo se le agregó éter etílico y se mantuvo a 4 °C por 12 h, el residuo se secó y almacenó para su posterior análisis. Los extractos se conservaron a -20° C hasta sus análisis correspondientes.

Previo al análisis de cuantificación, a cada tejido se le determinó el contenido de humedad para expresar la concentración de los metabolitos secundarios con base en la materia seca (MS).

## **Cuantificación**

Compuestos fenólicos totales (CFT).

El análisis se realizó mediante el método descrito por Singleton y Rossi (1965), con algunas modificaciones. A 50 µL del extracto se agregaron 250 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu a 50 %, se dejó reposar en obscuridad durante 8 minutos. Posteriormente se adicionaron 1.25 mL de carbonato de sodio a 5 % y nuevamente se dejó reposar por 30 min en obscuridad a temperatura

ambiente. La lectura de absorbancia de la mezcla se realizó a 725 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Evolution 300, Thermo Scientific). Se obtuvo una curva estándar ( $y = 2.0364x - 0.0016$ ,  $R^2 = 0.9942$ ) con ácido tánico (Sigma Aldrich) como referencia. Los resultados se expresaron en  $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  MS.

#### *Taninos totales.*

Se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito por Makkar *et al.* (1993). En un tubo de ensaye se colocaron 200 mg de PVPP (Polivinilpirrolidona), 2 mL de extracto y 2 mL de agua destilada, se agitó en vórtex y se dejó reposar por 15 min en oscuridad a 4 °C. Se volvió a agitar, se filtró utilizando doble papel filtro poro medio. Posteriormente se tomó una alícuota de 150  $\mu\text{L}$  y se aforó a 1 mL con agua destilada, de este extracto se tomaron 50  $\mu\text{L}$  y se realizó el mismo procedimiento como en la determinación de compuestos fenólicos totales. Los resultados se expresaron en g de ácido tánico (Sigma Aldrich) por 100 g de materia seca, con base en la ecuación proporcionada por la curva estándar ( $y = 2.0977x - 0.0241$ ,  $R^2 = 0.9919$ ).

#### *Taninos hidrolizables.*

El contenido de taninos hidrolizables se calculó por la diferencia de taninos totales y taninos condensados. Los resultados se expresaron en  $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  MS (García-Ferrer *et al.*, 2016).

#### *Taninos condensados (proantocianidinas).*

Se realizó de acuerdo a Porter *et al.* (1986) con algunas modificaciones. A 500  $\mu\text{L}$  del extracto se le adicionaron 3 mL de 1-butanol-HCl y 100  $\mu\text{L}$  de reactivo férrico a 2 % en HCl 2 N, la solución se colocó en baño maría a 80 °C durante 15 minutos. Finalmente se registró la absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Evolution 300, Thermo Scientific). La

concentración de taninos condensados se calculó con base en materia seca, utilizando el factor 78.26.

#### *Flavonoides totales.*

Se utilizó la metodología propuesta por Chang *et al.* (2002) con algunas modificaciones. Se colocaron 500  $\mu\text{L}$  del extracto, 1.5 mL de etanol 80 %, 100  $\mu\text{L}$  de solución de cloruro de aluminio hexahidratado a 20 %, 100  $\mu\text{L}$  de acetato de potasio 1 M y 2.8 mL de agua destilada. Se agitó e incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. La lectura de absorbancia se realizó a una longitud de onda de 415 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Evolution 300 Thermo Scientific). Los resultados se expresaron en g equivalentes de quercetina (Sigma Aldrich) por 100 g de materia seca, a partir de la ecuación obtenida ( $y = 6.0986x - 0.0004$ ,  $R^2 = 0.9952$ ) de la curva estándar.

#### *Saponinas totales.*

Se determinó por el método de ácido sulfúrico – vainillina descrito por Hiai *et al.* (1976). Se tomaron 5  $\mu\text{L}$  del extracto añadiendo 95  $\mu\text{L}$  de agua, 1 mL de ácido sulfúrico concentrado, 100  $\mu\text{L}$  de una solución fresca de vainillina a 8 % en etanol. Posteriormente se incubó a 60 °C durante 20 minutos, después los tubos se colocaron en baño con hielo. La absorbancia se leyó a 544 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Evolution 300, Thermo Scientific). Se obtuvo una curva estándar ( $y = 0.0033x + 0.0786$ ,  $R^2 = 0.9919$ ) con saponina de Quillaja (Sigma Aldrich) como referencia. Los resultados se expresaron en  $\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$  MS

#### *Triterpenos totales.*

Se utilizó el método colorimétrico con el sistema vainillina – ácido acético descrito por Fan y He (2006) con algunas modificaciones. A 0.5 mg de extracto se añadieron 100 µL de vainillina a 5 % y 400 µL de ácido perclórico y se mantuvo a 60 °C durante 15 min. Los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se les adicionaron 2.5 mL de ácido acético. Finalmente se registró la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 550 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Evolution 300 Thermo Scientific). Los resultados se expresaron en  $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  de materia seca a partir de una curva estándar ( $y = 0.0125x - 0.0274$ ,  $R^2 = 0.9949$ ) preparada con ácido oleanólico (Sigma Aldrich) como estándar.

#### *Análisis estadístico.*

Para los resultados de las pruebas cualitativas por cromatografía en capa fina se realizó una tabla de contingencia. Para los valores de concentración de metabolitos secundarios, que incluyeron nueve repeticiones para cada estructura vegetal, por quimiotipo y sistema de manejo de cultivo, se realizó un análisis de varianza. La diferencia entre medias por sistema de manejo, quimiotipo y tejido vegetal, se evaluó por la prueba de media (Tukey  $\alpha=0.05$ ) mediante el paquete estadístico SAS versión 9.0 (SAS, 2002).

### **3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **Análisis cualitativo por cromatografía en capa fina.**

En el Cuadro 3.2 se aprecian los resultados de cromatografía en capa fina (CCF) de los extractos realizados solamente con sistemas de disolventes donde se observó una mejor separación de bandas. Los grupos de fitoquímicos identificados con mayor presencia por la abundancia de bandas mostraron variación en los tejidos vegetales en relación con el sistema de manejo del

cultivo de vainilla, con la siguiente distribución: 1) Compuestos fenólicos totales (CFT) (42 bandas en sistema de manejo de acahual y 45 en sistema de malla sombra), 2) Triterpenos (29 bandas en acahual y 33 bandas en malla sombra) 3) Flavonoides (29 bandas en acahual y 31 en malla sombra) y 4) Saponinas (26 bandas en acahual y 27 bandas en malla sombra). De manera general el mayor número de bandas de los compuestos fenólicos totales, triterpenos, flavonoides y saponinas se presentó en los tejidos vegetales de vainilla cultivada bajo malla sombra. Diversos factores ambientales como la disponibilidad de agua, temperatura e intensidad de luz, tipo y composición del suelo entre otros, tienen influencia en la calidad y la producción de compuestos fitoquímicos (Ramakrishna y Ravishankar, 2011; Radušienė *et al.*, 2012). Condiciones de estrés pueden mostrar cambios en el contenido de compuestos fitoquímicos, los cuales se caracterizan por actuar como agentes protectores, inhibidores y pesticidas contra organismos invasores (Bhattacharya *et al.*, 2010; Szakiel *et al.*, 2011). Por lo que, la presencia de un mayor número de bandas en la condición de manejo en malla sombra pudo haberse generado por estrés en esta condición (Figura 3.1A-Figura3.6A, ver anexos).

En relación con los diferentes tejidos, el extracto de fruto beneficiado mostró el mayor número de bandas (4-5) en CFT, flavonoides, saponinas y triterpenos totales, seguido del fruto verde que tuvo de 2 a 5 bandas, mientras que el de hoja, tallo y flor mostraron un rango más amplio de bandas (1-4) referente a los mismos compuestos (Cuadro 3.2). Los taninos y los alcaloides aunque con menor número de bandas también se mostraron en mayor abundancia en el fruto beneficiado (Cuadro 3.2).

La radicación interceptada en el sistema de malla sombra para el quimiotipo QI fue de 30 % y para el quimiotipo QVI de 45 %, en comparación con el sistema de acahual que tuvo 79 % en el quimiotipo QI y 60 % en el quimiotipo VI (Cuadro 3.1). Esto mostró que el sistema de manejo

de malla sombra tuvo una cantidad mayor de radiación, lo que sugiere una condición de estrés lumínico, que ocasiona que la planta de vainilla genere más compuestos fitoquímicos que le ayudan a la adaptación en el medio ambiente (Kliebenstein, 2004).

Cuadro 3.2 Número de bandas de fitoquímicos detectados por cromatografía en capa fina en los extractos de hoja (H), tallo (T), flor (F), fruto verde (Fv) y fruto beneficiado (Fb) de dos quimiotipos de *Vanilla planifolia* J. de la región del Totonacapan, México. QI: Quimiotipo I; QVI: Quimiotipo VI. \*= extracto de metanol; \*\*= extracto de hexano.

Sistema de manejo	Quimiotipo	Tejido	Compuestos					Alcaloides*	Total
			fenólicos totales*	Taninos totales*	Flavonoides*	Saponinas*	Triterpenos totales**		
No. de bandas									
		H	4	1	2	1	2	0	10
		T	4	1	1	2	2	0	10
	QI	F	4	1	2	2	2	0	11
		Fv	4	1	4	3	4	0	16
		Fb	5	2	5	5	5	3	25
Acahual	Subtotal		21	6	14	13	15	3	72
		H	4	1	2	2	2	0	11
		T	4	1	2	2	2	0	11
	QVI	F	4	1	3	2	2	0	12
		Fv	4	2	4	2	4	0	16
		Fb	5	3	4	5	4	3	24



	Subtotal		21	8	15	13	14	3	74
Total			42	14	29	26	29	6	146
		H	5	1	2	2	2	1	13
		T	5	1	2	2	2	1	13
	QI	F	5	1	3	3	2	1	15
		Fv	4	1	4	3	4	1	17
		Fb	5	3	5	4	5	3	25
Malla	Subtotal		24	7	16	14	15	7	83
sombra		H	4	1	2	1	2	1	11
		T	4	1	2	2	4	1	14
	QVI	F	4	1	3	2	2	1	13
		Fv	4	1	4	3	5	1	18
		Fb	5	3	4	5	5	5	27
	Subtotal		21	7	15	13	18	9	83
Total			45	14	31	27	33	16	166

Diez *et al.* (2017) señalaron que la luz es el factor con mayor influencia sobre la fotosíntesis de plantas de metabolismo ácido crasuláceo (MAC), como la vainilla, y por lo tanto sobre el crecimiento, la supervivencia y en la habilidad de aclimatación a diferentes hábitats. Sumado a que la cantidad de radiación influye en el grado de absorción de CO<sub>2</sub>, que afecta la abundancia de carbohidratos generados a través del ciclo de Calvin y la glucogénesis, que son necesarios para la provisión de fosfoenolpiruvato por la noche (Nobel y Hartsock, 1983). Inclusive, la intensidad de la luz es un factor que altera la concentración de compuestos secundarios en las plantas y sus respuestas varían entre especies y con la clase de metabolitos secundarios (Estell *et al.*, 2016). El exceso de radiación y la sobreexcitación del aparato fotosintético MAC provocan una disminución de la fotosíntesis y de la producción de biomasa en las plantas (Carrasco-Ríos, 2009).

### **Análisis cuantitativo de compuestos fitoquímicos**

Los promedios en la concentración de compuestos fitoquímicos por sistema de manejo, quimiotipo y estructura vegetal mostraron diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en las variables evaluadas, con excepción de flavonoides por sistema de manejo (Cuadro 3.3). Los compuestos fenólicos totales, taninos totales, flavonoides, saponinas y triterpenos presentaron coeficientes de variación con intervalos de 0.9 % y 17.2 %. Mientras los taninos condensados y taninos hidrolizables presentaron coeficiente de variación mayor entre 25.9 % y 27.8 % respectivamente. Los datos indican consistencia en la información con el modelo estadístico utilizado para sistemas biológicos que permite tener coeficientes de variación arriba del 20 %. Además, la mayoría de las variables evaluadas presentan diferencia altamente significativa en relación con los factores de sistema de manejo, quimiotipo y estructura vegetal.

Cuadro 3.3 Medias, coeficientes de variación y cuadrados medios de metabolitos secundarios de *Vanilla planifolia* de la región del Totonacapan, México. CV= Coeficiente de variación. \*: P≤0.05; \*\*: P≤0.001 \*\*\*: P≤0.0001; NS: No significativo.

Fitoquímico	Media (g·100 g <sup>-1</sup> MS)	CV (%)	Cuadrados medios			
			Sistema de manejo	Quimiotipo	Estructura vegetal	Error
Compuestos fenólicos totales	1.470	14.204	0.337***	2.862***	3.285***	0.034
Taninos totales	0.306	17.283	0.094***	0.054***	0.040***	0.002
Taninos hidrolizables	0.185	27.806	0.046***	0.017***	0.015***	0.033
Taninos condensados	0.121	25.914	0.024***	0.057***	0.052***	0.0009
Flavonoides	0.745	16.502	0.008 <sup>NS</sup>	0.601***	0.0662***	0.015
Saponinas	0.104	9.678	0.017***	0.087***	0.100***	0.0001
Triterpenos totales	2.013	0.931	4.523***	4.145***	2.980***	0.0003

Dentro del sistema de manejo todos los compuestos fitoquímicos evaluados presentaron diferencia significativa (P<0.05) en su concentración, a excepción de los flavonoides (Cuadro 3.4). Fue notable que los tejidos de la planta de vainilla, por análisis de CCF presentaron en general un mayor número de bandas en el sistema de cultivo en malla sombra (Cuadro 3.2), pero la cuantificación de los compuestos fitoquímicos, mostró que en el sistema de acahual, los tejidos de vainilla tuvieron una concentración mayor de compuestos fenólicos totales, taninos totales, taninos hidrolizables, taninos condensados y triterpenos totales, y en malla sombra mostraron solo concentración mayor de saponinas (Cuadro 3.4). Las diferencias en la concentración de compuestos fitoquímicos entre sistemas de manejo pudo deberse a las características ambientales particulares, como temperatura, humedad relativa y luminosidad interceptada, siendo esta última

el factor que mayor influencia tiene sobre la producción de compuestos fitoquímicos (Cach-Pérez *et al.*, 2014). Los fenilpropanoides son compuestos fitoquímicos del tipo fenólico, que presentan actividad contra insectos herbívoros (War *et al.*, 2012). Dentro de este grupo se encuentran los compuestos fenólicos totales, taninos y flavonoides, entre otros compuestos como ligninas, suberinas, estilpironas, estilbenos, cumarinas, furanocumarinas (Pereira *et al.*, 2009). La biosíntesis de estos compuestos es inducida por la radiación UV-B, que se acumulan predominantemente en las células de la epidermis. Los flavonoides presentan una respuesta a la radiación ultravioleta-B, lo que se ha relacionado con su acción antioxidante frente a radicales libres (Hofmann *et al.*, 2000). Sin embargo, en este trabajo, la diferente luminosidad interceptada en los sistemas de manejo de vainilla no tuvo impacto en estos compuestos.

En relación con los quimiotipos, el QVI mostró una concentración mayor de todos los compuestos fitoquímicos, excepto de taninos hidrolizables que no mostró diferencia entre quimiotipos (Cuadro 3.4). Este quimiotipo ha sido el más utilizado por los agricultores de la región del Totonacapan por su aroma, propiedad que caracteriza la variación química existente en las plantaciones de vainilla de la región, el cual presumiblemente es el menos influenciado por factores climáticos o geográficos, ya que en plantas clonadas, como vainilla, la composición química permanece constante (Loziene y Venskutonis, 2005), mientras que el QI, cuyo cultivo tiene poco tiempo en la región del Totonacapan, su variación de compuestos fitoquímicos podría estar determinada por el ambiente, dado que en éstos, son el resultado del proceso de adaptación ambiental para garantizar su supervivencia y reproducción. Dentro de las especies vegetales, la cantidad de compuestos fitoquímicos en los tejidos varía dependiendo de la estructura de la planta (Tahvanainen *et al.*, 1991). En vainilla, el fruto beneficiado presentó la concentración más alta de taninos hidrolizables, triterpenos totales y compuestos fenólicos totales junto con el fruto

verde que también tuvo la concentración mayor de flavonoides y saponinas (Cuadro 3.4). La hoja tuvo la concentración más alta de taninos totales y taninos condensados.

Cuadro 3.4 Promedio de compuestos fitoquímicos en sistema de manejo, quimiotipo y tejido vegetal de *Vanilla planifolia* J. de la región del Totonacapan, México.

	<b>Compuestos fenólicos totales</b>	<b>Taninos Totales</b>	<b>Taninos hidrolizables</b>	<b>Taninos condensados</b>	<b>Flavonoides</b>	<b>Saponinas</b>	<b>Triterpenos totales</b>
(g·100 g <sup>-1</sup> MS)							
<b>Sistema de manejo</b>							
Acahual	1.593 <sup>a</sup>	0.341 <sup>a</sup>	0.206 <sup>a</sup>	0.134 <sup>a</sup>	0.737 <sup>a</sup>	0.090 <sup>b</sup>	2.157 <sup>a</sup>
Malla sombra	1.348 <sup>b</sup>	0.272 <sup>b</sup>	0.165 <sup>b</sup>	0.107 <sup>b</sup>	0.753 <sup>a</sup>	0.119 <sup>a</sup>	1.869 <sup>b</sup>
DMS	0.084	0.021	0.018	0.014	0.058	0.012	0.087
<b>Quimiotipo</b>							
Q I	1.389 <sup>b</sup>	0.271 <sup>b</sup>	0.186 <sup>a</sup>	0.085 <sup>b</sup>	0.674 <sup>b</sup>	0.097 <sup>b</sup>	1.642 <sup>b</sup>
Q VI	1.542 <sup>a</sup>	0.342 <sup>a</sup>	0.185 <sup>a</sup>	0.156 <sup>a</sup>	0.816 <sup>a</sup>	0.112 <sup>a</sup>	2.384 <sup>a</sup>
DMS	0.094	0.021	0.018	0.014	0.058	0.012	0.087
<b>Tejido vegetal</b>							
Hoja	1.001 <sup>b</sup>	0.384 <sup>a</sup>	0.163 <sup>bc</sup>	0.221 <sup>a</sup>	0.716 <sup>bc</sup>	0.052 <sup>c</sup>	1.486 <sup>d</sup>
Tallo	0.903 <sup>c</sup>	0.320 <sup>b</sup>	0.192 <sup>ab</sup>	0.128 <sup>b</sup>	0.451 <sup>d</sup>	0.033 <sup>c</sup>	1.668 <sup>cd</sup>
Flor	0.951 <sup>c</sup>	0.277 <sup>bc</sup>	0.147 <sup>c</sup>	0.129 <sup>b</sup>	0.646 <sup>c</sup>	0.005 <sup>d</sup>	1.743 <sup>c</sup>
Fruto verde	2.150 <sup>a</sup>	0.305 <sup>b</sup>	0.201 <sup>ab</sup>	0.104 <sup>b</sup>	1.105 <sup>a</sup>	0.234 <sup>a</sup>	2.291 <sup>b</sup>
Fruto beneficiado	2.347 <sup>a</sup>	0.246 <sup>c</sup>	0.225 <sup>a</sup>	0.021 <sup>c</sup>	0.805 <sup>b</sup>	0.198 <sup>b</sup>	2.877 <sup>a</sup>
DMS	0.188	0.046	0.04	0.032	0.129	0.027	0.194

Letras diferentes en cada columna indican diferencia significativa Tukey (P≤0.05).

La concentración de los compuestos fitoquímicos, en relación con el sistema de manejo y los quimiotipos, mostró una amplia variación ( $P < 0.05$ ) en función con la estructura vegetal (Cuadro 3.5). Debido a que los factores ambientales dentro del sistema de manejo influyen en la concentración de los compuestos fitoquímicos en las plantas (Sampaio *et al.*, 2011; Rezende *et al.*, 2015).

La concentración mayor de compuestos fenólicos totales se presentó en los frutos beneficiados independientemente del quimiotipo (Cuadro 3.5). En vainilla, estos fitoquímicos contribuyen mayoritariamente ( $1.961$  a  $2.309 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1} \text{ MS}$ ) al aroma de los frutos beneficiados (Sinha *et al.*, 2007). La presencia de este grupo de fitoquímico es de gran interés biológico por servir de defensa contra depredadores (Lattazio *et al.*, 2006), su actividad contra radicales libres (Berradre *et al.*, 2013).

En ambos sistemas de manejo, la mayor cantidad de taninos totales ( $0.445$  a  $0.513 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1} \text{ MS}$ ) y taninos condensados ( $0.249$  a  $0.338 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1} \text{ MS}$ ) se presentó en hoja del QVI. Los taninos hidrolizables mostraron la concentración más alta en fruto verde ( $0.267 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1} \text{ MS}$ ) y en hoja ( $0.264 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1} \text{ MS}$ ) del QVI cultivado en acahual, aunque tuvieron valores similares en los tallos y en frutos beneficiados (Cuadro 3.5). Los taninos a pesar ser un grupo considerado anti-nutricional ya que puede llegar a reducir la cantidad de proteína disponible, son de gran importancia por su capacidad antioxidante y resistencia al estrés por calor (Olivas-Aguirre *et al.*, 2015). Particularmente en hojas y tallos se encuentran en concentraciones mayores, ya que estos metabolitos actúan como de defensa contra herbívoros, debido a que proporcionan el sabor astringente que causa hostilidad al sabor de un alimento (Provenza *et al.*, 1990), lo cual coincide con lo encontrado en este estudio donde las hojas. La presencia de taninos, condensados e hidrolizables, en las estructuras vegetales de vainilla de los quimiotipos QI y QVI presentaron

particularidades en su comportamiento dependiendo del sistema de manejo. Las estructuras vegetales pertenecientes a quimiotipo QVI en malla sombra tuvo mayor contenido de taninos condensados y en acahual tuvo mayor contenido de taninos hidrolizables. El sistema de acahual mostro mayor cantidad de taninos totales mientras el sistema de malla sombra propició el desarrollo de taninos hidrolizables y suprimió el desarrollo de taninos condensados. Diversos autores mencionan a los taninos condensados como los más abundantes, sin embargo, se han reportado cantidades mayores de taninos hidrolizables en frutas como moras, frambuesas, guayaba y granada (Smeriglio *et al.*, 2017). También en algunas especies de fabáceas forrajeras como *Cacahuatillo*, *Stylosanthes*, *Clitoria* y *Kudzú* (García-Ferrer *et al.*, 2016), y en *Rosa Gallica* y *Lythrum salicaria* que han sido utilizadas durante mucho tiempo en la medicina tradicional para el tratamiento de problemas digestivos, diarrea crónica, cólicos y la leucorrea (Ochir *et al.*, 2010; Eck-Varanka *et al.*, 2015). Incluso la abundancia de los taninos hidrolizables en algunas especies como el roble (*Quercus robar*), presenta cambios estacionales, que en el verano tienen mayor concentración (Salminen *et al.*, 2004). Lo cual sugiere que en vainilla, los taninos hidrolizables pueden acumularse en relación con la estación del año o es propia de la especie, de lo cual no hay reportes documentados.

Los flavonoides se detectaron en mayor cantidad ( $1.135-1.285 \text{ g}\cdot 100\text{g}^{-1} \text{ MS}$ ) en el fruto verde del QI, sin distinción del sistema de manejo del cultivo, pero en el QVI ( $1.106 \text{ g}\cdot 100\text{g}^{-1} \text{ MS}$ ) la concentración fue superior solo en el cultivo de acahual (Cuadro 3.5). En otras especies de orquídeas como *Dendrobium speciosum*, la concentración de flavonoides está en un rango de  $0.12 \text{ g}\cdot 100\text{g}^{-1} \text{ MS}$  (tallos) a  $0.21 \text{ g}\cdot 100\text{g}^{-1} \text{ MS}$  (hoja). La concentración menor en el fruto beneficiado indica que durante el proceso de beneficiado, los flavonoides se degradan, ya que algunos flavonoides son termosensibles (Liu *et al.*, 2015).



Particularmente, las saponinas se detectaron con mayor abundancia en fruto verde (0.292 a 0.305 g·100g<sup>-1</sup> MS) en el sistema de cultivo en malla sombra (Cuadro 3.5). Lo anterior debido a que la síntesis de saponinas es mayor en respuesta al estrés, y se relacionan con la adaptación de la planta para sobrevivir bajo condiciones adversas de suelo y clima (Copaja *et al.*, 2003), ya que normalmente tienen una participación activa en los procesos de regulación del crecimiento vegetal, si bien la variación en su distribución, composición y concentración en las plantas se ha atribuido a las necesidades que tienen las especies vegetales para protección (Moses *et al.*, 2014). Aunque también el fruto beneficiado de acahual tuvo una concentración similar al fruto verde (Cuadro 2.5).

Los triterpenos totales se encontraron en mayor concentración (3.310-3.569 g·100g<sup>-1</sup> MS) en el fruto beneficiado del QVI en ambos sistemas de manejo del cultivo. Generalmente, estos fitoquímicos se sintetizan en tejidos vegetales, flores y eventualmente en raíces (Dudareva *et al.*, 2004), están involucrados en interacciones ecológicas asociadas con roles defensivos en la interacciones planta-insecto, planta-patógeno y planta-planta (Paschold *et al.*, 2006); además de estar implicados en el aroma de las plantas (Pichersky *et al.*, 2006; Schwab *et al.*, 2008).

Cuadro 3.5 Compuestos fitoquímicos en estructuras vegetales de *Vanilla planifolia* J. cultivada en diferente sistema de manejo de la región del Totonacapan, México.

Sistema de manejo	Quimiotipo	Estructura vegetal	Compuestos fenólicos totales	Taninos totales	Taninos hidrolizables	Taninos condensados	Flavonoides	Saponinas	Triterpenos totales
(g·100 g <sup>-1</sup> MS)									
Acahual	Q I	Hoja	0.773 <sup>d</sup>	0.287 <sup>c</sup>	0.138 <sup>c</sup>	0.148 <sup>bcd</sup>	0.425 <sup>ef</sup>	0.025 <sup>ef</sup>	1.203 <sup>j</sup>
		Tallo	0.798 <sup>d</sup>	0.337 <sup>c</sup>	0.218 <sup>abc</sup>	0.119 <sup>d</sup>	0.277 <sup>f</sup>	0.012 <sup>fg</sup>	1.373 <sup>i</sup>
		Flor	0.811 <sup>d</sup>	0.289 <sup>c</sup>	0.155 <sup>bc</sup>	0.133 <sup>cd</sup>	0.677 <sup>cd</sup>	0.002 <sup>g</sup>	1.530 <sup>h</sup>
		Fv	2.031 <sup>ab</sup>	0.340 <sup>bc</sup>	0.216 <sup>abc</sup>	0.123 <sup>cd</sup>	1.135 <sup>a</sup>	0.188 <sup>b</sup>	1.872 <sup>g</sup>
		Fb	2.167 <sup>a</sup>	0.264 <sup>c</sup>	0.241 <sup>ab</sup>	0.022 <sup>e</sup>	0.852 <sup>bc</sup>	0.166 <sup>c</sup>	2.005 <sup>f</sup>
	Q VI	Hoja	1.313 <sup>c</sup>	0.513 <sup>a</sup>	0.264 <sup>a</sup>	0.249 <sup>a</sup>	0.931 <sup>ab</sup>	0.065 <sup>d</sup>	2.222 <sup>e</sup>
		Tallo	0.805 <sup>d</sup>	0.327 <sup>c</sup>	0.177 <sup>abc</sup>	0.150 <sup>bcd</sup>	0.477 <sup>def</sup>	0.030 <sup>e</sup>	2.692 <sup>c</sup>
		Flor	1.046 <sup>cd</sup>	0.347 <sup>bc</sup>	0.155 <sup>bc</sup>	0.191 <sup>b</sup>	0.526 <sup>de</sup>	0.003 <sup>g</sup>	2.289 <sup>d</sup>
		Fv	1.771 <sup>b</sup>	0.440 <sup>ab</sup>	0.267 <sup>a</sup>	0.173 <sup>bc</sup>	1.106 <sup>a</sup>	0.151 <sup>c</sup>	2.815 <sup>b</sup>
		Fb	2.162 <sup>a</sup>	0.264 <sup>c</sup>	0.230 <sup>abc</sup>	0.034 <sup>e</sup>	0.966 <sup>ab</sup>	0.259 <sup>a</sup>	3.569 <sup>a</sup>
	DMS	0.317	0.102	0.1	0.052	0.224	0.016	0.042	
Malla sombra	Q I	Hoja	0.943 <sup>de</sup>	0.291 <sup>bc</sup>	0.143 <sup>cde</sup>	0.148 <sup>b</sup>	0.650 <sup>c</sup>	0.097 <sup>d</sup>	1.209 <sup>i</sup>
		Tallo	0.994 <sup>de</sup>	0.269 <sup>cd</sup>	0.209 <sup>ab</sup>	0.059 <sup>cd</sup>	0.425 <sup>d</sup>	0.049 <sup>e</sup>	1.084 <sup>j</sup>
		Flor	0.794 <sup>e</sup>	0.209 <sup>d</sup>	0.162 <sup>abcde</sup>	0.046 <sup>cde</sup>	0.504 <sup>cd</sup>	0.009 <sup>f</sup>	1.493 <sup>g</sup>
		Fv	1.900 <sup>b</sup>	0.211 <sup>d</sup>	0.173 <sup>abcd</sup>	0.038 <sup>cde</sup>	1.285 <sup>a</sup>	0.292 <sup>a</sup>	2.029 <sup>d</sup>
		Fb	1.961 <sup>b</sup>	0.211 <sup>d</sup>	0.203 <sup>abc</sup>	0.009 <sup>e</sup>	0.510 <sup>cd</sup>	0.128 <sup>c</sup>	2.625 <sup>b</sup>
	Q VI	Hoja	0.975 <sup>de</sup>	0.445 <sup>a</sup>	0.106 <sup>e</sup>	0.338 <sup>a</sup>	0.858 <sup>b</sup>	0.021 <sup>f</sup>	1.312 <sup>h</sup>
		Tallo	1.016 <sup>de</sup>	0.347 <sup>b</sup>	0.163 <sup>abcde</sup>	0.184 <sup>b</sup>	0.627 <sup>c</sup>	0.040 <sup>e</sup>	1.524 <sup>f</sup>
		Flor	1.153 <sup>d</sup>	0.262 <sup>cd</sup>	0.115 <sup>de</sup>	0.147 <sup>b</sup>	0.880 <sup>b</sup>	0.006 <sup>f</sup>	1.661 <sup>e</sup>
		Fv	1.438 <sup>c</sup>	0.231 <sup>cd</sup>	0.150 <sup>bede</sup>	0.081 <sup>c</sup>	0.896 <sup>b</sup>	0.305 <sup>a</sup>	2.449 <sup>c</sup>
		Fb	2.309 <sup>a</sup>	0.245 <sup>cd</sup>	0.227 <sup>a</sup>	0.018 <sup>de</sup>	0.893 <sup>b</sup>	0.241 <sup>b</sup>	3.310 <sup>a</sup>
	DMS	0.263	0.067	0.065	0.049	0.179	0.016	0.01	

Fv: fruto verde; Fb: fruto beneficiado. Letras diferentes en cada columna indican diferencia significativa Tukey (P≤0.05).

### 3.4 CONCLUSIONES

El sistema de manejo en el cultivo de *V. planifolia* afectó la presencia y concentración de los compuestos fitoquímicos evaluados, excepto la concentración de flavonoides. La condición del manejo de cultivo en acahual, con una radiación interceptada de 60-79%, favoreció la acumulación de compuestos fenólicos totales, taninos totales, taninos hidrolizables, taninos condensados y triterpenos totales, mientras que la condición de cultivo en malla sombra, con una radiación interceptada de 30 - 45 %, propicio una concentración mayor de saponinas. El quimiotipo QVI mostró una acumulación mayor de compuestos fenólicos totales, taninos totales, taninos condensados, flavonoides, saponinas y triterpenos totales, respecto al quimiotipo QI. La acumulación de fitoquímicos fue diferencial en los tejidos vegetales. Los compuestos fenólicos totales, taninos hidrolizables y triterpenos se acumularon en mayor cantidad en el fruto beneficiado. Los taninos totales y taninos condensados fueron más abundantes en hoja, tallo, flor y fruto verde. Los flavonoides y saponinas estuvieron en mayor cantidad en frutos verdes seguido de frutos beneficiados.

### 3.5 LITERATURA CITADA

- Barrera-Rodríguez AI, Herrera-Cabrera BE, Jaramillo-Villanueva JL, Escobedo-Garrido JS, Bustamante-González A. 2009. Characterization of vanilla production systems (*Vanilla planifolia* A.) under orange tree and mesh shade in the Totonacapan region. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 10: 199-212.
- Barrera-Rodríguez AI, Jaramillo-Villanueva JL, Escobedo-Garrido JS, Herrera-Cabrera BE. 2011. Rentabilidad y competitividad de los sistemas de producción de vainilla (*Vanilla planifolia* J.) en la región del Totonacapan, México. *Agrociencia*. 45: 625-638.

- Barrón-Yáñez RM, Villanueva-Verduzco C, García-Mateos MR, Colinas-León MT. 2009. Valor nutricional y contenido de saponinas en germinados de huauzontle (*Chenopodium nuttalliae* Saff.), calabacita (*Cucurbita pepo* L.), canola (*Brassica napus* L.) y amaranto (*Amaranthus leucocarpus* S. Watson syn. *hypochondriacus* L.). Revista Chapingo Serie Horticultura. 15: 237-243.
- Berradre M, González B, Sulbarán B, Fernández V. 2013. Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de extractos de semilla de uva (*Vitis vinifera*) variedad Malvasia y Tempranillo. Revista de la Facultad de Agronomía LUZ. 30: 619-631.
- Bhattacharya A, Sood P, Citovsky V. 2010. The roles of plant phenolics in defence and communication during *Agrobacterium* and *Rhizobium* infection. Molecular Plant Pathology. 11: 705-719.
- Bruman H. 1948. The culture history of Mexican vanilla. The Hispanic American Historical Review. Duke University Press. 28: 360-376.
- Bythrow JD. 2005. Vanilla as a Medicinal Plant. Seminars in integrative medicine. 3: 129-131.
- Cach-Pérez MJ, Andrade JL, Reyez-García C. 2014. La susceptibilidad de la bromeliáceas epífitas al cambio climático. Botanical Sciences. 92: 157-168.
- Carrasco-Ríos L. 2009. Efecto de la radiación ultravioleta-B en plantas. IDESIA (Chile). 27: 59-76.
- Chang, C, Yang MH, Wen HM, Chern JC. 2002. Estimation of total flavonoids content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food and Drug Analysis. 10: 176-182.

- CONABIO. 2012. Portal de Geoinformación. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. <http://www.conabio.gob.mx/informacion/gis/>. Consultado: Abril 19, 2017.
- Copaja SV, Blackburn C, Carmona R. 2003. Variation of saponin contents in *Quillaja saponica* Molina. *Wood Science and Technology*. 37: 103-108.
- Diez MC, Moreno F, Gantiva E. 2017. Effects of light intensity on the morphology and CAM photosynthesis of *Vanilla planifolia* Andrews. *Facultad Nacional de Agronomía*. 70: 8023-8033.
- Eck-Varanka B, Kováts N, Hubai K, Paulovits G, Ferincz Á, Horváth E. 2015. Genotoxic effect of *Lythrum salicaria* extract determined by the mussel micronucleus test. *Acta Biologica Hungarica*. 66: 460-463.
- Estell RE, Fredrickson EL, James DK. 2016. Effect of light intensity and wavelength on concentration of plant secondary metabolites in the leaves of *Flourensia cernua*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 65: 108-114.
- Fan JP, He CH. 2006. Simultaneous quantification of three major bioactive triterpene acids in the leaves of *Diospyros kaki* by high-performance liquid chromatography method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41: 950-956.
- Ferguson LR. 1994. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. *Mutation Research*. 307: 395-410.
- García-Ferrer L, Bolaños-Aguilar D, Lagunes-Espinoza LC, Ramos-Juárez J, Osorio-Arce MM. 2016. Concentración de compuestos fenólicos en fabáceas forrajeras tropicales en edad diferente del rebrote. *Agrociencia*. 50: 429-440.

- Gurnani N, Kapoor N, Mehta D, Gupta M, Mehta BK. 2014. Characterization of chemical groups and identification of novel volatile constituents in organic solvent extracts of cured Indian Vanilla beans by GC-MS. Middle East Journal of Scientific Research. 22: 769-776.
- Herrera-Cabrera BE, Hernández-Ruíz J, Delgado-Alvarado A. 2016. Variación de aroma en *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews silvestre y cultivada. Agroproductividad. 9: 10-17.
- Hiai S, Oura H, Nakajima T. 1976. Color reaction of some sapogenins and saponins with vanillin and sulfuric acid. Planta Medica. 29: 116-122.
- Hofmann RW, Swinny EE, Bloor SJ, Markham KR, Ryan KG, Campbell BD, Jordan BR, Fountain DW. 2000. Responses of nine *Trifolium repens* L. populations to ultraviolet-B radiation: differential flavonol glycoside accumulation and biomass production. Annals of Botany. 86: 527-537.
- Kliebenstein D. J., 2004. Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinted glasses. Plant Cell and Environment. 27: 675-684.
- Lattanzio V, Lattanzio VMT, Cardinali A. 2006. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. Phytochemistry: Advances in Research. 37: 23-67.
- Liu Y, Wang H, Cai X. 2015. Optimization of the extraction of total flavonoids from *Scutellaria baicalensis* Georgi using the response surface methodology. Journal of Food Science and Technology. 52: 2336-2343.
- Loziene K, Venskutonis PR. 2005. Influence of environmental and genetic factor son the stability of essential oil composition of *Thymus pulegioides*. Biochemical Systematics and Ecology. 33: 517-525.

- Makkar HPS, Bluemmel M, Borowy NK, Becker K. 1993. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 61: 161-165.
- Moses T, Papadopoulou KK, Osbourn A. 2014. Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 49: 439-462.
- Nobel PS, Hartsock TL. 1983. Relationships between photosynthetically active radiation, nocturnal acid accumulation, and CO<sub>2</sub> uptake for a Crassulacean Acid Metabolism plant *Opuntia ficusindica*. *Plant Physiology*. 71: 71-75.
- Ochir S, Nishizawa M, Park BJ, Ishii K, Kanazawa T, Funaki M, Yamagishi T. 2010. Inhibitory effects of *Rosa gallica* on the digestive enzymes. *Journal of Natural Medicines*. 64: 275-280.
- Olivas-Aguirre FJ, Wall-Medrano A, González-Aguilar GA, López-Díaz JA, Álvarez-Parrilla E, de la Rosa L, Ramos-Jiménez A. 2015. Taninos hidrolizables: bioquímica, aspectos nutricionales y analíticos y efectos en la salud. *Nutrición Hospitalaria*. 31: 55-66.
- Palama TL, Fock I, Choi YH, Verpoorte R, Kodja H. 2010. Biological variation of *Vanilla planifolia* leaf metabolome. *Phytochemistry*. 71: 567-573.
- Paschold A, Halitschke R, Baldwin IT. 2006. Using 'mute' plants to translate volatile signals. *The Plant Journal*. 45: 275-291.
- Pavarini DP, Pavarini SP, Niehues M, Lopes NP. 2012. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. *Animal Feed Science and Technology*. 176: 5-16.
- Pereira DM, Valentão P, Pereira JA, Andrade PB. 2009. Phenolics: From Chemistry to Biology. *Molecules*. 14: 2202-2211.

- Pichersky E, Noel JP, Dudareva N. 2006. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science*. 311: 808-811.
- Porter LJ, Hrstich LN, Chan BG. 1986. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyaniding and delphinidin. *Phytochemistry*. 25: 223-230.
- Portères R. 1954. Le genre *Vanilla* et ses espèces. In: *Le Vanillier et la Vanille dans le Monde*. Bouriquet G. (ed). Ed. Paul Lechevalier. France. pp 94–290.
- Provenza FD, Burnt EA, Clausen TP, Bryant JP, Reichardt PB, Diste RA. 1990. Conditioned flavor aversion: A mechanism for goats to avoid condensed tannins in blackbush. *The American Naturalist*. 136: 810-828.
- Radušienė J, Karpavičiene B, Ždrunas S. 2012. Effect of external and internal factors on secondary metabolites accumulation in St. John's Worth. *Botanica Lithuanica*. 18: 101-108.
- Ramakrishna A, Ravishankar GA. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*. 6: 1720-1731.
- Ranadive AS. 1992. Vanillin and related flavor compounds in vanilla extract made from beans of various global origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40: 1922-1924.
- Rezende WP, Borges L, Santos DL, Alves NM, Paula J. 2015. Effect of environmental factors on phenolic compounds in leaves of *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). *Modern Chemistry & Applications*. 3: 1-6.
- Salazar-Rojas VM, Herrera-Cabrera BE, Delgado-Alvarado A, Soto-Hernández M, Castillo-González F, Cobos-Peralta M. 2012. Chemotypical variation in *Vanilla planifolia* Jack. (Orchidaceae) from the Puebla-Veracruz Totonacapan region. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 59: 875-887.



- Salminen JP, Roslin T, Karonen M, Sinkkonen J, Philaja K, Pulkkinen P. 2004. Seasonal variation in the content of hydrolyzable tannins, flavonoid glycosides, and proanthocyanidins in oak leaves. *Journal of Chemical Ecology*. 30: 1693-1711.
- Sampaio BL, Bara MT, Ferri PH, Santos S, de Paula J. 2011. Influence of environmental factors on the concentration of phenolic compounds in leaves of *Lafoensia pacari*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 21: 1127-1137.
- SAS. 2002. Statistical Analysis Software Versión 9.0. SAS Institute Inc. North Caroline. USA.
- Schwab W, Davidovich-Rikanati R, Lewinsohn E. 2008. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *The Plant Journal*. 54: 712-732.
- Shanmugavalli N, Umashankar V, Raheem A. 2009. Antimicrobial activity of *Vanilla planifolia*. *Indian Journal of Science and Technology*. 2: 37-40.
- Shyamala BN, Naidu MM, Sulochanamma G, Srinivas P. 2007. Studies on the antioxidant activities of natural vanilla extract and its constituent compounds through *in vitro* models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 7738-7743.
- Singleton VL, Rossi JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16: 144-158.
- Sinha, A.K., U.K. Sharma, Sharma N. 2008. A comprehensive review on vanilla flavor: extraction, isolation and quantification of vanillin and others constituents. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 59: 299-326.
- Smeriglio A, Barreca D, Bellico E, Trombetta D. 2017. Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects. *British Journal of Pharmacology*. 174: 1244-1262.

- Szakiel A, Paczkowski C, Henry M. 2010. Influence of environmental abiotic factors on the content of saponins in plants. *Phytochemistry Reviews*. 10: 471-491.
- Tahvanainen J, Niemelä P, Henttonen H. 1991. Chemical aspects of herbivory in boreal forest-feeding by small rodents, hares and crevids. In: *Plant Defenses against Mammalian Herbivory*. Palo RT, Robbins CT. (eds). Ed. CRC Press. EUA. pp. 115-131.
- Tai A, Sawano T, Yazama F, Ito H. 2011. Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assays. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1810: 170-177.
- Tamura H, Hata Y, Chida M. 2010. Aroma profile of vanilla in bourbon beans. In: *Recent Advances in Food and Flavor Chemistry*. Ho C-T, Mussinan CJ, Shahidi F, Tratas E. (eds). Ed. RSC Publishing. Cambridge. UK. pp.139-140.
- Vargas-Hernández J, Gámez-Vazquez HG. 2014. Producción de vainilla en tres sistemas de producción en la sierra Huasteca Potosina. Ed. INIFAP SAGARPA. México. pp. 5-9.
- Wagner H, Blatt S. 1996. *Plant drug analysis. A thin layer chromatography*. 2da. Edición. Ed. Springer. Germany. pp 195-197.
- War AR, Paulraj MG, Ahmad T, Buhroo AA, Hussain B, Ignacimuthu S, Sharma HC. 2012. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signaling & Behavior*. 7: 1306-1320.
- Xochipa-Morante RC, Delgado-Alvarado A, Herrera-Cabrera BE, Escobedo-Garrido JS, Arévalo-Galarza L. 2016. Influencia del proceso de beneficiado tradicional mexicano en los compuestos del aroma de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews. *Agroproductividad*. 9: 55-62.
- Yadav RNS, Agarwala M. 2011. Phytochemical analysis of some medicinal plants. *Journal of Phytology*. 3: 10-14.

## CAPITULO IV

### CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE DOS QUIMIOTIPOS DE *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews DE LA REGIÓN DEL TOTONACAPAN, MÉXICO

#### Resumen

En los últimos años, la vainilla ha sido de gran interés por parte de consumidores, especialistas de la salud y la comunidad científica, debido a reportes de actividad biológica que en ella se ha investigado. Por lo que el objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antioxidante de tejidos vegetales de dos quimiotipos (QI y QVI) de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews cultivados en acahual y malla sombra. La medición de la capacidad antioxidante de hoja, tallo, flor, fruto verde y fruto beneficiado se realizó en extractos de metanol mediante los métodos de DPPH y ABTS, y por el método de ORAC en la fracción hidrofílica y lipofílica. La mayor actividad antioxidante se detectó en los frutos beneficiados, seguido del fruto verde de ambos quimiotipos de vainilla. La condición de manejo de acahual favoreció la mayor actividad antioxidante en los tejidos debido a que está presentó las condiciones óptimas de luminosidad y temperatura para desarrollo de la vainilla. La capacidad antioxidante se correlaciono con la concentración de compuestos fenólicos totales. En conclusión, la vainilla cultivada en la región del Totonacapan tuvo una actividad antioxidante mayor en el quimiotipo QVI en el sistema de manejo de acahual.

Palabras clave: acahual, actividad antioxidante, malla sombra, *Vanilla planifolia*.

## ANTIOXIDANT CAPACITY OF TWO QUIMIOTIPOS OF *Vanilla planifolia* Jacks. ex

Andrews FROM THE TOTONACAPAN REGION, MEXICO

### Abstract

In recent years, vanilla has been of great interest from consumers, health specialists and the scientific community, due to reports of biological activity that it has been investigated. Therefore, the study aimed to evaluate the antioxidant activity of plant tissues of two chemotypes (QI and QVI) of *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews grown in acahual and mesh shade. Measurement of antioxidant capacity of leaf, stem, flower, green fruit and cured fruit was performed in methanol extracts by the methods of DPPH and ABTS, and by the ORAC method in the hydrophilic and lipophilic fraction. The highest antioxidant activity was detected in the cured fruits, followed by the green fruit of both vanilla chemotypes. The condition of acahual management favored the greater antioxidant activity in the tissues due to the fact that it has the optimum conditions of luminosity and temperature for the development of vanilla. The antioxidant capacity correlated with the concentration of total phenolic compounds. In conclusion, vanilla cultivated in the region of Totonacapan had higher antioxidant activity in the chemotype QVI in the acahual management system.

Key words: Acahual, antioxidant activity, mesh shade, *Vanilla planifolia*.

## 4.1 INTRODUCCIÓN

Numerosos estudios evidencian en extractos y frutos beneficiados de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) diversas propiedades funcionales como anticarcinogénicos, antimutagénicos, antiinflamatorios, antimicrobianas, así como una alta capacidad antioxidante (Ferguson, 1994; Bythrow, 2005; Shyamala *et al.*, 2007; Shanmugavalli *et al.*, 2009; Tai *et al.*, 2011).

Los antioxidantes son apreciados por su conocido aporte a la salud de quien los consume, debido a sus propiedades funcionales o nutracéuticas (Mierziak *et al.*, 2014). Su importancia radica en su capacidad de neutralizar radicales libres, que contienen uno o más electrones desapareados, siendo responsables de muchas enfermedades degenerativas, cataratas, arterioesclerosis, muerte celular y cáncer, asimismo por su capacidad de eliminar y atrapar potencialmente a los electrófilos dañadores del ADN, metales tóxicos, hasta la inhibición de enzimas activadoras de precarcinógenos hasta carcinógenos (Villanueva-Tiburcio *et al.*, 2010).

Para evaluar la actividad antioxidante en diversas matrices alimentarias existen diferentes métodos, cada uno de ellos con diferente fundamento, entre ellos incluyen: ácido 2,2,2-azinobis-[3 etilbenzotiazolin-6-sulfónico] (ABTS) (Leong y Shui, 2002), 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) (Gil *et al.*, 2002), y la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) (Thaipong *et al.*, 2006). Awika *et al.* (2003) observaron una alta correlación entre los métodos de DPPH, ABTS y ORAC en la determinación de la capacidad antioxidante en sorgo y productos derivados de este. Algunos autores, como Prior *et al.* (2003) mencionan al ensayo de ORAC como el método más relevante ya que se basa en la inhibición de la reactividad de radicales libres del tipo peroxilo. Así, el ensayo de ORAC utiliza radicales de relevancia biológica, es el único método que combina el tiempo y grado de inhibición en una misma prueba, y ha sido

recientemente adaptado para el uso de fluoresceína como prueba de fluorescencia (Ou *et al.*, 2001).

El objetivo del estudio fue analizar la actividad antioxidante de extractos de tejidos vegetales (hoja, tallo, flor, fruto verde y fruto beneficiado) de dos quimiotipos de *V. planifolia* cultivados en dos sistemas de manejo, acahual y malla sombra mediante tres métodos (DPPH, ABTS y ORAC). A fin de conocer el efecto que tiene el manejo en el cultivo de la vainilla en la capacidad antioxidante de la planta y frutos.

## **4.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material vegetal**

Durante el periodo de floración (abril-mayo del 2013) se recolectaron hojas, tallos y flores de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrew provenientes de dos sistemas de manejo, acahual y malla sombra. Los frutos verdes se recolectaron 32 semanas después de la polinización y se sometieron a un mismo proceso de beneficiado tradicional (Beneficio Primero de Mayo, Papantla, Veracruz). Las plantas utilizadas correspondieron a dos quimiotipos (QI y QVI) de genotipo diferente (Genotipo VI y Genotipo III, respectivamente), que fueron caracterizados previamente por los componentes del aroma de los frutos beneficiados (Herrera-Cabrera *et al.*, 2016).

### **Elaboración de extractos**

Las diferentes estructuras en fresco se cortaron en porciones de aproximadamente 0.5 cm a las que se les adiciono metanol (Sigma Aldrich) hasta cubrirlas en una relación 1:5 (m/v), las muestras se colocaron en un baño ultrasónico (AutoScience AS5150B) durante 30 minutos y se mantuvieron en maceración durante 24 horas. En el método de ORAC, además del extracto en

metanol para la fracción hidrofílica, se realizó el procedimiento anterior utilizando hexano como disolvente para la obtención de la fracción lipofílica. Posteriormente los extractos se filtraron y almacenaron en viales de vidrio en condiciones de congelación ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) hasta el momento de su uso.

### **Extracciones con disolventes de polaridad creciente**

500 g de cada tejido vegetal se secó a temperatura ambiente ( $22 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y trituró. Posteriormente por separado los diferentes tejidos vegetales se mezclaron con disolventes de polaridad creciente: (n-hexano, cloroformo, metanol) (Sigma Aldrich), hasta el agotamiento completo, en una relación 1:5 (m/v). Cada extracto en cada uno de los disolventes se agitó y se preparó por maceración durante 48 horas, este paso se realizó en tres ocasiones en un mismo disolvente, después se filtró por gravedad, posteriormente los disolventes orgánicos se evaporaron en rotavapor a presión reducida hasta sequedad para obtener los respectivos residuos. Por último, los extractos se resuspendieron en el mismo disolvente para posterior análisis.

### **Rendimiento de extractos con disolventes de polaridad creciente**

Para obtener el rendimiento de la extracción, se tomó como referencia el peso del material vegetal antes de la extracción y el peso del material vegetal seco obtenido después de la extracción.

### **Actividad antioxidante por método DPPH**

Este método, desarrollado por Brand-Williams *et al.* (1995), se basa en la reducción de la absorbancia medida a 517 nm del radical DPPH $\cdot$  (1,1-Difenil-2-picrilhidrazilo), con modificaciones para micrométodo. A 50  $\mu\text{L}$  de cada extracto se agregó 200  $\mu\text{L}$  de DPPH 0.1

mM, la mezcla se homogenizó y mantuvo en obscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las medidas de absorbancia a 517 nm se realizaron al blanco (metanol) ( $A_0$ ) y a las muestras ( $A_1$ ) en un espectrofotómetro Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific). Los resultados del ensayo de DPPH· se expresó como porcentaje de inhibición, lo cual corresponde a la cantidad de radical DPPH neutralizado por el extracto (Ecuación 1).

$$\% \text{ Inhibición} = \left[ \frac{A_0 - A_1}{A_1} \right] * 100 \text{ (Ecuación 1)}$$

$A_0$  = Absorbancia del blanco

$A_1$  = Absorbancia de la muestra

Luego de calcular los porcentajes de inhibición, se determinó la concentración media inhibitoria ( $CI_{50}$ ), que es la cantidad de antioxidante necesario para disminuir la concentración inicial de DPPH al 50%, a través una regresión lineal de la curva de calibración de cuatro puntos de los resultados del porcentaje de inhibición del extracto (Deng *et al.*, 2011; García-Mateos *et al.*, 2012).

### **Actividad antioxidante por método ABTS**

Se utilizó el método propuesto por Re *et al.* (1999) y modificado por Kuskoski *et al.* (2004). El radical ABTS<sup>+</sup> se formó a partir de 0.0033 g de persulfato de potasio y 0.0194 g de reactivo ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico) en 5 mL de agua destilada. La mezcla se agito y se mantuvo en obscuridad durante 16 horas a temperatura ambiente. Se realizó una mezcla con etanol absoluto con el radical ABTS<sup>+</sup>, en las proporciones necesarias para obtener una absorbancia de  $0.70 \pm 0.02$  a 754 nm. En una celda de cuarzo se agregaron 3920  $\mu$ L de la solución de radical ABTS y se registró la absorbancia inicial ( $A_i$ ), posteriormente se adicionaron 80  $\mu$ L de cada extracto, se mezcló y al término de 7 minutos se registró la



absorbancia final ( $A_f$ ), usando un espectrofotómetro UV-Vis (Evolution 300 Thermo Scientific). Los resultados se expresaron como el porcentaje de inhibición aplicando la fórmula de la ecuación 2:

$$\% \text{ Inhibición} = \left[ \frac{A_i - A_f}{A_i} \right] * 100 \text{ (Ecuación 2)}$$

Al igual, que en el análisis de la actividad inhibitoria del radical DPPH·, una vez calculado los porcentajes de inhibición, se determinó la concentración media inhibitoria ( $CI_{50}$ ), a través una curva de regresión lineal (Deng *et al.*, 2011; García-Mateos *et al.*, 2012).

### **Actividad antioxidante por método ORAC**

El método de ORAC se basa en la inhibición de oxidaciones inducidas por radicales peroxilo y refleja la actividad antioxidante clásica de ruptura de cadena radical por transferencia de átomos de hidrogeno (Cao *et al.*, 1993). Las determinaciones se realizaron en un medio con luz amarilla. En una microplaca de 96 pocillos en sus pocillos exteriores se colocó 200  $\mu$ L de agua destilada en cada uno de los pocillos exteriores que rodean la placa, para proporcionar una masa térmica, mientras que los pocillos interiores se usaron para las determinaciones experimentales. En cada pocillo se colocaron 25  $\mu$ L de solución de calibración, blanco o muestra, se incubó en oscuridad a 37 °C durante 10 min, en seguida se agregó 150  $\mu$ L de fluoresceína 0.1  $\mu$ M, la microplaca se volvió a incubar a 37 °C durante 30 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se agregaron 25  $\mu$ L de dihidrocloruro de 2,2-Azobis-2-metilpropionamidina (AAPH) 153 mM, y se midió la fluorescencia durante 60 minutos con intervalos de un minuto en un Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific). Se realizaron curvas de calibración con ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) 100  $\mu$ M en buffer de fosfato (75 mM, pH 7.4). Los

valores ORAC se calcularon como describen Cao y Prior (1999). La AUC y la AUC<sub>Neta</sub> de los estándares y de las muestras se determinaron utilizando las ecuaciones 3 y 4 respectivamente. La ecuación 5 se utilizó para calcular el valor ORAC en equivalentes de Trolox.

$$AUC = 0.5 + (R2/R1) + (R3/R1) + (R4/R1) + \dots + 0.5(Rn/R1) \text{ (Ecuación 3)}$$

R1= Lectura de fluorescencia en el inicio de la reacción

Rn= Lectura de fluorescencia en la última medición

La curva estándar se obtuvo mediante el trazado de la AUC<sub>Neta</sub> de diferentes concentraciones de Trolox contra su concentración.

$$AUC_{Neta} = AUC_{Muestra} - AUC_{Blanco} \text{ (Ecuación 4)}$$

El valor ORAC (la actividad antioxidante) se calcula mediante el uso de una curva de calibración de Trolox con una ecuación de regresión lineal entre AUC Neta y la concentración de antioxidantes para todas las muestras. Los resultados finales se expresan en micromoles de Equivalentes Trolox por gramo.

$$x = \frac{y-b}{m} * \frac{DF}{W} \text{ (Ecuación 5)}$$

Donde:

y = AUC<sub>Neta</sub> de la pérdida de fluorescencia

b = Intercepción

m = Pendiente

DF = Factor de dilución

W = peso de la muestra en gramos

x = micromoles de Equivalentes Trolox por gramo ( $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}$ )

### **Análisis estadístico.**

Se realizó un análisis de varianza de la actividad antioxidante en los diferentes tejidos por quimiotipo y sistema de manejo de cultivo expresada, a través de los diferentes ensayos, se incluyeron nueve repeticiones para cada estructura vegetal. La diferencia entre medias por sistema de manejo, quimiotipo y tejido vegetal, se evaluó por la prueba de media (Tukey  $\alpha=0.05$ ) mediante el paquete estadístico SAS versión 9.0 (SAS, 2002). Adicionalmente se efectuó un análisis de correlación de Pearson entre los métodos para determinar actividad antioxidante y los valores medios de compuestos fenólicos totales, taninos totales, flavonoides, saponinas y triterpenos totales, para determinar las relaciones entre los compuestos fitoquímicos y la actividad antioxidante de la vainilla.

## **4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Capacidad antioxidante en tejidos de vainilla por extracciones sucesivas**

Los porcentajes obtenidos del rendimiento de las extracciones sucesivas con disolventes de polaridad creciente mostraron que el fruto verde y fruto beneficiado fueron los tejidos que presentaron el rendimiento mayor en los diferentes extractos (Cuadro 4.1). Respecto a los solventes, el metanol fue el solvente que tuvo mayor rendimiento para todos los tejidos. De hoja, tallo y flor los rendimientos fueron bajos. Mientras que en los extractos de metanol de los frutos beneficiados el rendimiento fue de hasta casi 63 %. Por lo que en los tejidos frescos la actividad antioxidante se determinó en los extractos de metanol.

Cuadro 4.1 Rendimiento de extracciones sucesivas en disolventes de polaridad creciente de hoja, tallo, flor, fruto verde y beneficiado de *Vanilla planifolia* J.

<b>Estructura vegetal</b>	<b>Extracto</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
Hoja	Hexano	1.52
	Cloroformo	0.74
	Metanol	4.23
Tallo	Hexano	1.16
	Cloroformo	1.49
	Metanol	3.88
Flor	Hexano	0.77
	Cloroformo	0.9
	Metanol	0.96
Fruto verde	Hexano	40.36
	Cloroformo	41.99
	Metanol	50.52
Fruto beneficiado	Hexano	44.12
	Cloroformo	46.36
	Metanol	62.99

En este estudio se evaluó en los extractos de las diferentes órganos de la planta de vainilla, la concentración necesaria para disminuir 50% la concentración inicial del radical DPPH, tomando en cuenta que un  $CI_{50}$  bajo está asociado con una actividad antioxidante alta.

Los extractos con disolventes de polaridad creciente en el ensayo de DPPH mostraron valores de  $CI_{50}$  en un rango entre 0.71 a 1.75  $mg \cdot mL^{-1}$ , y para el ensayo de ABTS de 0.22 a 0.69  $mg \cdot mL^{-1}$ , con los valores menores para el fruto beneficiado en ambos ensayos (Cuadro 4.2).

Cuadro 4.2 Actividad antioxidante ( $CI_{50}$ ) de extracción sucesiva en metanol frente al radical DPPH y ABTS de diferentes tejidos de *Vanilla planifolia*.

	$CI_{50}$ ( $mg \cdot mL^{-1}$ )	
	DPPH	ABTS
Hoja	$1.07 \pm 0.11^b$	$0.69 \pm 0.97^d$
Tallo	$1.75 \pm 0.05^d$	$0.67 \pm 0.77^{cd}$
Flor	$1.74 \pm 0.11^d$	$0.65 \pm 0.80^c$
Fruto verde	$1.13 \pm 0.21^c$	$0.49 \pm 0.64^b$
Fruto beneficiado	$0.71 \pm 0.15^a$	$0.22 \pm 0.33^a$
DMS	0.01	0.02

Letras diferentes en cada columna indican diferencia significativa Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

### Capacidad antioxidante en tejidos de vainilla de extractos frescos

#### *Efecto de quimiotipo y sistema de manejo de cultivo*

Los resultados obtenidos en la determinación de la capacidad antioxidante  $CI_{50}$  ( $mg \cdot mL^{-1}$ ) analizada por los métodos de DPPH y ABTS mostraron diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) por sistema de manejo de cultivo, entre quimiotipos dentro de tejidos vegetales, (Cuadro 4.3). Los extractos de fruto beneficiado tuvieron una actividad inhibidora del radical DPPH· significativamente mayor a los demás tejidos, con valores de  $CI_{50}$  en un intervalo de 3.67 a 5.99  $mg \cdot mL^{-1}$ . Los frutos beneficiados del quimiotipo QVI en ambos sistemas de manejo presentaron la actividad inhibitoria mayor. El fruto verde comparado con los demás extractos presentó una actividad inhibidora intermedia con valores de 13.85 a 30.61  $mg \cdot mL^{-1}$ . La hoja, tallo y flor presentaron la capacidad más baja de atrapar radicales DPPH, con valores de  $CI_{50}$  en intervalos de 29.25 a 57.57  $mg \cdot mL^{-1}$  (Cuadro 4.3).

Cuadro 4.3 Actividad antioxidante (CI<sub>50</sub>) frente al radical DDPH y ABTS de diferentes tejidos de dos quimiotipos de *Vanilla planifolia*.

Sistema de manejo	Quimiotipo	Estructura vegetal	CI <sub>50</sub> (mg·mL <sup>-1</sup> )	
			DPPH	ABTS
Acahual	QI	Hoja	56.11 ± 0.25 <sup>e</sup>	37.70 ± 0.98 <sup>c</sup>
		Tallo	57.57 ± 0.75 <sup>e</sup>	40.75 ± 0.34 <sup>cd</sup>
		Flor	57.35 ± 1.58 <sup>e</sup>	37.21 ± 0.75 <sup>c</sup>
		Fruto verde	13.85 ± 0.21 <sup>b</sup>	11.38 ± 0.52 <sup>b</sup>
		Fruto beneficiado	5.04 ± 0.13 <sup>a</sup>	2.59 ± 0.07 <sup>a</sup>
	QVI	Hoja	55.25 ± 3.74 <sup>e</sup>	41.08 ± 3.13 <sup>cd</sup>
		Tallo	53.78 ± 3.63 <sup>e</sup>	42.12 ± 3.12 <sup>d</sup>
		Flor	44.78 ± 2.92 <sup>d</sup>	40.79 ± 2.58 <sup>cd</sup>
		Fruto verde	20.63 ± 1.41 <sup>c</sup>	9.57 ± 0.82 <sup>b</sup>
		Fruto beneficiado	3.67 ± 0.20 <sup>a</sup>	1.54 ± 0.12 <sup>a</sup>
	DMS	4.88	4.10	
Malla sombra	QI	Hoja	53.47 ± 4.33 <sup>ef</sup>	40.23 ± 2.98 <sup>de</sup>
		Tallo	56.20 ± 4.12 <sup>f</sup>	43.11 ± 3.75 <sup>e</sup>
		Flor	29.25 ± 2.22 <sup>b</sup>	32.23 ± 2.48 <sup>c</sup>
		Fruto verde	29.19 ± 2.47 <sup>b</sup>	10.10 ± 0.98 <sup>b</sup>
		Fruto beneficiado	5.99 ± 0.58 <sup>a</sup>	2.57 ± 0.10 <sup>a</sup>
	QVI	Hoja	46.83 ± 0.71 <sup>d</sup>	37.28 ± 0.42 <sup>d</sup>
		Tallo	48.78 ± 0.94 <sup>de</sup>	40.36 ± 1.19 <sup>de</sup>
		Flor	39.53 ± 0.70 <sup>c</sup>	36.85 ± 0.47 <sup>d</sup>
		Fruto verde	30.61 ± 0.59 <sup>b</sup>	11.19 ± 0.29 <sup>b</sup>
		Fruto beneficiado	3.86 ± 0.14 <sup>a</sup>	1.95 ± 0.24 <sup>a</sup>
	DMS	5.36	4.32	

QI: Quimiotipo QI, QVI: Quimiotipo QVI. Letras diferentes en cada columna indican diferencia significativa Tukey (P≤0.05).

Diversas investigaciones han reportado el efecto del ambiente sobre la actividad antioxidante en plantas, donde variables como la temperatura, la radiación solar, la sequía y el exceso de agua

dan lugar a respuestas protectoras o de reparación en las plantas, incluida la producción de antioxidantes. (Alexieva *et al.*, 2001; Nacif de Abreu *et al.*, 2005).

En el cuadro 3.1 del capítulo III se mostró que la condición de malla sombra manifestó la menor cantidad de radiación interceptada, lo que propicio una temperatura mayor en la condición de las plantas cultivadas en este sistema de manejo, lo anterior puede condicionar el desarrollo de compuestos con actividad antioxidante, ya que Larrauri *et al.* (1997) determinaron que condiciones de cultivo con temperaturas altas dan lugar a la pérdida de antioxidantes naturales dado que el calor puede acelerar la oxidación y otras reacciones de degradación en frutas y vegetales (Larrauri *et al.*, 1997). La condición del manejo en acahual, tuvo una radiación interceptada de 60-79 % que favoreció la acumulación de compuestos fenólicos totales, de manera similar en esta condición de cultivo se detectaron los valores promedio más altos de capacidad antioxidante de los tejidos vegetales.

La comparando de los valores de  $CI_{50}$  de extractos de los tejidos vegetales en fresco con los exhibidos por los estándares de referencia (Cuadro 4.4), muestra que la capacidad antioxidante de los extractos fue débil, bajo las condiciones de estudio, donde las concentraciones oscilaron en intervalos de 8.07 a 81.19  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para los estándares en el ensayo de DPPH y 7.01 a 51.99  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  en estándares en el ensayo de ABTS. En cambio con los extractos de los tejidos con disolventes de polaridad creciente la proporción de la capacidad inhibitoria si bien no fue cercana de la manifestada por los estándares de referencia, estos presentan resultados similares a los reportados por Shyamala *et al.* (2007), donde se logra un valor de  $CI_{50}$  de 480  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para fruto beneficiado frescos en la prueba de DPPH. Mientras que Krishanasree y Anallu (2013) reportaron para extractos metanólicos de frutos beneficiados cortados finamente y extraídos en metanol al 80 % valores de 64  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  a 92  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de  $CI_{50}$ .

Cuadro 4.4 Actividad antioxidante (CI<sub>50</sub>) frente al radical DPPH y ABTS de estándares de referencia utilizados en el análisis de antioxidantes.

Estándar	CI <sub>50</sub> (µg·mL <sup>-1</sup> )	
	DPPH	ABTS
Ácido gálico	8.07±0.84 <sup>a</sup>	7.01±0.13 <sup>a</sup>
Ácido ascórbico	25.33±0.83 <sup>b</sup>	15.96±0.34 <sup>b</sup>
BHT	81.19±0.61 <sup>c</sup>	51.99±0.30 <sup>c</sup>
DMS	0.87	0.29

Letras diferentes en cada columna indican diferencia significativa Tukey (P≤0.05).

Es recomendable utilizar varios métodos para la evaluación de la capacidad antioxidante de un alimento, ya que se puede obtener diversidad de resultados entre métodos, por las variaciones entre las condiciones de experimentación como lo mencionan Rojas-López y Cañizares-Macías (2013).

Ramos *et al.* (2003) reportan una clasificación de extractos vegetales dependiendo de la concentración de CI<sub>50</sub>. Extractos con alto potencial antioxidante son aquellos con concentraciones menores a 30 µg·mL<sup>-1</sup>, extractos con moderado potencial aquellos que presenten un intervalo entre 30 µg·mL<sup>-1</sup> y 100 µg·mL<sup>-1</sup> y extractos con bajo potencial antioxidante aquellos que presenten un CI<sub>50</sub> por encima de 100 µg·mL<sup>-1</sup>. Sin embargo, Lee *et al.* (2008) reportaron que todo extracto que tenga efecto antioxidante (CI<sub>50</sub>) con una concentración menor a 10 mg·mL<sup>-1</sup> es considerado un antioxidante efectivo, por lo que en base a este último criterio, la actividad antioxidante mostrada en frutos beneficiados y extractos de los diferentes tejidos con disolventes de polaridad creciente en los ensayos de DPPH y ABTS pueden ser considerados extractos con capacidad antioxidante alta.



La capacidad antioxidante expresada como micromoles de Equivalentes Trolox por gramo ( $\mu\text{M ET}\cdot\text{g}^{-1}$ ) resultante con la metodología de ORAC se muestran en el cuadro 4.5.

El método de ORAC es sensible y presenta la ventaja de combinar el tiempo de inhibición como grado de inhibición de la generación de radicales, ya que lleva la reacción de oxidación hasta su finalización y utiliza una técnica de área bajo la curva (AUC) para la cuantificación de la capacidad antioxidante (Prior *et al.*, 2003; Krishnaiah *et al.*, 2011). Además de que este método permite la medición de la capacidad antioxidante total ya que combina la cuantificación de componentes antioxidantes de naturaleza lipofílica y de naturaleza hidrofílica (Wu *et al.*, 2004).

La fracción hidrofílica del fruto beneficiado presentó la mayor capacidad antioxidante con un intervalo de 17329.01 a 23748.21  $\mu\text{M ET}\cdot\text{g}^{-1}$  donde los valores mayores se presentaron en el quimiotipo QVI en ambos sistemas de manejo, seguido del fruto verde con un rango de 10045.01 a 15559.67  $\mu\text{M ET}\cdot\text{g}^{-1}$ . Los tejidos vegetales hoja, tallo y flor presentaron valores de capacidad antioxidante entre 2490.73 y 7748.49  $\mu\text{M ET}\cdot\text{g}^{-1}$ .

La fracción lipofílica mostro la mayor capacidad antioxidante en el fruto beneficiado con valores entre 3453.32 y 8746.97  $\mu\text{M ET}\cdot\text{g}^{-1}$ . Los demás tejidos vegetales presentaron valores entre 600.27 y 3580.22  $\mu\text{M ET}\cdot\text{g}^{-1}$ , siendo los valores más altos los encontrados en tallo y flor del quimiotipo QVI en acahual y fruto verde en el quimiotipo QVI en malla sombra.

Dudonné *et al* (2009) reportaron valores de 1593  $\mu\text{M ET}\cdot\text{g}^{-1}$  para extracto acuoso (fracción hidrofílica) de frutos beneficiados de vainilla provenientes de Madagascar. La base de datos del Departamento de Agricultura de Estados Unidos de America (U.S. Department of Agriculture) USDA (2010) documenta una capacidad antioxidante de 1224  $\mu\text{M ET}\cdot\text{g}^{-1}$  para frutos beneficiados de vainilla, con un valor de 293  $\mu\text{M ET}\cdot\text{g}^{-1}$  para la fracción hidrofílica y 931  $\mu\text{M ET}\cdot\text{g}^{-1}$  para la fracción lipofílica.

g<sup>-1</sup> para la fracción lipofílica. Estos valores difieren de la proporción que se encontró en este trabajo, ya que los valores de la fracción hidrofílica siempre fueron mayores. En los resultados del presente estudio y bajo las condiciones de nuestro experimento se tuvieron valores de cinco a siete veces mayores de actividad antioxidante en comparación con las reportadas en la literatura por el método ORAC.

El quimiotipo QVI de acuerdo al cuadro 3.4 en el capítulo III mostró mayor concentración de compuestos fitoquímicos respecto al quimiotipo VQI, siendo el fruto beneficiado quien manifestó alto contenido de compuestos fenólicos totales, taninos hidrolizables y triterpenos totales. Esto coincide con los resultados mostrados en los cuadros 4.3 y 4.5 donde se aprecia que en los ensayos de DPPH, ABTS y ORAC los frutos beneficiados pertenecientes del quimiotipo QVI en ambos sistemas presentaron la mayor actividad antioxidante.

Debido a que muchos trabajos relacionan la capacidad antioxidante con el contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y taninos presentes en extractos de plantas (Farasat *et al.*, 2014; Abootalebian *et al.*, 2016).

Cuadro 4.5 Actividad antioxidante por el método de ORAC de diferentes tejidos de dos quimiotipos de *Vanilla planifolia* de la región del Totonacapan, México.

Sistema de manejo	Quimiotipo	Estructura vegetal	Fracción Hidrofílica	Fracción Lipofílica
			$\mu\text{M ET} \cdot \text{g}^{-1} \text{MS}$	$\mu\text{M ET} \cdot \text{g}^{-1} \text{MS}$
Acahual	Q I	Hoja	2725.49 ± 30.28 <sup>g</sup>	600.27 ± 52.18 <sup>d</sup>
		Tallo	2547.60 ± 65.96 <sup>g</sup>	1749.23 ± 81.91 <sup>c</sup>
		Flor	7748.49 ± 83.76 <sup>e</sup>	1642.52 ± 34.60 <sup>c</sup>
		Fruto verde	15559.67 ± 11.49 <sup>c</sup>	2890.46 ± 45.48 <sup>b</sup>
		Fruto beneficiado	17329.01 ± 10.93 <sup>b</sup>	6781.74 ± 78.92 <sup>a</sup>
	Q VI	Hoja	2490.73 ± 28.79 <sup>g</sup>	2805.53 ± 29.53 <sup>b</sup>
		Tallo	2964.15 ± 34.17 <sup>g</sup>	3373.41 ± 34.84 <sup>b</sup>
		Flor	5706.24 ± 66.33 <sup>f</sup>	1720.78 ± 20.49 <sup>c</sup>
		Fruto verde	10045.01 ± 82.09 <sup>d</sup>	1147.30 ± 55.68 <sup>cd</sup>
		Fruto beneficiado	23748.21 ± 49.80 <sup>a</sup>	3467.69 ± 27.93 <sup>b</sup>
		DMS	1542.4	760.75
Malla sombra	Q I	Hoja	3251.32 ± 11.77 <sup>fg</sup>	1362.20 ± 30.08 <sup>d</sup>
		Tallo	3890.73 ± 40.62 <sup>ef</sup>	855.45 ± 53.35 <sup>e</sup>
		Flor	5222.47 ± 36.78 <sup>d</sup>	963.62 ± 10.71 <sup>e</sup>
		Fruto verde	13022.24 ± 88.96 <sup>c</sup>	738.38 ± 10.34 <sup>e</sup>
		Fruto beneficiado	18814.54 ± 81.00 <sup>b</sup>	3453.32 ± 24.26 <sup>b</sup>
	Q VI	Hoja	2849.88 ± 25.94 <sup>g</sup>	2926.15 ± 18.37 <sup>c</sup>
		Tallo	4595.75 ± 27.86 <sup>de</sup>	2651.60 ± 15.07 <sup>c</sup>
		Flor	4471.30 ± 13.82 <sup>de</sup>	2808.68 ± 13.94 <sup>c</sup>
		Fruto verde	12247.57 ± 58.27 <sup>c</sup>	3580.22 ± 35.03 <sup>b</sup>
		Fruto beneficiada	20322.37 ± 58.27 <sup>a</sup>	8746.97 ± 78.91 <sup>a</sup>
		DMS	990.59	360.02

QI: Quimiotipo QI, QVI: Quimiotipo QVI. Letras diferentes en cada columna indican diferencia significativa Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

La correlación entre las variables del ensayo de DPPH/CI<sub>50</sub> y ABTS/CI<sub>50</sub> respectivamente, mostraron valores negativos con la concentración de compuestos fenólicos totales (-0.90541\*\*\*; -0.90394\*\*\*), flavonoides (-0.50996\*; -0.58793\*\*), saponinas (-0.70139\*\*; -0.8444\*\*\*) y triterpenos totales (-0.77902\*\*\*; -0.77768\*\*\*) (Cuadro 4.6). El método ORAC en sus fracciones hidrofílica y lipofílica mostraron correlaciones positivas con respecto al contenido de compuestos fenólicos totales (0.89944\*\*\*; 0.63342\*\*), la fracción hidrofílica con saponinas (0.78466\*\*\*) y ambas fracciones con triterpenos totales (0.7283\*\*; 0.57403\*\*) (Cuadro 4.6). En particular se observó una fuerte correlación negativa entre el contenido de compuestos fenólicos totales con la capacidad de atrapar radicales libres (DPPH/CI<sub>50</sub> y ABTS/CI<sub>50</sub>), y positiva con la fracción hidrofílica del ensayo ORAC, lo que indica que estos compuestos son altamente responsables de la actividad antioxidante de los tejidos de vainilla analizados.

Las propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos están directamente relacionadas con su estructura química, ya que estos compuestos se componen de uno o más anillos aromáticos que llevan uno o más grupos hidroxilo y, por lo tanto, son potencialmente capaces de atrapar radicales libres formando radicales fenoxilo estabilizados (Rice-Evans *et al.*, 1996; Bors y Michel, 2002). En caso de las saponinas y triterpenos estos pueden actuar como antioxidantes directos a través de mecanismos de eliminación de radicales libres y/o como antioxidantes indirectos al mejorar el estado antioxidante (enzimático y no enzimático). Además, de ser compuestos estructurales extensos y variados en la naturaleza, que muestran una amplia gama de actividades biológicas y farmacológicas. (González-Burgos y Gómez-Serranillos, 2012; Akinpelu *et al.*, 2014).

Cuadro 4.6. Análisis de correlación (R) entre la actividad antioxidante y compuestos fitoquímicos en los diferentes tejidos de *Vanilla planifolia*.

	<b>DPPH (CI<sub>50</sub>)</b>	<b>ABTS (CI<sub>50</sub>)</b>	<b>ORAC Fracción hidrofílica</b>	<b>ORAC Fracción lipofílica</b>	<b>Compuestos fenólicos totales</b>	<b>Flavonoides</b>	<b>Saponinas</b>	<b>Triterpenos totales</b>
<b>DPPH (CI<sub>50</sub>)</b>	1	0.94263 ***	-0.92466 ***	-0.60069 **	-0.90541 ***	-0.50996 *	-0.70139 **	-0.77902 ***
<b>ABTS (CI<sub>50</sub>)</b>		1	-0.94209 ***	-0.54064 **	-0.90394 ***	-0.58793 **	-0.84447 ***	-0.77768 ***
<b>ORAC Fracción hidrofílica</b>			1	0.63964 **	0.89944 ***	0.48531 *	0.78466 ***	0.7283 **
<b>ORAC Fracción lipofílica</b>				1	0.63342 **	0.22413 NS	0.42046 NS	0.57403 **
<b>Compuestos fenólicos totales</b>					1	0.68903 **	0.80693 ***	0.70666 **
<b>Flavonoides</b>						1	0.68589 **	0.40489 NS
<b>Saponinas</b>							1	0.60624 *
<b>Triterpenos totales</b>								1

\*\*\*= p<0.001 Muy altamente significativo, \*\*= p<0.01 altamente significancia, \*= p<0.05 Significativo y NS= No significativo.

#### 4.4 CONCLUSIONES

En este estudio se determinó la capacidad antioxidante de la hoja, tallo, flor, fruto verde y fruto beneficiado de dos quimiotipos de vainilla en dos sistemas de manejo de cultivo. La actividad antioxidante *in vitro* observada en los frutos beneficiados de vainilla mostró la más alta capacidad por DPPH, ABTS y ORAC. El quimiotipo QVI tuvo mayor actividad antioxidante que el quimiotipo QI. La actividad antioxidante se correlacionó con el contenido de compuestos fenólicos totales seguido de los triterpenos totales.

Las condiciones en el manejo, como la cantidad de radiación interceptada y temperatura promedio, influyeron en la actividad antioxidante de los tejidos evaluados, que limitó dicha propiedad en frutos cultivados en el sistema de malla sombra. El sistema de manejo en acahual presentó condiciones adecuadas para el desarrollo de compuestos fitoquímicos como compuestos fenólicos totales y triterpenos totales, los cuales son responsables de la actividad antioxidante.

#### 4.5 LITERATURA CITADA

- Abootalebian M, Keramat J, Kadivar M, Ahmadi F, Abdinian M. 2016. Comparison of total phenolic and antioxidant activity of different *Mentha spicata* and *M. longifolia* accessions. *Annals of Agricultural Science*. 61: 175-179.
- Akinpelu BA, Igbeneghu OA, Awotunde AI, Iwalewa EO, Oyedapo OO. 2014. Antioxidant and antibacterial activities of saponin fractions of *Erythropheleum suaveolens* (Guill. And Perri.) stem bark extract. *Scientific Research and Essays*. 9: 826-833.
- Alexieva V, Sergiev I, Mapelli S, Karanov E. 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell & Environment*. 24: 1447-1344.

- Arnao MB. 2000. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science & Technology*. 11: 419-421.
- Awika JM, Rooney LW, Wu X, Prior RL, Cisneros-Zevallos L. 2003. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 6657-6662.
- Bors W, Michel C. 2002. Chemistry of the antioxidant effect of polyphenols. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 957: 57-69.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*. 28: 25-30.
- Bythrow JD. 2005 Historical Perspective: Vanilla as a Medicinal plant. *Seminars in integrative medicine*. 3: 129-131.
- Cao G, Alessio HM, Cutler RG. 1993. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology & Medicine*. 14: 303-311.
- Cao G, Prior RL. 1999. Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. *Methods in Enzymology*. 299: 50-62.
- Chen JC, Yeh JY, Chen PC, Hsu CK. 2007. Phenolic Content and DPPH Radical Scavenging Activity of Yam-containing Surimi Gels Influenced by Salt and Heating. *Asian Journal of Health and Information Science*. 2: 1-11.
- Deng J, Cheng W, Yang G. 2011. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. *Food Chemistry*. 125: 1430-1435.
- Dudonné S, Vitrac X, Coutière P, Woillez M, Mérillon JM. 2009. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial

- Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 1768-1774.
- Farasat M, Khavari-Nejad RA, Bagher SM, Namjooyan F. 2014. Antioxidant Activity, Total Phenolics and Flavonoid Contents of some Edible Green Seaweeds from Northern Coasts of the Persian Gulf. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 13: 163-170.
- Ferguson LR. 1994. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. *Mutation Research*. 307: 395-410.
- García-Mateos R, Aguilar-Santelises L, Soto-Hernández M, Nieto-Angel R, Kite G. 2012. Total phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity in flowers of *Crataegus* spp. from México. *Agrociencia*. 46: 651-662.
- Gil MI, Tomás-Barberán F, Hess-Pierce B, Kader AA. 2002. Antioxidant Capacities, Phenolic Compounds, Carotenoids, and Vitamin C Contents of Nectarine, Peach, and Plum Cultivars from California. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 4976-4982.
- González-Burgos E, Gómez-Serranillos. 2012. Terpene compounds in nature: a review of their potential antioxidant activity. *Current Medicinal Chemistry*. 19: 5319-5341.
- Herrera-Cabrera BE, Hernández-Ruíz J, Delgado-Alvarado A. 2016. Variación de aroma en *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews silvestre y cultivada. *Agroproductividad*. 9: 10-17.
- Krishnaiah D, Sarbatly R, Nithyananham R. 2011. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing*. 89: 217-233.
- Krishnasree V, Adallu B. 2013. Radical scavenging activity of vanilla (*Vanilla fragrans*) pods and commercial vanilla essence. *International Journal of Scientific and Research Publications*. 3: 1-5.



- Kuskoski EM, Asuero AG, García-Parilla MC, Troncoso AM, Fett R. 2004. Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. *Food Science and Technology*. 24: 691-693.
- Larrauri JA, Ruperez P, Saura-Calixto F. 1997. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45: 1390-1393.
- Lee YL, Jian SY, Lian PY, Mau JL. 2008. Antioxidant properties of extracts from a White mutant of the mushroom *Hypsizigus marmoreus*. *Journal of Food Composition & Analysis*. 21: 116-124.
- Leong LP, Shui G. 2002. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chemistry*. 76: 69-75.
- Mierziak J, Kostyn K, Kulma A. 2014. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules*. 19: 16240-16265.
- Nacif de Abreu I; Mazzafera P. 2005. Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. *Plant Physiology and Biochemistry*. 43: 241-248.
- Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 4619-4926.
- Prior RL, Hoang H, Gu L, Wu X, Bacchiocca M, Howard L, Hampsch-Woodill M, Huang D, Ou B, Jacob R. 2003. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 3273-3279.

- Ramos A, Visozo A, Piloto J, García A, Rodríguez CA, Rivero R. 2003. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 87: 241-246.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Tang M, Rice.Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*. 26: 1231-1237.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acid. *Free Radical Biology & Medicine*. 20: 933-956.
- Rojas-López A, Cañizares-Macías MP. 2013. Antioxidant Capacity in Vanilla Extracts Obtained by Applying Focused Microwaves. *Food and Nutrition Sciences*. 4: 244-253.
- SAS. 2002. Statistical Analysis Software Versión 9.0. SAS Institute Inc. North Caroline. USA.
- Shanmugavalli N, Umashankar V, Raheem A. 2009. Antimicrobial activity of *Vanilla planifolia*. *Indian Journal of Science and Technology*. 2: 37-40.
- Shyamala BN, Naidu MM, Sulochanamma G, Srinivas P. 2007. Studies on the antioxidant activities of natural vanilla extract and its constituent compounds through in vitro models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 7738-7743.
- Tai A, Sawano T, Yazama F, Ito H. 2011. Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assays. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1810: 170-177.
- Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Byrne DH. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extrats. *Journal of Food Composition and Analysis*. 19: 669-675.

- U.S. Department of Agriculture (USDA). 2010. Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, Release 2, Agricultural Research Service. Nutrient Data Laboratory Home Page. <http://www.ars.usda.gov/nutrientdata/orac>. Consultada: 16 de enero 2016.
- Villanueva-Tiburcio JE, Condezo-Hoyos LA, Ramirez E. 2010. Antocianinas, ácido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante, en la cáscara de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K) McVaugh). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 30: 151-160.
- Wu X, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior RL. 2004. Lipophilic and Hydrophilic Antioxidant Capacities of Common Foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 4026-4037.

## CAPITULO V

### TOXICIDAD AGUDA (DL<sub>50</sub>) Y MOTILIDAD GASTROINTESTINAL DE EXTRACTOS

#### ACUOSO Y METANÓLICO DE FRUTOS BENEFICIADOS DE *Vanilla planifolia* J. ex

Andrews

#### Resumen

En México, las enfermedades digestivas son un problema de salud pública que afectan a un gran número de personas. El objetivo del presente trabajo fue determinar la dosis letal media, así como la motilidad gastrointestinal en ratones, de extracto acuoso y de metanol de *Vanilla planifolia* cultivada en la región del Totonacapan. Los extractos fueron analizados por el método de Lorke modificado para la estimación de la dosis letal media, para la determinación de la motilidad gastrointestinal se ocupó el método de carbón activado como marcador en el tracto intestinal. Los resultados indicaron un débil nivel de toxicidad aguda en ambos extractos de vainilla, el acuoso y el de metanol. El extracto de metanol fue capaz de disminuir el avance del contenido gastrointestinal bajo las condiciones experimentales probadas, lo que sugiere que este extracto puede ser útil en el tratamiento de diarrea. El extracto acuoso no mostro diferencia entre los grupos administrados a pesar de un aumento en la dosis y además presenta un comportamiento laxante, por lo que para emitir una conclusión del comportamiento de este extracto se requiere mayor experimentación.

Palabras clave: dosis letal media, motilidad gastrointestinal, *Vanilla planifolia*.

ACUTE TOXICITY (LD<sub>50</sub>) AND GASTROINTESTINAL MOTILITY OF AQUEOUS AND  
METHANOLIC EXTRACTS OF CURED FRUITS OF *Vanilla planifolia* J. ex Andrews

Abstract

In Mexico, digestive diseases are a public health problem that affects a large number of people. The objective of this study was to determine the median lethal dose and gastrointestinal motility in mice, of aqueous and methanol extracts of *Vanilla planifolia* grown in the Totonacapan region. The extracts were analyzed by the modified Lorke method for the estimation of the median lethal dose. For the determination of gastrointestinal motility, the activated carbon method was used as a marker in the intestinal tract. The results indicated a weak level of acute toxicity in both vanilla extracts, aqueous and methanol. The methanol extract was able to decrease the advance of the gastrointestinal content under the experimental conditions tested, which suggests that this extract may be useful in the treatment of diarrhea. The aqueous extract showed no difference between the groups administered despite an increase in the dose and also presents a laxative behavior, so to issue a conclusion on the behavior of this extract requires further experimentation.

Key words: median lethal dose, gastrointestinal motility, *Vanilla planifolia*.

## 5.1 INTRODUCCIÓN

Las enfermedades gastrointestinales son una de las primeras causas de consulta médica y también una de las primeras causas de muerte en México y en el mundo (Hernández *et al.*, 2011). Por lo que se considera un problema de salud pública a nivel mundial, especialmente en países en vía de desarrollo donde afecta a personas de cualquier edad y condición social, principalmente a niños (León-Ramírez, 2002).

El uso de plantas con fines medicinales es una práctica común en la medicina tradicional, es el producto de conocimiento empírico de la interacción hombre-planta (Toso *et al.*, 2012).

La vainilla (*Vanilla planifolia* J. ex Andrews) desde la época prehispánica ha sido utilizada como medicina tradicional para aliviar diversas enfermedades, entre las cuales se mencionan: dismenorrea, fiebre, histeria, dispepsia, prevención de caries dental, dolor de muelas y úlceras (Menon y Nayeem, 2013). Los extractos de frutos beneficiados y en particular la vainillina, que es el compuesto responsable del aroma de la vainilla, tiene efectos anticarcinogénicos (Lirdprapamongkol, 2005; Ho, 2009), antimutagénico (King *et al.*, 2007), antimicrobiano (Shanmugavalli *et al.*, 2009) y también posee una alta capacidad antioxidante (Tai *et al.*, 2011).

Un aspecto esencial en el estudio y uso de las plantas medicinales es la determinación de la toxicidad aguda, este debe ser el primer ensayo realizado a una planta determinada, de la cual se considera que posee propiedades nutracéuticas, esto con la finalidad de conocer el potencial tóxico de una sustancia, referido como el estudio cuali-cuantitativo de los fenómenos tóxicos y de su aparición en función del tiempo tras la administración de una dosis única de la sustancia (Ogbuehi *et al.*, 2015). La dosis letal media (DL<sub>50</sub>) para una sustancia particular es la cantidad que causa la muerte a la mitad (es decir, 50%) de un grupo de algunas especies animales

particulares, como ratas o ratones, cuando se administra por una vía particular (Randhawa, 2009).

A su vez, estudios relacionados con la toxicidad aguda y el valor de  $DL_{50}$  han permitido elaborar sistemas de clasificación referentes al grado de toxicidad para valorar un compuesto determinado. Un beneficio terapéutico de la vainilla reportado por Abuirmeileh *et al.* (2015) es su propiedad antiespasmódica, por lo que un estudio sobre la motilidad gastrointestinal es necesario. La motilidad gastrointestinal in vivo, es “la propiedad de las paredes intestinales para contraerse y relajarse a fin de que el contenido del intestino vaya de un lugar a otro, que favorece la absorción adecuada de nutrientes” (Romero-Trujillo *et al.*, 2012).

## **5.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material vegetal**

Los frutos beneficiados de vainilla se obtuvieron durante el 2015 de la región del Totonacapan Puebla-Veracruz. El beneficiado que recibieron fue artesanal realizado durante 14 semanas.

El material vegetal se secó a temperatura ambiente y cortó en trozos pequeños de aproximadamente 5 mm.

### **Animales**

Se emplearon ratones albinos, cepa NIH, hembras, con peso de 20 a 25 g, que se mantuvieron en condiciones de ayuno por 24 h previas al experimento, con libre acceso al agua. La vía de administración fue oral en todos los tratamientos y los volúmenes administrados correspondieron

a la centésima parte del peso corporal del ratón. Los animales fueron tratados de acuerdo a las recomendaciones de la NOM-062-ZOO-1999 (Lomelí, 2002).

### **Obtención del extracto acuoso**

La preparación del extracto se realizó a partir de frutos beneficiados secos y molidos (400 g). Se extrajo por medio de Soxhlet con agua destilada. El extracto se filtró por gravedad y se concentró en un evaporador rotatorio Buchi RE-111, y finalmente se expuso a una corriente de aire a temperatura ambiente ( $22 \pm 2$  °C).

### **Obtención del extracto de metanol**

El extracto con metanol se preparó por maceración a temperatura ambiente durante 48 horas a partir de 400 g de fruto seco y molido, posteriormente se filtró por gravedad; esta operación se realizó en tres ocasiones para finalmente concentrar en un evaporador rotatorio Buchi RE-111, y finalmente se expuso a una corriente de aire a temperatura ambiente ( $22 \pm 2$  °C).

### **Determinación de la toxicidad aguda Dosis letal media (DL<sub>50</sub>)**

Se empleó la metodología de Lorke (1983) modificada por De la Cruz *et al.* (2012). Se formaron tres grupos de tres animales cada uno, se marcaron y pesaron. La determinación de la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) se determinó en dos fases. La primera consistió en administrar una dosis al grupo por vía intraperitoneal en un intervalo de dosis de 10 – 1000 mg·kg<sup>-1</sup> de peso. Pasadas 48 horas se registró la mortalidad de los ratones y los sobrevivientes fueron monitoreados durante un lapso de 15 días. En la segunda fase, se administraron dosis en un intervalo de 1600 – 5000 mg·kg<sup>-1</sup> de peso.



La ecuación para determinar las dosis letal media ( $DL_{50}$ ): [a: dosis correspondiente al <50% de mortalidad; b: dosis correspondiente al >50% de mortalidad;  $P_{50}$ : unidades probit de mortalidad del 50%;  $P_a$ : unidades probit de la dosis a;  $P_b$ : unidades probit de la dosis b (De la Cruz *et al.*, 2012).

$$\text{Log}LD_{50} = \left[ \frac{P_{50} - P_a}{P_b - P_a} \right] \log\left(\frac{b}{a}\right) + \log(a)$$

### **Motilidad gastrointestinal en ratón**

Se formaron cinco grupos de 10 animales cada uno. Los ratones se mantuvieron en ayunas durante 24 h antes del experimento, permitiéndoles el libre acceso a agua. Los extractos en un intervalo de dosis de 100 – 1000  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , loperamida (testigo positivo) y la solución salina isotónica se administraron por vía oral. Treinta minutos después, se administró a todos los animales una suspensión de goma arábica (5 %) y carbón activado (10 %). Transcurridos treinta minutos, todos los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se extrajeron los intestinos. Se determinó la longitud del intestino, la distancia recorrida por el marcador y se calculó el porcentaje de avance del marcador de cada ratón, en cada uno de los grupos (Williamson *et al.*, 1996; Romero *et al.*, 2009).

### **Análisis estadístico**

Se empleó un análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Dunnett para determinar diferencias significativas en el avance del marcador (De la Cruz *et al.*, 2012)

### 5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Extractos

En el figura 5.1 se muestran los extractos acuoso y metanólico de los frutos beneficiados de *Vanilla planifolia*. En el cuadro 5.1 se concentran los rendimientos obtenidos de los extractos.

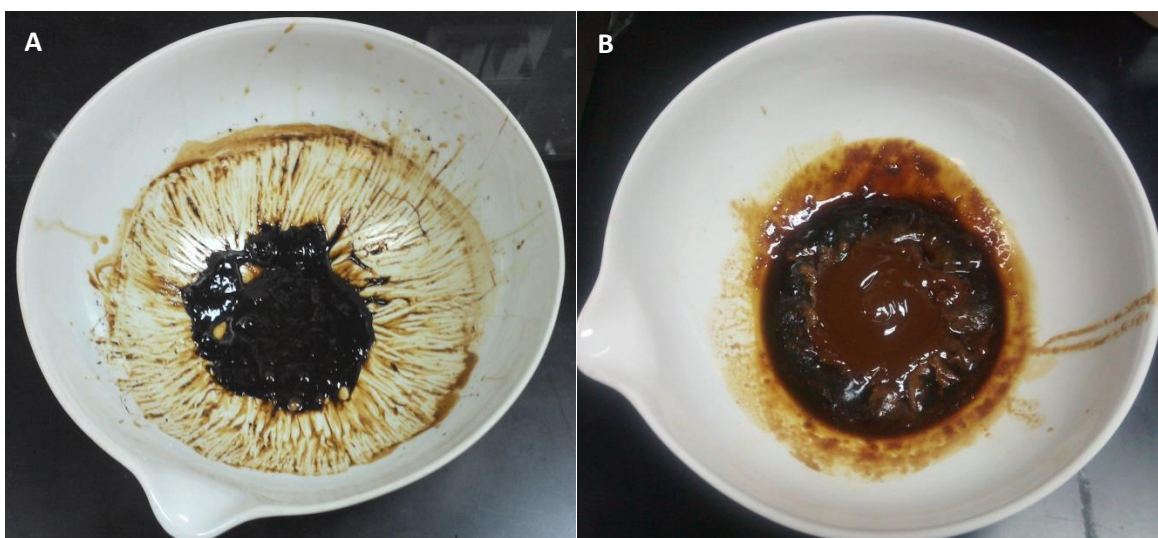


Figura 5.1 Extracto acuoso (A) y extracto metanólico (B) de frutos beneficiados de *Vanilla planifolia*.

Cuadro 5.1 Rendimientos de extractos de *Vanilla planifolia*.

Extracto	Rendimiento (%)	Consistencia	Color
Acuso	17.85	Pastosa semisólida	Café oscuro
Metanólico	13.83	Pastosa semisólida	Café oscuro

En el extracto de metanol se formaron dos fases una sólida en mayor cantidad y una líquida. La prueba de motilidad inter intestinal se efectuó con la fase pastosa-sólida.

### **Dosis letal media (DL<sub>50</sub>)**

En el cuadro 5.2 se presenta los resultados de la dosis letal media de los diferentes extractos obtenidos.

Cuadro 5.2. Dosis letal media de extractos totales de *Vanilla planifolia* (DL<sub>50</sub>).

<b>Extracto</b>	<b>DL<sub>50</sub> (g·kg<sup>-1</sup>)</b>
Acuoso	3.07
Metanólico	2.08

Los resultados obtenidos para la DL<sub>50</sub> de los extractos acuoso y metanólico (fase pastosa) de *V. planifolia* muestran que son débilmente tóxicos. Lo anterior, de acuerdo con la clasificación propuesta por Montoya (2002). Por lo que los extractos no inducen toxicidad inmediata en las condiciones de experimentación empleadas.

Las figuras 5.2 y 5.3 presentan la actividad del extracto metanólico y extracto acuoso sobre la motilidad gastrointestinal. Existe diferencia estadísticamente significativa en el avance del marcador, entre el grupo administrado con solución salina isotónica y los grupos administrados con las dosis de 300 mg·kg<sup>-1</sup> y de 1000 mg·kg<sup>-1</sup> del extracto metanólico de vainilla. Esto significa que este extracto disminuye el avance del contenido gastrointestinal en ratón, a las dosis probadas, por lo que pudiera ser útil en el tratamiento de diarrea. Estos resultados de experimentación *in vivo* concuerdan con los informados en experimentación *in vitro* sobre vainilla (Abuiermeileh *et al.*, 2015).

Si bien, en general se observa diferencia estadística entre el grupo administrado con solución salina isotónica y los grupos administrados con el extracto acuoso de vainilla, no se encontró diferencia entre los grupos administrados con el extracto a pesar del aumento en las dosis.

Se requiere mayor experimentación para poder emitir una conclusión respecto al efecto de este extracto acuoso.

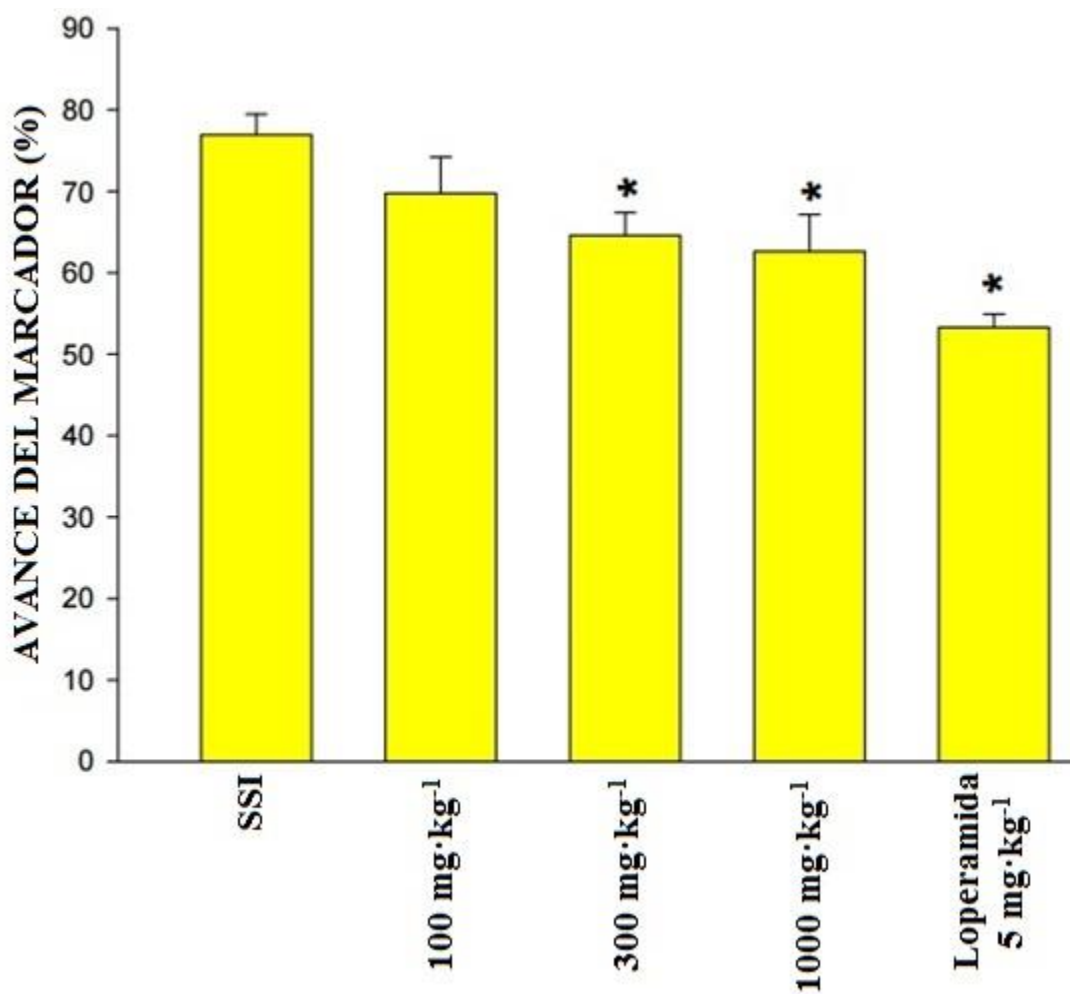


Figura 5.2 Actividad del extracto metanólico de *V. planifolia* J. SSI (solución salina isotónica), loperamida (referencia) y las diferentes dosis del extracto metanólico de *V. planifolia*. \*Diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo negativo, ANOVA seguido de la prueba de Dunnett,  $p < 0.05$ . Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar media (EEM) (n=10 ratones/grupo).

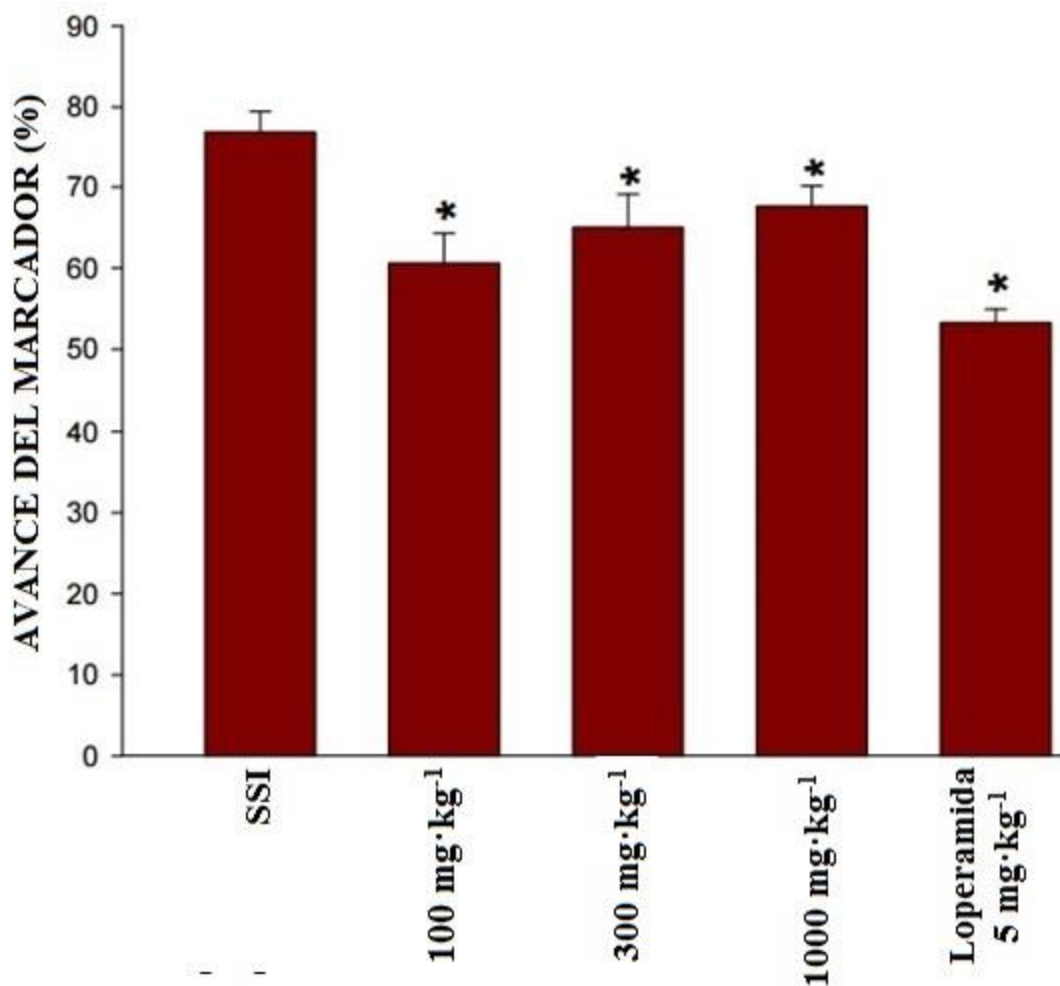


Figura 5.3 Actividad del extracto acuoso de *V. planifolia* J. SSI (solución salina isotónica), loperamida (referencia) y las diferentes dosis del extracto metanólico de *V. planifolia*. \*Diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo negativo, ANOVA seguido de la prueba de Dunnet,  $p < 0.05$ . Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar media (EEM) (n=10 ratones/grupo).

## 5.4 CONCLUSIONES

Los valores de la prueba toxicológica de los extractos de frutos beneficiados de *V. planifolia*, ubica a los extractos acuosos y metanólico de la vainilla como débilmente tóxicos en las condiciones experimentales probadas.

El extracto metanólico de *V. planifolia* fue capaz de disminuir el avance del contenido gastrointestinal bajo las condiciones experimentales probadas, por lo que pudiera ser útil en el tratamiento de diarrea.

## 5.5 LITERATURA CITADA

- Calixto JB. 2005. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personal view. *Journal of Ethnopharmacology*. 100: 131-134.
- De la Cruz, Rodríguez E, Dávalos HN, Astudillo-Vázquez A. 2012. Acute toxicity and decreased peristalsis in mice caused by *Taxodium mucronatum* and *Acacia farnesiana* extracts. *Revista Latinoamericana de Química*. 40: 19-25.
- Hernández C, Aguilera MG, Castro G. 2011. Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enfermedades infecciosas y microbiología*. 4: 137-151.
- Ho K, Latifah SY, Norsharina I, Maznah I. 2009. Apoptosis and cell cycle arrest of human colorectal cancer cell line HT-29 induced by vanillin. *Cancer Epidemiology*. 33: 155-160.
- King AA, Shaughnessy DT, Mure K, Leszczynska J, Ward WO, Umbach DM. 2007. Antimutagenicity of cinnamaldehyde and vanillin in human cells, global gene expression and possible role of DNA damage and repair. *Mutatational Research*. 616: 60-69.
- León-Ramírez S. 2005. Shigelosis (disentería bacilar). *Salud en Tabasco*. 8: 22-25.
- Lirdprapamongkol K, Sakurai H, Kawasaki N, Choo MK, Saitoh Y, Aozuka Y, Singhirunnusorn P, Ruchirawat S, Svasti J, Saiki. 2005. Vanillin suppresses *in vitro* invasion and *in vivo* metastasis of mouse breast cancer cells. *Journal of Pharmaceutical Science*. 25: 57-65.
- Lomelí C. 2002. Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio. Institute of Laboratory Animal Resources Council, Commission on Life Sciences, National Research Council. Ed. Academia Nacional de Medicina. México. pp. 25-55.

- Lorke D. 1983. A new approach to practical acute toxicity testing. *Archives of Toxicology*. 54: 275-87.
- Menon S, Nayeem N. 2013. *Vanilla Planifolia*: A Review of a Plant Commonly Used as Flavouring Agent. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 42: 225-228.
- Montoya MA. 2002. Intoxicaciones y envenenamientos: guías diagnósticas y terapéuticas para el médico general y especialista. 1ª Ed. México.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”. Diario oficial de la Federación. México.
- Ogbuehi IH, Ebong OO, Obianime A. 2015. Oral acute toxicity (LD<sub>50</sub>) study of different solvent extracts of *Abrus precatorius* Linn leaves in wistar rats. *European Journal of Experimental Biology*. 5: 18-25.
- Randhawa MA. 2009. Calculation of LD<sub>50</sub> values from the method of miller and tainter, 1944. *Journal of Ayub Medical College Abbottabad*. 21: 1-2.
- Romero MA, Dávalos HN, Astudillo-Vázquez A. 2009. Actividad gastrointestinal del fruto de *Cydonia oblonga* Miller. *Revista Latinoamericana de Química*. 37: 115-121.
- Romero-Trujillo JO, Frank-Márquez D, Cervantes-Bustamante R, Cadena-León JF, Montijo-Barrios F, Zárate-Mondragón F, Cázares-Méndez FM, Ramírez-Mayans J. 2012. Sistema nervioso entérico y motilidad gastrointestinal. *Acta Pediátrica de México*. 33: 207-214.
- Shanmugavalli N, Umashankar V, Raheem. 2009. Antimicrobial activity of *Vanilla planifolia*. *Indian Journal of Science and Technology*. 2: 37-40.
- Tai A, Sawano T, Yazama F, Ito H. 2011. Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assays. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2:170-177.

Toso RE, Poblete G, Boeris MA. 2012. Efecto de *Prosopis flexuosa* DC. var. *flexuosa* (“algarrobo”) sobre la motilidad gastrointestinal. *Ciencia Veterinaria*. 14: 54-61.

Williamson EM, Okpako DT, Evans FJ. 1996. Selection, preparation and pharmacological evaluation of plant material. *Pharmacological methods in Phytotherapy Research*. John Wiley and Sons. Chichester. p. 28.



## DISCUSIÓN GENERAL

Durante años, la función de los compuestos fitoquímicos era desconocida, se creía que estos compuestos eran productos finales del metabolismo sin función o metabolitos de desecho (Taiz y Zeiger, 2012). De forma reciente se descubrió que tenían importante funciones ecológicas en las plantas, como servir como atrayentes de polinizadores y dispensadores de semilla y como agentes en la competencia planta-planta, y como proteger a las plantas de la ingestión de herbívoros y de la infección por patógenos microbianos (Brown y Trigo, 1995). Gran parte de esta propiedad de defensa de las plantas son un producto de la mutación hereditaria, selección natural y cambios evolutivos (Theis y Lerdau, 2003).

Los efectos bióticos incluyen interacciones más sofisticadas con la bioquímica vegetal y la fisiología vegetal. En un sentido más amplio puede suponerse que los efectos bióticos están relacionados con las interacciones de plantas con aspectos fisiológicos de las plantas, como la fenología y la ontogenia. Los efectos abióticos que contribuyen a su biosíntesis se incluyen todos los efectos físicos que gobiernan el hábitat, tales como la luz, o la radiación UV-vis, la disponibilidad de agua (que conduce a la influencia de la sequía), la temperatura y la composición del suelo. (Briskin, 2000; Pavarini *et al.*, 2012)

En este sentido, el cultivo de la vainilla depende en gran medida del manejo adecuado de la luz, ya que es el factor ambiental con mayor influencia sobre la fotosíntesis de las plantas y por lo tanto sobre el crecimiento, la supervivencia y, en última instancia, la habilidad de aclimatación a diferentes hábitats (Puthur, 2005). La importancia de establecer la capacidad de aclimatación de las plantas de vainilla a diferentes ambientes de luz y determinar las más favorables para su crecimiento. Por lo que es necesario establecer un microclima apropiado para la planta que

genera lo menos posible su exposición solar, lo que ocasionará una disminución en las fluctuaciones de temperatura y humedad del aire (Colley *et al.*, 2000; Diez *et al.*, 2016).

Zotz y Andrade (2002) resaltan la importancia de las condiciones microclimáticas para la distribución y crecimiento de las epífitas y hemiepífitas y exponen que la mayoría de estas plantas prefieren sitios intermedios: ni muy expuestos ni totalmente a la sombra, en cuanto a luz se refiere, reafirman a la luz como una de las variables más influyentes en el crecimiento y desarrollo de las plantas.

El sistema tradicional (acahual), generalmente ubicado en terrenos con pendientes ligeras y pronunciadas, presenta abundante vegetación secundaria que en algunos casos es usada como tutor, y ofrece buena sombra; además los suelos presentan abundante materia orgánica lo que los hace ricos en nutrientes (Soto-Arenas, 2006). La cantidad de agua requerida es de vital importancia sobre todo en la etapa de crecimiento y desarrollo del fruto, ya que prolongadas sequías provocan la caída del fruto antes de su maduración, en este sistema de manejo la mayoría depende de riego de temporal, sin embargo, algunos cuentan con un sistema de riego artificial (Curti, 1995; Mata *et al.*, 2007).

El sistema de manejo en malla sombra, que trata de semejar las condiciones que requiere la vainilla en forma natural. La regulación de sombra se logra colocando malla color negro al 50% de sombra, la humedad se satisface con un sistema de riego ya sea por goteo o aspersión. Esto permite un microclima ideal semejante al que ofrece el dosel de los árboles para el manejo de vainilla en áreas de pequeñas superficies. En cuanto a la regulación de la temperatura algunos autores mencionan que es ideal mantener la malla a una altura de 4 m sin cubrir las paredes con

el fin de permitir que el lote se mantear ventilado y esto regule la temperatura durante las épocas más calurosas (Vargas-Hernández y Gamez-Vazquez, 2014).

Diez *et al.* (2017) mencionan que la vainilla como la mayoría de las orquídeas, para su adecuado desarrollo necesita la recreación de condiciones microecológicas constantes, que den como resultado un ambiente favorable. Por lo que este cultivo depende en gran medida del manejo adecuado de la luz, ya que es el factor ambiental con mayor influencia sobre la fotosíntesis de las plantas y por lo tanto sobre su crecimiento, su supervivencia y, la adecuada aclimatación en diferentes hábitats (Puthur, 2005). Ello hace necesario establecer microclimas apropiados para la disminución en las fluctuaciones de temperatura y humedad del aire (Colley *et al.*, 2000). Ya que una sobreexposición de alta radiación solar desencadena mecanismos de desacoplamiento y desactivación entorno al fotosistema II, debido a que la intensidad de luz sobrepasa la capacidad de absorción y transformación de la planta. Ello ocasiona la búsqueda de mecanismos que minimicen el daño global sobre el aparato fotosintético y, por tanto, proteja a la planta mediante la maximización de la disipación de la luz (Nelson y Yocum, 2006).

En este trabajo, los atributos fisicoquímicos de los frutos beneficiados presentaron diferencia significativa, lo que confirmo que dichos caracteres se encuentran relacionados con las condiciones de manejo. En particular, los azúcares solubles totales (AST), glucosa, fructosa y sacarosa del quimiotipo QI presentaron los valores más altos en el sistema de manejo en acahual. Estos azúcares se encuentran involucrados con la reacción de Maillard, la cual tiene presencia en el proceso de curado, misma que es afectada por la temperatura, ya que el calor ocasiona que se rompan los enlaces químicos que unen a las moléculas de la sacarosa, compuesta por fructosa y glucosa, para posterior formar distintos fragmentos de moléculas que reaccionan entre sí para

formar compuestos volátiles, que se caracterizan por presentar un aroma agradable (Badui, 2006; Palama, 2010).

Los azúcares en las plantas se originan de la fotosíntesis y son los principales compuestos químicos que almacenan la energía radiante del Sol (BeMiller y Huber, 2007). Sin embargo, como se había mencionado antes, las temperaturas altas pueden dañar los componentes fotosintéticos de las hojas y reducir las tasas de asimilación de dióxido de carbono, en comparación con los ambientes que tienen temperaturas óptimas. La sensibilidad de la fotosíntesis al calor, se debe principalmente al daño de los componentes del fotosistema II (membranas de tilacoides del cloroplasto) y a la alteración en las propiedades de la membrana (Al-Khatib y Paulsen, 1999). Lo anterior se comprueba tomando como base la radiación interceptada en el sistema de malla sombra para el quimiotipo QI que fue de 30 % y para el quimiotipo QVI de 45 %, en comparación con el sistema de acahual que tuvo 79 % en el quimiotipo QI y 60 % en el quimiotipo VI. Esto pudo haber propiciado que la fructosa y sacarosa, en el sistema de manejo de malla sombra, que tuvo una cantidad mayor de radiación, se hayan sintetizado en mayor cantidad por la condición de estrés lumínico en el ambiente. Mientras que la condición del sistema de acahual mostro una cantidad de radiación interceptada mayor que ocasionan condiciones óptimas para el proceso de fotosíntesis y crecimiento adecuado para producir vainas con mejor tamaño.

En cuanto al aroma de los frutos beneficiados, el sistema de acahual favoreció una concentración menor de ácido *p*-hidroxibenzóico y ácido vanílico. Mientras que la concentración de vainillina mostro diferencia significativa entre los dos sistemas de manejo, dando una mayor concentración en el sistema de acahual, donde los frutos con valores altos se presentaron en QI seguido del quimiotipo QVI. Lo cual sugiere que la acumulación de la vainillina está directamente

relacionada con factores ambientales adecuados para la síntesis de este compuesto, aunado a la madurez del fruto, tipo de beneficiado, criterios de selección de los productores respecto al aroma (Ranadive, 1992; Sánchez *et al.*, 2001; Salazar-Rojas *et al.*, 2012). Fue notable que el análisis de componentes principales y conglomerados mostró una agrupación similar a lo que propone Salazar *et al.* (2012), quienes plantean que el patrón de distribución de los diferentes quimiotipos de *V. planifolia* que existen en la región del Totonacapan no está condicionada por la variación ambiental, sino por el proceso de selección y domesticación de los totonacas a las accesiones existentes en la región para quimiotipo QVI, donde es evidente un agrupamiento por similitud de los compuestos que definen la calidad del aroma de los frutos beneficiados de vainilla. Mientras que el quimiotipo QI se agrupa de forma individual; ello muestra que en este quimiotipo la variación del aroma aun responde a las condiciones del ambiente, dado que el aroma también es el resultado de un proceso de adaptación ambiental para garantizar su supervivencia y reproducción (Chartier *et al.*, 2013; Tuttolomondo *et al.*, 2014).

Los resultados de cromatografía en capa fina mostraron variabilidad de compuestos fitoquímicos en los tejidos vegetales cultivados en los sistemas de manejo de *V. planifolia* provenientes de la región del Totonacapan. La mayor abundancia de bandas fue de compuestos fenólicos totales, triterpenos, flavonoides y saponinas, que mostraron un número mayor de bandas en el sistema de manejo de malla sombra. Dado que las plantas bajo condiciones de estrés por factores ambientales pueden mostrar cambios en el aumento de la producción de compuestos fitoquímicos, ya que estos le ayudan a su supervivencia (Ramakrishna y Ravishankar, 2011). Esto puede ser un indicativo que la condición de manejo en malla sombra propició condiciones de estrés que se tradujo en la manifestación de un mayor número de bandas.

La concentración de los compuestos fitoquímicos en relación con el sistema de manejo y los quimiotipos, también mostró una amplia variación dentro de las diferentes estructuras vegetales. La mayor concentración de compuestos fenólicos totales se presentó en los frutos beneficiados, la presencia de este grupo de fitoquímicos es de gran interés biológico por servir de defensa contra depredadores, su actividad contra radicales libres. En el caso de la *V. planifolia* su importancia radica que los compuestos fenólicos: ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido vanílico, ácido *p*-hidroxibenzaldehído y vainillina; son los responsables de mayor abundancia en la generación del aroma en los frutos beneficiados de vainilla.

La mayor cantidad de taninos totales y taninos condensados se manifestaron en hojas de quimiotipo QVI, mientras los taninos hidrolizables mostraron la concentración más alta en fruto verde y en hoja. El sistema de acahual mostro mayor cantidad de taninos totales mientras el sistema de malla sombra propició el desarrollo de taninos hidrolizables y suprimió el desarrollo de taninos condensados. Este grupo es considerado anti-nutricional ya que puede llegar a reducir la cantidad de proteína disponible en la ingesta de alimentos por parte de rumiantes, sin embargo, estos también presentan actividad antioxidante (Olivas-Aguirre *et al.*, 2015).

Los flavonoides se detectaron en mayor cantidad en el fruto verde del quimiotipo QI, en ambos sistemas de manejo del cultivo. Sin embargo, su concentración fue menor en frutos beneficiados, lo que indica que durante el proceso de beneficiado los flavonoides se degradan ya que algunos flavonoides tienen la particularidad de ser termosensibles (Liu *et al.*, 2015).

Las saponinas mostraron mayor abundancia en fruto verde del sistema de cultivo en malla sombra. Estos compuestos se expresan como respuesta al estrés de la adaptación de la planta en condiciones adversas (Copaja *et al.*, 2003).

Los triterpenos totales tuvieron una concentración mayor en el fruto beneficiado del quimiotipo QVI en ambos sistemas de manejo del cultivo. Este grupo de fitoquímicos está vinculado con la defensa de la planta contra insectos y el aroma de las plantas (Paschold *et al.*, 2006; Schwab *et al.*, 2008).

La presencia de estos compuestos fitoquímicos, en especies endémicas, permite contar con una fuente natural renovable de éstos; ya que dichos compuestos poseen gran valor económico por sus variadas acciones fisiológicas como agentes protectores, inhibidores y pesticidas contra organismos invasores, como las saponinas, flavonoides, fenoles y terpenoides (Bhattacharya *et al.*, 2010, War *et al.*, 2012). Además, recientemente investigaciones han demostrado que las orquídeas poseen un almacén rico de componentes químicos con prometedoras actividades anti-tumorales y antiinflamatorias (Pérez, 2010). Esto derivó en el análisis de posibles actividades biológicas en las diferentes estructuras vegetales de la planta de vainilla.

En este estudio se determinó la actividad antioxidante *in vitro* de extractos de metanol de hoja, tallo, flor, fruto verde y beneficiado de vainilla. El rendimiento de los extractos varió dependiendo de la parte de la planta y del solvente usado para la extracción. Los rendimientos más altos fueron obtenidos en extractos de metanol de fruto beneficiado seguido de fruto verde, 62.99 % y 50.52 % respectivamente. Para las demás estructuras vegetales aunque los rendimientos fueron mayores en metanol, tuvieron rendimientos bajos de 0.96 % en flor a 4.23 % en hoja.

La actividad antioxidante (CI<sub>50</sub>) de los tejidos de vainilla deshidratada en los extractos de extracción sucesiva en metanol, tuvo un rango variación de 0.71 a 1.75 mg·mL<sup>-1</sup> en el ensayo de

DPPH, y de 0.22 a 0.69 mg·mL<sup>-1</sup> en el ensayo de ABTS. Los frutos beneficiados fueron los que presentaron la mejor capacidad antioxidante.

La actividad antioxidante de los tejidos frescos de la vainilla se analizó en extractos de metanol, que también fue mayor en el fruto beneficiado, y especialmente el ensayo por ABTS mostro una capacidad antioxidante mayor (CI<sub>50</sub> = 1.54 a 2.59 mg·mL<sup>-1</sup>) que por el ensayo de DPPH (CI<sub>50</sub> = 3.67-5.99 mg·mL<sup>-1</sup>), aun cuando mostraron una tendencia similar en los diferentes tejidos. Estos resultados coinciden con Shalaby y Shanab. (2013) quienes señalan que los extractos de metanol de *Spirulina platensis* por el método de ABTS mostraron una mayor actividad antioxidante que por el método de DPPH.

En general en los demás tejidos la actividad antioxidante por el método de ABTS, después del fruto verde que mostro un rango estrecho de variación (CI<sub>50</sub> = 9.57 a 11.38 mg·mL<sup>-1</sup>), la flor y la hoja tuvieron valores similares de actividad antioxidante.

La capacidad de absorción de radicales libres de oxígeno (ORAC) se ha aceptado como una medida de la actividad antioxidante en las industrias nutracéutica, farmacéutica y alimentaria (Huang *et al.*, 2002), además de que este método es el único que combina el tiempo y el grado de inhibición en una sola cantidad (Cao y Prior, 1999), y puede medir la capacidad hidrofílica y lipofílica de una sustancia.

Los resultados de actividad antioxidante por el método de ORAC mostraron a la fracción hidrofílica con la mayor capacidad antioxidante en los extractos de los tejidos vegetales evaluados. Los frutos beneficiados del quimiotipo QVI tuvieron la mayor actividad, con una concentración promedio de 23748.21 ± 49.80 μM ET·g<sup>-1</sup> MS en el sistema de achual y 20322.37 ± 58.27 μM ET·g<sup>-1</sup> MS en el sistema de malla sombra. Estos valores de antioxidantes



en el fruto beneficiado muestran a la vainilla cultivada en la región del Totonacapan, con una capacidad antioxidante muy alta, comparada con los valores reportados por Dudonné *et al.* (2009), quienes expresan valores de  $1593 \mu\text{M ET g}^{-1}$  para extracto acuoso de frutos beneficiados de vainilla provenientes de Madagascar, y la base de datos de la USDA (2010) que exhibe una capacidad antioxidante de  $1224 \mu\text{M ET g}^{-1}$  para frutos beneficiados de vainilla. La diferencia en los valores reportados por la literatura quizás se deba al tipo de solvente, que pudo haber comprometido la eficiencia en la extracción de los compuestos fenólicos, ya que en este estudio se utilizaron extractos de metanol y se reportaron con base en materia seca (MS) y en los estudios mencionados usaron extractos acuosos y no mencionan en qué tipo de tejidos realizaron el análisis. Incluso los valores de la fracción lipofílica (extractos en hexano) en el fruto beneficiado mostraron valores de 3453.32 a  $8746.97 \mu\text{M ET g}^{-1}$  MS.

También se realizó una prueba de actividad biológica sobre la motilidad gastrointestinal en los extractos acuoso y de metanol de los frutos beneficiados de vainilla. La dosis letal media ( $DL_{50}$ ) de ambos extractos se manifestó como débilmente tóxica, de acuerdo con la clasificación propuesta por Montoya (2002).

La actividad de los extractos metanólico y acuoso sobre la motilidad gastrointestinal, fue contraste. El primero reveló diferencia estadísticamente significativa en el avance del marcador, entre el grupo administrado con solución salina isotónica y los grupos administrados con las diferentes dosis del extracto metanólico de vainilla, lo que significó que este extracto disminuye el avance del contenido gastrointestinal en ratón, por lo que el extracto metanólico de frutos beneficiados de la región del Totonacapan pudiera ser usado para el tratamiento de la diarrea. Sin embargo, el extracto acuoso a pesar de manifestar diferencia estadística entre el grupo administrado con solución salina isotónica y los grupos administrados con el extracto acuoso de

vainilla, no se encontró diferencia entre los grupos administrados con el extracto a pesar del aumento en las dosis, es decir que este extracto aumentó el movimiento gastrointestinal en ratón presentando propiedades de laxante. Dado que los extractos entre sí presentaron propiedades distintas a pesar de utilizar disolventes con polaridad similar, y por tanto se extraen compuestos fitoquímicos similares, se requiere mayor experimentación para poder emitir una conclusión respecto al efecto de este extracto acuoso.

Los resultados en general, llevan a proponer la utilización de diversas estructuras vegetales, en especial a los frutos beneficiados de la vainilla, seguido de los frutos verdes de la región del Totonacapan, para su posible uso farmacológico, con la finalidad de prevenir, atenuar y aliviar diversos padecimientos como trastornos gastrointestinales, así como en la prevención y reparación de los daños causados por el estrés oxidativo que pueden derivar en el desarrollo de enfermedades crónicas y degenerativas como cáncer, trastornos autoinmunes, envejecimiento, cataratas, artritis reumatoide, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Pham-Huy *et al.*, 2008).

En este sentido, el uso de la vainilla, como un ingrediente nutracéutico, puede representar una alternativa para la conservación del germoplasma de vainilla, contribuyendo al desarrollo y fortalecimiento de la región del Totonacapan, México. Dado que el aprovechamiento del recurso vainilla en la región del Totonacapan está encaminado a un tipo de conservación denominado *circa situm* que implica la conservación mediante el uso, el cual considera el contexto sociocultural de los agricultores de una determinada región permitiendo mantener la variabilidad genética (Frankie *et al.*, 2004).

Debido a que los factores ambientales dentro del sistema de manejo influyen en la concentración de los compuestos fitoquímicos en las plantas (Sampaio *et al.*, 2011; Rezende *et al.*, 2015). El valor estratégico de la vainilla en esta región, está determinado por su código genético, el cual ha dado como resultado una composición química concreta que representa un perfil específico que ha sido moldeado a través de años de selección por parte de los totonacas.

## LITERATURA CITADA

- Al-Khatib K, Paulsen GM. 1999. High-Temperature Effects on Photosynthetic Processes in Temperate and Tropical Cereals. *Crop Science*. 39: 119-125.
- Badui S. 2006. Química de los alimentos. 4 th ed. Ed. Pearson Educación. México. 59 p.
- BeMiller JN, Huber KC. 2007. Carbohydrates. In: Fennema's Food Chemistry 4 th. Damodaran S, Parkin KL, Fennema OR. (eds). Ed. CRC Press. UK. 87 p.
- Bhattacharya A, Sood P, Citovsky V. 2010. The roles of plant phenolics in defence and communication during *Agrobacterium* and *Rhizobium* infection. *Molecular Plant Pathology*. 11: 705-719.
- Briskin DP. 2000. Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. *Plant Physiology*. 124: 507-514.
- Brown KS, Trigo JR. 1995. The ecological activity of alkaloids. In: *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*. pp 227-354.
- Cao G, Prior RL. 1999. Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. *Methods in Enzymology*. 299: 50-62.
- Chartier M, Pélozuelo L, Buatois B, Bessiére JM, Gibernau M. 2013. Geographical variations of odour and pollinators, and test for local adaptation by reciprocal transplant of two European *Arum* species. *Functional Ecology*. 27: 1367-1381.

- Colley D, Payne R, Elswijk M. 2000. Microclimate gradients across a forest Edge. New Zealand Journal of Ecology. 24: 111-121.
- Copaja SV, Blackburn C, Carmona R. 2003. Variation of saponin contents in *Quillaja saponica* Molina. Wood Science and Technology. 37: 103-108.
- Curti DE. 1995. Cultivo y beneficiado de la vainilla de la región de Papantla, Veracruz. Comision Nacional de Fruticultural SARH, Xalapa, Veracruz, México. 65 p.
- Diez MC, Moreno F, Gantiva E. 2017. Effects of light intensity on the morphology and CAM photosynthesis of *Vanilla planifolia* Andrews. Facultad Nacional de Agronomía. 70: 8023-8033.
- Diez MC, Osorio NW, Moreno F. 2016, Effects of dose and type of fertilizer on flowering and fruiting of vanilla plants. Journal of Plant Nutrition. 39: 1297-1310.
- Dudonné S, Vitrac X, Coutière P, Woillez M, Mérillon JM. 2009. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 57: 1768-1774.
- Frankie GW, Mata A, Vinson SB. 2004. Biodiversity conservation in Costa Rica: Learning the lessons in a dry forest. Ed. University Of California Press. USA. 341 p.
- Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan J, Prior R. 2002. High-throughput assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well Format. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50: 4437-4444.

- Liu Y, Wang H, Cai X. 2015. Optimization of the extraction of total flavonoids from *Scutellaria baicalensis* Georgi using the response surface methodology. *Journal of Food Science and Technology*. 52: 2336-2343.
- Mata GB, Silecio LM, González MVS, Almaguer VG, Espinosa RE, Karla V, Ortíz B, Fajardo FML. 2007. *Agricultura con sabor cítrico y aroma de vainilla en la región del Totonacapan*. Ed. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, México. 288 p.
- Montoya MA. 2002. *Intoxicaciones y envenenamientos: guías diagnósticas y terapéuticas para el médico general y especialista*. 1ª Ed. México.
- Nelson N, Yocum CF. 2006. The structure and function of photosystems I and II. *Annual Review of Plant Biology*. 57: 521-565.
- Olivas-Aguirre FJ, Wall-Medrano A, González-Aguilar GA, López-Díaz JA, Álvarez-Parrilla E, de la Rosa L, Ramos-Jiménez A. 2015. Taninos hidrolizables: bioquímica, aspectos nutricionales y analíticos y efectos en la salud. *Nutrición Hospitalaria*. 31: 55-66.
- Palama TL. 2010. *NMR-based metabolomic characterization of *Vanilla planifolia**. Thesis Doctorate. Universiteit Leiden, France. 9 p.
- Paschold A, Halitschke R, Baldwin IT. 2006. Using 'mute' plants to translate volatile signals. *The Plant Journal*. 145: 275-291.
- Pavarini DP, Pavarini SP, Niehues M, Lopes NP. 2012. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. *Animal Feed Science and Technology*. 176: 5-16.
- Pérez RM. 2010. Orchids: A review of uses in traditional medicine, its phytochemistry and pharmacology. *Journal of Medicinal Plants Research*. 4: 592-638.
- Pham-Huy LA, He H, Pham.Huy C. 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science*. 4: 89-96.

- Puthur, J.T. 2005. Is non flowering on the vertically climbing branches of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) a mystery?. *Indian Journal of Arecanut, Spices and Medicinal Plants*. 7: 100-115.
- Ramakrishna A, Ravishankar GA. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*. 6: 1720-1731.
- Ranadive AS. 1992. Vanillin and related flavor compounds in vanilla extracts made from beans of various global origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40: 1922-1924.
- Rezende WP, Borges L, Santos DL, Alves NM, Paula J. 2015. Effect of environmental factors on phenolic compounds in leaves of *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). *Modern Chemistry & Applications*. 3: 1-6.
- Salazar-Rojas VM, Herrera-Cabrera BE, Delgado-Alvarado A, Soto-Hernández M, Castillo-González F, Cobos-Peralta M. 2012. Chemotypical variation in *Vanilla planifolia* Jack. (Orchidaceae) from the Puebla-Veracruz Totonacapan region. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 59: 875-887.
- Sampaio BL, Bara MT, Ferri PH, Santos S, de Paula J. 2011. Influence of environmental factors on the concentration of phenolic compounds in leaves of *Lafoensia pacari*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 21: 1127-1137.
- Sanchez A, Becerril A, Tijerina L, Santizo J. 2001. Crecimiento y desarrollo de vainilla en y tres sistemas de producción en Papantla, Veracruz. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 24: 49-56.
- Schwab W, Davidovich-Rikanati R, Lewinsohn E. 2008. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *The Plant Journal*. 54: 712-732.

- Shalaby EA, Shanab SMM. 2013. Comparison of DPPH and ABTS assays for determining of antioxidant of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. Indian J Geo-Marine Sciences. 42: 556-564.
- Soto-Arenas MA. 2006. Vanilla: Challenges and prospects of its cultivation. Biodiversitas. 66: 1-9.
- Taiz L, Zeiger E. 2012. Plant Physiology. 5th. ed. Ed. Sinauer Associates. Sunderland, MA. USA. 370 p.
- Theis N, Lerdau M. 2003. The evolution of function in plant secondary metabolites. International Journal of Plant Sciences. 164: 93-102.
- Tuttolomondo T, Leto C, Leone R, Licata M, Virga G, Ruberto G, Bella SL. 2014. Essential oil characteristics of wild Sicilian oregano populations in relation to environmental conditions. Journal of Essential Oil Research. 26: 210-220.
- U.S. Department of Agriculture (USDA). 2010. Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, Release 2, Agricultural Research Service. Nutrient Data Laboratory Home Page. <http://www.ars.usda.gov/nutrientdata/orac>. Consultada: 16 de enero 2016.
- Vargas-Hernández J, Gámez-Vazquez HG. 2014. Producción de vainilla en tres sistemas de producción en la sierra Huasteca Potosina. Ed. Inifap – SAGARPA. San Luis Potosí. México. pp. 5-9.
- War AR, Paulraj MG, Ahmad T, Buhroo AA, Hussain B, Ignacimuthu S, Sharma HC. 2012. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. Plant Signaling & Behavior. 7: 1306-1320.

Zotz G, Andrade JL. 2002. La ecología y la fisiología de las epífitas y las hemiepífitas. En:  
Kattan, G.H. y M.R. Guariguata (ed.). Ecología y conservación de bosques neotropicales.  
Ed. Libro Universitario Regional. San José, Costa Rica. 271-276.



## CONCLUSIONES GENERALES

Con base en el planteamiento de la hipótesis general del trabajo que: “las condiciones de manejo en acahual y malla sombra de dos quimiotipos (QI y QVI) de *Vanilla planifolia* Jacks ex Andrews de la región del Totonacapan, propicia variación en la presencia y cantidad de los atributos fisicoquímicos y la composición química: afectando el aroma, contenido de compuestos fitoquímicos y su actividad biológica en hoja tallo, flor, fruto verde y fruto beneficiado”, se concluye que:

El sistema de manejo de la vainilla afecto los atributos de calidad fisicoquímica y aromática de los frutos beneficiados de la región del Totonacapan. Los frutos beneficiados provenientes del sistema de manejo en acahual tuvieron valores mayores de azúcares solubles totales, glucosa, fructosa, sacarosa, flexibilidad, así como la flexibilidad y su relación con el largo. Ya que en este sistema de manejo existe una cantidad de radiación interceptada mayor que origina condiciones óptimas para el proceso de fotosíntesis y un crecimiento adecuado de frutos en comparación con el sistema de producción en malla sombra. También algunas variables fisicoquímicas (porcentaje de humedad,  $A_w$ , flexibilidad respecto a ancho y grosor y en color el ángulo Hue) no mostraron variación en relación con el manejo del cultivo.

Dentro de la región del Totonacapan, el manejo del cultivo de vainilla afecto la intensidad de la calidad del aroma, pero también reveló estar determinado por el genotipo. Los frutos beneficiados del quimiotipo QI/genotipo GVI, que se han sometido a cultivo por un tiempo menor, tuvieron variación en las características del aroma en relación con el sistema de manejo. Mientras que el quimiotipo QVI/genotipo III, que se ha cultivado con mayor frecuencia, su aroma se expresó de forma similar tanto en el sistema de acahual como en malla sombra.

El tamizaje fitoquímico en las diferentes estructuras de la vainilla evidenció la presencia de compuestos fenólicos totales, taninos hidrolizables y triterpenos con una concentración mayor en el fruto beneficiado. Los taninos totales y taninos condensados se presentaron con una abundancia mayor en hoja, tallo, flor y fruto verde. Los flavonoides y saponinas se acumularon principalmente en los frutos verdes seguido de los frutos beneficiados.

El sistema de manejo del cultivo y el quimiotipo de vainilla mostraron variación en el tipo y la cantidad de los compuestos fitoquímicos. El sistema de manejo de acahual, con una radiación interceptada de 60-79%, favoreció la acumulación de compuestos fenólicos totales, taninos totales, taninos hidrolizables, taninos condensados y triterpenos totales, mientras que la condición de cultivo en malla sombra, con una radiación interceptada de 30 - 45 %, propicio una concentración mayor de saponinas. Respecto a los quimiotipos, el quimiotipo QVI manifestó una concentración más alta de compuestos fenólicos totales, taninos totales, taninos condensados, flavonoides, saponinas y triterpenos totales respecto al quimiotipo QI.

Se estableció la capacidad antioxidante de la hoja, tallo, flor, fruto verde y fruto beneficiado de dos quimiotipos de vainilla cultivados en dos sistemas de manejo de cultivo. Los frutos beneficiados provenientes del sistema de manejo de acahual tuvieron los valores promedio más altos de capacidad antioxidante, evaluada por los métodos de DPPH, ABTS y ORAC. En especial el quimiotipo QVI mostró una actividad antioxidante mayor que el quimiotipo QI. La condición del manejo en el cultivo de la vainilla, como la cantidad de radiación interceptada y temperatura promedio, en el sistema de acahual influyeron positivamente en la actividad antioxidante de los tejidos evaluados, pero en los frutos cultivados en el sistema de malla sombra limitó su capacidad antioxidante. La actividad antioxidante presentó una correlación alta con el contenido de compuestos fenólicos totales seguido de los triterpenos totales.

Los valores de la prueba toxicológica de los extractos acuosos y de metanol de frutos beneficiados de *V. planifolia* los ubicaron como débilmente tóxicos en las condiciones experimentales probadas. El extracto de metanol de la vainilla fue capaz de disminuir el avance del contenido gastrointestinal bajo las condiciones experimentales probadas, por lo que pudiera ser útil en el tratamiento de diarrea.

## ANEXOS

Cuadro 3.1A Sistema cromatográfico y reveladores para la identificación de compuestos fitoquímicos en *Vanilla planifolia* de la región del Totonacapan.

Fitoquímico	Extracto	Sistema	Revelador
Ácidos fenólicos	Metanol	Acetato de etilo: Ác fórmico: Ác acético: Agua 10: 8: 8: 1	Folin-Ciocalteu / Na <sub>2</sub> (CO) <sub>3</sub> 20%
	Cloroformo	Metanol: Agua: Isopropanol: Acetona 30: 65: 2: 3	
	Hexano	Metanol: Agua: Isopropanol: Acetona 30: 65: 2: 3	
Taninos	Metanol	Acetato de etilo: Ác fórmico: Ác acético: Agua 10: 8: 8: 1	FeCl <sub>3</sub> en HCl 0.5N
	Cloroformo	Acetato de Etilo: Hexano 7: 3	
	Hexano	Acetato de Etilo: Hexano 7: 3	
Flavonoides	Metanol	Acetato de etilo: Ác fórmico: Ác acético: Agua 7: 0.8: 0.8: 1.75	NP 1% / PEG 5%
	Cloroformo	Cloroformo: Acetona 9: 1	
	Hexano	Cloroformo: Acetona 9: 1	
Saponinas	Metanol	Butanol: Ácido acético glacial: Agua 4: 1: 4	Vainillina 1% / H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10% en EtOH o Anisaldehido
	Cloroformo	Cloroformo: Acetona 9: 1	
	Hexano	Cloroformo: Acetona 9: 1	
Terpenos	Metanol	Hexano: Acetato de etilo: Agua 7: 3: 1	Vainillina 1% / H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10% en EtOH
	Cloroformo	Hexano: Acetato de etilo 7: 3	
	Hexano	Hexano: Acetato de etilo 7: 3	
Alcaloides	Metanol	Acetato de etilo: Metanol: Agua 3: 1: 1	I: KI
	Cloroformo	Acetato de etilo: Hexano: Amoniac 7: 3: 0.2	
	Hexano	Acetato de etilo: Hexano: Amoniac 7: 3: 0.2	

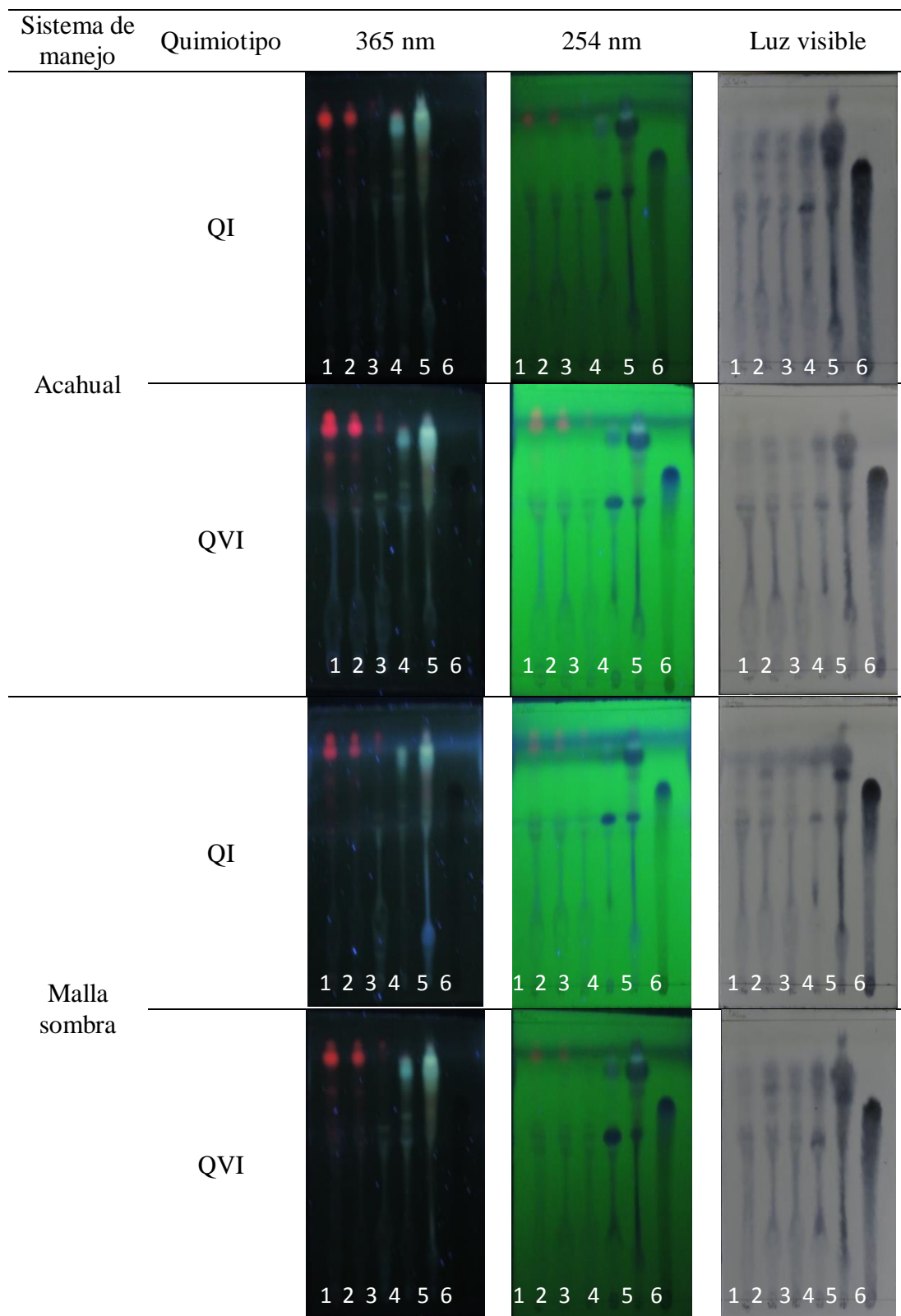


Figura 3.1A Identificación de compuestos fenólicos totales por cromatografía en capa fina en extracto metanólico. 1= Hoja, 2= Tallo, 3= Flor, 4= Fruto verde, 5= Fruto beneficiado, 6= Estándar.

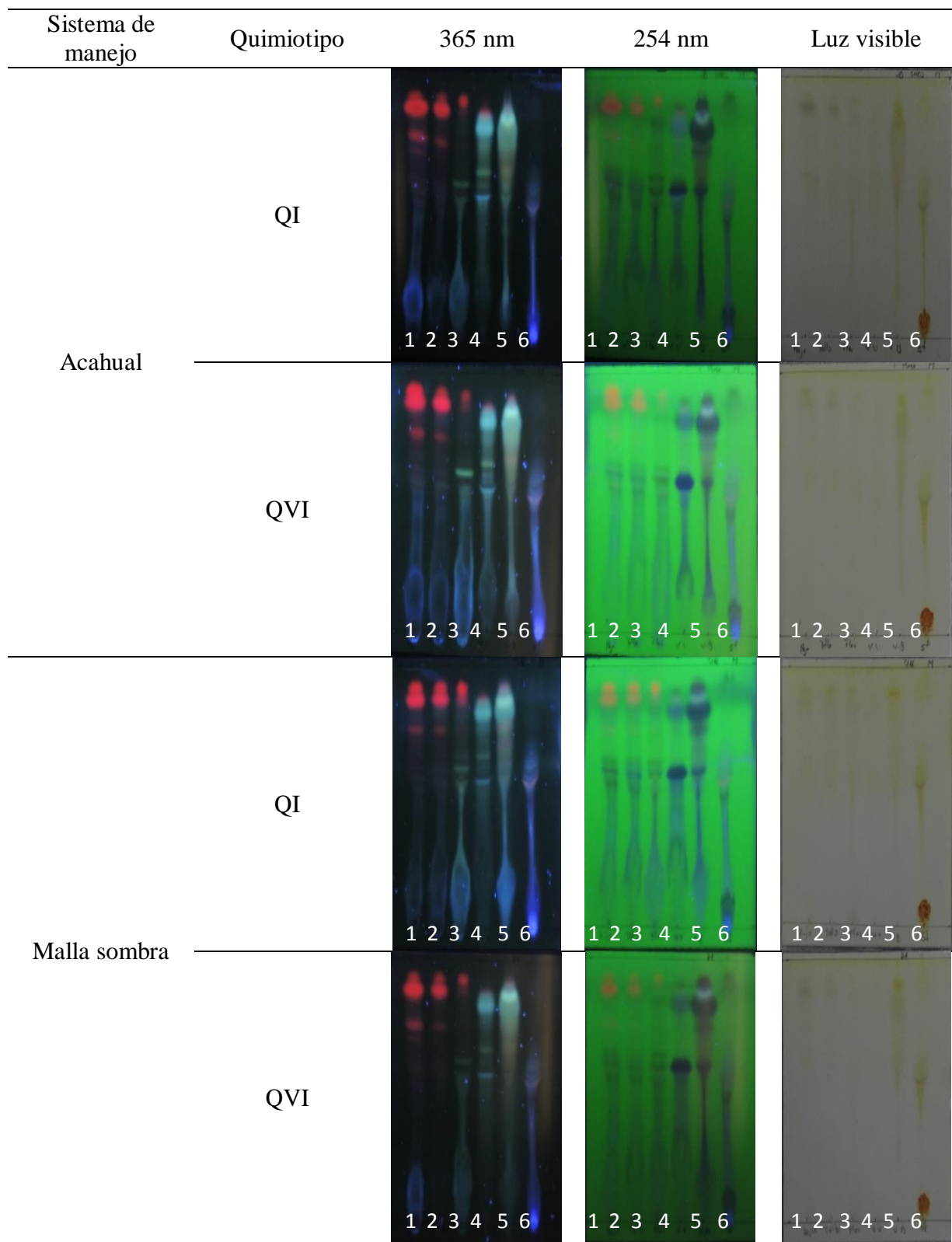


Figura 3.2A Identificación de taninos totales por cromatografía en capa fina en extracto metanólico. 1= Hoja, 2= Tallo, 3= Flor, 4= Fruto verde, 5= Fruto beneficiado, 6= Estándar.

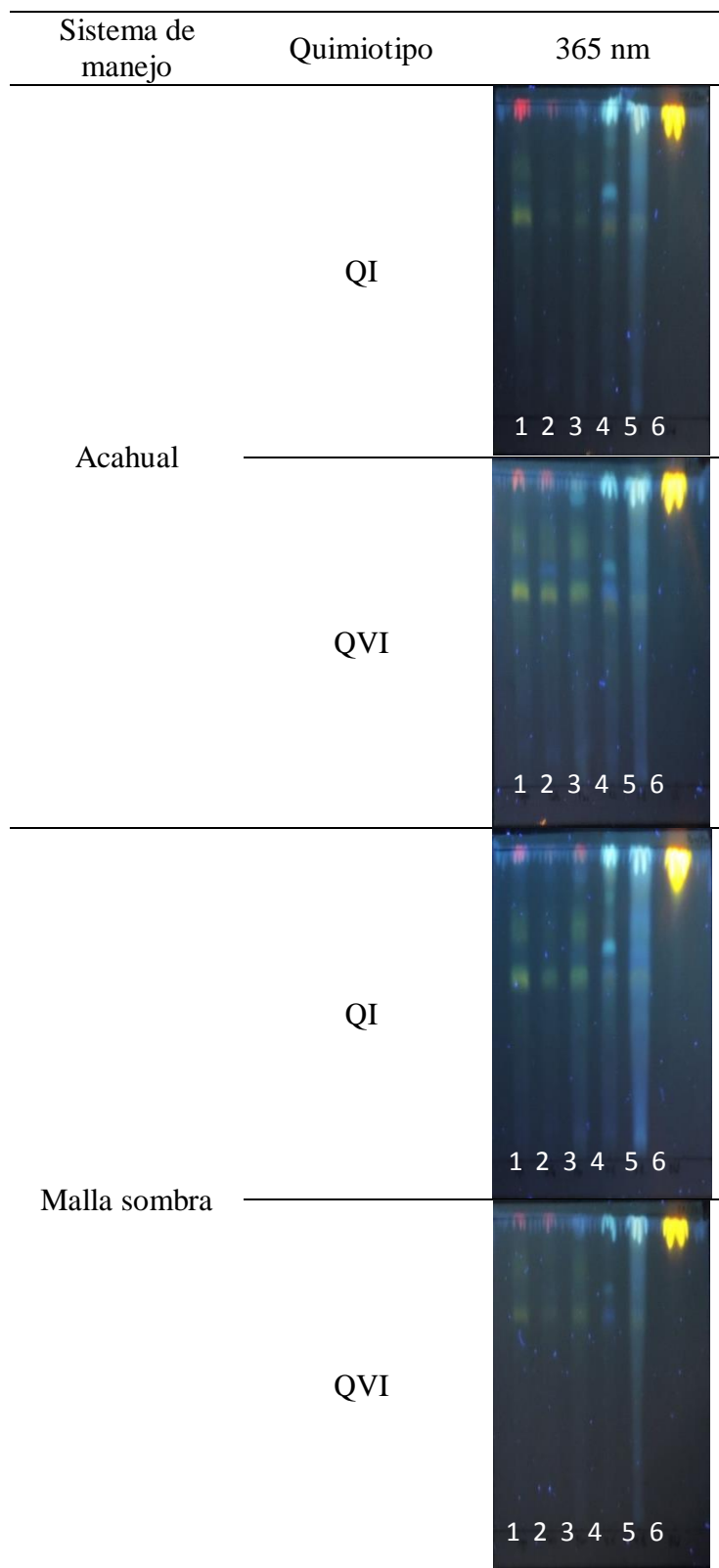


Figura 3.3A Identificación de flavonoides por cromatografía en capa fina en extracto metanólico. 1= Hoja, 2= Tallo, 3= Flor, 4= Fruto verde, 5= Fruto beneficiado, 6= Estándar.

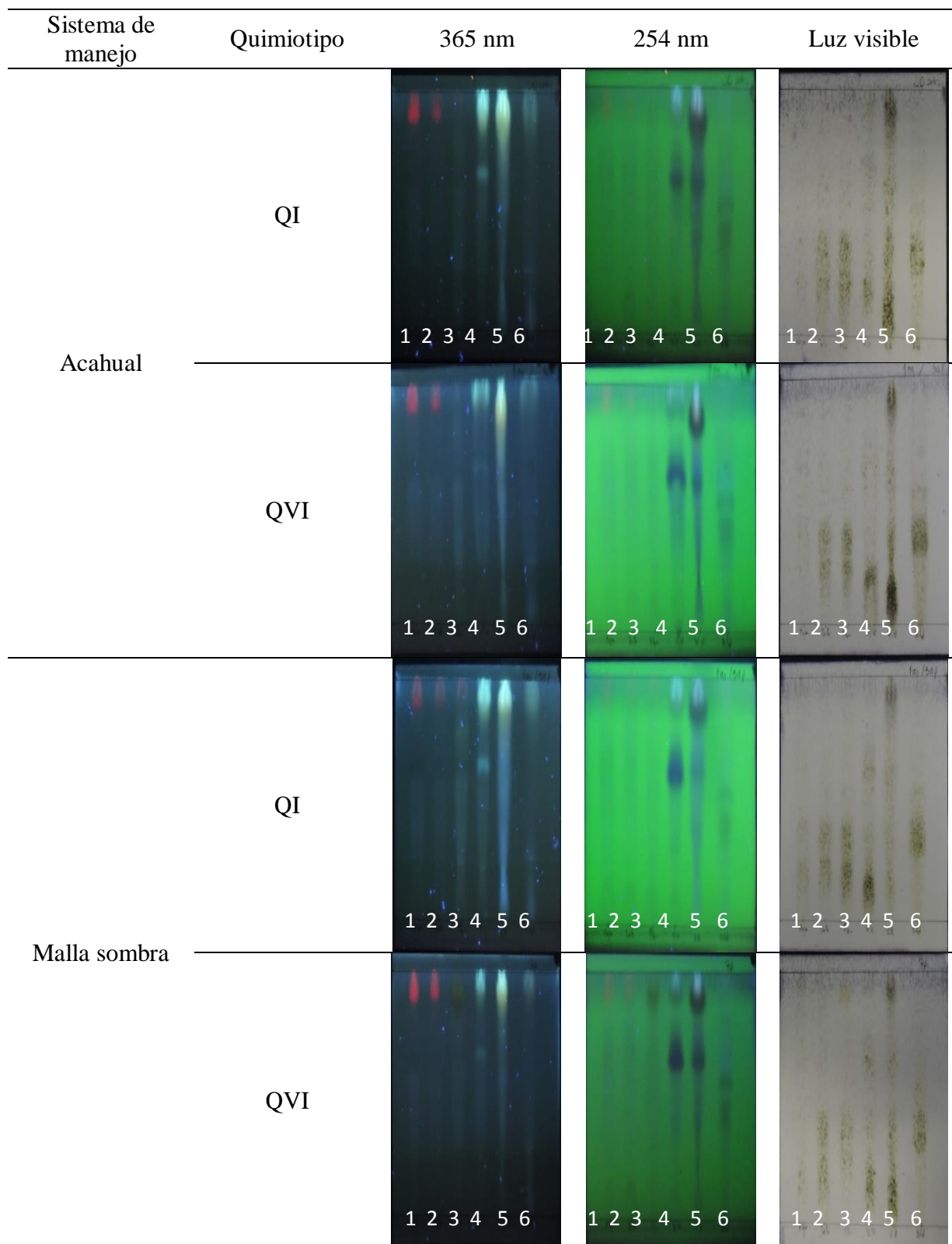


Figura 3.4A Identificación de saponinas por cromatografía en capa fina en extracto metanólico.  
1= Hoja, 2= Tallo, 3= Flor, 4= Fruto verde, 5= Fruto beneficiado, 6= Estándar



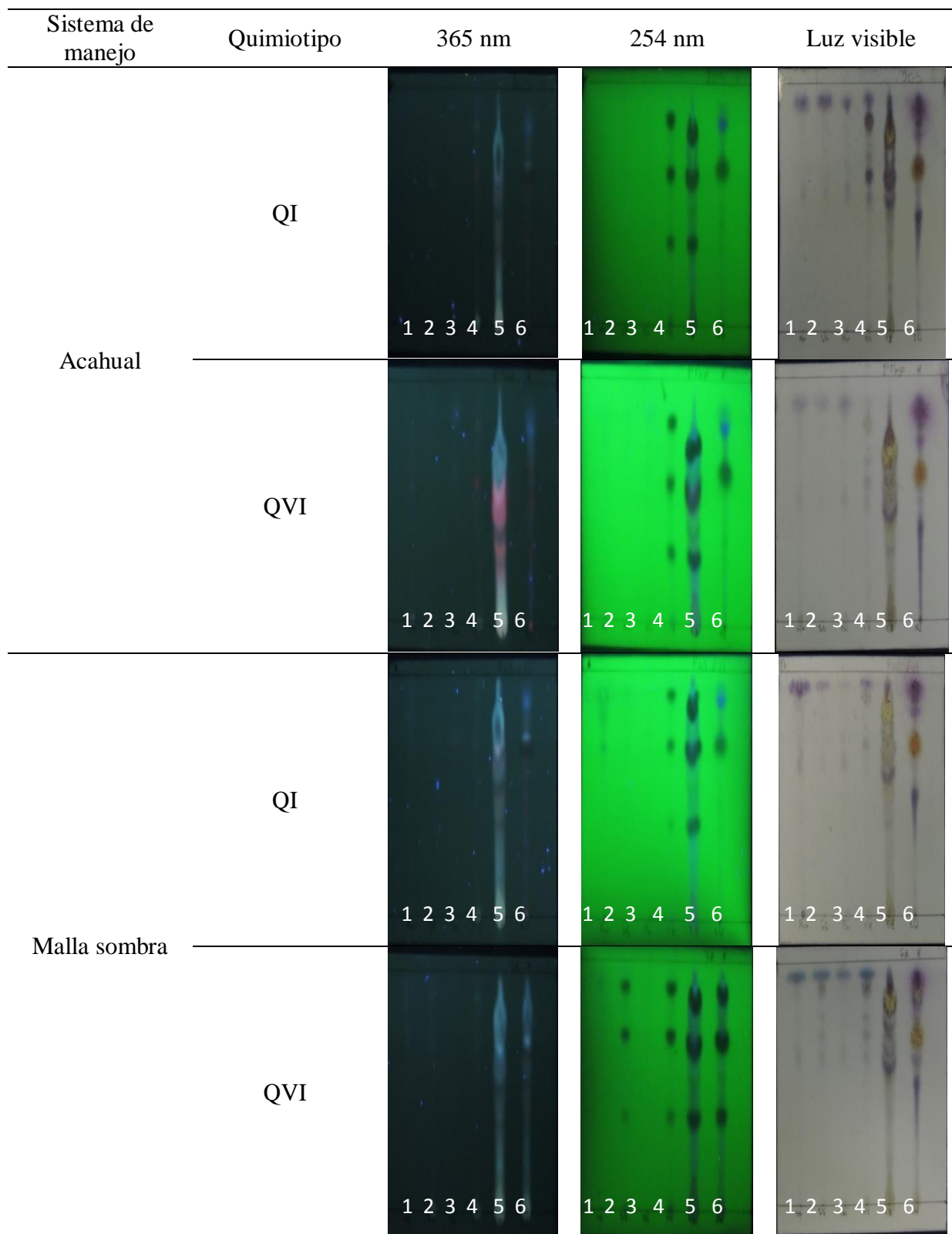


Figura 3.5A Identificación de triterpenos totales por cromatografía en capa fina en extracto hexánico. 1= Hoja, 2= Tallo, 3= Flor, 4= Fruto verde, 5= Fruto beneficiado, 6= Estándar

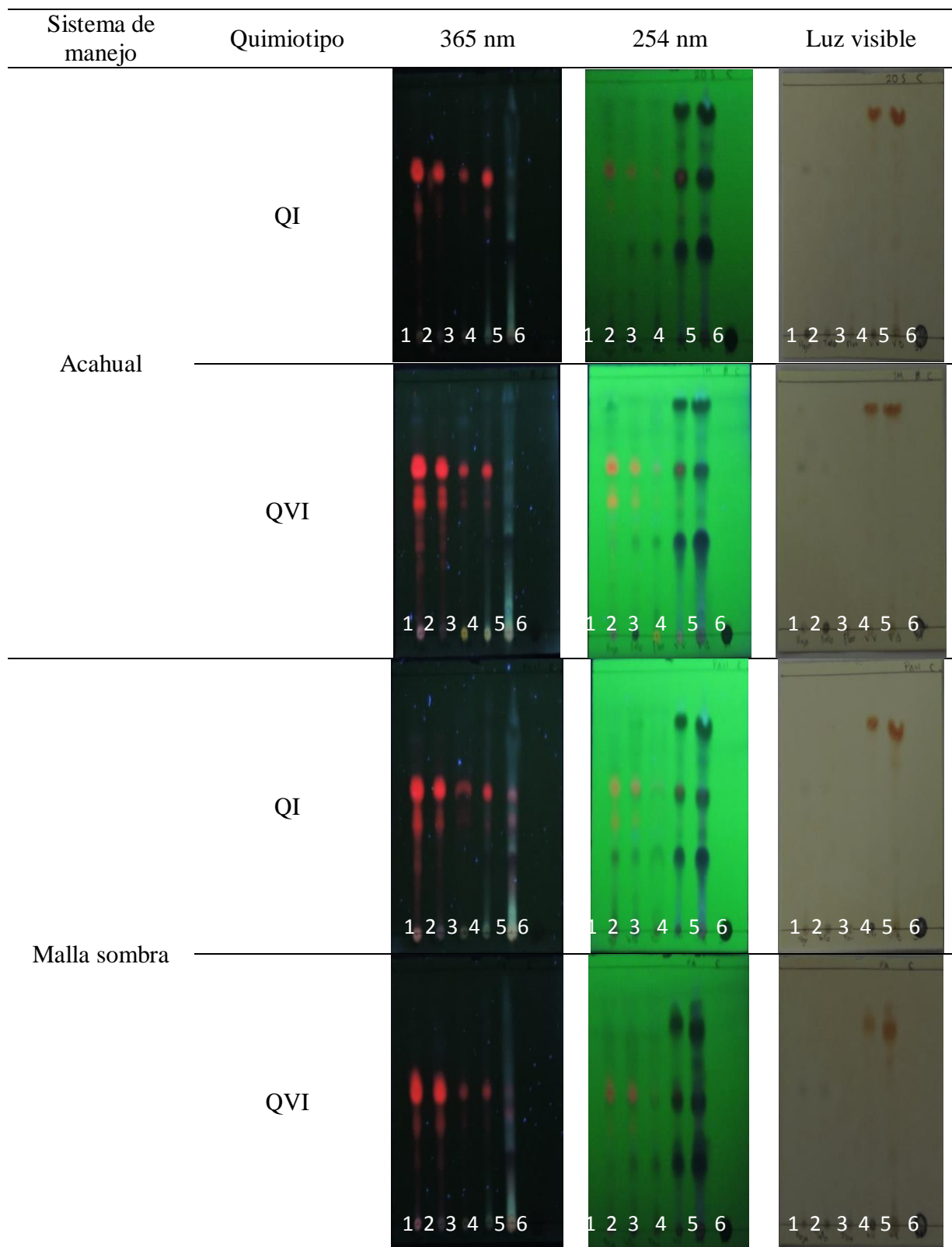


Figura 3.6A Identificación de alcaloides por cromatografía en capa fina en extracto metanólico. 1= Hoja, 2= Tallo, 3= Flor, 4= Fruto verde, 5= Fruto beneficiado, 6= Estándar