



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 FITOQUÍMICOS EN HOJAS, TALLOS,
FLORES Y VAINAS BENEFICIADAS DE *Vanilla planifolia* Jacks. ex
Andrews DE LA HUASTECA HIDALGUENSE, MÉXICO**

GUADALUPE ANDRADE ANDRADE

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PUEBLA, PUEBLA

2016



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

SUBDIRECCIÓN DE EDUCACIÓN
CAMPUS PUEBLA

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, la que suscribe **Guadalupe Andrade Andrade**, alumna 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 fitoquímicos en hojas, tallos, flores y vainas beneficiadas de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews de la Huasteca hidalguense, 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 la 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, 30 de septiembre del 2016.

Guadalupe Andrade Andrade

Vo. Bó. Profesora Consejera
Dra. Adriana Delgado Alvarado

La presente tesis, titulada: **Estudio del contenido de fitoquímicos en hojas, tallos, flores y vainas beneficiadas de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews de la Huasteca hidalguense, México**, realizada por la alumna: **Guadalupe Andrade Andrade**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

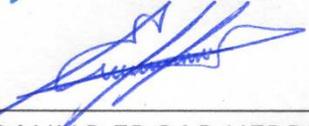
ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

CONSEJO PARTICULAR

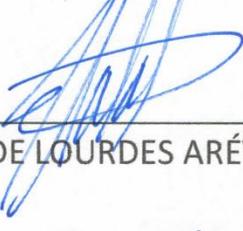
CONSEJERA:


DRA. ADRIANA DELGADO ALVARADO

ASESOR:


DR. BRAULIO EDGAR HERRERA CABRERA

ASESORA:


DRA. MA. DE LOURDES ARÉVALO GALARZA

ASESORA:


DRA. LAURA CASO BARRERA

Puebla, Puebla, México, 30 de septiembre del 2016

ESTUDIO DEL CONTENIDO DE FITOQUÍMICOS EN HOJAS, TALLOS, FLORES Y
VAINAS BENEFICIADAS DE *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews DE LA HUASTECA
HIDALGUENSE, MÉXICO

GUADALUPE ANDRADE ANDRADE, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2016

Vanilla planifolia Jacks. ex Andrews es una especie originaria de México, no obstante, existen zonas con potencial para su cultivo como la Huasteca hidalguense de las que aún se desconocen las características de la vainilla cultivada en la región. Por tal motivo, el presente trabajo tuvo como objetivos realizar un análisis de las características fisicoquímicas y aromáticas de las vainas beneficiadas, identificar y cuantificar los principales grupos de fitoquímicos en hoja, tallo, flor y vaina beneficiada deplantas de *V. planifolia* de diferentes localidades de la Huasteca hidalguense; además de conocer los usos potenciales y el origen de la vainilla cultivada en esta zona. En diferentes localidades de la Huasteca hidalguense se realizaron 14 colectas de vainas de vainilla de 32 semanas de madurez, una vez beneficiadas se evaluaron características fisicoquímicas como el color, pH, porcentaje de humedad, actividad de agua (A_w), azúcares solubles totales, dimensiones y firmeza. El perfil del aroma se evaluó cuantificando los principales compuestos que conforman el aroma en vainas beneficiadas (ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido vanílico, *p*-hidroxibenzaldehído y vainillina) mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El tamiz fitoquímico se realizó en tres colectas (Huizotlaco, Coacuilco y Contepec) a través de pruebas por agentes cromógenos y cromatografía en capa fina, la cuantificación de compuestos fenólicos totales (CFT), taninos totales (TT), taninos condensados (TC) y flavonoides (Flav) se realizó a través de métodos espectrofotométricos. También se aplicó una entrevista a productores de vainilla para conocer acerca del origen de sus plantaciones y usos potenciales de la planta de vainilla. Los resultados indicaron que existen cuatro grupos de vainas con diferentes características fisicoquímicas y cuatro grupos con diferente perfil del aroma, donde la vainillina, compuesto mayoritario del aroma, mostro un amplio rango de concentración (14740 a 22390 ppm) y una proporción de compuestos menores entre 7 y 14%. Los principales grupos de fitoquímicos identificados fueron saponinas, taninos y terpenos principalmente en tallo, flor y vaina beneficiada. Se observó que hoja, tallo y flor mostraron características similares en la concentración de CFT en un intervalo de entre 1.35 y 2.36 mg g⁻¹ MSy TT entre 0.33 y 0.41 mg g⁻¹ MS, mientras que la vaina beneficiada tuvo mayor abundancia de estos fitoquímicos. Con respecto a las colectas, se determinó que las colectas de Huizotlaco y Contepec mostraron características similares en el contenido de los fitoquímicos evaluados y que la colecta de Coacuilco mostró en sus tejidos la concentración mayor de TT, TC y Flav. La entrevista indicó que no se conoce el origen de la vainilla cultivada en esta zona y que sólo las vainas son aprovechadas a través de su venta o consumo, lo cual da una importancia principalmente económica.

Palabras clave: Hidalgo, recurso genético, usos, vainilla, variación.

STUDY OF PHYTOCHEMICAL CONTENT IN LEAVES, STEMS, FLOWERS AND CURED PODS of *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews OF HIDALGO HUASTECA

Guadalupe Andrade Andrade, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2016

Vanilla planifolia Jacks. ex Andrews is a species from Mexico, however, there are areas with potential for its cultivation like Hidalgo Huasteca from which are still unknown the characteristics of vanilla cultivated in this area. For this reason, the goals of this research were perform a physical chemistry and aromatic analysis in cured pods, identify and quantify the main phytochemical groups in leaf, stem, flower and cured pod of *V. planifolia* plants from different locations of Hidalgo Huasteca; in addition to know the potential uses and origin of vanilla cultivated in that region. Fourteen collections of vanilla pods with 32 maturity weeks were realized in different locations of Hidalgo Huasteca, once cured physical chemistry characteristics like color, pH, moisture percentage, activity water (*A_w*), total soluble sugars, dimensions and firmness were evaluated. The aromatic profile was evaluated quantifying the main compounds that conform the aroma in cured pods (*p*-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, *p*-hydroxybenzaldehyde and vanillin) through high performance liquid chromatography (HPLC). The phytochemical sieve was realized in three collections (Huizotlaco, Coacuilco and Contepec) through chromogenic tests and thin layer chromatography (TLC), quantification of total phenolic compounds (TPC), total tannins (TT), condensed tannins (CT) and flavonoids (Flav) were realized through spectrophotometric methods. An interview was also applied to vanilla producers to know about the origin of their plantations and potential uses of vanilla plants. The results indicated that there are four groups of pods with different physical chemistry characteristics and four groups con different aromatic profile, where vanillin, main compound of aroma, showed a wide range of concentration (14740 to 22390 ppm) and a proportion of minor compounds between 7 and 14%. The main phytochemical groups identified were saponins, tannins and terpenes mainly in stem, flower and cured pod. Were observed that leaf, stem and flower showed similar characteristics in TPC concentration in a range between 1.35 y 2.36 mg g⁻¹ DM and TT between 0.33 y 0.41 mg g⁻¹ DM, while cured vanilla was the vegetal tissue with higher abundance in this phytochemicals. About the collections, it was determined that Huizotlaco and Contepec showed similar characteristics in the phytochemical content evaluated and the Coacuilco collection showed in its tissues la higher concentration of TT, CT and Flav. The interview evidenced that the origin of vanilla cultivated in this area is unknown and just the pods are used through sale or consumption, which give it a mainly economic importance.

Key words: genetic resource, Hidalgo, uses, vanilla, variation.

DEDICATORIA

A mis padres: gracias por ser mi fuerza y mi más grande motivo para luchar cada día, por enseñarme el amor por el estudio, por su apoyo incondicional, por su cariño y por ser los mejores padres que la vida me pudo dar. Todo lo bueno que hay en mí es gracias a ustedes, los quiero.

A mis hermanos: Por su apoyo, su compañía y su cariño, en especial a Paty, por estar conmigo en esas largas noches de desvelo, por tu confianza y por siempre impulsarme a dar más de mí.

A José: Por ser mi mejor ejemplo de superación, mi mejor compañero y amigo en este largo camino de crecimiento personal y profesional, por compartir la pasión por aprender. Gracias por tu apoyo, por tu cariño, por ser mi más grande motivo para dar lo mejor de mí, por alegrar cada uno de mis días y llenarlos de tanto amor. Gracias por formar parte de mi vida (Kpaxkiyan).

A mis amigos de laboratorio: Paula, Reyna, Alma, Alfricia y Diego. Gracias por su compañía y por hacer más amena mi estancia, por su paciencia, su apoyo y los buenos momentos que pasamos como compañeros y amigos; especialmente a la Dra. Patricia Ramírez Carrasco, por su paciencia, su alegría y por toda esa bondad que la caracteriza.

A la Dra. Adriana Delgado, gracias por su amistad, por su paciencia y su apoyo, por ser mi principal guía en el camino de formación profesional y por enseñarme a dar los primeros pasos en este hermoso camino de la ciencia y la investigación.

Al Dr. Edgar Herrera, gracias por su amistad, por todas sus enseñanzas para convertirse en un mejor ser humano y profesionalista. Gracias por su paciencia, su apoyo y calidez.

A la Dra. Laura Caso, gracias por su apoyo y permitirme ampliar los horizontes de esta investigación.

A la Dra. Ma. de Lourdes Arévalo, por sus valiosos consejos y su apoyo en el desarrollo de la investigación

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados Campus Puebla, por brindarme la grandiosa oportunidad de ampliar mis horizontes.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico que hicieron posible mi formación académica.

Al proyecto 2012-04-190442 “Estrategia de investigación aplicada para el fortalecimiento, innovación y competitividad de la producción de vainilla en México” y el SNITT (Sistema Nacional de Investigación y Transferencia Tecnológica para el Desarrollo Rural Sustentable) que permitieron en financiamiento para el desarrollo de la investigación.

A los miembros del Consejo particular: Dra. Adriana Delgado, Dr. Edgar Herrera, Dra. Laura Caso y Dra. Ma. de Lourdes Arévalo. Gracias por guiarme en cada etapa de esta investigación, por ser más que un asesor.

A la M.C. Cecilia García Osorio, por su apoyo y asesoría durante el desarrollo de la primera etapa de investigación realizada en el Colegio de Postgraduados Campus Montecillo.

A la Facultad de Ingeniería Química (FIQ) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) por su apoyo en la primera etapa experimental de la presente investigación.

A mi compañero Agustín Maceda, por su apoyo durante la aplicación de entrevistas.

A todos los productores de vainilla de la Huasteca hidalguense, sin cuyo trabajo esta investigación no habría sido posible. Gracias por abrirme las puertas de su hogar durante la aplicación de entrevistas y por su esfuerzo para conservar tan importante recurso como lo es la vainilla.

Esta investigación fue financiada por:



Colegio de Postgraduados



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



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



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

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1. Importancia	2
2. Justificación	4
3. Problema de investigación	5
4. Objetivos e Hipótesis	6
5. Literatura citada	7
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES	11
Resumen	11
1.1 Beneficiado y reacciones enzimáticas	12
1.2 Perfil aromático	16
1.3 Metabolitos secundarios o fitoquímicos	17
1.4 Conocimiento tradicional	21
1.5 Literatura citada	23
CAPÍTULO II. CARACTERIZACIÓN AROMÁTICA Y FISICOQUÍMICA DE VAINAS BENEFICIADAS DE <i>Vanilla planifolia</i> Jacks. ex Andrews DE LA HUASTECA HIDALGUENSE, MÉXICO	28
Resumen	28
2.1 Introducción	29
2.2 Materiales y métodos	32
2.3 Resultados y discusión	41
2.4 Conclusiones	63
2.5 Literatura citada	64
CAPÍTULO III. EVALUACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS EN ESTRUCTURAS VEGETALES DE <i>Vanilla planifolia</i> Jacks. ex Andrews DE LA HUASTECA HIDALGUENSE, MÉXICO	68
Resumen	68
3.1 Introducción	69
3.2 Materiales y métodos	74
3.3 Resultados y discusión	80

3.4 Conclusiones	98
3.5 Literatura citada	99
CAPÍTULO IV. CONOCIMIENTO EN EL USO DE <i>Vanilla planifolia</i> Jacks. ex Andrews EN LA HUASTECA HIDALGUENSE, MÉXICO	102
Resumen	102
4.1. Introducción	103
4.2. Materiales y métodos	107
4.3 Resultados y discusión	110
4.4 Conclusiones	117
4.5 Literatura citada	118
CONCLUSIONES GENERALES	121
ANEXOS	124

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Ubicación de poblaciones de plantas de <i>Vanilla planifolia</i> Jacks. ex Andrews en la Huasteca hidalguense, México.	35
Cuadro 2.	VARIABLES UTILIZADAS PARA EVALUAR LAS CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS EN VAINAS BENEFICIADAS DE <i>Vanilla planifolia</i> Jacks. ex Andrews en la Huasteca hidalguense, México.	36
Cuadro 3.	VARIABLES UTILIZADAS PARA EVALUAR LAS CARACTERÍSTICAS AROMÁTICAS EN VAINAS BENEFICIADAS DE <i>Vanilla planifolia</i> Jacks. ex Andrews en la Huasteca hidalguense, México.	38
Cuadro 4.	Medias y coeficientes de variación de las 15 variables fisicoquímicas evaluadas en <i>Vanilla planifolia</i> Jacks. ex Andrews en 14 sitios de colecta de la Huasteca hidalguense, México.	41
Cuadro 5.	Prueba de medias para las variables fisicoquímicas evaluadas en <i>Vanilla planifolia</i> Jacks. ex Andrews en 14 sitios de colecta de la Huasteca hidalguense, México.	46
Cuadro 6.	Valores propios, proporción de las variación totales y variación acumulada de las variables fisicoquímicas en las tres dimensiones de la caracterización de <i>Vanilla planifolia</i> Jacks. ex Andrews de la Huasteca hidalguense, México.	47
Cuadro 7.	Medias y coeficientes de variación de las 10 variables aromáticas evaluadas en <i>Vanilla planifolia</i> Jacks. ex Andrews en 14 sitios de colecta de la Huasteca hidalguense, México.	51
Cuadro 8.	Prueba de medias para las variables aromáticas evaluadas en <i>Vanilla planifolia</i> Jacks. ex Andrews en 14 sitios de colecta de la Huasteca hidalguense, México.	53
Cuadro 9.	Valores propios, proporción de la variación total y variación acumulada de las variables aromáticas en las tres dimensiones de la caracterización de <i>Vanilla planifolia</i> Jacks. ex Andrews de la Huasteca hidalguense, México.	54

- Cuadro 10.** Valores propios, proporción de la variación de la variación total y variación acumulada de las variables fisicoquímicas y aromáticas en las tres dimensiones de la caracterización de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews de la Huasteca hidalguense, México. 58
- Cuadro 11.** Pruebas de identificación de fitoquímicos en *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews. 76
- Cuadro 12.** Sistemas cromatográficos, reveladores y testigos (Test) para CCF en *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews. 78
- Cuadro 13.** Variables fitoquímicas evaluadas en diferentes tejidos de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews. 79
- Cuadro 14.** Tamizaje fitoquímico en extractos de hoja (H), tallo (T), flor (F) y vaina beneficiada (VB) de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews de tres localidades de la Huasteca hidalguense, México. 85
- Cuadro 15.** Determinación de metabolitos secundarios y valor R_f por cromatografía en capa fina en hojas, tallos, flores y vaina beneficiada de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews. 89
- Cuadro 16.** Medias y coeficientes de variación de las cuatro variables fitoquímicas evaluadas en *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews en tres sitios de colecta de la Huasteca hidalguense, México. 91
- Cuadro 17.** Prueba de medias para las variables fitoquímicas evaluadas en *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews en tres sitios de colecta de la Huasteca hidalguense, México. 92
- Cuadro 18.** Prueba de medias de fitoquímicos para hoja, tallo, flor y vaina beneficiada de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrew de la Huasteca hidalguense, México. 93
- Cuadro 19.** Cuantificación de metabolitos secundarios en hoja, tallo, flor y vaina beneficiada de tres colectas (S2, S4 y S8) de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews de la Huasteca hidalguense, México. 94

Cuadro 20. Valores propios, proporción de la variación total y variación acumulada de las variables aromáticas en las dos dimensiones de la caracterización de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews de la Huasteca hidalguense, México.

96

Cuadro 21. Municipios de Hidalgo y número de entrevistas realizadas respecto al uso, conocimiento tradicional y origen de la vainilla.

109

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Ubicación de los 14 sitios de colecta (S1-S14) de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews en la Huasteca hidalguense. 35
- Figura 2.** Dispersión de 14 sitios de colecta de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews de la Huasteca hidalguense, con base en los tres primeros componentes principales del análisis de 15 variables fisicoquímicas agrupadas por medias poblacionales. 48
- Figura 3.** Dendrograma de 14 sitios de colecta de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews en la Huasteca hidalguense, basado en el promedio de 15 variables fisicoquímicas y agrupado por similitud de distancias. La intensidad en el color indica valores más altos en cada variable. 50
- Figura 4.** Dispersión de 14 sitios de colecta de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews de la Huasteca hidalguense basada en los tres primeros componentes principales del análisis de 10 variables aromáticas agrupadas por medias poblacionales. 55
- Figura 5.** Dendrograma de 14 sitios de colecta de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews en la Huasteca hidalguense, basado en el promedio de 10 variables aromáticas y agrupado por similitud de distancias. La intensidad en el color indica valores más altos en cada variable. 57
- Figura 6.** Dispersión de 14 sitios de colecta de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews de la Huasteca hidalguense basada en los tres primeros componentes principales de análisis de 14 variables fisicoquímicas y 10 variables aromáticas agrupadas por medias poblacionales. 59
- Figura 7.** Dendrograma de 14 sitios de colecta de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews en la Huasteca hidalguense, basado en el promedio de 15 variables fisicoquímicas y 10 variables aromáticas agrupadas por similitud de distancias. La intensidad en el color indica valores más altos en cada variable. 61

- Figura 8.** Ubicación geográfica de los sitios de colecta de material vegetal en la Huasteca hidalguense. S2: Huizotlaco, S4: Coacuilco, S8: Contepec. 75
- Figura 9.** Dispersión de cuatro tejidos vegetales sitios de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews de la Huasteca hidalguense basada en los dos primeros componentes principales de análisis de cuatro variables fitoquímicas agrupadas por medias poblacionales. 97
- Figura 10.** Dendrograma de tres sitios de colecta de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews en la Huasteca hidalguense, basado en el promedio de cuatro variables fitoquímicas y agrupado por similitud de distancias. La intensidad en el color indica valores más altos en cada variable. 98
- Figura 11.** Ubicación de los municipios en que se aplicaron las entrevistas en estado de Hidalgo, México. 110
- Figura 12.** Principales aspectos de importancia para productores de vainilla en la Huasteca hidalguense. EC: importancia económica; UF: utilidad del fruto y CE: conservación de la especie (n=14). 112
- Figura 13.** Tiempo de conocimiento de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews en la Huasteca hidalguense (n=14) 113
- Figura 14.** Tipos de polinización en flores de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews en la Huasteca hidalguense (n=14). 115
- Figura 15.** Principales usos de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews en la Huasteca hidalguense (n=14). 116

INTRODUCCIÓN GENERAL

La vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) es una orquídea trepadora, hemiepífita y perenne originaria de México (Sagrero y Schwartz 1988; Palama *et al.* 2010; Cid-Pérez y López-Malo 2011; Gurnani *et al.* 2014). Aunque se introdujo en Europa a mediados del siglo XVI, su producción comercial inició 300 años después del descubrimiento de la polinización artificial (Azeez 2008; De la cruz-Medina *et al.* 2009; Toth *et al.* 2011; Menon y Nayeem 2013).

En México la vainilla es cultivada principalmente en la región del Totonacapan, que abarca varios municipios de los estados de Puebla y Veracruz, no obstante, otros estados de la república como Oaxaca, Chiapas, Quintana Roo, San Luís Potosí e Hidalgo cuentan con zonas potenciales para su cultivo (Castillo y Engleman 1993; Consejo nacional de Productores de Vainilla 2006).

La vainilla crece en las regiones tropicales y subtropicales de clima cálido bajo condiciones de alta humedad (Korthou y Verpoorte 2007; Azeez 2008; Castro-Bobadilla *et al.* 2011), con una temperatura óptima de entre 21-32 °C y una temperatura promedio de 27 °C además de precipitación anual de 2000 mm anuales; aunado a esto, después de la siembra de la planta se requieren de 3 a 4 años para que se inicie la floración (Menon y Nayeem 2013).

Con la distribución de la planta de vainilla en diferentes regiones del mundo, se hicieron diversos intentos por cultivarla, sin embargo, la fertilización de las flores no se lograba debido a que la flor de vainilla es hermafrodita y posee un rostelo (membrana que separa la antera del estigma) que evita la polinización natural además de que sus posibles polinizadores naturales, la abeja melipona (*Melipona beechii*) y el colibrí (*Cynnis sp.*), sólo se encuentran en México (Bory *et al.* 2008; Cid-Pérez y López-Malo 2011; Hernández-Hernández 2011).

Por tal motivo fue necesario desarrollar una técnica que permitiera la polinización de las flores, fue así como se dio lugar a la polinización artificial, la cual ocurrió en 1836 por C. Morren (Cid-Pérez y López-Malo 2011) y en 1838 por J. Neumann; sin embargo, en los países en que se cultiva *V. planifolia* Jacks. ex Andrews se utiliza la técnica descubierta en 1841 por Edmond Albius (Bory *et al.* 2008).

Se considera que el rostelo es producto de la evolución selectiva para evitar la autopolinización, por lo cual se ubica justo entre el estigma (órgano femenino) y el saco anteral (órgano masculino). Dado el impedimento natural para la fecundación de las flores y el bajo índice de polinización natural (aproximadamente 1%), se ha optado por realizar una polinización manual en la cual es necesario un encausamiento de guía de entre 130-180 cm de altura para facilitar tanto la polinización como la cosecha de las vainas (Azeez 2008; Hernández-Hernández 2011).

La técnica de polinización consiste en mover manualmente el polen del saco anteral al estigma pasando por el rostelo, esta es una actividad diaria con duración aproximada de mes y medio que además de incrementar de forma considerable la producción de vainas también contribuye a generar jornales, los cual representan cerca del 40% del costo total en la producción de vainilla (Azeez 2008). Bajo este contexto, la cantidad de flores polinizadas depende de las condiciones ambientales, del manejo del productor, la posición y vigor de las plantas, así como de las características biológicas propias de cada cultivo (Hernández-Hernández 2011).

De esta manera las vainas maduran de forma gradual 8 ó 10 meses después de la floración, sin embargo, si se cosechan estando inmaduras tanto el aroma como las características de color no se desarrollan de manera adecuada y las hace propensas a infecciones fúngicas (Azeez 2008; Brillouet *et al.* 2010; Toth *et al.* 2011).

1. Importancia

Vanilla planifolia Jacks. ex Andrews, ha resultado un producto con gran versatilidad con diversos usos, es el principal saborizante natural utilizado en alimentos y bebidas, cosméticos, tabaco y fármacos, entre otros (Jadhav *et al.* 2009; Cláudio *et al.* 2010; Palama *et al.* 2011; Gurnani *et al.* 2014; Van Dyk *et al.* 2014).

Dentro de la industria alimenticia la vainillina (principal compuesto aromático en vainas beneficiadas) está siendo ampliamente utilizada como conservador debido a su propiedad antioxidante y antimicrobiana (Azeez 2008; Gurnani *et al.* 2014) contralando bacterias Gram (+) y Gram (-) así como en hongos y levaduras (Azeez 2008; Jadhav *et al.* 2009), no obstante, también ha mostrado un importante efecto protector para la planta contra rayos X y radiación UV (De Guzmán 2006).

De igual manera se le atribuye una serie de propiedades para combatir diversos padecimientos como la dismenorrea, fiebre, histeria, dispepsia, para prevenir caries dentales, aliviar dolores dentales y úlceras, así como actividad antiespasmódica, antiinflamatoria y analgésica (Menon y Nayeem 2013). Aunado a esto, desde la perspectiva de recurso genético, la vainilla representa uno de los más importantes legados agro-biológicos de las culturas mesoamericanas (Salazar-Rojas *et al.* 2011).

De las tres especies de importancia económica en el mundo (*V. planifolia*, *V. tahitensis* y *V. pompona*) *V. planifolia* es la más importante gracias a su impacto económico, ecológico y social, de manera que su asociación con árboles forestales y otros cultivos perennes representan una alternativa económica y ecológica para el desarrollo y conservación del patrimonio natural (Azofeifa-Bolaños *et al.* 2014).

De esta manera, representa una fuente de ingreso y generación de empleo para los productores, ya que es la tercera especie más costosa del mundo y durante la polinización se genera una importante cantidad de jornales debido a que esta actividad se realiza manualmente, lo cual representa cerca del 40% de los costos de producción (Consejo Nacional de Productores de Vainilla 2006).

Por otro lado, su importancia también radica en que contribuye a la conservación y reforestación de las zonas en que se cultiva; desde la perspectiva social su cultivo no requiere grandes extensiones de terreno para obtener ingresos porque utiliza principalmente la mano de obra familiar (Azofeifa-Bolaños *et al.* 2014). Asimismo, la vainilla guarda un importante trasfondo cultural especialmente para la cultura totonaca, ya que además de estar íntimamente ligada a ella esta especie se

relaciona también con diversos rituales, leyendas y tradiciones surgidos de una idiosincrasia mágica-religiosa de la cultura totonaca, con lo cual se ha creado toda una cultura alrededor de la vainilla (ASERCA 2000; Salazar-Rojas *et al.* 2011).

2. Justificación

La vainilla es un importante cultivo de México cuya historia se hace presente antes de 1180 e.c. y ha logrado posicionarse como una de las especies más costosas en el mundo, sin embargo, a pesar de que México es centro de origen y diversidad no se encuentra dentro de los principales países productores ya que sólo aporta cerca del 1% de la producción total de vainilla beneficiada a nivel mundial (Barrera-Rodríguez *et al.* 2009).

Su cultivo y cosecha es una tradición (Barrera-Rodríguez *et al.* 2009; Herrera-Cabrera *et al.* 2012) que además de considerarla una especie de alta rentabilidad y valor económico en comparación a otros cultivos también fue utilizada como medida de cambio (Azofeifa-Bolaños *et al.* 2014).

Es un producto con gran potencial y demanda, sin embargo, en las últimas décadas se ha enfrentado a diversas amenazas que han reducido e incluso puesto en riesgo su producción, ya que hace falta inversión directa para fomentar y mantener su cultivo y hay mucho desconocimiento acerca del manejo que requiere la planta de vainilla(COFUPRO 2012-14).

Algunas otras de las dificultades que enfrenta el cultivo de vainilla es su propagación vegetativa, los cambios climáticos y las afectaciones bióticas (Menchaca *et al.* 2011), aunado a esto, ha disminuido el consumo de vainilla natural tras la inclusión al mercado de productos sintéticos cuyo costo es considerablemente más bajo que un extracto natural. De igual forma, el excesivo intermediarismo, susceptibilidad de la planta al ataque de hongos, pudriciones basales, necrosis, bajo rendimiento en la producción, falta de asociación de los productores y beneficiadores y el escaso apoyo a los productores han ocasionado que el cultivo de la vainilla se encuentre amenazado, por lo cual resulta pertinente implementar políticas para favorecer su cultivo y propagación que aseguren su

conservación (Consejo nacional de Productores de Vainilla 2006; Santa-Cardona *et al.* 2012).

A su vez, la región Huasteca de Hidalgo posee una importante riqueza de nutrientes en el suelo así como las condiciones climáticas apropiadas para el desarrollo de la vainilla (Madueño-Paulette 2000), sin embargo, no es un cultivo de alto impacto a diferencia del maíz, frijol, cebada, maguey pulquero, alfalfa, aguacate y café, los cuales representan los principales ingresos a la región (SAGARPA 2009).

Al introducir la vainilla como cultivo, es necesario el uso de especies arbóreas como café, naranjo u otras que funcionen como tutor o sostén de la planta de vainilla, las cuales además de proporcionar sombra generan biomasa, la cual puede incorporarse al suelo como material orgánico que además de contribuir al desarrollo de la vainilla, retiene humedad y aporta nutrientes al suelo con lo cual se evita la erosión y el deterioro del suelo (Kelso-Bucio *et al.* 2013).

Considerando lo anterior, y dado que en México existen regiones como la Huasteca hidalguense en las cuales el conocimiento acerca de las propiedades o beneficios de esta planta, así como de su diversidad y variación son poco conocidos, a través del presente trabajo se pretende proporcionar información acerca de las características físicas, químicas y fitoquímicas que presenta *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews cultivada en diferentes localidades de la Huasteca de Hidalgo caracterizando los frutos beneficiados, hojas, tallos y flores; así como profundizar en el conocimiento que los productores tienen acerca del lugar de origen de la vainilla que cultivan y sus usos potenciales para dar a conocer las características de la vainilla cultivada en la región y así fomentar su cultivo.

3. Problema de investigación

La vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) es un recurso que enfrenta serias dificultades, no sólo problemas de calidad e incidencia de plagas y enfermedades, sino también cuestiones de precio y competencia ante el producto sintético que sustituye al extracto de vainilla natural (Soto-Arenas 2009). El hábitat de esta

orquídea está amenazado tanto por cambios climáticos como por destrucción o invasión de campos de cultivo, por lo cual es importante iniciar una búsqueda de conservación y propagación de esta especie (Salazar-Rojas *et al.* 2011), así como potenciar el uso y aprovechamiento del cultivo en la Huasteca hidalguense.

A pesar de las diversas investigaciones acerca de las características físicas al igual que la composición química de los frutos de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews, es preciso realizar investigación que permita generar conocimiento acerca de la composición fitoquímica de las diferentes estructuras de la planta como hojas, tallos y flores en las diferentes zonas donde crece y se cultiva esta especie en México. Las cuales pueden contener compuestos bioactivos, que podrían proporcionar beneficio a la salud tras su consumo, o bien, tener aplicación en industrias como la farmacéutica (Ho 1992) con la finalidad de dar opciones de diversificación de su cultivo ya que hasta ahora la mayoría de las investigaciones realizadas en México sobre vainilla se han hecho primordialmente sobre vainas y extractos de vainilla beneficiada.

Considerando las diferentes aplicaciones que pueden tener las estructuras vegetales y reproductivas que constituyen la planta de vainilla, y retomando el hecho de que los factores ambientales pueden afectar la cantidad de compuestos presentes en la vainilla, dada la zona agroecológica de su cultivo, se pretende determinar si los componentes del aroma en las vainas beneficiadas, así como los fitoquímicos presentes en hojas, tallos, flores y vainas beneficiadas presentan similitudes o diferencias en cuanto a su concentración dada una región específica de cultivo dentro de la Huasteca hidalguense.

4. Objetivos e Hipótesis

Objetivo General

Determinar la concentración de los principales componentes del aroma en vainas beneficiadas de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews así como identificar los principales fitoquímicos en hojas, tallos, flores y vainas beneficiadas de diferentes

colectas de vainilla de la Huasteca hidalguense, México y conocer el origen y posibles formas de aprovechamiento de esta especie.

Objetivos Particulares

- Evaluar las propiedades fisicoquímicas de vainas beneficiadas de diferentes colectas de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews procedentes de la Huasteca hidalguense, México.
- Analizar los componentes mayoritarios del aroma (vainillina, ácido vanílico, ácido *p*-hidroxibenzoico, *p*-hidroxibenzaldehído) de vainas beneficiadas de diferentes colectas de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews procedentes de la Huasteca hidalguense, México.
- Aislar e identificar los principales compuestos fitoquímicos en hojas, tallos, flores y vainas beneficiadas en colectas de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews con diferente contenido de vainillina procedentes de diferentes zonas ecológicas de la Huasteca hidalguense, México.
- Conocer el origen de la vainilla cultivada en la región así como el uso y aprovechamiento que tienen las vainas beneficiadas y partes de la planta de vainilla en la Huasteca hidalguense, México.

Hipótesis

La concentración de componentes primarios del aroma en vainas beneficiadas así como de los compuestos fitoquímicos presentes en hojas, tallos, flores y vainas beneficiadas de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews se ve influenciada por la región agroecológica en la cual se cultiva esta especie.

5. Literatura citada

- ASERCA. (2000). De nuestra cosecha. La vainilla en México, una tradición con un alto potencial. *Claridades Agropecuarias*, 101, 2-42.
- Azeez, S. (2008). Vanilla. En V.A. Parthasarathy, B. Chempakam y T.J. Zachariah (Ed). *Chemistry of spices* (pp 287-311). Indian Institute of Spices Research, Kelara, India, CAB International.
- Azofeifa-Bolaños, J.B., Paniagua-Vázquez, A., y García-García, J.A. (2014). Importancia y desafíos de la conservación de *Vanilla* spp (Orchidaceae) en Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 25(1), 189-202.

- Barrera-Rodríguez, A.I., Herrera-Cabrera, B.E., Jaramillo-Villanueva, J.L., Escobedo-Garrido, J.S., y Bustamante-González, A. (2009). Caracterización de los sistemas de producción de vainilla (*Vanilla planifolia* A.) bajo naranjo y en malla sombra en el Totonacapan. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10(2), 199-212.
- Bory, S., Grisoni, M., Duval, M.F., y Besse, P. (2008). Biodiversity and preservation of vanilla: present state of knowledge. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55(4), 551-571.
- Brillouet, J.M., Odoux, E., y Conejero, G. (2010). A set of data on Green ripening and senescent vanilla pods (*Vanilla planifolia*; *Orchidaceae*): anatomy, enzymes, phenolics and lipids. *Fruits*, 65(4), 221-235.
- Castillo-Martínez, R., y Engleman, E.M. (1993). Caracterización de dos tipos de *Vanilla planifolia*. *Acta Botánica Mexicana*, 25,49-59.
- Castro-Bobadilla, G., Martínez, A.J., Martínez, M.L., y García-Franco, J.G. (2011). Aplicación de riego localizado para aumentar la retención de frutos de *Vanilla planifolia* en el Totonacapan, Veracruz, México. *Agrociencias*, 45(3), 281-291.
- Cid-Pérez, T.S., y López-Malo, A. (2011). Extractos de vainilla: una mezcla de componentes químicos de aroma y sabor. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 5(1), 51-63.
- Cláudio, A.F.M., Freire, M.G., Freire, C.S.R., Silvestre, A.J.D., Coutinho, J.A.P. (2010). Extraction of vanillin using ionic-liquid-based aqueous two-phase systems. *Separation and Purification Technology*, 75(1), 39-47.
- COFUPRO. (2012-14). Demandas del Sector 2012-14. Fondo Sectorial de Investigación en materia agrícola, pecuaria, acuacultura, agrobiotecnología y recursos fitogenéticos. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.1-9.
- Consejo nacional de Productores de Vainilla. (2006). Logros y perspectivas de la vainilla en México, *Comité Nacional Sistema Producto Vainilla*. 1-30. Fecha de consulta: 4 de Noviembre 2015. Recuperado de: <http://207.248.177.30/mir/uploadtests/24200.177.59.1.Anexo%20IV%20%20Estudio%20Sistema%20Producto%20Vainilla.pdf>
- De Guzmán, C.C. (2006). Vanilla. En K.V. Peter (Ed) *Handbook of Herbs and Spices* (pp 335-362). University of the Philippines Los Baños, Philippines. Woodhead Publishing Limited.

- De la Cruz-Medina, J., Rodríguez-Jiménez, G.C., García, H.S. (2009). Vanilla Post-harvest Operations. INPhO-Post-harvest Compendium. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. 51 p.
- Gurnani, N., Kapoor, N., Mehta, D., Gupta, M., y Mehta, B.K. (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(5), 769-776.
- Hernández-Hernández, J. (2011). Mexican Vanilla Production. En D. Havkin-Frenkel y F. Belanger. *Handbook of Vanilla science and Technology*, (pp 3-22). United Kingdom, Blackwell Publishing.
- Herrera-Cabrera, B.E., Salazar-Rojas, V.M., Delgado-Alvarado, A., Campos-Contreras, J.E., y Cervantes-Vargas, J. (2012). Use and conservation of *Vanilla planifolia* J. in the Totonacapan region, Mexico. *European Journal of Environmental Sciences*, 2(1), 37-44.
- Ho, C. T. (1992). Phenolic Compounds in Food. An Overview. En C.T. Ho, C.Y. Lee y M.T. Huang. *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health*, (pp 1-4). Washington D.C., USA, ACS Press.
- Jadhav, D., Rekha, B.N., Gogate, P.R., y Rathod, V.K. (2009). Extraction of vanillin from vanilla pods: A comparison study of conventional soxhlet and ultrasound assisted extraction. *Journal of Food Engineering*, 93(4), 421-426.
- Kelso-Bucio, H.A., Reyes-López, D., Cruz-Palacios, M.I., Villegas-Rodríguez, I., Rodríguez-Morales, B., Pascual-Ramírez, F., Mamadou-Bâ, K., Magaña-Hernández, F., y Huerta-Gómez, I. (2013). Beneficiado semi-mecanizado de vainilla. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 22(1), 38-40.
- Korthou, H., y Verpoorte, R. (2007). Vanilla. En R.G. Berger. *Flavours and Fragrances. Chemistry, Bioprocessing and Sustainability* (pp. 203-211). Germany, Springer.
- Madueño-Paulette, R. (2000). La Huasteca hidalguense: pobreza y marginación acumulada. *Revista Sociológica*, 15(44), 97-131.
- Menchaca, R., Ramos, J., Moreno, D., Luna, M., Mata, M., Vázquez, L.M., y Lozano, M. (2011). In vitro germination of *Vanilla planifolia* and *V. pompona* hybrids. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(1): 80-84.
- Menon, S., y Nayeem, N. (2013). *Vanilla planifolia*: A review of a plan commonly used as flavouring agent. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review*, 20(2), 225-228.

- Palama, T.L., Fock, I., Choi, Y.H., Verpoorte, R., y Kodja, H. (2010). Biological variation of *Vanilla planifolia* leaf metabolome. *Phytochemistry*, 71(5-6), 567-573.
- Palama, T.L., Khatib, A., Hae, C. Y., Côme, B., Fock, I., Verpoorte, R., Kodja, H. (2011). Metabolic characterization of Green pods from *Vanilla planifolia* accessions grown in La Réunion. *Environmental and Experimental Botany*, 72(2), 258-265.
- SAGARPA. (2009). Monitor Agroeconómico 2009 del Estado de Hidalgo. Recuperado de: http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Estadisticas/Documents/HIDALGO.pdf?Mobile=1&Source=%2Fagronegocios%2FEstadisticas%2F_layouts%2Fmobile%2Fview.aspx%3FList%3Dea4191c6-15b5-4625-afe9be7e6cce2216%26View%3Df5c8d175-3fb9-49f2-86e6-c9db05b29bfb%26CurrentPage%3D1
- Sagrero-Nieves, L., y Schwartz, S.J. (1988). Phenolic content of *Vanilla planifolia* as affected by harvest period. *Journal of Food Composition and Analysis*, 1(4), 362-365.
- Salazar-Rojas, V.M., Herrera-Cabrera, B.E., Delgado-Alvarado, A., Soto-Hernández, M., Castillo-González, F., y Cobos-Peralta, M. (2011). Chemotypical variation in *Vanilla planifolia* Jack. (Orchidaceae) from the Puebla-Veracruz Totonacapan region. *Genetic Resource and Crop Evolution*, 59(5), 875-887.
- Santa-Cardona, C., Marín-Montoya, M., y Díez, M.C. (2012). Identificación del agente causal de la pudrición basal del tallo de vainilla en cultivo bajo cobertizos en Colombia. *Revista Mexicana de Micología*, 35, 23-34.
- Soto-Arenas, M.A. (2009). Recopilación y análisis de la información existente sobre las especies mexicanas el género *Vanilla*. Reporte intermedio. *Instituto Chinoín, A.C.*
- Toth, S., Joong-Lee, K., Havkin-Frenkel, D., Belanger, F.C., Hartman, T.G. (2011). Volatile Compounds in Vanilla. En D. Havkin-Frenkel y F. Belanger *Handbook of Vanilla Science and Technology* (pp 183-218). United Kingdom, Blackwell Publishing.
- Van Dyk, S., Holdorf, P., Subedi, P., Walsh, K., Williams, M., y McGlasson, W.B. (2014). Determining the harvest maturity of vanilla beans. *Scientia Horticulturae*, 168(26), 249-257.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

Resumen

Vanilla planifolia Jacks. ex Andrews es una especie que requiere de 8 a 9 meses desde la polinización de la flor hasta la cosecha del fruto verde carente de aroma, por lo que es preciso realizar un proceso llamado beneficiado que permita el desarrollo del aroma, detener el desarrollo vegetativo de las vainas e incrementar la vida de anaquel de las vainas. A su vez, el desarrollo del aroma involucra diversos grupos de enzimas como la glucosidasa, peroxidasa y polifenoloxidasa, entre otras, las cuales permiten la formación de cerca de 200 compuestos de origen fenólico de los cuales destacan el ácido vanílico, ácido *p*-hidroxibenzoico, *p*-hidroxibenzaldehído y vainillina, este último compuesto puede presentar concentraciones de 2-2.5% en su composición y por tanto son utilizados para evaluar la calidad y autenticidad de extractos de vainilla. No obstante, la variación en el contenido de estos compuestos está dado por factores como el origen geográfico, el área productiva, el clima o el periodo de cosecha, entre otros aspectos; un ejemplo de esto es la vainilla cultivada en México, la cual se ha determinado que contiene aproximadamente 2% de contenido de vainillina y presenta un aroma intenso, dulce y especiado. Además de la síntesis de estos compuestos, existen los denominados fitoquímicos, que pueden aportar aroma y sabor así como brindar protección a la planta ante la presencia de plagas, radiación UV, patógenos, estrés biótico y abiótico, entre otras funciones. En el caso de otras especies, la identificación de estos fitoquímicos así como su aprovechamiento y usos potenciales se ha dado de manera empírica y ha generado conocimiento que es transmitido de generación en generación en diversos grupos culturales; los cuales en conjunto dan lugar al conocimiento tradicional que permite la preservación de una especie en particular.

Palabras clave: conocimiento tradicional, perfil aromático, recurso genético, variación.

1.1 Beneficiado y reacciones enzimáticas

Desde la siembra del esqueje, la planta de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) requiere de tres a cuatro años para que inicie el periodo de floración, el cual tiene una duración aproximada de dos a tres meses (abril a mayo, sin embargo, en ocasiones puede prolongarse hasta junio). Sus flores son hermafroditas, de color cremoso y tonalidades amarillo verdoso y están formadas por tres sépalos, dos pétalos y una columna central o ginostemo en el cual se fusionan los órganos sexuales, a su vez, estos órganos se encuentran separados por una membrana llamada rostelo (De la Cruz-Medina *et al.* 2009).

Una vez fertilizada la flor deben transcurrir de ocho a diez meses para que el fruto se desarrolle y madure, de esta manera se cosechan los frutos con tonalidades verdes o amarillas (Sistema producto Vainilla 2006; De la Cruz-Medina *et al.* 2009; Tapia-Ochoategui *et al.* 2011). Estas vainas carecen de aroma, es decir, no presentan los principales compuestos del aroma en forma libre sino como glucósidos (Leong *et al.* 1989; Odoux 2005; De la Cruz-Medina *et al.* 2009; Van Dyk *et al.* 2014), los cuales comienzan a acumularse en el fruto 15 semanas después de la polinización y continúan hasta cerca de la semana 30 (Odoux 2005; Van Dyk *et al.* 2010) representando menos del 2% de peso fresco de las vainas (Van Dyk *et al.* 2010).

Actualmente se han identificado 15, siendo la glucovainillina el glucósido más abundante y la forma de almacenamiento más importante de vainillina (Odoux 2005; Van Dyk *et al.* 2014), el cual tras su hidrólisis libera vainillina constituyendo aproximadamente 85% del total de los compuestos volátiles presentes en las vainas (Menon y Nayeem 2013).

Se han identificado aproximadamente 200 compuestos que conforman el aroma de las vainas beneficiadas de vainilla (Gurnani *et al.* 2014) siendo los compuestos presentes en mayor cantidad la vainillina (4-hidroxi-3-metioxibenzaldehído), ácido vanílico, ácido *p*-hidroxibenzoico (ácido *p*HB) y *p*-hidroxibenzaldehído (*p*HB), cuya cuantificación es un importante criterio para evaluar tanto la calidad de las vainas

como la autenticidad de los extractos de vainilla (Parthasarathy *et al.* 2008; Cicchetti y Chaintreau 2009; Palama *et al.* 2011).

Las características del aroma están dadas principalmente por compuestos fenólicos como la vainillina que después del beneficio puede llegar a 2-2.5%, dependiendo de la procedencia de la vainilla (Parthasarathy *et al.* 2008; Jadhav *et al.* 2009). Sin embargo, las diferencias en las características aromáticas de las vainas están asociadas a diversos factores como su origen (país, áreas productivas o variaciones propias de su origen), variación entre lotes de vainas beneficiadas, condiciones agroclimáticas y de crecimiento, composición del suelo, madurez del fruto, prácticas culturales y el tipo de beneficio al que se sometan las vainas (Brillouet *et al.* 2010; Gurnani *et al.* 2014). De igual manera, también se ha determinado que las variaciones en el contenido de vainillina están en función del periodo de cosecha (Sagrero-Nieves y Schwartz 1988).

De esta manera, el proceso de beneficio o beneficiado se define como el conjunto de cambios que ocurren en el procesamiento primario de un determinado material verde o crudo para obtener un producto final con características deseables para el mercado (Korthou y Verpoorte 2007; De la Cruz-Medina *et al.* 2009). En el caso de la vainilla el beneficio puede durar más de seis meses (Dignum *et al.* 2002; Salazar Rojas *et al.* 2011; Menon y Nayeem 2013) y tiene como objetivos detener el desarrollo vegetativo de las vainas, incrementar su vida de anaquel y crear las condiciones adecuadas para la interacción sustrato-enzima (Dignum *et al.* 2002; Odoux 2005; Gassenmeier *et al.* 2008; Brillouet *et al.* 2010; Van Dyk *et al.* 2010; Cid-Pérez y López-Malo 2011; Frenkel *et al.* 2011) lo cual genera un excelente aroma, color, textura, brillo y humedad en las vainas a través de un proceso fermentativo realizado a altas temperaturas con la finalidad de deshidratar las vainas y que estas adquieran sus características comerciales y un valor agregado al producto (Korthou y Verpoorte 2007). No obstante, se realiza con un propósito adicional, que es prevenir la dehiscencia de las vainas lo cual les resta calidad (Odoux 2005; Cid-Pérez y López-Malo 2011).

Así, el beneficiado de las vainas de vainilla consta básicamente de cuatro etapas (Dignum *et al.* 2002; Gassenmeier *et al.* 2008; Brillouet *et al.* 2010; Van Dyk *et al.* 2010; Tapia-Ochoategui *et al.* 2011).

- 1) Marchitamiento o matado: Esta primera etapa se considera la más crítica e importante, ya que es donde se detienen o inhiben los cambios naturales post-cosecha que las vainas podrían sufrir, tales como el proceso celular de las vainas (crecimiento vegetativo y respiración) para evitar la dehiscencia y el inicio de las reacciones enzimáticas que desarrollan el aroma y el sabor. Favorece la descompartimentalización celular (ruptura de la pared celular) para permitir la interacción de enzimas y sustratos que provoque la liberación de compuestos aromáticos; la cual se lleva a cabo mediante la hidrólisis de la glucovainillina por efecto de la β -glucosidasa y la oxidación que da lugar a la formación de pigmentos oscuros. A su vez, la velocidad de conversión de glucovainillina en glucosa y vainillina puede ser determinada por la velocidad de desaparición de glucovainillina y acumulación de vainillina, sin embargo, estudios han sugerido que la tasa de conversión alcanza sólo 40% de su capacidad hidrolítica (Frenkel *et al.* 2011).
- 2) Sudado: Esta etapa permite el incremento de temperatura para favorecer las reacciones enzimáticas, la hidrólisis de glucovainillina y la oxidación para desarrollar el aroma, además de las propiedades de textura y flexibilidad de las vainas, seguido de la continua pérdida de agua en las vainas con el fin de evitar la presencia de hongos o levaduras (De la Cruz-Medina *et al.* 2009).
- 3) Secado: las vainas se remueven de sus contenedores para exponerlas directamente al sol y así eliminar el exceso de humedad, al hacerlo de manera repetida las vainas pierden cerca de dos terceras partes de su peso. El proceso se repite hasta que las vainas alcanzan entre 25-30% de humedad y un color oscuro además de reducir la actividad de agua para evitar el crecimiento de microorganismos (De la Cruz-Medina *et al.* 2009).
- 4) Acondicionado: permite el incremento de materia seca a 50-60% además de continuar con el desarrollo del aroma. Las vainas se colocan en

“camillas” para verificar la ausencia de hongos y la calidad del aroma, posteriormente son almacenadas en papel cera, de estraza, bolsas de celofán o plástico, o bien, en recipientes con sello hermético para evitar la pérdida de sabor y aroma.

Durante el beneficiado se da lugar a la actividad de diversas enzimas que contribuyen al desarrollo del aroma, entre ellas se encuentran la glucosidasas, oxidadasas, sintetadasas, metiltransferadasas, proteadasas y fenilamonioliasas (Cid-Pérez y López-Malo 2011); en las cuales están involucradas reacciones de oxidación lipídica, de Maillard y de degradación de proteínas, entre otras (Odoux 2005). Sin embargo, las glucosilhidroladasas (β -glucosidada), proteadasas, peroxidadasas y polifenoloxidasas son las principales enzimas asociadas al beneficiado.

En el caso de la β -glucosidada, su actividad incrementa de forma considerable entre el tercer y cuarto mes después de la polinización alcanzando un máximo de actividad en el quinto mes de desarrollo, su contenido en las vainas de vainilla es mayor a los 6-7 meses después de la polinización (Dignum *et al.* 2004), y expresa una actividad mínima durante el beneficio de las vainas (Odoux *et al.* 2006).

De acuerdo con lo reportado por Kanisawa *et al.* (1994), se considera que hay dos tipos de glucosidasas presentes en las vainas de vainilla, una específica para la glucovainillina detectada únicamente en las vainas, la cual no se inactiva con el tratamiento térmico, y otra no específica presente en las hojas y vainas (Odoux 2005; Korthou y Verpoorte 2007). No obstante, su actividad se detiene después del beneficiado lo cual demuestra que la conformación del aroma puede no deberse en su totalidad a un proceso enzimático (Dignum *et al.* 2004; Parthasarathy *et al.* 2008), ya que además de los compuestos aromáticos volátiles generados por efecto de las enzimas durante el beneficiado, existen otros metabolitos no volátiles que contribuyen al olor y sabor de las vainas, como los taninos (Cid-Pérez y López-Malo 2011).

La proteada muestra una importante actividad en el marchitamiento, la cual se mantiene constante una vez que las vainas están maduras y disminuye entre 60-70% su actividad después del beneficiado, no obstante, mantiene su actividad aún

después de este tratamiento mientras que otras enzimas como las glucosidasas sí se inactivan (Frenkel *et al.* 2011).

La polifenoloxidasa (PPO) y la peroxidasa son los dos principales sistemas enzimáticos que pueden catalizar los procesos de oscurecimiento, no obstante, la actividad de la PPO disminuye durante el beneficiado cerca de 50% mientras que la peroxidasa incrementa su actividad durante el marchitamiento y etapas posteriores del beneficiado, por lo cual puede encontrarse en altas cantidades durante el beneficiado (Van Dyk *et al.* 2010; Frenkel *et al.* 2011), aunque también se le atribuye la oxidación de la vainillina a compuestos quinínicos durante el sudado y secado, lo cual aporta otras notas aromáticas a las vainas (Van Dyk *et al.* 2010).

A su vez, la peroxidasa es la responsable de generar los cambios de color en las vainas (de verde a marrón y café oscuro) así como de oxidar los compuestos que aportan el sabor y aroma a vainilla de tal forma que se lleve a cabo la transformación de vainillina en ácido vanílico y *p*-hidroxibenzaldehído a ácido *p*-hidroxibenzoico (Podstolsky *et al.* 2002).

No obstante, las enzimas involucradas en la obtención de compuestos aromáticos no se distribuyen de manera uniforme, sino que se distribuyen de distinta manera a lo largo del tejido de la vaina, de tal forma que las enzimas hidrolíticas junto con otras enzimas se ubican principalmente en la pared exterior de la vaina (Cid-Pérez y López-Malo 2011).

También se ha sugerido que existen microorganismos que podrían contribuir al perfil aromático global de las vainas e incluso también en la formación de vainillina puesto que diversos microorganismos se encuentran presentes en las vainas durante el beneficiado (Frenkel *et al.* 2011).

1.2 Perfil aromático

En los análisis realizados en *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews los compuestos identificados incluyen ácidos, éteres, alcoholes, ésteres y compuestos fenólicos (Salazar-Rojas *et al.* 2011) teniendo como característica particular que 95% o más

de los compuestos volátiles están presentes en concentraciones inferiores a 10 partes por millón (ppm) (Ranadive 2011).

De esta amplia gama de compuestos, cuatro son los principales indicadores de calidad comercial puesto que se encuentran en mayor concentración: vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído) presente en concentración de 1, 000 - 20, 000 ppm, *p*-hidroxibenzaldehído (2,000 ppm), ácido vanílico (ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico) (2,000 ppm) y ácido *p*-hidroxibenzoico (200 ppm) (Gassenmeier *et al.* 2008; Salazar Rojas *et al.* 2011), siendo la vainillina el compuesto al cual se le atribuye casi una tercera parte del perfil aromático global (Sinha *et al.* 2008; Hernández-Hernández 2011) y el principal criterio para determinar la calidad aromática tanto de las vainas como de los productos derivados de ellas (Frenkel *et al.* 2011).

De acuerdo con los análisis realizados en la vainilla mexicana se ha determinado que esta se caracteriza por tener un aroma intenso, dulce, ligeramente especiado y con notas de aroma a tabaco con un contenido aproximado de 2% de vainillina. Considerando que el aroma de la vainilla contiene más de 200 compuestos, se ha reportado que la vainilla cultivada en México contiene aproximadamente 65 compuestos volátiles, en los cuales predominan los ácidos y compuestos fenólicos (Hernández-Hernández 2011).

1.3 Metabolitos secundarios o fitoquímicos

En el metabolismo de las plantas se generan principalmente dos grupos de compuestos, a los cuales se les denomina metabolitos primarios y secundarios (Ávalos-García y Pérez-Urria 2009; Gómez-Romero *et al.* 2010); los metabolitos primarios (v.g. ácidos orgánicos, ácidos grasos, nucleótidos, aminoácidos y azúcares) desempeñan funciones esenciales en el crecimiento y desarrollo de las plantas así como en procesos de respiración, fotosíntesis y síntesis de hormonas y proteínas (Ávalos-García y Pérez-Urria 2009; Gómez-Romero *et al.* 2010) mientras que los metabolitos secundarios no forman parte del metabolismo primario pero se biosintetizan a partir de moléculas intermediarias (De la Cruz-Chacón y González-Esquinca 2009).

Los metabolitos secundarios, también llamados fitoquímicos (Kabera *et al.* 2014), se definen como compuestos de bajo peso molecular obtenidos como productos finales de procesos reguladores celulares (De la Cruz-Chacón y González-Esquinca 2009); pueden ser considerados también como la última respuesta de sistemas biológicos a cambios genéticos o ambientales como cambios en el pH, temperatura y nutrición (Fox y Howlett 2008; Gómez-Romero *et al.* 2010).

Las plantas, en su medio natural, están expuestas a cambios ambientales o ataques de plagas o patógenos, como consecuencia de esto, han desarrollado sistemas de defensa que generan señales que se transmiten desde el tejido dañado hacia el resto de la planta (respuesta sistémica) o se distribuyen a nivel local al generar cambios en el zona atacada (respuesta local).

Los sistemas de defensa pueden expresarse en forma de barreras físicas y químicas como espinas, tricomas, cutículas superficiales de las hojas y ceras protectoras de diversos organismos; así como en la síntesis de metabolitos defensivos que den repuestas a un determinado estímulo, en el caso de las plantas sanas, a estos metabolitos se les conoce como fitoanticipinas (Osbourn 1996).

Considerando que una de las principales funciones de los fitoquímicos es brindar protección ante el ataque de patógenos o plagas, su mecanismo de acción ocurre a través de la descompartimentalización, una vez que las células han sido destruidas la glucosidasa entra en contacto con el glucósido generando un aglicón tóxico. De esta manera se genera una respuesta de defensa en la que una fitoanticipina presente en las células de las plantas se transforma en un compuesto altamente reactivo y tóxico después del ataque de los microorganismos o insectos (Korthou y Verpoorte 2007).

Las respuestas defensivas de las plantas pueden ser de tres tipos (Hallbrocket *al.* 1995).

- 1) Innata: es también conocida como respuesta independiente del huésped, protege principalmente contra patógenos e involucra el reconocimiento y

generación de señales internas de la planta. Su principal defensa son las barreras físicas como espinas, tricomas y ceras en la superficie de los tejidos vegetales, principalmente en las hojas.

- 2) Local inducida: tiene lugar en la zona dañada y su periferia mostrando efecto nocivo para el organismo agresor, consiste en la acumulación de enzimas, proteínas estructurales o metabolitos.
- 3) Sistémica inducida: abarca el tejido distante o un órgano no afectado de la planta.

Una característica importante de los metabolitos secundarios o fitoquímicos que los diferencia de los metabolitos primarios es que pueden no estar presentes en determinados grupos de especies vegetales, es decir, no todos los metabolitos se encuentran en todos los grupos de plantas, de tal manera que pueden sintetizarse en pequeñas cantidades estando restringida a un determinado género de plantas, especie, células especializadas o fases específicas del desarrollo (Ávalos-García y Pérez-Urria 2009; De la Cruz-Chacón y González-Esquinca 2009).

Estos compuestos desempeñan funciones de protección contra herbívoros, microorganismos y radiación UV además de ayudar a atraer a los polinizadores o dispersores de semillas y actuar como moléculas de señal ante condiciones de estrés, entre otras funciones (Bérdy 2005; Ávalos-García y Pérez-Urria 2009; Gómez-Romero *et al.* 2010).

Además de las funciones ya mencionadas, también son responsables de las características sensoriales como el sabor y olor de las plantas alimenticias y ornamentales; por lo que tienen un amplio uso en fármacos, agroquímicos, narcóticos, antibióticos, aceites comestibles, biodiesel, esencias, saborizantes e insecticidas, entre otros (De la Cruz-Chacón y González-Esquinca 2009).

Dado que estos metabolitos pueden ser utilizados para el beneficio del ser humano, también son conocidos como productos naturales y pueden agruparse principalmente en tres clases (Ávalos-García y Pérez-Urria 2009; De la Cruz-Chacón y González-Esquinca 2009):

- Terpenos: incluye hormonas, pigmentos o aceites esenciales. Generalmente se dividen en cuatro grupos: triterpenos verdaderos, esteroides, saponinas y glucósidos cardiacos. Las saponinas se distribuyen en las especies vegetales de acuerdo con la naturaleza de su aglicón, de manera que pueden ser esteroides o triterpenos (Ciesla y Waksmundzka-Hajnos 2009).
- Compuestos fenólicos: incluye cumarinas, flavonoides, lignina y taninos. La biodisponibilidad y efectos biológicos de los ácidos fenólicos resulta importante dado que desempeñan funciones en la fisiología de las plantas al estimular su crecimiento. Además, se ha demostrado que presentan un importante efecto fungistático, bacteriostático, colerético, sedante, anti convulsionante y antioxidante al captar los radicales libres (Ciesla y Waksmundzka-Hajnos 2009; Gómez-Romero *et al.* 2010).
- Alcaloides: se han dividido en varios grupos de acuerdo con su estructura química y precursores biosintéticos, los cuales pueden ser muy complejas y variadas, por lo cual su identificación mediante pruebas de cromatografía no es simple dado que generalmente se encuentran en forma de mezclas (Ciesla y Waksmundzka-Hajnos 2009). Debido a su abundancia, diversidad e importancia, los alcaloides son los metabolitos secundarios más estudiados tanto para el aspecto químico y farmacobiológico como para el ecológico (Dirzo 1985).

La identificación de estos compuestos se realiza a través de análisis fitoquímicos preliminares, en los cuales una de las técnicas más comunes para obtener los principios activos de las plantas es la extracción por efecto de un solvente, de manera que se lleve a cabo la separación de la materia soluble (fitoquímicos) de los tejidos vegetales (materia insoluble) (Flores-Morales *et al.* 2014).

Posterior a su extracción, uno de los métodos más utilizados para identificar su presencia es la cromatografía en capa fina y agentes cromógenos, esta última detecta los principales tipos de metabolitos con actividad biológica como alcaloides, flavonoides y esteroides, entre otros (Flores-Morales *et al.* 2014), mientras que en la cromatografía en capa fina (Thin Layer Chromatography, TLC,

por sus siglas en inglés) los compuestos analizados son transferidos a través de una agente adsorbente mediante el uso de solventes con alto poder eluyente (Ciesla y Waksmundzka-Hajnos 2009; Dar *et al.* 2014).

La presencia de los fitoquímicos puede ser observada a simple vista (en el caso de clorofila y otros pigmentos), sin embargo, existen también sustancias incoloras que deben identificarse mediante el análisis de cromatografía en capa fina o bajo radiación UV con intervalos de 254 a 365 nanómetros (nm) mostrando fluorescencia como respuesta (Flores-Morales *et al.* 2014).

1.4 Conocimiento tradicional

El conocer la historia de vida de un determinado recurso genético mediante la comprensión de los diferentes ciclos de vida que afectan su supervivencia y reproducción, así como la interacción con otros organismos, tipo de reproducción, etc., son aspectos fundamentales para generar información y estrategias que contribuyan a su conservación (Villanueva-Viramontes 2014).

Sin embargo, los estudios científicos encaminados a conocer las propiedades y beneficios de los recursos biológicos son actividades recientes, ya que durante siglos diversas comunidades alrededor del mundo han aprendido, utilizado y transferido conocimientos tradicionales de la diversidad con la que están en contacto para aprovecharla con diferentes propósitos, desde utilizarla como alimento, medicamento, prácticas de agricultura, etc. (Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica 2011). A su vez, este conocimiento tradicional se ha desarrollado a través de la experiencia de las comunidades a lo largo del tiempo y transmitido de generación en generación.

Con base en lo anterior, “conocimiento tradicional” se define como el conjunto acumulado y dinámico del saber teórico, la práctica y la experiencia que poseen los pueblos mediante la interacción con su medio natural (UNESCO 2006; García-Aguirre 2007).

Esto representa una fuente valiosa para identificar los usos de los recursos genéticos y cumple con la importante labor de preservar, mantener e incluso a

incrementar la diversidad biológica (Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica 2011). Ejemplo de esto, es que en diferentes regiones de México los distintos grupos indígenas como los mayas tzetzales, mayas yucatecos y los purépechas han logrado identificar más de 1200, 900 y 500 especies de plantas, respectivamente (Toledo 1985). No obstante, la relación ciencia-conocimiento tradicional muestra que estos son dos aspectos que innegablemente van de la mano, puesto que sin la investigación muchos de los recursos aprovechados y preservados actualmente no habrían sido identificados.

Tras el conocimiento del aprovechamiento potencial de un recurso ya identificado, se pone en práctica también el conocimiento agrícola, técnico, ecológico, etc., a través de los cuales se lleva a cabo actividades de recolección y selección con lo cual se genera variación en las especies cultivadas.

En el caso específico de un recurso genético de importancia ecológica, cultural e industrial como la vainilla, la colecta y selección tanto de los frutos que proporciona como de las partes reproductivas ha ocurrido con mayor intensidad en la región del Totonacapan, en la cual la selección en el caso de los frutos se da principalmente con base a las características aromáticas y tamaño, mientras que los esquejes (partes reproductivas) se eligen de acuerdo con su nivel de sanidad, floración y vigor (calidad de la planta madre y resistencia al corte).

A través del tiempo, este conocimiento genera técnicas empíricas del cultivo de las especies que deriva en la agricultura tradicional en la que el cultivo o prácticas de manejo utilizadas se basa en una amplia experiencia empírica transmitida a través de los años y que conforma un fuente invaluable de conocimiento resguardado por las poblaciones agrícolas (Hernández-Xolocotzi 1985). Finalmente, estos conocimientos tradicionales, materializados en las prácticas locales de uso de recursos naturales, reflejan su valor en el hecho de que le han permitido a las comunidades rurales adaptarse a los cambios registrados en el tiempo, tanto ambientales como de índole cultural (Herrera-Cabrera *et al.* 2010).

Aunado a lo anterior, resulta pertinente que quienes utilizan tanto el conocimiento y agricultura tradicionales como los recursos en sí, les brinden el valor que

merecen y lo hagan de forma justa y equitativa dando el reconocimiento correspondiente a las diversas comunidades ya sean indígenas o locales de donde estos se obtienen.

1.5 Literatura citada

- Ávalos-García, A., y Pérez-Urria Carril, E. (2009). Metabolitos secundarios de plantas. *Reduca. Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), 119-145.
- Bérdy, J. (2005). Bioactive Microbial Metabolites. *The Journal of Antibiotics*, 58(1), 1-26.
- Brillouet, J.M., Odoux, E., y Conejero, G. (2010). A set of data on Green ripening and senescent vanilla pods (*Vanilla planifolia*; *Orchidaceae*): anatomy, enzymes, phenolics and lipids. *Fruits*, 65(4), 221-235.
- Cicchetti, E., y 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(17), 3043-3052.
- Cid-Pérez T.S., y López-Malo A. (2011). Extractos de vainilla: una mezcla de componentes químicos de aroma y sabor. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 5(1), 51-63.
- Ciesla, L., y Waksmundzka-Hajnos, M. (2009). Two-dimensional thin-layer chromatography in the analysis of secondary plant metabolites. *Journal of Chromatography A*, 1216(7), 1035-1052.
- Dar, A.A., Sangwan, P.L., Khan, I., Gupta, N., Quadri, A., Tasduq, S.A., Kitchlu, S., Kumar, A., y Koul, S. (2014). Simultaneous quantification of eight bioactive secondary metabolites from *Codonopsis ovata* by validated high performance thin layer chromatography and their antioxidant profile. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 100, 300-308.
- De la Cruz-Chacón, I., y González-Esquinca, A.R. (2009). Biotecnología aplicada a la producción de metabolitos secundarios. *Lacandonia, Revista Ciencias Unicach*, 3(2), 59-65.
- De la Cruz-Medina, J., Rodríguez-Jiménez, G.C., y García, H.S. (2009). Vanilla Post-harvest Operations. INPhO-Post-harvest Compendium. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 51 p.

- Dignum, M.J.W., Kerler, J., y Verpoorte, R. (2002). Vanilla curing under laboratory conditions. *Food Chemistry*, 79(2), 165-171.
- Dignum, M.J.W., Van der Heijden, R., Kerler, J., Winkel, C., y Verpoorte, R. (2004). Identification of glucosides in green beans of *Vanilla planifolia* Andrews and kinetics of vanilla β -glucosidase. *Food Chemistry*, 85(2), 199-205.
- Dirzo, R. (1985). Metabolitos secundarios en las plantas ¿Atributos panglossianos o de valor adaptativo?, *Ciencia*, 36, 137-145.
- Flores-Morales, V., Castañeda-Hernández, O., Montiel-Santillán, T., y Hernández-Delgadillo, G.P. (2014). Análisis fitoquímico preliminar del extracto hexánico de hojas de *Hemiphylacus novogalicianus*, una especie endémica de México. *Investigación y Ciencia*, 22(63), 18-23.
- Fox, E.M., y Howlett, B. J. (2008). Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Current Opinion in Microbiology*, 11(6), 481-487.
- Frenkel, C., Ranadive, A.S., Tochihuitl-Vázquez, J., y Havkin-Frenkel, D. (2011). Curing of Vanilla. En D. Havkin-Frenkel y F. Belanger (pp 79-102) *Handbook of Vanilla Science and Technology*. United Kingdom, Blackwell Publishing.
- García-Aguirre, M.A.A. (2007). Conocimiento tradicional de los pueblos indígenas de México y Recursos Genéticos. Análisis de la problemática actual de los conocimientos tradicionales asociados a los recursos genéticos, a nivel internacional y nacional. Comisión Nacional para el Desarrollo de los Pueblos Indígenas (CDI). Dirección General de Desarrollo y Cultura de los Pueblos Indígenas. 61 p.
- Gassenmeier, K., Riesen, B., y Magyar, B. (2008). Commercial quality and analytical parameters of cured vanilla beans (*Vanilla planifolia*) from different origins from the 2006-2007 crop. *Flavour and Fragrance Journal*, 23, 194-201.
- Gómez-Romero, M., Segura-Carretero A., y Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Metabolite profiling and quantification of phenolic compounds in methanol extracts of tomato fruit. *Phytochemistry*, 71(16), 1848-1864.
- Gurnani, N., Kapoor, N., Mehta, D., Gupta, M., y Mehta, B.K. (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(5), 769-776.
- Hallbrock, K., Scheel, D., Logemann, E., Nürberger, T., Parniske, M., Reynolds, S., Sacks, W., y Scmelzer, E. (1995). Oligopeptide elicitor-mediated defense

- gene activation in cultures parsley cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 4150-4157.
- Hernández-Hernández, J. (2011). Mexican Vanilla Production. En D. Havkin-Frenkel y F. Belanger (pp 3-22). *Handbook of Vanilla Science and Technology*. United Kingdom, Blackwell Publishing.
- Hernández-Xolocotzi, E. (1985). Agricultura tradicional y desarrollo. *Revista de Geografía Agrícola. Tomo I*. Universidad Autónoma de Chapingo. México. 419-422 p.
- Herrera-Cabrera, B.E., Miranda-Trejo, J., y Delgado-Alvarado, A. (2010). Conocimiento Tradicional, Predictores Climáticos y Diversidad Genética: Fitoindicadores, observaciones astronómicas y diversidad genética de haba en la agricultura. LAP LAMBERT Academic Publishing. 54 p.
- Jadhav, D., Rekha, B.N., Gogate, P. R., y Rathod, Virendra K. (2009). Extraction of vanillin from vanilla pods: A comparison study of conventional soxhlet and ultrasound assisted extraction. *Journal of Food Engineering*, 93(4), 421-426.
- Kabera, J.N., Semana, E., Mussa, A.R., y He, X. (2014). Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2, 377-392.
- Kanisawa, T., Tokoro, K., y Kawahara, S. (1994). Flavour development in the beans of *Vanilla planifolia*. En K. Kurihara, N. Suzuki y H. Ogawa. *Proceeding of the International Symposium*, Springer, Tokyo, 268-270.
- Korthou, H., y Verpoorte, R. (2007). Vanilla. En R.G. Berger (Ed.) *Flavours and Fragrances. Chemistry, Bioprocessing and Sustainability* (pp. 203-211). Germany, Springer.
- Leong, G., Uzio, R., y Berbesy, M. (1989). Synthesis, identification and determination of glucosides present in green vanilla beans (*Vanilla fragans* Andrews). *Flavour and Fragrance Journal*, 4(4), 163-167.
- Menon, S., y Nayeem, N. (2013). *Vanilla planifolia*: A review of a plan commonly used as flavouring agent. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review*, 20(2), 225-228.
- Odoux, E. (2005). Glucosylated aroma precursors and glucosidase(s) in vanilla bean (*Vanilla planifolia* G. Jackson). *Fruits*, 61(3), 171-184.
- Odoux, E., Escoute, J., y Verdeil, J. (2006). The relation between glucovanillin, β -D-glucosidase activity and cellular compartmentation during the senescence,

- freezing and traditional curing of vanilla beans. *Annals of Applied Biology*, 149, 43-52.
- Osbourn, A.E. (1996). Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *The Plant Cell*, 8, 1821-1831.
- Palama, L., Khatib, A., Hae-Choi, Y., Côme, B., Fock, I., Verpoorte, R., y Kodja, H. (2011). Metabolic characterization of Green pods from *Vanilla planifolia* accessions grown in La Réunion. *Environmental and Experimental Botany*, 72(2), 258-265.
- Parthasarathy, V.A., Chenpakam, B., y Zachariah, T.J. (2008). Vanilla. En A. Azeez, *Chemistry of spices* (pp 287-311). Indian Institute of Spices Research, Kelara, India.
- Podstolski, A., Havkin-Frenkel, D., Malinowski, J., Blount, J.W., Kourteva, G., y Dixon, R.A. (2002). Unusual 4-hydroxybenzaldehyde synthase activity from tissue cultures of the vanilla orchid *Vanilla planifolia*. *Phytochemistry*, 61(6), 611-620.
- Ranadive, A. S. (2011). Authentication and Flavor Analysis. Quality Control of Vanilla Beans and Extract. En D. Havkin-Frenkel y F. Belanger (Ed.) *Handbook of Vanilla Science and Technology* (pp 141-159). United Kingdom, Blackwell Publishing.
- Sagrero-Nieves, L., y Schwartz, S.J. (1988). Phenolic content of *Vanilla planifolia* as affected by harvest period. *Journal of Food Composition and Analysis*, 1(4), 362-365.
- Salazar-Rojas, V.M., Herrera-Cabrera, B.E., Delgado-Alvarado, A., Soto-Hernández, M., Castillo-González, F., y Cobos-Peralta, M. (2011). Chemotypical variation in *Vanilla planifolia* Jack. (Orchidaceae) from the Puebla-Veracruz Totonacapan region. *Genetic Resource and Crop Evolution*, 59(5), 875-887.
- Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica: ABS. (2011). Conocimiento tradicional. Convenio Sobre la Diversidad Biológica. 2-5.
- Sinha, A.K., Sharma, U.K., y Sharma, N. (2008). A comprehensive review on vanilla flavor: Extraction, isolation and quantification of vanillin and others constituents. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 59(4), 299-326.
- Sistema Producto Vainilla. (2006). Logros y perspectivas de la vainilla en México. SAGARPA

- Tapia-Ochoategui, A.P., Camacho-Díaz, B.H., Perea-Flores, M.J., Ordóñez-Ruíz, I.M., Gutiérrez-López, G.F., y Dávila-Ortiz, G.F. (2011). Cambios morfométricos durante el beneficio tradicional de las vainas de vainilla (*Vanilla planifolia*; Orchidaceae) en México. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 10(1), 105-115.
- Toledo, V. M. (1985). Las eco-comunidades: un diseño ecológico para el desarrollo rural de México. *Ciencia y Desarrollo*, 62, 25-32.
- UNESCO. (2006). Conocimientos tradicionales. Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura, 1-2.
- Van Dyk, S., Barry-McGlasson, W., Williams, M., y Gair, C. (2010). Influence of curing procedures on sensory quality of vanilla beans. *Fruits*, 65(6), 387-399.
- Van Dyk, S., Holdorf, P., Subedi, P., Walsh, K., Williams, M., y McGlasson, W.B. (2014). Determining the harvest maturity of vanilla beans. *Scientia Horticulturae*, 168(26), 249-257.
- Villanueva-Viramontes, S. (2014). Genética de la conservación y la historia de vida de *Vanillaplanifolia* Andrews (Orchidaceae). Centro de Investigación Científica de Yucatán, 6, 88-90.

CAPÍTULO II. CARACTERIZACIÓN AROMÁTICA Y FISICOQUÍMICA DE VAINAS BENEFICIADAS DE *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews DE LA HUASTECA HIDALGUENSE, MÉXICO

Resumen

Originaria de México, *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews es una especie cultivada en las zonas tropicales de la República, siendo el Totonacapan una de las regiones más representativas de producción de vainilla; no obstante, zonas como la Huasteca hidalguense han mostrado gran potencial para el cultivo de vainilla. A pesar de esto, son escasos los estudios enfocados a conocer las características de la vainilla de esta zona, por tal motivo el objetivo fue realizar una evaluación de características fisicoquímicas y de aroma de vainas beneficiadas de vainilla. La metodología consistió en cuatro etapas: 1) Obtención de vainas, 2) Evaluación de porcentaje de humedad, pH, actividad de agua, concentración de azúcares solubles totales (glucosa, fructosa y sacarosa), color, dimensiones y firmeza, 3) Cuantificación de los cuatro principales compuestos del aroma (ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido vanílico, *p*-hidroxibenzaldehído y vainillina), 4) Análisis estadístico mediante prueba de Tukey, componentes principales, cluster y correlación de Pearson. Los resultados indicaron cuatro grupos definidos principalmente por variables fisicoquímicas como el contenido de azúcares solubles totales, firmeza, actividad de agua, color, pH y largo de las vainas. Por su parte, las características del aroma indicaron que básicamente existen cuatro aromas en la Huasteca hidalguense; de igual manera, sólo se observaron correlaciones positivas y significativas en lo referente a la concentración de sacarosa y compuestos menores del aroma, indicando que al incrementar la concentración de sacarosa disminuye la concentración de dichos compuestos.

Palabras clave: concentración, Hidalgo, *Vanilla planifolia*, variación.

2.1 Introducción

La vainilla, especie originaria de México e introducida al viejo mundo tras la llegada de los españoles, es considerada una de las más grandes contribuciones de América al mundo de los aromas y de los sabores (De Guzmán 2006). En México existen diversas zonas donde se cultiva esta especie, no obstante, sólo algunas de ellas han sido objeto de estudio para determinar las características del aroma de sus frutos siendo una de las principales la región del Totonacapan.

No obstante, la Huasteca de Hidalgo ha mostrado características óptimas para el cultivo de vainilla, sin embargo, a la fecha son escasos los estudios documentados en relación con esta especie en dicha región, en particular se desconoce el perfil del aroma y las características fisicoquímicas de las “vainas” beneficiadas.

Se sabe que en general las características tanto aromáticas como físicas de las vainas beneficiadas de vainilla presentan variaciones que se encuentran sujetas a factores ambientales, geográficos y de procesamiento, así como a características propias de la especie. Dentro de las principales causas que generan variación se encuentran las condiciones de crecimiento y composición del suelo, tiempo de maduración del fruto, características del beneficiado, origen geográfico y altitud entre otras (Ranadive 1992; De Guzmán 2006; Frenkel *et al.* 2011; Van Dyk *et al.* 2014).

Los frutos verdes carecen de aroma por lo cual es necesario someterlos a un beneficiado, proceso en el que se desarrolla el aroma de la vainilla. Sin embargo, este proceso está relacionado directamente con la madurez de las vainas, ya que si no tienen la madurez adecuada o el beneficiado no es el óptimo el desarrollo de compuestos aromáticos será bajo, incluso en algunos casos pueden no producirse estos compuestos a pesar de que el proceso de beneficio se realice de forma adecuada (Frenkel *et al.* 2011; Rivera-Espinoza y Muriel 2013).

Mientras que si las vainas tienen la madurez adecuada tendrán concentraciones más altas de glucovainillina, mayor actividad de β -glucosidasa y por tanto, mayor concentración de vainillina (Van Dyk *et al.* 2010). En contraste, si las vainas

permanecen demasiado tiempo en la planta, eventualmente presentarán dehiscencia en la punta (división en dos) como efecto de la sobre-maduración, lo cual resultará en la pérdida de aroma y consecuentemente en la disminución de calidad y precio (De la Cruz-Medina *et al.* 2009; Van Dyk *et al.* 2014).

También existe una importante relación tiempo de maduración, origen geográfico y altitud de cultivo, ya que el tiempo necesario para que los frutos alcancen su máxima longitud y madurez varía de acuerdo a la región, es decir, la madurez puede ser más temprana o tardía. Se ha demostrado que las primeras vainas cosechadas son de menor tamaño con respecto de aquellas que maduran después, con lo cual se determina que el ambiente del año en que se desarrollen puede afectar su calidad, al igual que la altitud, ya que a diferentes altitudes se da también una variación en la temperatura (Jones *et al.* 1949).

En cuanto a las características aromáticas de los frutos, se considera que la formación de vainillina se inicia 16 semanas después de la polinización y se maximiza a las 26 semanas (Brodellius 1994). Las vainas alcanzan el punto adecuado de madurez de 8 a 10 meses posteriores a la polinización, con lo cual alcanza su máximo potencial para desarrollar las mejores características aromáticas tras el beneficiado, de esta manera, la madurez junto con el beneficiado de los frutos representa un factor importante para determinar su calidad (Frenkel *et al.* 2011; Van Dyk *et al.* 2014).

Es ampliamente conocido que durante el beneficio de los frutos se desarrollan los compuestos del aroma, de los cuales la vainillina es el que se encuentra en mayor concentración (aproximadamente 2%) (Gassenmeier *et al.* 2008). Sin embargo, el ácido vanílico, ácido *p*-hidroxibenzoico y el *p*-hidroxibenzaldehído también contribuyen a definir su calidad sensorial, específicamente su aroma y sabor (Van Dyk *et al.* 2010), por lo cual se les ha denominado “compuestos marcadores” ya que son utilizados como parámetros de autenticidad de calidad (Gassenmeier *et al.* 2008).

A su vez, la edad fisiológica de las vainas afecta la concentración de los compuestos del aroma (Van Dyk *et al.* 2014), aunque Ranadive (1992) menciona

que la concentración de *p*-hidroxibenzaldehído y ácido *p*-hidroxibenzoico se asocia más a factores propios de la especie, como variaciones genéticas de tipo polimórfico. Algunos autores mencionan que bajo condiciones controladas de madurez y beneficiado, las vainas pueden mostrar variaciones significativas en la concentración de vainillina y ácido vaníllico, mientras que las concentraciones de los otros dos compuestos pueden no ser significativas (Salazar-Rojas *et al.* 2011).

El perfil aromático es uno de los principales aspectos que se evalúan para determinar la calidad de las vainas beneficiadas, no obstante, de acuerdo a la Norma NOM-182-SCFI-2011 se consideran características físicas y químicas para complementar su clasificación. Por ello, la flexibilidad o firmeza, longitud, color, tamaño y porcentaje de humedad son factores de gran importancia para evaluar la calidad de las vainas de vainilla, además se ha determinado que existe una importante correlación entre las características físicas y aromáticas de las vainas (Gassenmeier *et al.* 2008; Exley 2011; Van Dyk *et al.* 2014).

En 1980 se sugirió por primera vez obtener índices a partir de los cuatro principales compuestos aromáticos (vainillina, ácido vaníllico, ácido *p*-hidroxibenzoico y *p*-hidroxibenzaldehído) estableciendo relaciones entre ellos para determinar la proporción en que estos se encuentran en las vainas beneficiadas además de funcionar como indicadores de autenticidad (Gassenmeier *et al.* 2008; Hoffman 2011). El primer índice propuesto fue vainillina/*p*-hidroxibenzaldehído, más tarde se agregaron las relaciones vainillina/ácido vaníllico y vainillina/ácido *p*-hidroxibenzoico (Hoffman 2011).

El porcentaje de humedad es de igual forma un aspecto determinante para la calidad de las vainas beneficiadas, ya que una excesiva humedad en las vainas, éstas serán más propensas a sufrir ataques por hongos y levaduras lo cual le resta calidad e inocuidad. Por otra parte, si las vainas contienen 10% de humedad son consideradas de baja calidad, por lo que las vainas de grado gourmet son las que contienen cerca de 35% de humedad y las de grado extracción contienen de 20-25% de humedad (Ranadive 2011).

Con base en lo anterior, es claro que el perfil aromático de las vainas así como sus características fisicoquímicas permiten definir su calidad, lo cual determinará su precio final en el mercado. Sin embargo, dado que se le han atribuido ciertas propiedades a esta especie gracias a la presencia de determinados fitoquímicos, resulta conveniente también conocer el tipo de metabolitos secundarios (fitoquímicos) presentes en las diferentes estructuras que conforman la planta de vainilla, estudio que se abordara en otro capítulo del trabajo.

Por tal motivo el objetivo de este capítulo fue realizar una caracterización aromática y fisicoquímica de las vainas beneficiadas de diferentes colectas de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews que crecen y se cultivan en la Huasteca hidalguense a través de la evaluación de los cuatro principales compuestos que conforman el aroma de la vainilla (vainillina, ácido vanílico, ácido *p*-hidroxibenzoico y *p*-hidroxibenzaldehído), así como sus características fisicoquímicas (color, firmeza, humedad, Aw, dimensiones, pH y concentración de azúcares solubles totales).

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Área de estudio

El estado de Hidalgo se ubica en los 21° 24' 19" 36' de latitud norte y los 97° 58' - 99° 53' de longitud oeste (INEGI 2015) en la parte central de la República Mexicana. Limita al norte con San Luis Potosí, al noreste y este con Veracruz, al este y sureste con Puebla, al sur con Tlaxcala y México, y al oeste con Querétaro (Hernández-Salinas y Ramírez-Bautista 2013). Lo conforman principalmente tres grandes regiones: la Huasteca (parte plana y baja del norte del estado), la Sierra (región montañosa ubicada en el centro) y el Altiplano (región alta y casi plana localizada al sur) siendo la Huasteca la región de estudio.

Esta zona se ubica al noreste del estado y está conformada por ocho municipios: Atlapexco, Huautla, Huazalingo, Huejutla de Reyes, Jaltocan, Orizatlán, Xochiatipán y Yahualica (Villavicencio-Nieto y Pérez-Escandón 2005), es la región más baja sobre el nivel del mar de la entidad y se caracteriza por tener un clima

caluroso y húmedo acompañado de lluvias en verano, una vegetación variada y abundante que incluye árboles de finas maderas, gran diversidad de frutos tropicales, bosques de coníferas y encinos, mesófilo de montaña y tropical perennifolio o selva; así como una abundante fauna y una intensa actividad ganadera y agrícola. Además tiene tres zonas climáticas: climas cálido, cálido húmedo y semicálido con temperatura media anual de 22 °C, rango de temperatura media anual de 12 a 18 °C y un rango de precipitación anual de 1200 a 2500 mm (Villavicencio-Nieto y Pérez-Escandón 2005) así como una altitud aproximada de 190 a 2500 msnm (IMTA 2007).

2.2.2 Especie de estudio

La vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) es una especie originaria de México (Bory *et al.* 2008; Parthasarathy *et al.* 2008; Palama *et al.* 2010) perteneciente al género *Vanilla*, la cual incluye cerca de 110 especies. Es una planta trepadora, hemiepífita o terrestre perteneciente a la familia Orchidaceae, que requiere para su cultivo un tutor o sostén, sombra y gran cantidad de materia orgánica (humus).

Prospera en un clima tropical cálido húmedo, con temperaturas de 20 a 30 °C e incluso 32 °C, requiere una precipitación media anual entre 2,000 a 3,000 mm con dos o tres meses de condiciones relativamente secos para favorecer la floración de la planta, la cual ocurre entre los meses de abril y junio (Hernández-Hernández 2011).

Las condiciones de altitud oscilan entre 0 y 600 msnm, no obstante, se han encontrado ejemplares hasta los 1100 a 1500 msnm. Suele cultivarse bajo sistemas forestales, en los cuales las especies leñosas proveen el sostén y sombra necesarios para su crecimiento y desarrollo como organismo hemiepífito así como para obtener protección a la exposición solar. De acuerdo con lo reportado por Maceda (2015), la vainilla cultivada en la Huasteca hidalguense tiene una edad entre 10 y 70 años y se cultivan principalmente en cafetales y acahuals predominando la polinización natural de las flores.

2.2.3 Obtención de vainas y beneficiado

Tras seleccionar los sitios de colecta de acuerdo con Maceda (2015), se procedió a la polinización de entre 20 y 30 flores durante el mes de abril de 2013, 32 semanas (ocho meses) posteriores a la polinización se realizó la colecta de las vainas, las cuales se trasladaron al ejido Primero de Mayo, Papantla, Veracruz, México para realizar el beneficiado tradicional por el maestro beneficiador Veremundo Rodríguez. El proceso consistió en un marchitamiento o matado de las vainas verdes mediante escaldado en agua caliente a 90 °C durante un minuto.

Las vainas se almacenaron durante 24 h en cajones de madera hasta lograr su enfriamiento, se realizaron 21 ciclos de asoleado-sudado exponiendo las vainas al sol durante 3 ó 4 horas diarias para posteriormente almacenarlas en cajones de madera que permitieran mantener la temperatura. Luego de 5 ó 6 sudados las vainas se orearon en camillas de madera para evitar la proliferación de hongos o levaduras, finalmente se almacenaron a -80 °C hasta el momento de su uso, la descripción a detalle del proceso de beneficiado se cita en Xochipa-Morante *et al.* (2016).

2.2.4 Ubicación de sitios de colecta y zonas agroecológicas

Se identificaron 14 sitios de colecta en la Huasteca hidalguense distribuidos en los municipios de Atlapexco, Huejutla y Jaltocán (Cuadro 1, Figura 1), dado que las investigaciones acerca de la vainilla en Hidalgo son escasas y únicamente se ha reportado un estudio realizado por Lubinsky *et al.* (2008), en el cual hacen referencia al uso de tres accesiones de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews, el presente estudio aporta información relevante acerca de las características aromáticas y fisicoquímicas de las vainillas beneficiadas de *V. planifolia* Jacks. ex Andrews en la Huasteca hidalguense. Si se considera que no existen registros documentados acerca de los sitios en la Huasteca donde se produce la vainilla, los sitios de colecta se ubicaron por observación directa junto con los pobladores de la región de acuerdo al trabajo realizado por Maceda (2015) a través de un GPS (Garmin Montana 650®) (Cuadro 1), posteriormente se realizó la ubicación geográfica de los sitios (Figura 1).

Cuadro 1. Ubicación de poblaciones de plantas de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews en la Huasteca hidalguense, México.

Municipio	Localidad	Sitio	Longitud	Latitud	Altitud	Clima
Atlapexco	Itzocal	S1	-98.40	21.02	382	Am(f) Cálido húmedo
Atlapexco	Huizotlaco	S2	-98.38	21.05	285	
Atlapexco	Huizotlaco	S3	-98.38	21.05	273	
Atlapexco	San Isidro	S5	-98.43	21.02	350	
Huejutla	Contepec	S7	-98.49	21.14	406	(A)C(m)(f) Semicálido- templado húmedo
Huejutla	Contepec	S8	-98.49	21.14	352	
Huejutla	Tezóhual	S13	-98.50	21.12	414	
Huejutla	Poxtla	S12	-98.48	21.09	367	
Huejutla	Poxtla	S11	-98.48	21.09	331	
Huejutla	Ichcatepec	S6	-98.52	21.10	545	
Jaltocán	Tlanepantla	S14	-98.56	21.11	482	A(f) Cálido húmedo mes más frío menor a 18 °C
Huejutla	Coacuilco	S4	-98.60	21.11	400	
Huejutla	Coacuilco	S9	-98.59	21.08	473	(A)C(fm) Semicálido húmedo del grupo C
Huejutla	Coacuilco	S10	-98.57	21.10	423	

Fuente: CONABIO 2012.

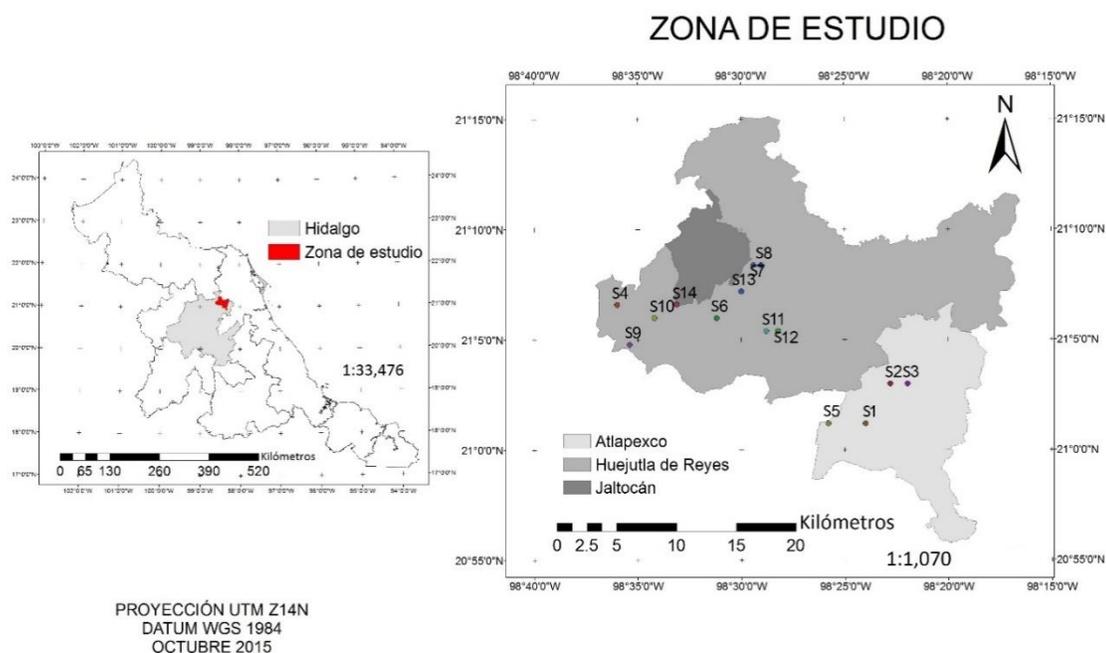


Figura 1. Ubicación de los 14 sitios de colecta (S1-S14) de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews en la Huasteca hidalguense, México.

2.2.5 Variables fisicoquímicas

Las variables fisicoquímicas evaluadas para caracterizar las vainas beneficiadas de la Huasteca hidalguense se describen en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Variables utilizadas para evaluar las características fisicoquímicas en vainas beneficiadas de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews en la Huasteca hidalguense, México.

Código	Variable fisicoquímica	Unidades*
L	Luminosidad	Adimensional
Croma	Croma	Adimensional
Hue	Hue	Grados
Anc	Ancho	mm
Long	Longitud	cm
Gros	Grosor	mm
Aw	Actividad de agua	Adimensional
%H	Humedad	%
pH	pH	Adimensional
F/G	Firmeza/Grosor	g mm ⁻¹
F/A	Firmeza/Ancho	g mm ⁻¹
F/L	Firmeza/Longitud	g cm ⁻¹
Glu	Glucosa	%
Fru	Fructosa	%
Sacarosa	Sacarosa	%
AT	Azúcares solubles totales (Glucosa+Fructosa+Sacarosa)	%

* mmg⁻¹= milímetros gramos fuerza⁻¹, mm=milímetros, cm= centímetros, %= porcentaje

Las variables se evaluaron como se describe a continuación:

Color: Las variables de color se evaluaron con un colorímetro ColorFlex Hunter Lab®. Se analizaron colocando cuatro vainas completas y cubriéndolas con una tapa cilíndrica de foamy, se realizaron dos repeticiones por cada par de vainas beneficiadas. Con base en los resultados obtenidos de los espectros L*, a* y b* (L*= Luminosidad del color, a*= posición entre rojo y verde, b*= posición entre amarillo y azul) se determinaron los valores de Hue y Croma. Hue expresa el ángulo de tono o el color con valor entre 0 a 360° y Croma la intensidad, saturación o pureza del color; las cuales contribuirán a proporcionar una mejor descripción de las características del color de la vaina a través de las siguientes ecuaciones:

$$Croma = (a *^2 + b *^2)^{1/2}$$

$$Hue = \arctan(b */a *)$$

Longitud (cm), grosor (mm) y ancho (mm): estas variables fueron medidas con un vernier digital Marca Mitotuyo®.

Firmeza/Longitud, Firmeza/Grosor, Firmeza/Ancho: la firmeza de las vainas se determinó con un Texturómetro TA.XT. Plus Texture Analyser® (Ver Anexo A), se empleó la punta SMS P/0.5 de 4 cm de largo por 1.2 cm de diámetro, colocando la vaina sobre una base cilíndrica hueca de 3.5 cm de alto por 2.1 cm de diámetro interno, a partir del punto máximo de flexión obtenido en cada muestra se obtuvieron índices que expresan la relación de firmeza entre cada una de las dimensiones de las vainas. El equipo se calibró a una velocidad de 5 mm s⁻¹, distancia de 8 mm, distancia de retorno de 2 mm, velocidad de retorno de 10 mm s⁻¹ y una fuerza de contacto de 0.1 g. Además de una velocidad de adquisición de 25 puntos por segundo y un tiempo de prueba típico de 150 segundos.

Actividad de agua (Aw): se evaluó al colocar un trozo de vaina beneficiada de aproximadamente un centímetro en el equipo AQUALAB PRO y realizando cuatro repeticiones por cada colecta.

Porcentaje de humedad (%H): se determinó colocando aproximadamente 500 mg de vaina beneficiada molida en una termobalanza Ohaus MB35 y realizando cuatro repeticiones por cada sitio de colecta.

pH: la lectura se realizó de manera directa sobre un segmento de la vaina con un potenciómetro Hanna Instruments pH211.

Glucosa, fructosa y sacarosa: Se obtuvieron de acuerdo al método enzimático descrito por Scholes *et al.* (1994), realizando lecturas en un espectrofotómetro de microplacas UV/VIS (Varioskan Flash Thermo Scientific®), (Ver Anexo B).

2.2.6 Compuestos aromáticos

Para evaluar las características de calidad aromáticas de las vainas beneficiadas de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews de la Huasteca de Hidalgo se tomaron

como base los cuatro compuestos mayoritarios que conforman el aroma (ácido *p*-hidroxibenzoico, *p*-hidroxibenzaldehído, ácido vanílico y vainillina), de los cuales se obtuvieron sumatorias e índices para mostrar la proporción en que se encuentran los compuestos minoritarios (ácido *p*-hidroxibenzoico *p*-hidroxibenzaldehído y ácido vanílico) con respecto a la vainillina, compuesto de mayor concentración; dando un total de 10 variables evaluadas, las cuales se describen en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Variables utilizadas para evaluar las características aromáticas en vainas beneficiadas de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews en la Huasteca hidalguense, México.

Código	Variable aromática	Unidades*
C1	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	ppm
C2	Ácido vanílico	ppm
C3	<i>p</i> -hidroxibenzaldehído	ppm
C4	Vainillina	ppm
ΣCM	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico + Ácido vanílico + <i>p</i> -hidroxibenzaldehído	ppm
ΣCM/C4	(Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico + Ácido vanílico + <i>p</i> -hidroxibenzaldehído)/vainillina	%
C1/C4	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico/vainillina	Adimensional
C2/C4	Ácido vanílico/vainillina	Adimensional
C3/C4	<i>p</i> -hidroxibenzaldehído/vainillina	Adimensional
(C1+C2)/C4	(Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico + Ácido vanílico)/vainillina	Adimensional

*ppm = partes por millón (mg Kg^{-1}), % = Porcentaje

La cuantificación de las cuatro principales variables aromáticas de las vainas beneficiadas se llevó a cabo mediante el análisis de extractos etanólico-acuosos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (High Performance Liquid Chromatography, HPLC por sus siglas en inglés) obtenidos mediante el proceso de extracción e inyección modificado de Cicchetti y Chaintreau (2009), como sigue:

Las vainas beneficiadas, previamente congeladas, fueron trituradas en un molino de carga (Krupps GX4100) hasta lograr una molienda uniforme. Se pesaron 50 mg de vaina beneficiada molida en viales de vidrio. A los viales con la muestra se

agregaron 18 mL de una solución compuesta por agua y etanol grado HPLC en proporción 1:1. Se agitaron manualmente durante algunos segundos, posteriormente se colocó un magneto en cada vial y se sometieron a agitación durante 30 minutos en una parrilla magnética a velocidad 6, transcurridos este lapso los viales se llevaron a refrigeración durante 24 horas. Posteriormente los extractos se agitaron durante cinco minutos y se tomó un mililitro de muestra con una jeringa para filtrarla con ayuda de un acrodisco (PALL Life Science, membrana GHP, 13 mm, 0.45 μm) y se colocó en viales de dos mililitros con tapa de rosca con septa pre-perforada (Ver Anexo C).

Una vez obtenidas las muestras se procedió a la inyección de la muestra en un cromatógrafo bajo las siguientes condiciones: columna (Perkin Elmer C18 5 μ , 250 x 4.6 mm) 1.5 mL min^{-1} , fase móvil isocrática (25% metanol-75% H_3PO_4 10^{-2} M), solución metanol grado HPLC-agua (50-50), tiempo de corrida (20 min) y detector UV/VIS a 254 nm (Series 200, Perkin ElmerTM). Para identificar y cuantificar los compuestos fenólicos se emplearon sustancias puras.

La solución estándar se preparó en una solución etanol: agua (1:1) con 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de vainillina (3 metoxi-4-hidroxibenzaldehído); y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ácido 4-hidroxibenzoico, 4-hidroxibenzaldehído y ácido vanílico (ácido 4-hidroximetoxibenzoico) (Sigma-Aldrich, USA). A partir de esta mezcla se realizaron las diluciones necesarias para la obtención de las curvas de calibración (Ver Anexos D y E).

2.2.7 Análisis estadístico de variables

Para el análisis de las variables se utilizaron dos diseños estadísticos, en el primer caso se consideró el efecto de 15 variables fisicoquímicas en la dispersión y agrupación de 14 colectas con cuatro repeticiones en cada caso dando un total de 56 muestras. En el segundo diseño se evaluaron 10 variables aromáticas en 14 colectas con cuatro réplicas en cada colecta con un total de 56 muestras.

Ambos casos se analizaron a través del procedimiento PROC GLM y PROC ANOVA, con los cuales se obtuvieron las medias y coeficientes de variación, Se

llevó a cabo una prueba de medias mediante la prueba de Tukey. Se realizó un análisis de componentes principales (ACP) mediante el paquete estadístico SAS versión 9.0 (SAS 2002) y un análisis de Cluster a través de distancia media entre conglomerados basado en el promedio de las variables estudiadas. Se realizó también la prueba de correlación de Pearson para determinar el grado de asociación entre variables fisicoquímicas y entre aromáticas.

En la prueba de asociación de variables se estableció una hipótesis nula (H_0) que establece que el valor de la correlación es igual a cero y una hipótesis alterna (H_a) que indica una correlación diferente de cero.

$H_0: r = 0$

$H_a: r \neq 0$

Dado que la hipótesis nula implica que las dos variables sometidas a prueba no se asocian, en esta prueba se evaluó la posibilidad de rechazar dicha hipótesis; su rechazo o no aceptación ocurre cuando el valor del coeficiente de correlación de Pearson calculado con los datos supera el valor crítico del coeficiente de correlación establecido previamente en tablas estadísticas, de esta manera, si H_0 se rechaza se concluye que probablemente existe una asociación real entre el par de variables estudiadas.

Con base a la fórmula,

$$G.L.: n - 2$$

Donde:

G.L.: Grados de libertad

n= número de colectas evaluadas

$$G.L.: 14 - 2 = 12$$

y los valores críticos del coeficiente de Correlación de Pearson establecidos en tablas con una significancia de 0.05 el valor obtenido es 0.532. Este valor será utilizado posteriormente en la prueba de hipótesis de los datos obtenidos.

2.3 Resultados y discusión

2.3.1 Análisis estadístico de variables fisicoquímicas

El análisis de las características fisicoquímicas en vainas beneficios de *V. planifolia* Jacks. ex Andrews mostró coeficientes de variación (CV) entre 1-20%, siendo la relación firmeza/ancho y la concentración de fructosa las variables que tuvieron los coeficientes más altos (18.84 y 19.29%, respectivamente); mientras que los coeficientes de variación más bajos los mostraron Hue (1.35%), Aw (1.15%), pH (3.72%) y longitud de la vaina (4.93%). Además se detectaron diferencias altamente significativas en las variables fisicoquímicas evaluadas en las diferentes colectas analizadas ($P < 0.001$) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Medias y coeficientes de variación de las 15 variables fisicoquímicas evaluadas en *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews en 14 sitios de colecta de la Huasteca hidalguense, México.

Variable	Media	Coeficiente de variación (CV)	Cuadrados medios	
			Colecta	Error
Luminosidad	16.5393	6.0337	4.8427***	0.9959
Croma	4.1102	10.9765	1.3064***	0.2035
Hue	229.8219	1.3515	54.0929***	9.6479
F/G	36.3071	16.7828	344.9977***	37.1286
F/L	7.9369	15.0395	11.2936***	1.4249
F/A	18.3474	18.8394	87.1092***	11.9476
Aw	0.8660	1.1506	0.0065***	0.0001
%H	28.2565	8.9620	142.0798***	6.4128
pH	5.0522	3.7239	0.2248***	0.0354
Ancho	7.2063	10.9088	1.9016**	0.6180
Longitud	16.2082	4.9321	7.9885***	0.6391
Grosor	3.4707	12.6072	0.6954**	0.1915
Glucosa	6.3091	14.4078	48.6013***	0.8263
Fructosa	4.0701	19.2880	30.5909***	0.6163
Sacarosa	3.8871	15.6540	15.3008***	0.3703
AT	14.2663	12.1534	230.7510***	3.0060

*** $P < 0.0001$, ** $P < 0.001$

Las variables agrupadas a través de la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) mostraron gran variación entre las colectas de vainas beneficiadas. En el caso de la Luminosidad (L) se hizo evidente la formación de cinco grupos siendo Coacuilco (S4) la colecta que presentó vainas más brillantes y Huizotlaco (S2) las de menor brillo con valores de 18.62 y 13.87, respectivamente. La evaluación de la variable Cromo, que corresponde al grado de saturación o pureza del color, mostró la formación de siete grupos, lo cual demuestra la amplia variedad de intensidad de color que presentaron las vainas. De esta manera, Tlaneplantla (S14) fue la colecta con vainas con colores más saturados, mientras que Poxtla (S11) y Contepec (S8) mostraron los valores más bajos, es decir, tienen tonos más grises y por tanto menos brillantes (Cuadro 5).

Considerando que Hue define la pureza del color, fue posible determinar la formación de cinco grupos, siendo Tezóhual (S13) y Huizotlaco (S2) los sitios con valores más altos en esta variable y por tanto sus vainas mostraron colores más oscuros mientras que las colectas de Contepec (S7 y S8) mostraron los valores más bajos, por lo que su color es más claro.

El índice de firmeza respecto al grosor de las vainas (F/G) formaron seis grupos, el primer grupo definido por la colecta de Coacuilco (S4) fue el que mostró el valor más alto, cabe destacar que esta colecta mostró vainas con más de 3.8 mm y un porcentaje de humedad superior a 30% lo cual contribuye a proporcionarles mayor firmeza y flexibilidad. La relación Firmeza/Longitud (F/L) formó siete grupos, el primero de ellos conformado por las colectas de Coacuilco (S4 y S9) mostró los valores más altos en este índice; por otra parte, la relación Firmeza/Ancho (F/A) formó seis grupos en los cuales las colectas de Coacuilco (S4 y S9) corresponden al grupo con el valor más alto. Puede observarse que estas colectas mostraron vainas con mayor tamaño, anchura y porcentaje de humedad lo cual aporta firmeza y flexibilidad, características deseadas en vainas beneficiadas.

La evaluación del ancho de las vainas (Anc) formó tres grupos, el primero concentró en su mayoría colectas provenientes de Huejutla de Reyes (Coacuilco, Ichcatepec y Contepec) y Atlapexco (Huizotlaco y San Isidro) así como las vainas

de Jaltocán (Tlanepantla) con rangos de ancho de 7.22 a 8.03 mm. El segundo grupo incluyó las colectas de Poxtla (S11 y S12), Tezóhual (S13) e Itzocal (S1) mostrando vainas con grosor de 6.53 a 7.01 mm y el tercer grupo fueron las vainas colectadas en Huizotlaco (S2).

En relación a la longitud (Long) de las vainas, se observó la formación de seis grupos. El primero incluye la colecta de Coacuilco (S4) con vainas de 18.08 cm de longitud (Cuadro 5), el segundo formado por Coacuilco (S10), Poxtla (S12) y Tlanepantla (S14) con vainas de 15.70 a 15.76 cm de largo; un tercer grupo estuvo formado por Ichcatepec (S6) con vainas de 17.85 cm. El grupo más extenso incluyó las colectas de Huizotlaco (S3), Itzocal (S1), Coacuilco (S9), San Isidro (S5) y Huizotlaco (S2) con longitudes de 16.60 a 17.63 cm, el quinto grupo conformado por Poxtla (S11) y Contepec (S7) mostró vainas de 15.96 a 16.08 cm y por último las colectas de Contepec (S8) y Tezóhual (S13) integraron el grupo con vainas de menor tamaño (13.40 a 13.60 cm). Por su parte, la NOM-182-SCFI-2011, describe que la longitud para vainas debe ser >15 cm, de acuerdo con lo anterior todas las colectas, con excepción de S8 y S13, cumplieron con las características establecidas.

El grosor de las vainas (Gros) formó cinco grupos, siendo el más extenso el integrado por Coacuilco (S4 y S10), Tlanepantla (S14), Ichcatepec (S6), Huizotlaco (S3), Itzocal (S1) y San Isidro (S5) mostrando vainas de 3.36 a 3.83 mm de grosor. El segundo grupo más amplio tuvo un grosor 3.07 a 3.16 mm siendo conformado por Contepec (S7), Tezóhual (S13) y Contepec (S8); Poxtla (S11) y Huizotlaco (S2) formaron el tercer grupo con vainas entre 2.87 a 2.95 mm. Poxtla (S12) y Coacuilco (S9) representan el cuarto y quinto grupo, respectivamente, con grosor de 4.03 mm y 4.26 mm (Cuadro 5). De manera general se considera que las vainas colectadas en Coacuilco (S4) fueron las que físicamente mostraron las mejores características tanto en tamaño como en flexibilidad y firmeza lo cual proporciona una importante característica de calidad.

Variabes químicas de las vainas como la actividad de agua (A_w) permitió la formación de cinco grupos siendo las colectas de Coacuilco (S4, S9 y S10),

Tlanepantla (S14), Huizotlaco (S3) y San Isidro (S5) las colectas correspondientes al primer grupo con valores entre 0.89 y 0.90, con lo cual podría considerarse que se incrementa en riesgo de proliferación de hongos. Asimismo, Itzocal (S1), Poxtla (S11), Contepec (S7 y S8) y Tezóhual (S13) corresponden al segundo grupo con A_w entre 0.84 y 0.86, Poxtla (S12) e Ichcatepec (S6) formaron el tercer y cuarto grupo con valores de 0.88 y 0.86, respectivamente; mientras que Huizotlaco (S2) fue la colecta de vainas con menor actividad de agua (0.75) haciéndola menos propensa al desarrollo de microorganismos que alteren su calidad. Sin embargo, dado que la A_w se relaciona directamente con el porcentaje de humedad, consecuentemente esta colecta mostró el menor contenido de humedad lo cual genera vainas quebradizas y de menor calidad.

La evaluación del contenido de humedad en las vainas (%H) fue muy variable, puesto que formó 12 grupos con porcentajes de 16.34-36.68 %, la NOM-182-SCFI-2011 indica un porcentaje de humedad entre 25-38 %. De esta manera, todas las colectas con excepción de S2, S6, S11 y S13 se encuentran dentro de este rango (Cuadro 5); Coacuilco (S9) fue la colecta con mayor porcentaje de humedad (36.68%), lo cual coincide con su alto valor de actividad de agua (0.90) incrementando el riesgo de proliferación de microorganismos; por el contrario, Huizotlaco (S2) mostró el contenido de humedad más bajo (16.34%) , lo que corresponde a una consecuente baja actividad de agua (0.75). Lo anterior lleva a concluir que las vainas menos gruesas y anchas poseen poca materia seca, lo cual afecta su calidad final.

Al evaluar la acidez de las diferentes colectas (pH) se observó la formación de siete grupos, de forma que la colecta de San Isidro (S5) mostró el valor de pH más alto y por tanto menor acidez, mientras que las vainas de Tezóhual (S13) y Contepec (S8) presentaron los valores de pH más bajo indicando mayor acidez lo cual reduce la proliferación de microorganismos que afecten la calidad de las vainas.

Con respecto a la concentración de azúcares en las vainas se encontró alta variabilidad entre las muestras. Se identificaron valores del 22.91 y 22.06 % en las

vainas de Poxtla (S11) y Contepec (S8) respectivamente, hasta 7.29 % en las vainas de Ichcatepec (S6). En general la proporción de los azúcares coincide con lo reportado por Xochipa *et al.* (2016) y Zamora-Flores *et al.* (2016) en donde el azúcar predominante es la glucosa, seguida de la fructosa y finalmente la sacarosa. Esta proporción de azúcares solubles pudo ser consecuencia del tipo de beneficiado que experimentan las vainas.

Por otra parte, la concentración de azúcares solubles totales (AT) en las vainas beneficiadas evaluadas mostró cinco grupos de manera que Poxtla (S11) y Contepec (S8) fueron las colectas con mayor concentración de azúcares solubles totales (entre 22.06 y 22.91%) lo cual indica que son las vainas más dulces (Cuadro 5).

Cuadro 5. Prueba de medias para las variables fisicoquímicas evaluadas en *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews en 14 sitios de colecta de la Huasteca hidalguense, México.

Sitio	Variables															
	L	Croma	Hue	F/G	F/L	F/A	Aw	Anc	Long	Gros	%H	pH	Glu	Fru	Sac	AT
S4	18.62 ^a	4.62 ^{ab}	230.98 ^{abc}	53.15 ^a	10.51 ^a	23.02 ^{ab}	0.89 ^a	8.03 ^a	18.08 ^a	3.83 ^{abc}	32.79 ^{abc}	5.43 ^{ab}	7.44 ^{bc}	5.15 ^{cd}	4.07 ^{bc}	16.65 ^b
S10	17.24 ^{ab}	4.41 ^{abc}	229.65 ^{abc}	34.04 ^{bc}	7.41 ^{bc}	16.29 ^{bcd}	0.89 ^a	7.41 ^a	15.76 ^c	3.36 ^{abc}	32.14 ^{abcd}	4.88 ^d	6.58 ^{cd}	3.15 ^{ef}	2.99 ^d	12.73 ^b
S12	17.21 ^{ab}	3.73 ^{bcd}	226.96 ^{bc}	34.88 ^{bc}	8.85 ^{abc}	20.10 ^{bc}	0.88 ^{ab}	6.94 ^{ab}	15.75 ^c	4.03 ^{ab}	27.17 ^{cdef}	5.04 ^{bcd}	7.64 ^{cd}	4.08 ^{de}	4.10 ^{bc}	15.82 ^b
S14	17.08 ^{ab}	4.91 ^a	230.22 ^{abc}	36.62 ^{bc}	8.54 ^{abc}	19.03 ^{bcd}	0.89 ^a	7.22 ^a	15.70 ^c	3.79 ^{abc}	32.51 ^{abcd}	4.90 ^{cd}	3.64 ^{fg}	3.13 ^{ef}	2.70 ^d	9.46 ^{de}
S6	16.89 ^{ab}	4.09 ^{abcd}	227.80 ^{bc}	40.59 ^{abc}	7.65 ^{abc}	19.92 ^{bc}	0.86 ^{bc}	7.48 ^a	17.85 ^{ab}	3.59 ^{abc}	22.90 ^{efg}	4.98 ^{bcd}	2.92 ^g	1.51 ^g	2.87 ^d	7.29 ^e
S3	16.81 ^{ab}	4.83 ^{ab}	232.18 ^{ab}	34.13 ^{bc}	8.16 ^{abc}	17.12 ^{bcd}	0.89 ^a	7.63 ^a	17.08 ^{abc}	3.54 ^{abc}	34.34 ^{ab}	5.34 ^{abc}	4.13 ^{efg}	2.55 ^{fg}	2.74 ^d	9.42 ^{de}
S1	16.80 ^{ab}	3.42 ^{cd}	227.86 ^{bc}	27.79 ^{cd}	6.19 ^{cd}	13.42 ^{cd}	0.85 ^c	7.01 ^{ab}	16.83 ^{abc}	3.63 ^{abc}	26.53 ^{defg}	4.91 ^{cd}	7.39 ^{bc}	5.70 ^{bc}	4.48 ^b	17.57 ^b
S9	16.51 ^{ab}	4.23 ^{abcd}	231.19 ^{abc}	48.83 ^{ab}	10.54 ^a	28.69 ^{ab}	0.90 ^a	7.50 ^a	17.63 ^{abc}	4.26 ^a	36.68 ^a	5.12 ^{abcd}	4.48 ^{ef}	2.58 ^{fg}	2.59 ^d	9.64 ^{de}
S11	16.31 ^{abc}	3.26 ^d	230.19 ^{abc}	35.22 ^{bc}	7.22 ^{bcd}	14.38 ^{cd}	0.84 ^c	6.79 ^{ab}	16.08 ^{bc}	2.87 ^c	20.31 ^{gh}	4.94 ^{cd}	9.82 ^a	7.31 ^a	5.79 ^a	22.91 ^a
S7	16.23 ^{abc}	3.82 ^{abcd}	224.41 ^c	37.74 ^{bc}	7.97 ^{abc}	17.86 ^{bcd}	0.86 ^c	7.43 ^a	15.96 ^{bc}	3.14 ^{bc}	30.06 ^{bcd}	5.21 ^{abcd}	7.17 ^{bc}	4.15 ^{de}	6.19 ^a	17.52 ^b
S5	16.17 ^{bc}	4.20 ^{abcd}	229.77 ^{abc}	47.08 ^{ab}	9.65 ^{ab}	21.87 ^{abc}	0.89 ^a	7.82 ^a	17.13 ^{abc}	3.55 ^{abc}	29.98 ^{bcd}	5.50 ^a	5.26 ^{de}	3.35 ^{ef}	2.69 ^d	11.30 ^{cd}
S13	15.63 ^{bc}	4.66 ^{ab}	236.76 ^a	35.33 ^{bc}	8.04 ^{abc}	21.83 ^{abc}	0.84 ^c	6.53 ^{ab}	13.60 ^d	3.16 ^{bc}	21.87 ^{fgh}	4.77 ^d	3.55 ^{fg}	1.69 ^g	4.05 ^{bc}	9.30 ^{de}
S8	15.47 ^{bc}	3.19 ^d	223.81 ^c	28.75 ^{cd}	6.60 ^{cd}	10.59 ^d	0.85 ^c	7.58 ^a	13.40 ^d	3.07 ^{bc}	28.10 ^{cde}	4.80 ^d	10.00 ^a	6.04 ^{abc}	6.01 ^a	22.06 ^a
S2	13.87 ^c	3.87 ^{abcd}	235.91 ^a	16.42 ^d	4.32 ^d	14.73 ^{bcd}	0.75 ^d	5.27 ^b	16.60 ^{abc}	2.95 ^c	16.34 ^h	5.10 ^{abcd}	8.27 ^b	6.70 ^{ab}	3.25 ^{cd}	18.22 ^b

Nota: Letras diferentes por columna indican diferencia estadística, Tukey ($\alpha=0.05$). S4, S9 y S10: Coacuilco, S11 y S12: Poxtla, S14: Tlanepantla, S6: Ichcatepec, S3: Huizotlaco, S1: Itzocal, S7 y S8: Contepec, S5: San Isidro, S13: Tezóhual, S2: Huizotlaco. L: Luminosidad, F/G: Firmeza/Grosor, F/L: Firmeza Longitud, F/A: Firmeza/Ancho, Aw: Actividad de agua, Anc: Ancho, Long: Longitud, Gros: Grosor, %H: Porcentaje de humedad, Glu: Glucosa, Fru: Fructosa, Sac: Sacarosa, AT: Azúcares totales.

2.3.2 Distribución de la variación de variables fisicoquímicas

El análisis de componentes principales determinó que la distribución de la variación de los 15 caracteres fisicoquímicos de las 14 colectas evaluadas a través de los primeros tres componentes explicó 81% de la variación total (Cuadro 6). El CP1 aportó 50% de la variación total y fue definido por la relación de firmeza asociadas con las dimensiones de las vainas (F/G, F/A, F/L), actividad de agua (*A_w*) y azúcares solubles totales (AT). El segundo componente (CP2) aportó 20% de la variación total y estuvo asociado con las variables Hue, ancho de las vainas (Anc) y la concentración de sacarosa (Sac), por último, el CP3 determinó aproximadamente 11% de la variación, representado por variables como la longitud de las vainas (Long) y el pH (Cuadro 6).

Cuadro 6. Valores propios, proporción de las variación totales y variación acumulada de las variables fisicoquímicas en las tres dimensiones de la caracterización de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews de la Huasteca hidalguense, México.

VARIABLE	COMPONENTES PRINCIPALES (CP)		
	CP1	CP2	CP3
Croma	0.269674	-0.258754	-0.040117
Hue	0.039601	-0.459932	0.248486
F/G	0.293418	0.226395	0.104380
F/A	0.302063	-0.066666	0.157991
F/L	0.312063	0.203656	0.041058
<i>A_w</i>	0.292495	0.256256	-0.230408
Anc	0.234076	0.37511	-0.152154
Long	0.178285	0.031359	0.561342
Gros	0.284798	0.086382	0.050913
%H	0.267511	0.252743	-0.123227
pH	0.170204	0.135671	0.549427
Gluc	-0.275038	0.304135	0.183088
Fruc	-0.281305	0.205098	0.330099
Sac	-0.240872	0.322943	-0.127483
AT	-0.290549	0.297277	0.17139
Valor propio	7.5363	3.0693	1.6330
Proporción variación total	0.5024	0.2046	0.1089
Variación acumulada	0.5024	0.7070	0.8159

Los valores marcados en negritas indican las variables que representan mayor influencia en cada componente principal

Con base en la distribución espacial de los tres primeros componentes principales se observó la formación de cuatro grupos (Figura 2), de acuerdo con el CP1 se determinó que los sitios con vainas más firmes respecto a sus dimensiones (F/G, F/A y F/L), actividad de agua (Aw) y azúcares solubles totales (AT) se distribuyen en los grupos GII y GIII ubicados en la parte superior del eje, mientras que los sitios con menor valor en estas variables se localizaron en la parte inferior (GI y GIV).

El CP2 incluyó la variable de color Hue, ancho de vaina (Anc) y concentración de sacarosa (Sac), de esta manera los sitios con valores más altos en estas variables se localizan en el grupo GI ubicado en la región positiva del eje. Respecto al CP3, se consideró que la longitud de las vainas (Long) y el pH fueron las variables más representativas en este componente, por lo cual los grupos GII y GIV localizados en la región positiva del eje presentaron los valores más altos en dichas variables (Figura 2).

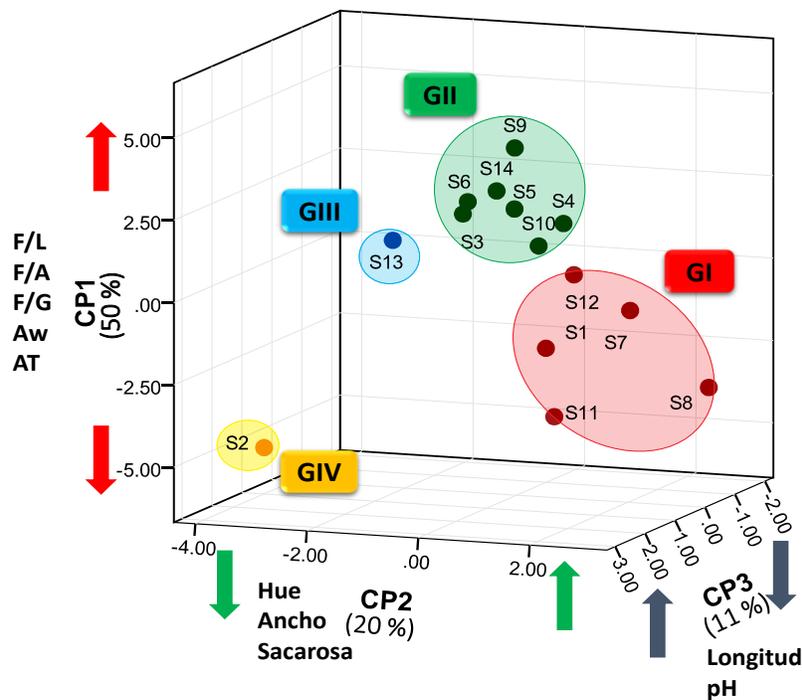


Figura 2. Dispersión de 14 sitios de colecta de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews de la Huasteca hidalguense, México con base en los tres primeros componentes principales del análisis de 15 variables fisicoquímicas agrupadas por medias poblacionales.

2.3.3 Agrupación de la variación de variables fisicoquímicas

El análisis de conglomerados mantuvo la misma agrupación que el análisis de componentes principales, realizando el corte a una distancia de 0.85 se observó la formación de cuatro grupos (Figura 3).

Grupo GI: Formado por los sitios Itzocal (S1), Contepec (S7 y S8), Poxtla (S11 y S12), se caracterizó por tener concentraciones de glucosa entre 7.17 y 10%, fructosa entre 4.08 y 7.31%, sacarosa entre 4.10 y 6.19% así como azúcares solubles totales entre 15.82 y 22.91% así como los valores más bajos en Croma y Hue.

Grupo GII: El grupo más numeroso, integrado por los sitios Coacuilco (S4, S9 y S10), Tlanepantla (S14), Huizotlaco (S3), Ichcatepec (S6) y San Isidro (S5). Mostraron las vainas con mayor firmeza (F/G, F/A y F/L), longitud (Long), grosor (Gros) y ancho (Anc) así como concentración de glucosa entre 2.92 y 7.44%, fructosa entre 2.55 y 5.15%, sacarosa entre 2.59 y 4.07% y azúcares solubles totales entre 7.29 y 16.65%. Por otro lado, presentaron valores medios de actividad de agua (A_w) y porcentaje de humedad (%H) además de las vainas con valores más altos de pH.

Grupo GIII: Representado por Tezóhual (S13), contiene las vainas con el valor más alto de Hue, valores medios en Croma, las vainas de menor longitud y pH así como la menor concentración de fructosa y concentración media de sacarosa.

Grupo GIV: Conformado por Huizotlaco (S2) se caracterizó por tener las vainas con los índices más bajos de firmeza respecto a las dimensiones de las vainas, de menor tamaño, grosor, ancho, actividad de agua (A_w) y porcentaje de humedad (%H) así como valores medios de glucosa (Glu), fructosa (Fru) y azúcares solubles totales (AT).

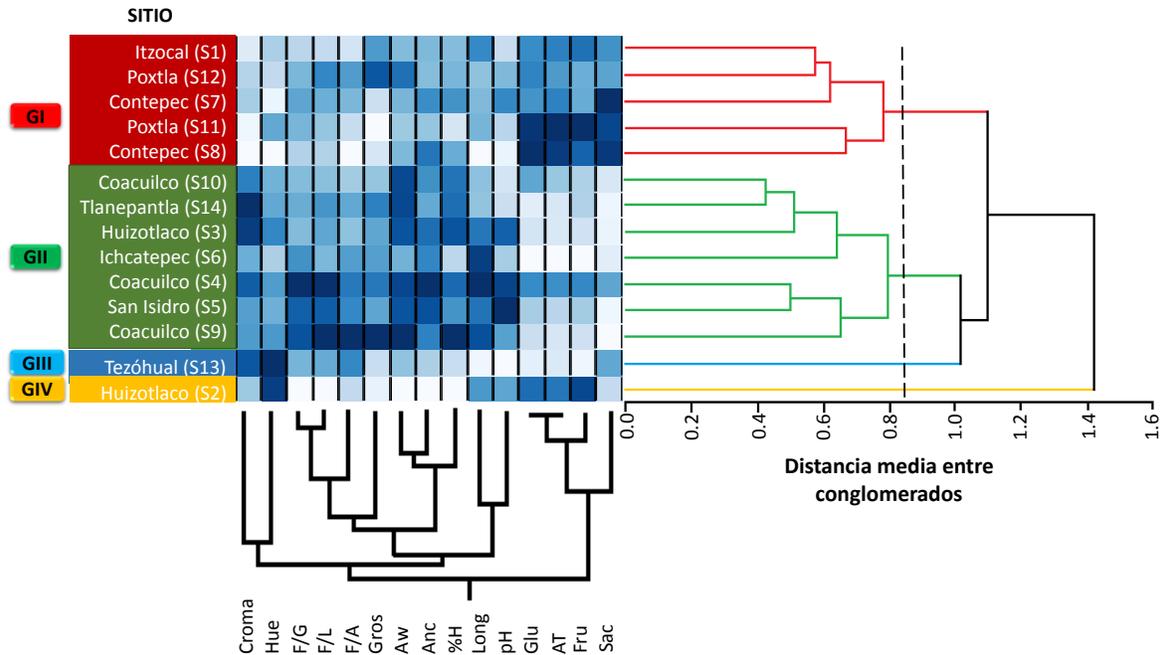


Figura 3. Dendrograma de 14 sitios de colecta de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews en la Huasteca hidalguense, México basado en el promedio de 15 variables fisicoquímicas y agrupado por similitud de distancias. La intensidad en el color indica valores más altos en cada variable.

2.3.4 Análisis estadístico de variables del aroma

El análisis estadístico realizado mostró diferencias significativas ($P < 0.0001$) en las diez variables aromáticas evaluadas en las vainas beneficiadas, presentaron coeficientes de variación entre 7 y 23%. La relación ácido *p*-hidroxibenzoico/vainillina (C1/C4) fue la variable que mostró el coeficiente de variación más alto (23.3%), mientras que el índice compuestos menores/vainillina ($\Sigma\text{CM}/\text{C4}$) tuvo el coeficiente de variación más bajo (7.5%) (Cuadro 7).

Cuadro 7. Medias y coeficientes de variación de las 10 variables aromáticas evaluadas en *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews en 14 sitios de colecta de la Huasteca hidalguense, México.

Variable	Media	Coeficiente de variación	Cuadrados medios	
			Sitio	Error
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico (C1) (ppm)	245	13.7225	54207***	1130
Ácido vanílico (C2) (ppm)	790	11.3994	131054***	8119
<i>p</i> -hidroxibenzaldehído (C3)(ppm)	575	13.1030	143696***	5685
Vainillina (C4) (ppm)	18008	10.5715	36428987***	3624028
ΣCM (C1+C2+C3) (ppm)	1611	7.5926	560730***	14957
ΣCM/C4	0.09	13.2238	0.0017***	0.00014
C1/C4	0.02	23.3126	0.0002***	0.00001
C2/C4	0.05	18.5382	0.0005***	0.00007
C3/C4	0.03	12.9977	0.0002***	0.00002
(C1+C2)/C4	0.06	17.6201	0.0011***	0.00011

*** $P < 0.0001$

Con base en los resultados de la prueba de medias (Tukey, $\alpha=0.05$) gran variación entre las variables aromáticas evaluadas. La concentración de ácido *p*-hidroxibenzoico formó siete grupos, destacando el primero grupo formado por San Isidro (S5) y Tezóhual (S13) por tener la concentración más alta en este compuesto, 506.14 y 462.30 ppm, respectivamente.

El ácido vanílico presentó amplia diversidad en su contenido puesto que se observó la formación de nueve grupos con concentraciones entre 471.19 y 1097.78 ppm (Cuadro 8). Por su parte, el contenido de *p*-hidroxibenzaldehído formó cinco grupos, de manera que el primer grupo conformado por San Isidro (S5), Coacuilco (S4, S9 y S10), Tlanepantla (S14), Ichcatepec (S6) Huizotlaco (S2 y S3) y Poxtla (S12) mostró la concentración más baja entre 410.28 y 535.96 ppm. Respecto al contenido de vainillina se observó un amplio rango de variación al formar 12 grupos con concentraciones que oscilaron entre 14740 y 22390 ppm.

Se observa que las vainas de las colectas de Huizotlaco (S3) y Coacuilco (S4 y S9) tuvieron contenido de humedad superior a 30%, no obstante, mostraron la menor

concentración de vainillina. Por otra parte, las colectas de Ichcatepec (S6) y Poxtla (S11) con un porcentaje de humedad de aproximadamente 20% mostraron concentraciones de vainillina ligeramente superiores a 2%.

De igual manera puede observarse que la colecta de Huizotlaco (S2) tiene el contenido de humedad más bajo (16.34%) así como una baja concentración de vainillina (aproximadamente 1.7%) que indican que las vainas en principio fueron de bajo calibre y al ser sometidas al beneficio y consecuente deshidratación se obtienen vainas de menor calidad física y aromática. Estas diferencias pueden indicar que aspectos como el manejo del cultivo así como la madurez a la cosecha pueden influenciar la calidad de las vainas.

Por otra parte, de acuerdo con lo reportado por Salazar-Rojas *et al.* (2011) la proporción en que se encuentran los compuestos menores del aroma (C1+C2+C3) en relación al contenido de vainillina (compuesto mayoritario, C4), con valor mayor o igual a 12% hace referencia a una característica propia de las poblaciones silvestres, por lo cual podría considerarse que las colectas de San Isidro (S5) y Tezóhual (S13) poseen características aromáticas de un ejemplar silvestre.

De igual manera las colectas con proporciones de compuestos menores entre 9 y 11% hacen referencia a una importante participación de compuestos menores. En comparación a la NOM-182-SCF-2011 las concentraciones de ácido *p*-hidroxibenzoico y ácido vanílico mostraron valores muy superiores a lo establecido, el *p*-hidroxibenzaldehído presentó valores más cercanos a lo indicado en la norma.

Asimismo el contenido de vainillina la norma establece un contenido mínimo de 20000 ppm (2%), no obstante, sólo las colectas de Tezóhual (S13), Contepec (S7 y S8), Ichcatepec (S6), Poxtla (S11) e Itzocal (S1) cumplieron esta especificación.

De acuerdo con Odoux (2011), un alto contenido de ácido *p*-hidroxibenzoico y ácido vanílico proporcionan a las vainas beneficiadas características sensoriales de aroma y sabor ahumado y notas fenólicas resultando en características indeseables; mientras que el alto contenido de *p*-hidroxibenzaldehído y vainillina aportan aroma y sabor avainillado, lo cual representa característica deseables en vainas beneficiadas de

calidad. De acuerdo con esto, las colectas de San Isidro (S5) y Tezóhual (S13) mostraron la mayor concentración de ácido *p*-hidroxibenzoico y ácido vanílico y por tanto son las colectas con aroma y sabor más ahumado, asimismo, las vainas colectadas en Ichcatepec (S6) y Contepec (S7) tuvieron la concentración más alta de *p*-hidroxibenzaldehído y vainillina con lo cual se considera que son las colectas de mejor calidad aromática (Cuadro 8).

Cuadro 8. Prueba de medias para las variables aromáticas evaluadas en *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews en 14 sitios de colecta de la Huasteca hidalguense, México.

VARIABLES					
Sitio	C1 (ppm)	C2 (ppm)	C3 (ppm)	C4 (ppm)	ΣCM/C4 (%)
S5	506.14 ^a	60.40 ^{bcde}	495.83 ^d	13600 ^g	14 ^a
S13	462.30 ^a	1097.78 ^a	877.56 ^{ab}	20349 ^{abcd}	12 ^{ab}
S8	352.14 ^b	966.91 ^{abc}	747.08 ^{bc}	20019 ^{abcde}	11 ^{bc}
S10	260.30 ^c	908.48 ^{abcd}	451.62 ^d	16057 ^{defg}	10 ^{bcd}
S4	252.72 ^{cd}	664.85 ^{ef}	496.67 ^d	15369 ^{efg}	9 ^{bcde}
S14	214.43 ^{cde}	696.83 ^{de}	477.42 ^d	16242 ^{cdefg}	9 ^{cde}
S6	193.23 ^{cde}	1067.33 ^{ab}	535.46 ^d	21686 ^{ab}	8 ^{cde}
S2	192.70 ^{cde}	648.33 ^{ef}	429.10 ^d	17011 ^{bcdefg}	8 ^{de}
S7	189.11 ^{cde}	649.91 ^{ef}	936.12 ^a	20841 ^{abc}	9 ^{cde}
S11	182.12 ^{cde}	760.21 ^{cde}	858.98 ^{ab}	22390 ^a	8 ^{cde}
S1	175.75 ^{de}	766.96 ^{cde}	567.75 ^{cd}	20848 ^{abc}	7 ^{de}
S3	148.30 ^e	471.19 ^f	410.28 ^d	15148 ^{fg}	7 ^e
S9	144.57 ^e	646.60 ^{ef}	440.78 ^d	14740 ^g	9 ^{cde}
S12	139.67 ^e	742.11 ^{de}	455.05 ^d	19758 ^{abcdef}	7 ^e
Rango	140-506	471-1098	410-936	13600-22390	7-14
NOM-182-SCFI-2011	58-100	219-498	411-861	20000 (mínimo)	

Letras diferentes por columna indican diferencias estadísticas, Tukey ($\alpha=0.05$). S5: San Isidro, S13: Tezóhual, S7 y S8: Contepec, S4, S9 y S10: Coacuilco, S14: Tlanepantla, S6: Ichcatepec, S2 y S3: Huizotlaco, S11 y S12: Poxtla, S1: Itzocal. C1: ácido *p*-hidroxibenzoico, C2: ácido vanílico, C3: *p*-hidroxibenzaldehído, C4: vainillina; C1+ C2/C4: ácido *p*-hidroxibenzoico + ácido vanílico /vainillina. ΣCM: Sumatoria de compuestos menores. Letras diferentes por columna indican diferencia estadística, Tukey ($\alpha=0.05$).

2.3.5 Distribución de la variación de variables aromáticas

Con base en el análisis de componentes principales se determinó que con los tres primeros componentes principales se explica aproximadamente 98% de la variación total en las variables evaluadas. El primer componente principal (CP1) aportó 58% tomando como principales variables la concentración de ácido *p*-hidroxibenzoico (C1), la proporción de los ácidos *p*-hidroxibenzoico y vanílico respecto a la vainillina ((C1+C2)/C4) y la proporción ácido *p*-hidroxibenzoico/vainillina (C1/C4).

El segundo componente principal (CP2) explicó 27% de la variación total siendo definido principalmente por la concentración de *p*-hidroxibenzaldehído (C3) y vainillina (C4), el tercer componente principal (CP3) contribuyó con 12% de la explicación tomando como variables la concentración de ácido vanílico (C2) y proporción *p*-hidroxibenzaldehído/vainillina (C3/C4) (Cuadro 9).

Cuadro 9. Valores propios, proporción de la variación total y variación acumulada de las variables aromáticas en las tres dimensiones de la caracterización de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews de la Huasteca hidalguense, México.

VARIABLE	COMPONENTES PRINCIPALES (CP)		
	CP1	CP2	CP3
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico (C1)	0.399503	-0.057372	-0.121787
Ácido vanílico (C2)	0.308650	0.147256	0.555042
<i>p</i> -hidroxibenzaldehído (C3)	0.147630	0.547208	-0.198341
Vainillina (C4)	-0.19830	0.537575	0.372925
ΣCM (C1+C2+C3+C4)	0.344121	0.324212	0.127125
ΣCM/C4	0.400065	-0.077518	-0.189898
C1/C4	0.362810	-0.224153	-0.182913
C2/C4	0.342462	-0.234126	0.333350
C3/C4	0.225445	0.340918	-0.546484
(C1+C2)/C4	0.380443	-0.232793	0.056901
Valor propio	5.814808	2.741666	1.237163
Proporción variación total	0.5815	0.2742	0.1237
Variación acumulada	0.5815	0.8556	0.9794

Los valores marcados en negritas indican las variables que presentan mayor influencia en cada componente principal

La distribución espacial de las colectas evaluadas definida por los tres primeros componentes principales determinaron que los sitios con mayor proporción de compuestos menores respecto a la vainillina ($\Sigma CM/C4$), concentración de ácido *p*-hidroxibenzoico (C1) y de los ácidos *p*-hidroxibenzoico y vanílico respecto a la vainillina ((C1+C2)/C4) así como la proporción ácido *p*-hidroxibenzoico/vainillina (C1/C4) se localizan en los grupos GIII y GIV ubicándose en la parte superior del gráfico (Figura 4).

El CP2 distribuyó los sitios con mayor contenido de *p*-hidroxibenzaldehído (C3) y vainillina (C4) en la región positiva del eje (GII y GIII), mientras que el CP3 ubicó los sitios con mayor contenido de ácido vanílico (C2) y proporción *p*-hidroxibenzaldehído/vainillina (C3/C4) en la parte positiva del eje (GIII) (Figura 4).

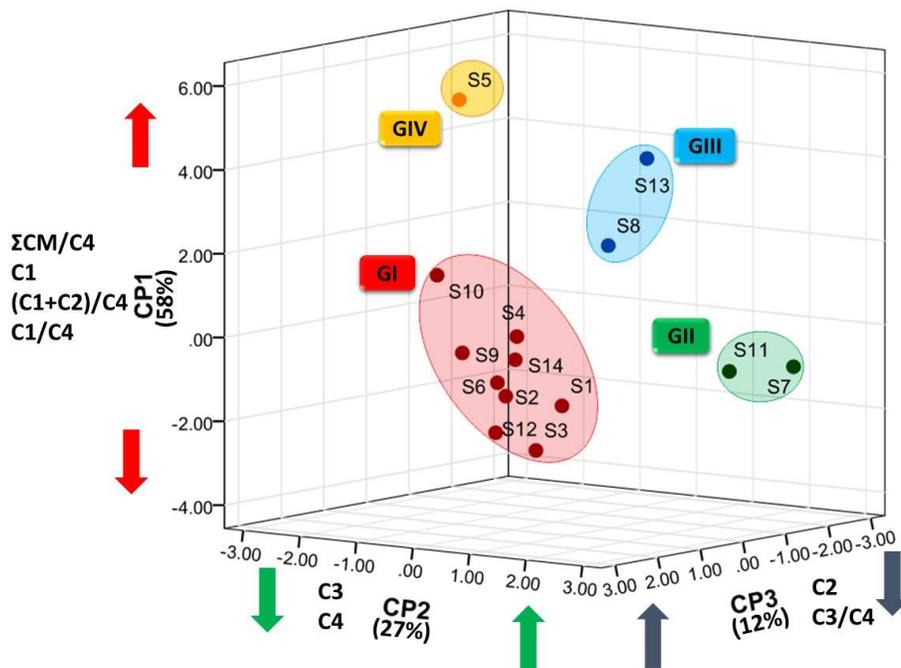


Figura 4. Dispersión de 14 sitios de colecta de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews de la Huasteca hidalguense, México basada en los tres primeros componentes principales del análisis de 10 variables aromáticas agrupadas por medias poblacionales.

2.3.6 Agrupación de la variación de variables aromáticas

Mediante el análisis de conglomerados se determinó que el dendrograma obtenido mantuvo la misma agrupación que en el análisis de componentes principales. Al realizar el corte a una distancia de 0.85 se observó la formación de cuatro grupos (Figura 5).

Grupo I (GI): El conjunto más numeroso estuvo formado por Itzocal (S1), Poxtla (S12), Tlanepantla (S14), Coacuilco (S4, S9 y S10), Huizotlaco (S2 y S3) e Ichcatepec (S6) y se caracterizó principalmente por mostrar la menor concentración de ácido *p*-hidroxibenzoico (C1), ácido vanílico (C2) y proporciones de compuestos menores respecto a la vainillina ($\Sigma\text{CM}/\text{C4}$, $\text{C1}/\text{C4}$, $(\text{C1}+\text{C2})/\text{C4}$ y $\text{C3}/\text{C4}$).

Grupo II (GII): Integrado por Poxtla (S11) y Contepec (S7), presentó la mayor proporción de ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido vanílico y *p*-hidroxibenzaldehído respecto a la vainillina.

Grupo III (GIII): Lo conforman las colectas de Tezóhual (S13) y Contepec (S8), se caracterizó principalmente por tener la proporción más alta en la proporción de compuestos menores y la suma de ácido *p*-hidroxibenzoico y ácido vanílico respecto a la vainillina ($\Sigma\text{CM}/\text{C4}$, $(\text{C1}+\text{C2})/\text{C4}$), así como concentraciones medias de compuestos menores y vainillina.

Grupo IV (GIV): Conformado por San Isidro (S5), se caracterizó por tener las vainas con la mayor concentración de compuestos menores (C1, $\Sigma\text{CM}/\text{C4}$, $\text{C1}/\text{C4}$, $\text{C2}/\text{C4}$, $(\text{C1}+\text{C2})/\text{C4}$) así como la menor concentración de vainillina.

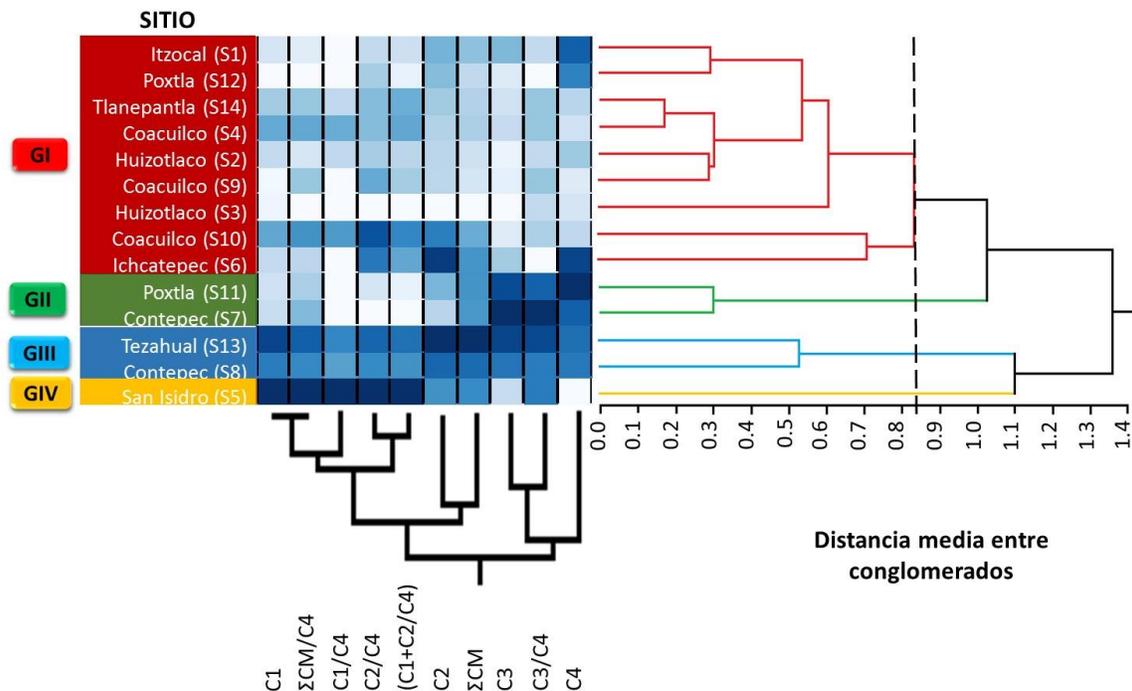


Figura 5. Dendrograma de 14 sitios de colecta de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews en la Huasteca hidalguense, México basado en el promedio de 10 variables aromáticas y agrupado por similitud de distancias. La intensidad en el color indica valores más altos en cada variable.

2.3.7 Distribución de la variación en variables fisicoquímicas y aromáticas

En el análisis de componentes principales de las variables fisicoquímicas y aromáticas en conjunto, los tres primeros componentes principales proporcionaron aproximadamente 73% de la variación total (Cuadro 10). De esta manera el primer componente principal (CP1) explicó 37% de la variación total tomando como principales variables la concentración de vainillina, Croma, la relación firmeza/ancho y firmeza/longitud, así como la concentración de sacarosa y azúcares solubles totales.

El segundo componente principal (CP2) explicó cerca del 23% considerando como variables la concentración de ácido *p*-hidroxibenzoico y la proporción de compuestos menores respecto a la vainillina ($\Sigma\text{CM}/\text{C4}$, $\text{C1}/\text{C4}$ y $(\text{C1}+\text{C2})/\text{C4}$); el tercer componente principal (CP3) explicó cerca del 14% y consideró Hue y el ancho de las vainas como variables para distribuir las colectas evaluadas (Cuadro 10).

Cuadro 10. Valores propios, proporción de la variación de la variación total y variación acumulada de las variables fisicoquímicas y aromáticas en las tres dimensiones de la caracterización de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews de la Huasteca hidalguense, México.

Variable	COMPONENTES PRINCIPALES (CP)		
	CP1	CP2	CP3
C1	0.067188	0.395216	-0.026713
C2	-0.036480	0.324169	-0.054587
C3	-0.184453	0.206172	0.227662
C4	-0.254912	0.039260	0.098827
Σ CM	-0.249177	0.081618	0.101893
Σ CM/C4	0.103055	0.389607	0.025236
C1/C4	0.138216	0.334410	-0.030389
C2/C4	0.143918	0.327858	-0.106204
C3/C4	-0.065605	0.268386	0.255734
(C1+C2)/C4	0.148403	0.348047	-0.075521
Croma	0.253636	-0.007612	-0.161349
Hue	0.071004	0.030070	-0.401086
F/G	0.242410	0.032699	0.291207
F/A	0.258481	-0.018942	0.030604
F/L	0.260406	-0.002126	0.271056
Aw	0.240993	-0.022914	0.290867
Anc	0.189059	0.022671	0.387672
Long	0.151292	-0.241838	-0.003575
Gros	0.235877	-0.182941	0.088082
%H	0.230869	-0.099068	0.262022
pH	0.170559	-0.095077	0.107184
Gluc	-0.234134	-0.016234	0.170022
Fruc	-0.235089	-0.062371	0.072114
Sac	-0.250020	0.072091	0.320203
AT	-0.257306	-0.011613	0.186615
Valor propio	9.2227	5.6431	3.4241
Proporción variación total	0.3689	0.2257	0.1370
Variación acumulada	0.3689	0.5946	0.7316

Los valores marcados en negritas indican las variables que presentan mayor influencia en cada componente principal

Con base en la distribución de los tres primeros componentes principales se observó la formación de cinco grupos (Figura 6), de acuerdo con el CP1 se determinó que los sitios con mayor concentración de vainillina, valor de Croma, firmeza respecto al ancho y longitud de las vainas así como mayor contenido de sacarosa y azúcares solubles totales se distribuyen en la parte superior del eje (GII y GIII). El CP2 mostró los sitios con mayor concentración de ácido *p*-hidroxibenzoico y proporción de compuestos menores se localizan en la región positiva del eje (GIII y GIV). Por otra parte, en la parte positiva del CP3 se localizaron los sitios con los valores más altos en Hue y vainas más anchas (GI y GIII).

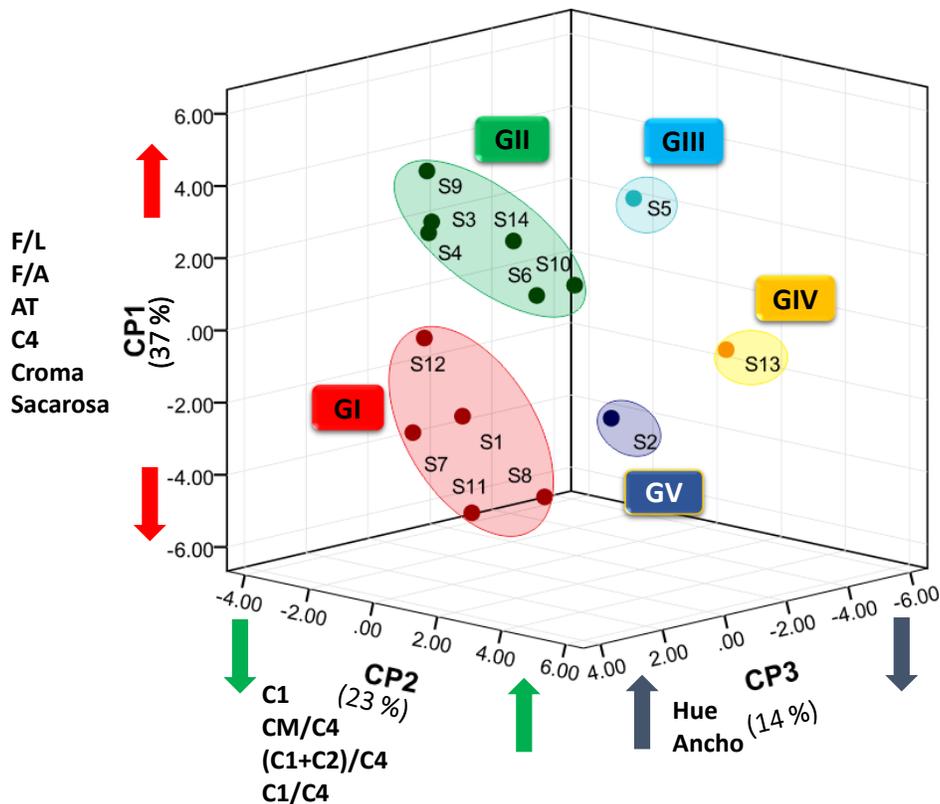


Figura 6. Dispersión de 14 sitios de colecta de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews de la Huasteca hidalguense, México basada en los tres primeros componentes principales de análisis de 14 variables fisicoquímicas y 10 variables aromáticas agrupadas por medias poblacionales.

2.3.8 Agrupación de la variación en variables fisicoquímicas y aromáticas

A través del análisis de conglomerados realizando un corte a una distancia de 0.85 se observó la formación de cinco grupos (Figura 7), los cuales muestran la misma tendencia de agrupación que el análisis de componentes principales.

Grupo I (GI): Conformado por las colectas de Itzocal (S1), Poxtla (S11 y 12) y Contepec (S8), se caracterizó por tener las concentraciones más altas de vainillina, glucosa, fructosa, sacarosa, azúcares solubles totales, vainillina, compuestos menores y la proporción de *p*-hidroxibenzaldehído, no obstante, mostró los valores más bajos en la concentración de ácido *p*-hidroxibenzoico y la proporción de compuestos menores.

Grupo II (GII): Lo integran las colectas de Coacuico (S10), Tlanepantla (S14), Huizotlaco (S3), Coacuico (S4 y S9) e Ichcatepec (S6). Se caracterizó por tener los valores más altos en la variable Croma, las colectas con vainas más largas, gruesas y anchas, así como vainas con mayor actividad de agua (*A_w*), porcentaje de humedad y firmeza.

Grupo III (GIII): Integrado por Huizotlaco (S2), mostró los valores más altos en la variable Hue así como las colectas con vainas menos gruesas y anchas, con menor actividad de agua (*A_w*) y porcentaje de humedad así como las relaciones de firmeza más bajas.

Grupo IV (GIV): Formado por Tezóhual (S13) presentó los valores más altos en la variable Hue y la concentración de ácido vanílico, de igual manera se observaron valores medios en la proporción de compuestos menores y las vainas con menor valor de Hue, menor longitud y pH.

Grupo V (GV): Lo integra la colecta de San Isidro (S5) mostrando los valores más altos en las proporciones de compuestos menores y pH, también se observaron las concentraciones más bajas de sacarosa, vainillina y compuestos menores.

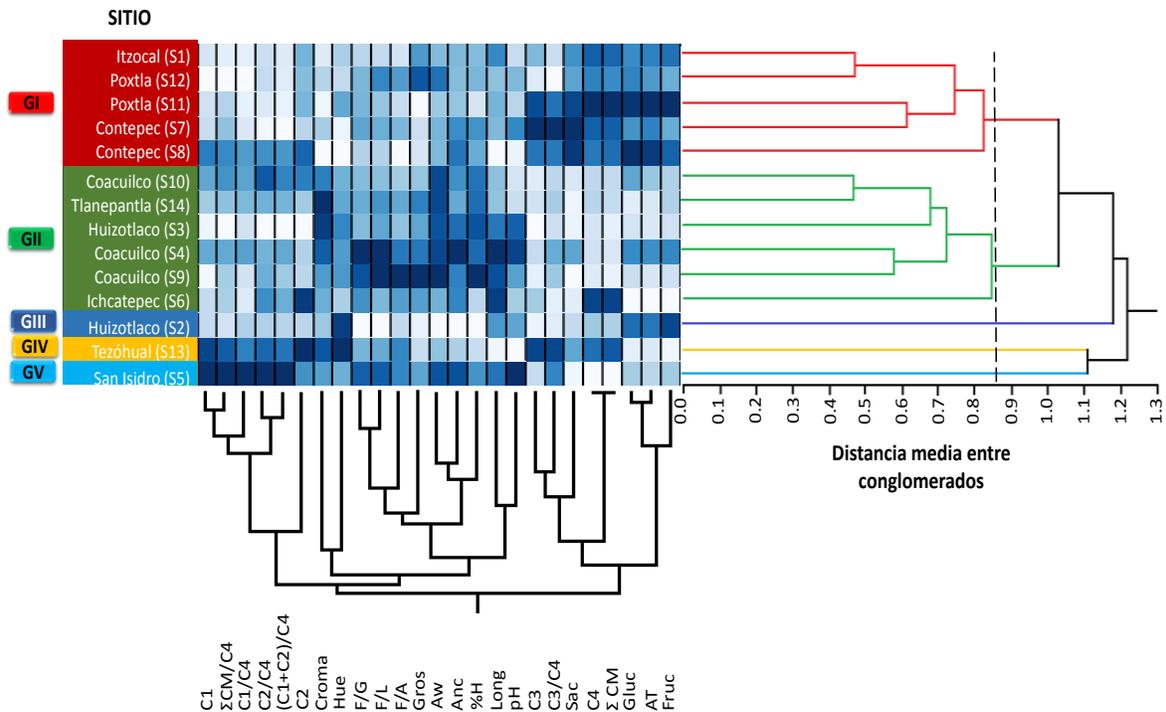


Figura 7. Dendrograma de 14 sitios de colecta de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews en la Huasteca hidalguense, México basado en el promedio de 15 variables fisicoquímicas y 10 variables aromáticas agrupadas por similitud de distancias. La intensidad en el color indica valores más altos en cada variable.

2.3.9 Análisis de correlación de Pearson en variables fisicoquímicas y aromáticas

Se realizó un análisis de correlación de Pearson entre el grupo de variables fisicoquímicas y aromáticas para determinar la correlación que existe entre ellas a fin de demostrar qué tan importante es juntar y analizar los dos grupos de variables, por lo que sólo se mostrarán aquellas correlaciones con los valores más altos y de mayor significancia.

De acuerdo con los resultados obtenidos las variables con mayor significancia se dividieron en dos grupos, el primero incluyó las correlaciones entre las variables aromáticas y químicas (Aw, Humedad, pH y sacarosa) y el segundo grupo considera las correlaciones entre variables aromáticas y físicas (firmeza, longitud y grosor) (Ver Anexo F).

La correlación entre variables químicas como la actividad de agua, porcentaje de humedad y pH con las variables aromáticas mostraron valores negativos, sólo se presentaron correlaciones positivas entre la concentración de sacarosa y *p*-hidroxibenzaldehído ($r=0.6685$, $p<.0001$), vainillina ($r=0.4545$, $p=0.0003$), suma de compuestos menores ($r=0.4728$, $p=0.0001$) y la relación *p*-hidroxibenzaldehído/vainillina ($r=0.5631$, $p<.0001$), es decir, que al incrementar la concentración de sacarosa también aumenta la concentración de los compuestos ya mencionados (Ver Anexo F).

Por otra parte se determinó que la asociación entre variables físicas y aromáticas mostró valores negativos, lo cual indica una correlación inversa. La asociación de longitud de las vainas con las variables aromáticas que mostraron mayor significancia fueron principalmente C1 ($r= -0.3867$, $p= 0.0023$), C2 ($r= -0.4169$, $p= 0.009$), C3 ($r= -0.4816$, $p= <.0001$), C3/C4 ($r= -0.4224$, $p= 0.0008$) indicando que al incrementar la longitud de las vainas se reduce la concentración de estos compuestos. Asimismo, la asociación entre Cromo y la concentración de vainillina ($r= -0.4550$, $p= 0.0002$) y la suma de compuestos menores ($r= -0.4507$, $p= 0.0003$) también mostraron valores negativos expresando que las vainas menos brillantes contienen menor concentración de vainillina ($r= -0.4550$, $p= 0.0002$) y compuestos menores ($r= -0.4507$, $p= 0.0003$) (Ver Anexo F).

Respecto al índice firmeza/ancho y firmeza/longitud se determinó mayor asociación con la concentración de vainillina y compuestos menores al mostrar índices de correlación (r) entre -0.3326 y -0.3447 y significancia (p) con valores entre 0.0070 y 0.0094 . Sin embargo, puesto que la correlación presenta valores negativos, indica que al incrementar los índices de firmeza respecto al ancho y la longitud disminuye la concentración de vainillina y la suma de compuestos menores. Asimismo, la variable de grosor mostró asociación inversa principalmente con C3 ($r= -0.4439$, $p= 0.0004$) y la relación C3/C4 ($r= -0.3659$, $p= 0.0040$) (Ver Anexo F).

Con base en el valor crítico obtenido en tablas y los coeficientes de correlación obtenidos entre las variables químicas y aromáticas (Ver Anexo F) se determina que las correlaciones obtenidas por A_w , humedad y pH con vainillina y suma de

compuestos menores no superaron el valor crítico, por lo cual no se rechaza H_0 , es decir, se acepta la suposición de que no existe una asociación estadísticamente significativa entre las variables evaluadas.

En el caso de la sacarosa y compuestos aromáticos se determina que las correlaciones establecidas entre sacarosa y *p*-hidroxibenzaldehído ($r= 0.6685$) y el índice *p*-hidroxibenzaldehído/vainillina ($r= 0.5631$) superan el valor estimado en tablas (0.532), por lo cual puede concluirse que existe una asociación estadísticamente significativa entre las variables (Ver Anexo F), mientras que con la vainillina y la suma de compuestos menores no existe asociación. Por otra parte, las correlaciones establecidas entre las variables físicas (croma, firmeza/ancho, firmeza/longitud, longitud y grosor) y aromáticas (C1, C2, C3, C4, C3/C4 y Σ CM) fueron negativas y menores al valor crítico de tablas por lo cual se considera que no existe asociación entre estas variables.

2.4 Conclusiones

El perfil aromático de los frutos beneficiados de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews, mostró variación con cuatro grupos químicos del aroma de acuerdo con los análisis realizados, lo que sugiere que puede existir polimorfismo genético en la región de la Huasteca hidalguense. Las características fisicoquímicas evaluadas en los frutos beneficiados de vainilla determinó la existencia de cuatro grupos con características específicas, el grupo I contiene las vainas más dulces, el grupo II las más firmes, el grupo III las más oscuras y el grupo IV las de menor tamaño y firmeza.

Respecto a las características ambientales, los sitios ubicados a una latitud superior a 21.1 y longitud entre 98.48 y 98.52, así como las cultivadas en clima semicálido-templado húmedo en Huejutla de Reyes mostraron colectas con una concentración de vainillina superior a 20000 ppm (S13, S8, S6, S7, S11 y S1). Por otro lado, la mayoría de colectas con menor proporción de compuestos menores en su perfil aromático (S1 y S3) se cultivaron en Atlapexco bajo un clima cálido-húmedo. Las colectas que proporcionaron las vainas más largas y anchas fueron cultivadas en un clima cálido húmedo (Coacuilco, S4), lo cual indica que el ambiente es un factor que genera

variación, aunque es importante considerar en futuros trabajos, factores como el manejo del cultivo, irrigación, edad de la planta, entre otros aspectos que complementen la investigación.

Con base en las características de las vainas beneficiadas establecidas por la NOM-182-SCFI-2011 las colectas evaluadas presentaron vainas con longitud mayor a los 15 cm, con excepción de Tezóhual (S13) y Contepec (S8). Referente al porcentaje de humedad, sólo las colectas de Ichcatepec (S6), Poxtla (S11), Tezóhual (S13) y Huizotlaco (S2) mostraron valores inferiores a 25% de humedad. Para el contenido de vainillina indicado en la norma, las colectas de Tezóhual (13), Contepec (S7 y S8), Ichcatepec (6), Poxtla (11) e Itzocal (1) presentaron concentraciones superiores a 20000 ppm.

2.5 Literatura citada

- Bory, S., Grisoni, M., Duval, M.F., y Besse, P. (2008). Biodiversity and preservation of vanilla: present state of knowledge. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55(4), 551-571.
- Brodelius, P.E. (1994). Phenylpropanoid metabolism in *Vanilla planifolia* Andr. (V) High performance liquid chromatographic analysis of phenolic glycosides and aglycons in developing fruits. *Phytochemical Analysis*, 5, 27–31.
- Cicchetti, E., y 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.
- CONABIO. (2012). Portal de Geoinformación. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/informacion/gis/> Fecha de consulta: Agosto 2015.
- De Guzmán, C.C. (2006). Vanilla. En K.V. Peter, *Handbook of Herbs and Spices* (pp 335-362). University of the Philippines Los Baños, Philippines.
- De la Cruz-Medina, J., Rodríguez-Jiménez, G.C., y García, H.S. (2009). Vanilla Post-harvest Operations. INPhO-Post-harvest Compendium. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. 51 p.

- Exley, R. (2011). Vanilla production in Australia. En D. Havkin-Frenkel y F. Belanger. *Handbook of Vanilla Science and Technology* (pp 69-78). United Kingdom, Blackwell Publishing.
- Frenkel, C., Ranadive, A.S., Tochiuitl-Vázquez, J., y Havkin-Frenkel, D. (2011). Curing of Vanilla. En D. Havkin-Frenkel y F. Belanger. *Handbook of Vanilla Science and Technology* (pp 79-102). United Kingdom, Blackwell Publishing.
- Gassenmeier, K., Riesen, B., y Magyar, B. (2008). Comercial quality and analytical parameters of cured vanilla beans (*Vanilla planifolia*) from different origins from the 2006-2007 crop. *Flavour and Fragrance Journal*, 23, 194-201.
- Hernández-Hernández, J. (2011). Programa Estratégico para el Desarrollo Rural Sustentable de la Región Sur-Sureste de México: Trópico Húmedo 2011. Paquete tecnológico Vainilla (*Vanilla planifolia* Jackson). Establecimiento y mantenimiento. SAGARPA.
- Hernández-Salinas, U., y Ramírez-Bautista, A. (2013). Distribución de la herpetofauna en cuatro tipos de vegetación del estado de Hidalgo, México. En Pulido-Flores G, Monks S. *Estudios científicos en el estado de Hidalgo y zonas aledañas. Vol. II*. Lincoln, NE:Zea Books. 144 p.
- Hoffman, P.G., y Zapf, C.M. (2011). Flavor, quality, and authentication. En D. Havkin-Frenkel y F. Belanger. *Handbook of Vanilla Science and Technology* (pp 162-179). United Kingdom, Blackwell Publishing.
- INEGI. Total estatal, Hidalgo. (s.f.). Recuperado el 20 de Agosto de 2015, de <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/default.aspx?e=13>
- Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA). (2007). El agua en la huasteca hidalguense. Problemática y perspectivas para su manejo sustentable. *Gaceta del IMTA*, SAGARPA, 8, 1-7.
- Jones, M.A., y Vicente, G.C. (1949). Quality of cured vanilla in relation to some natural factors. *Journal of Agricultural Research*, 78(11), 445-450.
- Lubinsky, P., Bory, S., Hernández-Hernández, J., Seung-Chul, K., y Gómez-Pompa, A. (2008). Origins and dispersal of cultivated Vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. (Orchidaceae)). *Economic Botany*, 62(2), 127-138.
- Maceda-Rodríguez, A. (2015). Distribución potencial, caracterización morfológica y conocimiento tradicional de *Vanilla planifolia* J. en la región de la Huasteca hidalguense, México. (Tesis de maestría). Colegio de Postgraduados, Puebla, México, 48 pp.

- 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, 18 de Agosto de 2011.
- Odoux, E. (2011). Developing the aromatic quality of cured vanilla beans (*Vanilla planifolia* G. Jackson). En E. Odoux y M. Grisoni, Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles. Vanilla. (pp 189-204). CRC Press, Taylor & Francis Group. United States of America.
- Palama, T.L., Fock, I., Choi, Y. H., Verpoorte, R., y Kodja, H. (2010). Biological variation of *Vanilla planifolia* leaf metabolome. *Phytochemistry*. 71(5-6), 567-573.
- Parthasarathy, V.A., Chenpakam, B., y Zachariah, T.J. (2008). Vanilla. En A. Azeez, *Chemistry of Spices* (pp 287-311). Indian Institute of Spices Research, Kelara, India.
- Ranadive, A.S. (1992) Vanillin and related flavor compounds in Vanilla extracts made from beans of various origins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 40, 1922–1924.
- Ranadive, A.S. (2011). Authentication and Flavor Analysis. Quality Control of Vanilla Beans and Extract. En D. Havkin-Frenkel y F. Belanger. *Handbook of Vanilla Science and Technology* (pp 141-159). United Kingdom, Blackwell Publishing.
- Rivera-Espinoza, Y., y Muriel, P. (2013). Vanilla. *Global advances Research Journal of Microbiology*, 2(11), 203-210.
- Salazar-Rojas, V.M., Herrera-Cabrera, B.E., Delgado-Alvarado, A., Soto-Hernández, M., Castillo-González, F., y Cobos-Peralta, M. (2011). Chemotypical variation in *Vanilla planifolia* Jack. (Orchidaceae) from the Puebla-Veracruz Totonacapan region. *Genetic Resource and Crop Evolution*, 59(5), 875:887.
- SAS. (2002). SAS/STAT. User guide, version 9.0. SAS Institute Inc, North Carolina.
- Scholes, J.D., Lee, P.J., Horton, P., y Lewis, D.H. (1994). Invertase: understanding changes in the photosynthetic and carbohydrate metabolism of varley leaves infected with podery mildew. *New Phytologist*, 126, 213-222.
- Van Dyk, S., McGlasson, W.B, Williams, M., y Gair, C. (2010). Influence of curing procedures on sensory quality of vanilla beans. *Fruits*, 65(6), 387-399.
- Van Dyk, S., Holdorf, P., Subedi, P., Walsh, K., Williams, M., y McGlasson, W.B. (2014). Determining the harvest maturity of vanilla beans. *Scientia Horticulturae*, 168(26), 249-257.

- Villavicencio-Nieto, M.A., y Pérez-Escandón, B.E. (2005). Vegetación e inventario de la flora útil de la Huasteca y la zona Otomí-Tepehua de Hidalgo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Centro de Investigaciones Biológicas. 1-15.
- Zamora-Flores, A.L., Arévalo-Galarza, L., García-Osorio, C., Ramírez-Guzmán, M.R., Valle-Guadarrama, S. (2016). Calidad de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) empacada bajo diferentes películas plásticas. *Agroproductividad*, 9(9), 18-25.
- Xochipa-Morante, R.C., Delgado-Alvarado, A., Herrera-Cabrera, B.E., Escobedo-Garrido, J.S. y Arévalo-Galarza, M.L. (2016). Influencia del proceso de beneficiado tradicional mexicano en los compuestos del aroma de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews. *Agroproductividad*, 9(1): 55-62.

CAPÍTULO III. EVALUACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS EN ESTRUCTURAS VEGETALES DE *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews DE LA HUASTECA HIDALGUENSE, MÉXICO

Resumen

Los fitoquímicos o metabolitos secundarios son compuestos bioactivos de bajo peso molecular que pueden estar distribuidos de manera específica en etapas de desarrollo, tejidos, órganos o especies de plantas; estos fitoquímicos pueden tener funciones de protección contra plagas, bacterias, estrés ambiental o radiación UV, entre otros. En *Vanilla planifolia*, se ha identificado que algunas estructuras de la planta de vainillina como hojas, tallos y vainas presenta un amplio espectro de inhibición microbiana, no obstante aún es poco conocida la composición fitoquímica de esta especie. Por ello, se realizó un tamiz fitoquímico en hojas, tallos, flores y vainas beneficiadas de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews (Huizotlaco, Coacuilco y Contepec) mediante pruebas por agentes cromógenos y cromatografía en capa fina (CCF) en extractos de diferente polaridad, así mismo, se cuantificaron los principales grupos de fitoquímicos (compuestos fenólicos totales, taninos totales, taninos condensados y flavonoides). Los resultados indicaron que Coacuilco fue la colecta con mayor contenido de fitoquímicos especialmente en hojas, tallos y vainas beneficiadas. En las pruebas de CCF Coacuilco mostró mayor contenido de terpenos, saponinas y flavonoides, en la cuantificación se observó que los compuestos fenólicos totales mostraron un rango de concentración de 2-2.61 mg g⁻¹, taninos totales 0.38-0.51 mg g⁻¹, taninos condensados 1.67-2.30 mg g⁻¹ y flavonoides 0.71-0.97 mg g⁻¹. También se determinó que Coacuilco fue la colecta con mayor concentración de metabolitos secundarios, mientras que hoja, tallo y flor mostraron concentraciones semejantes de fenoles totales y taninos totales, destacando la vaina beneficiada al tener la mayor concentración de estos fitoquímicos.

Palabras clave: *Vanilla planifolia*, metabolitos secundarios, tejidos vegetales, tamiz fitoquímico.

3.1 Introducción

El conjunto de reacciones químicas en un organismo para sintetizar (anabolismo) o degradar (catabolismo) compuestos se denomina metabolismo. En organismos como las plantas la mayor parte del carbono, nitrógeno y energía son utilizados para sintetizar las moléculas necesarias para su funcionamiento, este primer grupo que incluye aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos se les denomina metabolitos primarios (Ávalos-García y Pérez-Urria 2009).

No obstante, existe un segundo grupo de compuestos no-nutritivos y bioactivos de bajo peso molecular denominados metabolitos secundarios o fitoquímicos (por ser metabolitos exclusivos de las plantas) que pueden estar presentes en etapas específicas del desarrollo de la planta así como en órganos o tejidos específicos (Shanmugavalli *et al.* 2009).

Los fitoquímicos parecen no tener una función directa en procesos primarios o básicos del metabolismo como la fotosíntesis, respiración o asimilación de nutrientes y tampoco forman parte de él, pero se biosintetizan a partir de moléculas intermediarias y pueden desempeñar importantes funciones ecológicas como defensa contra herbívoros, virus, hongos, bacterias, sustancias alelopáticas, fitoalexinas, adaptación de la planta al ambiente, cambios en la nutrición, temperatura o pH y simbiosis, entre otros (Fox y Howlett 2008; Ávalos-García y Pérez-Urria 2009; Wink y Schimmer 2010; Mazid *et al.* 2011; Pagare *et al.* 2015).

Otras de las funciones de los fitoquímicos son proteger a la planta de posibles riesgos en el ambiente como el estrés biótico y abiótico, competencia por el suelo, nutrientes y luz solar con otras especies (Bourgaud *et al.* 2001; Mazid *et al.* 2011; Saxena *et al.* 2013; Kabera *et al.* 2014b), asimismo son un factor de comunicación entre plantas y otros organismos además de atraer polinizadores y dispersores de semillas (Schäfer y Wink 2009; Pagare *et al.* 2015).

De igual manera aportan características sensoriales como el sabor, color, olor y consistencia en plantas comestibles y ornamentales, lo cual en conjunto les permite tener un amplio uso en la elaboración de fármacos, agroquímicos, narcóticos,

antibióticos, saborizantes etc. por lo cual se les atribuye importancia económica (De la Cruz-Chacón y González-Esquinca 2009; Pérez-Alonso y Jiménez 2011; Saxera *et al.* 2013; Pagare *et al.* 2015).

Los precursores de la síntesis de los metabolitos secundarios se derivan de las rutas metabólicas primarias como la glucólisis, el ciclo de Krebs o la vía del Shikimato (Shanmugavalli *et al.* 2009), no obstante, también pueden sintetizarse en los órganos y tejidos de la planta y posteriormente transportarse mediante el xilema o el floema a diferentes tejidos para ser almacenados en estructuras reproductivas como flores, frutos y semillas; así como en raíces, hojas y tallos (Sepúlveda-Jiménez *et al.* 2003; Wink 2010; Wink y Schimmer 2010).

Su síntesis está estrechamente ligada a la etapa de desarrollo de la planta y condiciones de crecimiento, es decir, los tejidos más jóvenes con bajo nivel de lignificación presentan una mayor concentración de fitoquímicos que los protegen de plagas, estrés y enfermedades (Sepúlveda-Jiménez *et al.* 2003; Palama *et al.* 2010; Saxena *et al.* 2013).

La mayoría de los fitoquímicos se distinguen por tener una distribución específica y restringida, es decir, no se encuentran los mismos metabolitos en los grupos vegetales, sino que pueden limitarse a un género, familia o especie en particular, y variar en concentración entre sí (Ávalos-García y Pérez-Urria 2009; Schäfer y Wink 2009; Mazid *et al.* 2011; Pagare *et al.* 2015). Por ejemplo, en las orquídeas los principales fitoquímicos identificados son alcaloides, flavonoides, carotenoides, antocianinas y esteroides, siendo los alcaloides y flavonoides los dos grupos de fitoquímicos de mayor importancia biológica (Musharof 2011).

Específicamente *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews presenta un amplio espectro de acción antimicrobiana, con base en algunos estudios realizados se ha demostrado que hojas, tallos y vainas poseen una actividad inhibitoria contra ciertos patógenos (Shanmugavalli *et al.* 2009). A lo largo de las diferentes estructuras que conforman la planta de vainilla se han identificado diversos compuestos como el *p*-etoximetilfenol, *p*-

butoximetilfenol, vainillina, *p*-hidroxi-2-metoxicinamaldehído y ácido 3,4-dihidroxifenilacético (Sun *et al.* 2001; Palama *et al.* 2011).

También se considera que los compuestos mayoritarios en hojas, tallos y vainas de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews son el bis [4-(β -d-glucopiranosiloxi)-benzil]-2-isopropiltartrato, también denominado glucósido A y bis [4-(β -d-glucopiranosiloxi)-benzil]-2-(2-butyl)-tartrato] o glucósido B, considerados como los precursores de la glucovainillina (Palama *et al.* 2010), con lo cual Kanisawa *et al.* (1994) establecieron la teoría de que los glucósidos A y B se producen inicialmente en las hojas y posteriormente se transportan a las vainas a través de los tallos.

Algunos autores mencionan que un contenido alto de metabolitos secundarios se relaciona con una mayor protección a la planta y por lo tanto la hace más resistente, pero su producción tiene un alto gasto energético que reduce de forma considerable el crecimiento y reproducción de la planta, por lo cual se sintetizan en bajas concentraciones (Mazid *et al.* 2011; Pagare *et al.* 2015).

Los metabolitos secundarios de las plantas incluyen un grupo muy variable de fitoquímicos en cuanto a su número, heterogeneidad estructural y distribución. Algunos autores los clasifican en tres grandes grupos de acuerdo con su ruta biosintética: terpenos y esteroides, compuestos fenólicos y alcaloides (Crozier *et al.* 2006; Mazid *et al.* 2011; Pagare *et al.* 2015), no obstante, se considera que los principales fitoquímicos de interés para las plantas son:

Flavonoides: incluye compuestos como flavanonas, flavonas, dihidroflavonoles, flavonoles, antocianinas, isoflavonas y proantocianidas (Campos-Vega y Oomah 2013); se encargan de pigmentar las flores con tonos amarillos, rojos o azules para atraer polinizadores, en plantas superiores protegen contra radiación ultravioleta (UV), contribuyen en la fijación simbiótica de nitrógeno y pigmentación de inflorescencias (Crozier *et al.* 2006; Mazid *et al.* 2011; Kabera *et al.* 2014a).

Ácidos fenólicos: es una de las principales clases de compuestos fenólicos que se presentan principalmente en forma de ésteres, glucósidos o amidas, no obstante, rara vez se localizan de forma aislada. Pueden presentarse básicamente en forma de ácido

hidroxicinámico o hidroxibenzoico (Khoddami *et al.* 2013). Aunque los ácidos fenólicos están presentes principalmente en las raíces, pueden incorporarse a la pared celular de las plantas en respuesta del estrés biótico o estar en forma conjugada con un azúcar unidos mediante uno o más grupos fenólicos hidroxilo (Mandal *et al.* 2010).

Taninos: son compuestos con actividad tóxica que actúan como repelente de alimentos para diversos animales. Estos compuestos fenólicos de alto peso molecular se distribuyen principalmente en la raíz, corteza, tallo y capas externas del tejido de las plantas y pueden ser de dos tipos, hidrolizables (producen ácido gálico y elágico, pudiendo ser galotaninos o egalitaninos dependiendo del tipo de ácido producido) y condensados (Hamuel-Doughari 2012; Saxena *et al.* 2013). Algunas de sus aplicaciones son como astringentes, diuréticos, antisépticos, antioxidantes y para tratar la diarrea, en la industria alimentaria son utilizados para clarificar vinos, cerveza y jugos de fruta (Saxena *et al.* 2013)

Terpenos: se clasifican como mono-, di-, tri- y sesquiterpenos dependiendo del número de átomos de carbono (Hamuel-Doughari 2012), no obstante, la mayoría de terpenos difieren unos de otros por la estructura básica de su esqueleto carbonado y el grupo funcional (Saxena *et al.* 2013). Los integrantes del grupo de los terpenos son influenciados en gran medida por la luz y temperatura de forma que puedan actuar como protección ante condiciones de alta luminosidad y calor (Campos-Vega y Oomah 2013); en las plantas se producen como terpenos volátiles que repelen a ciertos animales y fitohormonas para regular el crecimiento (Saxena *et al.* 2013).

Saponinas: son compuestos de alto peso molecular en el cual una molécula de azúcar se combina con un triterpeno o aglicón esteroideo, se distinguen dos grupos de saponinas: saponinas esteroideas y saponinas triterpeno (Hamuel-Doughari 2012).

Alcaloides: es el grupo de compuestos más amplio de metabolitos secundarios que contienen nitrógeno en su estructura química dado que son sintetizados a partir de aminoácidos, nunca se encuentran aislados uno del otro, sino que se identifican como una mezcla de alcaloides de biosíntesis particulares que se diferencian principalmente por sus grupos funcionales (Campos-Vega y Oomah 2013).

Su principal función es proteger a la planta contra el ataque de herbívoros y patógenos se encuentran en mayor concentración en semillas y raíces. Presentan una amplia aplicación en la industria farmacéutica como estimulantes y narcóticos, entre otros. Actualmente se conocen aproximadamente 12, 000 alcaloides en cerca del 20% de las especies de plantas, y de ellos sólo aproximadamente 20% se utilizan con fines medicinales (Hamuel-Doughari 2012).

La presencia de los metabolitos secundarios en especies, tejidos u órganos suele ser específica; en el caso de las orquídeas como *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews si bien destaca principalmente por su importancia comercial, también ha sido utilizada en el tratamiento de histeria, reumatismo y algunas variantes de fiebre, dado que se han identificado en su composición la presencia de alcaloides, flavonoides, glucósidos, carbohidratos y otros fitoquímicos (Shanmugavalli *et al.* 2009).

Uno de los fitoquímicos que se encuentran presentes en mayor proporción es la vainillina, un compuesto fenólico de bajo peso molecular que presenta principalmente propiedades antioxidantes y antimicrobianas al mostrar actividad contra el crecimiento de bacterias Gram (+) y (-) al igual que con hongos y levaduras, por lo cual se le atribuye un importante potencial como conservador en alimentos (Walton *et al.* 2003), no obstante, es importante identificar el tipo de metabolitos presentes en las diferentes estructuras de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews, con el propósito de establecer los principales grupos de fitoquímicos que prevalecen en la planta de vainilla.

Existen diversas técnicas para determinar la composición química de una especie y determinar la presencia de los diferentes fitoquímicos, para ello es necesario realizar un análisis fitoquímico preliminar en el cual se identifica la presencia o ausencia de dichos metabolitos (Carvajal-Rojas *et al.* 2009), dentro de estas técnicas de identificación y cuantificación se mencionan las pruebas de cromatografía en capa fina, pruebas de tubo a través de agentes cromógenos, métodos espectrofotométricos, HPLC (High Performance Liquid Chromatography) y cromatografía de gases (Gas Chromatography).

Por otra parte, a pesar de las investigaciones referente a la composición química y aromática del fruto de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews es preciso generar conocimiento acerca de su composición fitoquímica. Por lo que el presente trabajo tuvo como objetivo realizar un tamiz fitoquímico y cuantificación de los principales metabolitos secundarios de hojas, tallos, flores y frutos beneficiados de plantas de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews de tres sitios de colecta provenientes de la Huasteca hidalguense, México.

3.2 Materiales y métodos

Para aportar conocimiento sobre la composición química de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews y determinar el tipo de metabolitos secundarios presentes en los diferentes tejidos vegetales, se realizó un tamizaje fitoquímico en hoja, tallo, flor y vaina beneficiada, en el que se determinó la presencia de ácidos fenólicos, flavonoides, alcaloides, taninos, terpenos y saponinas mediante agentes cromógenos (sustancias que reaccionan formando precipitados, espuma o cambios de color, etc.) y cromatografía en capa fina (CCF) con solventes de diferente polaridad, la cual permite visualizar la presencia de moléculas pequeñas; así como la cuantificación de flavonoides, taninos totales y condensados y compuestos fenólicos totales mediante métodos espectrofotométricos.

3.2.1 Obtención de material vegetal

El material vegetal utilizado se obtuvo en diferentes fechas dada su disponibilidad, en el caso de hojas, tallos y flores se colectaron en el mes de Mayo de 2014 debido a que era temporada de floración. Por su parte, las vainas se colectaron a las 32 semanas posteriores a la polinización, en diciembre de 2013, y se trasladaron al ejido Primero de Mayo para someterlas a un beneficiado tradicional realizado por el maestro beneficiador Veremundo Rodríguez.

Se seleccionaron tres de los 14 sitios de colecta de frutos (vainas) (Figura 8), debido a que mostraron concentraciones contrastantes en el contenido de vainillina en las vainas beneficiadas, esto se realizó con la finalidad de asociar las variaciones en el contenido o presencia de fitoquímicos con el de vainillina.

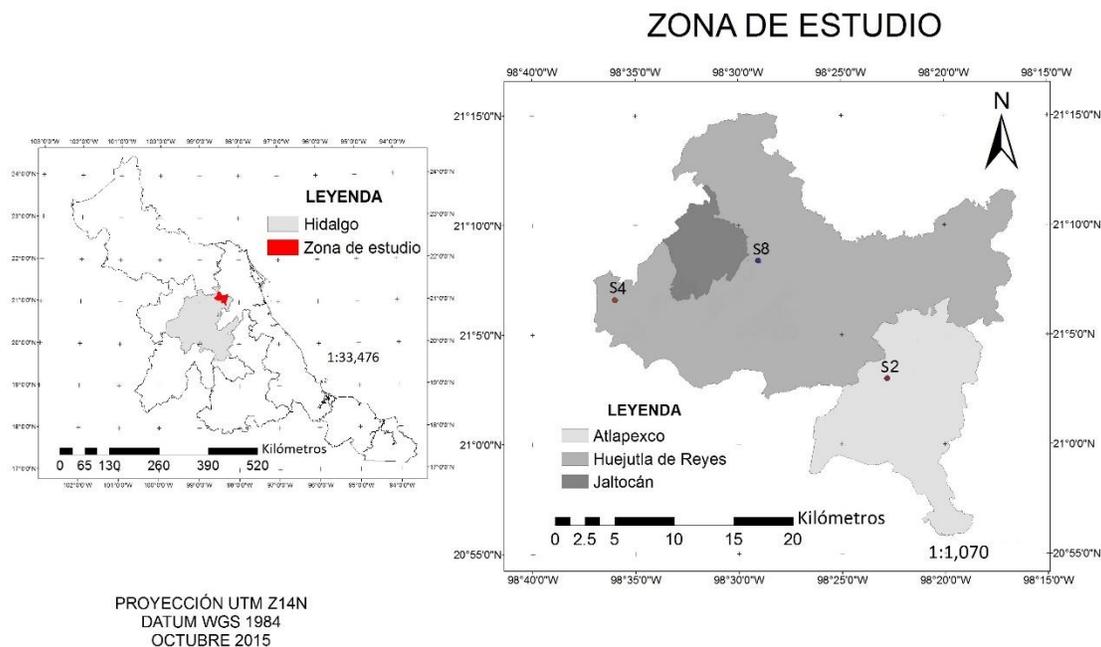


Figura 8. Ubicación geográfica de los sitios de colecta de material vegetal en la Huasteca hidalguense, México. S2: Huizotlaco, S4: Coacuilco, S8: Contepec.

3.2.2 Preparación de extractos

La extracción de fitoquímicos se realizó a partir del material vegetal fresco (hoja, tallo y flor) y vainas beneficiadas triturados y sometidos a un tratamiento de sonicación a una frecuencia de 5.5 durante 30 minutos en solventes de diferente polaridad (metanol, cloroformo y hexano, en el caso de la vaina beneficiada sólo se utilizó metanol dada la baja disponibilidad de muestra) en una proporción de 1:5, para ello se pesaron 5 g de material vegetal suspendidos en 12 mL de solvente. Transcurrido el tiempo de sonicación las muestras permanecieron en maceración durante 24 horas para lograr la mayor extracción posible de los fitoquímicos de interés, posteriormente se filtraron y almacenaron en viales de vidrio en condiciones de congelación (-30 °C) hasta la realización de las pruebas para evitar evaporación del solvente.

3.2.3 Pruebas por agentes cromógenos

La identificación de los principales grupos de fitoquímicos se realizó a través de pruebas por agentes cromógenos en las que puede darse una reacción química que

produce la alteración de las estructuras moleculares, cambios en grupos funcionales o formaciones de precipitados, cambios de color, desprendimiento de gases etc. lo cual indicará la presencia de un determinado metabolito y así poder clasificarlo dentro de los grupos correspondientes.

Se evaluó la presencia de saponinas, taninos, terpenos, flavonoides, alcaloides y ácidos fenólicos a través de las metodologías descritas en el Cuadro 11 (Ver Anexo G) tomando como referencia el sistema cualitativo de cruces para especificar la presencia o ausencia así como la medida en que se hace evidente la presencia de dichos fitoquímicos a través de los siguientes criterios: alto contenido (+++), presencia notable (++) , presencia leve (+), ausencia (-) y trazas (T).

Cuadro 11. Pruebas de identificación de fitoquímicos en *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews.

Fitoquímico	Prueba
Saponinas	Fehling
	Rosenthaler
	Índice afrosimétrico o prueba de espuma
Alcaloides	Dragendorff
	Hager
Terpenos	Wagner *
	Lieberman-Burchard
Ácidos fenólicos	Salkowski
	FeCl ₃
Flavonoides	HCl + Mg ⁺²
	NH ₄ OH/UV
Taninos	HCl 4N + NaOH 10%
	FeCl ₃
	Acetato de plomo al 2%

3.2.4 Cromatografía en capa fina (CCF)

La identificación de fitoquímicos, mediante las pruebas de cromatografía en capa fina (CCF), de los tres extractos (metanol, cloroformo y hexano) así como de los estándares, se llevó a cabo utilizando placas cromatográficas con soporte de aluminio (sílica gel 60, F₂₅₄; de 5x10 cm, Sigma-Aldrich), en el caso de alcaloides, taninos y ácidos fenólicos las pruebas se realizaron en placas de 5 cm x 5 cm dada la baja presencia de dichos metabolitos. Esta técnica se basa en concentrar la muestra en un punto de aplicación en la fase estacionaria, en este caso placas cromatográficas, y someterle a la influencia de una fase móvil (sistema cromatográfico). De esta forma el eluyente asciende a través de la placa arrastrando los compuestos de interés produciendo bandas. Los sistemas cromatográficos y reveladores utilizados se muestran en el Cuadro 12.

Después del desarrollo de los cromatogramas, las placas se removieron de la cámara cromatográfica y se secaron a temperatura ambiente. Finalmente se hizo la detección y el conteo del número de bandas de los compuestos por cada prueba, la cual se realizó bajo la luz visible y con luz ultravioleta a dos longitudes de onda (UV₂₅₄nm y UV₃₆₅ nm), con el empleo de una lámpara ultravioleta UVP (UVLMS-38 EI series 3UV™ Lamp), posteriormente se asperjaron con los reactivos cromogénicos.

Cuadro 12. Sistemas cromatográficos, reveladores y testigos (Test) para CCF en *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews.

Fitoquímico	Extracto	Sistema	Revelador
Flavonoides	Metanol	Acetato de etilo:Ác. fórmico:Ác. Acético:Agua (7:0.8:0.8:1.75)	NP 1% / PEG 5% Test: Quercetina 0.5 mg mL ⁻¹
	Cloroformo	Cloroformo:Acetona (9:1)	
	Hexano		
Saponinas	Metanol	Butanol:Ác. Acético glacial:Agua (4:1:4)	Vainillina 1% / H ₂ SO ₄ 10% en CH ₃ CH ₂ OH, calentar para revelar Test: Saponina reactivo
	Cloroformo	Cloroformo:Acetona (9:1)	
	Hexano		
Taninos	Metanol	Acetato de etilo:Ác. fórmico:Ác. Acético:Agua (10:8:8:1)	FeCl ₃ al 0.1% Test: Ácido tánico 0.5 mg mL ⁻¹
	Cloroformo	Acetato de etilo:Hexano (3:7)	
	Hexano		
Terpenos	Metanol	Hexano:Acetato de etilo (2:1)	Vainillina 1% / H ₂ SO ₄ 10% en Etanol Test: Clavo
	Cloroformo	Hexano:Acetato de etilo (7:3)	
	Hexano		
Alcaloides	Metanol	Acetato de etilo:Metanol (9:1)	I:KI Test: <i>Lupinus</i>
	Cloroformo	Acetato de etilo:Hexano:Amoniaco (7:3:0.2)	
	Hexano		
Ácidos fenólicos	Metanol	Acetato de etilo:Ác. Fórmico:Ác. Acético:Agua (10:8:8:1)	Folin-Ciocalteu al 50% y asperjar NH ₄ concentrado Ácido gálico 0.5 mg mL ⁻¹
	Cloroformo	Metanol:Agua:Isopropanol:Acetona (30:65:2:3)	
	Hexano		

3.2.5 Cuantificación de fitoquímicos

Para complementar el análisis fitoquímico preliminar (pruebas por agentes cromógenos y cromatografía en capa fina) se realizó una cuantificación de los principales grupos de metabolitos secundarios a través de métodos espectrofotométricos. Se evaluó la presencia de compuestos fenólicos totales, flavonoides y taninos totales y condensados.

Para ello, se realizaron extractos en metanol del material vegetal fresco (hojas, tallos y flores) y vainas beneficiadas, en el caso de hojas y tallos se realizaron tres extractos de diferentes partes del esqueje (extremo superior e inferior y región media) para así obtener un perfil fitoquímico más completo.

La obtención de extractos se realizó en una proporción 1:5 sonicando durante 30 minutos a una frecuencia de 5.5 y macerando durante 24 horas, transcurrido este tiempo se procedió a la filtración de los extractos para llevarlos a condiciones de congelación hasta el momento de su análisis para una mejor conservación. Se determinó el peso seco de cada tejido vegetal, los cuales fueron utilizados para los cálculos posteriores de la cuantificación, los protocolos utilizados y curvas de calibración se describen de forma detallada en el Anexo K.

3.2.6 Variables fitoquímicas

Para realizar la caracterización fitoquímica de los diferentes tejidos de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews se evaluaron cuatro grupos de fitoquímicos, los cuales se retomaron como variables y se describen en el Cuadro 13.

Cuadro 13. Variables fitoquímicas evaluadas en diferentes tejidos de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews.

Código	Variable fitoquímica	Unidades*
CFT	Compuestos fenólicos totales	mg g ⁻¹ MS
TT	Taninos totales	mg g ⁻¹ MS
TC	Taninos condensados	mg g ⁻¹ MS
Flav	Flavonoides	mg g ⁻¹ MS

*mg g⁻¹MS= miligramos de fitoquímico por gramo de muestra seca

3.2.7 Análisis estadístico de variables fitoquímicas

La cuantificación de compuestos fenólicos totales, taninos totales y condensados y flavonoides se realizó en cuatro diferentes tejidos vegetales de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews (hoja, tallo, flor y vaina beneficiada) provenientes de tres sitios de colecta de la Huasteca hidalguense. Se hicieron nueve repeticiones para hoja y tallo y cuatro repeticiones para flor y vaina beneficiada para cada sitio de colecta y cada fitoquímico evaluado.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó mediante un análisis de varianza y prueba de medias (Tukey $\alpha=0.05$) para determinar las medias y coeficientes de variación entre colectas, tejidos vegetales, la interacción colecta-tejido vegetal y fitoquímicos en cada colecta.

De igual manera se realizó un análisis de componentes principales (ACP) para determinar las variables con mayor influencia en la distribución de los tejidos de acuerdo con su similitud y un análisis de cluster por colecta mediante el paquete estadístico SAS versión 9.0 (2002).

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Identificación de fitoquímicos por agentes cromógenos

El análisis fitoquímico preliminar llevado a cabo en extractos de metanol, cloroformo y hexano reveló la presencia de fitoquímicos como saponinas, terpenos y flavonoides y en muy baja presencia ácidos fenólicos, taninos y alcaloides (Cuadro 14). Para cada grupo de metabolitos se obtuvieron los siguientes resultados:

- **Flavonoides**

La prueba de HCl y Mg^{+2} para la colecta de Huizotlaco (S2) mostró trazas para el extracto en metanol de los tejidos frescos así como en hoja y flor en cloroformo, también en el de hoja en hexano y ausencia en el resto de extractos evaluados. Con la prueba de NH_4OH y luz UV se observó presencia leve en el extracto de flor en metanol, trazas en los extractos de cloroformo y ausencia en extractos de hexano de los tejidos vegetales frescos. Por otra parte, la prueba de HCl 4N y NaOH indicó presencia leve en extracto de metanol de los tejidos frescos así como trazas en extractos de hoja, tallo y flor en cloroformo así como en el de hexano para hoja.

La colecta de Coacuilco (S4) mostró presencia leve en extracto de metanol de hoja y trazas en el resto de extractos para tejidos vegetales frescos para la prueba de HCl y Mg^{+2} . Se observó también presencia leve de flavonoides en extracto de metanol para hoja y tallo y NH_4OH y luz UV y notable en flor. El extracto en cloroformo presentó trazas en hoja y tallo y ausencia en los demás extractos de tejidos frescos, asimismo,

en la prueba de HCl 4N y NaOH se observó la misma tendencia que la prueba anterior para los tejidos evaluados.

Los extractos obtenidos de la colecta de Contepec (S8) mostraron presencia leve en extracto de metanol para flor y trazas en hoja y tallo, de igual manera se observaron trazas en hoja, tallo y flor en cloroformo así como flor en hexano en la prueba de HCl y Mg^{+2} . Con NH_4OH y luz UV se observó presencia leve en flor en metanol, el extracto de cloroformo para los tres tejidos frescos indicaron trazas al igual que el hoja y tallo en hexano. Finalmente, la prueba de HCl 4N y NaOH indicó presencia leve de flavonoides para hoja en metanol y trazas en tallo y flor; el extracto en cloroformo evidenció trazas en hoja y tallo y ausencia en flor, mientras que sólo la hoja en metanol indicó la presencia de trazas.

Por otra parte las pruebas realizadas en vaina beneficiada indicaron que las colectadas en Huizotlaco (S2) mostraron presencia leve con HCl y Mg^{+2} y trazas en las dos pruebas restantes. La colecta de Coacuilco (S4) indicó presencia notable en HCl y Mg^{+2} y leve en NH_4OH con luz UV y HCl 4N con NaOH; en contraparte, Contepec (S8) indicó presencia notable con HCl y Mg^{+2} , leve en NH_4OH con luz UV y trazas en HCl 4N con NaOH (Cuadro 14, Anexos H.1.).

- **Saponinas**

La prueba de Fehling para la colecta de Huizotlaco (S2) indicó presencia notable de saponinas principalmente en los extractos de metanol de flor así como presencia leve a notable en extractos de cloroformo de los tejidos vegetales frescos. Mediante la prueba de Rosenthaler se observó presencia leve en extractos de hexano para hoja y flor al igual que trazas en tallo, de igual manera se observaron trazas en los extractos de metanol y cloroformo de los tejidos vegetales frescos; por su parte, el índice afrosimétrico o prueba de espuma indicó presencia leve sólo en hoja y tallo. Respecto a la vaina beneficiada se observó presencia notable en la prueba de Fehling y trazas en Rosenthaler.

La colecta de Coacuilco (S4) presentó presencia notable en extractos de metanol para tallo, flor y vaina beneficiada, el extracto en cloroformo mostró presencia de leve a

notable en los diferentes tejidos vegetales frescos y trazas en extractos de hexano para tallo y flor. Mediante la prueba de Rosenthaler se identificó presencia de leve a notable en extracto de hexano para los tejidos vegetales y en su mayoría trazas para los diferentes extractos, por otro lado, la prueba de espuma evidenció la presencia leve de saponinas en hojas y tallos. La vaina beneficiada mostró presencia notable en la prueba de Fehling y trazas en Rosenthaler.

La identificación de saponinas para la colecta de Contepec (S8) mediante la prueba de Fehling mostró presencia leve en extracto de metanol de los tejidos vegetales frescos; el extracto en cloroformo de hoja y flor, al igual que el de hexano de tallo indicó presencia leve. A través de la prueba de Rosenthaler se identificó principalmente presencia leve en extracto de metanol de tallo y flor, en extracto de cloroformo para hoja y tallo se observó presencia notable; asimismo, la prueba de espuma evidenció presencia leve en hoja y tallo. Por su parte, la vaina beneficiada mostró la misma tendencia que las dos colectas (S2 y S4) mencionadas anteriormente (Cuadro 14, Anexo H.2.).

- **Taninos**

La identificación de taninos en los diferentes tejidos vegetales frescos de las colectas de Huizotlaco (S2) y Coacuilco (S4) mediante la prueba de FeCl_3 5% indicó que los extractos de hoja, tallo y flor en metanol tuvieron presencia leve y trazas para los tejidos frescos en cloroformo y hexano. En la colecta de Huizotlaco (S2) la prueba con acetato de plomo mostró presencia leve, trazas y ausencia para los tejidos frescos en cloroformo y hexano, respectivamente; mientras que para Coacuilco (S4) hoja en metanol indicó presencia leve y tallo y flor presencia notable además de ausencia de taninos en extractos de cloroformo y hexano.

A su vez la prueba de FeCl_3 5% en la colecta de Contepec (S8) mostró trazas para hoja, tallo y flor en metanol, hoja en cloroformo así como hoja y tallo en hexano. El ensayo con acetato de plomo mostró presencia leve en hoja y tallo en metanol y trazas en flor, mientras que se observó ausencia de este metabolito en los extractos restantes. Referente a la identificación de taninos en vaina beneficiada se observaron trazas en

FeCl₃ 5% y presencia leve con acetato de plomo para las tres colectas evaluadas (Cuadro 14, Anexo H.3.).

- **Terpenos**

La prueba de Liberman-Burchard para la colecta de Huizotlaco (S2) indicó presencia notable para el extracto en metanol de hoja y tallo y trazas para flor, en cloroformo sólo se observaron trazas al igual que en el extracto en hexano de hoja. En la prueba de Salkowski se observaron trazas para todos los extractos evaluados, mientras que la vaina beneficiada indicó trazas y presencia notable para las pruebas de Liberman-Burchard y Salkowski, respectivamente.

Para la colecta de Coacuilco (S4) se indicó presencia leve en extracto en metanol de flor y trazas para los demás extractos, la prueba de Salkowski mostró trazas para todos los extractos evaluados, salvo en el de hexano de hoja, donde se observó ausencia de terpenos. Por último, la colecta de Contepec (S8) hizo evidente la presencia leve de terpenos en extracto de metanol para hoja y tallo y trazas para flor.

Los extractos en cloroformo y hexano de hoja y tallo indicaron la presencia de trazas, mientras que en los extractos de flor se observó ausencia de este metabolito. Por otra parte, la vaina beneficiada mostró trazas en Liberman-Burchard y presencia notable en Salkowski para las tres colectas (Cuadro 14, Anexo H.4.).

- **Alcaloides**

A través de las pruebas realizadas se determinó que las estructuras vegetales de Huizotlaco (S2) no mostraron presencia de alcaloides en la prueba de Dragendorff, en la prueba de Wagner se observaron trazas en extracto de hexano para los tejidos vegetales frescos. Mediante la prueba de Hager se evidenciaron trazas para todos los extractos realizados.

En la colecta de Coacuilco (S4) sólo se observaron trazas para el extracto en hexano de los tejidos vegetales frescos para la prueba de Dragendorff, a través de la prueba de Wagner se evidenciaron trazas en los extractos de cloroformo y hexano de los tejidos frescos; por otra parte, la prueba de Hager presentó la misma tendencia en los

extractos evaluados que la prueba de Wagner. Contepec (S8) presentó trazas en el extracto de cloroformo de tallo y flor, en las pruebas de Hager y Wagner se observaron trazas para los extractos en cloroformo y hexano de los tejidos frescos.

En vaina beneficiada la colecta de Huizotlaco (S2) indicó presencia leve con la prueba de Dragendorff, ausencia en Wagner y trazas en Hager; las vainas de Coacuilco (S4) mostraron presencia leve en la prueba de Dragendorff así como trazas para Wagner y Hager, por último, la colecta de Contepec (S8) presentó trazas para las tres pruebas realizadas (Cuadro 14, Anexo H.5.).

- **Ácidos fenólicos**

En las colectas de Huizotlaco (S2) y Coacuilco (S4), la presencia de ácidos fenólicos se hizo evidente en forma leve sólo en el extracto de metanol de los tejidos vegetales frescos, mostrando trazas en los extractos de metanol de la colecta de Contepec (S8). Para los extractos de cloroformo y hexano de Huizotlaco (S2) y Coacuilco (S4) se observaron trazas, no obstante, Contepec (S8) presentó características distintas a las dos anteriores colectas al mostrar ausencia de ácidos fenólicos para el extracto hexano de hoja y tallo y trazas en el resto de las muestras. Los ácidos fenólicos en vainas beneficiadas de las tres colectas mostraron un alto contenido debido a que estos son los principales compuestos generados como resultado del beneficiado (Cuadro 14, Anexo H.6.).

Cuadro 14. Tamizaje fitoquímico en extractos de hoja (H), tallo (T), flor (F) y vaina beneficiada (VB) de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews de tres localidades de la Huasteca hidalguense, México.

PRUEBA	Sitio	Huizotlaco (S2)				Coacuilco (S4)				Contepec (S8)				
		TV [†] E [‡]	H	T	F	VB	H	T	F	VB	H	T	F	VB
Flavonoides	HCl, Mg ²⁺	M [§]	T	T	T	+	T	T	+	++	T	T	+	++
		C [¶]	T	-	T		T	T	T		T	T	T	
		Hex [¶]	T	-	-		T	T	T		-	-	T	
	UV/NH ₄ OH	M	T	T	+	T	+	+	++	+	T	T	+	+
		C	T	T	T		T	T	-		T	T	T	
		He	-	-	-		-	-	-		T	T	-	
HCl 4N, NaOH	M	+	+	+	T	+	+	++	+	+	T	T	T	
	C	T	T	T		T	T	-		T	T	-		
	He	T	-	-		-	-	-		T	-	-		
Saponinas	Fehling	M	T	T	++	++	T	++	++	++	+	+	+	++
		C	+	++	++		++	+	+		++	T	++	
		He	T	T	T		-	T	T		T	++	-	
	Rosenthaler	M	T	T	T	T	T	T	+	T	T	+	+	T
		C	T	T	T		T	T	T		++	++	T	
		He	+	T	+		+	++	+		T	T	T	
Espuma	TF	+	+	-		+	+	-		+	+	-		
	M	+	+	+	T	+	+	+	T	T	T	T	T	
	C	T	T	T		T	T	T		T	-	-		
Taninos	FeCl ₃ 5%	He	T	T	T		T	T	T		T	T	-	
		M	+	+	+	+	+	++	++	+	+	+	T	+
		C	T	T	T		-	-	-		-	-	-	
Terpenos	Liberman-Burchard	M	+	+	T	T	T	+	T	+	+	T	T	
		C	T	T	T		T	T	T		T	T	-	
		He	T	-	-		T	T	T		T	T	-	
	Salkowski	M	T	T	T	++	T	T	T	++	T	T	T	++
		C	T	T	T		T	T	T		T	T	-	
		He	T	T	T		-	T	T		T	T	-	
Alcaloides	Dragendorff	M	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	T
		C	-	-	-		-	-	-		-	T	T	
		He	-	-	-		T	T	T		-	-	-	
	Wagner	M	-	-	-	-	-	-	-	T	T	T	T	T
		Cl	-	-	-		T	T	T		T	T	+	
		He	T	T	T		T	T	T		T	T	+	
Hager	M	T	T	T	T	-	-	-	T	-	-	T	T	
	C	T	T	T		T	T	T		-	-	+		
	He	T	T	T		T	T	T		T	T	+		
Ácidos fenólicos	FeCl ₃ 5%	M	+	+	+	+++	+	+	+	+++	T	T	T	+++
		C	T	T	T		T	T	T		T	T	T	
		He	T	T	T		T	T	T		-	-	T	

†Tejido vegetal; ‡Extracto; §Metanol; ¶Cloroformo; ¶Hexano; Espacio en blanco: No realizado. Escala de concentración: alta (+++), medio (++), débil (+), trazas (T) y ausencia (-).

3.3.2 Identificación de fitoquímicos por cromatografía en capa fina

Se realizaron pruebas de identificación de fitoquímicos a través de Cromatografía en Capa Fina (CCF) con la finalidad de complementar y confirmar la presencia o ausencia de dichos compuestos mediante las pruebas por agentes cromógenos.

- **Flavonoides**

Los extractos en metanol de los diferentes tejidos vegetales colectados en Huizotlaco (S2) mostraron de manera más evidente la presencia de flavonoides en hoja y flor al observar la formación de seis bandas en cada extracto, mientras que en la vaina beneficiada sólo se observó una banda. A su vez, la evaluación extractos de hoja, tallo y flor en cloroformo y hexano mostraron la formación de dos bandas en cada caso.

Para la colecta de Coacuilco (S4), se observó mayor abundancia de flavonoides en el extracto de flor en metanol al observarse siete bandas, no obstante, hoja y tallo evidenciaron una presencia notable de este metabolito al indicar seis bandas en cada caso, y, al igual que la colecta S2, vaina beneficiada mostró la formación de una banda. Por otra parte, cada uno de los tejidos vegetales frescos (hoja, tallo y flor) en hexano presentaron dos bandas, mientras que los extractos en cloroformo hicieron más evidente la presencia de flavonoides en flor al mostrar dos bandas.

De igual manera, la colecta de Contepec (S8) mostró mayor presencia de flavonoides en el extracto de flor en metanol al observar cinco bandas, a su vez, para hoja y tallo en metanol se observaron cuatro bandas en cada extracto así como una banda en el extracto de vaina beneficiada. Los extractos de cloroformo evidenciaron mayor presencia de flavonoides en tallo al formar dos bandas en la placa cromatográfica, también se observó una banda para la prueba realizada en extracto de hexano para hoja y tallo (Cuadro 15, Anexo I.1. y J.1.).

- **Saponinas**

En la colecta de Huizotlaco (S2) se identificó que los extractos de hoja y vaina beneficiada en metanol mostraron mayor abundancia de saponinas al formar tres bandas cada extracto, asimismo, tallo y flor mostraron sólo una banda. En los extractos

de cloroformo la flor presentó seis bandas, seguido de hoja y tallo al formar cinco bandas; por otra parte, los extractos de hexano indicaron mayor contenido de saponinas en hoja y tallo al observarse cuatro bandas para cada tejido.

La evaluación de los tejidos colectados en Coacuilco (S4) mostró que los extractos de metanol de los tejidos vegetales evaluados formaron tres bandas en cada muestra; por su parte, los extractos de cloroformo indicaron que el tallo fue el tejido con mayor abundancia de este metabolito al formar cinco bandas, mientras que hoja y flor formaron cuatro bandas. En extractos de hexano, hoja y flor indicaron mayor abundancia de saponinas.

Por último, la colecta con mayor presencia de saponinas fue la de Contepec (S8) al observarse siete bandas en extractos de hoja y tallo en metanol, esta misma tendencia se observó en los extractos de cloroformo, mientras que en hexano, el tejido más abundante en saponinas fue la hoja (Cuadro 15, Anexo I.2. y J.2.).

- **Taninos**

Los extractos de metanol para los diferentes tejidos evaluados provenientes de Huizotlaco (S2) fueron los que mostraron mayor presencia de taninos al observarse una banda en cada uno de los extractos; a su vez, en los extractos de cloroformo no se observaron bandas, a diferencia de la muestra de hoja en hexano, donde se indicó una banda. Los tejidos vegetales provenientes de Coacuilco (S4) presentaron una banda en extracto de metanol de tallo, flor y vaina beneficiada, en contraste, la colecta de Contepec (S8) sólo mostró una banda en el extracto de vaina beneficiada (Cuadro 15, Anexo I.3. y J.3.).

- **Terpenos**

Se determinó que en la colecta de Huizotlaco (S2) el extracto de vaina beneficiada en metanol presentó mayor contenido de terpenos mostrando siete bandas, seguido del extracto de flor con cuatro bandas y hoja y tallo con tres bandas. No obstante, en extracto de cloroformo, la hoja mostró mayor contenido de este fitoquímico indicando

cinco bandas a pesar de ser un solvente con menor polaridad; además, los extractos de hexano con presencia más notable de terpenos fueron de hoja y tallo.

A diferencia de la colecta anterior, la colecta de Coacuilco (S4) mostraron que los extractos de metanol con mayor evidencia de terpenos fueron los de hoja, tallo y vaina beneficiada al mostrar cuatro bandas. No obstante, el extracto de hoja en cloroformo mostró de manera más notable este fitoquímico en hoja al observar seis bandas; con respecto a la colecta de Contepec (S8), la vaina beneficiada mostró mayor contenido en este fitoquímico al presentar seis bandas; por su parte, en los extractos de cloroformo se identificó que la hoja fue el tejido que evidenció mayor presencia de terpenos con siete bandas, esta tendencia se observó en los extractos de cloroformo mostrando cinco bandas en hoja (Cuadro 15, Anexo I.4 y J.4.).

- **Alcaloides**

La presencia de alcaloides en la colecta de Huizotlaco (S2) fue evidente sólo en extractos de metanol indicando dos bandas para hoja, tallo, flor y vaina beneficiada aunque estas presentaron tonalidades tenues; esta misma tendencia pudo observarse en la colecta de Coacuilco (S4), no obstante, el valor Rf de las bandas formadas en la colecta S2 fueron superiores a los de S4, indicando que los alcaloides identificados en esta última colecta pueden ser de mayor peso molecular.

Por otra parte, la colecta de Contepec (S8) mostró dos bandas en los extractos de metanol de los diferentes tejidos vegetales evaluados, sin embargo, también se observó la presencia de una banda en extracto de hoja y tallo en hexano (Cuadro 15, Anexo I.5 y J.5.).

- **Ácidos fenólicos**

Puesto que los compuestos fenólicos son uno de los principales grupos de fitoquímicos presentes en vainas beneficiadas, la colecta de Huizotlaco (S2) fue el tejido que mostró mayor presencia de ácidos fenólicos al formar dos bandas, mientras que los extractos de hoja, tallo y flor tanto en metanol como en cloroformo y hexano sólo mostraron una banda. Por otra parte, la colecta de Coacuilco (S4) mostró mayor abundancia de ácidos

fenólicos puesto que los extractos de metanol para vaina beneficiada indicaron tres bandas y en tallo y flor dos; asimismo, los extractos de cloroformo y hexano presentaron una banda para cada tejido evaluado. Por último, en los extractos de metanol de hoja, tallo, flor y vaina beneficiada se indicaron dos bandas, mientras que en los extractos de cloroformo se observó una banda para cada tejido; de igual manera, en extracto de hexano este grupo de metabolitos sólo se identificaron en hoja y tallo (Cuadro 15, Anexo I.6. y J.6.).

Cuadro 15. Determinación de metabolitos secundarios y valor R_f por cromatografía en capa fina en hojas (H), tallos (T), flores (F) y vaina beneficiada (VB) de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews.

MS [†]	TV [‡]	E [§]	Huizotlaco(S2)		Coacuilco(S4)		Contepec(S8)	
			NB ^p	Rf [¶]	NB	Rf	NB	Rf
Flavonoides	H	M ^{††}	6	0.09, 0.61, 0.70, 0.77, 0.80, 0.96	6	0.63, 0.70, 0.78, 0.81, 0.92, 0.97	4	0.63, 0.70, 0.79, 0.97
		C ^{‡‡}	2	0.05, 0.86	1	0.86	1	0.84
		He ^{§§}	2	0.64, 0.95	2	0.62, 0.94	1	0.98
	T	M	4	0.09, 0.62, 0.81, 0.98	6	0.63, 0.70, 0.78, 0.81, 0.92, 0.97	4	0.62, 0.70, 0.80, 0.97
		C	2	0.05, 0.86	1	0.86	2	0.07, 0.84
		He	2	0.64, 0.95	2	0.62, 0.94	1	0.98
	F	M	6	0.09, 0.62, 0.69, 0.76, 0.80, 0.98	7	0.09, 0.63, 0.70, 0.81, 0.92, 0.97	5	0.62, 0.73, 0.81, 0.89, 0.97
		C	2	0.05, 0.86	2	0.55, 0.86	0	
		He	2	0.64, 0.95	2	0.62, 0.94	0	
	VB	M	1	0.98	1	0.98	1	0.98
M		3	0.69, 0.90, 0.95	3	0.69, 0.86, 0.93	7	0.31, 0.40, 0.59, 0.68, 0.77, 0.86, 0.94	
Saponinas	H	C	5	0.60, 0.58, 0.80, 0.95, 0.97	4	0.60, 0.66, 0.77, 0.94	7	0.22, 0.38, 0.56, 0.65, 0.72, 0.77, 0.95
		He	4	0.56, 0.63, 0.77, 0.89	4	0.59, 0.65, 0.87, 0.94	5	0.51, 0.59, 0.71, 0.79, 0.84
		M	1	0.33	3	0.36, 0.86, 0.93	7	0.31, 0.40, 0.59, 0.68, 0.76, 0.84
	T	C	5	0.60, 0.68, 0.80, 0.95, 0.97	5	0.58, 0.66, 0.77, 0.88, 0.94	7	0.19, 0.56, 0.65, 0.71, 0.76, 0.88, 0.94
		He	4	0.55, 0.63, 0.76, 0.93	3	0.57, 0.65, 0.93	1	0.84
		M	1	0.94	3	0.36, 0.67, 0.93	2	0.52, 0.98
	F	C	6	0.60, 0.68, 0.80, 0.95, 0.97, 0.99	4	0.58, 0.66, 0.76, 0.90	2	0.73, 0.98
		He	3	0.60, 0.72, 0.89	4	0.58, 0.65, 0.85, 0.91	3	0.52, 0.73, 0.98
		M	3	0.52, 0.61, 0.86	3	0.46, 0.61, 0.87	2	0.52, 0.98

†Metabolito secundario o fitoquímico; ‡Tejido vegetal; §Extracto; pNúmero de bandas; Espacio en blanco: No detectado ¶Factor de retención; ††Metanol; ‡‡Cloroformo; §§Hexano.... (Continúa)

(Cuadro 15.Continuación)

MS†	TV¶	E§	Huizotlaco (S2)		Coahuila (S4)		Contepec (S8)	
			NB ^p	Rf [¶]	NB	Rf	NB	Rf
Taninos	H	M††	1	0.96	0		0	
		C¶¶	0		0		0	
		He§§	1	0.86	0		0	
		M	1	0.96	1	0.93	0	
		C	0		0		0	
	T	He	0		0		0	
		M	1	0.96	1	0.93	0	
		C	0		0		0	
		He	0		0		0	
		M	1	0.96	1	0.93	0	
Terpenos	VB	M	1	0.96	1	0.91	1	0.91
		M	3	0.47, 0.59, 0.67	4	0.49, 0.59, 0.66, 0.84	2	0.60, 0.66
	H	C	5	0.47, 0.50, 0.55, 0.87, 0.89	6	0.39, 0.49, 0.58, 0.82, 0.88, 0.90	7	0.15, 0.38, 0.49, 0.56, 0.64, 0.80, 0.87
		He	4	0.56, 0.79, 0.87, 0.92	2	0.51, 0.88	5	0.42, 0.49, 0.62, 0.82, 0.88
		M	3	0.47, 0.59, 0.66	4	0.48, 0.59, 0.67, 0.84	4	0.19, 0.50, 0.60, 0.66
		C	3	0.47, 0.87, 0.89	5	0.40, 0.59, 0.82, 0.88, 0.90	5	0.38, 0.49, 0.56, 0.64, 0.87
		He	4	0.42, 0.56, 0.87, 0.92	2	0.51, 0.88	4	0.49, 0.73, 0.82, 0.88
	T	M	4	0.47, 0.59, 0.61, 0.84	3	0.48, 0.60, 0.84	3	0.63, 0.75, 0.84
		C	3	0.47, 0.87, 0.89	3	0.83, 0.88, 0.90	3	0.55, 0.73, 0.97
		He	5	0.56, 0.62, 0.79, 0.87, 0.92	2	0.50, 0.86	3	0.70, 0.73, 0.84
M		7	0.15, 0.46, 0.49, 0.58, 0.80, 0.83, 0.88	4	0.51, 0.61, 0.83, 0.89	6	0.37, 0.53, 0.61, 0.67, 0.86, 0.91	
M		2	0.75, 0.96	2	0.68, 0.89	2	0.68, 0.89	
Alcaloides	H	C	0		0		0	
		He	0		0		1	0.91
		M	2	0.73, 0.96	2	0.66, 0.89	2	0.68, 0.89
		C	0		0		0	
		He	0		0		1	0.93
	T	M	2	0.75, 0.98	2	0.68, 0.89	2	0.71, 0.91
		C	0		0		0	
		He	0		0		1	0.93
		M	2	0.75, 0.98	2	0.68, 0.89	2	0.71, 0.91
		C	0		0		0	
Ácidos fenólicos	VB	M	2	0.08, 0.96	2	0.64, 0.93	2	0.66, 0.96
		M	1	0.82	1	0.88	2	0.66, 0.82
	H	C	1	0.80	1	0.84	1	0.66
		He	1	0.77	1	0.89	1	0.86
		M	1	0.82	2	0.71, 0.86	2	0.66, 0.82
		C	1	0.89	1	0.86	1	0.86
		He	1	0.96	1	0.89	1	0.89
	T	M	1	0.82	2	0.71, 0.86	2	0.66, 0.82
		C	1	0.89	1	0.86	1	0.86
		He	1	0.96	1	0.89	1	0.89
M		1	0.82	2	0.71, 0.86	2	0.66, 0.82	
C		1	0.89	1	0.86	1	0.86	
F	He	1	0.96	1	0.89	1	0.89	
	M	1	0.82	2	0.71, 0.86	2	0.66, 0.82	
	C	1	0.89	1	0.86	1	0.86	
	He	1	0.96	1	0.89	1	0.89	
	M	1	0.82	2	0.71, 0.86	2	0.66, 0.82	
VB	M	2	0.66, 0.84	3	0.34, 0.66, 0.86	2	0.66, 0.82	

†Metabolito secundario o fitoquímico; ¶Tejido vegetal; §Extracto; PNúmero de bandas; Espacio en blanco: No detectado; ¶Factor de retención; ††Metanol; ¶¶Cloroformo; §§Hexano.... (Continúa)

3.3.3 Determinación cuantitativa de metabolitos secundarios

Análisis estadístico de variables fitoquímicas

El análisis de las características fitoquímicas en tejidos vegetales de *V. planifolia* Jacks. ex Andrews mostró coeficientes de variación entre 6 y 16%, de manera que compuestos fenólicos totales (CFT) presentó el coeficiente de variación más bajo (6.72%), asimismo, taninos totales (TT) tuvo el coeficiente de variación más alto (15.50%). De igual manera, se identificaron diferencias altamente significativas en las variables evaluadas ($P < 0.001$) (Cuadro 16).

Cuadro 16. Medias y coeficientes de variación de las cuatro variables fitoquímicas evaluadas en *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews en tres sitios de colecta de la Huasteca hidalguense, México.

Variable	Media	Coeficiente de variación	Cuadrados medios	
			Colecta	Error
Compuestos fenólicos totales	2.4000	6.7209	2.7678***	0.0260
Taninos condensados	0.4412	10.1029	0.1152***	0.0020
Taninos totales	1.9875	15.4971	2.1734***	0.0949
Flavonoides	0.7534	11.5422	0.8929***	0.0076

* $P < 0.0001$

Se realizó una prueba de medias (Prueba de Tukey, $\alpha = 0.05$) a las variables evaluadas, de acuerdo con esto se pudo observar que los compuestos fenólicos totales (CFT) y flavonoides (Flav) mostraron mayor variación en las colectas evaluadas, donde la colecta de Contepec (S8) tuvo la mayor concentración de CFT (2.61 mg g⁻¹ MS), mientras que la colecta de Huizotlaco (S2) mostró la concentración más baja (2.00 mg g⁻¹ MS).

Con respecto a flavonoides, la colecta de Coacuilco (S4) presentó la concentración más alta en este grupo de fitoquímicos (0.97 mg g⁻¹ MS), seguida de la colecta Huizotlaco (S2) con 0.71 mg g⁻¹ MS y finalmente por Contepec (S8), la cual mostró una concentración de 0.59 mg g⁻¹ MS (Cuadro 17). Taninos condensados (TT) y taninos totales (TC) fueron las variables con menor variación al mostrar concentraciones de

0.38-0.51 mg g⁻¹ MS y 1.67-2.30 mg g⁻¹ MS, respectivamente, de esta manera Coacuilco (S4) fue la colecta con mayor concentración en TT, TC y Flav (Cuadro 17).

Cuadro 17. Prueba de medias para las variables fitoquímicas evaluadas en *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews en tres sitios de colecta de la Huasteca hidalguense, México.

Colecta	Fitoquímico			
	Compuestos fenólicos totales (mg g ⁻¹ MS)	Taninos condensados (mg g ⁻¹ MS)	Taninos totales (mg g ⁻¹ MS)	Flavonoides (mg g ⁻¹ MS)
Huizotlaco	2.00 ^b	0.38 ^a	2.03 ^a	0.71 ^{ba}
Coacuilco	2.58 ^{ba}	0.51 ^a	2.30 ^a	0.97 ^a
Contepec	2.61 ^a	0.42 ^a	1.67 ^a	0.59 ^b

Letras distintas por columna indican diferencia estadística de acuerdo a la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$)

En relación con la interacción de fitoquímicos con respecto a los tejidos vegetales evaluados se determinó que los compuestos fenólicos totales (CFT) mostraron mayor variación con un rango de concentración de 1.35-6.03 mg g⁻¹ MS siendo la vaina beneficiada quien presentó una concentración mayor, mientras que en hoja se detectó la concentración menor. Por otra parte, taninos condensados (TC) se detectaron en un rango de concentración de 0.33-0.82 mg g⁻¹ MS, predominando su concentración en vainas beneficiadas (0.82 mg g⁻¹ MS), seguido de hoja (0.41 mg g⁻¹ MS), tallo (0.36 mg g⁻¹ MS) y flor (0.33 mg g⁻¹ MS).

Por último, la presencia de taninos totales (TT) fue más evidente en hoja (3.55 mg g⁻¹ MS) y tallos (0.36 mg g⁻¹ MS) al tener las concentraciones más altas, en contraste con la concentración en flor (0.66 mg g⁻¹ MS) y vainas beneficiadas (0.49 mg g⁻¹ MS), las cuales mostraron los valores más bajos. Se determinó también que la mayor concentración de flavonoides se presentó en hoja (1.03 mg g⁻¹ MS) seguido de vainas beneficiadas (0.90 mg g⁻¹ MS); así mismo, tallo y flor mostraron una concentración similar con 0.50 mg g⁻¹ MS y 0.56 mg g⁻¹ MS, respectivamente (Cuadro 18).

Cuadro 18. Prueba de medias de fitoquímicos para hoja, tallo, flor y vaina beneficiada de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrew de la Huasteca hidalguense, México.

Tejido vegetal	Fitoquímico			
	Compuestos fenólicos totales (mg g ⁻¹ MS)	Taninos condensados (mg g ⁻¹ MS)	Taninos totales (mg g ⁻¹ MS)	Flavonoides (mg g ⁻¹ MS)
Hoja	1.35 ^d	0.41 ^b	3.55 ^a	1.03 ^a
Tallo	1.62 ^c	0.36 ^c	2.18 ^b	0.50 ^c
Flor	2.36 ^b	0.33 ^c	0.66 ^c	0.56 ^c
Vaina beneficiada	6.03 ^a	0.82 ^a	0.49 ^c	0.90 ^b

Letras distintas por columna indican diferencia estadística de acuerdo a la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

Al analizar el contenido de fitoquímicos en cada colecta se detectó que en la colecta de Huizotlaco (S2) la mayor concentración de CFT se identificó en vaina beneficiada (5.80 mg g⁻¹ MS) al mostrar un contenido de aproximadamente cuatro veces el contenido en hoja, tallo y flor, de igual manera, la concentración de taninos condensados (TC) se hizo más evidente en vaina beneficiada (0.70 mg g⁻¹ MS) al mostrar una concentración de casi 2.5 la de tallo (0.28 mg g⁻¹ MS) y flor (0.30 mg g⁻¹ MS).

A su vez, el tejido que mostró la mayor concentración de TC fue la hoja (4.34 mg g⁻¹ MS), mientras que la vaina beneficiada indicó la concentración más baja (0.28 mg g⁻¹ MS); también se observó que la hoja presentó mayor concentración de flavonoides con 1.01 mg g⁻¹ MS, seguido de vaina beneficiada con 0.92 mg g⁻¹ MS.

En la colecta de Coacuilco (S4) se observó que la vaina beneficiada tuvo la concentración más alta de CFT (5.98 mg g⁻¹ MS), no obstante, las concentraciones en tallo y flor mostraron valores de casi dos veces lo indicado en la colecta S2. Respecto a la concentración de TC la vaina beneficiada presentó la mayor concentración con 0.79 mg g⁻¹ MS, mientras en TT el tallo tuvo la mayor concentración con 4.21 mg g⁻¹ MS y de manera contrastante la vaina beneficiada mostró la concentración más baja.

Al igual que en la colecta S2, la hoja tuvo la mayor concentración de flavonoides al mostrar 1.16 mg g⁻¹ MS, seguido de tallo (0.96 mg g⁻¹ MS), vaina beneficiada (0.88 mg g⁻¹ MS) y flor (0.66 mg g⁻¹ MS).

Asimismo, se determinó que la vaina beneficiada (6.31 mg g⁻¹ MS) y la flor (2.92 mg g⁻¹ MS) colectada en Contepec (S8) tuvo la concentración más alta de CFT de las tres colectas evaluadas, esta misma condición se aplicó para la concentración de TC en vaina beneficiada al presentar 0.97 mg g⁻¹ MS. Por su parte, el tejido que mostró mayor concentración de TT fue la hoja con 3.49 mg g⁻¹ MS, por último, vaina beneficiada (0.90 mg g⁻¹ MS) y hoja (0.88 mg g⁻¹ MS) mostraron concentraciones similares en cuanto a la concentración de flavonoides (Cuadro 19).

Cuadro 19. Cuantificación de metabolitos secundarios en hoja, tallo, flor y vaina beneficiada de tres colectas (S2, S4 y S8) de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews de la Huasteca hidalguense, México.

Tejido vegetal	Compuestos fenólicos totales (mg g ⁻¹ MS)	Fitoquímico		Flavonoides (mg g ⁻¹ MS)
		Taninos condensados (mg g ⁻¹ MS)	Taninos totales (mg g ⁻¹ MS)	
Huizotlaco (S2)				
Hoja	1.04 ^d	0.39 ^b	4.34 ^a	1.01 ^a
Tallo	1.19 ^c	0.28 ^c	1.63 ^b	0.36 ^c
Flor	1.44 ^b	0.30 ^c	0.36 ^c	0.59 ^b
VB	5.80 ^a	0.70 ^a	0.28 ^c	0.92 ^a
Coacuilco (S4)				
Hoja	1.57 ^d	0.45 ^{bc}	2.72 ^b	1.16 ^a
Tallo	2.00 ^c	0.53 ^b	4.21 ^a	0.96 ^{ab}
Flor	2.73 ^b	0.35 ^c	0.58 ^c	0.66 ^c
VB	5.98 ^a	0.79 ^a	0.53 ^c	0.88 ^b
Contepec (S8)				
Hoja	1.32 ^d	0.39 ^b	3.49 ^a	0.88 ^a
Tallo	1.68 ^c	0.26 ^c	1.19 ^b	0.32 ^c
Flor	2.92 ^b	0.33 ^c	1.03 ^b	0.44 ^b
VB	6.31 ^a	0.97 ^a	0.67 ^c	0.90 ^a

Letras distintas dentro de cada colecta por columna indican diferencia estadística de acuerdo a la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

Estudios realizados por López-Gutiérrez *et al.* (2014) en hojas de *Camelia sinensis* mencionan la presencia de flavonoides (catequinas) en concentraciones de 43 mg g⁻¹ de MS y de ácidos fenólicos (ácido clorogénico) 0.003 mg g⁻¹ de MS, lo cual, en comparación al contenido de estos fitoquímicos en *V. planifolia* Jacks. ex Andrews muestra que los tejidos evaluados, principalmente la vaina beneficiada poseen una importante función antioxidante para el organismo. Ya que aunque la concentración de

flavonoides no es tan alta como en *Camelia sinensis*, la concentración de compuestos fenólicos si es notablemente mayor.

Asimismo, de acuerdo con lo reportado por Ene-Obong *et al.* (2016) en frutos de *Cola pachycarpa* colectados en zonas geográficas distintas, se observaron diferencias en la concentración de compuestos fenólicos (0.03 y 0.02 mg g⁻¹), flavonoides (4.71 y 6.62 mg g⁻¹) y taninos (0.19 y 0.23 mg g⁻¹), lo cual indica que el ambiente fue un factor importante en estas diferencias. De acuerdo con esto, *V. planifolia* Jacks. ex Andrews tiene gran potencial como nutracéutico debido a su alto contenido de fenoles y taninos en comparación a *C. pachycarpa*, aunado a esto, se determinó que en las colectas de la Huasteca hidalguense, el ambiente fue uno de los principales factores de variación.

Específicamente la colecta más alejada geográficamente, en la zona de estudio, fue la que mostró mayor concentración de fitoquímicos. Con lo cual puede considerarse que se trata de plantas con características más silvestres, o bien, que está sometida a condiciones de estrés que favorece la síntesis de estos compuestos para proteger las diferentes estructuras que conforman la planta.

3.3.4 Distribución de la variación de variables fitoquímicas

Con base en el análisis de componentes principales se determinó que con los primeros dos componentes principales se explica aproximadamente 97% de la variación total; de esta manera el primer componente principal (CP1) explicó aproximadamente 62% de la variación total e incluyó a las variables de concentración de compuestos fenólicos totales (CFT) y taninos totales (TT), mientras que el segundo componente (CP2) explicó 35% de la variación y considera la concentración de taninos condensados y flavonoides como principales variables (Cuadro 20).

Cuadro 20. Valores propios, proporción de la variación total y variación acumulada de las variables aromáticas en las dos dimensiones de la caracterización de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews de la Huasteca hidalguense, México.

Variable	COMPONENTES PRINCIPALES (CP)	
	CP1	CP2
Compuestos fenólicos totales	0.632892	-0.055796
Taninos totales	0.605328	0.204982
Taninos condensados	-0.431607	0.594241
Flavonoides	0.216198	0.775724
Valor propio	2.481529	1.400125
Proporción variación total	0.6204	0.3500
Variación acumulada	0.6204	0.9704

Los valores marcados en negritas indican las variables que presentan mayor influencia en cada componente principal

La distribución espacial de los tejidos vegetales evaluados definida por los dos primeros componentes principales determinó que los tejidos con mayor concentración de compuestos fenólicos totales y taninos totales se localizan en el grupo GII localizado en la parte superior del gráfico de acuerdo con el CP1; asimismo, en la región positiva del CP2 se localizó el grupo GIII, el cual se caracterizó por mostrar la mayor concentración de flavonoides y taninos condensados, mientras que el grupo GI presentó la menor concentración de estos fitoquímicos (Figura 9).

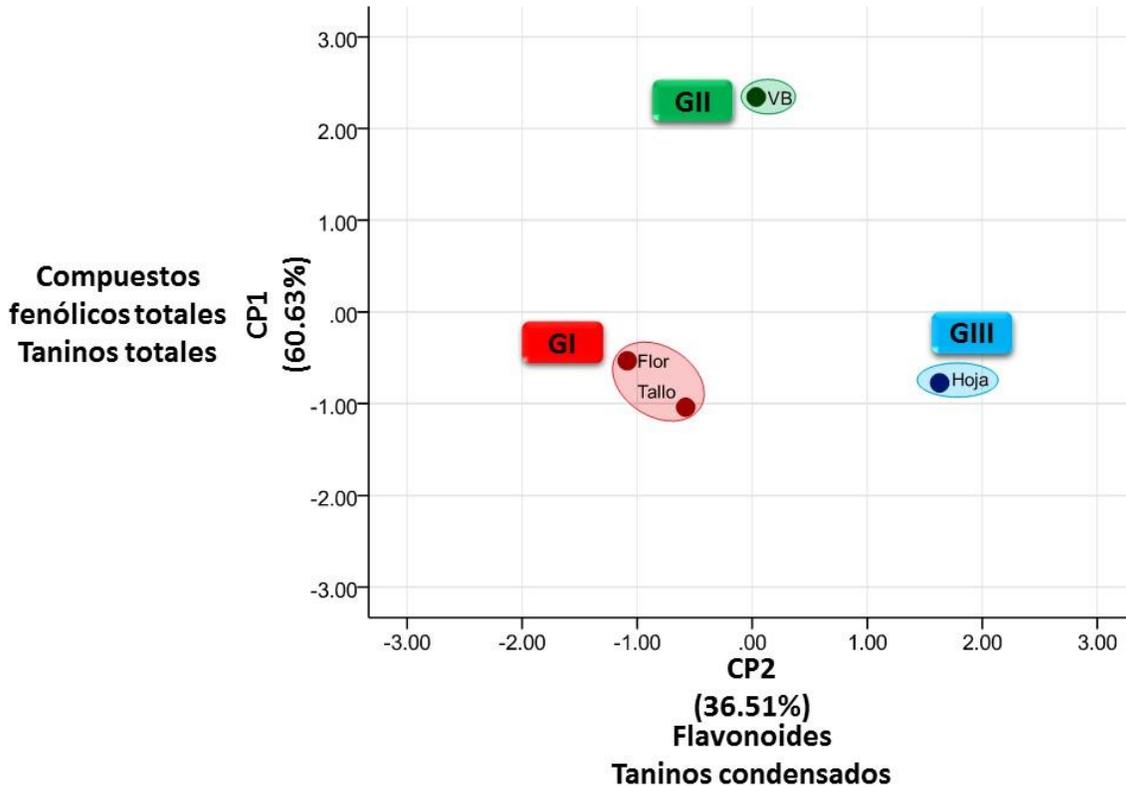


Figura 9. Dispersión de cuatro tejidos vegetales sitios de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews de la Huasteca hidalguense, México basada en los dos primeros componentes principales de análisis de cuatro variables fitoquímicas agrupadas por medias poblacionales.

A través del análisis de conglomerados se determinó la formación de dos grupos, de esta manera, el primer grupo conformado por las colectas S2 y S8 mostró la mayor y menor concentración de compuestos fenólicos totales, respectivamente, así como los valores más bajos en taninos totales y condensados y flavonoides. Por otra parte, la colecta S4 conformó el segundo grupo, el cual se caracterizó por mostrar la concentración más alta de taninos totales y condensados así como de flavonoides (Figura 10).

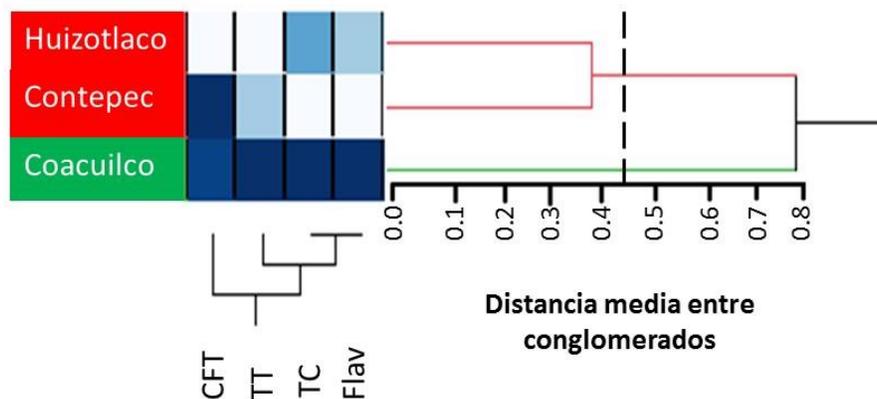


Figura 10. Dendrograma de tres sitios de colecta de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews en la Huasteca hidalguense, México basado en el promedio de cuatro variables fitoquímicas y agrupado por similitud de distancias. La intensidad en el color indica valores más altos en cada variable.

3.4 Conclusiones

Por medio de los análisis realizados fue posible obtener un tamiz fitoquímico a través del cual se determinó la composición de *V. planifolia* Jacks. ex Andrews. La prueba por agentes cromógenos detectó la presencia de fitoquímicos en extractos de metanol, de forma notable en la colecta de Coacuilco (S4). La presencia de saponinas en tejidos vegetales frescos sólo se hizo evidente en hoja y tallo, mientras que alcaloides y taninos sólo se observó en forma de trazas en todas las colectas.

Las pruebas de cromatografía en capa fina fueron de utilidad para complementar y confirmar la presencia de los diferentes grupos de metabolitos, de igual manera, flavonoides, saponinas y terpenos se presentaron de forma más evidente; mientras que en las pruebas para alcaloides, taninos y ácidos fenólicos se observaron sólo algunas bandas de coloraciones tenues debido a su baja presencia en los tejidos evaluados.

En relación a los tejidos vegetales, tallo y flor mostraron semejanza en la concentración de los fitoquímicos evaluados. La vaina beneficiada se caracterizó por tener la mayor concentración de compuestos fenólicos y taninos totales, por su parte, la hoja tuvo mayor concentración de flavonoides y taninos condensados.

Las colectas S2 y S8 mostraron semejanza en el contenido de fitoquímicos, no obstante, S8 destacó por la alta concentración de compuestos fenólicos totales, taninos totales y condensados en vaina beneficiada. Mientras que, la colecta S4 mostró la mayor concentración de taninos totales, taninos condensados y flavonoides de las colectas evaluadas y en menor proporción compuestos fenólicos totales.

3.5 Literatura citada

- Ávalos-García, A., y Pérez-Urria Carril, E. (2009). Metabolismo secundario de las plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), 119-145.
- Barrón, R.M., García, M.R., Soto, M.R., Colinas, T., y Kite, G. (2011). Flavonoides y actividad antioxidante de *Calia secundiflora* (Ort.) Yakovlev. *Fitotecnia Mexicana*, 34(3), 151-157.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., y Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 161, 839-851.
- Campos-Vega, R., y Oomah B. D. (2013). Chemistry and classification of phytochemicals. En B.K. Tiwari, N.P. Brunton, C.S. Brennan. *Handbook of Plant Food Phytochemicals. Sources, Stability and Extraction* (7-41 pp). Wiley-Blackwell. United Kingdom.
- Carvajal-Rojas, L., Hata-Urbe, Y., Sierra-Martinez, N., y Rueda-Niño, D. (2009). Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de cupatá (*Strychnos schultesiana* Krukoff). *Revista Colombiana Forestal*, 12, 161-170.
- Crozier, A., Jaganath, I.B., y Clifford, M.N. (2006). Phenols, polyphenols and tannins: An overview. En A. Crozie, M.N. Clifford, H. Ashihara. *Plant Secondary Metabolites* (1-22 pp). Blackwell Publishing, United Kingdom.
- De la Cruz-Chacón, I., y González-Esquinca, A.R. (2009). Biotecnología aplicada a la producción de metabolitos secundarios. *Lacandonia, Revista Ciencias UNICACH*, 3(2), 59-65.
- Ene-Obong, H.N., Okudu, H.O., y Asumugha, U.V. (2016). Nutrient and phytochemical composition of two varieties of Monkey kola (*Cola parchycarpa* and *Cola lepidota*): An underutilized fruit. *Food Chemistry*, 193, 154-159.
- Fox, Ellen M., y Howlett, B.J. (2008), Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Current Opinion in Microbiology*, 11, 481-487.

- Hamuel-Doughari, J. (2012). Phytochemicals: Extraction methods, basic structures and mode of action as potential chemotherapeutical agents. En V. Venketeshwer. *Phytochemicals- A global perspective of their role in nutrition and health* (1-33 pp). Intech.
- Kabera, J.N., Semana, E., Mussa, A.R., y He, X. (2014a). Plant secondary metabolites: Biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2, 377-392.
- Kabera, J., Tuyisenge, R., Ugirishuti, V., Nyirabageni, A., y Munyabuhoro, S. (2014b). Preliminary investigation of anthelmintic activity and phytochemical screening of leaf crude extracts of *Tithonia diversifolia* and *Tephrosia vogelii*. *African Journal of Microbiology Research*, 8(25), 2449-2457.
- Kanisawa, T., Tokoro, K., y Kawahara, S. (1994). Flavour development in the beans of *Vanilla planifolia*. En K. Kurihara, N. Suzuki y H. Ogawa. *Proceeding of the International Symposium*, Springer, Tokyo, 268-270.
- Khoddami, A., Wilkes, M.A., y Roberts, T.H. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18, 2328-2375.
- López-Gutiérrez, N., Romero-González, R., Plaza-Bolaños, P., Martínez-Vidal, J.L., y Garrido-Frenich, A. (2014). Identification and quantification of phytochemicals in nutraceutical products from green tea by UHPLC-Orbitrap-MS. *Food Chemistry*, 173, 607-618.
- Mandal, S.M., Chakraborty, D., y Dey, S. (2010). Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant Signaling and Behavior*, 5(4), 359-368.
- Mazid, M., Khan, T.A., y Mohammad, F. (2011). Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and Medicine*, 3(2), 232-249.
- Musharof-Hossain, M. (2011). Therapeutic orchids: traditional uses and recent advances-An overview. *Fitoterapia*, 82, 102-140.
- Pagare, S., Bhatia, M., Tripathi, N., Pagare, S., y Bansal, Y.K. (2015). Secondary metabolites of plants and their role: Overview. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 9(3), 293-304.
- Palama, T.L., Fock, I., Choi, Y.H., Verpoorte, R., y Kodja, H. (2010). Biological variation of *Vanilla planifolia* leaf metabolome. *Phytochemistry*, 71, 567-573.
- Palama, T.L., Khatib, A., Choi, Y.H., Come, B., Fock, I., Verpoorte, R., y Kodja, H. (2011). Metabolic characterization of Green pods from *Vanilla planifolia*

- accessions grown in La Réunion. *Environmental and Experimental Botany*, 72, 258-265.
- Pérez-Alonso, N., y Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. *Bioteología Vegetal*, 11(4), 195-211
- Porter, L.J., Hrstich, L.N., y Chan, B.J. (1986). The conversion of proanthocyanidins and prodelphinidins to cyaniding and delphinidin. *Phytochemistry*, 25, 223-230.
- SAS. (2002). SAS/STAT. User guide, version 9.0. SAS Institute Inc, North Carolina.
- Saxena, M., Saxena, J., Nema, R., Singh, D., y Gupta, A. (2013). Phytochemistry of medicinal plants. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1(6), 168-182.
- Schäfer, H., y Wink, M. (2009). Medicinally important secondary metabolites in recombinant microorganisms or plants: Progress in alkaloid biosynthesis. *Biotechnology Journal*, 4, 1684-1703.
- Sepúlveda-Jiménez, G., Porta-Ducoing, H., y Rocha-Sosa, M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3), 355-363.
- Shanmugavalli, N., Umashankar, V., y Raheem. (2009). Antimicrobial activity of *Vanilla planifolia*. *Indian Journal of Science and Technology*, 2(3), 37-40.
- Sun, R., Sacalis, J.N., Chin, C.K., Still, C.C. (2001). Bioactive aromatic compounds from leaves and stem of *Vanilla*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 5161-5164.
- Walton, N.J., Mayer, M.J., y Narbad, A. (2003). Molecules of interest: Vanillin. *Phytochemistry*, 63, 505-515.
- Wink, M. (2010). Introduction. En M. Wink. *Annual plant review. Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites* (1-16 pp). Wiley-Blackwell, United Kingdom.
- Wink, M., y Schimmer, O. (2010). Molecular modes of action of defensive secondary metabolites. En *Annual plant reviews. Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites*. Second edition, Wiley-Blackwell. 21-137.

CAPÍTULO IV. CONOCIMIENTO EN EL USO DE *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews EN LA HUASTECA HIDALGUENSE, MÉXICO

Resumen

Vanilla planifolia Jacks. ex Andrews es una especie de gran importancia cultural y económica en México, especialmente en la región Totonacapan, no obstante, aún es escasa la información referente al conocimiento tradicional de esta especie; por tal motivo, el objetivo de este capítulo fue realizar una investigación exploratoria para conocer el origen de la vainilla cultivada en la Huasteca hidalguense así como el conocimiento tradicional en el uso y aprovechamiento de la planta de vainilla. Para ello se aplicó una entrevista a 14 productores de vainilla de los municipios de Atlapexco, Huejutla de Reyes y Jaltocán en la cual se abordaron aspectos del cuidado y origen de la planta que actualmente cultivan así como el uso y aprovechamiento de la especie. Los resultados indicaron un conocimiento de la planta de vainilla de aproximadamente tres generaciones, es decir, aproximadamente 100 años, la importancia de la vainilla para los productores de la Huasteca hidalguense recae en el aspecto económico (81%), de conservación de la especie (13%) y utilidad del fruto (6%). Algunos aspectos del manejo son el encausamiento de guía, el chapeo de maleza, la polinización tanto manual como natural y la combinación de ambas; los principales tutores utilizados son naranjo (*Citrus x sinensis*), cojón de gato (*Tabernaemontana alba* Miller), guacima (*Guazuma ulmifolia*), chalahuite (*Inga jinicuil* Schlechtenda), jonote (*Heliocarpus appendiculatus*), chaká (*Bursera simaruba*) y zapote (*Manilkara zapota*). El uso y aprovechamiento de la planta está enfocado al comercio de las vainas ya sea verdes o secadas al sol, en la elaboración de bebidas y postres. Con base en lo mencionado en las entrevistas, el origen de la vainilla en Hidalgo en su mayoría no es conocido, sin embargo, algunos productores afirmaron haber realizado la compra de esquejes en Xiquila, Hidalgo y Poza Rica, Veracruz. Lo anterior indica que el conocimiento respecto al manejo, uso y aprovechamiento de la vainilla en Hidalgo se encuentra en etapa incipiente.

Palabras clave: conocimiento tradicional, Hidalgo, uso, *Vanilla planifolia*.

4.1. Introducción

La vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews), además de ser uno de los saborizantes de mayor importancia a nivel mundial y ser utilizada en diversas industrias (Correll 1953; ASERCA 2000), está considerado uno de los cultivos más rentables de los trópicos cálidos (Soto-Arenas y Dressler 2010).

Originaria de México y Centroamérica, el cultivo de la vainilla se ha extendido a países como Madagascar, Indonesia y La Reunión, entre otros; sin embargo, su historia comienza en la época precolombina y está innegablemente ligada a los indios totonacos que habitaron cerca de la región de Papantla (Veracruz), teniendo como primeros reportes de la presencia de vainilla en México los escritos de Bernardino de Sahagún en 1529. No obstante, se considera que la vainilla data del periodo en que los aztecas conquistaron al imperio totonaco a finales del siglo XV, siendo ofrecida como uno de los más raros tributos otorgados al emperador azteca Moctezuma (Bruman 1948; Correll 1953).

Puesto que el uso de la vainilla se remonta a la época precolombina se considera que los mayas, los totonacos y, posteriormente los aztecas, fueron los primeros en dar utilidad a la vainilla (Gamboa-Gaitán 2014). Según Karner (2007), en sus inicios, los totonacos obtenían los frutos de la orquídea sólo mediante la recolecta de ejemplares silvestres, una vez que éste desarrollaba su aroma de manera natural solía ser utilizado como aromatizante en el hogar, no necesariamente por su sabor y por tanto no tenía uso comestible.

En náhuatl llamada "*tlil-xochitl*" (flor negra), en totonaco "*xanaŋ*" (flor) y en maya "*zizbic*" los totonacos comenzaron a utilizar la vainilla como aromatizante de bebidas, más tarde los aztecas la utilizaron para aromatizar una bebida que denominaban "*xocolatl*", la cual era exclusiva de la nobleza y los guerreros (Bruman 1948; Musalem 2002; Caso-Barrera y Aliphath-Fernández 2006) y podía incluir además otros ingredientes como maíz, miel y chile (Karner 2007).

Otras formas de uso además de aromatizante, eran curativos, de apreciación estética y en la realización de rituales (Bruman 1948), de tal forma que una de las principales

interpretaciones dadas a la vainilla al ser ofrecida como ofrenda a los dioses era la de mantenerse a salvo de cualquier peligro puesto que los dioses les brindarían protección (Karner 2007). Posteriormente, algunos otros usos eran mediante la decocción de las vainas usándola como diurético, para tratar la dismenorrea, histeria, dispepsia y evitar la caries dental, entre otros beneficios nutracéuticos en México (Bruman 1948; Gurnani *et al.* 2014).

El comienzo de la comercialización de la vainilla se dio únicamente con la recolección, por lo cual no existía un ciclo agrícola, ni se conoce con claridad el área geográfica que abarcaba su recolección en sus inicios. Sólo se tienen breves referencias coloniales de recolección, además de Veracruz, en Tabasco, Oaxaca, Campeche, la Región del Soconusco y Guatemala. De manera que durante el siglo XVI la demanda de vainilla solía ser baja y principalmente interna por lo cual no era significativa desde la perspectiva comercial (Kouri 2013).

Por otra parte, modificaciones en el cultivo de vainilla como el inicio de la polinización manual, trajo como consecuencia importantes cambios tanto en la economía como en las tradiciones y la cultura alrededor de la vainilla, puesto que comenzó una segmentación de labores para el cuidado de la planta al considerarse la polinización como una actividad exclusiva de las mujeres, en especial de aquellas jóvenes y castas (ASERCA 2000).

De igual manera, la disminución en el uso de vainilla por parte de los grupos indígenas durante cerca de medio siglo derivó en la pérdida de su nombre nativo, ya que en los primeros años posteriores a la conquista el nombre “*tlixochitl*”, que era común para hacer referencia a dicha especie, cambió su nombre a finales del siglo hasta conocerla con su actual nombre, “vainilla” (Bruman 1948).

Todas estas características en conjunto permitieron que la vainilla llegara a convertirse lentamente en un símbolo que definía su vida cultural, de tal modo que la cosmovisión de los pueblos totonacos y su explicación del universo en sí giraba en torno a la relación entre el hombre y la naturaleza como convivencia, de manera que los elementos presentes en la naturaleza encarnaban en deidades. Por ello, los indígenas totonacos realizaban rituales de agradecimiento o permiso para poder recolectar las

vainas, razón por la cual, se le consideraba una actividad místico-religiosa a tal grado que surgieron leyendas en torno a su origen que logró convertir a la vainilla en un producto emblemático a nivel no sólo regional, sino nacional e internacional (ASERCA 2000; González-Martínez 2011).

No obstante, entre los totonacos la vainilla no mostró una importancia real hasta que se convirtió en un producto comercial a inicios del siglo XVIII teniendo los principales informes que documentan la importancia comercial de la vainilla en 1743, cuando los indios totonacos recolectaban las vainas maduras de las plantas silvestres para ser vendidas a un grupo de compradores, quienes posteriormente las beneficiaban, empero, las ventas solían ser pequeñas y con una baja remuneración (Bruman 1948).

A lo largo del siglo XVIII y parte de los siglos XIX y XX, la historia de Papantla se consideraba una parte inseparable de la historia propia de la vainilla, puesto que la producción y comercialización de vainilla llegó a ser para esta región y sus alrededores uno de los principales lazos sociales, ya que como consecuencia de estas actividades se inició una etapa de transformación e impulso económico que iba de la mano del desarrollo comercial de la vainilla, es decir, al evolucionar la economía vainillera también evolucionaban las relaciones sociales entre las poblaciones involucradas (Kouri 2013).

Bajo este contexto, durante 1826 el cultivo de vainilla pasó de ser una actividad primaria a ser el producto de mayor valor económico para la población papanteca, ya que resultaba más rentable que la explotación de otros productos como el tabaco (*Nicotiana tabacum*), la grana cochinilla (*Dactylopius coccus*) y el añil (*Indigofera* sp.), motivo por el cual en ese momento se le consideraba el “diamante de la economía agrícola mexicana” (Kouri 2000).

Cabe destacar que a pesar del aislamiento de algunas zonas productoras de vainilla como Papantla (para México) ciertamente se encontraba conectada con otras partes del mundo a través del comercio internacional, cuyo vínculo era la vainilla, de esta manera la orquídea se convirtió en el principal producto negociable de la región (Kouri 2013).

Debido a sus características sensoriales, de producción y oferta, la vainilla tiene actualmente una alta cotización internacional con precios en el mercado internacional de entre 150-200 mil dólares por tonelada de vainilla beneficiada. Sin embargo, gran parte de su importancia también radica en generar fuente de trabajo, en especial en la temporada de floración ya que la polinización es manual y genera de 300 a 600 jornales anuales por hectárea (Comité Estatal del Sistema Producto Vainilla de Oaxaca A.C. 2013-14).

Aunado a esto, gran parte de su relevancia económica se basa en la versatilidad de usos ya que la vainilla es uno de los productos de especial interés puesto que puede ser utilizada tanto para saborizar o aromatizar una gran diversidad de productos o alimentos y además ser utilizada para la elaboración de artesanías (Delgado-Calderón y García-Díaz 2011).

Estas formas de aprovechamiento y usos potenciales de la vainilla, así como de otras especies, surgen a partir del conocimiento tradicional de los grupos indígenas, a su vez, este conocimiento tiene un origen local basado en las características lingüísticas, botánicas, zoológicas y agrícolas en las que la información es obtenida principalmente de la naturaleza y la relación de esta con el ser humano y su entorno, así como de la experiencia (Díaz-Bautista *et al.* 2008).

De esta manera el conocimiento tradicional contribuye a la conservación de una especie, ya que es más un proceso social que biológico, por lo que los grupos indígenas son importantes aliados para la conservación de la naturaleza, ya que además de su interés de conservación y preservación constituyen la base de sus creencias y cultura (Toledo *et al.* 2002). Por tanto, la supervivencia de las culturas y el conocimiento derivado de ellas son algunos de los factores de mayor relevancia para asegurar la conservación de una especie determinada y de la diversidad biológica (Casas 2005; Díaz-Bautista *et al.* 2008).

Parte importante de la conservación de una especie se ve reflejada en la presencia de ejemplares silvestres, sin embargo, en el caso de la vainilla su distribución original o natural no es del todo clara, por lo cual resulta una tarea compleja estimar los especímenes silvestres y los escapados. En México se ha puntualizado la localización

de ejemplares silvestres en Oaxaca, Veracruz, Chiapas, San Luís Potosí, el Sur de Quintana Roo (cerca de la frontera con Belice) y posiblemente algunos especímenes aislados en Tabasco (Soto-Arenas 1999), desconociendo hasta ahora la posibilidad de encontrar en otros sitios aptos para su cultivo ejemplares silvestres de vainilla, como es el caso de Hidalgo.

Por tal motivo, dado que el estado de Hidalgo ha comenzado a destacar en la producción de vainilla, específicamente en la región Huasteca y no ha sido objeto de estudio respecto al conocimiento tradicional, usos potenciales y origen de la vainilla cultivada en esta región, el objetivo de este trabajo se centró en realizar una investigación exploratoria en la Huasteca hidalguense mediante entrevistas a productores de vainilla, a través de las cuales se trató de conocer la procedencia de la vainilla cultivada por ellos, así como la importancia y usos potenciales que dicha especie presenta a fin de generar posibles estrategias encaminadas a la difusión del conocimiento que tiene los habitantes de la Huasteca hidalguense.

4.2. Materiales y métodos

4.2.1 Área de estudio

El estado de Hidalgo se ubica geográficamente 21° 24' al norte, 19° 36' al sur de latitud norte, 97° 58' al este y 99° 53' de longitud oeste, representando aproximadamente 1.1% de la superficie total de México. Colinda al norte con Querétaro, San Luís Potosí y Veracruz; al este con Veracruz y Puebla; al sur con Puebla, Tlaxcala y el Estado de México; y al oeste con México y Querétaro (INEGI 2014).

Por su parte, la región Huasteca localizada al noreste de Hidalgo abarca 10 de los 84 municipios que conforman el estado (San Felipe Orizatlán, Jaltocán, Huejutla de Reyes, Atlapexco, Huautla, Xochiatipan, Yahualica, Huazalingo, Calnali y Tlanchinol) que representan aproximadamente 9.5% de la superficie total de Hidalgo (IMTA 2007); puesto que dicha entidad federativa es un territorio multiétnico y, por tanto, multicultural, aproximadamente 23.27% de la población es de origen indígena distribuido en pueblos otomís, nahuas y tepehuas (SAGARPA 2011), de forma que en

la Huasteca predominan las poblaciones nahuas ya que 9 de cada 10 habitantes hablan náhuatl (Escobar-Ohmstede 2008).

Su clima cálido-templado permite el desarrollo de cultivos tanto comerciales como para autoconsumo tales como plátano, tamarindo, mamey, cacao, café, caña de azúcar, maíz, chile, frijol, cítricos así como vainilla (Madueño-Paulette 2000); mientras que cultivos como los cítricos o el café muestran una gran importancia económica, la vainilla no ha sido relevante para la población huasteca.

Por tal motivo, se realizó una investigación descriptiva mediante una entrevista, en la cual se incluyeron preguntas abiertas y cerradas a través de las cuales se obtuvo información respecto al conocimiento que tienen los productores del cultivo de vainilla, su uso y aprovechamiento así como algunos aspectos del manejo.

4.2.2 Fuentes de información

La información acerca de los usos potenciales, conocimiento tradicional y origen de la vainilla cultivada en la Huasteca hidalguense se obtuvo a partir de la técnica de bola de nieve o cadena debido a que actualmente no existen registros de productores de vainilla en la región, mediante esta técnica se identificaron los individuos calificados como potenciales informantes que condujeron a otros productores (Galeano-Marín 2004).

A los productores seleccionados se les aplicó una entrevista semiestructurada, guiada por un conjunto de preguntas básicas aplicada en forma de conversación informal en la que se dialoga de forma semejante a una conversación y preguntas insertadas (Valles-Martínez 2007). La aplicación se realizó de manera individual a 14 productores de vainilla mayores de 18 años pertenecientes a tres municipios.

En el Cuadro 21 se presenta la lista de municipios y el número de entrevistas aplicadas en cada uno, siendo Huejutla de Reyes el municipio con mayor número de entrevistas realizadas, dada una mayor cercanía geográfica con Veracruz y por tanto podría aportar información relevante.

Cuadro 21. Municipios de Hidalgo y número de entrevistas realizadas respecto al uso, conocimiento tradicional y origen de la vainilla.

Localidad	Municipio	Entrevistas realizadas
Huizotlaco (S2)	Atlapexco	4
Poxtla (S11)	Huejutla de Reyes	8
Tlanepantla (S14)	Jaltocán	2

Dado que en la Huasteca hidalguense la lengua indígena predominante es el náhuatl, 21% de las entrevistas (3 entrevistas) fueron realizadas en náhuatl en Huejutla de Reyes con ayuda de un traductor oriundo de la región, mientras que las restantes (79%) se realizaron en español a pesar de que las personas tenían origen náhuatl.

Entrevista: Las entrevistas se realizaron a partir de un cuestionario que incluyó 12 preguntas que abarcan tres aspectos (Ver Anexo L):

1. Conocimiento general de la especie, nombre nativo y tiempo de conocer la especie.
2. Importancia que tiene la vainilla de acuerdo a su criterio, partes de la planta con usos potenciales, frecuencia de uso y cómo aprendió a utilizarla.
3. Origen de la vainilla cultivada en la región y manejo de la especie.

La aplicación de entrevistas se llevó a cabo en la segunda semana de Mayo de 2015 considerando que era temporada de floración y por tanto una de las de mayor actividad para los productores de vainilla. En la Figura 11 se muestra el mapa del área de estudio así como la ubicación de los municipios en que se realizaron las entrevistas.

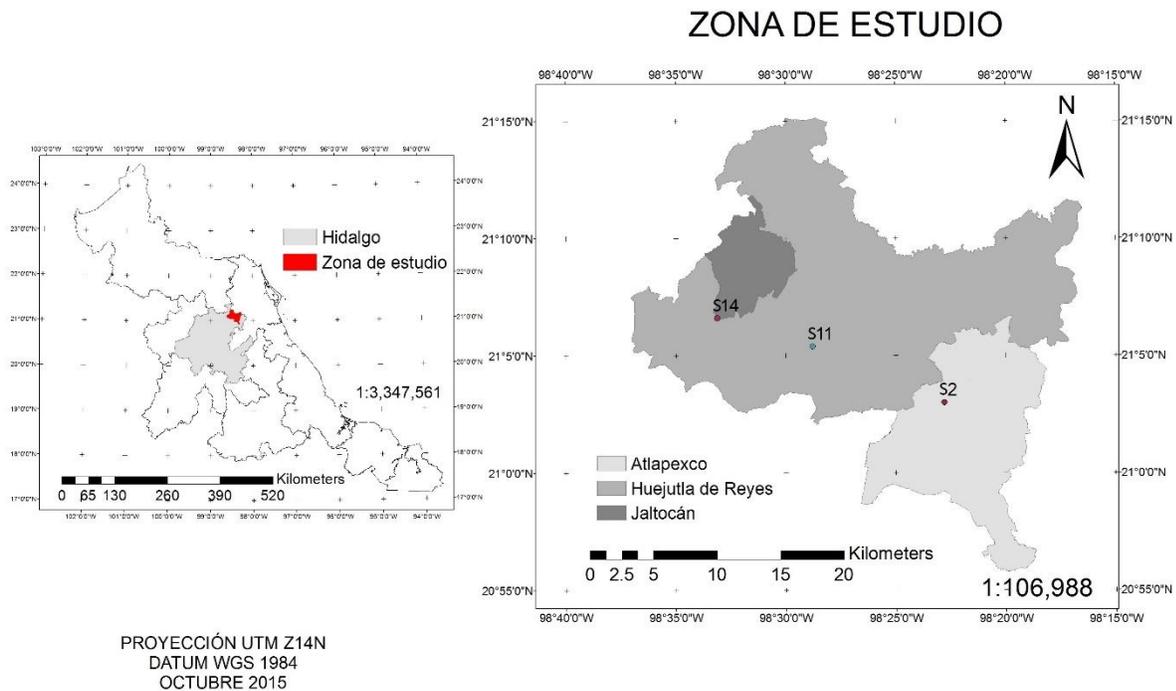


Figura 11. Ubicación de los municipios en que se aplicaron las entrevistas en estado de Hidalgo, México.

4.2.3 Análisis de la información

La información obtenida a través de las entrevistas fue codificada en una base de datos en Excel, posteriormente se realizó un análisis descriptivo de la información con base en los comentarios de los entrevistados y la obtención de porcentajes, los cuales se expresaron mediante gráficas de barras a fin de simplificar la comprensión de la información.

4.3 Resultados y discusión

Los resultados mostraron que el intervalo de edad de los entrevistados osciló entre 33 y 77 años y que han habitado toda su vida en su lugar de origen. Hay que considerar que la principal actividad económica de la Huasteca es la agricultura, sus pobladores cultivan principalmente alimentos de subsistencia como el maíz, el frijol o el café, sin embargo, a pesar de que la zona tiene las condiciones propicias para el cultivo de vainilla, no se considera un producto con importancia económica ya que requiere la

inversión de recursos tanto económicos como de labor, además de ser delicada y requerir mayor cuidado, con poca rentabilidad.

Bajo este contexto, la mayor parte (57%) de los entrevistados considera que el precio de venta es bajo en comparación a otras regiones productoras de vainilla como Papantla, ya que en años anteriores el kilogramo de vaina verde sólo alcanzó un precio de venta de entre \$ 1.0-2.0 USD Kg⁻¹. Por otra parte, el resto de los entrevistados (43%) considera que actualmente la vainilla tiene un precio aceptable, puesto que a pesar de tener pocos compradores, puede tener un costo de entre \$ 5 y 6.50 USD Kg⁻¹.

No obstante, aunque la mayoría de los entrevistados consideraron un precio bajo por la venta de frutos en verde, la mayor importancia de esta especie es económica dado que puede permitir un ingreso adicional considerando que puede obtenerse únicamente mediante recolección de las vainas.

De acuerdo a la Figura 12 la mayoría (81%) de los productores opinan que la vainilla tiene importancia económica (EC), mientras que 13% la considera importante desde la perspectiva de conservación de la especie (CE) y por tanto que debe incrementarse su cultivo, y una mínima parte (6%) atribuye su importancia a la utilidad del fruto (UF) (vainas maduras y secas) como saborizante y aromatizante de alimentos.

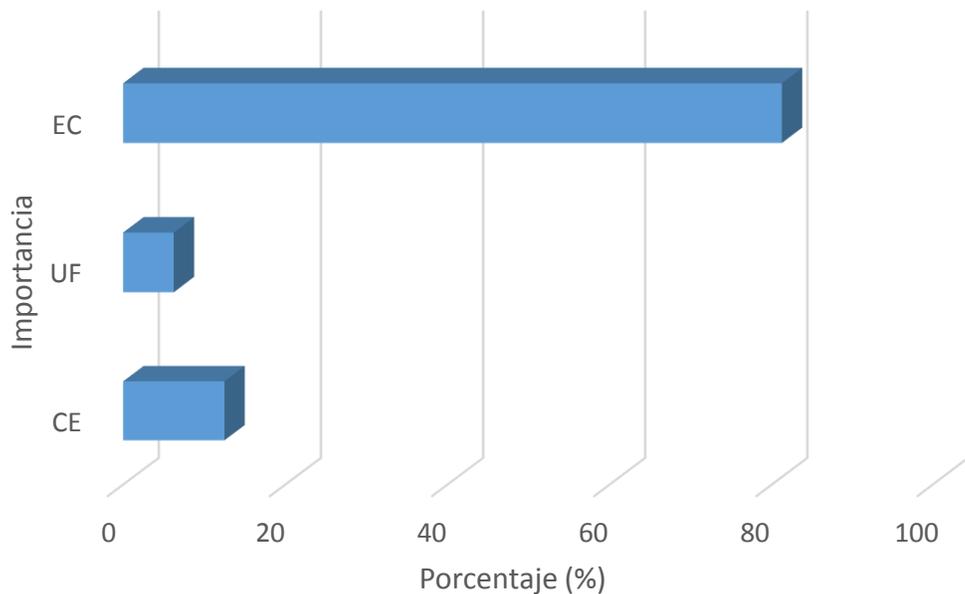


Figura 12. Principales aspectos de importancia para productores de vainilla en la Huasteca hidalguense, México. EC: importancia económica; UF: utilidad del fruto y CE: conservación de la especie (n=14).

Otro aspecto que complementa la importancia que la vainilla podría tener es el factor cultural alrededor de esta especie en la Huasteca, como se ha mencionado anteriormente el término “vainilla” fue adoptado después de la llegada de los españoles trayendo como consecuencia la pérdida de su nombre nativo (“*tlilxochitl*” en náhuatl) en muchas regiones. A pesar de que en la Huasteca los grupos indígenas predominantes son los nahuas, ninguno de los entrevistados (ni siquiera los de mayor edad) afirmó conocer el nombre nativo de la vainilla, lo cual es un claro ejemplo de la pérdida de conocimiento de la especie.

Respecto al tiempo que llevan los productores de conocer la vainilla, una parte (29%) mencionó que tiene entre 10 y 20 años de conocer la especie, 14% afirma conocerla entre 21 y 50 años, mientras que la mayoría (57%) afirmó conocerla desde su infancia, es decir, desde que tenían la edad suficiente para soportar el traslado de su hogar a donde podían encontrar la planta (Figura 13). Lo que sugiere que gran parte de la información respecto al nombre, cuidados básicos y usos de la vainilla fueron proporcionados por familiares, principalmente sus padres, abuelos o suegros.

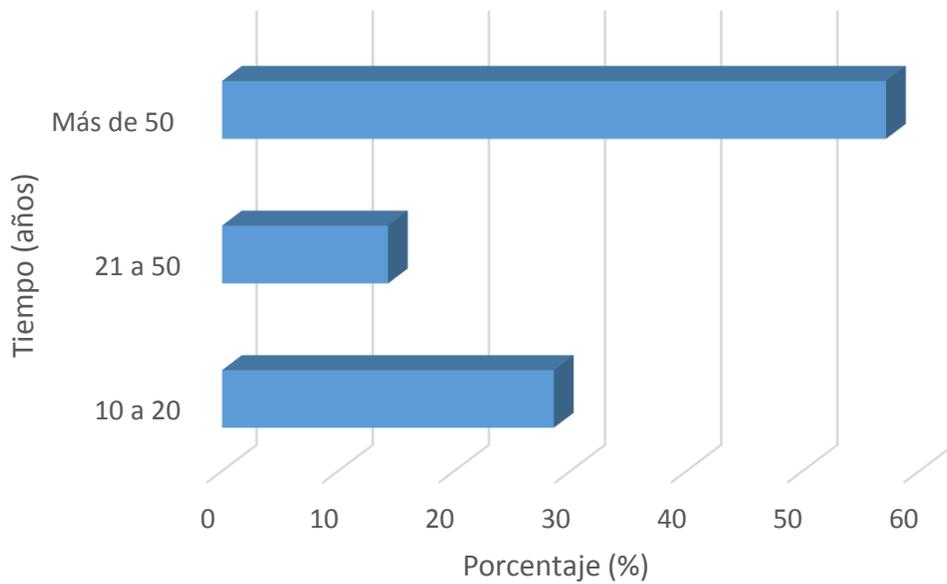


Figura 13. Tiempo de conocimiento de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews en la Huasteca hidalguense, México (n=14).

Con respecto al origen el origen de la vainilla cultivada en la Huasteca hidalguense, 93% de los entrevistados desconoce por completo de donde proviene su plantío, aunque suponen que es originaria de la zona, debido a que algunos de los entrevistados recuerdan haberla visto crecer en el monte de manera natural (sin ser aprovechada y sin cuidado alguno), o bien, cuando sus padres o abuelos mantenían algunas plantas de las cuales podían aprovechar las vainas. Lo cual lleva a estimar que la vainilla ha estado presente en la Huasteca de Hidalgo durante al menos tres generaciones, posiblemente hace cerca de 100 años.

De acuerdo con Bertolini *et al.* (2012), la presencia de vainilla (*Vanilla planifolia* J.) se reporta en los municipios de Huautla, Huejutla de Reyes y Orizatlán, no obstante, no hay registro de ello en ningún herbario a reserva de que la colección del herbario del Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (Herbario HGOM), que hace referencia a los riesgos de extinción de las orquídeas en Hidalgo, sin embargo, no menciona *Vanilla planifolia* (Chavarria-Olmedo y Ballesteros-Barrera 2013).

Un caso particular en Huizotlaco, Atlapexco quien mencionó que adquirió sus plantas en Xiquila, Hidalgo; mientras que otro de los productores conserva algunos ejemplares que su padre adquirió en Poza Rica cuando viajaba de Veracruz a Hidalgo.

Referente al apoyo o capacitación recibida para el cuidado de la vainilla, tanto la literatura como los entrevistados hacen referencia que entre los años 2000 y 2002 se emprendió una campaña de fomento y preservación de la vainilla (CONACYT-Gobierno del estado de Hidalgo 2001-2002), en la cual ingenieros de la SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación) y PSP's del ICATHI (Instituto de Capacitación para el Trabajo del Estado de Hidalgo) proporcionaron una breve capacitación en Huejutla y Pachuca acerca del cuidado que requiere la planta además de enseñarles el proceso de polinización manual de las flores de vainilla y de realizar la venta de esquejes aproximadamente a \$15.00 cada uno para su posterior siembra.

No obstante, a pesar de la información proporcionada a los productores referente a la polinización, años atrás, la mayoría de los entrevistados (64%) aún obtiene los frutos de la vainilla únicamente a través de la polinización natural, mientras que otros productores (29%) la obtiene combinando polinización natural y manual y sólo una mínima parte de los productores (7%) lo hacen mediante polinización manual (Figura 14).

Por otra parte, los principales tutores y prácticas agrícolas que utilizan los productores de vainilla en la Huasteca hidalguense son el naranjo (*Citrus x sinensis*), cojón de gato (*Tabernaemontana alba* Miller), guacima (*Guazuma ulmifolia*), chalahuite (*Inga jinicuil* Schlechtenda), jonote (*Heliocarpus appendiculatus*), chaká (*Bursera simaruba*) y zapote (*Manilkara zapota*), así como el control de maleza mediante el chapeo (limpiar la tierra de hierbas o maleza con el machete) y en algunos casos el encausamiento de guía para mantener las guías de la vainilla a dos metros de altura aproximadamente, para facilitar tanto la polinización como la cosecha de las vainas maduras, lo cual demuestra que el conocimiento respecto a la vainilla se encuentra en una etapa incipiente.

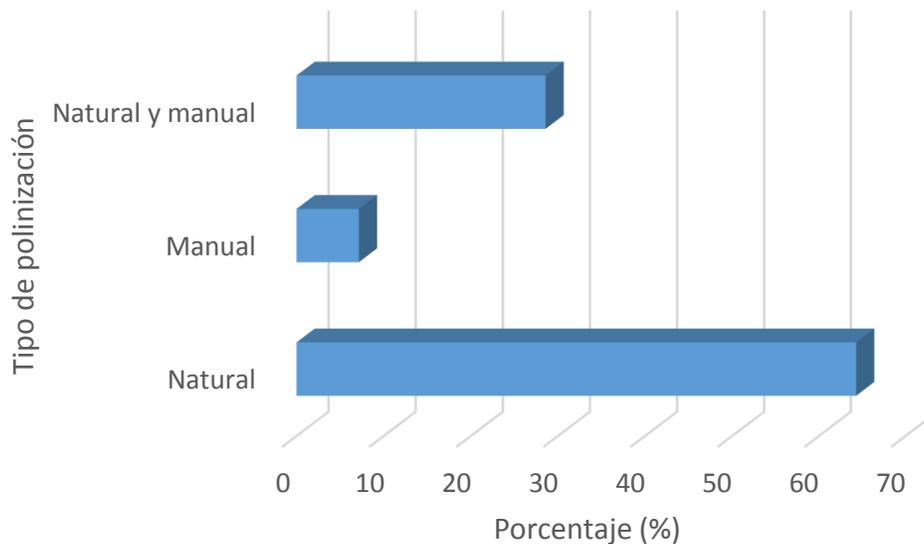


Figura 14. Tipos de polinización en flores de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews en la Huasteca hidalguense, México (n=14).

Asimismo, cabe destacar que tras la polinización de las flores se cosechan las vainas maduras para posteriormente venderlas, y debido a que desconocen el proceso de beneficiado es usual la venta de frutos en verde. Esta venta se realiza principalmente a los acopiadores de la región o personas interesadas en adquirir el producto, sin embargo, no es clara su área de distribución.

De acuerdo con la bibliografía, en 2011 se aprobó un programa de capacitación del cultivo de vainilla por parte de la Agencia de Gestión de la Innovación (AGI) denominada “Servicios para el desarrollo autogestivo de empresas sociales S.C.” (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Gobierno del estado de Hidalgo 2011), lamentablemente, no se dio el seguimiento necesario a este programa y en algunos de los casos los esquejes terminaron por secarse, lo cual generó desánimo en los productores para seguir con el cultivo de vainilla.

En la actualidad (2016) y de acuerdo con el Plan de Desarrollo Municipal de Hidalgo 2012-2016 se considera el destinar parte de los ingresos del estado para dar a conocer el Paquete Tecnológico para Cultivos Industriales, en el que está incluido la producción de esquejes o plántulas y asociación de vainilla con cultivos como el café en Huejutla de Reyes (H. Ayuntamiento de Huejutla de Reyes, Hidalgo 2012-2016).

Respecto a los usos potenciales de *V. planifolia* en la Huasteca hidalguense, Pérez y Villavicencio (2003) reportan que los principales usos dados a la vainilla son para la elaboración de postres como pan, pasteles, gelatinas, o vinos; no obstante, también ha mostrado un uso ornamental dado la belleza natural de la flor. De acuerdo con la información obtenida de las entrevistas respecto a los principales usos dados a los frutos de vainilla, una mínima parte (15%) la utiliza en la elaboración de postres como pan, gelatinas y productos helados como los denominados “bolis”.

Otra parte (30%) la usa en la elaboración de bebidas en forma de extractos en aguardiente, jerez, vinos y atole. Sin embargo, el uso de mayor importancia (55%) para los productores de vainilla en la Huasteca hidalguense fue la venta de vainas ya sea verde o deshidratada al sol (Figura 15). Es menos común, realizar la venta cuando la vaina está seca ya que pierde mucho de su peso tras la deshidratación lo cual se ve reflejado en un pérdida de ganancia.

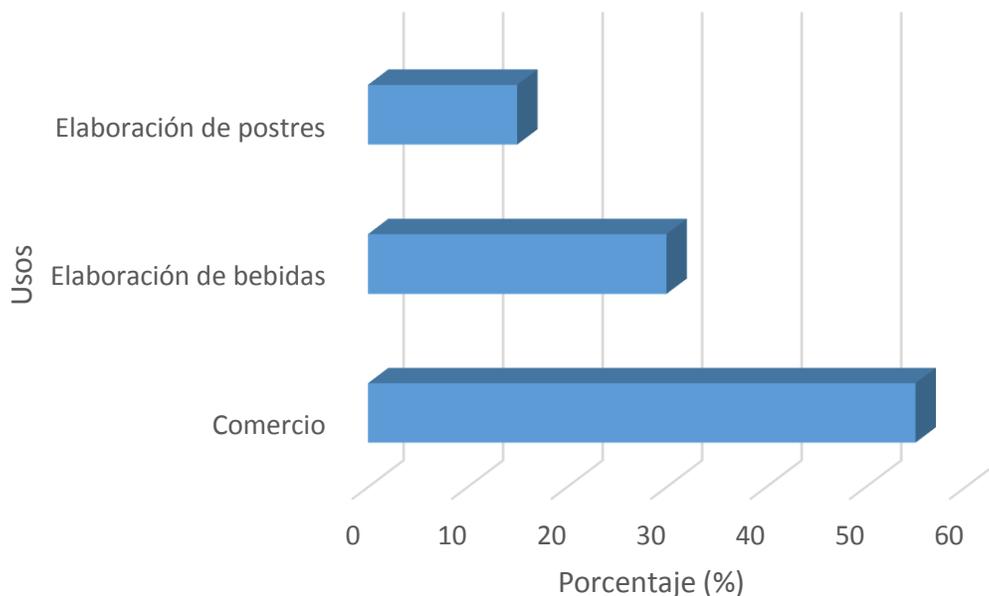


Figura 15. Principales usos de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews en la Huasteca hidalguense, México (n=14).

Por otro lado, en la Huasteca hidalguense la vainilla no presenta usos rituales, aunque en algunos casos llegó a mostrarse una apreciación estética, por lo cual únicamente las vainas han mostrado importancia de uso. A pesar de que Paredes-López *et al.* (2006)

menciona que la vainilla en Hidalgo tiene aplicaciones medicinales para el tratamiento de la fiebre y aliviar el dolor de vientre, los entrevistados no refirieron ningún uso a partes de la planta de vainilla como hojas, tallos o flores debido a la naturaleza irritante de su savia.

En la Huasteca hidalguense el conocimiento tradicional aplicado al cultivo de vainilla ha sido transmitido principalmente por familiares, sin embargo, los estudios son escasos; por lo que falta ampliar la investigación al respecto así como conocer a fondo las características de la vainilla cultivada en esta región, e incluso determinar si puede ser centro de origen y diversidad de la vainilla la huasteca de Hidalgo. Por otra parte, dado que en esta zona la vainilla tiene importancia primordialmente económica es preciso ahondar en temáticas como sistemas de manejo, tipos de beneficiado, medios de comercialización, conservación y usos para incrementar la productividad.

4.4 Conclusiones

El conocimiento de la vainilla como especie data de al menos tres generaciones, es decir, aproximadamente 100 años, en la Huasteca hidalguense; no obstante, no fue posible determinar la edad exacta de los vainillales dado que en su mayoría fueron heredados por padres y abuelos. Los aspectos que determinaron la importancia de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews para los productores en esta zona fueron principalmente el factor económico (81%), la conservación de la especie (13%) y en menor proporción la utilidad de las vainas (6%).

Los frutos de la planta de vainilla, es la única estructura de la planta con utilidad, de manera que 55% de los productores vende las vainas ya sea en verde o deshidratadas al sol, 30% elaboran bebidas o extractos y sólo 15% las utilizan en la elaboración de postres. Respecto a la vainilla que se cultiva en la Huasteca hidalguense, su procedencia no fue clara y sólo dos productores comentaron haberla obtenido del estado de Veracruz.

El conocimiento tradicional respecto al manejo o aprovechamiento de la especie se encuentra en una etapa inicial, puesto que es bajo el nivel de aprovechamiento de la especie, sólo se realizan actividades básicas de cuidado a la planta tales como chapeo

de maleza, encausamiento de guía y abonado mediante acumulación de materia orgánica. Además de que la mayoría de los productores (64%) obtienen los frutos de la vainilla sólo a través de la polinización natural, 29% combina polinización natural y manual y sólo 7% utiliza exclusivamente la polinización manual.

4.5 Literatura citada

ASERCA. (2000). De nuestra cosecha. La vainilla en México, una tradición con un alto potencial. *Claridades Agropecuarias*, 101, 2-42.

Bertolini, V., Damon, A., Luna-Tavera, F.R., y Rojas-Velázquez, A.N. (2012). Las orquídeas del valle del mezquital, Hidalgo (México), resultados preliminares. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, 11(2), 85-94.

Bruman, H. (1948). The culture history of Mexican Vanilla. *The Hispanic American Historical Review*, 28(3), 360-376.

Casas, A. (2005). El manejo tradicional y diversidad biológica, el caso del Xoconochtlí. CONABIO. *Biodiversitas*, 60, 1-6.

Caso-Barrera, L., y Aliphat-Fernández, M. (2006). Cacao, vanilla and annatto: three production and Exchange systems in the Southern Maya Lowlands, XVI-XVII centuries. *Journal of Latin American Geography*, 5(2), 29-52.

Chavarria-Olmedo, Y. J., y Ballesteros-Barrera, C. (2013). Extinción y orquídeas de Hidalgo, México. *Boletín de divulgación del herbario HGOM*, 1(1), 26-28 p.

Comité Estatal del Sistema Producto Vainilla de Oaxaca A.C. (2013-14). Informe final del proyecto. Comité estatal del sistema producto vainilla. SAGARPA. 22 p.

CONACYT-Gobierno del estado de Hidalgo. (2002-01). Demanda específica. Área 1. Cadena alimentaria agropecuaria. SAGARPA, 25 p.

Correll, D.S. (1953). Vanilla: Its botany, history, cultivation and economic importance. *Economic Botany*, 7(4), 291-358.

Delgado-Calderón, A., y García-Díaz, B. (2011). Las culturas Veracruzanas en el siglo XX. En M. Aguilar-Sánchez, J. Ortiz-Escamilla. *Historia general de Veracruz*, (pp 617-665). Veracruz, México. Secretaría de Educación-Gobierno del Estado de Veracruz.

Díaz-Bautista, M., Herrera-Cabrera, B.E., Ramírez-Juárez, J., Aliphat-Fernández, M., y 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(8), 610-615.

- Escobar-Ohmstede, A. (2008). Las huastecas, ¿De qué tipo de “regiones” hablamos? *Península*, 3(2), 97-125.
- Galeano-Marín, M.E. (2004). El diseño en la investigación social cualitativa. En M.E. Galeano-Marín (pp 35). *Diseño de proyectos en la investigación*. Fondo Editorial Universidad EAFIT, Medellín, Colombia.
- Gamboa-Gaitán, M.A. (2014). Vainillas colombianas y su microbiota. II. Diversidad, cultivo y microorganismos endófitos. *Universitas Scientiarum*, 19(3), 287-300.
- González-Martínez, J. (2011). Veracruz. Perfiles regionales, económicos y poblacionales. En M. Aguilar-Sánchez, J. Ortiz-Escamilla. *Historia general de Veracruz*, (pp 19-55). Veracruz, México. Secretaría de Educación-Gobierno del Estado de Veracruz.
- Gurnani, N., Kapoor, N., Mehta, D., Gupta, M., y Mehta, B.K. (2014). Characterization of chemical group and identification of novel volatile constituents in organic solvents extracts of cured Indian vanilla beans by GC-MS. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 22(5), 769-776.
- H. Ayuntamiento de Huejutla de Reyes, Hidalgo. (2012-2016). Plan de desarrollo municipal. Gobierno del Estado de Hidalgo, 174 p.
- INEGI. (2014). Anuario estadístico y geográfico de Hidalgo 2013. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. México.
- Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA). (2007). El agua en la huasteca hidalguense. Problemática y perspectivas para su manejo sustentable. *Gaceta del IMTA, SAGARPA*, 8, 1-7.
- Karner, J. (2007). Vanilla lands. En J. Karner (pp 6-10). *The biography of vanilla*, Crabtree Publishing Company, Canada.
- Kouri, E.H. (2000): La vainilla de Papantla: Agricultura, comercio y sociedad rural en el siglo XIX. *Signos Históricos*, 1(3), 105-130 p.
- Kouri, E.H. (2013). El cultivo y comercio de la vainilla mexicana. En E. Kouri (pp 23-64). *Un pueblo dividido. Comercio, propiedad y comunidad en Papantla, México*. Fondo de cultura económica. México.
- Madueño-Paulette, R. (2000). La Huasteca hidalguense: pobreza y marginación social acumulada. *Sociológica*, 15(44), 97-131.
- Paredes-López, O., Guevara-Lara, F., y Bello-Pérez, L.A. (2006). Otras exquisiteces mesoamericanas. En O. Paredes-López, F. Guevara-Lara y L.A. Bello-Pérez (pp

- 129). *Los alimentos mágicos de las culturas indígenas*. Fondo de Cultura Económica, México D.F.
- Pérez-Escandón, B. E., y Villavicencio-Nieto, M.A. (2003). Plantas útiles del estado de Hidalgo III. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Centro de Investigaciones Biológicas. Pachuca, Hidalgo, México. 237 p.
- SAGARPA. (2011). Resultados del estudio de Diagnóstico Sectorial en el estado de Hidalgo 2010. SAGARPA 1-125 p.
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Gobierno del Estado de Hidalgo. (2011). Resultados de la convocatoria 2011 para la selección de agencias de gestión de la innovación (AGI's) en el estado de Hidalgo. SAGARPA, 1 p.
- Soto-Arenas, M.A. (1999). Filogeografía y recursos genéticos de las vainillas de México. Instituto Chinoín AC. Informe Final SNIM-CONABIO proyecto No. J101, México, D.F.
- Soto-Arenas, M.A., y Dressler, R.L. (2009). A revision of the Mexican Central American species of *Vanilla plumier* ex Miller with a characterization of its region of the nuclear ribosomal DNA. *Lankesteriana*, 9(3), 285-354.
- Toledo, V.M., Alarcón-Chaires, P., Miguel, P., Olivo, M., Cabrera, A., Leyequien, E., y Rodríguez-Aldabe, A. (2002). Biodiversidad y pueblos indios. *Biodiversitas*, 7(43), 1-16.
- Valles-Martínez, M.S. (2007). Fundamentos metodológicos de las entrevistas cualitativas. En M.S. Valles-Martínez. (pp 38-39). *Cuadernos metodológicos. Entrevistas cualitativas*. Centro de Investigaciones Sociológicas. Madrid, España.

CONCLUSIONES GENERALES

Para México, la vainilla (*Vanilla planifolia*) representa uno de los recursos genéticos que definen y enmarcan una parte importante de su cultura y diversidad biológica, no obstante, enfrenta diversos retos que comprometen su conservación, ya que de acuerdo con la NOM-059-ECOL-2001, la vainilla es una especie en riesgo.

Estos factores de riesgo incluyen cambios climáticos, reproducción limitada, lento crecimiento del fruto y el alto costo comparativamente con el de los saborizantes artificiales que ha afectado la demanda y consumo de vainilla natural.

Dado que México es centro de origen y diversidad de la vainilla, su conservación se hace una tarea obligada que involucra diversas disciplinas que en conjunto permitan atender las necesidades creadas alrededor de su mantenimiento, sobrevivencia y reproducción además de las relaciones existentes en el contexto social y biológico.

De esta manera, la investigación realizada en la Huasteca hidalguense representa una importante fuente de información a través de la cual es posible ahondar en las características de la planta de vainilla, así como el conocimiento que los productores tienen de este cultivo respecto a su aprovechamiento y manejo; estas características en conjunto constituyen la base de futuras investigaciones.

Con base en lo anterior y los análisis realizados se diferenciaron cuatro grupos en la calidad de vainas beneficiadas con distintas características fisicoquímicas, definidos por la firmeza, dimensiones, concentración de azúcares solubles totales, color y pH. Las colectas con vainas más firmes, dulces y de mayor tamaño se localizaron en su mayoría en la región noroeste de la Huasteca hidalguense (Ichcatepec, Tlanepantla y Coacuilco).

Además se diferenciaron cuatro grupos de acuerdo con la proporción de compuestos aromáticos, se determinó que las vainas colectadas en San Isidro (S5) y Tezóhual (S13) presentan un aroma más ahumado, mientras que las colectadas en Ichcatepec (S6) y Contepec (S7) tienen un aroma más avainillado y, por tanto, poseen una mejor calidad aromática.

Por otra parte, se determinó que los principales grupos de fitoquímicos en las diferentes estructuras de *Vanilla planifolia* fueron flavonoides expresándose de forma más evidente en extractos de vainas beneficiadas en metanol así como en extractos de hojas y flores en metanol y cloroformo. La presencia de saponinas fue más evidente en extractos de hojas y tallos en cloroformo y menor en vainas beneficiadas.

De igual manera, la presencia de terpenos fue mayor en las vainas beneficiadas en metanol así como en hojas y tallos en cloroformo, no obstante, taninos, alcaloides y ácidos fenólicos se encontraron en proporciones sumamente bajas que impiden identificarlos a través de estas pruebas.

Se observó que hoja, tallo y flor presentaron concentraciones similares al mostrar un rango de concentración de 1.35-2.36 mg g⁻¹ MS de compuestos fenólicos totales y 0.33-0.41 mg g⁻¹ MS de taninos totales, también se determinó que la colecta de Coacuilco (S8) tuvo la mayor concentración de fitoquímicos, principalmente en hoja y vaina beneficiada.

Con relación al conocimiento local, se destaca que aunque la vainilla es conocida en la región desde hace aproximadamente 100 años, no obstante, en su mayoría desconocen la procedencia de las plantas; ya que principalmente fueron plantaciones heredadas por familiares, quienes también les enseñaron a dar utilidad a las vainas.

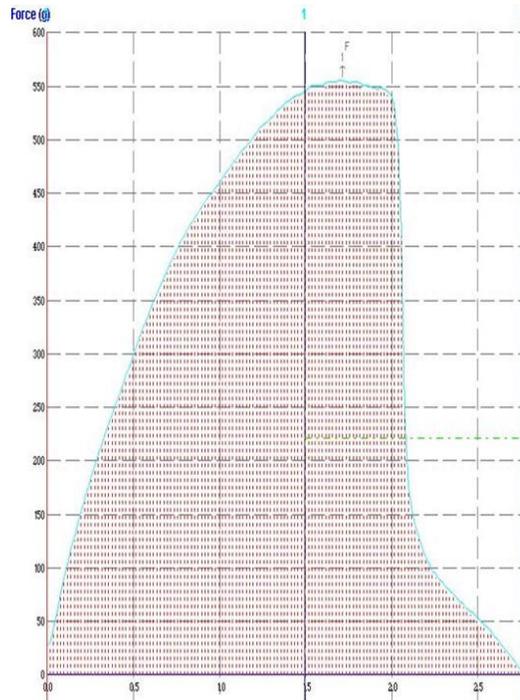
Bajo este contexto cabe destacar que los principales aspectos de importancia para la vainilla en la Huasteca hidalguense son el económico, puesto que representa una fuente de ingresos para los productores; seguido de la conservación de la especie y la utilidad del fruto. En este aspecto, los principales usos dados a la vainilla son la elaboración de bebidas y postres,

Por otra parte, es preciso mencionar que el manejo dado a la vainilla se encuentra en etapa incipiente, puesto que en su mayoría las principales actividades encaminadas al cuidado de la planta son el chapeo de arvenses y encausamiento de guía; no obstante, el 7% de los productores entrevistados realizan polinización manual.

Bajo este contexto, cabe destacar que aunque la región de la Huasteca hidalguense tiene las condiciones climáticas adecuadas para el cultivo de la vainilla, es necesario implementar estrategias para incentivar su producción, capacitación en los usos y aprovechamientos de esta especie, que por su demanda en el mercado nacional e internacional, puede ser una opción que mejore las condiciones de los pequeños y medianos productores de la región.

ANEXOS

Anexo A. Evaluación de firmeza en vainas beneficiadas de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews. a) Gráfica de punto máximo de flexión en vainas beneficiadas de *V. planifolia* Jacks. ex Andrews. b) Texturómetro midiendo firmeza en vainas beneficiadas de *V. planifolia* Jacks. ex Andrews.



a)



b)

Anexo B. Mezcla de reacción en placa para cuantificación de azúcares solubles totales

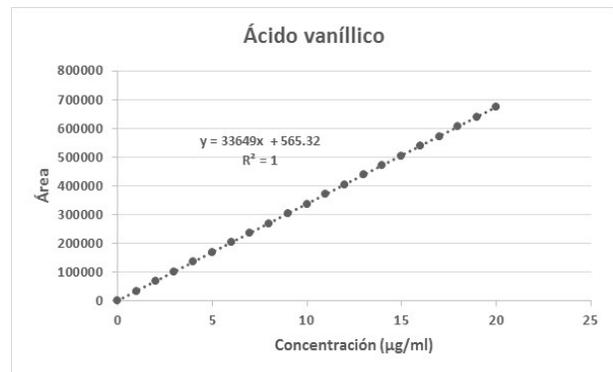
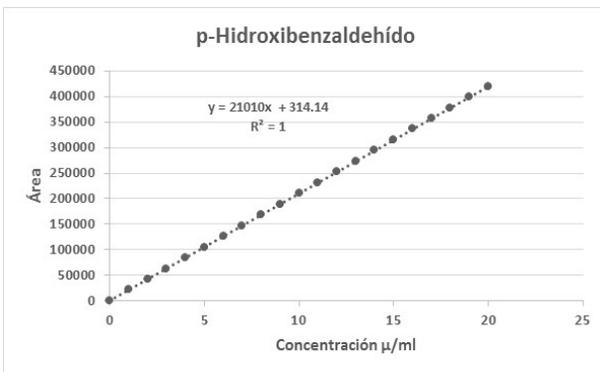
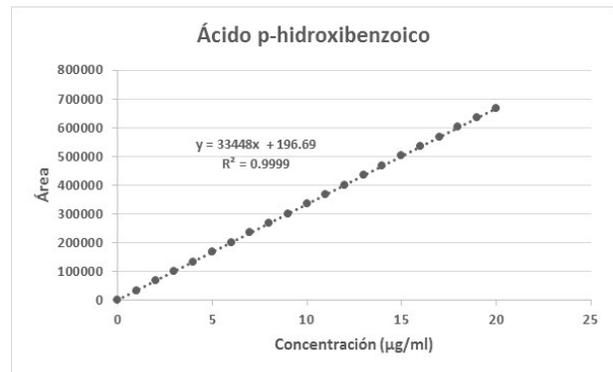
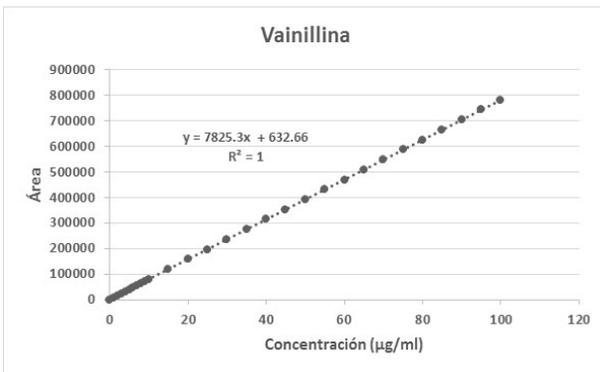
- 200 μ L HEPES 100 mM a pH 7.5
- 10 μ L NAD 40 mM
- 10 μ L ATP 100 mM a pH 7
- μ L Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
- 10 μ L Extracto o Standard

Anexo C. Obtención de extracto de vaina beneficiada de *V. planifolia* Jacks. ex Andrews.

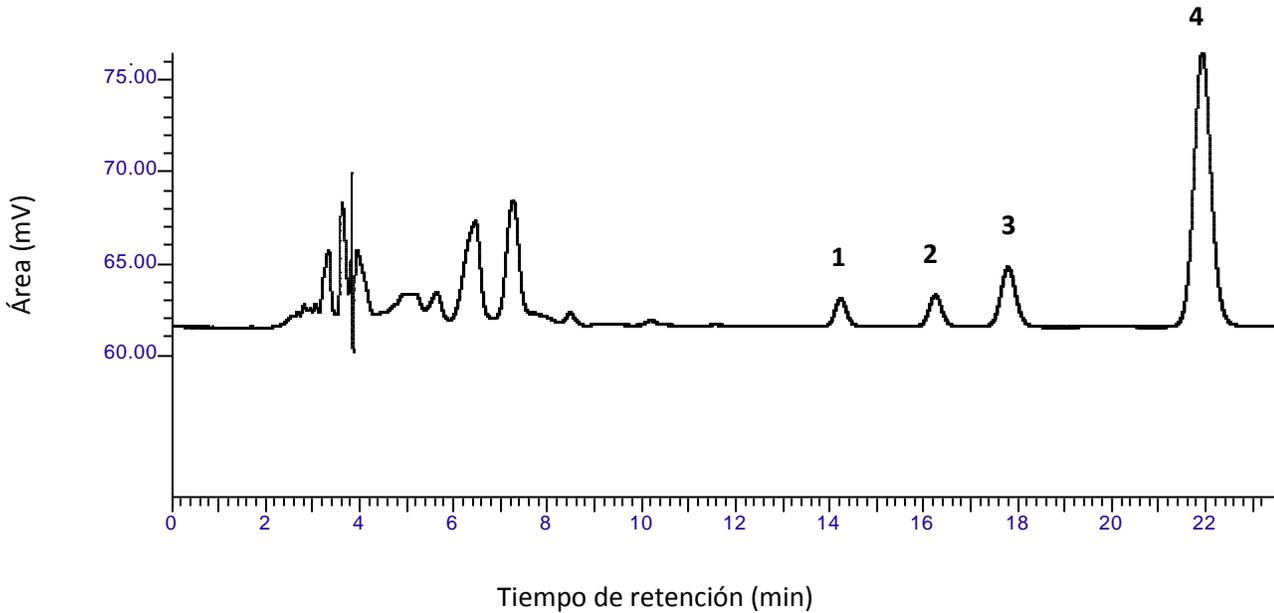
1. Se pesaron 50 mg de vaina beneficiada molida y se colocaron en un tubo de ensaye

2. Se agregaron 3 mL de etanol al 80% y se colocaron en baño de agua caliente a 80 °C durante 10 minutos manteniendo el alcohol en ebullición
3. Se retiró el extracto y se colocó en un vaso de precipitado
4. Se realizaron cuatro lavados a la muestra, agregando en cada lavado tres mililitros de etanol al 80%.
5. Los extractos se colocaron en estufa de aire forzado a 60 °C durante 24 horas.
6. Transcurridas las 24 horas, las muestras se re-suspendieron en 2 mL de agua.

Anexo D. Curvas de calibración de los cuatro principales compuestos del aroma en vainas beneficiadas de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews.



Anexo E. Cromatograma de los cuatro principales compuestos aromáticos en vainas beneficiadas de vainilla. (1) Ácido *p*-hidroxibenzoico, (2) *p*-hidroxibenzaldehído, (3) Ácido vanílico, (4) Vainillina



Anexo F. Coeficientes de correlación y significancia en variables físicas, químicas y aromáticas

Cuadro F.1. Coeficientes de correlación y significancia de variables químicas y aromáticas.

Variables		r	P
Aw	C4	-0.3505	0.0060
	ΣCM	-0.3471	0.0066
Humedad	C4	-0.4469	0.0003
	ΣCM	-0.4608	0.0002
pH	C4	-0.3582	0.0050
	ΣCM	-0.3756	0.0031
Sacarosa	C3	0.6685	<.0001
	C4	0.4545	0.0003
	ΣCM	0.4728	0.0001
	C3/C4	0.5631	<.0001

Cuadro F.2. Coeficientes de correlación y significancia de variables físicas aromáticas

Variables		r	p
Croma	C4	-0.4550	0.0002
	ΣCM	-0.4507	0.0003
Firmeza/Ancho	C4	-0.3447	0.0070
	ΣCM	-0.3411	0.0077
Firmeza/Longitud	C4	-0.3376	0.0083
	ΣCM	-0.3326	0.0094
Longitud	C1	-0.3867	0.0023
	C2	-0.4169	0.0009
	C3	-0.4816	<.0001
	C3/C4	-0.4224	0.0008
Grosor	C3	-0.4439	0.0004
	C3/C4	-0.3659	0.0040

Anexo G. Identificación de metabolitos secundarios mediante pruebas por agentes cromógenos en tejidos vegetales (hoja, tallo y flor) de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews.

G.1. Identificación de flavonoides

Testigo: Quercetina 2.5 mg mL⁻¹

G.1.1. Prueba de HCl+Mg⁺²

- Colocar 100 µL de muestra y 200µL de HCl concentrado, adicionar un trozo de cinta de magnesio.
- La formación de espuma rojiza es indicativa de la presencia de flavonoides.

G.1.2. Prueba de NH₄OH/UV

- Agregar 100 µL de muestra y 100 µL de NH₄OH en un tubo de ensaye.
- Observar en lámpara UV a 365 nm
- La prueba positiva presentará fluorescencia

G.1.3. Prueba de HCl 4N + NaOH 10%

Testigo: Quercetina 0.5 mg mL⁻¹

- Agregar 100 µL de muestra y 200 µL de NaOH al 10%, se observará un color amarillo intenso

- b) Adicionar 300 μL de HCl 4N
- c) La solución incolora indica una prueba positiva

G.2. Identificación de saponinas

Testigo: Saponina reactivo

G.2.1. Prueba de Fehling

Preparación de reactivos para 25 mL de reactivo de Fehling

- a) Solución A: disolver 6.4 g de sulfato de cobre en 50 mL de agua.
- b) Solución B: disolver 176 g de tartrato sódico potásico y 77g de NaOH en 500 mL de agua.
- c) Para usarse se juntan soluciones A y solución B (1:1).
- d) Colocar 150 μL de muestra.
- e) En otro tubo con la mezcla 1:1, tomar 1mL de reactivo de Fehling y 0.5 mL de Na_2CO_3 a 5%
- f) Colocar en baño de agua (cuando este al punto de ebullición)/30 minutos.
- g) La presencia de un precipitado rosa indicará una prueba positiva

G.2.2. Prueba de Rosenthaler

- a) Colocar 100 μL de muestra, 50 μL de reactivo de Rosenthaler y 50 μL de H_2SO_4
- b) Prueba positiva presenta coloración violeta

G.2.3. Índice afrosimétrico o Prueba de espuma

- a) Colocar un fragmento del tejido de interés en 3 veces su volumen de agua en un tubo de ensaye.
- b) Agitar en vórtex de 30 segundos a 1 minuto.
- c) La formación de espuma en la superficie indica la presencia de saponinas.

G.3. Identificación de taninos

Testigo: Ácido tánico 1.65 mg mL^{-1}

G.3.1. Prueba de FeCl_3

- a) Agregar 100 μL de muestra y 40 μL de FeCl_3 al 5%
- b) Una coloración azul oscuro a negro verdoso indica una prueba positiva

G.3.2. Prueba de acetato de plomo al 2%

- a) Colocar 100 μL de muestra y 40 μL de acetato de plomo al 2%
- b) Prueba positiva muestra la presencia de un precipitado blanco

G.4. Identificación de terpenos

Testigo: Clavo

G.4.1. Prueba de Liberman-Burchard

- a) Colocar 100 μL de muestra, 100 μL de cloroformo y 100 μL de anhídrido acético
- b) Reposar en frío
- c) Agregar 18 μL de H_2SO_4
- d) La presencia de coloración verde azulado indica presencia de triterpenos.

G.4.2. Prueba de Salkowski

- a) Adicionar 100 μL de muestra, 100 μL de cloroformo y 100 μL de H_2SO_4
- b) Una coloración rojo azulado o cherry indica prueba positiva

G.5. Identificación de alcaloides

Testigo: *Lupinus*

G.5.1. Prueba de Dragendorff

- a) Colocar 100 μL de muestra
- b) Adicionar 2 mL de HCl al 1% en H_2O
- c) Colocar los tubos en baño María durante 20 minutos
- d) Dejar enfriar a temperatura ambiente y agregar 3 gotas del reactivo de Dragendorff
- e) La prueba positiva mostrará una coloración naranja intenso

G.5.2. Prueba de Hager

- a) Agregar 100 μL de muestra y 100 μL de HCl 4N
- b) Centrifugar a 7000 rpm durante dos minutos
- c) Agregar 150 μL de ácido pícrico
- d) Prueba positiva presenta un precipitado amarillo

G.5.3. Prueba de Wagner

- a) Adicionar 100 μL de muestra y 100 μL de HCl 4 N

- b) Centrifugar a 7000 rpm durante dos minutos
- c) Agregar 150 μL del reactivo de Wagner
- d) Una coloración café rojiza indica prueba positiva

G.6. Identificación de ácidos fenólicos

Testigo: Ácido gálico 1.65 mg mL⁻¹

G.6.1 Prueba de FeCl₃

- a) Adicionar 100 μL de muestra y 200 μL de FeCl₃ al 5%
- b) La coloración negro-azulado indica prueba positiva

Anexo H. Identificación de fitoquímicos en *V. planifolia* Jacks. ex Andrews por agentes cromógenos

H.1. Identificación de flavonoides

Figura H.1.1. HCl, Mg²⁺

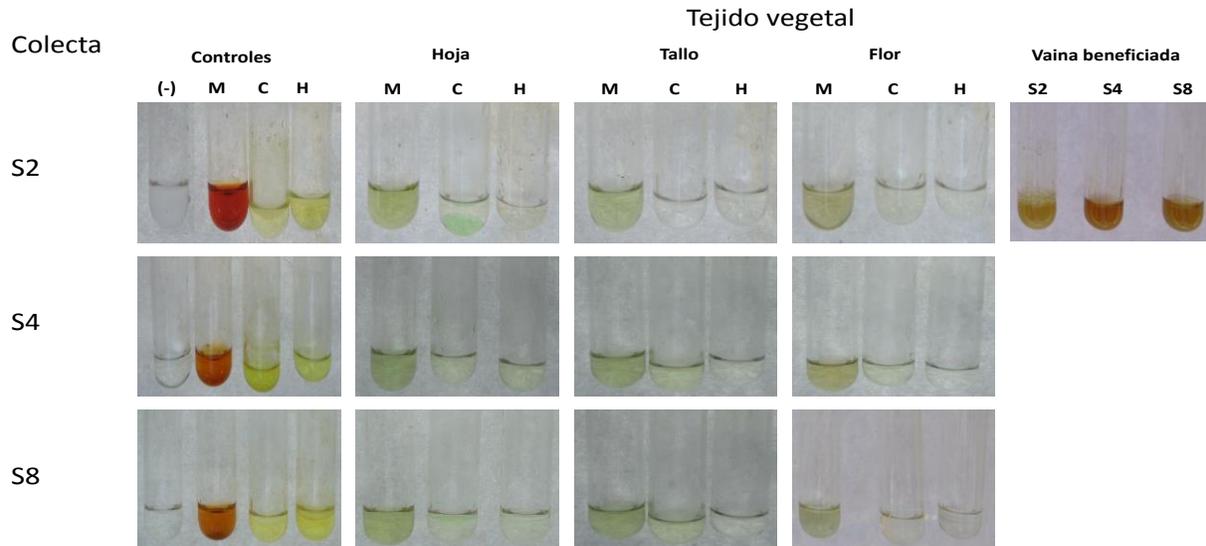


Figura H.1.2. Prueba de UV/NH₄OH

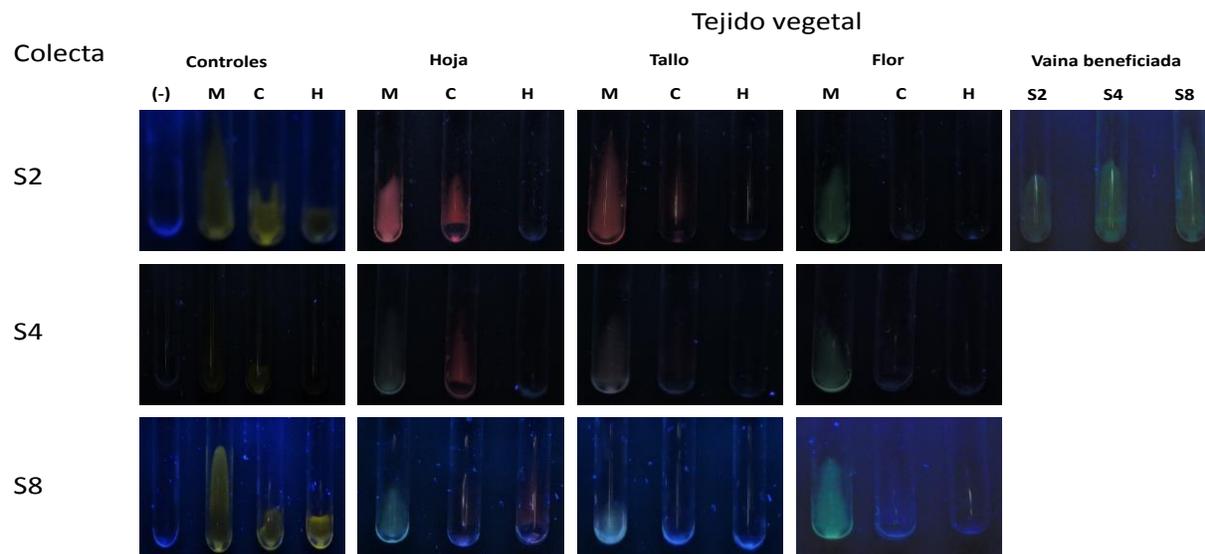
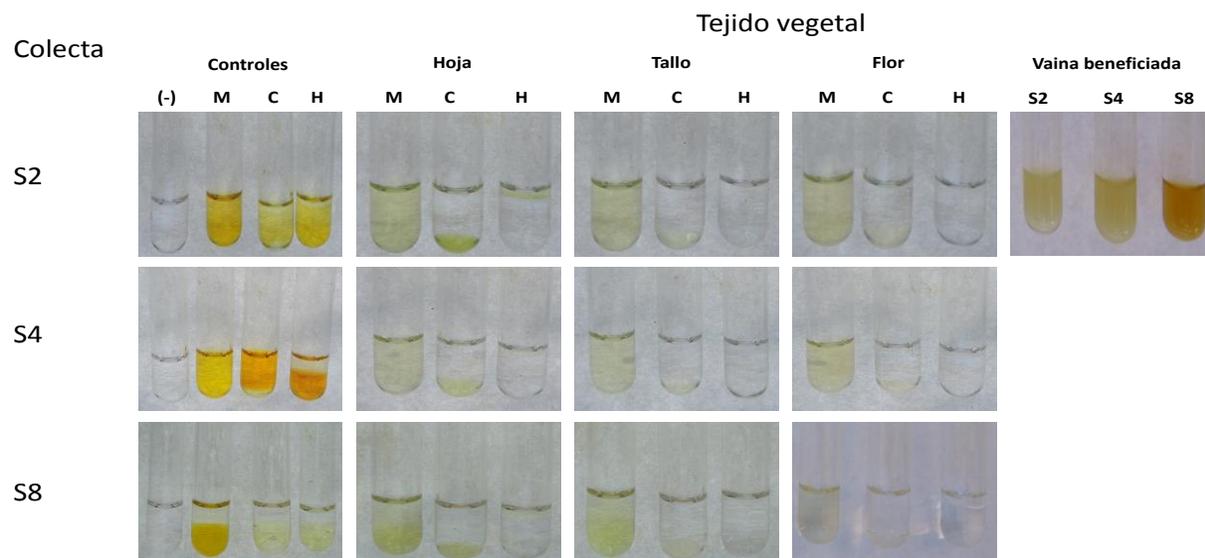


Figura H.1.3. Prueba de HCl 4N, NaOH



H.2. Identificación de saponinas

Figura H.2.1. Prueba de Fehling

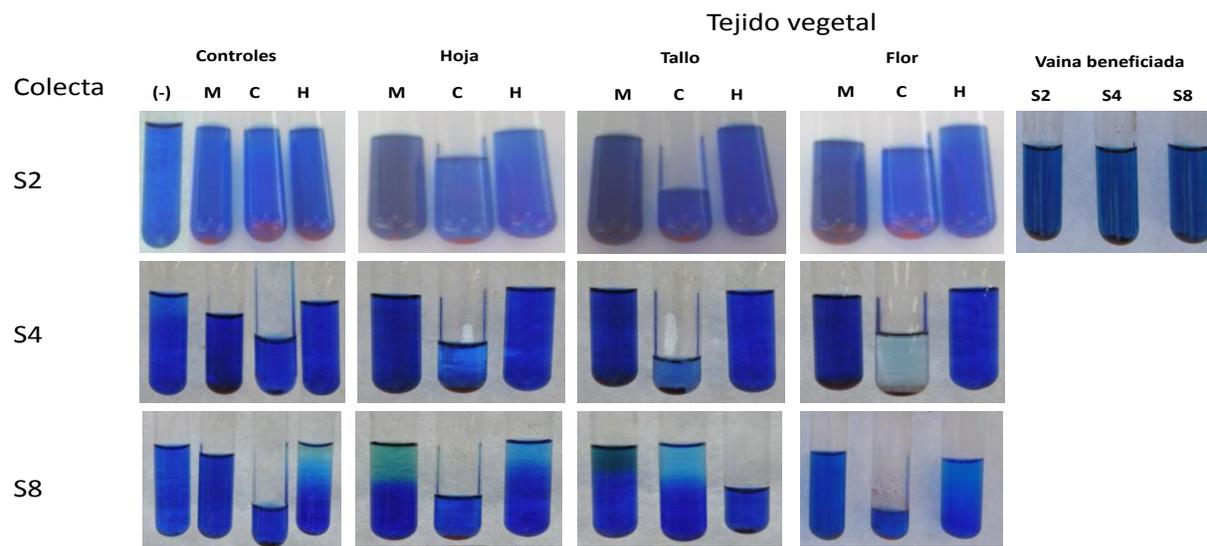


Figura H.2.2. Prueba de Rosenthaler

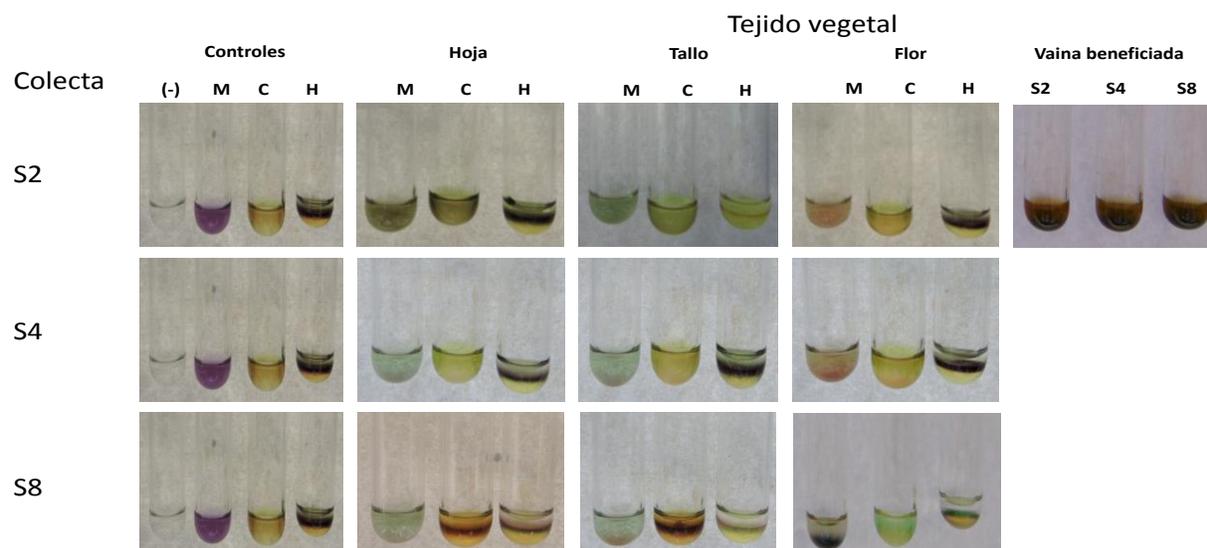
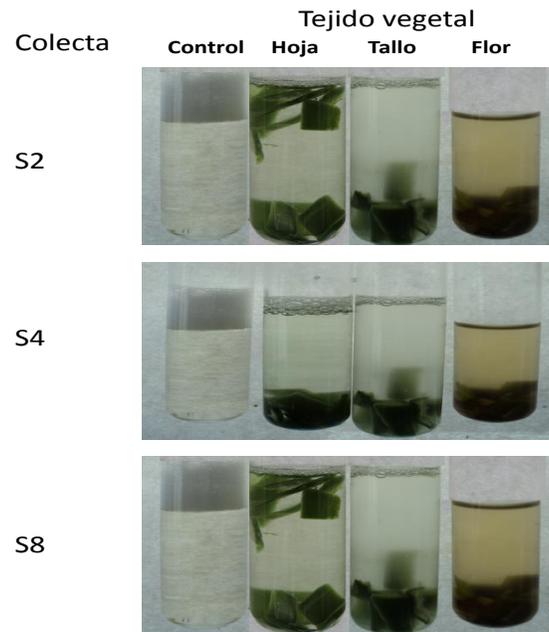


Figura H.2.3. Prueba de espuma



H.3. Identificación de taninos

Figura H.3.1. Prueba de $FeCl_3$ 5%

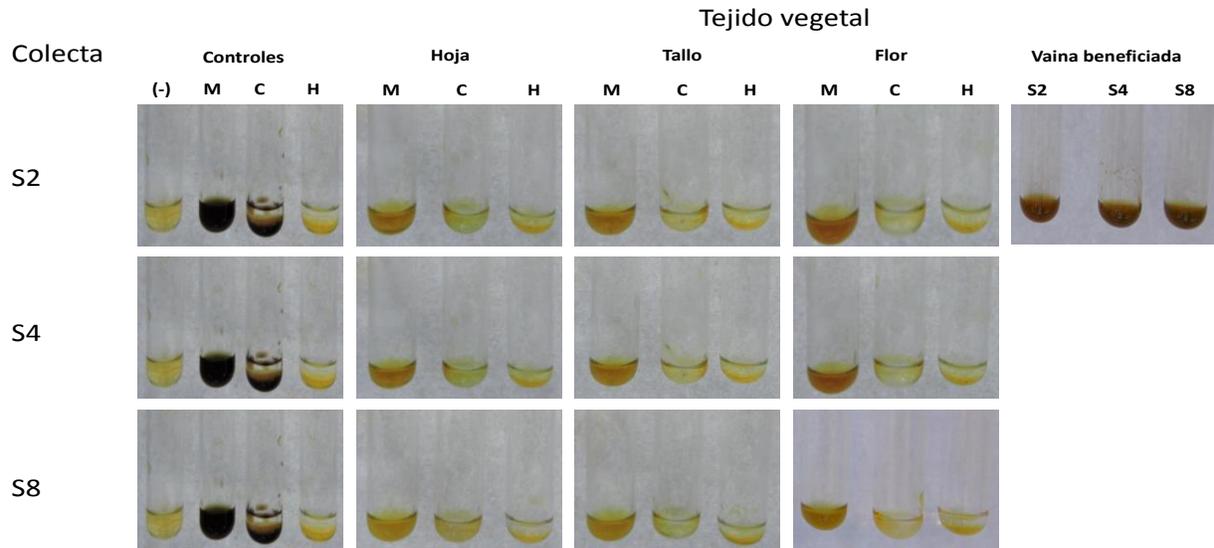
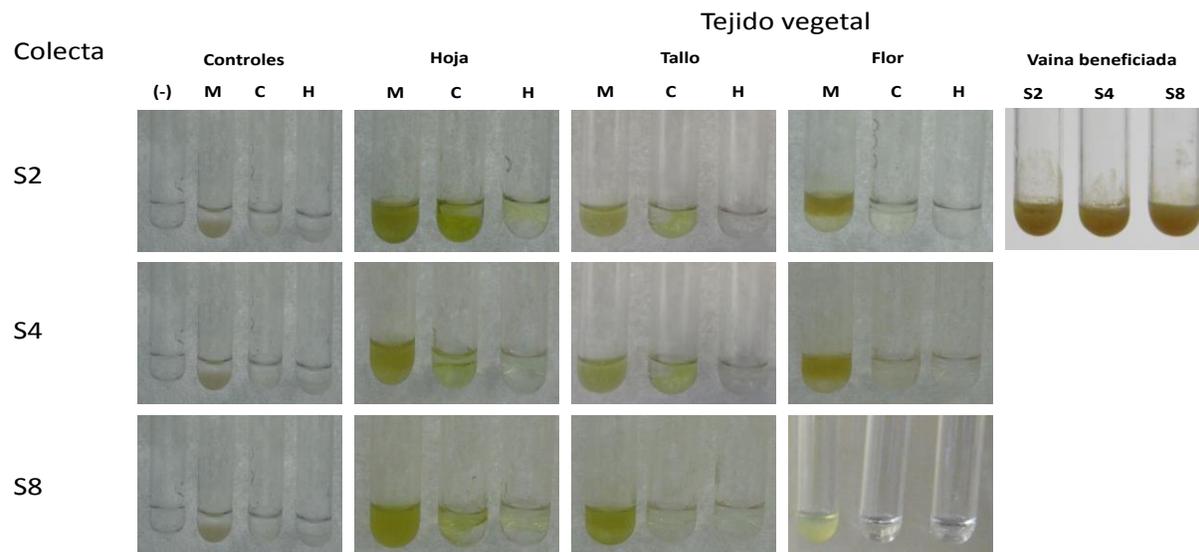


Figura H.3.2. Prueba de acetato de plomo



H.4. Identificación de Terpenos

Figura H.4.1. Prueba de Liberman-Burchard

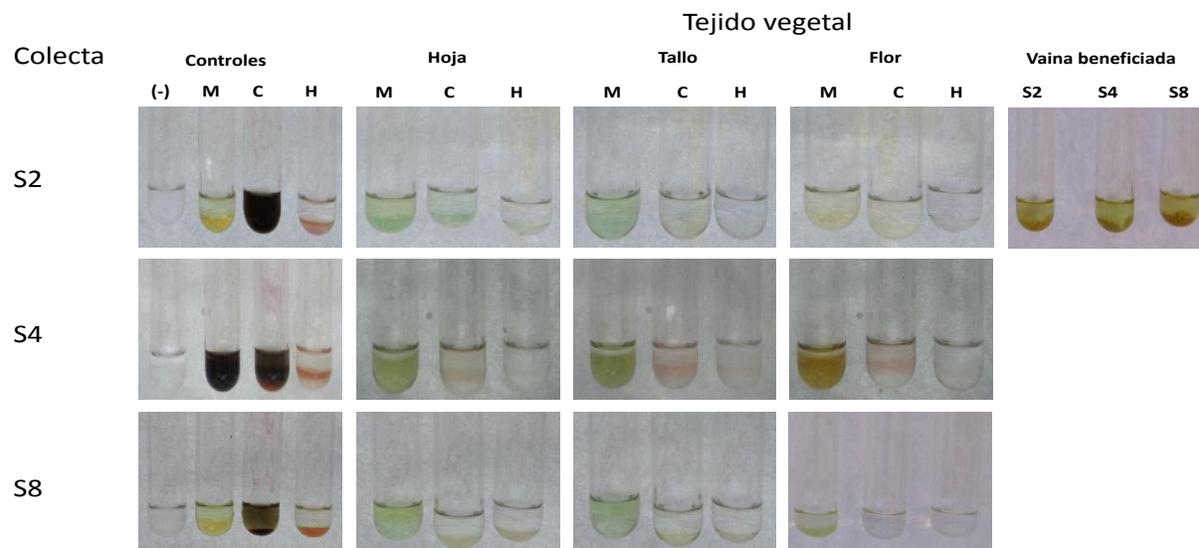
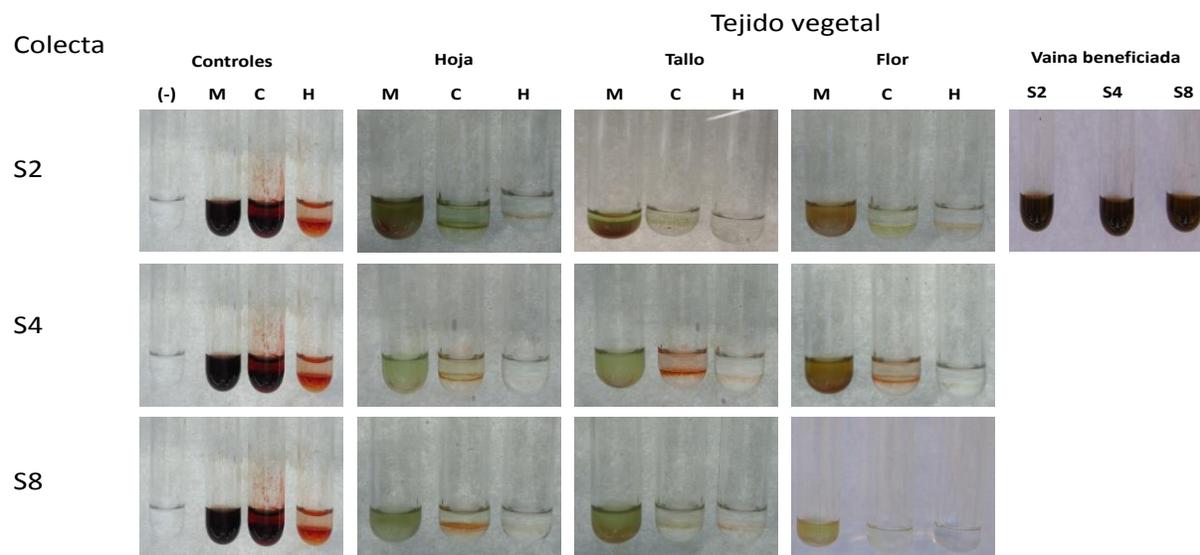


Figura H.4.2. Prueba de Salkowski



H.5. Identificación de alcaloides

Figura H.5.1 Prueba de Dragendorff

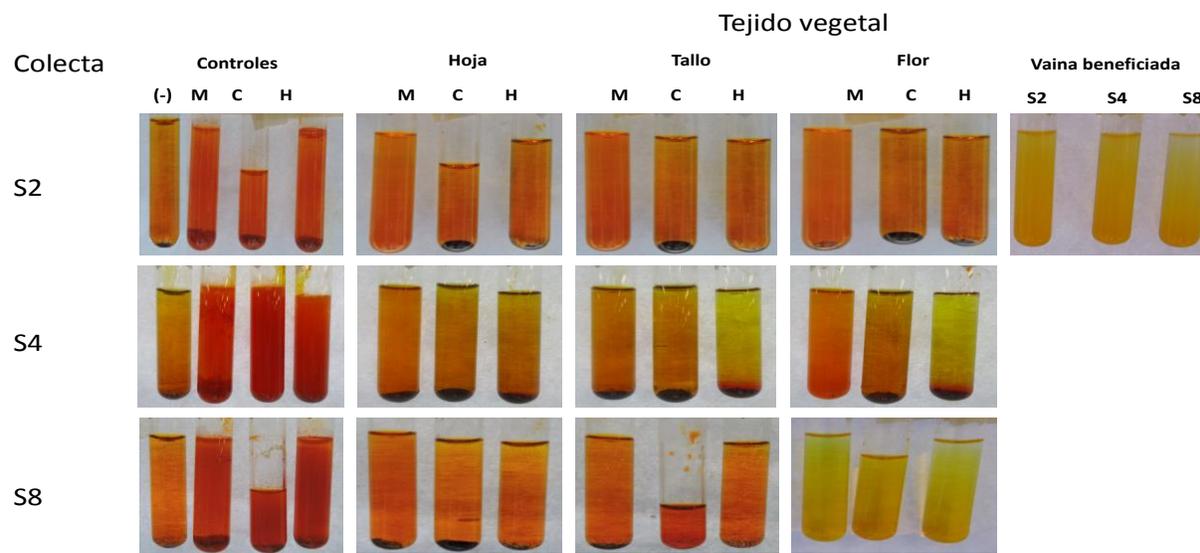


Figura H.5.2. Prueba de Hager

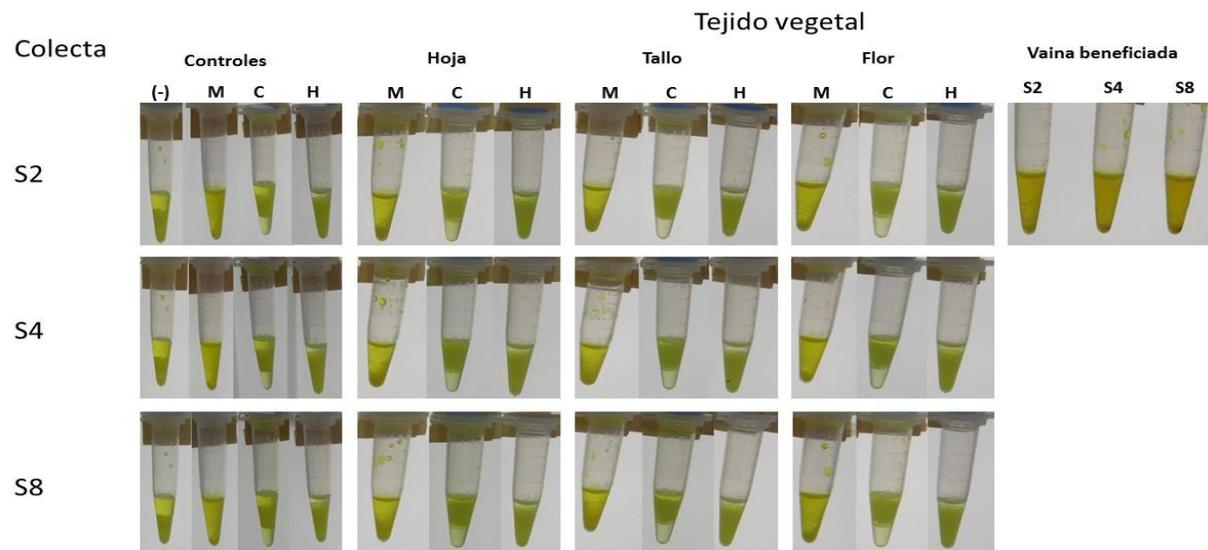
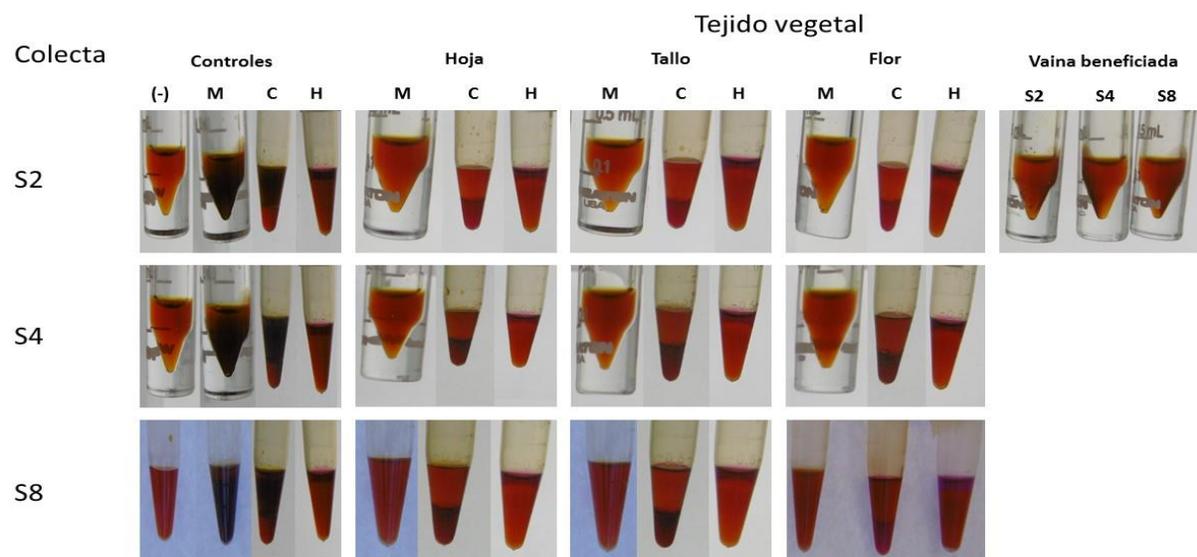
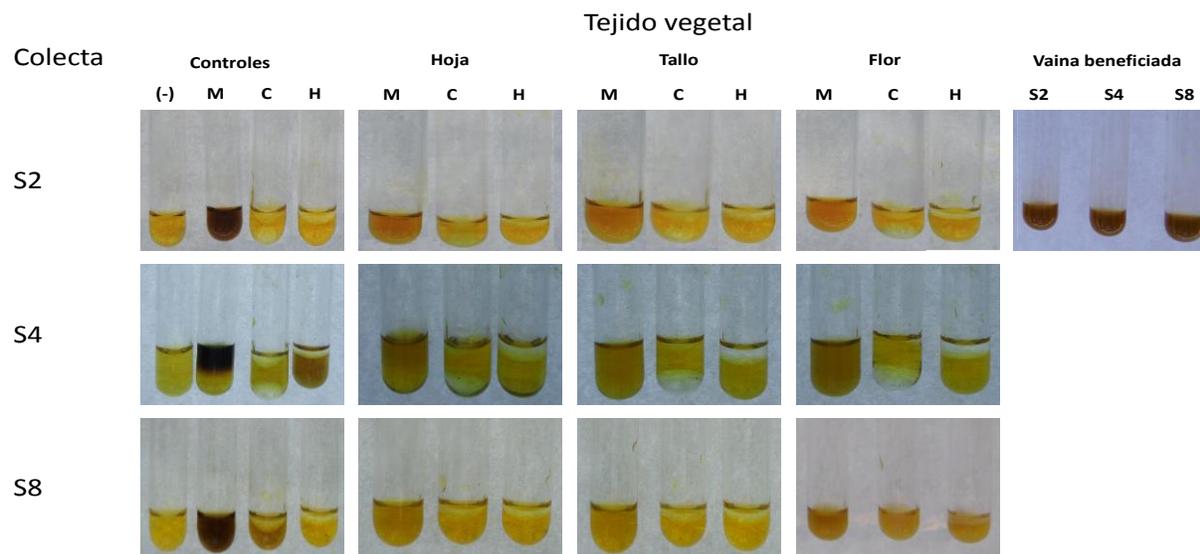


Figura H.5.3. Prueba de Wagner



H.6. Identificación de ácidos fenólicos

Figura H.6.1. Prueba de FeCl_3 5%



Anexo I. Identificación de metabolitos secundarios mediante cromatografía en capa fina (CCF) en tejidos vegetales (hoja, tallo y flor) de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews.

Figura I.1. Identificación de Flavonoides (H: Hoja, T: Tallo, F: Flor, Test: Testigo)

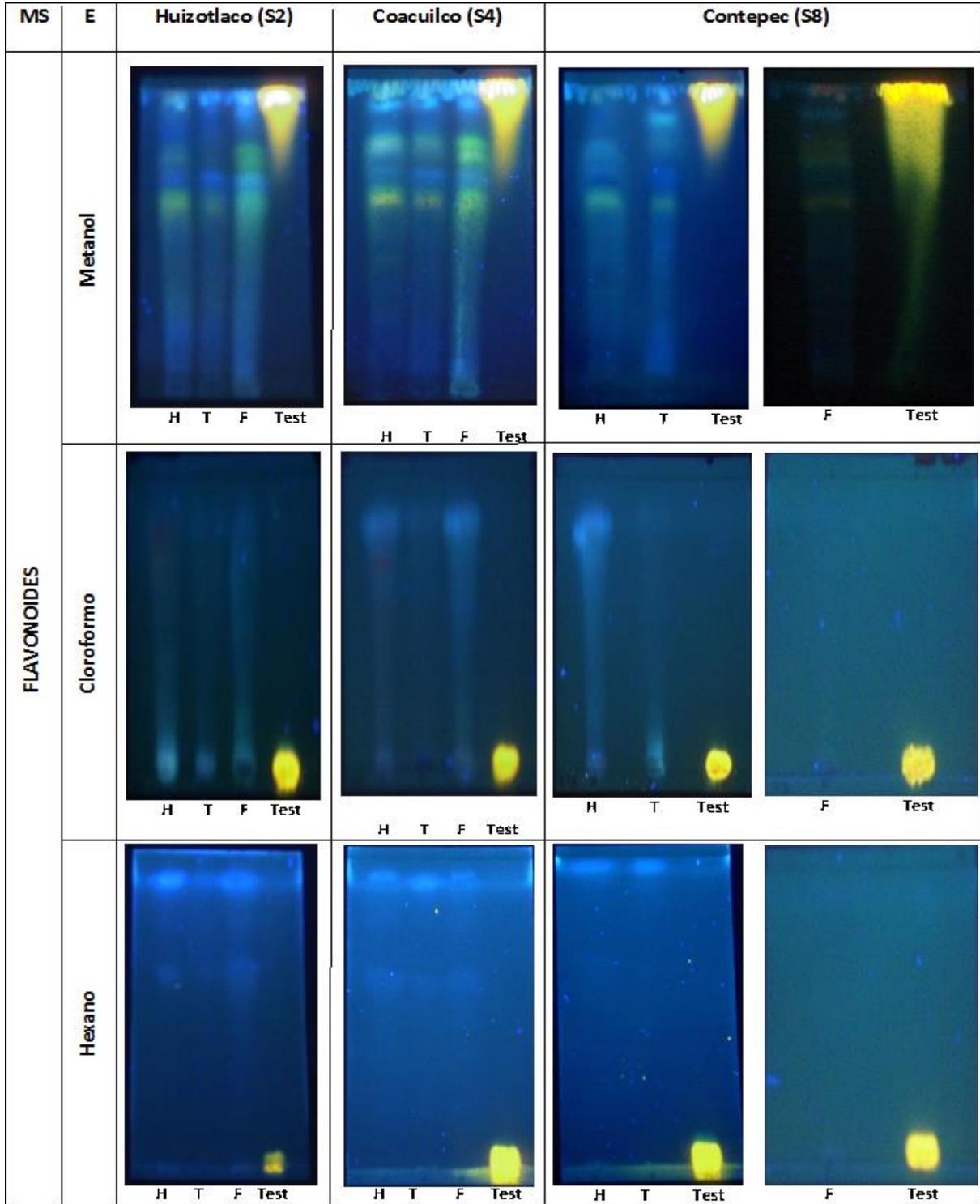


Figura I.2. Identificación de Saponinas (H: Hoja, T: Tallo, F: Flor, Test: Testigo)

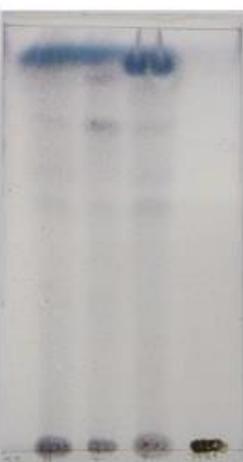
MS	E	Huizotlaco (S2)	Coacuilco (S4)	Contepec (S8)	
SAPONINAS	Metanol				
	Cloroformo				
	Hexano				

Figura I.3. Identificación de Taninos (H: Hoja, T: Tallo, F: Flor, Test: Testigo)

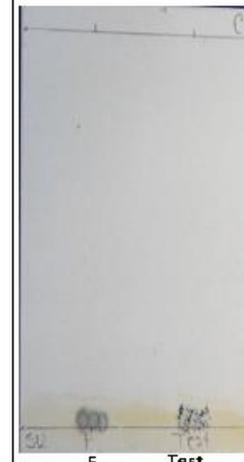
MS	E	Huizotlaco (S2)	Conacuilco (S4)	Contepec (S8)	
TANINOS	Metanol				
	Cloroformo				
	Hexano				

Figura I.4. Identificación de Terpenos (H: Hoja, T: Tallo, F: Flor, Test: Testigo)

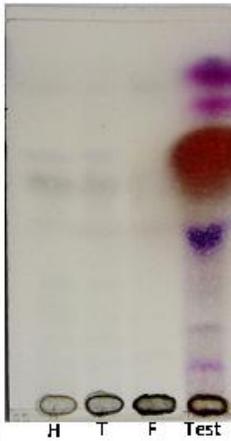
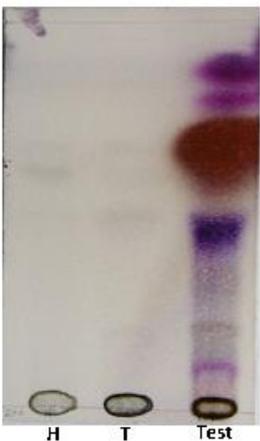
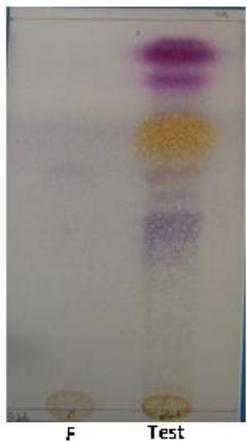
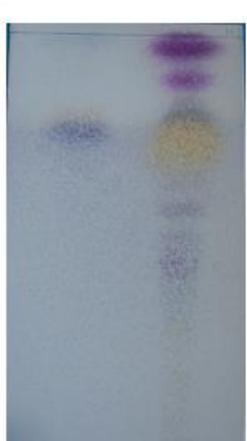
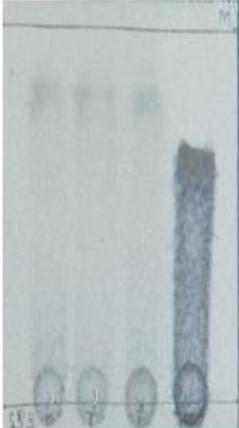
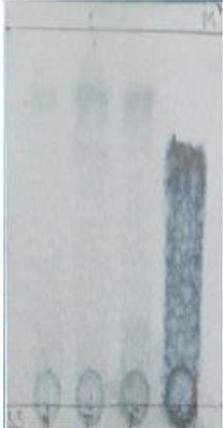
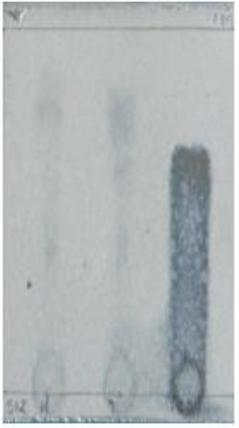
MS	E	SITIO 2	SITIO 4	SITIO 8	
TERPENOS	Metanol				
	Cloroformo				
	Hexano				

Figura I.5. Identificación de Alcaloides (H: Hoja, T: Tallo, F: Flor, Test: Testigo)

MS	E	Huizotlaco (S2)	Coacuilco (S4)	Contepec (S8)	
ALCALOIDES	Metanol				
	Cloroformo				
	Hexano				

Figura I.6. Identificación de Ácidos fenólicos (H: Hoja, T: Tallo, F: Flor, Test: Testigo)

MS	E	SITIO 2	SITIO 4	SITIO 8	
ÁCIDOS FENÓLICOS	Metanol				
	Cloroformo				
	Hexano				

Anexo J. Identificación de metabolitos secundarios mediante cromatografía en capa fina (CCF) en vainas beneficiadas de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews.
 Figura J.1. Identificación de Flavonoides (VB: Vaina beneficiada, Test: Testigo)

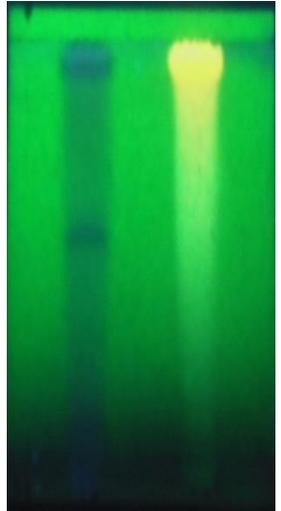
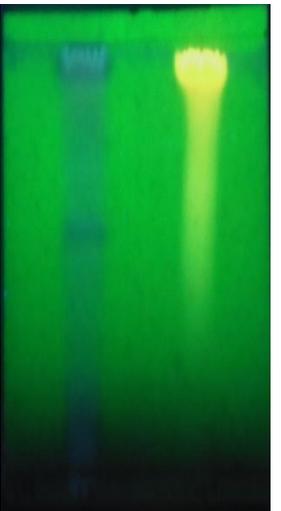
MS	E	Huizotlaco (S2)	Coacuilco (S4)	Contepec (S8)			
FLAVONOIDES	Metanol	365 nm	365 nm	365 nm			
							
		VB	Test	VB	Test	VB	Test
		302 nm	302 nm	302 nm			
							
		VB	Test	VB	Test	VB	Test

Figura J.2. Identificación de Saponinas (VB: Vaina beneficiada, Test: Testigo)

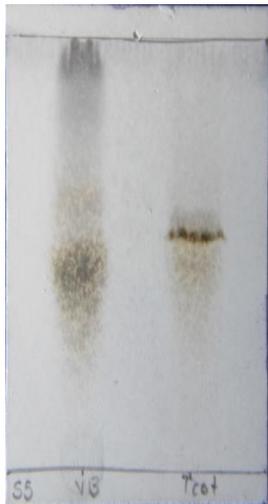
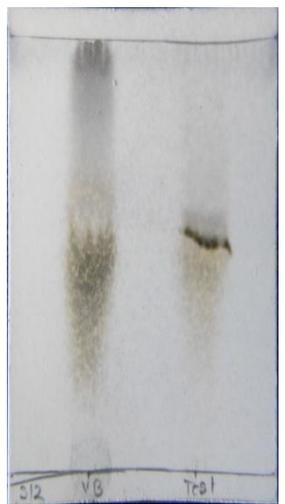
MS	E	Huizotlaco (S2)	Coacuilco (S4)	Contepec (S8)	
SAPONINAS	Metanol				
		VB	Test	VB	Test
		VB	Test	VB	Test

Figura J.3. Identificación de Taninos

MS	E	Huizotlaco (S2)	Coacuilco (S4)	Contepec (S8)	
TANINOS	Metanol				
		VB	Test	VB	Test
		VB	Test	VB	Test

Figura J.4. Identificación de Terpenos (VB: Vaina beneficiada, Test: Testigo)

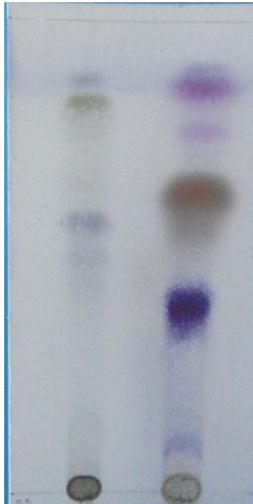
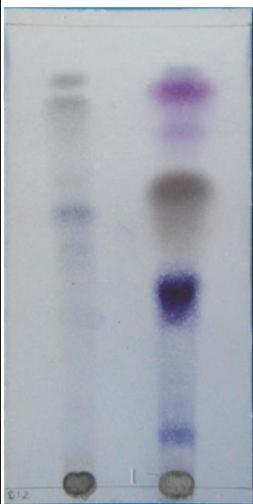
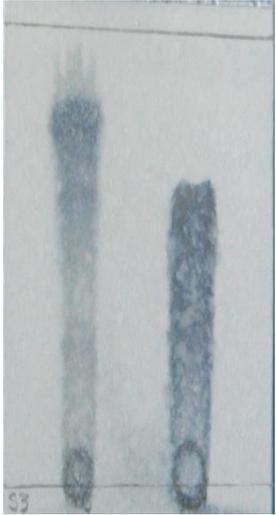
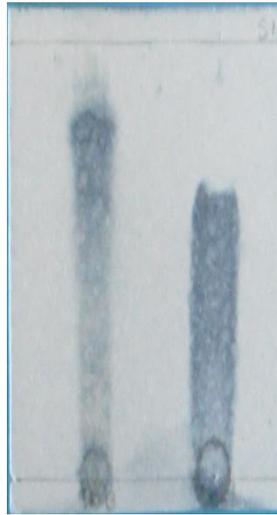
MS	E	Huizotlaco (S2)	Coacuilco (S4)	Contepec (S8)
TERPENOS	Metanol			
		VB	Test	VB

Figura J.5. Identificación de Alcaloides (VB: Vaina beneficiada, Test: Testigo)

MS	E	Huizotlaco (S2)	Coacuilco (S4)	Contepec (S8)
ALCALOIDES	Metanol			
		VB	Test	VB

Figura J.6. Identificación de Ácidos fenólicos (VB: Vaina beneficiada, Test: Testigo)

MS	E	Huizotlaco (S2)	Coacuilco (S4)	Contepec (S8)
ÁCIDOS FENÓLICOS	Metanol			
		VB Test	VB Test	VB Test

Anexo K. Cuantificación de fitoquímicos en *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews por método espectrofotométrico

K.1. Cuantificación de Compuestos Fenólicos Totales (Makkar *et al.* 1993)

Blanco:

- 500 µL de agua destilada
- 250 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu al 50%, reposar 8 minutos
- 1.25 mL de Na₂CO₃ al 5%, agitar en vórtex
- Incubar 30 min a temperatura ambiente.

Reactivos:

- Reactivo de Folin-Ciocalteu al 50% (proteger de la luz y mantener en refrigeración)
- Carbonato de Sodio al 5%

Procedimiento Determinación Compuestos Fenólicos Totales:

Envolver en aluminio los tubos de ensayo

1. Tomar 50 µL del extracto, o del standard
2. Adicionar 450 µL de agua destilada
3. Adicionar 250 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu al 50%
4. Reposar 8 minutos
5. Agregar 1.25 mL de Na₂CO₃ al 5%

6. Agitar en vórtex
7. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente
8. Leer a 725nm

K.2.Cuantificación de Taninos Totales (Makkar *et al.* 1993)

Reactivos

- Reactivo de Folin-Ciocalteu 50% (proteger de la luz y mantener en refrigeración)
- Carbonato de Sodio al 5%
- PVPP (Poly(vinylpolypyrrolidone))
- Ácido tánico: Estándar 0.5mgmL⁻¹ (Se prepara al momento)

Preparación del extracto con PVPP

1. En un tubo de ensayo cubierto con papel aluminio, se colocan:
 - 200 mg de PVPP
 - 2 mL de extracto
 - 2 mL de agua destilada
2. Se mezcla en vórtex
3. Incubar 15 minutos en oscuridad a 4°C
4. Mezclar en vórtex
5. Filtrar utilizando doble filtro de poro medio
6. Se toma del filtrado una alícuota de 150 µL y se coloca en un tubo Eppendorf de 2mL
7. Aforar a 1mL con agua destilada

Preparación de la muestra

1. Tomar 50 µL de muestra y aforar a 500 µL con agua
2. Agregar 250 µL de Folin-Ciocalteu
3. Agitar y reposar por 8 minutos
4. Agregar 1.25 mL de Na₂CO₃ al 5%
5. Agitar el vórtex
6. Incubar 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente
7. Leer a 725 nm

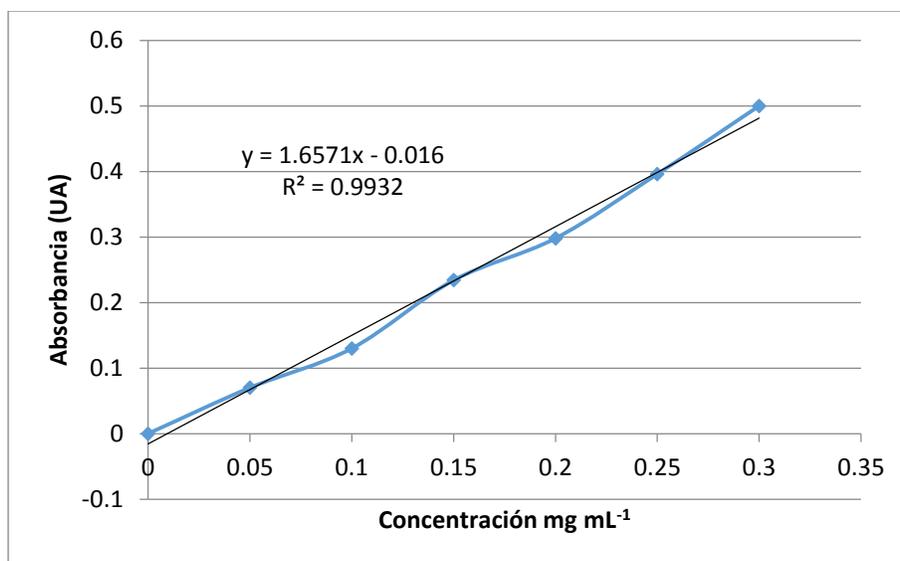


Figura K.2. Curva de calibración para cuantificación de compuestos fenólicos totales y taninos totales

K.3. Cuantificación de Taninos Condensados (Porter *et al.* 1986)

Reactivos:

- Reactivo de Butanol HCl (95:5 v/v)
- Reactivo sulfato de amonio férrico (2N en HCl) se guarda en botella ámbar)

Procedimiento:

1. En un tubo agregar los siguiente:

0.5 mL de extracto

3 mL de butanol HCl

0.1 mL de reactivo férrico

2. Agitar envórtex

3. El blanco se prepara sin calentar

4. Cubrir el tubo con una canica

5. Evaporar por 60 minutos

6. Enfriar a temperatura ambiente

7. Leer a 550nm

Cálculos: $Taninos\ condensados\ (\%) = \frac{(A_{550\ nm} * 78.26 * Factor\ de\ dilución)}{\%MS}$

Donde: A= Absorbancia a 550 nm; 78.26= Factor de corrección; %MS= Porcentaje de materia seca

K.4. Cuantificación de Flavonoides (Barrón *et al.* 2011)

Reactivos

- Cloruro de Aluminio hexahidratado al 10%
- Solución de Acetato de Potasio 1M

Mezcla de reacción y procedimiento

1. Cubrir los tubos con papel aluminio
2. Preparar la mezcla de reacción:
 - 2.8 mL de agua destilada
 - 1.5 mL de etanol al 80%
 - 500 μL del extracto (250 mg mL^{-1}), o del Standard
 - 100 μL Solución de AlCl_3 hexahidratado al 10%
 - 100 μL Solución de Acetato de Potasio 1M

Blanco:

- 3.4 mL de agua destilada
- 1.5 mL de etanol al 80%
- 100 μL Solución de Acetato de Potasio 1M

Nota: No se le agrega el cloruro de aluminio porque de lo contrario reacciona, y vira a café.

- a) Mezclar en el vórtex
- b) Incubar 30 minutos a temperatura ambiente
- c) Leer a 415 nm

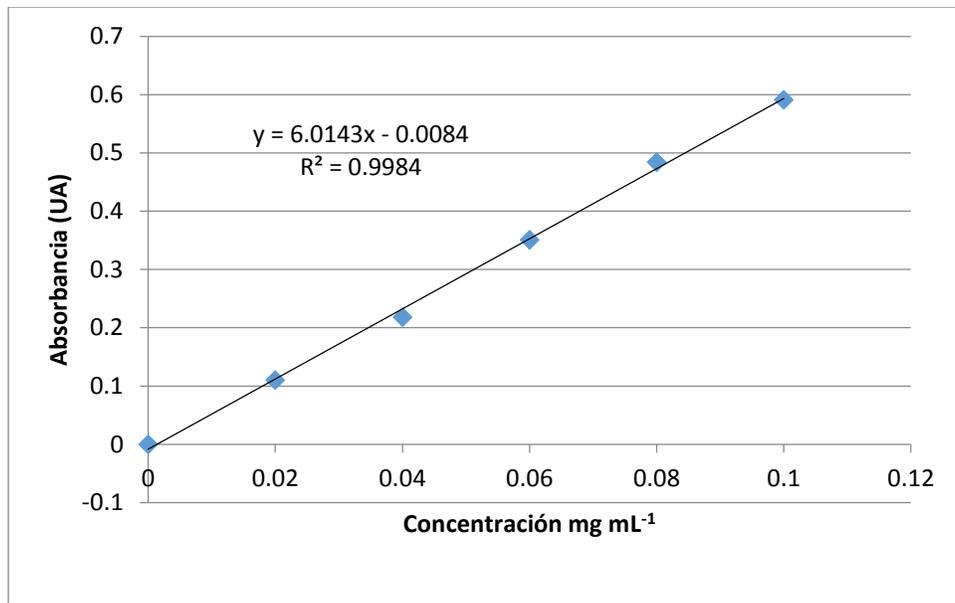


Figura K.4. Curva de calibración para cuantificación de flavonoides

Anexo L. Entrevista aplicada a productores de vainilla (*Vanilla planifolia* J. ex Andrews) de la Huasteca hidalguense, México.

I. Datos Generales

Fecha: _____

Municipio _____ Localidad: _____

Grupo _____ étnico: _____

Nombre: _____ Edad: _____ Género: M () F ()

Ocupación: _____ Tiempo viviendo en la comunidad: _____

1. ¿Conoce la planta de vainilla?
Sí _____ No _____
2. ¿La conoce con otro nombre?
Sí _____ No _____ ¿Cuál? _____
3. ¿Desde cuándo conoce la vainilla?

4. ¿Es importante para usted la vainilla?
Sí _____ No _____ ¿Por qué? _____
5. ¿Utiliza alguna parte de la planta?
Sí _____ No _____ ¿Cuál? _____
6. ¿Cómo la utiliza?
 - a) Adorno
 - b) Alimento
 - c) Medicina
 - d) Venta
 - e) Aromatizante
 - f) Bebida
 - g) Otro _____
7. ¿Desde cuándo la utiliza?

8. ¿Para qué la utiliza?

9. ¿Con qué frecuencia la utiliza?

10. ¿Cómo aprendió o quién le enseñó a utilizarla?

11. ¿Sabe de dónde proviene la vainilla que cultiva?
Sí _____ No _____ ¿De dónde? _____
12. ¿Qué cuidados le da a la planta de vainilla?
