



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS

CAMPUS PUEBLA

POSTGRADO EN ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA
REGIONAL

**ANÁLISIS DE FITOQUÍMICOS Y ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE DE *Vanilla pompona* Schiede.
DESARROLLADA BAJO DOS AMBIENTES**

CECILIA VIVEROS ANTONIO

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PUEBLA, PUEBLA

2018



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 **Cecilia Viveros Antonio**, 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 **Análisis de fitoquímicos y actividad antioxidante de *Vanilla pompona* Schiede desarrollada bajo dos ambientes**, 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, la Consejera 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, 18 de mayo del 2018

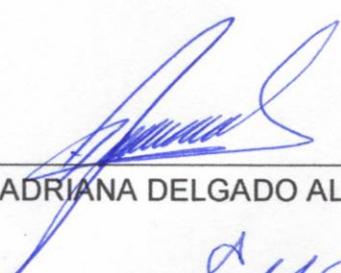
Cecilia Viveros Antonio

Vo. Bo. Profesora Consejera
Dra. Adriana Delgado Alvarado

La presente tesis, titulada: **Análisis de fitoquímicos y actividad antioxidante de *Vanilla pompona* Schiede desarrollada bajo dos ambientes**, realizada por la alumna: **Cecilia Viveros Antonio**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

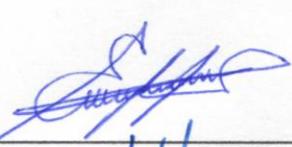
MAESTRA EN CIENCIAS
ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA:



DRA. ADRIANA DELGADO ALVARADO

ASESOR:



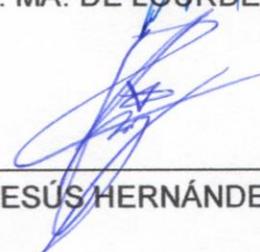
DR. BRAULIO EDGAR HERRERA CABRERA

ASESORA:



DRA. MA. DE LOURDES ARÉVALO GALARZA

ASESOR:



DR. JESÚS HERNÁNDEZ RUIZ

Puebla, Puebla, México, 18 de mayo del 2018

ANÁLISIS DE FITOQUÍMICOS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE *Vanilla pompona* Schiede DESARROLLADA BAJO DOS AMBIENTES

Viveros Antonio Cecilia, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2018

Las plantas producen fitoquímicos en respuesta ante factores ambientales, y muchos de ellos son los responsables de la actividad antioxidante que sirve para proteger a las plantas del estrés oxidativo. El trabajo tuvo como objetivo analizar los grupos de fitoquímicos y actividad antioxidante en estructuras vegetales y reproductivas de *V. pompona* y conocer la influencia del ambiente sobre ellos, para potenciar su uso como fuente de compuestos bioactivos. El material vegetal se obtuvo durante el período de floración y se cosecharon frutos en dos localidades (Cazuelas, Papantla, Veracruz y Morelos, Santa Cruz Itundujia, Oaxaca) de México. Los fitoquímicos en hoja, tallo, flor fruto verde y fruto beneficiado de 29, 31 y 36 semanas se analizaron mediante pruebas cualitativas por agentes cromógenos y por cromatografía en capa fina (CCF); la cuantificación de compuestos fenólicos totales (CFT), saponinas totales (SAPT), flavonoides totales (FLAVT) y triterpenos totales (TRIT) se realizó mediante métodos espectrofotométricos; la capacidad antioxidante se analizó frente al radical DPPH/ CI_{50} y por método de ORAC (fracción hidrofílica y fracción lipofílica). Las pruebas realizadas por agentes cromógenos y por CCF, mostraron presencia principalmente de saponinas, terpenos, flavonoides y ácidos fenólicos. Por tejido, la hoja tuvo las concentraciones mayores de SAPT y FLAVT, los frutos verdes destacaron por mostrar concentraciones altas de SAPT ($3.71 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) y las concentraciones mayores de CFT ($0.50 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) y TRIT ($19.79 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$). Por localidad, Morelos destacó por presentar las concentraciones mayores de FLAVT ($0.80 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) y Cazuelas tuvo las concentraciones más altas en TRIT ($9.30 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) y SAPT ($3.79 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$). La capacidad antioxidante mayor se obtuvo en hoja ($CI_{50}=2.98 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) y fruto verde de 29 semanas ($CI_{50}=4.93 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ MS), frente al radical DPPH. En el ensayo de ORAC, la fracción hidrofílica también mostró los valores mayores en hoja (123,168 a 123,478 $\mu\text{M TE} \cdot \text{g}^{-1}$) seguido de frutos verdes de 29 y 31 semanas. La temperatura media anual y el régimen de humedad del suelo tuvieron efecto en la acumulación de metabolitos (TRIT y SAPT) en la localidad de Cazuelas.

Palabras clave: *Vanilla pompona*, ambiente, antioxidantes, estructuras vegetales y reproductivas, metabolitos secundarios.

ANALYSIS OF PHYTOCHEMICALS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *Vanilla pompona* Schiede. DEVELOPED UNDER TWO ENVIRONMENTS

Viveros Antonio Cecilia, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2018

Plants produce phytochemicals in response to environmental factors, and many of them are responsible for the antioxidant activity used to protect plants from oxidative stress. The study aimed to analyze groups of phytochemicals and antioxidant activity. The study aimed to analyze groups of phytochemicals and antioxidant activity in plant and reproductive structures of *Vanilla pompona* Schiede and knowing the influence of environment on them, to enhance their use as a source of bioactive compounds. The plant material was obtained during the flowering period and fruits were harvested in two localities (Cazuelas, Papantla, Veracruz and Morelos, Santa Cruz Itundujia, Oaxaca) of Mexico. The phytochemicals in leaf, stem, flower, green fruit and cured fruit of 29, 31 and 36 weeks were analyzed by qualitative tests by chromogenic agents and by thin layer chromatography (TLC). The quantification of total phenolic compounds (CFT), total saponins (SAPT), total flavonoids (FLAVT) and total triterpenes (TRIT) was performed by spectrophotometric methods; the antioxidant capacity was analyzed against the radical DPPH/IC₅₀ and by the ORAC method (hydrophilic fraction and lipophilic fraction). Tests by chromogenic agents and TLC showed the presence primarily of saponins, terpenes, flavonoids and phenolic acids. By tissue, the leaf had the highest concentrations of SAPT and FLAVT, the green fruits stood out for showing high concentrations of SAPT (3.71 g·100 g⁻¹) and the highest concentrations of CFT (0.50 g·100 g⁻¹) and TRIT (19.79 g·100 g⁻¹). By location, Morelos stood out for presenting the highest concentrations of FLAVT (0.80 g·100 g⁻¹) and Cazuelas had the highest concentrations in TRIT (9.30 g·100 g⁻¹) and SAPT (3.79 g·100 g⁻¹). The highest antioxidant capacity was obtained sheet (CI₅₀ = 2.98 mg·mL⁻¹) and green fruit 29 weeks (CI₅₀ = 4.93 mg·mL⁻¹), against DPPH radical. In the ORAC assay, the hydrophilic fraction also showed the highest values in leaf (123,168 to 123,478 μM TE·g⁻¹) followed by green fruits of 29 and 31 weeks. The mean annual temperature and soil moisture regime had an effect on the accumulation of metabolites (TRIT and SAPT) in the town of Cazuelas.

Palabras clave: *Vanilla pompona*, environment, antioxidants, plant and reproductive structures, secondary metabolites.

Dedicatorias

Dedico esta tesis con especial cariño a mis padres y hermanos, por demostrarme su gran apoyo y confianza.

A mis queridos amigos por su amistad que me brindaron.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme una beca para realizar la maestría.

Al Colegio de Postgraduados *Campus* Puebla, por su apoyo financiero con el fideicomiso de Fondos para la investigación científica y desarrollo tecnológico del centro público de investigación y por permitirme realizar la maestría, así como hacer uso del equipo del laboratorio e instalaciones de la institución.

A los miembros de mi consejo:

A la Dra. Adriana Delgado Alvarado, por su amistad, por guiarme en este camino de la investigación, por sus enseñanzas, valiosos consejos y paciencia que me brindó durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Braulio Edgar Herrera Cabrera por sus valiosos consejos y apoyo brindado en el análisis de los datos durante la realización de este trabajo y por su amistad.

A la Dra. Ma. de Lourdes Arévalo Galarza, por sus enseñanzas, valiosos consejos y su amistad durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Jesús Hernández Ruiz por su amistad y gran apoyo brindado durante la realización de este trabajo.

A los productores de *Vainilla pompona*: Ing. Pedro Heriberto Larios Rivera† por su motivación para realizar este estudio, y a la Lic. Luz Olimpia Larios Fuentes por su amabilidad y facilidades para trabajar en su vainillal y obtener parte de las muestras con las que trabajamos. Al Sr. José de la comunidad de Morelos, por permitirnos trabajar en su propiedad y compartirnos los frutos, hojas y tallos de *V. pompona*.

Al maestro beneficiador Veremundo Rodríguez en el Beneficio de Primero de Mayo, Papantla, Veracruz

A la estudiante Mayra Nonoal Quisehualtl, por su apoyo en la parte de Cromatografía en capa fina (CCF), durante su estancia.

A mis amigos del laboratorio: Alma Cuellar, Dra, Paty, Paula Fuentes, Etzael Nuñez, Diego Ibarra, Guadalupe Andrade, Cristian Villaseñor, Katya Martínez y Marly Ortiz.

CONTENIDO	Página
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
HIPÓTESIS.....	4
OBJETIVOS	5
OBJETIVO GENERAL.....	5
LITERATURA CITADA	5
CAPÍTULO I	9
ANÁLISIS CUALITATIVO DE FITOQUÍMICOS EN <i>Vanilla pompona</i> Schiede.....	9
RESUMEN	9
1.1 INTRODUCCIÓN	10
1.2 MATERIALES Y MÉTODOS	15
1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
1.4 CONCLUSIONES	35
1.5 LITERATURA CITADA	35
CAPÍTULO II	43

CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FITOQUÍMICOS DE ORGANOS DE <i>Vanilla pompona</i> Schiede DESARROLLADOS BAJO DOS AMBIENTES.....	43
RESUMEN	43
2.1 INTRODUCCIÓN	44
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	45
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
2.4 CONCLUSIONES	72
2.5 LITERATURA CITADA	72
CAPÍTULO III.....	80
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN TEJIDOS DE <i>Vanilla pompona</i> Schiede EN DIFERENTES AMBIENTES.....	80
RESUMEN	80
3.1 INTRODUCCIÓN	81
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	84
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	89
3.4 CONCLUSIONES	103
3.5 LITERATURA CITADA	103

CONCLUSIONES GENERALES..... 109

ANEXOS 111

LISTA DE CUADROS

Página

Cuadro 1.1 Sitios de colecta de *Vanilla pompona* Schiede en el estado de Veracruz y Oaxaca..... 16

Cuadro 1.2 Estructuras vegetales y reproductivas colectadas de *Vanilla pompona*. 17

Cuadro 1. 3 Características climáticas de las localidades de recolecta de *Vanilla pompona* Schiede de Oaxaca y Veracruz, México. 19

Cuadro 1.4 Pruebas por agentes cromógenos para identificación de fitoquímicos en *Vanilla pompona* Schiede. 21

Cuadro 1.5 Sistemas cromatográficos, reveladores y testigos para CCF en *Vanilla pompona* Schiede. 22

Cuadro 1.6 Tamizaje fitoquímico de extractos de hoja (H), tallo (T), flor (F), Fruto verde (Fv) y Fruto beneficiado (Fb) de cinco sitios de colecta de *Vanilla pompona*. 29

Cuadro 1.7 Numero de bandas de fitoquímicos detectados por cromatografía en capa fina en los extractos de hoja (H), tallo (T), flor (F), fruto verde (Fv) y fruto beneficiado (Fb) de *Vanilla pompona* Schiede de las localidades de Cazuelas, Puntilla Aldama, Hidalgo, Morelos y Primavera Morelos..... 35

Cuadro 2.1 Sitios de colecta de *Vanilla pompona* Schiede en Cazuelas y Morelos. 46

Cuadro 2.2 Estructuras vegetales y reproductivas colectadas de *Vanilla pompona* en Cazuelas Papantla, Veracruz y Morelos Santa Cruz Utundujia, Oaxaca. 47

Cuadro 2.3 Características climáticas de las localidades de recolecta de *Vanilla pompona* Schiede de Morelos, Santa Cruz, Oaxaca y Cazuelas, Papantla Veracruz. 48

Cuadro 2.4 Medias y coeficientes de variación de las variables evaluadas en <i>Vanilla pompona</i> Schiede en dos localidades colectadas de Veracruz y Oaxaca, México.	54
Cuadro 2.5 Prueba de medias para las variables fitoquímicas en <i>Vanilla pompona</i> Schiede en la localidad de Cazuelas y la localidad de Morelos, México.	55
Cuadro 2.6 Concentración de fitoquímicos de hoja, tallo, flor, fruto verde y beneficiado de <i>Vanilla pompona</i> Schiede de Oaxaca y Veracruz, México.	58
Cuadro 2.7 Cuantificación de fitoquímicos en hoja, tallo, flor, vaina verde y vaina beneficiada de <i>Vanilla pompona</i> Schiede por localidad, México.	62
Cuadro 2.8 Porcentaje de humedad de frutos verdes y beneficiados de <i>Vanilla pompona</i> de diferentes semanas de maduración.	64
Cuadro 2.9 Valores propios y proporción acumulada de la variación explicada para cada variable en las tres primeras dimensiones de la caracterización de fitoquímicos de <i>Vanilla pompona</i> Schiede de Veracruz y Oaxaca.	66
Cuadro 2.10 Correlaciones de fitoquímicos con variables ambientales de la localidad de Cazuelas Papantla, Veracruz y Morelos Santa Cruz Itundujia, Oaxaca.	71
Cuadro 3.1 Características de los sitios de colecta de <i>Vanilla pompona</i> Schiede en el estado de Veracruz y Oaxaca.	85
Cuadro 3.2 Estructuras vegetales y reproductivas colectadas de <i>Vanilla pompona</i>	86
Cuadro 3.3 Medias, coeficientes de variación y cuadrados medios del análisis de varianza combinado para las variables CI ₅₀ frente al radical DPPH, ORAC fracción hidrofílica, ORAC fracción lipofílica y ORAC total de cinco tejidos de la	

planta de <i>Vanilla pompona</i> Schiede en dos localidades de Veracruz y Oaxaca, México.	91
Cuadro 3.4 Medias, desviación estándar (DS) y coeficiente de variación (CV) del CI ₅₀ (mg·mL ⁻¹ MS) de la actividad antioxidante por el método de DPPH de extractos de hoja, tallo, flor, fruto verde y fruto beneficiado de <i>Vanilla pompona</i> Schiede de Oaxaca y Veracruz, México.	92
Cuadro 3.5 Medias, desviación estándar (DS) y coeficiente de variación (CV) de la actividad antioxidante por el método de ORAC de extractos de hoja, tallo, flor, fruto verde y fruto beneficiado de <i>Vanilla pompona</i> Schiede de Oaxaca y Veracruz, México.....	93
Cuadro 3.6 Comparación de medias de la actividad antioxidante entre localidades de colecta de <i>Vanilla pompona</i>	94
Cuadro 3.7 Medias, desviación estándar (DS) y coeficiente de variación (CV) del CI ₅₀ (mg·mL ⁻¹ MS) de la actividad antioxidante por el método de DPPH de extractos de hoja, tallo, flor, fruto verde y fruto beneficiado de <i>Vanilla pompona</i> Schiede de la localidad de Cazuelas y Morelos, México.	96
Cuadro 3.8 Medias, desviación estándar (DS) y coeficiente de variación (CV) de la actividad antioxidante por el método de ORAC de extractos de hoja, tallo, flor, fruto verde y fruto beneficiado de <i>Vanilla pompona</i> Schiede de la localidad de Cazuelas, Veracruz, México.....	97
Cuadro 3.9 Medias, desviación estándar (DS) y coeficiente de variación (CV) de la actividad antioxidante por el método de ORAC de extractos de hoja, tallo,	

flor, fruto verde y fruto beneficiado de <i>Vanilla pompona</i> Schiede de la localidad de Morelos, Oaxaca, México.	98
Cuadro 3.10 Análisis de correlación (R) entre la actividad antioxidante y fitoquímicos en hoja, tallo, flor, fruto verde y beneficiado de 29, 31 y 36 semanas.	100
Cuadro 3.11 Análisis de correlación (R) entre la actividad antioxidante y fitoquímicos en fruto verde y beneficiado de 29, 31 y 36 semanas.	103

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1.1 Localidades de colecta de <i>Vanilla pompona</i> en: a) Veracruz y b) Oaxaca, México.	17
Figura 1.2 Estructuras colectadas de <i>Vanilla pompona</i>	18
Figura 2.1 Frutos verdes y frutos beneficiados de <i>Vanilla pompona</i> de 29, 31 y 36 semanas después de la polinización, procedentes de Cazuelas, Papantla, Veracruz y Morelos, Santa Cruz Itundujia, Oaxaca.	48
Figura 2.2 Concentración de fitoquímicos en la interacción de localidad*tejido en <i>Vanilla pompona</i> Schiede en los sitios de recolecta en Cazuelas, Papantla Veracruz y Morelos, Santa Cruz Itundujia Oaxaca, México.	60
Figura 2.3 Dispersión de tejidos de <i>Vanilla pompona</i> Schiede de localidades de Oaxaca y Veracruz, México, con base en los tres primeros componentes principales del análisis de cuatro variables fitoquímicas agrupadas por medias poblacionales.	68
Figura 2.4 Dendograma de tejidos de <i>Vanilla pompona</i> Schiede de Oaxaca y Veracruz, México, con base en el promedio de cuatro variables y agrupamiento por distancia euclidiana.	70
Figura 2.5 Representación gráfica de los coeficientes de correlación estructural de los dos primeros factores en la interacción de variables ambientales (■) y fitoquímicos (■) de los tejidos de <i>Vanilla pompona</i>	72

INTRODUCCIÓN GENERAL

El género *Vanilla* incluye de 107 a 110 especies de orquídeas trepadoras, generalmente hemiepífitas, es antiguo y el mayor en la subfamilia Vanilloideae, su importancia radica en que algunas de las especies son utilizadas como saborizante y aromatizante. Particularmente, en México se reconocen nueve especies de *Vanilla* (Soto Arenas, 2009), donde *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews, *V. tahitensis* J.W.Moore y *V. pompona* Schiede son las principales porque se utilizan los frutos beneficiados (fermentados y deshidratados, para desarrollar el sabor y aroma) (Ramachandra y Ravishankar, 2000; Xochipa-Morate *et al.*, 2016).

En frutos de *V. planifolia* los principales fitoquímicos que confieren el aroma característico a vainilla son: ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido vanílico, ácido *p*-hidroxibenzaldehído y vainillina (Sharma *et al.*, 2007; Salazar-Rojas *et al.*, 2012), sin embargo, cada especie del género *Vanilla* posee características organolépticas diferenciales.

La mayor información sobre el aroma y otros fitoquímicos, se enfocan principalmente en *V. planifolia* (Ranavide, 1992; Pérez-Silva *et al.*, 2006; Sinha *et al.*, 2008; Salazar-Rojas *et al.*, 2012; Delgado-Alvarado *et al.*, 2014). Sin embargo, en la última década se ha destacado lo vulnerable que es el cultivo de esta especie a factores ambientales como cambio climático, enfermedades y caída prematura del fruto. (Hernández-Hernández *et al.*, 2011). Por lo que se considera relevante investigar alguna especie silvestre del género *Vanilla*, como es *V. pompona*, la cual soporta cambios del clima y es resistente a enfermedades como *Fusarium sp.* en comparación con las especies comerciales (Galeas *et al.*, 2015). También, tiene características que son deseables en un programa de mejoramiento genético (Cameron, 2011).

A pesar de estas ventajas de *V. pompona* se registra como la tercera en importancia comercial, actualmente su cultivo en México es limitado, aunque se ha reportado la presencia de *V. pompona* Oaxaca, Nayarit, Michoacán, Guerrero, Veracruz y Jalisco, la mayoría de los registros son de plantas silvestres, donde los frutos son recolectados, mientras que algunas plantaciones se tienen en cafetales. Esta especie se distribuye en varios tipos de bosques húmedos subtropicales/ tropicales de tierras bajas (caducifolios, subdeciduos, perennifolios, montañas bajas, bosques de galería), bosques cálidos de pino y encino. Es común en áreas estacionalmente muy secas y por lo general, está ausente de los bosques húmedos (Soto-Arenas, 2009; Herrera- Cabrera *et al.*, 2017).

La escasa información que existe de *V. pompona* sobre el tipo de fitoquímicos, en el fruto beneficiado se refieren particularmente a los compuestos del aroma, detectados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) encontrando: ácido *p*-hidroxibenzóico, alcohol *p*-anisilo, vainillina, ácido anísico, *p*-anisaldehído, ácido vanílico y ácido *p*-hidroxibenzaldehído (Ehlers y Pfister, 1997).

Mientras, que por la misma técnica Maruenda *et al.* (2013), detectó principalmente a alcohol 4-hidroxibencílico, alcohol *p*-anisilo y vainillina, en frutos de diferentes etapas de madurez. Por otra parte, Galeas *et al.* (2015, 2016) por técnica de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG/MS) detectaron alcohol *p*-anisilo, vainillina, *p*-anisaldehído, ácido anísico, 5-(hydroxymethyl)-2-furfural entre otros compuestos en frutos beneficiados. Estos autores también señalaron que los frutos beneficiados de *V. pompona* tienen un aroma complejo con características típicas de la vainilla y que podrían ser una fuente importante para aplicaciones en perfumería.

Por lo que, este trabajo se enfocó en *V. pompona*, a fin de aportar conocimiento sobre los compuestos que dan aroma a los frutos beneficiados y sobre los demás grupos de fitoquímicos que

están en hoja, tallo, flor y fruto verde. Para que, eventualmente se pueda potenciar su uso dentro de la industria de la vainilla. Debido a sus propiedades novedosas, características aromáticas y potencial agrícola, que inclusive podrían ser de utilidad para algún programa de mejoramiento, por sus propiedades deseables a los cultivos comerciales de *V. planifolia* (Cameron, 2011).

Por lo que, este trabajo tuvo el objetivo de identificar la presencia de fitoquímicos y cuantificar los compuestos fenólicos totales, flavonoides totales, terpenos totales y saponinas totales en las estructuras vegetales (hoja, tallo), reproductivas (flor, fruto verde y fruto beneficiado) de *V. pompona* en localidades de Veracruz y Oaxaca, a fin de aportar conocimiento sobre ella y eventualmente potenciar su uso dentro de la industria de la vainilla.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A nivel mundial se reporta que *V. pompona* se encuentra creciendo de manera natural en las islas Guadalupe, Martinica y Dominica (Ehlers y Pfister, 1997). Sin embargo, en México esta especie tiene una importante distribución natural en los estados de Nayarit, Jalisco, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Veracruz (Soto-Arenas, 2009). Actualmente *V. pompona* se encuentra en peligro debido a que sus poblaciones están disminuyendo y se encuentran fragmentadas, porque la calidad de su hábitad está siendo afectada por el cambio de uso de suelo (Herrera-Cabrera *et al.*, 2017).

Aun cuando en México, *V. pompona* no es de interés comercial, los usos que se le reportan solo son para la industria cosmética y de perfumería, debido a su sabor floral, de perfume similar a la heliotropina un aldehído aromático utilizado en la perfumería (Ehlers y Pfister, 1997). No obstante, poco se conoce del perfil de aroma que presentan sus frutos beneficiados, y menos aún el tipo de compuestos químicos que tiene la planta.

Es factible, que las estructuras vegetales y reproductivas de *V. pompona*, escasamente estudiada, contenga sustancias de importancia funcional y que aún estén por descubrirse. Con este enfoque muchas especies vegetales son estudiadas con frecuencia para hallar su posible valor farmacológico, en especial por sus propiedades estrogénicas, antipiréticas, astringentes, amebicidas, fungicidas, antibióticas, antioxidantes, entre otras. Tal como se ha reportado en *V. planifolia*, en donde, la vainillina, su compuesto mayoritario tiene propiedades antioxidantes (Shyamala *et al.*, 2007; Dong *et al.*, 2014), anticancerígenas (Akagi *et al.*, 1995; Lirdprapamongkol *et al.*, 2005), para inhibir formación de células falciformes (Zhang *et al.*, 2004) y para reducir daño cromosómico (Keshava *et al.*, 1998) entre otras.

El presente estudio considero importante analizar en *V. pompona* el tipo de fitoquímicos que tienen las estructuras vegetales (hoja y tallo) y reproductivas (flor y fruto verde y beneficiado), y si los factores ambientales tienen efecto en la producción de fitoquímicos de esta especie. Con estos resultados se podrá aportar conocimiento sobre el tipo de compuestos que presenta y eventualmente darle algún uso de acuerdo a los grupos de fitoquímicos que contenga. Lo cual contribuirá a la conservación de la diversidad genética de la especie, a un mayor y mejor uso de la variación del género *Vanilla* y a la optimización de los recursos genéticos de la vainilla, a fin de tener un aprovechamiento integral de la estructura de la planta y de la especie en diferente ambiente.

HIPÓTESIS

La presencia, abundancia de fitoquímicos y capacidad antioxidante en hojas, tallos, flores, frutos verdes y frutos beneficiados de *V. pompona* se ve influenciada por la condición ambiental en la que se encuentra.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Analizar los grupos de fitoquímicos y actividad antioxidante en estructuras vegetales y reproductivas de *V. pompona* y conocer la influencia del ambiente sobre ellos, para potenciar su uso como fuente de compuestos bioactivos.

Objetivos particulares:

- Identificar los grupos fitoquímicos presentes en hoja, tallo, flor, fruto verde y beneficiado de *V. pompona*.
- Cuantificar los principales grupos de fitoquímicos identificados en hoja, tallo, flor, fruto verde y beneficiado de *V. pompona*.
- Analizar la capacidad antioxidante de las estructuras vegetales y reproductivas de *V. pompona*.

LITERATURA CITADA

Akagi K, Hirose M, Hoshiya T, Mizoguchi Y, Ito N, Shirai T. 1995. Modulating effects of elagic acid, vanillin and quercetin in a rat medium term multi-organ carcinogenesis model. *Cancer letters*. 94: 113-121.

Cameron KM. 2011. *Vanilla Orchids: Natural History and Cultivation* (ed.), Timber Press. p. 212.

Delgado-Alvarado A, Salazar-Rojas VM, Herrera-Cabrera BE. 2014. Polimorfismo químico de componentes del aroma en germoplasma de *Vanilla* spp de la región del Totonacapan Puebla-Veracruz, México. *I Seminario Internacional de Vainilla*. Promoviendo la investigación, la extensión y la producción de vainilla en Mesoamérica INISEFOR, Vol. 1, 25p.

- Dong Z, Gu F, Xu F, Wang Q. 2014. Comparison of four kinds of extraction techniques and kinetics of microwave-assisted extraction of vanillin from *Vanilla planifolia* Andrews. Food Chemistry. 149: 54-61.
- Ehlers D, Pfister M. 1997. Compounds of vanillons (*Vanilla pompona* Schiede). Journal of Essential Oil Research. 9: 427-431.
- Galeas M, Lin J, Hartman T. 2015. Chemical Characterization of *Vanilla pompona* Schiede, Part I. Perfumer and Flavorist. 40: 16-28.
- Galeas M, Lin J, Hartman T. 2016. Chemical Characterization of *Vanilla pompona* Schiede, Part II. Perfumer and Flavorist. 41: 26-34.
- Herrera-Cabrera BE, Hernández-Ruíz J, Delgado-Alvarado A. 2016. Variación de Aroma en *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews Silvestre y Cultivada. Agro Productividad. 9: 10-17.
- Herrera-Cabrera BE, Hernández M, Vega M, Wegier A. 2017. *Vanilla pompona*. The IUCN Red List of Threatened Species 2017: T105878897A105878899. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T105878897A105878899>. Consultado el 27 de febrero del 2018.
- Hernández-Hernández J, Lubinsky P. 2011. Vanilla Diseases, In: *Handbook of vanilla science and technology*. Havkin- Frenkel D. & Belanger F.C. (Eds.) Wiley -Blackwell Publishing Ltd., pp 26-38.
- Keshava C, Keshava N, Ong TM, Nath J. 1998. Protective effect of vanillin on radiation-induced micronuclei and chromosomal aberrations in V79 cell. Mutation Research. 397: 149-159.

- Lirdprapamongkol K, Sakurai H, Kawasaki N, Choo MK, Saitoh Y, Aozuka Y, Singhirunnusorn P, Ruchirawat S, Svasti J, Saiki I. 2005. Vanillin suppresses in vitro invasion and in vivo metastasis of mouse breast cancer cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 25: 57–65.
- Maruenda H, Del Lujan Vico M, Householder JE, Janovec JP, Cañari C, Naka A, González AE. 2013. Exploration of *Vanilla pompona* from the Peruvian Amazon as a potential source of vanilla essence: Quantification of phenolics by HPLC-DAD. *Food Chemistry*. 138: 161-167.
- Pérez-Silva A, Odoux E, Brat P, Ribeyre F, Rodriguez-Jimenez G, Robles-Olvera V, García-Alvarado MA, Günata Z. 2006. GC-MS and GC olfactometry analysis of aroma compounds in a representative aroma extract from cured vanilla (*Vanilla planifolia*) beans. *Food Chemistry*. 99:728–735.
- Ramachandra RS, Ravishankar GA. 2000. Vanilla flavour: Production by conventional and biotechnological routes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80: 189-304.
- Ranadive A. 1992. Vanillin and related flavour compounds in Vanilla extracts made from beans of various origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40: 1922-1924.
- Salazar-Rojas VM, Herrera-Cabrera BE, Delgado-Alvarado A, Soto-Hernández M, Castillo-González F, Cobos-Peralta M. 2011. Chemotypical variation in *Vanilla planifolia* Jack. (Orchidaceae) from the Puebla-Veracruz Totonacapan region. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 59: 875-887.
- Sharma A, Verma SC, Saxena N, Chadda N, Singh NP, Sinha AK. 2006. Microwave and ultrasound assisted extraction of vanillin and its quantification by high performance liquid chromatography in *Vanilla planifolia*. *Journal of Separation Science*. 29: 613-619.

- Sharma UK, Sharma N, Gupta AP, Kumar V, Sinha AK. 2007. RP–HPTLC densitometric determination and validation of vanillin and related phenolic compounds in accelerated solvent extract of *Vanilla planifolia*. *Journal of Separation Science*. 30: 3174-3180.
- Shyamala BN, Naidu MM, Sulochanamma G, Srinivas P. 2007. Studies on the antioxidant activities of natural vanilla extract and its constituent compounds through in vitro models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 7738-7743.
- Sinha AK, Verma SC, Sharma UK. 2007. Development and validation of an RP–HPLC method for quantitative determination of vanillin and related phenolic compounds in *Vanilla planifolia*. *Journal of Separation Science*. 30: 15-20.
- Sinha AK, Sharma UK, Sharma N. 2008. A comprehensive review on vanilla flavour: Extraction, isolation and quantification of vanillin and others constituents. *International Journal of Food Science and Nutrition*. 59: 299-326.
- Soto Arenas MA. 2009. Recopilación y análisis de la información existente sobre las especies mexicanas del género *Vanilla*. Reporte intermedio, CONACYT. P. 76.
- Xochipa-Morante RC, Delgado-Alvarado A, Herrera-Cabrera BE, Escobedo-Garrido J.S, Arévalo-Galarza L. 2016. Influencia del proceso de beneficiado tradicional Mexicano en los compuestos del aroma de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews. *Agro Productividad*. 9: 55-62.
- Zhang C, Li X, Lian L, Chen Q, Abdulmalik O, Vassilev V, Lai CS, Asakura T. 2004. Anti-sickling effect of MX-1520, a prodrug of vanillin: an in vivo study using rodents. *British Journal of Haematology*. 125: 788-795.

CAPÍTULO I.

ANÁLISIS CUALITATIVO DE FITOQUÍMICOS EN *Vanilla pompona* Schiede

RESUMEN

Las plantas producen fitoquímicos, los cuales sirven de protección ante factores bióticos y abióticos. Estos metabolitos en las estructuras vegetales y reproductivas pueden variar en función de la especie o el ambiente donde crecen. Por lo que el presente estudio tuvo como objetivo identificar los grupos de fitoquímicos presentes en hoja, tallo, flor, fruto verde y fruto beneficiado de *Vanilla pompona* de la localidad de Cazuelas y Puntilla Aldama, Veracruz, la localidad de Morelos, Primavera Morelos e Hidalgo, Oaxaca. Los fitoquímicos se detectaron mediante pruebas cualitativas por agentes cromógenos y por cromatografía en capa fina (CCF), en extractos de diferente polaridad. Las pruebas por agentes cromógenos detectaron mayor presencia de saponinas, alcaloides, taninos, flavonoides, terpenos y ácidos fenólicos principalmente en extractos de metanol de las estructuras analizadas de *V. pompona* de las cinco localidades de colecta. Mientras que en las pruebas por CCF terpenos mostró mayor número de bandas en extractos de hexano de las estructuras analizadas de *V. pompona* de las cinco localidades. Por localidad, las flores y frutos verdes mostraron mayor presencia de terpenos en Cazuelas y Morelos. En hoja y tallo se obtuvo presencia alta de saponinas en Morelos, Hidalgo y Primavera Morelos. En hoja destacaron por mostrar mayor presencia de flavonoides la localidad de Cazuelas, Puntilla Aldama y Morelos. En las cinco localidades se observó presencia baja de alcaloides y taninos en la mayoría de las estructuras analizadas de *V. pompona*.

Palabras clave: *Vanilla pompona*, fitoquímicos, estructuras vegetales y reproductivas, Oaxaca, Papantla

1.1 INTRODUCCIÓN

Las plantas producen compuestos orgánicos de bajo peso molecular que no están relacionados con su desarrollo y crecimiento. Estos compuestos se sintetizan a partir del metabolismo secundario, que es la transformación y degradación de compuestos, por medio de proteínas especializadas. Estos compuestos se sintetizan en estructuras en específico y en una etapa en particular del desarrollo de la planta (Pichersky y Gang, 2000; Croteau, 2000).

En la evolución de las plantas y su interacción con el medio ambiente, necesitaron adaptarse a condiciones cambiantes de temperatura, humedad, salinidad, radiación UV, estrés químico, produciendo fitoquímicos para su defensa en las relaciones interespecíficas (Akula y Ravishankar, 2011). Por lo que, los metabolitos secundarios son sustancias eficaces ecológicamente, en las que empezaron a realizarse investigaciones de sus funciones y a partir de 1950-1960. Estos compuestos naturales tienen una limitada distribución en el reino vegetal, encontrándose en una especie o grupo de plantas taxonómicamente relacionadas (Croteau, 2000).

Las estructuras en crecimiento, los órganos de reproducción y de dispersión contienen una concentración y diversidad mayor de metabolitos secundarios. Estos compuestos se pueden diferenciar por la estructura química de cada tipo de compuesto y la posición de los grupos funcionales que presentan (Bourgaud *et al.*, 2001). Algunos de estos compuestos actúan como agentes alelopáticos, defensa ante herbívoros, relaciones de mutualismo en la atracción de polinizadores, funciones defensivas causando toxicidad, protección de rayos ultravioleta y desecación entre otras funciones. Por lo que son utilizados en la industria de la farmacología, perfumería y también utilizados como insecticidas y saborizantes (Rhodes, 1994; Wink, 1988; Croteau, 2000; Van der Fits, 2000; Zhang *et al.*, 2011; Teoh, 2016).

Además, en la biosíntesis específica para cada tipo de compuesto, interviene una enzima en particular, donde la alta temperatura y humedad son algunos factores que pueden activar la biosíntesis de compuestos a partir de rutas como la del ácido chikimico y del ácido mevalónico (Akula y Ravishankar, 2011). De acuerdo, con las rutas de biosíntesis que forman los metabolitos secundarios, estos se dividen en tres grupos; terpenos, compuestos fenólicos y nitrogenados como son los alcaloides. Se han identificado aproximadamente entre 25,000 a 30,000 terpenos que comparten una característica en común, una unidad de cinco átomos de carbono (isopreno) (García, 2004).

Los terpenos proceden de unidades de acetato activo (acetil-CoenzimaA) que se transforman en ácido mevalónico para dar origen a un isopreno que es específico en la biosíntesis de terpenos. Es el número de unidades de isopreno quien determina su clasificación; hemiterpenos una unidad de isopreno, monoterpenos dos unidades de isopreno, se caracterizan por formar parte de los compuestos volátiles de las plantas, sesquiterpenos tres unidades de isopreno, diterpenos cuatro unidades de isopreno, triterpenos seis unidades de isopreno. Los terpenos se sintetizan en el citosol y el retículo endoplasmático, y estos dan origen a sustancias como fragancias florales y sirven para atraer a polinizadores, aceites esenciales y algunas hormonas como las giberelinas. También son utilizados en la farmacología, como el ácido oleanólico que se encuentra en uvas (Croteau, 2000; Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2003; García, 2004).

Algunos ejemplos del uso de terpenos, son; el monoterpeno linanool producido por las orquídeas, es un compuesto aromático para que sirve para atraer polinizadores. Así mismo, el sesquiterpeno artemisinina es utilizado para aliviar la malaria, principalmente, la fiebre, este compuesto es derivado (*Artemisia annua*) planta medicinal de China. El diterpeno Placitaxol sirve para aliviar cáncer de colon y de pulmón (Teoh, 2016).

Se conocen aproximadamente 8,000 compuestos fenólicos. La biosíntesis se da por dos rutas metabólicas, la del ácido shikímico y ácido malónico. La primera ruta es más común en plantas superiores y la segunda ruta en microorganismos. La fenilalanina y la tirosina son intermediarios metabólicos en la biosíntesis de compuestos fenólicos. Estos compuestos están formados por un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo (OH). Tienen funciones de proveer color y aroma a las plantas. La vainillina es uno de los compuestos que proporciona sabor y aroma a la vainilla (Croteau, 2000; Michalak, 2006; Sharma *et al.*, 2007; Salazar-Rojas *et al.*, 2012; Delgado-Alvarado *et al.*, 2014).

Los flavonoides son compuestos polifenólicos, que tienen una estructura benzo- γ -pirano (tienen dos anillos aromáticos bencénicos unidos por un puente de tres átomos de carbono y como estructura general C6-C3-C6). Por lo que, el doble enlace del anillo aromático bencénico tiene la posibilidad de absorber la radiación ultravioleta. La biosíntesis de los flavonoides se da por dos rutas; la del shikimato y la del acetato-malonato. Algunos de tipos de flavonoides son las flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, antocianinas, isoflavonoides entre otros. Los flavonoides se encuentran en la membrana del tilacoide del cloroplasto, son importantes para la expresión de dos enzimas multigénicas, la fenilalanina amonio liasa y la chalcona sintasa, importantes en la síntesis de pigmentos (antocianinas) que se encuentran en forma de glicósidos en tejidos vegetales (Cartaya *et al.*, 2001).

Se han reportado aproximadamente 10,000 compuestos que son parte de los flavonoides, de los cuales aproximadamente 4,000 han sido descritos (Magalhães *et al.*, 2012). De las funciones que tienen en las plantas es como defensa, protección de los rayos UV, protección de hongos, bacterias, insectos. Por lo que el metabolismo de los fenoles se activa ante el estrés biótico y abiótico (Cartaya *et al.*, 2001). También, participan en las señales químicas (polinización), y tienen efectos en las

enzimas. Se caracterizan por tener actividad antioxidante, propiedad antiviral y antibacterial. Como es el caso de la quercetina que es un antioxidante y también tiene actividad antiinflamatoria, este compuesto también se encuentra en orquídeas como *Dendrobium catenatum*. Así mismo, en las orquídeas también se encuentran antocianinas que son responsables del color de las flores (Croteau, 2000; Teoh, 2016).

De los alcaloides se han reportado aproximadamente de 8,000 a 12,000 estos son compuestos nitrogenados y tienen un grupo funcional amina, presentan rutas biosintéticas diversas, a partir de diferentes aminoácidos como: L-arginina, L-lisina, L-fenilalanina, L-triptófano entre otros. Así mismo, son tres tipos de reacciones que determinan la estructura principal de los alcaloides; la formación de las bases de Schiff, la reacción de Mannich y el acoplamiento oxidativo de fenoles (Garcia, 2004). Algunas de sus funciones en las plantas es la protección al actuar en el sistema nervioso de sus depredadores. Así los, alcaloides en grandes cantidades pueden alterar el sistema nervioso. Por ejemplo, la cafeína y la nicotina (*Nicotiana tabacum*) son estimulantes del sistema nervioso, pero en dosis bajas pueden utilizarse como analgésicos, como la morfina que es un alcaloide del opio (*Papaver somniferum*), la nicotina (*Nicotiana tabacum*) también es utilizada como insecticida (Croteau, 2000).

La camptotecina, es un alcaloide quinolénico derivado de *Camptotheca accuminata* y se utiliza para el tratamiento de cáncer de ovario (Teoh, 2016). Así mismo se han encontrado que algunos géneros de la familia Orchidaceae contienen alcaloides con aplicación en la farmacología como son; Liparis, Malaxis, Dendrobium, Oberonia, Bulbophyllum con 314 especies de orquídeas en Bougainville, Papúa Nueva Guinea, estos géneros tienen alcaloides de tipo pyrrolizidine y dendrobine. Mientras que *Lupinus albus* y *L. mutabilis* también contienen alcaloides como

quinolizidina. Mientras que, en el género *Vanilla* no se detectaron alcaloides (Wink, 1988; Teoh, 2016).

Las saponinas son compuestos de alto peso molecular, formadas de moléculas de azúcar combinadas con un triterpeno. Las saponinas tienen polaridad alta y se agrupan en saponinas esteroideas y saponinas triterpeno (Hamuel-Doughari, 2012). La síntesis de saponinas en hojas, tallos, raíz, bulbos, flores y frutos de *Panax ginseng* se presentan para protección de la planta, y su producción depende de los factores ambientales (Akula y Ravishankar, 2011). Mientras que en *V. planifolia* se detectó presencia de saponinas en hoja, tallo, flor y fruto beneficiado (Andrade-Andrade *et al.*, 2018).

En *V. planifolia* se han documentado estudios sobre el tipo de fitoquímicos que contienen los frutos beneficiados (ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido *p*-hidroxibenzaldehído y vainillina) (Salazar-Rojas *et al.*, 2012; Delgado-Alvarado *et al.*, 2014). También, algunos estudios en donde la vainillina que está presente en frutos beneficiados de *V. planifolia* contiene propiedades antioxidantes (Dong *et al.*, 2014), anticancerígenas (Lirdprapamongkol *et al.*, 2005). Mientras que en *V. pompona* los estudios sobre el tipo de fitoquímicos que contienen son escasos, y se basan principalmente en el aroma en frutos verdes y beneficiados (Ehlers y Pfister, 1997; Maruenda *et al.*, 2013; Galeas *et al.*, 2015, 2016). Por lo que, aún falta identificar los fitoquímicos en las estructuras vegetales y reproductivas. En función de lo anterior, este estudio tuvo como objetivo detectar mediante pruebas cualitativas los grupos de fitoquímicos presentes en extractos de diferente polaridad de hoja, tallo, flor, fruto verde y beneficiado de *V. pompona* de dos localidades del estado de Veracruz: Cazuelas, Papantla y Puntilla Aldama, San Rafael y tres localidades de Oaxaca: Primavera Morelos, Hidalgo y Morelos, Santa Cruz Itundujia.

1.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Se recolectó material vegetal de *V. pompona* proveniente de cinco sitios; una plantación introducida y establecida en árboles de cedro blanco, en Cazuelas, Papantla, Veracruz, otra en Puntilla Aldama, San Rafael, Veracruz; y tres poblaciones en condición silvestre en las localidades de Morelos, Hidalgo y Primavera Morelos, municipio de Santa Cruz Itundujia, Oaxaca (Cuadro 1.1 y Cuadro 1.3), (Figura 1.1).

Cuadro 1.1 Sitios de colecta de *Vanilla pompona* Schiede en el estado de Veracruz y Oaxaca.

Sitio	Estado	Municipio	Localidad	Longitud	Latitud	Altitud (m)
1	Veracruz	San Rafael	Puntilla Aldama	-96.90	20.23	7
2		Papantla	Cazuelas	-97.27	20.43	69
3	Oaxaca	Santa Cruz Itundujia	Primavera Morelos	-97.71	16.77	808
4		Santa Cruz Itundujia	Hidalgo	-97.71	16.82	1110
5		Santa Cruz Itundujia	Morelos	-97.68	16.78	1277

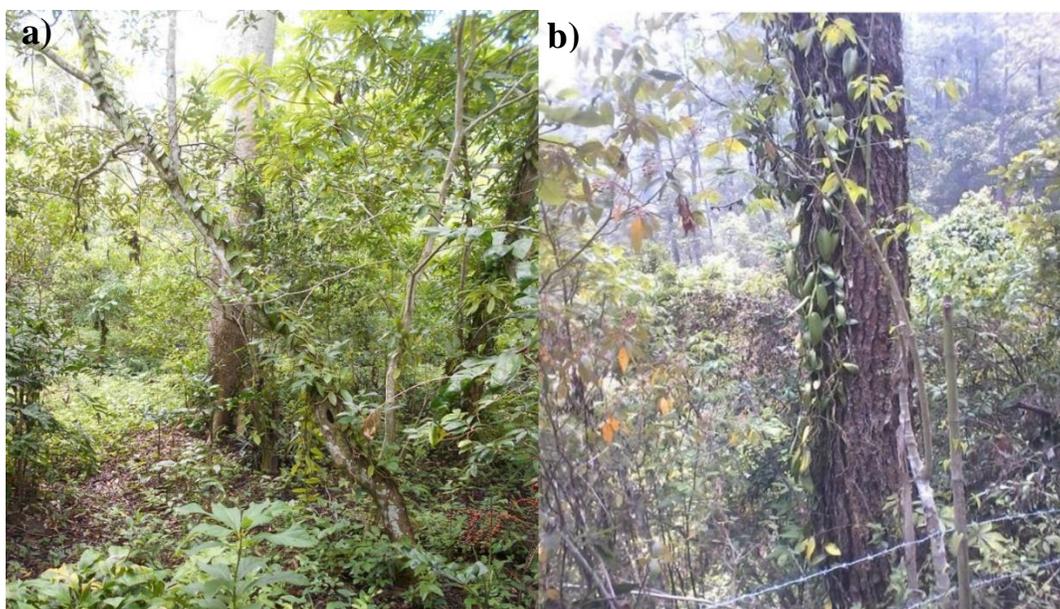


Figura 1 1 Localidades de colecta de *Vanilla pompona* en: a) Veracruz y b) Oaxaca, México.

Material Vegetal

Durante la floración, se realizó la recolecta de hojas, tallos y flores en el mes de mayo de 2016. Además, se marcaron y polinizaron de 20 a 30 flores por sitio (Cuadro 1.2), aproximadamente de 29 a 36 semanas después se recolectaron los frutos y se sometieron al proceso de beneficiado tradicional por el maestro beneficiador Veremundo Rodríguez en el Beneficio de Primero de Mayo, Papantla, Veracruz (Figura 1.2).

Cuadro 1.2 Estructuras vegetales y reproductivas colectadas de *Vanilla pompona*.

Sitio	Localidad	Hoja y tallo (esquejes)	Flor	Frutos sin beneficiar	Frutos beneficiados
1	Puntilla Aldama	1			
2	Cazuelas Primavera	7	19	26	45
3	Morelos	5			
4	Hidalgo	4			
5	Morelos	4	15	21	22



Figura 1.2 Estructuras colectadas de *Vanilla pompona*.

En las localidades de Cazuelas y Morelos se analizó hoja, tallo, flor, fruto verde y fruto beneficiado. Mientras, que en las localidades de Puntilla Aldama, Hidalgo y Primavera Morelos solo se analizó hoja y tallo, debido a que no fue posible colectar las demás estructuras.

El proceso de beneficiado tradicional se realizó siguiendo la descripción detallada por Xochipa-Morante *et al.* (2016), que consistió en cuatro pasos básicos, el matado de los frutos verdes mediante la inmersión en agua caliente (90 °C/ 1 min) y detener el desarrollo vegetativo. Después el sudado, en donde los frutos se almacenan durante 24 h en cajones de madera herméticamente cerrados, posteriormente se sometieron a 21 ciclos de un proceso llamado “asoleado-sudado” que consiste en exponer los frutos al sol, donde alcanzan una temperatura aproximada de 45 °C por 3 ó 4 h al día, después se colocan nuevamente en las cajas de madera, este proceso tiene el objetivo de deshidratar el fruto, pero también provocar el desarrollo de aromas y color característicos del fruto de vainilla.

Cuadro 1. 3 Características climáticas de las localidades de recolecta de *Vanilla pompona* Schiede de Oaxaca y Veracruz, México.

Localidad	Clima	Precipitación media anual (mm)	Altitud (m)	Temperatura media anual (°C)	Régimen de humedad del suelo[†]	Zona ecológica
Puntilla Aldama	Cálido húmedo Am(f)	1200 - 1500	7	≥22	Údico tipo II	Tropical húmeda
Cazuelas	Cálido subhúmedo (Aw1)	800-1200	69	>22	Ústico	Tropical húmeda Templada
Primavera- Morelos	Cálido subhúmedo (Aw2)	2000 - 2500	808	≥22	Xérico	subhúmeda Templada
Hidalgo	Cálido subhúmedo (Aw2) Semicálido subhúmedo	2000 - 2500	1110	≥22	Xérico	subhúmeda
Morelos	del grupo C (A)C (w1)	2000-2500	1277	>18	Xérico	Templada húmeda

(Fuente, CONABIO, 2012) Údico tipo II = 270 a 330 días de humedad; Ústico = 180 a 270 días de humedad; Xérico = 90 a 180 días de humedad.

Después de 5 ó 6 sudados y dependiendo de las condiciones del ambiente, los frutos se olean en camillas de madera para evitar la proliferación de hongos, el proceso de beneficiado se realizó en un periodo de aproximadamente 16 semanas. Al final los frutos se colocaron en doble bolsa de celofán y de plástico, y se almacenaron en la oscuridad a temperatura ambiente para completar el desarrollo del aroma.

Para la elaboración de extractos, se utilizaron solventes de diferente polaridad creciente; hexano, cloroformo y metanol. Las diferentes estructuras vegetales y reproductivas (hoja, tallo, flor, fruto sin beneficiar y beneficiado) se cortaron en pequeñas porciones y se les agregó cierta cantidad de solvente hasta cubrir perfectamente el tejido, calculando los pesos de las estructuras y la cantidad de solvente añadido, los extractos tuvieron una relación de 1:10 (v/v) (estructura vegetal: solvente) para cromógenos y 1:5 (v/v) para CCF, enseguida las muestras se colocaron en un baño ultrasónico (Ultrasonic Cleaner AS5150B) durante 30 min. Después los extractos se dejaron macerando por 12 horas. Posteriormente los extractos se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Pruebas por agentes cromógenos

Para detectar de manera preliminar la presencia de metabolitos secundarios como; saponinas, flavonoides, taninos, terpenos, alcaloides y ácidos fenólicos en tejidos vegetales (Cuadro 1.4), se utilizó un método que se basa en el análisis de extractos vegetales con agentes cromógenos, que son sustancias que forman precipitados, espuma. Estos métodos resultan muy útiles por la relativa rapidez y facilidad con la que pueden ser ejecutados, lo que permite una selección de materiales que contengan compuestos químicos de interés (Anexo 1A).

Cuadro 1.4 Pruebas por agentes cromógenos para identificación de fitoquímicos en *Vanilla pompona* Schiede.

Fitoquímico	Prueba	Referencia
Saponinas	Índice afrosimétrico (prueba de espuma)	Devmurari (2010)
	Rosenthaler	Velásquez <i>et al.</i> (2013)
Alcaloides	Dragendorff	Devmurari (2010); Félix-Silva <i>et al.</i> (2014)
	Wagner	Tiwari <i>et al.</i> (2011); Deshpande (2013)
	Hager	Tiwari <i>et al.</i> (2011); Deshpande (2013)
Flavonoides	Prueba Shinoda (HCl + Mg ⁺²)	Devmurari (2010); Sharma (2012)
	HCl 4N + NaOH 10%	Ramani <i>et al.</i> (2012); Abdullahi <i>et al.</i> (2013); Uma and Sekar (2014)
	NH ₄ OH/UV	Zohra <i>et al.</i> (2012)
Taninos	FeCl ₃ al 2%	Yadav and Agarwala (2011); Farhan <i>et al.</i> (2012)
	Acetato de plomo al 2%	Kumar <i>et al.</i> (2012); Abdullahi <i>et al.</i> (2013)
Ácidos fenólicos	FeCl ₃ al 10%	Yadav and Agarwala (2011); Farhan <i>et al.</i> (2012); Ganatra <i>et al.</i> (2012)
Terpenos	Acetato de cobre 2%	Tiwari <i>et al.</i> (2011); Ghogade (2013)
	Liebermann-Burchard	Tiwari <i>et al.</i> (2011); Félix-Silva <i>et al.</i> (2014)
	Salkowski	Tiwari <i>et al.</i> (2011)

Detección de grupos fitoquímicos por Cromatografía en capa fina (CCF)

La composición fitoquímica se confirmó mediante análisis por CCF. Las corridas de los extractos de hexano, cloroformo y metanol, y de los estándares, se realizaron en placas cromatográficas con soporte de aluminio (silica gel 60, F₂₅₄; de 5x10 cm, Sigma-Aldrich cat: Z193275-1PAK) en una cámara cromatográfica. Se aplicó el extracto en forma de punto dejando entre cada punto de aplicación (fase estacionaria) 0.5 cm de separación y se sometió a la influencia de una fase móvil (sistema cromatográfico), de esta forma el eluyente ascendió a través de la placa arrastrando los compuestos de interés produciendo bandas (Cuadro 1.5).

Cuadro 1.5 Sistemas cromatográficos, reveladores y testigos para CCF en *Vanilla pompona* Schiede.

Fitoquímico	Extracto	Sistema	Revelador
Flavonoides	Metanol	Acetato de etilo:Ác fórmico:Ác acético:Agua (7.5:1:1:0.5)	NP 1%/PEG 5%
	Cloroformo	Cloroformo:Acetona (9:1)	Testigo: Quercetina 0.5 mg mL ⁻¹
	Hexano	Cloroformo: Acetona (9:1)	
Saponinas	Metanol	Butanol:Ac acético glacial:Agua (4:1:4)	Vainillina 1% / H ₂ SO ₄ 6% en EtOH
	Cloroformo	Cloroformo:Acetona (9:1)	Testigo: Saponina reactivo 0.5 mg mL ⁻¹
	Hexano	Cloroformo:Acetona (9:1)	
Taninos	Metanol	Acetato de etilo:Ác fórmico: Ác acético:Agua (10:8:8:1)	FeCl ₃ 5% en HCl 0.5N
	Cloroformo	Acetato de Etilo:Acetona:Hexano (7:0.5:2.5)	Testigo: Ácido tánico 0.5 mg mL ⁻¹
	Hexano	Acetato de Etilo:Acetona:Hexano (7:0.5:2.5)	
Ácidos fenólicos	Metanol	Acetato de etilo:Ác fórmico:Ác acético:Agua (10:8:8:1)	Folin-Ciocalteu 50%/Na ₂ (CO) ₃ 20%
	Cloroformo	Metanol:Agua:Isopropanol:Acetona (30:65:2:3)	Testigo: Ácido gálico 0.5 mg mL ⁻¹
	Hexano	Metanol:Agua:Isopropanol:Acetona (30:65:2:3)	
Terpenos	Metanol	Hexano:Acetato de etilo:Agua (7:3:1)	Vainillina 1% / H ₂ SO ₄ 10% en EtOH
	Cloroformo	Hexano:Acetato de etilo (7:3)	Testigo: Clavo
	Hexano	Hexano:Acetato de etilo (7:3)	
Alcaloides	Metanol	Acetato de etilo:Metanol:Agua (3:1:1)	I 2%: KI 2%
	Cloroformo	Acetato de etilo:Hexano:Amoniaco (7:3:0.2)	Testigo: <i>Lupinus</i>
	Hexano	Acetato de etilo:Hexano:Amoniaco (7:3:0.2)	

Después del desarrollo de los cromatogramas, las placas se removieron de la cámara cromatográfica y se secaron a temperatura ambiente. Finalmente se realizó 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 series 3UVTM Lamp). Después, las placas cromatográficas se asperjaron con los reactivos cromogénicos (reveladores) específicos para cada prueba (Cuadro 1.5).

El movimiento de fitoquímicos a través de la placa se expresó mediante su factor de retención y los valores se calcularon a partir de la fórmula (1):

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida por la muestra (dm)}}{\text{Distancia total recorrida por el solvente}} \dots \dots \dots (1)$$

Los análisis para los ensayos evaluados en las pruebas de composición fitoquímica por agentes cromógenos, y las determinaciones por CCF en capa fina se realizaron por duplicado.

Análisis estadístico

Para los resultados de las pruebas cualitativas por cromatografía en capa fina se realizaron tablas de contingencia mediante el programa SPSS (versión 19). Para los valores de número de bandas de saponinas, alcaloides, flavonoides, taninos, ácidos fenólicos y terpenos, se realizaron dos repeticiones por estructura analizada.

1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis cualitativo de fitoquímicos por agentes cromógenos

Se tomó como referencia el sistema cualitativo de presencia y ausencia, mediante el conteo de cruces, tomando en cuenta los siguientes criterios; contenido alto (+++), medio (++) , débil (+) y ausente (-).

Saponinas

En la prueba de espuma para identificación de saponinas se detectó presencia débil y ausencia en la mayoría de los tejidos de las cinco localidades analizadas, con excepción de la muestra de hoja de la localidad de Puntilla Aldama que tuvo presencia media de saponinas (Figura 1.2B, ver Anexos). Lo que sugiere que la prueba de espuma no fue sensible para detectar estos compuestos en vainilla.

Mientras que, con la prueba de Rosenthaler, se detectó alta presencia de saponinas en el extracto de metanol en hoja, tallo, flor, fruto verde y beneficiado en comparación del extracto de cloroformo y hexano (Cuadro 1.6). Lo anterior debido a que las saponinas son compuestos polares y el extracto de metanol tiene polaridad más alta que el extracto de cloroformo y hexano. Así mismo, la prueba de Rosenthaler es específica para saponinas triterpénicas pentacíclicas (Wagner y Bladt, 1996; Velásquez *et al.*, 2013), lo que señala que probablemente este tipo de saponinas están presentes en los tejidos de la vainilla.

Alcaloides

Con las pruebas de Dragendorff, Wagner y Hager se detectaron alcaloides, con presencia media en el extracto de metanol hoja, tallo, flor y fruto verde y beneficiado, y presencia débil en el extracto de cloroformo y hexano, en la mayoría de los tejidos analizados de *V. pompona* indistintamente de la localidad (Cuadro 1.6, Figura 1.6B, ver Anexos). Mientras que, se reportó

alta presencia de alcaloides en extractos de la corteza de *Acacia nilotica* con solventes de polaridad alta como el etanol, y polaridad intermedia como el éter de petróleo (Deshpande *et al.*, 2013). Por otra parte, se ha documentado que los alcaloides vegetales pueden ser derivados de aminas terciarias, mientras que otros son nitrogenados. También, se ha reportado que *Strychnos schultesiana* Krukoff tiene alcaloides de tipo indólico en hojas, tallos y semillas que fueron detectados en solventes de polaridad baja como el cloroformo (Wagner y Bladt, 1996; Carvajal-Rojas *et al.*, 2009).

Los resultados anteriores indican que en las estructuras analizadas de *V. pompona* no se tienen alcaloides de tipo indólico, al detectarse alcaloides con presencia media en el extracto de metanol. Lo que infiere que podrían ser alcaloides de diferente naturaleza química.

Flavonoides

De las tres pruebas realizadas para la detección de flavonoides, con los ensayos de HCl 4N/NaOH y UV/NH₄OH se observó presencia alta en el extracto de metanol en la mayoría de los tejidos evaluados de *V. pompona* de las cinco localidades (Figura 1.11B, 1.12B, 1.13B, 1.14B y 1.15B, ver Anexos), probablemente, debido a que los flavonoides pueden ser de polaridad alta o de polaridad intermedia (Cartaya *et al.*, 2001). Mientras que la prueba con HCl/Mg⁺² mostró presencia media y débil de flavonoides en el extracto de metanol. Los resultados concuerdan con los del extracto de hojas de *Annona squamosa*, *Hibiscus rosa sinenses* y *Psidium guajava* en los que se detectó presencia de flavonoides (Sharma, 2012). A diferencia del extracto etanólico de la corteza de *Symplocos racemosa*, donde la prueba HCl/Mg²⁺ no mostró presencia de flavonoides (Devmurari, 2010). Mientras que, en los extractos de cloroformo y de hexano la presencia fue débil o ausente en todos los tejidos de *V. pompona* de las cinco localidades (Cuadro 1.6).

Taninos

Las pruebas de FeCl_3 y de acetato de plomo ambos al 2% para identificar la presencia de taninos, evidenció presencia media en el extracto de metanol para la mayoría de tejidos evaluados de *V. pompona* (Figura 1.16B, ver Anexos). Mientras, que en el extracto de cloroformo y de hexano hubo presencia débil y ausencia de taninos. Los anteriores resultados, fortalecen el supuesto de para consumo humano que es conveniente tener presencia baja de taninos en *V. pompona*, porque en exceso pueden ser tóxico y puede interferir con la síntesis de proteínas. En un estudio similar, la prueba de FeCl_3 2%, mostro que en extractos de metanol de hojas de *Bryophyllum pinnatum* y *Ricinus communis* mostró presencia de taninos (Yadav y Agarwala, 2011). Así mismo, se reporta que con la prueba de acetato de plomo al 2% en extractos acuosos de hojas de *Microtrichia perotitii* hubo presencia de taninos (Abdullahi *et al.*, 2013) (Cuadro 1.6).

Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos se visualizaron con presencia media en todos los tejidos de la planta de vainilla en las cinco localidades en el extracto de metanol (Figura 1.21B, ver Anexos). Mientras que, en el extracto de hexano y cloroformo la presencia fue débil (Cuadro 1.6). Resultados similares se presentaron, en el extracto de etanol de hojas y tallos de *Marva parviflora* con presencia de fenoles (ácidos fenólicos) (Farhan *et al.*, 2012) y en el extracto de metanol de hojas de *Ficus racemosa* (Ganatra *et al.*, 2012). Lo que sugiere que los fenoles son de polaridad alta e intermedia, lo cual explica porque en extractos de cloroformo y hexano de tejidos de *V. pompona* la presencia de fenoles fue débil.

Terpenos

Las pruebas de acetato de cobre, Liebermann-Burchard y Salkowski mostraron presencia alta y media de terpenos en el extracto de metanol de todos los tejidos evaluados de *V. pompona* de las cinco localidades (Figura 1.26B, ver Anexos). Mientras que en los extractos de cloroformo y hexano la presencia fue de media a ausente. En la prueba de Salkowski, específica para terpenos, se detectó mayor presencia de estos compuestos en todos los extractos, probablemente a que en los tejidos de vainilla pueda haber una mayor abundancia de triterpenos, mientras que la prueba de acetato de cobre detecta presencia de diterpenos y la prueba de Liebermann-Burchard puede detectar triterpenos y esteroides (García *et al.*, 2003). Estos dos compuestos difieren en sus estructuras (Ghogade, 2013, Tiwari *et al.*, 2011) (Cuadro 1.6).

Identificación de fitoquímicos por cromatografía en capa fina

Para confirmar los resultados obtenidos por agentes cromógenos se realizaron pruebas por cromatografía en capa fina en todos los tejidos de *V. pompona* procedentes de las cinco localidades de recolecta.

En el Cuadro 1.7 se concentraron los resultados de los extractos realizados solamente con sistemas de disolventes donde se observó una mejor separación de bandas. Los grupos de fitoquímicos identificados con mayor presencia de bandas fueron: saponinas>terpenos> flavonoides>ácidos fenólicos>alcaloides=taninos.

Saponinas

Este grupo de fitoquímicos, en hoja, tallo, flor, fruto verde y fruto beneficiado, presentó el mayor número de bandas, se detectaron 24 en total en la localidad de Cazuelas y 28 bandas en Morelos (Figura 1.1C, 1.2C, ver Anexos). Mientras que en Puntilla Aldama, Hidalgo y Primavera Morelos donde solo se analizó hoja y tallo, el número de bandas fue de 11 a 12 (Cuadro 1.7). A pesar de

que las saponinas son de polaridad alta, y se obtuvo mayor presencia en el extracto de metanol, también hubo presencia en extractos cloroformo y hexano, debido a que el sistema de cromatografía y de revelado que se utilizó posiblemente pudo haber detectado saponinas triterpénicas y esteroidales (Figura 1.2C, ver anexos) (Wagner y Bladt, 1996; Hamuel-Doughari, 2012).

Con base en lo que reportan Akula y Ravishankar, (2011) la síntesis de saponinas en hojas, tallos, raíz, bulbos, flores y frutos de *Panax ginseng* se presentan para protección de la planta, y su producción depende de los factores ambientales. Mientras que, en *V. planifolia* se tiene reportado que se obtuvo presencia de saponinas en hoja, tallo, flor y fruto beneficiado (Andrade-Andrade *et al.*, 2018). Lo que sugiere que en *V. pompona* las saponinas también pueden estar presentes en las diferentes estructuras de la planta.

Aunado a lo anterior, para conocer el papel que tienen las saponinas en *V. pompona*, es necesario realizar más estudios para identificar de qué naturaleza química son las saponinas que se encuentran en los tejidos de esta especie, para saber si pueden tener un uso potencial en la farmacología o si tienen efectos tóxicos. Dado que, se tiene reportado que las saponinas pueden tener efectos tóxicos como la de producir hemólisis en eritrocitos (Hinojosa *et al.*, 2013).

Cuadro 1.6 Tamizaje fitoquímico de extractos de hoja (H), tallo (T), flor (F), Fruto verde (Fv) y Fruto beneficiado (Fb) de cinco sitios de colecta de *Vanilla pompona*.

Fitoquímico	Prueba	Solvente	Papatla y San Rafael Veracruz						Santa Cruz Itundujia, Oaxaca									
			Cazuelas					Puntilla Aldama		Morelos					Primavera Hidalgo		Morelos	
			H	T	F	Fv	Fb	H	T	H	T	F	Fv	Fb	H	T	H	T
Saponina	Espuma	Agua	-	+		+	-	++	+	-	-		+	-	-	-	-	-
	Rosenthaler	Met	+++	+++	+++	+++	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++
		Clo	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
		Hex	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alcaloides	Dragendorff	Met	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
		Clo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		Hex	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Wagner	Met	++	+	++	++	+	++	++	+	+	++	++	+	++	++	++	++
		Clo	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		Hex	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Hager	Met	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
		Clo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		Hex	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HCl/Mg ²⁺	Met	+	+	++	++	++	++	+	++	+	+	++	+	+	+	+	+	
	Clo	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	
	Hex	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Flavonoides	HCl 4N, NaOH	Met	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	+++	++	+++	+++	++	++	++	+++	++
		Clo	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
		Hex	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Continuación del Cuadro 1.6

		Cazuelas					Puntilla Aldama		Morelos			Hidalgo		Primavera Morelos					
		H	T	F	Fv	Fb	H	T	H	T	F	Fv	Fb	H	T	H	T		
Flavonoides	UV/NH ₄ OH	Met	+++	++	+++	+++	++	+++	+	+++	+++	++	+++	+++	+	-	+++	++	
		Clo	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Hex	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Taninos	FeCl ₃ 2%	Met	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	
		Clo	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	++	++	+	+	+	+	
		Hex	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	Acetato de plomo 2%	Met	+	+	+	++	++	+	++	++	++	++	++	+	+	++	+	++	
		Clo	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
		Hex	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ácidos fenólicos	FeCl ₃ 10%	Met	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	
		Clo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		Hex	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Terpenos	Liebermann-Burchard	Met	++	++	+++	++	++	++	++	+	+	+++	++	++	++	+	+++	++	
		Clo	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	
		Hex	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Salkowski	Met	++	++	+++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	++	+	++	++	++	
		Clo	-	+	++	++	++	+	++	+	+	++	++	++	+	+	+	+	
		Hex	+	+	++	++	++	+	++	+	+	+	++	++	+	+	+	+	

Met= metanol; Clo= cloroformo; Hex= hexano. Escala de concentración: alta (+++), media (++), débil (+) y ausencia (-)

Alcaloides

Este grupo fitoquímico donde se analizaron todos los tejidos, tuvieron 4 y 7 bandas en la localidad de Cazuelas y Morelos respectivamente. Mientras que, en hoja y tallo, el número de bandas fue de 1 en Puntilla Aldama, Hidalgo y Primavera Morelos (Cuadro 1.7). La mayor detección de estos compuestos fue en extractos de metanol. Lo que sugiere que en los tejidos de *V. pompona* posiblemente existen alcaloides de polaridad intermedia ya que no se detectaron en los extractos con polaridad baja. La mayor detección de estos compuestos fue en extractos de metanol. Tal y como se observó en tejidos de *V. planifolia* (Andrade-Andrade *et al.*, 2018). Lo que sugiere que en los tejidos de *V. pompona* posiblemente existen alcaloides de polaridad intermedia ya que no se detectaron en los extractos con polaridad baja (Figura 1.8C, ver Anexos).

Los alcaloides se presentan en mayor abundancia en plantas dicotiledóneas más que en monocotiledóneas (Mazid *et al.*, 2011). También se tiene reportado que en el género *Vanilla* no se detectó presencia de alcaloides (Teoh, 2016). lo que pudiera explicar la baja detección de estos fitoquímicos en *V. pompona*. Por otra parte, los alcaloides en las plantas, tienen la función de protegerlas de los depredadores, ya que pueden alterar el sistema nervioso de este, además de poseer propiedades antimicrobianas (Croteau, 2000; Rodès-Reyes *et al.*, 2015) (Cuadro 1.7).

Flavonoides

En la localidad de Cazuelas y Morelos estos fitoquímicos tuvieron en hoja, tallo, flor, fruto verde y beneficiado 18 y 20 bandas, respectivamente. En Puntilla Aldama, Hidalgo y Primavera Morelos en hoja y tallo el número de bandas fue de 4 a 8, (Cuadro 1.7).

La presencia de este grupo de fitoquímicos en las placas de cromatografía fue evidente por la aparición de bandas de color verde, azul y amarillo a 254 y 365 nm, principalmente en el extracto

de metanol (Figura 1.9C y 1.10C, ver Anexos). Como se observó en extractos de metanol de hoja, tallo, flor y fruto beneficiado de *V. planifolia*, donde se reportó presencia de flavonoides (Andrade-Andrade *et al.*, 2018). De manera general, los flavonoides intervienen en las plantas para protección contra hongos, bacterias, insectos y para proteger a las células de flores y hojas de los rayos UV (Cartaya *et al.*, 2001; Mazid *et al.*, 2011).

Taninos

Este grupo fitoquímico mostró poca presencia en las localidades de Cazuelas y Morelos, donde se observaron solo cinco bandas en cada una de ellas. En Puntilla Aldama, Hidalgo y Primavera Morelos donde se analizó hoja y tallo, el número de bandas fue dos (Cuadro 1.7). Estos resultados sugieren que los taninos presentes en tejidos de *V. pompona* tienen polaridad intermedia, al detectarse primordialmente en extractos de metanol y muy poco en extractos de cloroformo y hexano (Figura 1.13C, ver Anexos). Como se reporta en hoja, tallo, flor y fruto beneficiado en *V. planifolia*, donde se detectaron taninos en extracto de metanol y no en extractos de polaridad baja (Andrade-Andrade *et al.*, 2018). A partir de los taninos y a su capacidad de enlazar proteínas, se generan toxinas, que sirven como protección ante depredadores de las plantas (Mazid *et al.*, 2011).

Ácidos fenólicos

La presencia de este grupo fitoquímico en el total de los tejidos analizados fue similar en la localidad de Cazuelas y Morelos, mostrado por las nueve y diez bandas respectivamente. Mientras que en Puntilla Aldama, Hidalgo y Primavera Morelos el número de bandas fue de dos a cuatro, en hoja y tallo (Cuadro 1.7) (Figura 1.17C, ver anexos). Algunas de las funciones de los compuestos fenólicos son de proveer color y aroma a las plantas, como los compuestos que originan el sabor y aroma de la vainilla (Croteau, 2000; Sharma *et al.*, 2007; Salazar-Rojas *et al.*,

2012). Además, el metabolismo de estos compuestos se activa ante el estrés biótico y abiótico como defensa para la planta ante herbívoros, insectos, y también tienen actividad antimicrobiana y antifúngica (Cartaya *et al.*, 2001; Mazid *et al.*, 2011).

Terpenos

Este grupo de fitoquímicos fue el segundo de mayor abundancia en el número de bandas totales, y donde se analizaron todos los tejidos tuvieron un número similar de bandas; 22 en Cazuelas y 23 en Morelos. Mientras que, en Puntilla Aldama, Hidalgo y Primavera Morelos solo se analizó hoja y tallo, el número de bandas se detectó en un rango de cuatro a nueve (Cuadro 1.7).

En el extracto de hexano fue donde se detectó mayor presencia de triterpenos en la mayoría de los tejidos de *V. pompona* (Figura 1.21C, 1.22C, 1.24 ver anexos). De igual manera se encontró que en el extracto de hexano de hoja, tallo, flor y fruto beneficiado de *V. planifolia* se detectó presencia de triterpenos (Andrade-Andrade *et al.*, 2018). Mientras que, en un estudio de extracto de la corteza de cedro (*Cedrela odorata* L.), se detectó la presencia de triterpenos en extractos de hexano y cloroformo (Pereira *et al.*, 2013). Lo que explica, que los triterpenos son compuestos de baja polaridad.

Por otra parte, los terpenos se sintetizan en el citosol y el retículo endoplasmático, y dan origen a sustancias como; aceites esenciales, fragancias florales las cuales sirven para atraer a polinizadores (Croteau, 2000; Garcia, 2004). En el caso de *V. pompona*, tiene polinización por recompensa, por lo que utiliza sus fragancias florales para atraer abejas del género *Euglossine*, que colectan fragancias del labelo de la flor (Soto-Arenas, 2009). Por otra parte, las diferentes estructuras de terpenos, que son algunas toxinas, actúan como defensa ante los depredadores. Como es el caso de los piretroides que son monoterpenos y pueden actuar como insecticida, estos

compuestos se han encontrado en hojas y flores de crisantemo (*Chrysanthemum* sp.) (Mazid *et al.*, 2011).

La presencia de fitoquímicos por tejido estuvo en relación directa con la localidad de recolecta, como las saponinas que mostraron un número mayor de bandas (6) en hoja y tallo en las localidades de Oaxaca: Morelos, Hidalgo y Primavera Morelos. Mientras que, la mayor presencia de terpenoides en flor y fruto verde (5-6 bandas) se mostró en las localidades de Cazuelas y Morelos. En la localidad de Cazuelas, Puntilla Aldama y Morelos se mostró mayor presencia de flavonoides en hoja (5-6 bandas). Por otra parte, en la localidad de Cazuelas, Puntilla Aldama, Morelos, Primavera Morelos e Hidalgo se tuvo baja presencia de alcaloides en la mayoría de los tejidos analizados de *V. pompona* (1-2) bandas, al igual que ácidos fenólicos (1-2 bandas) y taninos (1 banda) (Cuadro 1.7).

En el caso de flavonoides y ácidos fenólicos el número de bandas vario en las cinco localidades analizadas, posiblemente a que las localidades se ubican en sitios distantes, con diferente latitud, altitud, temperatura, precipitación, clima (Cuadro 1.3) (Figura 1.15C, ver anexos). Lo cual sugiere que el ambiente, el manejo en la plantación de *V. pompona* de la localidad de Cazuelas, la condición silvestre de *V. pompona* en la localidad de Morelos, Hidalgo y Primavera Morelos fue lo que ocasiono esas diferencias entre localidades, tal y como se reporta en las determinaciones por CCF de flavonoides y fenoles en extractos de metanol de hojas de *Tithonia tubaeformis*, donde se detectaron diferencias en fenoles y flavonoides de las muestras de las diferentes regiones de colecta, debido a la diferente radiación solar recibida en las plantas (Hinojosa *et al.*, 2013).

Cuadro 1.7 Número de bandas de fitoquímicos detectados por cromatografía en capa fina en los extractos de hoja (H), tallo (T), flor (F), fruto verde (Fv) y fruto beneficiado (Fb) de *Vanilla pompona* Schiede de las localidades de Cazuelas, Puntilla Aldama, Hidalgo, Morelos y Primavera Morelos.

Localidad	Tejido	Sap*	Alc*	Flav*	Tan*	Ác.f*	Terp**	Total
		Número de bandas						
Cazuelas	H	5	1	5	1	2	4	18
	T	5	0	5	1	2	4	17
	F	5	1	3	1	2	5	17
	Fv	6	1	2	1	1	6	17
	Fb	3	1	3	1	2	4	14
	Total		24	4	18	5	9	23
Puntilla	H	5	1	6	1	2	2	17
Aldama	T	6	1	2	1	2	2	14
	Total	11	2	8	2	4	4	31
Morelos	H	6	2	5	1	2	4	20
	T	6	1	5	1	2	4	19
	F	6	2	5	1	2	6	22
	Fv	5	1	2	1	2	5	16
	Fb	5	1	3	1	2	3	15
	Total		28	7	20	5	10	22
Hidalgo	H	6	1	3	1	2	4	17
	T	6	1	2	1	2	3	15
	Total	12	2	5	2	4	7	32
Primavera	H	6	1	3	1	1	5	17
Morelos	T	6	1	1	1	1	4	14
	Total	12	2	4	2	2	9	31

Sap= saponinas; Alc= alcaloides; Flav= flavonoides; Tan= taninos; Ac.f= ácidos fenólicos; Terp= terpenos; *=extracto de metanol; **=extracto de hexano.

1.4 CONCLUSIONES

El análisis cualitativo por la prueba de cromógenos mostró presencia en orden de importancia, de saponinas, flavonoides, terpenos ácidos fenólicos y alcaloides, principalmente en extractos de metanol en hoja, tallo, flor fruto verde y beneficiado de *V. pompona*. Mientras que por la prueba en cromatografía en capa fina se detectó presencia saponinas, ácidos fenólicos, flavonoides, alcaloides en extractos de metanol, y los terpenos se detectaron con presencia mayor en el extracto de hexano. En la localidad de Morelos y Cazuelas en flor y fruto verde se observó presencia mayor de terpenos, y la hoja mostró presencia mayor de flavonoides. Por ultimo las muestras de la localidad de Morelos y la de Cazuelas fueron las de mayor contenido de compuestos, a pesar de ser ambientes contrastantes tanto en precipitación (2000-2500 vs 800-1200 mm) como en altura (1277 vs 69 msnm) y comparables con la presencia de saponinas, flavonoides y terpenos, lo que indica que el nivel de fitoquímicos se mantiene a pesar de los diferentes ambientes y condiciones de desarrollo en *V. pompona*. Estos análisis mostraron de manera cualitativa el perfil de fitoquímicos que presentan las estructuras de la planta de *Vanilla pompona*.

1.5 LITERATURA CITADA

- Akula R, Ravishankar G.A. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling and Behavior*. 6: 1720-1731.
- Andrade-Andrade G, Delgado Alvarado A, Herrera-Cabrera BE, Arévalo-Galarza L, Caso-Barrera L. 2018. Variación de compuestos fenólicos totales, flavonoides y taninos en *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews de la Huasteca Hidalguense, México. *Agrociencia*. 52: 55-66.
- Bourgau F, Gravot A, Milesi S, Gontier E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*. 161: 839-851.

- Brunschwig C, Collard FX, Lepers-Andrzejewski S, Raharivelomanana P. 2017. Tahitian Vanilla (*Vanilla x tahitensis*): A Vanilla Species with Unique Features. In Active Ingredients from Aromatic and Medicinal Plants. In Tech 29-47.
- Carvajal-Rojas L, Hata-Uribe Y, Sierra-Martínez N, Rueda-Niño D. 2009. Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de cupatá (*Strychnos schultesiana* Krukoff). Colombia forestal. 12: 161-170.
- Cartaya O, Reynaldo I. 2001. Flavonoides: características químicas y aplicaciones. Cultivos tropicales. 22: 5-14.
- Chandra S, Khan S, Avula B, Lata H, Yang MH, ElSohly MA, Khan IA. 2014. Assessment of total phenolic and flavonoid content, antioxidant properties, and yield of aeroponically and conventionally grown leafy vegetables and fruit crops: A comparative study. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2014: 1-9.
- Chang CL, Lin CS. 2012. Phytochemical composition, antioxidant activity, and neuroprotective effect of *Terminalia chebula* Retzius extracts. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2012: 1-7.
- CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad). 2012. Portal de Geoinformación. (Consultado 20 Noviembre 2016). Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/informacion/gis/>
- Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG. 2000. Natural products (secondary metabolites). Biochemistry and molecular biology of plants. 24: 1250-1319.
- Delgado-Alvarado A, Salazar-Rojas VM, Herrera-Cabrera BE. 2014. Polimorfismo químico de componentes del aroma en germoplasma de *Vanilla* spp de la región del Totonacapan

- Puebla-Veracruz, México. *I Seminario Internacional de Vainilla*. Promoviendo la investigación, la extensión y la producción de vainilla en Mesoamérica INISEFOR, Vol. 1, 25p.
- Devmurari VP. 2010. Phytochemical screening study and antibacterial evaluation of *Symplocos racemosa* Roxb. Archives of Applied Science Research. 2: 354-359.
- Deshpande SN. 2013. Preliminary phytochemical analysis and in vitro investigation of antibacterial activity of *Acacia nilotica* against clinical isolates. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 1: 23-27.
- Dong Z, Gu F, Xu F, Wang Q. 2014. Comparison of four kinds of extraction techniques and kinetics of microwave-assisted extraction of vanillin from *Vanilla planifolia* Andrews. Food chemistry. 149: 54-61.
- Ehlers D, Pfister M. 1997. Compounds of vanillons (*Vanilla pompona* Schiede). Journal of Essential Oil Research. 9: 427-431.
- Farhan H, Rammal H, Hijazi A, Hamad H, Badran B. 2012. Phytochemical screening and extraction of polyphenol from stems and leaves of a Lebanese *Euphorbia macrolada schyzoceras* Boiss. Annals of Biological Research. 3: 149-156.
- Félix-Silva J, Antunes dos Santos J, Medeiros de Quadros L, Medeiros IT, Lira L, Da Silva-Junior A, Zucolotto S, Fernandes-Pedrosa MF. 2014. Systemic and local anti-inflammatory activity of aqueous leaf extract from *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae). Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 6: 142-145.
- Galeas M, Lin J, Hartman T. 2015. Chemical Characterization of *Vanilla pompona* Schiede, Part I. Perfumer and Flavorist. 40: 16-28.

- Galeas M, Lin J, Hartman T. 2016. Chemical Characterization of *Vanilla pompona* Schiede, Part II. Perfumer and Flavorist. 41: 26-34.
- Ganatra S, Durge SP, Patil SU. 2012. Preliminary Phytochemicals Investigation and TLC Analysis of *Ficus racemosa* Leaves. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. 4: 2380-2384.
- García DE, Ojeda F, Montejo I. 2003. Evaluación de los principales factores que influyen en la composición fitoquímica de *Morus alba* (Linn.). I Análisis cualitativo de metabolitos secundarios. Pastos y Forrajes. 26: 335-346.
- García DE. 2004. Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. Pastos y forrajes. 27: 1-13.
- Ghongade R. 2013. Phytochemical analysis of *Citrus karna* fruit. International Journal of Pharma and Bio Sciences. 4: 1162-1167.
- 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.
- Hinojosa DJ, Guitierrez LM, Siller LF, Rodríguez SA, Morales-Del Rio JA, Guerrero MPJ, Del-Toro-Sánchez CL. 2013. Screening fitoquímico y capacidad antiinflamatoria de hojas de *Tithonia tubaeformis*. Biotecnia. 15: 53-60.
- Ibarra-Cantún D. 2017. Estudio del contenido de compuestos fitoquímicos en hoja, tallo, flor, fruto verde y beneficiado de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews de la región del Totonacapan, México, Tesis Doctorado, Colegio de Postgraduados Campus Puebla. Programa en Estrategias Para el Desarrollo Agrícola Regional. 146 pp.

- Kumar S, Kumari SN, Bhat V, Sharmila KP, Prasad M. 2012. Preliminary phytochemical screening of various extracts of *Punica granatum* Peel, whole fruit and seeds. Nitte University Journal of Health Science. 2: 34-38.
- Lirdprapamongkol K, Sakurai H, Kawasaki N, Choo MK, Saitoh Y, Aozuka Y, Singhirunnusorn P, Ruchirawat S, Svasti J, Saiki I. 2005. Vanillin suppresses in vitro invasion and in vivo metastasis of mouse breast cancer cells. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 25: 57-65.
- Maruenda H, Del Lujan Vico M, Householder JE, Janovec JP, Cañari C, Naka A, González AE. 2013. Exploration of *Vanilla pompona* from the Peruvian Amazon as a potential source of vanilla essence: Quantification of phenolics by HPLC-DAD. Food Chemistry. 138: 161-167.
- Magalhães LM, Almeida MIG, Barreiros L, Reis S, Segundo MA. 2012. Automatic aluminum chloride method for routine estimation of total flavonoids in red wines and teas. Food Analytical Methods. 5: 530-539.
- Mazid M, Khan TA, Mohammad F. 2011. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. Biology and Medicine. 3: 232-249.
- Michalak A. 2006. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. Polish Journal of Environmental Studies. 15: 523-530.
- Pereira CS, Vega TD., Almeida SM, Morales TG, Viera TY, Sánchez GY. 2013. Actividad antimicrobiana in vitro de *Cedrela odorata* L.(cedro). Revista Cubana de Plantas Medicinales. 18: 513-521.
- Pichersky E, Gang DR. 2000. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. Trends in Plant Science. 5: 439-445.

- Ramani A, Charles A, Stanley L, Joseph M, Mani C. 2012. Novel extraction and phytochemical screening of *Alseodaphne semecarpifolia* Nees. (Lauraceae). International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 4: 1-2.
- Rhodes MJC. 1994. Physiological roles for secondary metabolites in plants: some progress, many outstanding problems. Plant Molecular biology. 24: 1-20.
- Rodés-Reyes S, Peña-Fuentes D, Hermosilla-Espinosa R. 2015. Tamizaje fitoquímico de extractos y tinturas al 20% de la raíz y corteza de *Dichrostachys cinerea* L. (Marabú). Revista Cubana de Plantas Medicinales. 20: 156-166.
- Salazar-Rojas VM, Herrera-Cabrera BE, Delgado-Alvarado A, Soto-Hernández M, Castillo-González F, Cobos-Peralta M. 2012. Chemotypical variation in *Vanilla planifolia* Jack. (Orchidaceae) from the Puebla-Veracruz Totonacapan region. Genetic Resources and Crop Evolution. 59: 875-887.
- Sepúlveda-Jiménez G, Porta-Ducoing H, Rocha-Sosa M. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. Revista Mexicana de Fitopatología. 21: 355-363.
- Sharma UK, Sharma N, Gupta AP, Kumar V, Sinha AK. 2007. RP-HPTLC densitometric determination and validation of vanillin and related phenolic compounds in accelerated solvent extract of *Vanilla planifolia*. Journal of Separation Science. 30: 3174-3180.
- Sharma RR. 2012. Preliminary phytochemical screening of some indigenous medicinal plant leaves extract in regulation of antidiabetic activity. Science Research Reporter. 2: 307-310.
- SPSS (2010) Statistical Package for Social Sciences. User's Manual (Versión 19).
- Soto Arenas MA. 2009. Recopilación y análisis de la información existente sobre las especies mexicanas del género *Vanilla*. Reporte intermedio, CONACYT. P. 76.

- Teoh ES. 2016. *Medicinal Orchids of Asia*, Springer. Basel, Switzerland. pp. 1-752.
- Tiwari P, Kumar B, Kaur M, Kaur G, Kaur H. 2011. Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*. 1:98-106.
- Uma C, Sekar SC. 2014. Phytochemical analysis of a folklore medicinal plant *Citrullus colocynthis* L. (Bitter apple). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2: 195-202.
- Van der Fits L, Memelink J. 2000. ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. *Science*. 289: 295-297.
- Velásquez O, Murillo E, Méndez JJ, Murillo W, Noreña DA. 2013. Quantification, chemical and biological characterization of the saponosides material from *Sida cordifolia* L. (Escobilla). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 18: 298-314.
- Wagner H S. Blatt. 1996. *Plant Drug Analysis: A thin Layer Chromatography Atlas*. 2d. Ed. Springer Verlag. New York. pp. 384.
- Wink M. 1988. Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theoretical and Applied Genetics*. 75: 225-233.
- Xochipa-Morante RC., Delgado-Alvarado A, Herrera-Cabrera BE., Escobedo-Garrido JS, Arévalo-Galarza L. 2016. Influencia del proceso de beneficiado tradicional Mexicano en los compuestos del aroma de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews. *Agro Productividad*. 9: 55-62.
- Yadav RNS, Agarwala M. 2011. Phytochemical analysis of some medicinal plants. *Journal of Phytology*. 3: 10-14.

Zhang HF, Yang XH, Wang Y. 2011. Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: current status and future directions. *Trends in Food Science and Technology*. 22: 672-688.

Zohra SF, Meriem B, Sabri S, Alsayadi M. 2012. Phytochemical Screening and identification of some compounds from Mallow. *Journal of Natural Product and Plant Resource*. 2: 512-516.

CAPÍTULO II.

CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FITOQUÍMICOS DE ORGANOS DE *Vanilla pompona* Schiede DESARROLLADOS BAJO DOS AMBIENTES

RESUMEN

Los factores ambientales pueden tener efecto en la producción de fitoquímicos en las plantas. En *Vanilla pompona* Schiede, la presencia de fitoquímicos se ha documentado principalmente en frutos verdes y beneficiados, en relación con los compuestos que proporcionan el sabor y aroma, sin considerar el efecto del ambiente donde crecen. El trabajo tuvo como objetivo cuantificar la concentración total de compuestos fenólicos (CFT), flavonoides (FLAVT), triterpenos (TRIT) y saponinas (SAPT) en las estructuras vegetales (hoja, tallo) y reproductivas (flor, fruto verde y fruto beneficiado) de *V. pompona* en dos sitios de recolecta: la localidad de Cazuelas del municipio de Papantla, Veracruz y la localidad de Morelos en el municipio de Santa Cruz Itundujia, Oaxaca, México. Los CFT, FLAVT se cuantificaron en extractos de metanol, TRIT en extractos de etanol y SAPT en extractos acuosos de las cinco estructuras de la planta mediante métodos espectrofotométricos. Por tejido el fruto verde de 36 semanas tuvo la concentración mayor de CFT ($0.586 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$), de TT ($34.213 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) y de SAPT ($5.968 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$), la hoja y la flor tuvieron la concentración más alta de FLAV (1.101 y $1.034 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$), respectivamente. Entre localidades, Morelos y Cazuelas tuvieron una concentración similar de CFT (0.344 y $0.325 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$). Mientras que la localidad de Morelos tuvo mayores concentraciones de FLAVT ($0.799 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$), y Cazuelas destaco por la concentración mayor de TRIT ($9.301 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) y SAPT ($3.792 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$). Mientras que la temperatura media anual y el régimen de humedad del suelo tuvieron efecto en la acumulación de TRIT y SAPT en la localidad de Cazuelas.

Palabras clave: ambiente, metabolitos secundarios, vainilla, Oaxaca, Veracruz,

2.1 INTRODUCCIÓN

Los fitoquímicos se caracterizan por tener propiedades farmacológicas, por lo que en los últimos años se ha investigado sobre el tipo de fitoquímicos que contienen algunas especies de plantas (Drago-Serrano *et al.*, 2006). Por ejemplo, en *V. planifolia*, donde la vainillina es el compuesto mayoritario de los frutos beneficiados, se caracteriza por tener propiedades antioxidantes (Shyamala *et al.*, 2007; Dong *et al.*, 2014), anticancerígenas (Akagi *et al.*, 1995; Lirdprapamongkol *et al.*, 2005), para inhibir formación de células falciformes (Zhang *et al.*, 2004) y para reducir daño cromosómico (Keshava *et al.*, 1998) entre otras. También en esta especie, los extractos etánolicos de hoja y tallo de *V. planifolia* han mostrado actividad antimicrobiana (Shanmugavalli *et al.*, 2009).

En algunos trabajos se ha documentado el efecto del ambiente que puede tener sobre la producción de fitoquímicos (Chandra *et al.*, 2014; Ibarra-Cantún *et al.*, 2017). En la especie *Potentilla fruticosa* L. provenientes de diferentes regiones de China se evidenció que factores ambientales como temperatura media anual, altitud y precipitación media anual, tuvieron influencia en la producción de fitoquímicos (Liu *et al.*, 2016). De igual forma en vainilla, se detectó que la concentración de algunos componentes fitoquímicos, como compuestos fenólicos totales, flavonoides totales, saponinas, taninos totales y condensados totales, tuvieron variación en función del tejido y del sitio de la recolecta en diferentes ambientes de la Huasteca Hidalguense (Andrade-Andrade *et al.*, 2018). En poblaciones silvestres de Oaxaca de *V. planifolia*, los frutos beneficiados mostraron efecto de la zona ecológica sobre la concentración de cuatro de los compuestos fenólicos del aroma (ácido *p*-hidroxibenzoico, *p*-hidroxibenzaldehído, ácido vanílico y vainillina) (Herrera-Cabrera *et al.*, 2016). Sin embargo, en *V. pompona* solo se han analizado fitoquímicos en frutos verdes y beneficiados (Ehlers y Pfister, 1997; Maruenda *et al.*, 2013; Galeas *et al.*, 2015, 2016), y

en ninguno de los estudios se ha considerado el ambiente en el que se cultivan. Por lo que, el trabajo tuvo como objetivo conocer la concentración de los compuestos fenólicos totales, flavonoides totales, triterpenos totales y saponinas totales en hojas, tallos, flores, frutos verdes y frutos beneficiados de *V. pompona*, además de determinar la influencia en la concentración de fitoquímicos de la condición ambiental en la que crecen las plantas en dos sitios de recolecta; Cazuelas Papantla, Veracruz y Morelos Santa Cruz Itundujia, Oaxaca, México. Con el propósito de conocer el potencial que tienen los tejidos de la planta de esta especie en la producción de fitoquímicos.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Se recolecto material vegetal de *V. pompona* proveniente de dos sitios; una plantación introducida y establecida en arboles de cedro blanco, en Cazuelas, Papantla, Veracruz, y una población en condición silvestre en la localidad de Morelos, Santa Cruz Itundujia, Oaxaca (Cuadro 2.1).

Cuadro 2.1 Sitios de colecta de *Vanilla pompona* Schiede en Cazuelas y Morelos.

Sitio	Estado	Municipio	Localidad	Longitud	Latitud	Altitud (m)
1	Veracruz	Papantla	Cazuelas	-97.27	20.43	69
2	Oaxaca	Santa Cruz Itundujia	Morelos	-97.68	16.78	1277

Material vegetal

Durante la floración, en el mes de mayo de 2016, se realizó la recolecta de hojas, tallos y flores. Además, se marcaron y polinizaron de 20 a 30 flores por sitio, posteriormente entre las 29-36 semanas después de la polinización se recolectaron los frutos, algunos fueron analizados en verde y otros se sometieron al proceso de beneficiado tradicional (Cuadro 2.2, Figura 2.1). El beneficiado

lo realizó el maestro beneficiador Veremundo Rodríguez en el Beneficio Primero de Mayo, Papantla, Veracruz.

Cuadro 2.2 Estructuras vegetales y reproductivas colectadas de *Vanilla pompona* en Cazuelas Papantla, Veracruz y Morelos Santa Cruz Utundujia, Oaxaca.

Tejido	Semanas	Localidad	
		Cazuelas	Morelos
Hoja y Tallo (esqueje)		7	4
Flor		19	15
Fruto verde	29	6	14
	31	13	7
	36	7	
Fruto beneficiado	29	9	16
	31	21	6
	36	15	

Se analizó el efecto del ambiente sobre el contenido de fitoquímicos de *V. pompona* entre localidades. Como variables ambientales se consideraron; clima, precipitación media anual, altitud, temperatura media anual y régimen de humedad del suelo (Cuadro 2.3).

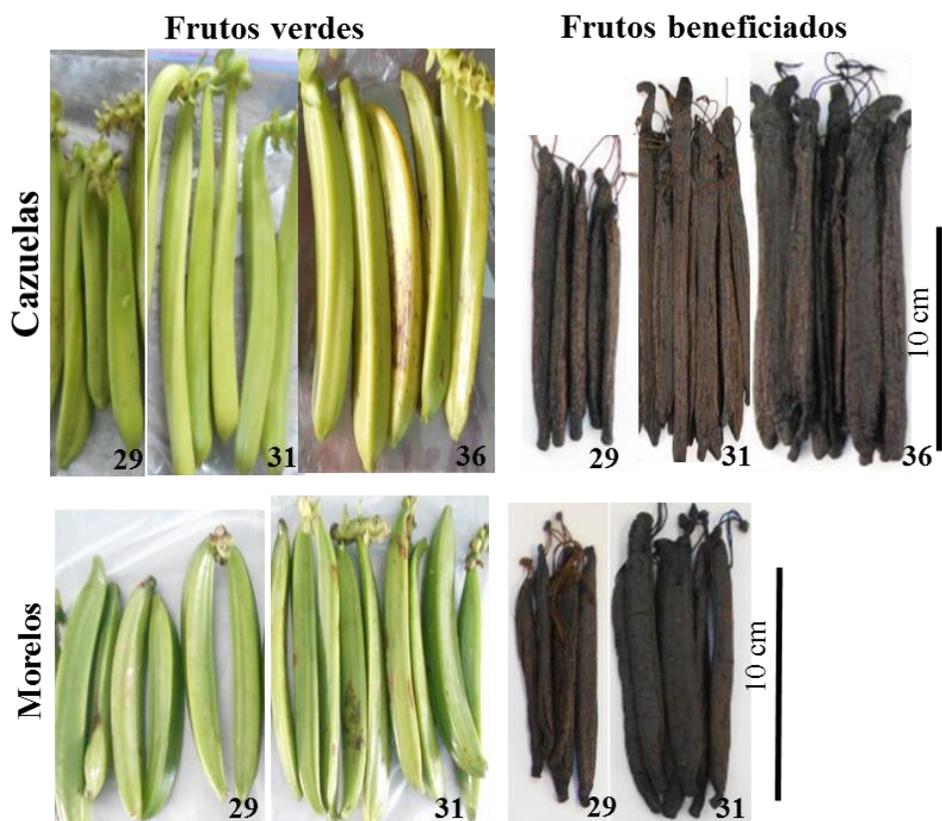


Figura 2.1 Frutos verdes y frutos beneficiados de *Vanilla pompona* de 29, 31 y 36 semanas después de la polinización, procedentes de Cazuelas, Papantla, Veracruz y Morelos, Santa Cruz Itundujia, Oaxaca.

Cuadro 2.3 Características climáticas de las localidades de recolecta de *Vanilla pompona* Schiede de Morelos, Santa Cruz, Oaxaca y Cazuelas, Papantla Veracruz.

Localidad	Clima	Precipitación media anual (mm)	Altitud (m)	Temperatura media anual (°C)	Régimen de humedad del suelo ¹	Zona ecológica
Cazuelas	Cálido subhúmedo (Aw1)	800-1200	69	>22	Ústico	Tropical húmeda
Morelos	Semicálido subhúmedo del grupo C (A)C (w1)	2000-2500	1277	>18	Xérico	Templada húmeda

(Fuente, CONABIO, 2012) Ústico= 180 a 270 días de humedad; Xérico= 90 a 180 días de humedad.

Elaboración de extractos

Previo al análisis de fitoquímicos, a todos los tejidos se les determinó el contenido de humedad en termobalanza (Ohaus MB45), para expresar la concentración de los metabolitos secundarios con base en materia seca (MS).

Compuestos fenólicos totales y flavonoides totales

De cada tejido (hoja, tallo, flor, fruto verde y fruto beneficiado) de la localidad de Cazuelas y Morelos se prepararon extractos en metanol a una concentración de $500 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Las muestras se colocaron en un baño ultrasónico (Ultrasonic Cleaner AS5150B) por un lapso de 30 min. Posteriormente, los extractos se dejaron macerando por 12 horas. Después se filtraron y almacenaron en viales de vidrio a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su análisis.

Triterpenos totales

Se pesó 1 g de muestra fresca, se añadió 10 mL de etanol al 75% y se dejó reposar a temperatura ambiente por 10 h. La muestra se sometió a baño ultrasonido por 40 min a $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Después se centrifugó a 5000 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 min. El sobrenadante se evaporó en el rotoevaporador utilizando vacío, procurando dejar etanol. La solución se guardó a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 12 horas, al término se centrifugó a 5000 rpm por 5 min. Posteriormente se evaporó por completo el etanol. El residuo se extrajo 4 veces con butanol:agua (1:1) (v/v). La fase acuosa se descartó y la fase orgánica se evaporó en rotoevaporador. Al residuo se le añadió éter etílico y se almacenó a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ por 12 h. El residuo se centrifugó y se descartó el disolvente. El precipitado se secó a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ en estufa de aire forzado. Con el residuo sólido se preparó una solución muestra a una concentración de $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ disuelto en etanol al 100 %. Los extractos se almacenaron en viales de vidrio a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su análisis.

Saponinas totales

De cada tejido (hoja, tallo, flor, fruto verde y fruto beneficiado) se prepararon extractos en agua a una concentración de $200 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Las muestras se colocaron en un baño ultrasónico (Ultrasonic Cleaner AS5150B ver manual) por un lapso de 30 min. Posteriormente, los extractos se dejaron macerando por 12 horas. Después se filtraron y almacenaron en viales de vidrio a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su análisis.

Cuantificación de fitoquímicos

Compuestos fenólicos totales

Se utilizó el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Herald *et al.*, 2012) con algunas modificaciones. Del extracto preparado se realizó una dilución de 1:5 (v/v) solo para fruto verde y beneficiado. Se utilizó $25 \text{ } \mu\text{L}$ de solución muestra o estándar y se mezcló con $75 \text{ } \mu\text{L}$ de agua desionizada, después a la mezcla se adicionaron $25 \text{ } \mu\text{l}$ del reactivo Folin-Ciocalteu al 50 % (v/v), la mezcla se agitó por 10 s a velocidad media y se dejó reposar por 6 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Se añadió $100 \text{ } \mu\text{L}$ de Na_2CO_3 al 7.5 % (p/v). se agitó por 10 s a velocidad media y se dejó reposar por 60 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Posteriormente se registró la absorbancia a 725 nm en un espectrofotómetro de microplaca (Thermo Scientific Varioskan Flash). Se obtuvo una curva estándar ($y = 0.0089x + 0.0002$; $r^2 = 0.99$) con ácido gálico (Sigma Aldrich; No. Cat. G7384). El contenido de compuestos fenólicos totales se expresó como equivalentes del ácido gálico en $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de materia seca (MS).

Flavonoides totales

El contenido de flavonoides totales se determinó con base en el método de Silva-Beltrán *et al.* (2015) con algunas modificaciones. El extracto se realizó para hoja, tallo, flor, fruto sin beneficiar

y beneficiado a una concentración de $500 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ en metanol al 100 %. Para fruto beneficiado se realizó una dilución de 1:5 (v/v) y para las demás estructuras no se realizó ninguna dilución. Posteriormente se utilizó 25 μL de solución muestra o estándar y se mezcló con 100 μL de agua desionizada, la mezcla se agito por 8 s a velocidad media, inmediatamente se añadió 10 μL de NaNO_2 al 5 % (p/v), la mezcla se agito por 8 s a velocidad media, y se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente. Enseguida se añadió 15 μL de AlCl_3 al 10 % (p/v), la mezcla se agito por 8 s a velocidad media y se dejó reposar 6 min a temperatura ambiente, enseguida se añadió 50 μL de NaOH a 1 M. La mezcla se agito por 8 s a velocidad media y se adicionó 50 μL de agua desionizada. La mezcla se agitó 15 s a velocidad media y se dejó reposar 5 min en oscuridad a temperatura ambiente, enseguida se determinó la absorbancia a una longitud de 415 nm en un espectrofotómetro de microplaca (Thermo Scientific Varioskan Flash). Se obtuvo una curva estándar ($y = 0.001x + 0.0209$; $r^2 = 0.99$) con quercetina (Sigma Aldrich; No. Cat. Q4951-10G). El contenido de flavonoides totales se expresó en equivalentes de quercetina en $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$.

Triterpenos totales

El contenido de triterpenos totales fue determinado por un método colorimétrico basado en Chang y Lin (2012) con algunas modificaciones. Se realizó una dilución de 1:5 (v/v) para fruto verde y 1:3 (v/v) para fruto beneficiado. Se utilizó 120 μL del extracto de cada muestra o estándar y se mezcló con 150 μL de vainillina (disuelto en ácido acético glacial) a 5 % (p/v), enseguida se añadió 500 μL de ácido perclórico. La mezcla se agito y se dejó en baño María por 45 min a 60°C . Posteriormente, se dejó enfriar en agua con hielo durante 10 min. Después, se adiciono 2.25 mL de ácido acético glacial. La absorbancia fue medida a una longitud de 550 nm en un espectrofotómetro (UV/VIS; Evolution 300, Thermo). Se obtuvo una curva estándar ($y = 0.0011x$

+ 0.0107; $r^2= 0.99$) con Ácido oleanólico (Sigma Aldrich; No. Cat. 05504-100MG). El contenido de triterpenos totales se expresó en equivalentes de ácido oleanólico en $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ MS.

Saponinas totales

El contenido de saponinas totales se cuantificó de acuerdo al método de Ahmed y Wang (2015), con algunas modificaciones. Se expresó como equivalentes de saponina quillaje. Se realizó una dilución de 1:3 (v/v) para tallo y hoja, para flor 1:4 (v/v). Mientras, que para fruto verde y beneficiado se realizó una dilución 1:10 (v/v). Se utilizó 25 μL del extracto de cada muestra y se mezcló con 225 μL de agua, enseguida se adiciono 250 μL a la mezcla de vainillina al 8 % (p/v) y 2.5 mL de ácido sulfúrico al 72 % (v/v). Posteriormente, la mezcla se colocó en baño María por 20 min a 60 °C y se dejó enfriar en agua con hielo por 10 min. Después, se dejó reposar por 30 s en agua a temperatura ambiente. La absorbancia fue medida a una longitud de 544 nm en un espectrofotómetro (UV/VIS; Evolution 300, Thermo). Se obtuvo una curva estándar ($y = 0.0003x + 0.0059$; $r^2= 0.99$) con saponina quillaje (Sigma Aldrich; No. Cat. 57900-25G). El contenido de saponinas totales se expresó en $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ MS.

Análisis estadístico

Para los valores de concentración de los compuestos fenólicos totales, flavonoides totales, saponinas totales y triterpenos totales, se incluyeron nueve repeticiones para hoja y tallo, y cuatro repeticiones para flor, fruto verde y beneficiado para cada localidad de recolecta. En el análisis estadístico de los resultados de la concentración de fitoquímicos de *V. pompona*, se utilizó a la temperatura media anual, régimen de humedad del suelo, altitud y precipitación media anual como fuente de variación. Los datos se analizaron bajo un modelo equivalente al diseño completamente

al azar. Se realizó un análisis de varianza (ANAVA) y comparación de medias mediante la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) mediante el paquete estadístico SAS versión 9.0 (2002).

Para identificar asociaciones entre variables ambientales y fitoquímicos se realizó análisis multivariados de las variables evaluadas, mediante el análisis de correlaciones canónicas. Porque este análisis es adecuado para buscar interdependencia entre las variables evaluadas, a diferencia de las correlaciones de Pearson. También, se pueden usar datos métricos y no métricos para variables dependientes e independientes. Además, la correlación canónica muestra la varianza compartida por las combinaciones lineales de los conjuntos de variables (Wydra y Verdier, 2002; Badii *et al.*, 2007; Herrera y García, 2010). Por lo que, este análisis explica la relación entre dos grupos de variables, usando combinaciones lineales para cada grupo, buscando la correlación más alta entre grupos de variables. Así mismo, se utilizaron cargas cruzadas para interpretar las correlaciones canónicas, ya que estas proporcionan una medida más directa de las relaciones entre las variables dependientes e independientes. Se realizó mediante el paquete estadístico SAS versión 9.0 (2002).

También, se realizó un análisis de conglomerado y un análisis de componentes principales (ACP) para determinar las variables con mayor influencia en la distribución de los tejidos de acuerdo con su similitud mediante el paquete estadístico SAS versión 9.0 (2002).

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis del contenido de fitoquímicos de V. pompona Schiede

Los compuestos fitoquímicos que se tienen reportados de poblaciones silvestres de *V. pompona* en México son muy escasas. Algunos trabajos reportan solamente compuestos en frutos beneficiados (Ehlers y Pfister, 1997; Delgado Alvarado *et al.*, 2014; Galeas *et al.*, 2015, 2016), en frutos verdes

y beneficiados (Maruenda *et al.*, 2013). Mientras que en la mayor parte de las investigaciones de fitoquímicos se enfocan principalmente en *V. planifolia*, en cuantificar los cuatro compuestos que proporcionan el sabor y aroma, por ser la especie más utilizada como saborizante en la industria (Salazar-Rojas *et al.*, 2012; Delgado-Alvarado *et al.*, 2014; Herrera-Cabrera *et al.*, 2016). Y algunos estudios en hoja, tallo, flor, fruto verde y beneficiado (Andrade-Andrade *et al.*, 2018).

El análisis de fitoquímicos de hoja, tallo, flor, y fruto verde y fruto beneficiado de 29, 31 y 36 semanas de maduración de *V. pompona* entre localidades mostró coeficientes de variación más altos en saponinas totales (SAPT; 26.676 %) y compuestos fenólicos totales (CFT; 20.785 %), debido a que la concentración de estos fitoquímicos tuvo una amplia variación dentro de las diferentes estructuras de la planta. Mientras, que los triterpenos totales (TRIT), mostraron los coeficientes de variación más bajos (14.369 %), debido a que la concentración fue más homogénea dentro de los tejidos de la planta (Cuadro 2.4).

Se detectaron diferencias altamente significativas ($P < 0.0001$) en las variables analizadas en localidad y tejido, excepto en CFT por localidad que no tuvo diferencia significativa (Cuadro 2.4).

Cuadro 2.4 Medias y coeficientes de variación de las variables evaluadas en *Vanilla pompona* Schiede en dos localidades colectadas de Veracruz y Oaxaca, México.

Variable			Cuadrados medios			
$\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$	Media	CV (%)	Localidad	Tejido	Localidad*Tejido	Error
CFT	0.334	20.785	0.011NS	0.298***	0.054***	0.005
FLAVT	0.749	16.040	0.263***	0.753***	0.114***	0.014
TRIT	7.308	14.369	321.764****	457.473***	10.295***	1.103
SAPT	3.166	26.676	40.429***	17.959***	6.753***	0.713

***= $P < 0.0001$; NS=estadísticamente no significativo; CFT= Compuestos Fenólicos Totales; FLAVT=Flavonoides Totales; TRIT=Triterpenos Totales; SAPT=Saponinas totales.

Los resultados del contenido de fitoquímicos mostró variación entre localidades, excepto en CFT que tuvieron valores similares de concentración promedio de los tejidos ($0.325\text{-}0.344\text{ g}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ MS) (Cuadro 2.5), lo que sugiere que a pesar de los diferentes ambientes en donde crecieron las plantas (Cuadro 2.3), no hubo efecto entre localidades para la producción de estos compuestos. En cultivos de frutales, la concentración de compuestos fenólicos y otros fitoquímicos pueden variar debido a cambios en las condiciones climáticas como temperatura, radiación UV, humedad, salinidad y precipitación (Akula y Ravishankar, 2011; Xu *et al.*, 2011; Chandra *et al.*, 2014).

En *V. planifolia* el ambiente no ha tenido efecto en la presencia y concentración de los cuatro compuestos principales que proporcionan su sabor y aroma (Salazar-Rojas *et al.*, 2012). Los cambios en la concentración de estos compuestos se han atribuido más bien a un proceso de selección de los frutos, realizado por los productores en la cultura totonaca basado en el aroma y usos, que ha promovido un aumento en la cantidad de la vainillina y una reducción en la concentración de tres compuestos minoritarios (ácido vanílico, *p*-hidroxibenzaldehído y ácido *p*-hidroxibenzoico) (Delgado-Alvarado *et al.*, 2014). Mientras que *V. pompona* no ha sufrido un proceso de selección tan arduo como *V. planifolia*, por lo que es de esperarse que esta especie tienda a producir mayor diversidad de fitoquímicos como un sistema de adaptación al ambiente donde se desarrolle (Chandra *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016).

Cuadro 2.5 Prueba de medias para las variables fitoquímicas en *Vanilla pompona* Schiede en la localidad de Cazuelas y la localidad de Morelos, México.

Localidad	Compuestos fenólicos	Flavonoides	Triterpenos	Saponinas
	totales	totales	totales	totales
	$\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$			
Cazuelas	0.325 ^a	0.707 ^b	9.301 ^a	3.792 ^a
Morelos	0.344 ^a	0.799 ^a	5.264 ^b	2.388 ^b
DMS	0.024	0.043	0.472	0.372

Letras diferentes dentro de columnas indican diferencia estadística según Tukey ($\alpha=0,05$); DMS= diferencia mínima significativa.

En FLAVT, SAPT, y TRIT se observó un efecto del ambiente en la concentración de estos compuestos por las localidades analizadas. De manera similar en otras especies como en fruto de *Cola pachycarpa* recolectado en distintas zonas geográficas, la concentración de compuestos fenólicos, flavonoides y taninos mostró variación atribuida al ambiente (Ene-Obong *et al.*, 2016). La localidad de Morelos tuvo la concentración mayor de FLAVT (0.799 $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$). A diferencia de la localidad de Cazuelas que mostró una concentración mayor de TRIT (9.301 $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$) y de SAPT (3.792 $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$) (Cuadro 2.5). Las respuestas diferenciadas de los fitoquímicos es probable que se deba, a que como son utilizados para defensa y protección, tienen un papel importante en relación con el entorno ecológico, las plantas los producen en función de sus necesidades para adaptarse a condiciones cambiantes de temperatura, humedad, salinidad, radiación UV, estrés químico, y/o también para su defensa ante depredadores, bacterias y hongos, de allí que se promueva la biosíntesis de compuestos derivados de la ruta del ácido shikimico y del ácido mevalónico (Akula y Ravishankar, 2011; Mazid *et al.*, 2011).

En la prueba de medias (Tukey $\alpha= 0.05$) por tejido se observaron diferencias significativas en la concentración de los fitoquímicos. El fruto verde de 31 y 36 semanas tuvo la concentración más alta de compuestos fenólicos totales (CFT) (0.501 y 0.586 $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$). Mientras que el tallo (0.192

$\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$) y el fruto beneficiado de 29 y 31 semanas (0.207 y $0.189 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$) tuvieron la concentración menor de estos metabolitos (Cuadro 2.6). La disminución en la concentración de CFT en el fruto beneficiado respecto a los frutos verdes, posiblemente se deba a que durante el proceso de curado estos metabolitos se degradan por la acción de las enzimas y alta temperatura, aunque para *V. pompona* no se encontró algún antecedente al respecto.

En FLAVT, la hoja ($1.101 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$) y flor ($1.034 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$) fueron los tejidos en los que se obtuvieron las concentraciones mayores, debido probablemente a que estos compuestos se generan por estrés, y la planta los utiliza para su defensa (Silva-Beltrán *et al.*, 2015), y son precisamente las hojas y frutos los órganos más expuestos ante factores externos. En fruto beneficiado de 29 y 31 semanas (0.519 y $0.447 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$) se tuvo la concentración más baja de este compuesto (Cuadro 2.6), al respecto se sabe que algunos de estos compuestos son termosensibles (Liu *et al.*, 2016), lo que sugiere que durante el proceso de beneficiado pudieron degradarse y por eso mostraron una concentración menor respecto a los frutos verdes.

En TRIT la concentración mayor se obtuvo en fruto verde de 36 semanas ($34.213 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$) y la menor concentración se obtuvo en flor ($2.763 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$). Mientras que en SAPT la concentración mayor se obtuvo en fruto verde de 29 y 36 semanas (6.144 y $5.986 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$), teniendo $\text{FV29}=\text{FV36}>\text{Fv31}>\text{H}=\text{T}>\text{Fb29}>\text{Fb36}>\text{F}=\text{Fb31}$ (Cuadro 2.6). De manera similar en soya (*Glycine max*) se encontró concentraciones de saponinas de 4 a $6 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$ (Berhow *et al.*, 2006). A diferencia de hojas de *Ginkgo biloba* L. donde obtuvieron concentraciones de saponinas de 5.914 a $11.155 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ (Qian *et al.*, 2009). Se tiene reportado que las saponinas tienen propiedades antifúngicas (Rodés-Reyes *et al.*, 2015), antiinflamatorias, antibacterial, antioxidantes, antimicrobiana (Cheok *et al.*, 2014). Por lo que, se necesitan realizar estudios más detallados en *V.*

pompona para conocer qué tipo de triterpenos y de que naturaleza química son las saponinas (triterpénicas o esteroidales) para poder darles un uso apropiado.

Cuadro 2.6 Concentración de fitoquímicos de hoja, tallo, flor, fruto verde y beneficiado de *Vanilla pompona* Schiede de Oaxaca y Veracruz, México.

Tejido	Compuestos	Flavonoides	Triterpenos	Saponinas
	fenólicos totales	totales	totales	totales
g·100 g⁻¹ MS				
Hoja	0.320 ^d	1.101 ^a	4.198 ^{ef}	3.247 ^{bc}
Tallo	0.192 ^e	0.697 ^b	3.926 ^{ef}	3.353 ^{bc}
Flor	0.408 ^c	1.034 ^a	2.763 ^f	1.669 ^d
Fv29	0.446 ^{bc}	0.721 ^b	11.114 ^c	6.144 ^a
Fv31	0.501 ^b	0.807 ^b	19.792 ^b	3.706 ^b
Fv36	0.586 ^a	0.840 ^b	34.213 ^a	5.968 ^a
Fb29	0.207 ^e	0.519 ^c	4.125 ^{ef}	2.164 ^{cd}
Fb31	0.189 ^e	0.447 ^c	5.607 ^{de}	1.302 ^d
Fb36	0.304 ^d	0.720 ^b	6.987 ^d	2.593 ^{bcd}
DMS	0.082	0.154	1.924	1.421

Letras diferentes dentro de columnas indican diferencia estadística según Tukey ($\alpha=0.05$); Fv29= fruto verde de 29 semanas; Fv31= fruto verde de 31 semanas; Fv36= fruto verde de 36 semanas; Fb29= fruto beneficiado de 29 semanas; Fb31= fruto beneficiado de 31 semanas; Fb36= fruto beneficiado de 36 semanas, DMS= diferencia mínima significativa.

En la interacción de los fitoquímicos de localidad con tejidos se tuvieron diferencias significativas para todas las variables analizadas (Figura 2.2). La concentración de compuestos fenólicos totales y de flavonoides totales fue similar en hoja y flor en ambas localidades, pero los tallos, frutos verdes (29 y 31 semanas) y frutos beneficiados (31 semanas) de la localidad de Morelos mostraron concentraciones mayores que en la localidad de Cazuelas (Figura 2.2).

La concentración mayor de saponinas totales la presentaron las hojas, frutos verdes (29 y 31 semanas) y frutos beneficiados (29 y 31 semanas) de Cazuelas. En triterpenos totales todos los tejidos excepto el fruto verde de 29 semanas, tuvieron una concentración más alta en la localidad de Cazuelas (Cuadro 2.1A, ver Anexos). Las diferencias entre localidades de recolecta pueden

atribuirse a las condiciones de cada localidad. Cazuelas, tiene un clima Cálido subhúmedo (Aw1), una precipitación media anual de 800-1200 mm, se encuentra a una altitud de 69 msnm, temperatura de >22 °C, se ubica en la zona ecológica tropical humedad y tiene un régimen de humedad del suelo ústico (180 a 270 días de humedad). Mientras que la localidad de Morelos tiene un clima semicálido subhúmedo del grupo C (A)C (w1), una precipitación media anual de 2000-2500 mm, la temperatura media anual es de >18 °C, se encuentra a una altitud de 1277 msnm y pertenece a la zona ecológica templada húmeda (CONABIO, 2012). Por lo que la temperatura y el régimen de humedad del suelo en la localidad de Cazuelas propiciaron la mayor acumulación de saponinas, tal y como se reporta en *Bacopa monnieri*, donde la alta humedad y temperatura provocó mayor producción de saponinas (Phrompittayarat *et al.*, 2011).

El análisis del contenido de fitoquímicos de los tejidos por localidad mostró que, en Morelos, el fruto verde de 31 semanas de maduración tuvo la concentración mayor de CFT ($0.647 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ MS), mientras que en los frutos beneficiados (29 y 31 semanas) se detectaron las concentraciones más bajas (0.157 a $0.199 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ MS).

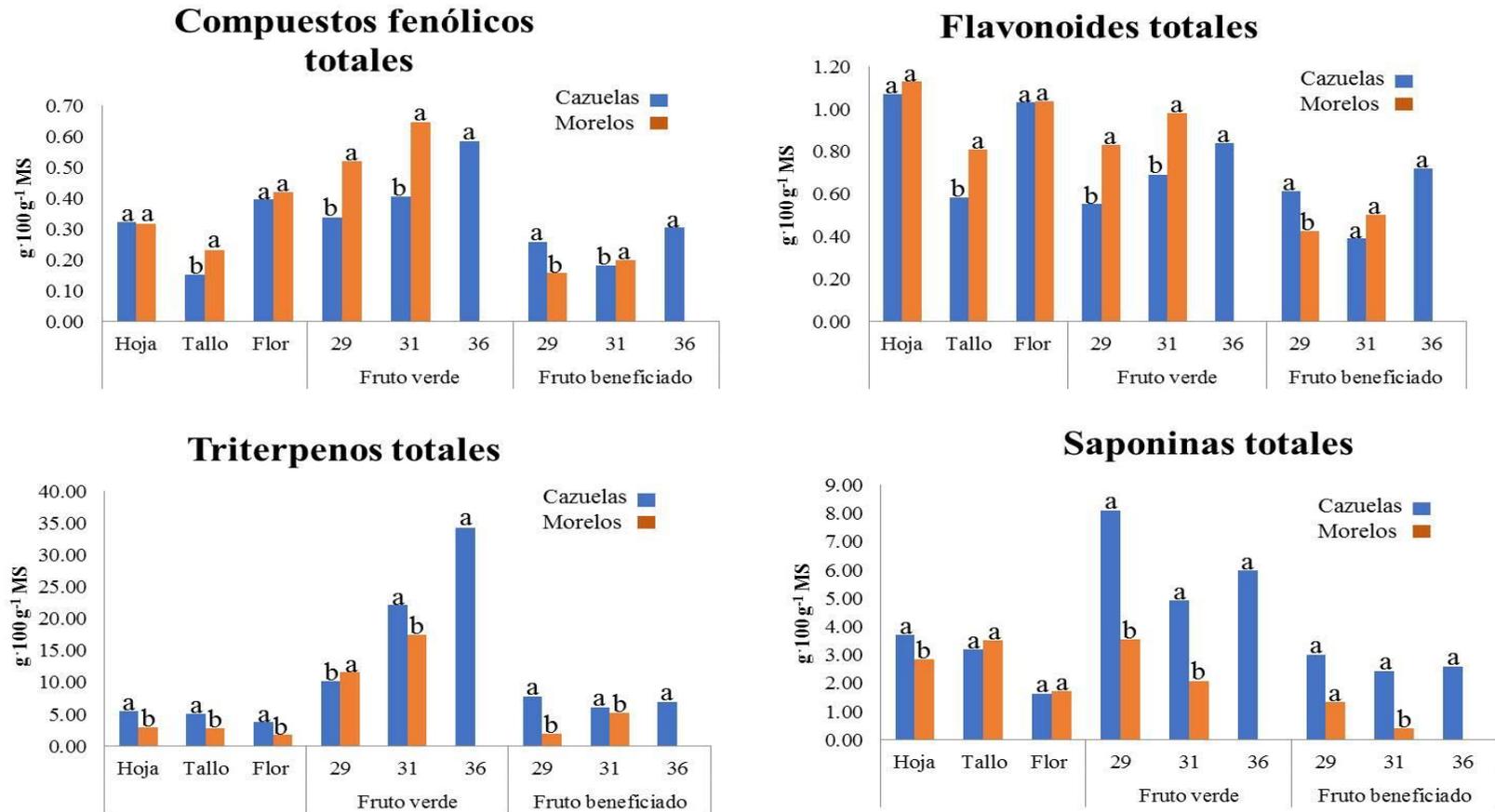


Figura 2.2 Concentración de fitoquímicos en la interacción de localidad*tejido en *Vanilla pompona* Schiede en los sitios de recolecta en Cazuelas, Papantla Veracruz y Morelos, Santa Cruz Itundujia Oaxaca, México.

Letras diferentes dentro de columnas indican diferencia estadística según Tukey ($\alpha=0.05$).

En el caso de FLAVT, la hoja ($1.131 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$) y la flor ($1.035 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$) mostraron los valores más altos (Cuadro 2.6). En triterpenos los frutos evaluados de mayor madurez (31 semanas) tuvieron la concentración mayor ($17.490 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$), sin embargo, en los frutos beneficiados la concentración de este compuesto disminuyó significativamente. Los tejidos que mostraron la concentración mayor de SAPT fueron fruto verde de 29 semanas de maduración ($3.553 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$), tallo ($3.516 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$) y hoja ($2.850 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$). Mientras que, en fruto beneficiado de 31 semanas de maduración, la concentración de SAPT disminuyó significativamente ($0.394 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$) (Cuadro 2.7), por lo que los frutos inmaduros tienen mayor contenido de fitoquímicos, como las saponinas que sirven para proteger a los frutos de los depredadores (Kreuger y Potter, 1994).

En la localidad de Cazuelas, los CFT mostraron la concentración mayor en el fruto verde de 36 semanas de maduración ($0.586 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$). Los FLAVT se acumularon en concentración mayor en hoja ($1.071 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$) y flor ($1.032 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$) (Figura 2.1B, ver Anexos). Por otra parte, los TRIT mostraron una concentración significativamente mayor en los frutos verdes de 36 semanas de maduración ($34.213 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$), pero disminuyó casi cinco veces en los frutos beneficiados de la misma edad ($6.987 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$). En general los terpenos actúan como protección de la planta ante depredadores, estrés abiótico como: alta temperatura, alta intensidad de luz, contaminación atmosférica entre otros factores (Siwko *et al.*, 2007; Vickers *et al.*, 2009), lo que sugiere que la temperatura de la localidad de Cazuelas ($>22 \text{ }^\circ\text{C}$) condujo a una mayor acumulación de triterpenos en comparación con la localidad de Morelos ($>18 \text{ }^\circ\text{C}$). En SAPT, el fruto verde de menor edad (29 semanas) tuvo la concentración más alta ($8.088 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$) (Cuadro 2.7).

Cuadro 2.7 Cuantificación de fitoquímicos en hoja, tallo, flor, vaina verde y vaina beneficiada de *Vanilla pompona* Schiede por localidad, México.

Localidad	Tejido	Compuestos	Flavonoides	Triterpenos	Saponinas
		fenólicos totales	totales	totales	totales
		g·100 g ⁻¹ MS			
Cazuelas	Hoja	0.322 ^{cd}	1.071 ^a	5.461 ^f	3.693 ^d
	Tallo	0.151 ^f	0.582 ^c	5.093 ^f	3.190 ^{de}
	Flor	0.396 ^{bc}	1.032 ^a	3.775 ^g	1.624 ^f
	Fv29	0.337 ^{bcd}	0.553 ^{cd}	10.223 ^c	8.088 ^a
	Fv31	0.404 ^b	0.690 ^{bc}	22.093 ^b	4.925 ^c
	Fv36	0.586 ^a	0.840 ^b	34.213 ^a	5.968 ^b
	Fb29	0.257 ^{de}	0.612 ^c	7.787 ^d	3.005 ^{de}
	Fb31	0.180 ^{ef}	0.393 ^d	6.013 ^{ef}	2.438 ^{ef}
	Fb36	0.304 ^d	0.720 ^{bc}	6.987 ^{de}	2.593 ^{ef}
	DMS	0.082	0.176	1.316	0.970
Morelos	Hoja	0.318 ^d	1.131 ^a	2.934 ^d	2.850 ^{ab}
	Tallo	0.232 ^e	0.811 ^c	2.759 ^{de}	3.516 ^a
	Flor	0.421 ^c	1.035 ^{ab}	1.750 ^f	1.725 ^c
	Fv29	0.519 ^b	0.833 ^c	11.560 ^b	3.553 ^a
	Fv31	0.647 ^a	0.983 ^b	17.490 ^a	2.080 ^{bc}
	Fb29	0.157 ^f	0.427 ^d	1.928 ^{ef}	1.323 ^c
	Fb31	0.199 ^{ef}	0.501 ^d	5.200 ^c	0.394 ^d
		DMS	0.066	0.131	0.856

Letras diferentes dentro de columnas indican diferencia estadística según Tukey ($\alpha=0.05$); Fv29= fruto verde de 29 semanas; Fv31= fruto verde de 31 semanas; Fv36= fruto verde de 36 semanas; Fb29= fruto beneficiado de 29 semanas; Fb31= fruto beneficiado de 31 semanas; Fb36= fruto beneficiado de 36 semanas, DMS= diferencia mínima significativa.

Los compuestos que definen el aroma de los frutos verdes y beneficiados de *V. pompona*, hasta ahora se han descrito que en su mayoría son de tipo fenólico (Ehlers y Pfister, 1997; Maruenda *et al.*, 2013, Galeas *et al.*, 2015, 2016). En este trabajo, la concentración de compuestos fenólicos totales tuvo los valores más altos en los frutos verdes de maduración más avanzada, 31 semanas (localidad de Morelos) y 36 semanas (localidad de Cazuelas). Sin embargo, la concentración en los frutos beneficiados de los mismos estados de maduración mostró una reducción significativa de casi 70 % en los frutos de 31 semanas y de cerca de 50 % en los frutos de 36 semanas. Estos resultados evidenciaron que los compuestos fenólicos de los frutos verdes de *V. pompona* se

degradaron durante el proceso de curado, contrario a *V. planifolia*, donde los compuestos fenólicos ($0.7496 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$) no solo no disminuyen, sino que se incrementan durante el beneficiado (Andrade-Andrade *et al.*, 2018), también durante este proceso se modifican otras propiedades fisicoquímicas (color, pH y humedad) y organolépticas (Ramachandra y Ravishankar, 2000; Luna-Guevara *et al.*, 2016).

En este trabajo, el beneficiado de los frutos se realizó de acuerdo al proceso descrito por Xochipa-Morante *et al.* (2016), que tradicionalmente se utiliza en los frutos de *V. planifolia*. El proceso consistió principalmente de cuatro etapas, el matado de los frutos verdes con agua caliente, posteriormente el sudado, en donde los frutos se almacenaron durante 24 h en cajones de madera, después se sometieron a aproximadamente 21-25 ciclos de un proceso llamado “asoleado-sudado”, luego los frutos nuevamente se colocaron en las cajas de madera, con el objetivo de deshidratar y provocar el desarrollo del aroma y el color del fruto de la vainilla. En el caso de *V. pompona* el beneficiado tardó alrededor de 16 semanas.

En otras especies como en *V. tahitensis* (Brunschwig *et al.*, 2017), el beneficiado de los frutos lo han realizado en tres etapas. Primero dejaron madurar las vainas hasta que tuvieran un color marrón (80% de humedad), y no realizaron tratamiento térmico con agua caliente. En la segunda etapa secaron al sol y realizaron sudados, en la parte final de esta etapa, para obtener frutos flexibles y brillantes, realizaron un masaje en todo el fruto para que las semillas se extendieran. La tercera etapa fue de secado al aire, dejando a los frutos con una humedad final de 50-55%. En *V. pompona* es limitada la información documentada sobre el proceso de curado de los frutos. Los pocos trabajos en los que se han mencionado los frutos beneficiados de esta especie, no indican los detalles de la forma de beneficiar los frutos.

La humedad se considera una de las propiedades fisicoquímicas que determinan la calidad de la vainilla (Ramachandra y Ravishankar, 2000). En este estudio los porcentajes de humedad y materia seca de los frutos verdes y beneficiados variaron en relación con la edad de maduración (Cuadro 2.8). En frutos verdes de 36 semanas de la localidad de Cazuelas se obtuvo el porcentaje de humedad más bajo (78.58 %) y un porcentaje alto de materia seca (21.42 %). En frutos verdes de 31 semanas de la localidad de Cazuelas hubo una reducción del contenido de materia seca (16.54 %). En ambas localidades, el porcentaje de humedad más bajo se registró en frutos beneficiados de 29 semanas en un rango de 13.60 a 14.78%, los frutos beneficiados de 31 semanas obtuvieron un porcentaje de humedad en un rango de 20.95 a 24.68 %, el cual se aproximó al contenido de humedad de 25 a 38 % que establece la NOM-182-SCFI-2011 para *Vanilla planifolia*.

Cuadro 2.8 Porcentaje de humedad de frutos verdes y beneficiados de *Vanilla pompona* de diferentes semanas de maduración.

Localidad	Semanas	Fruto verde		Fruto beneficiado	
		Humedad (%)	Materia seca (%)	Humedad (%)	Materia seca (%)
Cazuelas	29	80.52	19.48	13.60	86.40
	31	83.46	16.54	24.68	75.32
	36	78.58	21.42	22.83	77.17
Morelos	29	79.38	20.62	14.78	85.22
	31	78.99	21.01	20.95	79.05

En especies de *Vanilla* no comerciales, como *V. pompona* y *V. tahitensis*, se sabe poco de los efectos del proceso de beneficiado sobre la acumulación de fitoquímicos en frutos curados, a diferencia de *V. planifolia* donde está bien documentada la influencia del tipo de beneficiado sobre los compuestos del aroma (Luna-Guevara *et al.*, 2016; Xochipa-Morante *et al.*, 2016). Recientemente en *V. tahitensis*, Brunschwig *et al.* (2017) evaluaron por HPLC algunos de los componentes del aroma de los frutos en diferentes etapas de beneficiado, y observaron una

disminución de 30 % de los compuestos del aroma, cuando la humedad de los frutos paso de 80 % (inicio del beneficiado) a 50-55 % (final del beneficio), debido a la evaporación por el secado al sol y a la sudoración. En particular los compuestos que disminuyeron fueron el anisil alcohol y la vainillina, en tanto que el ácido vanílico y el anisaldehído se mantuvieron estables. Mientras que en el análisis de compuestos volátiles del aroma por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-MS) de *V. tahitensis* en las diferentes etapas de beneficiado, encontraron que al llegar al 40 % de humedad no fue adecuado, debido a que disminuyeron los ácidos grasos. En general los compuestos de anisil se mantuvieron estables, aumentaron aldehídos saturados (notas florales) y compuestos fenólicos, también hubo un incremento de aldehídos monoinsaturados y diinsaturados, lo cual no es adecuado para mantener el equilibrio del aroma de esta especie. Estos resultados sugieren que en *V. pompona*, pudo ocurrir algo similar durante el proceso de beneficiado, debido a que se observó una disminución significativa en el contenido de compuestos fenólicos totales, triterpenos y saponinas en los frutos beneficiados, respecto a la concentración que presentaron estos compuestos en los frutos verdes, especialmente los triterpenos totales.

En las dos localidades analizadas se obtuvo una concentración alta de triterpenos totales en fruto verde de 29, 31 y 36 semanas de maduración en un rango de 10.223 a 34.213 g·100g⁻¹MS (Cuadro 2.7). Al respecto algunos estudios han reportado que dentro de los compuestos volátiles que se han encontrado en *V. pompona* y en *V. planifolia* en frutos beneficiados son terpenos, principalmente limonene que pertenece al grupo de los limonoides (tetranortriterpenos) y monoterpenos (α -Terpineno, *p*-Cimeno), estos compuestos son utilizados en la industria como saborizantes y como aromatizantes (Galeas *et al.*, 2016; Sabik *et al.*, 2016). Lo que sugiere, que se deben realizar más

estudios para identificar los tipos de terpenos que hay en *V. pompona* de las localidades evaluadas (Cazuelas y Morelos).

Distribución de la variación de fitoquímicos

Para identificar la variación de fitoquímicos en los tejidos de *V. pompona* se realizó un análisis de componentes principales. En donde, los tres primeros componentes principales, explicaron 97 % de la variación acumulada para las cuatro variables evaluadas (Cuadro 2.9).

Cuadro 2.9 Valores propios y proporción acumulada de la variación explicada para cada variable en las tres primeras dimensiones de la caracterización de fitoquímicos de *Vanilla pompona* Schiede de Veracruz y Oaxaca.

	Componente principal (CP)		
	CP 1	CP 2	CP3
Compuestos fenólicos totales (g·100 g ⁻¹ MS)	0.618	0.277	-0.271
Flavonoides Totales (g·100 g ⁻¹ MS)	0.328	0.730	0.425
Triterpenos Totales (g·100 g ⁻¹ MS)	0.580	-0.322	-0.472
Saponinas Totales (g·100 g ⁻¹ MS)	0.417	-0.535	0.723
Autovalor	2.13	1.23	0.52
Proporción	0.53	0.31	0.13
Acumulada	0.53	0.84	0.97

Los valores en negritas indican las variables que más influencia tienen en cada componente principal.

El primer componente principal (CP1) explico 53 % de la variación total, y estuvo explicado por las variables; compuestos fenólicos totales (CFT) y triterpenos totales (TRIT). El segundo componente principal (CP2), expreso 31% de la variación total y estuvo integrado por la variable de flavonoides totales (FLAVT). Mientras que el tercer componente principal (CP3) definió 13% de la variación total y estuvo explicado por saponinas totales (SAPT) (Cuadro 2.7).

Conforme a los tres primeros componentes principales, la distribución espacial de los tejidos vegetales mostro la conformación de cinco grupos, donde el grupo I estuvo conformado por los frutos verdes de 29 y 31 semanas de maduración de la localidad de Morelos (MFv29 y MFv31). Mientras, que el grupo II estuvo conformado por los tejidos de hoja y flor de la localidad de Morelos (MH y MF) y de la localidad de Cazuelas (CH y CF). El grupo III estuvo conformado por fruto beneficiado de 29 y 31 semanas de maduración de la localidad de Morelos (MFb29 y MFb31), fruto beneficiado de 29, 31 y 36 semanas de la localidad de Cazuelas (CFb29, CFb31 y CFb36), tallos de la localidad de Cazuelas (CT) y de la localidad de Morelos (MT). El grupo IV estuvo conformado por frutos verdes de 29 semanas de la localidad de cazuelas (CFv29) y el grupo V incluyó los frutos verdes de 31 y 36 semanas de la localidad de cazuelas (CFv31 y CFv36) (Figura 2.3).

La distribución de los tejidos con base en el CP1 colocó a los de mayor contenido de compuestos fenólicos totales y triterpenos totales en el G I, este grupo estuvo ubicado en el eje positivo. También el grupo V mostró una cantidad intermedia de compuestos fenólicos totales y triterpenos totales, por lo que se encuentra colocado en el eje positivo. Mientras, que el grupo III se situó en el eje negativo por tener las concentraciones más bajas de compuestos fenólicos totales y triterpenos totales, al igual que el grupo II. El CP2, coloco a los grupos I y II en el eje positivo, porque contienen la mayor concentración de flavonoides totales. En el eje negativo del CP2 ubicó a los grupos III, IV y V por contener las concentraciones más bajas de flavonoides totales. Por otra parte, el CP3 ubico en el eje positivo al grupo IV por contener la concentración mayor de saponinas totales. En el eje negativo del CP3 se ubicó al grupo I, III y V por tener bajas concentraciones de saponinas totales (Figura 2.3).

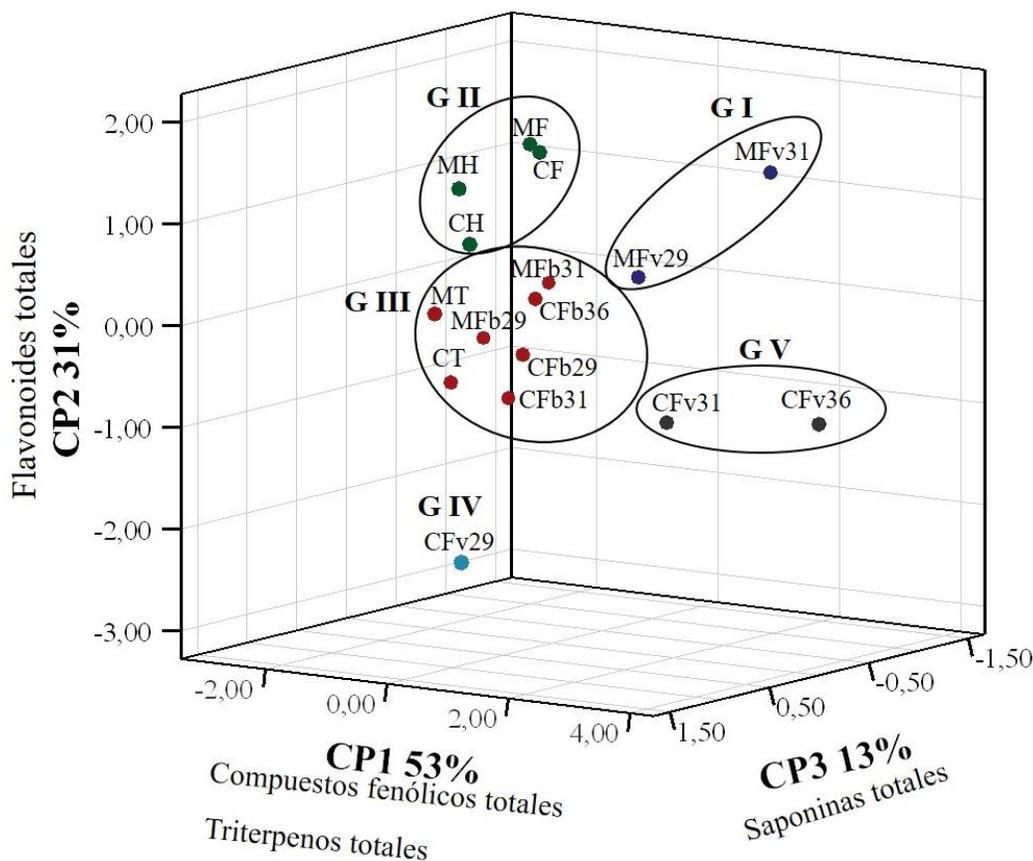


Figura 2.3 Dispersión de tejidos de *Vanilla pompona* Schiede de localidades de Oaxaca y Veracruz, México, con base en los tres primeros componentes principales del análisis de cuatro variables fitoquímicas agrupadas por medias poblacionales.

M= Morelos; C= Cazuelas; H= hoja; T= tallo; F= flor; Fv= fruto verde; Fb= fruto beneficiado; 29 semanas, 31 semanas; 36 semanas. GI= grupo I; GII= grupo II; GIII= grupo III; GIV= grupo IV; GV= grupo V.

Con el análisis de conglomerados a una distancia euclidiana de 0.8, se confirmaron los cinco grupos observados mediante análisis de componentes principales (Figura 2.4).

Grupo I (MFv29 y MFv31). Estuvo conformado por los frutos verdes de 29 y 31 semanas de maduración de Morelos. Se caracterizó por presentar la concentración mayor de compuestos fenólicos totales (CFT) (0.520-0.645 g·100 g⁻¹ MS). También mostró una concentración abundante

de triterpenos totales (TRIT) ($11.560-17.490 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$) en estos tejidos. Al igual que flavonoides totales (FLAVT) ($0.832-0.981 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$).

Grupo II (MH, MF, CH y CF). Constituido por los tejidos de hoja y flor tanto de la localidad de Cazuelas como de Morelos. Este grupo se identificó principalmente por tener una concentración alta de flavonoides totales (FLAVT) (hoja $1.071-1.131 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$ y flor $1.031-1.034 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$). Aunque mostró concentraciones bajas de triterpenos totales (TRIT) (hoja $2.934-5.460 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$ y flor $1.749-3.775 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$).

Grupo III (CT, CFb29, CFb31, CFb36, MT, MFb29, MFb31). Representado por los tallos y frutos beneficiados de las dos localidades, Cazuelas y Morelos. Este grupo expresó concentraciones bajas de compuestos fenólicos totales (CFT) ($0.151-0.302 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$) y de triterpenos totales (TRIT) ($1.927-7.786 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$).

Grupo IV (CFv29). Conformado por el fruto verde de 29 semanas de maduración particularmente de la localidad de Cazuelas, se diferenció de los demás grupos debido a que mostró la concentración mayor de saponinas totales (SAPT) ($8.090 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$).

Grupo V (CFv31, CFv36). Este grupo incluyó al fruto verde de 31 y 36 semanas de maduración de la localidad de cazuelas. Además, este grupo se caracterizó por contener la concentración mayor de triterpenos totales (TRIT) ($22.091-34.213 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$), también concentraciones considerables de CFT ($0.404-0.585 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$).

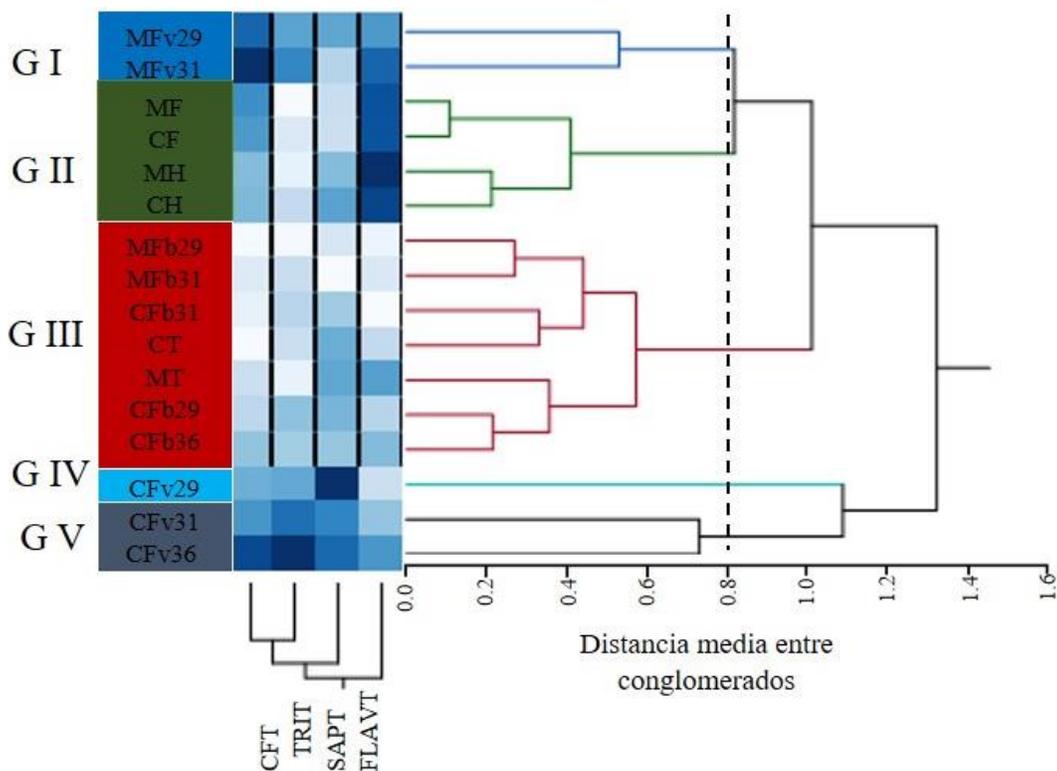


Figura 2.4 Dendrograma de tejidos de *Vanilla pompona* Schiede de Oaxaca y Veracruz, México, con base en el promedio de cuatro variables y agrupamiento por distancia euclidiana.

M= Morelos; C= Cazuelas; H= hoja; T= tallo; F= flor; Fv= fruto verde; Fb= fruto beneficiado; 29 semanas, 31 semanas; 36 semanas. GI= grupo I; GII= grupo II; GIII= grupo III; GIV= grupo IV; GV= grupo V, CFT= Compuestos Fenolicos Totales; FLAVT= Flavonoides Totales; TRIT= Triteterpenos Totales; SAPT= Saponinas Totales.

Se puede observar que las altas concentraciones de TRIT y SAPT en frutos verdes de la localidad de Cazuelas permitió la separación en diferentes grupos. Por otra parte, los tallos fueron los tejidos con menor concentración de la mayoría de grupos de fitoquímicos analizados.

Correlación canónica de las variables del ambiente con la concentración de fitoquímicos de *Vanilla pompona*

En la Figura 2.5 se observa que los dos primeros factores del análisis de correlaciones canónicas explicaron 99.72 % de la varianza total. Se muestra la correlación estructural de las variables

ambientales y los compuestos fitoquímicos, donde se observa que a mayor temperatura y humedad del suelo aumenta el contenido de triterpenos totales y saponinas totales. Se observa que existe alta colinealidad entre los parámetros ambientales de altitud y precipitación (1.0**); y entre humedad y temperatura (0.999**) (Cuadro 2.10).

Cuadro 2.10 Correlaciones de fitoquímicos con variables ambientales de la localidad de Cazuelas Papantla, Veracruz y Morelos Santa Cruz Itundujia, Oaxaca.

Variabes	Temp	Hum	Alt	PP
CFT	-0.077 ^{NS}	-0.077 ^{NS}	0.077 ^{NS}	0.077 ^{NS}
FLAVT	-0.177 ^{NS}	-0.176 ^{NS}	0.176 ^{NS}	0.176 ^{NS}
TRIT	0.310**	0.310**	-0.310**	-0.310**
SAPT	0.397**	0.397**	-0.397**	-0.397**
Temp	1	0.999***	-0.99***	-0.99***
Hum	0.99***	1	-1.00**	-1.00***
Atitud	-0.99***	-1.00***	1	1.000***
PP	-0.99***	-1.00***	1.00***	1

= P<0.01, *= P<0.0001, NS=No hay diferencia significativa, Temp= Temperatura media anual >18 y >22 °C; Hum= Régimen de humedad del suelo, Ústico: 180 a 270 días de humedad, Xérico 90 a 180 días de humedad; PP= Precipitación media anual 800-1200 y 2000-2500 mm; Altitud= 69 y 1277 m; CFT= Compuestos fenólicos totales; SAPT= Saponinas Totales; FLAVT= Flavonoides Totales; TRIT= Triterpenos Totales.

En el caso de altitud y precipitación, se observó una correlación baja con flavonoides totales (FLAVT 0.176^{NS}) y compuestos fenólicos totales (CFT 0.077^{NS}), lo que sugiere que a mayor altitud y precipitación no, es probable que, disminuya el contenido de flavonoides totales y compuestos fenólicos totales en *V. pompona*. Tal y como se observó en la localidad de Morelos que se encuentra a una altitud de 1277 msnm y tiene una precipitación media anual de 2000-2500 mm, donde se obtuvieron valores más altos de CFT y FLAVT en la mayoría de los tejidos analizados que la localidad de Cazuelas. A mayor altitud las plantas reciben mayor radiación UV por lo que se produce la acumulación de flavonoides para su defensa (Akula y Ravishankar, 2011; Mazid *et al.*, 2011).

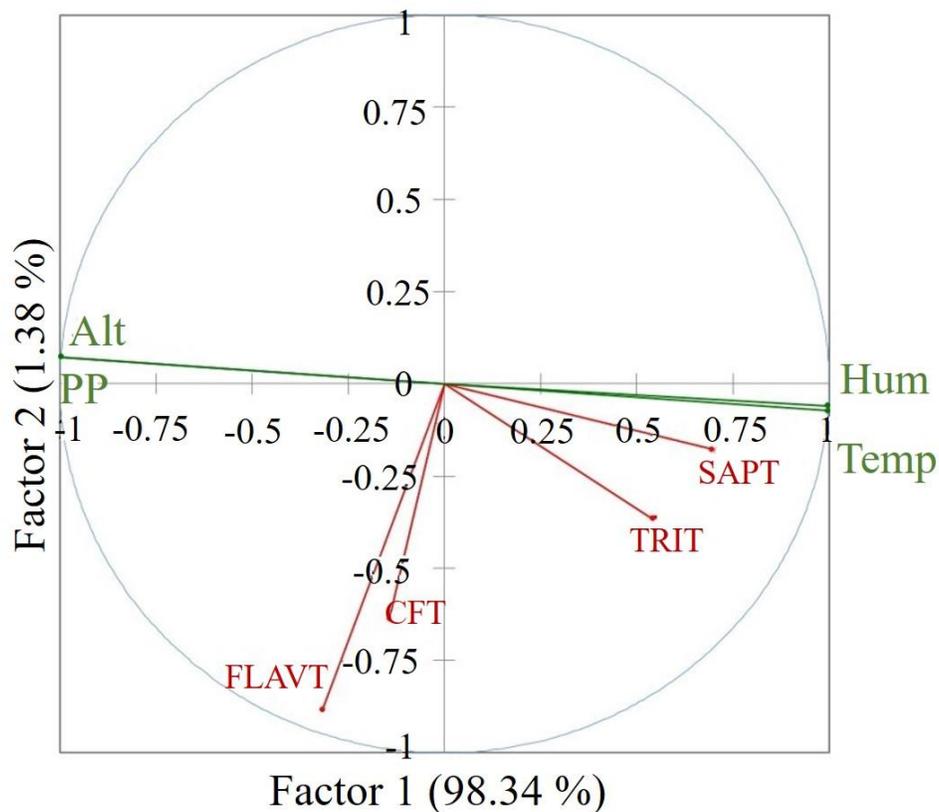


Figura 2.5 Representación gráfica de los coeficientes de correlación estructural de los dos primeros factores en la interacción de variables ambientales (■) y fitoquímicos (■) de los tejidos de *Vanilla pompona*.

Temp= Temperatura media anual >18 y >22 °C; Hum= Régimen de humedad del suelo, Ústico: 180 a 270 días de humedad, Xérico 90 a 180 días de humedad; PP= Precipitación media anual 800-1200 y 2000-2500 mm; Alt= 69 y 1277 m; CFT= Compuestos fenólicos totales; SAPT= Saponinas Totales; FLAVT= Flavonoides Totales; TRIT= Triterpenos Totales.

Por otra parte, los parámetros de humedad del suelo y temperatura media anual, mostraron correlaciones positivas con la concentración de triterpenos totales (TT 0.310**) y saponinas totales (SAPT 0.397**). Por lo que estas condiciones ambientales tienen efecto en la producción de estos fitoquímicos. Así mismo, la humedad del suelo y temperatura media anual son mayores en localidad de Cazuelas, donde se registraron los frutos con mayores valores para la concentración

de triterpenos totales en frutos verdes. Mientras que altitud y precipitación media anual mostraron correlaciones negativas con TRIT (-0.310**) y SAPT (-0.397**).

2.4 CONCLUSIONES

La concentración de compuestos fitoquímicos vario en relación con el tejido y la localidad de recolecta de *Vanilla pompona*. Por tejido, el fruto verde de 36 semanas tuvo la concentración mayor de compuestos fenólicos totales, triterpenos totales y saponinas totales. La flor y hoja tuvieron la concentración más alta de flavonoides. Por localidad, Morelos tuvo la concentración mayor de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales, y la localidad de Cazuelas tuvo un contenido mayor de saponinas totales y triterpenos totales principalmente en frutos verdes. Los frutos beneficiados de las dos localidades tuvieron concentraciones más bajas de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales que los frutos verdes. En Cazuelas, la temperatura media anual y el régimen de humedad del suelo tuvieron efecto directo en la acumulación de triterpenos totales y saponinas totales.

2.5 LITERATURA CITADA

- Ahmed HOA, Wang C. 2015. Determination of tea saponin in Camellia Seed Oil with UV and HPLC analysis. *World Journal of Engineering and Technology*. 3: 30-37.
- Akagi K, Hirose M, Hoshiya T, Mizoguchi Y, Ito N, Shirai T. 1995. Modulating effects of elagic acid, vanillin and quercetin in a rat medium term multi-organ carcinogenesis model. *Cancer letters*. 94: 113-121.
- Akula R, Ravishankar GA. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant signaling and behavior*. 6: 1720-1731.

- Andrade-Andrade G, Delgado Alvarado A, Herrera-Cabrera BE, Arévalo-Galarza L, Caso-Barrera L. 2018. Variación de compuestos fenólicos totales, flavonoides y taninos en *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews de la Huasteca Hidalguense, México. *Agrociencia*. 52: 55-66.
- Badii MH, Castillo J, Cortez K, Wong A, Villalpando P. 2007. Análisis de correlación canónica (ACC) e investigación científica (Canonical correlation analysis and scientific research). *Innovaciones de negocios*. 4: 405-422.
- Berhow, M.A., Kong, S.B., Vermillion, K.E., y Duval, S.M. 2006. Complete quantification of group A and group B soyasaponins in soybeans. *Journal of agricultural and food chemistry*. 54: 2035-2044.
- Brunschwig C, Collard FX, Lepers-Andrzejewski S, Raharivelomanana P. 2017. Tahitian Vanilla (*Vanilla × tahitensis*): A Vanilla Species with Unique Features. In *Active Ingredients from Aromatic and Medicinal Plants*. In Tech 29-47.
- Chandra S, Khan S, Avula B, Lata H, Yang MH, ElSohly MA, Khan IA. 2014. Assessment of total phenolic and flavonoid content, antioxidant properties, and yield of aeroponically and conventionally grown leafy vegetables and fruit crops: A comparative study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2014: 1-9.
- Chang CL, Lin CS. 2012. Phytochemical composition, antioxidant activity, and neuroprotective effect of *Terminalia chebula* Retzius extracts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012: 1-7.
- Cheok CY, Salman HAK, Sulaiman R. 2014. Extraction and quantification of saponins: A review. *Food Research International*. 59: 16-40.
- CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad). 2012. Portal de

Geoinformación. (Consultado: 20 Noviembre 2016) .Disponible en:
<http://www.conabio.gob.mx/informacion/gis/>

Delgado-Alvarado A, Salazar-Rojas VM, Herrera-Cabrera BE. 2014. Polimorfismo químico de componentes del aroma en germoplasma de *Vanilla* spp de la región del Totonacapan, Puebla-Veracruz, México. In: Araya Fernández C., R. Cordero Solórzano R., Paniagua Vásquez A. y J. B. Azofeifa Bolaños (Eds). *I Seminario Internacional de Vainilla. Promoviendo la investigación, extensión y la producción de vainilla en Mesoamérica* (pp. 93-118). Costa Rica. Instituto de Investigación y Servicios Forestales. Universidad Nacional, Heredia. Retrieved from https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/168849/I_Seminario_Internacional_de_Vainilla.pdf.

Dong Z, Gu F, Xu F, Wang Q. 2014. Comparison of four kinds of extraction techniques and kinetics of microwave-assisted extraction of vanillin from *Vanilla planifolia* Andrews. *Food Chemistry*. 149: 54-61.

Drago-Serrano ME, López ML, Espuñes TDRS. 2006. Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 37: 58-68.

Ehlers D, Pfister M. 1997. Compounds of vanillons (*Vanilla pompona* Schiede). *Journal of Essential Oil Research*. 9: 427-431.

Ene-Obong HN, Okudu HO, Asumugha UV. 2016. Nutrient and phytochemical composition of two varieties of Monkey kola (*Cola parchycarpa* and *Cola lepidota*): An underutilized fruit. *Food Chemistry*. 193: 154-159.

- Galeas M, Lin J, Hartman T. 2015. Chemical Characterization of *Vanilla pompona* Schiede, Part I. *Perfumer and Flavorist*. 40: 16-28.
- Galeas M, Lin J, Hartman T. 2016. Chemical Characterization of *Vanilla pompona* Schiede, Part II. *Perfumer and Flavorist*. 41: 26-34.
- Herald JT, Gadgil P, Tilley M. 2012. High-throughput micro plate assays for screening flavonoid content and DPPH-scavenging activity in sorghum bran and flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 92: 2326-2331.
- Herrera HJG, García, A. C. 2010. Bioestadística en Ciencias Veterinarias, Procedimientos de análisis de datos con SAS. Madrid, España, Universidad Complutense, Área, 139-168.
- Herrera-Cabrera BE, Hernández-Ruíz J, Delgado-Alvarado A. 2016. Variación de Aroma en *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews Silvestre y Cultivada. *Agro Productividad*. 9: 10-17.
- Ibarra-Cantún D. 2017. Estudio del contenido de compuestos fitoquímicos en hoja, tallo, flor, fruto verde y beneficiado de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews de la región del Totonacapan, México, Tesis Doctorado, Colegio de Postgraduados Campus Puebla. Programa en Estrategias Para el Desarrollo Agrícola Regional. 146 pp.
- Keshava C, Keshava N, Ong TM, Nath J. 1998. Protective effect of vanillin on radiation-induced micronuclei and chromosomal aberrations in V79 cell. *Mutation Research*. 397: 149-159.
- Kreuger B, Potter DA. 1994. Changes in saponins and tannins in ripening holly fruits and effects of fruit consumption on nonadapted insect herbivores. *American Midland Naturalist*. 132: 183-191.

- Luna-Guevara JJ, Ruiz-Espinosa H, Herrera-Cabrera EB, Navarro-Ocaña A, Delgado-Alvarado A, Luna-Guevara ML. 2016. Variedad de microflora presente en vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) relacionados con procesos de beneficiado. *Agro productividad*. 249: 3-9.
- Liu W, Yin D, Li N, Hou X, Wang D, Li D, Liu J. 2016. Influence of Environmental Factors on the Active Substance Production and Antioxidant Activity in *Potentilla fruticosa* L. and Its Quality Assessment. *Scientific Reports*. 6: 1-17.
- Lirdprapamongkol K, Sakurai H, Kawasaki N, Choo MK, Saitoh Y, Aozuka Y, Singhirunnusorn P, Ruchirawat S, Svasti J, Saiki I. 2005. Vanillin suppresses in vitro invasion and in vivo metastasis of mouse breast cancer cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 25: 57-65.
- Maruenda H, Del Lujan Vico M, Householder JE, Janovec JP, Cañari C, Naka A, González AE. 2013. Exploration of *Vanilla pompona* from the Peruvian Amazon as a potential source of vanilla essence: Quantification of phenolics by HPLC-DAD. *Food Chemistry*. 138: 161-167.
- Mazid M, Khan TA, Mohammad F. 2011. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and Medicine*. 3: 232-249.
- NOM-182-SCFI-2011. 2011. Vainilla de Papantla, extractos y derivados- Especificaciones, información comercial y métodos de ensayo (prueba). 9 p
- Ramachandra RS, Ravishankar GA. 2000. Vanilla flavour: Production by conventional and biotechnological routes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80: 189-304.

- Rodés-Reyes S, Peña-Fuentes D, Hermosilla-Espinosa R. 2015. Tamizaje fitoquímico de extractos y tinturas al 20% de la raíz y corteza de *Dichrostachys cinerea* L.(Marabú). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 20: 156-166.
- Phrompittayarat W, Jetiyanon K, Wittaya-areekul S, Putalun W, Tanaka H, Khan I, Ingkaninan K. 2011. Influence of seasons, different plant parts, and plant growth stages on saponin quantity and distribution in *Bacopa monnieri*. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 33: 193-199.
- Qian ZM, Lu J, Gao QP, Li SP. 2009. Rapid method for simultaneous determination of flavonoid, saponins and polyacetylenes in Folium Ginseng and Radix Ginseng by pressurized liquid extraction and high-performance liquid chromatography coupled with diode array detection and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1216: 3825-3830.
- Sabik H, Pérez-Silva A, Bèlanger D, Vivar-Vera Ma. de los Ángeles, Nicolás-García M, Reyes-López D. 2016. Identification of volatile compounds in cured Mexican vanilla (*Vanilla planifolia* G. Jackson) beans using headspace solid-phase microextraction with gas chromatography-mass spectrometry. *Fruits*. 71: 407-418.
- Salazar-Rojas VM, Herrera-Cabrera BE, Delgado-Alvarado A, Soto-Hernández M, Castillo-González F, Cobos-Peralta M. 2012. Chemotypical variation in *Vanilla planifolia* Jack. (Orchidaceae) from the Puebla-Veracruz Totonacapan region. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 59: 875-887.
- SAS. (2002). SAS/STAT. User guide, version 9.0. SAS Institute Inc, North Carolina.
- Shanmugavalli N, Umashankar V, Raheem. 2009. Antimicrobial Activity of *Vanilla planifolia*. *Indian Journal Science Technology*. 2: 37-40.

- Shyamala BN, Naidu MM, Sulochanamma G, Srinivas P. 2007. Studies on the antioxidant activities of natural vanilla extract and its constituent compounds through in vitro models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 7738-7743.
- Silva-Beltran NP, Ruiz-Cruz S, Cira-Chávez LA, Estrada-Alvarado MI, Ornelas-Paz JDJ, López-Mata MA, Márquez-Ríos E. 2015. Total phenolic, flavonoid, tomatine, and tomatidine contents and antioxidant and antimicrobial activities of extracts of tomato plant. *International Journal of Analytical Chemistry*. 2015: 1-10.
- Siwko ME, Marrink SJ, de Vries AH, Kozubek A, Uiterkamp AJS, Mark AE. 2007. Does isoprene protect plant membranes from thermal shock? A molecular dynamics study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 1768: 198-206.
- Vickers CE, Gershenzon J, Lerdau MT, Loreto F. 2009. A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress. *Nature Chemical Biology*. 5: 283-291.
- Wydra K, Verdier V. 2002. Occurrence of cassava diseases in relation to environmental, agronomic and plant characteristics. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 93:
- Xochipa-Morante RC., Delgado-Alvarado A, Herrera-Cabrera BE., Escobedo-Garrido JS, Arévalo-Galarza L. 2016. Influencia del proceso de beneficiado tradicional Mexicano en los compuestos del aroma de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews. *Agro Productividad*. 9: 55-62.
- Xu, C., Zhang, Y., Zhu, L., Huang, Y., Lu, J. 2011. Influence of growing season on phenolic compounds and antioxidant properties of grape berries from vines grown in subtropical climate. *Journal of agricultural and food chemistry*. 59: 1078-1086.

Zhang C, Li X, Lian L, Chen Q, Abdulmalik O, Vassilev V, Lai CS, Asakura T. 2004. Anti-sickling effect of MX-1520, a prodrug of vanillin: an in vivo study using rodents. *British Journal of Haematology*. 125: 788-795.

CAPÍTULO III.

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN TEJIDOS DE *Vanilla pompona* Schiede EN DIFERENTES AMBIENTES

RESUMEN

La actividad antioxidante es la capacidad de una sustancia para inhibir la degradación oxidativa, debido a su potencial de reacción con radicales libres. Existe un gran número de compuestos fitoquímicos con actividad antioxidante que se encuentran en los tejidos vegetales de especies poco conocidas. En este trabajo se analizó la capacidad antioxidante de hoja, tallo, flor, fruto verde y fruto beneficiado de 29, 31 y 36 semanas de maduración de *Vanilla pompona* una especie poco aprovechada en México, pero de importancia potencial en diferentes industrias. El material vegetal se cosechó en dos localidades (Cazuelas, Papantla, Veracruz y Morelos, Santa Cruz Itundujia, Oaxaca) de México. Para ello se elaboraron extractos de metanol de hoja, tallo, flor, frutos verdes y beneficiados y se determinó la capacidad antioxidante frente al radical DPPH/CI₅₀ y la fracción hidrofílica por el ensayo ORAC, mientras que en los extractos de hexano se analizó la fracción lipofílica. De acuerdo con los resultados la mayor capacidad antioxidante se obtuvo en hoja (CI₅₀=2.98 mg·mL⁻¹ MS) y fruto verde de 29 semanas (CI₅₀=4.93 mg·mL⁻¹ MS), frente al radical DPPH. En el ensayo de ORAC, la fracción hidrofílica también mostró los valores mayores en hoja (123,168 a 123,478 μM TE·g⁻¹ MS) seguido de frutos verdes de 29 y 31 semanas. En ORAC/fracción lipofílica, la capacidad antioxidante mayor se detectó en frutos verdes de 29, 31 y 36 semanas en un intervalo de 5220 a 5721 μM TE·g⁻¹ MS. Por localidad, la actividad antioxidante mayor frente al radical DPPH se observó en la localidad de Morelos (CI₅₀=7.571 mg·mL⁻¹ MS). En el ensayo ORAC/fracción hidrofílica la localidad de Morelos obtuvo la mayor capacidad antioxidante (43584.4 μM TE·g⁻¹ MS). Mientras que la localidad de Cazuelas en el ensayo

ORAC/fracción lipofílica mostró la capacidad antioxidante mayor (2481 $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}\text{MS}$). Existen correlaciones altamente significativas entre la capacidad antioxidante con compuestos fenólicos totales, flavonoides totales y triterpenos totales.

Palabras clave: estructuras vegetales, antioxidantes, frutos verdes, frutos beneficiados, *Vanilla pompona*.

3.1 INTRODUCCIÓN

Los antioxidantes son compuestos que pueden inhibir o retardar la oxidación de lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y de otras moléculas. Detienen los procesos de oxidación por medio de la inactivación de radicales libres al inicio o durante la propagación de las reacciones en cadena. En plantas, la capacidad antioxidante sirve para protegerlas de daños que puedan ser ocasionados por factores ambientales como, precipitación, humedad relativa, clima, temperatura, salinidad y por factores biológicos como plagas (Toor *et al.*, 2009; Chandra y Ramalingam, 2011; Chandra *et al.*, 2014). La ingesta de alimentos ricos en compuestos con capacidad antioxidante como los carotenoides, vitamina C, E, y polifenoles de origen natural, pueden prevenir enfermedades cardiovasculares, y cáncer en humanos (Pietta *et al.*, 1998; Pineda *et al.*, 1999; Bobo-Garcia *et al.*, 2014).

Los antioxidantes se dividen principalmente en dos categorías, endógenos: que son enzimáticos, los cuales son producidos por el propio organismo para prevenir daños por radicales libres (Carocho y Ferreira, 2013), y exógenos los cuales, pueden ser sintéticos o de origen natural (Embucado, 2015). En general, los antioxidantes sintéticos son compuestos de estructuras fenólicas con varios grados de sustitución alquílica, mientras que los antioxidantes naturales pueden ser: compuestos fenólicos (tocoferoles, flavonoides y ácidos fenólicos), compuestos

nitrogenados (alcaloides, derivados de la clorofila, aminoácidos y aminas), terpenos como: carotenoides y algunas vitaminas (ácido ascórbico). Hoy día es importante investigar las características y propiedades fitoquímicas de los recursos fitogenéticos poco conocidos con el objetivo de plantear nuevas alternativas de antioxidantes de origen natural con potencial a ser utilizados para este fin (Matsukawa *et al.*, 1997; Oroian y Escriche, 2015; Pisoschi y Pop, 2015).

Los antioxidantes naturales tienen efectos biológicos, los flavonoides y los compuestos fenólicos, muestran un amplio rango de funciones como: antibacteriales, antivirales, antiinflamatorias, antialérgicas, vasodilatadores, antitumorales, y estrogénicas (González *et al.*, 2007; Chandra *et al.*, 2014). Algunos estudios en tomate (*Lycopersicon esculentum*) reportan que los frutos tienen una actividad antioxidante y están correlacionados con los compuestos fenólicos, los extractos de los frutos tienen propiedades antimicrobianas y anticancerígenas (Silva-Beltrán *et al.*, 2015). Por otra parte, los carotenoides y cumarinas, también tienen actividad antioxidante (Pisoschi y Negulescu, 2011). En el caso de *V. planifolia*, la vainillina es uno de los compuestos que determina su aroma y tiene propiedades antioxidantes (Mourtzinou *et al.*, 2009; Tai *et al.*, 2011, Dong *et al.*, 2014). Al igual que los extractos de frutos beneficiados de *V. planifolia* (Shyamala *et al.*, 2007).

Mientras que *V. pompona* es una especie poco estudiada, pero tiene características importantes que resaltan en esta especie como: resistente a enfermedades como *Fusarium sp.* (Galeas *et al.*, 2015) y tolerancia a cambios del clima, debido a que se distribuye en bosques húmedos subtropicales/tropicales de tierras bajas (caducifolios, subdeciduos, perennifolios, montañas bajas, bosques de galería), bosques cálidos de pino y encino, además esta especie se encuentra en peligro debido a la fragmentación de sus poblaciones (Soto-Arenas, 2009; Herrera- Cabrera *et al.*, 2017). Por lo que, es importante estudiar a las estructuras vegetales y reproductivas de *V. pompona* para conocer

si tienen potencial como antioxidantes y poder darle un uso diferente al de aromatizante y saborizante.

Existen métodos indirectos que miden la habilidad del antioxidante para estabilizar algún radical libre, como radicales libres metaestables, debido a que cada método tiene diferente mecanismo de acción como: el tipo de radical sobre el que actúan y si la determinación de la capacidad antioxidante se da por pérdida de fluorescencia de la fluoresceína o pérdida de color, por lo que se utiliza más de un método para medir la capacidad antioxidante, para tener una información más completa (Pisoschi y Negulescu, 2011).

En este estudio se utilizó el método que se basa en la estabilidad del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), debido a la deslocalización de un electrón desapareado, este radical no dimeriza como la mayoría de los radicales, así mismo, esta deslocalización le otorga una coloración violeta con una fuerte absorción en el espectro visible, utilizada como herramienta para determinar actividad estabilizadora de radicales libres caracterizada por una banda de absorción, en solución de etanol, alrededor de 520 nm (Molyneux, 2004; Kedare y Singh, 2011). Por lo que algunos estudios han utilizado esta metodología para medir la capacidad antioxidante (González *et al.*, 2007; Chandra y Ramalingam, 2011).

Otro método de análisis es la Capacidad de Absorción del Radical Oxígeno (ORAC), que se basa en la inhibición de la oxidación inducida por radicales de peróxido, que se inicia por la descomposición térmica del reactivo 2,2'-azobis-2-metil-propanimidamida, diclorhidrato (AAPH). En este los antioxidantes reaccionan con los radicales peróxido y se retrasa la degradación de la fluoresceína (Teow *et al.*, 2007; Dudonnè *et al.*, 2009; Haytowitz y Bhagwat, 2010). Con este método se puede medir la actividad antioxidante de la fracción hidrofílica, lipofílica, y la actividad

antioxidante total (fracción hidrofílica + fracción lipofílica), lo que es conveniente porque da una información más completa de la actividad antioxidante de un alimento o algún tejido (Pietta *et al.*, 1998; Pineda *et al.*, 1999; Prior *et al.*, 2003).

El presente trabajo tuvo como objetivo cuantificar la capacidad antioxidante de las estructuras vegetales (hoja y tallo) y reproductivas (flor, fruto verde y fruto beneficiado) de *V. pompona* procedentes de la localidad de Cazuelas, Papantla, Veracruz y la localidad de Morelos, Santa Cruz Itundujia, Oaxaca. Además de analizar la correlación que presenta la capacidad antioxidante con los componentes antioxidantes de las estructuras de la planta.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Se recolecto material vegetal de *V. pompona* proveniente de dos sitios: una plantación introducida y establecida en arboles de cedro blanco, en la localidad de Cazuelas, Papantla, Veracruz y una población en condición silvestre en la localidad de Morelos, del municipio de Santa Cruz Itundujia, Oaxaca (Cuadro 3.1).

Cuadro 3.1 Características de los sitios de colecta de *Vanilla pompona* Schiede en el estado de Veracruz y Oaxaca.

Sitio	Estado	Municipio	Localidad	Longitud	Latitud	Altitud (m)
1	Veracruz	Papantla	Cazuelas	-97.27	20.43	69
2	Oaxaca	Santa Cruz Itundujia	Morelos	-97.68	16.78	1277

Material Vegetal

Durante la floración, en el mes de mayo 2016, se realizó la recolecta de hojas, tallos y flores. Además, se marcaron y polinizaron de 20 a 30 flores por sitio (Cuadro 3.2) Por otro lado, aproximadamente de 29 a 36 semanas después se recolectaron los frutos y se sometieron a un

proceso de beneficiado tradicional realizado por el maestro beneficiador Veremundo Rodríguez en el beneficio Primero de Mayo, Papantla, Veracruz.

Cuadro 3.2 Estructuras vegetales y reproductivas colectadas de *Vanilla pompona*.

Sitio	Localidad	Hoja y tallo (esquejes)	Flor	Frutos sin beneficiar	Frutos beneficiados
1	Cazuelas	7	19	26	45
2	Morelos	4	15	21	22

Previo al análisis de la capacidad antioxidante, a todos los tejidos se les determinó el contenido de humedad en termobalanza (Ohaus MB45), para expresar la concentración de los metabolitos secundarios con base en materia seca (MS).

Actividad antioxidante por el método 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)

Elaboración de extractos

De cada tejido (hoja, tallo, flor, fruto verde y fruto beneficiado) se prepararon extractos en metanol (J.T Baker No Cat. 9070-03), a una concentración de 500 mg·mL⁻¹. Las muestras se colocaron en un baño ultrasónico (Ultrasonic Cleaner AS5150B) por un lapso de 30 min. Posteriormente, los extractos se dejaron en maceración por 12 h, se filtraron y almacenaron en viales de vidrio a -20 °C hasta su análisis.

La capacidad antioxidante se analizó con base en el método Brand-Williams *et al.* (1995) con algunas modificaciones para micrométodo. En el ensayo se utilizó 50 µL de cada extracto y se mezcló con 200 µL DPPH 0.1 mM (Sigma-Aldrich No Cat. D9132-1G), después la mezcla se agitó por 10 s a velocidad media. La absorbancia se determinó cada minuto por un periodo de 30 min a 521 nm en el blanco (metanol) (A₀) y en las muestras (A₁), en un espectrofotómetro de microplaca (Thermo Scientific Varioskan Flash).

La actividad antioxidante se expresó como porcentaje de inhibición, lo cual corresponde a la cantidad de radical DPPH neutralizado por el extracto a una determinada concentración, de acuerdo a la siguiente ecuación.

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

A₀ = Absorbancia del blanco

A₁ = Absorbancia de la muestra

Se calculó el CI₅₀, que es la concentración media inhibitoria que causa la reducción del 50 % de color y concentración del DPPH. Para obtener el CI₅₀ se realizaron diluciones del extracto de metanol (500 mg·mL⁻¹), a diferentes concentraciones de los extractos de los tejidos analizados de *V. pompona*. A través de una regresión lineal de la curva de calibración, de cuatro puntos de los resultados del porcentaje de inhibición del extracto. Por lo que, a mayor actividad antioxidante, el valor de CI₅₀ será menor (Kedare y Singh, 2011).

Actividad antioxidante por el método ORAC (Capacidad de Absorción del Radical Oxígeno)

Elaboración de extractos para fracción hidrofílica

De cada tejido (hoja, tallo, flor, fruto verde y fruto beneficiado) se prepararon extractos en metanol (J.T Baker No Cat. 9070-03) a una concentración de 500 mg·mL⁻¹. Las muestras se colocaron en un baño ultrasónico (Ultrasonic Cleaner AS5150B) por un lapso de 30 min. Posteriormente, los extractos se dejaron macerando por 12 horas. Después se filtraron y almacenaron en viales de vidrio a -20 °C hasta su análisis.

Elaboración de extractos para fracción lipofílica

De cada tejido (hoja, tallo, flor, fruto verde y fruto beneficiado) se prepararon extractos en hexano a una concentración de $500 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Las muestras se colocaron en un baño ultrasónico (Ultrasonic Cleaner AS5150B) por un lapso de 30 min. Posteriormente, los extractos se dejaron macerando por 12 horas. Después se filtraron y almacenaron en viales de vidrio a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su análisis.

Las determinaciones se realizaron en un medio con luz amarilla, en una microplaca de 96 pozos. Se colocaron $200 \text{ } \mu\text{L}$ de agua destilada en cada uno de los pozos exteriores que rodean la placa, para proporcionar una masa térmica. En cada pozo se agregaron $25 \text{ } \mu\text{L}$ del extracto y se dejó incubar por 10 min a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Enseguida, se agregaron $150 \text{ } \mu\text{L}$ de Fluoresceína (Sigma-Aldrich No Cat. F6377-500G) ($0.1 \text{ } \mu\text{M}$), se dejó en incubación durante 30 min a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, después se agregó a la reacción $25 \text{ } \mu\text{L}$ de la solución AAPH (Sigma-Aldrich No Cat. 440914-100G) 153 mM . Se midió la fluorescencia en un espectrofotómetro de microplaca (Thermo Scientific Varioskan Flash) cada 2 min durante 90 min a una *excitación* 485 nm y *emisión* a 520 nm . Se obtuvo una curva estándar ($y = 0.8041x - 1.4398$; $r^2 = 0.99$) con Trolox (Sigma-Aldrich No Cat. 238813-5G). (Cao *et al.*, 1993).

Los valores de ORAC se calcularon como describen Cao y Prior (1999). El área bajo la curva (AUC) y la AUC_{Neta} de los estándares y de las muestras se determinaron utilizando las ecuaciones 1 y 2 respectivamente. La ecuación 3 se utilizó para calcular el valor ORAC, donde la capacidad antioxidante se expresó en micromoles de Equivalentes Trolox por gramo de materia seca ($\mu\text{M TE} \cdot \text{g}^{-1} \text{MS}$). (Ecuación 1)

$$\text{AUC} = 0.5 + \left(\frac{R2}{R1}\right) + \left(\frac{R3}{R1}\right) + \left(\frac{R4}{R1}\right) + \dots + 0.5\left(\frac{Rn}{R1}\right) \dots \text{Ecuación 1}$$

R1= Lectura de fluorescencia en el inicio de la reacción

Rn= Lectura de fluorescencia en la última medición

La curva estándar se obtuvo mediante el trazado de la AUCNeta de diferentes concentraciones de Trolox contra su concentración.

$$AUCNeta = AUCMuestra - AUCBlanco \dots\dots\dots Ecuación 2$$

El valor ORAC (actividad antioxidante) se calcula mediante el uso de una curva de calibración de Trolox, con una ecuación de regresión lineal entre AUC Neta y la concentración de antioxidantes para todas las muestras.

$$X = \frac{y-b}{m} * \frac{DF}{W} \dots\dots\dots Ecuación 3$$

Donde:

y = AUCNeta de la pérdida de fluorescencia

b = Intercepción

m = Pendiente

DF = Factor de dilución

W = Peso de la muestra en gramos

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

Para realizar las correlaciones de la capacidad antioxidante con los fitoquímicos, se utilizaron los contenidos de compuestos fenólicos totales, flavonoides, triterpenos totales y saponinas totales que se reportaron en el capítulo II.

Análisis estadístico

La actividad antioxidante se evaluó en hoja, tallo, flor, fruto verde y beneficiado provenientes de dos localidades de recolecta, Cazuelas y Morelos. Para hoja y tallo se realizaron cinco repeticiones, para flor, fruto verde y fruto beneficiado se hicieron cuatro repeticiones para cada localidad de

recolecta. Los datos se analizaron bajo un modelo equivalente al diseño completamente al azar. Se realizó un análisis de varianza (ANAVA) y comparación de medias mediante la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para determinar las medias entre y dentro de las variables evaluadas en los tejidos vegetales y procedencia. También, se realizaron correlaciones de Pearson para determinar las relaciones entre los compuestos fitoquímicos (compuestos fenólicos totales, flavonoides totales, triterpenos totales y saponinas totales) y la actividad antioxidante de *V. pompona* mediante el paquete estadístico SAS versión 9.0 (2002).

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capacidad antioxidante en tejidos de V. pompona

El análisis de varianza realizado para las cuatro variables de la capacidad antioxidante indicó que hubo diferencias estadísticas significativas ($P<0.0001$, $P<0.001$, $P<0.05$), entre localidades y por tejido (Cuadro 3.3). Los valores de ORAC en las diferentes fracciones y el total presentaron coeficientes de variación en un intervalo de 7.32 a 10.74 %, y la actividad antioxidante (CI_{50}) frente al radical DPPH mostró un coeficiente de variación un poco mayor (12.84 %).

Cuadro 3.3 Medias, coeficientes de variación y cuadrados medios del análisis de varianza combinado para las variables CI₅₀ frente al radical DPPH, ORAC fracción hidrofílica, ORAC fracción lipofílica y ORAC total de cinco tejidos de la planta de *Vanilla pompona* Schiede en dos localidades de Veracruz y Oaxaca, México.

Variable	Cuadrados medios				
	Media	CV (%)	Localidad	Tejido	Error
DPPH (CI ₅₀) (mg·mL ⁻¹)	7.80	12.84	6.30*	70.11***	1.05
ORAC/fracción hidrofílica (μM TE·g ⁻¹)	39820.10	7.32	529008977***	8698506911***	8485845.0
ORAC/fracción lipofílica (μM TE·g ⁻¹)	2354.94	10.74	986536**	27263160***	63961.9
ORAC/total (μM TE·g ⁻¹)	42175.04	7.33	484305877***	8879838418***	9552587.0

***=P<0.0001, **=P<0.001, *=P<0.05

En la evaluación de la capacidad antioxidante frente al radical DPPH, la actividad antioxidante mayor se observó en hoja (CI₅₀=2.98 mg·mL⁻¹ MS), los demás tejidos tuvieron una actividad antioxidante menor en el siguiente orden Fv29>Fv31=flor>Fv36>Fb31=Fb36>Fb29>tallo (Cuadro 3.4). En *Malva parviflora*, que es una especie de planta herbácea que se utiliza en la medicina tradicional para curar heridas y disminuir inflamación muscular, se ha documentado una actividad antioxidante similar en extractos etanólicos de hoja (CI₅₀=2.52 mg·mL⁻¹ MS) y de tallo (CI₅₀=2.74 mg·mL⁻¹ MS) (Farhan *et al.*, 2012). Mientras que en orégano (*Lippia graveolens* var. *Berlandieri*), que es una especie aromática, el extracto de metanol de tallo (CI₅₀=16.40 mg·mL⁻¹ MS) (González *et al.*, 2007) mostró una actividad antioxidante similar a la de tallo de *Vanilla pompona* (Cuadro 3.4). Fue notable que la actividad antioxidante de los frutos beneficiados de *V. pompona* se redujo significativamente respecto a la actividad en los frutos verdes, particularmente en los frutos de 29 semanas que disminuyeron su actividad casi 2.5 veces. Posiblemente, debido a la baja concentración de compuestos fenólicos (0.189 a 0.304 g·100 g⁻¹ MS) y flavonoides (0.447 a 0.720 g·100 g⁻¹ MS) en los frutos beneficiados en comparación con los frutos verdes. Lo cual es contrastante con la actividad antioxidante (CI₅₀ frente a radical DPPH) que presentaron los frutos

beneficiados de *Vanilla planifolia*, donde la actividad antioxidante llego a ser de 5 a 8 veces mayor respecto a la de los frutos verdes, lo que denota de que a pesar de ser del mismo género *Vanilla* los compuestos antioxidantes presentes en cada especie son diferentes (Ibarra-Cantún *et al.*, 2017).

Cuadro 3.4 Medias, desviación estándar (DS) y coeficiente de variación (CV) del CI₅₀ (mg·mL⁻¹ MS) de la actividad antioxidante por el método de DPPH de extractos de hoja, tallo, flor, fruto verde y fruto beneficiado de *Vanilla pompona* Schiede de Oaxaca y Veracruz, México.

Tejido	CI ₅₀ frente a radical DPPH		
	Media (mg·mL ⁻¹ MS)	DS (±)	CV (%)
Hoja	2.98 ^a	0.382	12833
Fv29	4.93 ^b	1.031	20.918
Fv31	6.12 ^{bc}	1.839	30.066
Flor	6.44 ^{bc}	1.473	22.876
Fv36	6.56 ^c	0.289	4.407
Fb31	8.53 ^d	0.402	4.712
Fb36	9.25 ^d	0.305	3.301
Fb29	12.24 ^e	1.045	8.539
Tallo	14.00 ^f	1.496	10.689
DMS	2.18		

Letras diferentes dentro de columnas indican diferencia estadística según Tukey (P<0.05), Fv29= fruto verde de 29 semanas, Fv31= fruto verde de 31 semanas, Fv36= fruto verde de 36 semanas, Fb29= fruto beneficiado de 29 semanas, Fb31= fruto beneficiado de 31 semanas, Fb36: fruto beneficiado de 36 semanas, n=5 (hoja y tallo) y n=4 (flor, fruto verde y fruto beneficiado).

En el ensayo de ORAC, la capacidad antioxidante más alta se detectó en la fracción hidrofílica en hoja (123168 μM TE·g⁻¹ MS), seguido de fruto verde de 29 y 31 semanas (58006-58207 μM TE·g⁻¹ MS) (Cuadro 3.5).

Cuadro 3.5 Medias, desviación estándar (DS) y coeficiente de variación (CV) de la actividad antioxidante por el método de ORAC de extractos de hoja, tallo, flor, fruto verde y fruto beneficiado de *Vanilla pompona* Schiede de Oaxaca y Veracruz, México.

Tejido	ORAC/fracción hidrofílica			ORAC/total		
	Media	DS (\pm)	CV (%)	Media	DS (\pm)	CV (%)
	$\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}\text{MS}$			$\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}\text{MS}$		
Hoja	123168 ^a	3196.29	2.60	123478 ^a	3077.29	2.49
Fv29	58006 ^b	6646.06	11.46	63290 ^b	6723.86	10.62
Fv31	58270 ^b	6430.34	11.04	63991 ^b	6923.06	10.82
Fv36	50816 ^c	242.35	0.48	56037 ^c	238.76	0.43
Tallo	28654 ^d	1002.58	3.50	28811 ^d	1051.55	3.65
Flor	16500 ^e	155.57	0.94	17871 ^e	521.07	2.92
Fb36	3639 ^f	79.08	2.17	5078 ^f	108.71	2.14
Fb31	3368 ^f	232.18	6.89	4742 ^f	306.61	6.47
Fb29	3367 ^f	309.14	9.18	4660 ^f	416.49	8.94
DMS	6110.80			6483.60		
	ORAC/fracción lipofílica					
	Media	DS (\pm)	CV (%)			
Fv31	5721.60 ^a	509.86	8.91			
Fv29	5284.10 ^a	172.58	3.27			
Fv36	5220.00 ^a	68.99	1.32			
Fb36	1438.60 ^b	39.57	2.75			
Fb31	1374.30 ^b	91.04	6.62			
Flor	1371.30 ^b	372.89	27.19			
Fb29	1292.40 ^b	132.15	10.23			
Hoja	309.23 ^c	150.82	48.77			
Tallo	156.70 ^c	124.16	79.26			
DMS	530.53					

Letras diferentes dentro de columnas indican diferencia estadística según Tukey ($P < 0.05$), Fv29= fruto verde de 29 semanas, Fv31= fruto verde de 31 semanas, Fv36= fruto verde de 36 semanas, Fb29= fruto beneficiado de 29 semanas, Fb31= fruto beneficiado de 31 semanas, Fb36: fruto beneficiado de 36 semanas.

La actividad antioxidante más baja se observó en los frutos beneficiados de 29 a 36 semanas.

Mientras que en la fracción lipofílica los valores más altos se obtuvieron en los frutos verdes de 29, 31 y 36 semanas en un rango de 5220.00 a 5721.60 $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}\text{MS}$. Y a diferencia de la fracción

hidrofílica, los frutos beneficiados mostraron valores intermedios (1292.40-1438.60 $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}$ MS) en la fracción lipofílica.

Efecto de la localidad en la capacidad antioxidante de V. pompona

Por localidad, Morelos mostro mayor capacidad antioxidante frente al radical DPPH ($\text{CI}_{50}=7.571$ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ MS), por el ensayo ORAC/fracción hidrofílica (43584.4 $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}$ MS) y ORAC/total (lipofílica + hidrofílica) (45776.8 $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}$ MS) (Cuadro 3.6). En *V. planifolia* bajo cultivo en acahual (se utilizan como tutores arboles de la región) mostro valores de ORAC/fracción hidrofílica de hoja, tallo, flor, fruto verde y beneficiado en un rango de 2490.73 a 23748.21 $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}$ MS (Ibarra-Cantún *et al.*, 2017). Sin embargo, la actividad antioxidante de la fracción hidrofílica de extractos acuosos de frutos beneficiados de *V. planifolia* de Madagascar fue aún más baja (1593 $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}$) (Dudonné *et al.*, 2009). Lo que evidencia que en *V. pompona* la actividad antioxidante es notablemente mayor y que en la localidad de Morelos, las condiciones ambientales, como alta temperatura y radiación UV, han favorecido la acumulación de sustancias antioxidantes en la planta de vainilla para protegerse del estrés oxidativo (Chandra, 2011; Silva-Beltrán *et al.*, 2015).

Cuadro 3.6 Comparación de medias de la actividad antioxidante entre localidades de colecta de *Vanilla pompona*.

Localidad	DPPH/ CI_{50}	ORACH	ORACL	ORACT
	$\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ MS	$\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}$ MS		
Cazuelas	8.31 ^b	36892.3 ^b	2481.37 ^a	39373.7 ^b
Morelos	7.57 ^a	43584.4 ^a	2192.38 ^b	45776.8 ^a

ORACH=ORAC/fracción hidrofílica; ORACL=ORAC/fracción lipofílica; ORACT=ORAC/fracción hidrofílica + lipofílica. Letras diferentes dentro de columnas indican diferencia estadística según Tukey ($P<0.05$).

Por su parte las plantas provenientes de la localidad de Cazuelas solo tuvieron mayor capacidad antioxidante en el ensayo ORAC/fracción lipofílica (2481.37 $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}$ MS) (Cuadro 3.6). Lo

que sugiere que posiblemente los triterpenos, podrían ser los compuestos responsables de la capacidad antioxidante de la fracción lipofílica, ya que se ha reportado que los terpenos actúan sobre radicales libres de oxígeno, superóxido y grupos hidroxilo reactivos (Drago-Serrano *et al.*, 2006). Mientras que los carotenoides son muy eficientes para controlar el oxígeno singulete (Thaipong *et al.*, 2006; Becker-Pertuzatti *et al.*, 2014).

En ambas localidades, la actividad antioxidante frente al radical DPPH tuvo valores similares en hoja, en un intervalo de 2.97 a 2.998 mg·mL⁻¹ MS. Pero en la localidad de Morelos, los frutos verdes mostraron mayor actividad antioxidante (4.07-4.44 mg·mL⁻¹ MS), que los frutos de Cazuelas (5.70-7.79 mg·mL⁻¹ MS) (Cuadro 3.7).

En las dos localidades, el tallo tuvo la actividad antioxidante más baja evaluada por el ensayo de DPPH, debido posiblemente a las concentraciones bajas que presentan estos tejidos de compuestos fenólicos totales, flavonoides totales, saponinas totales y triterpenos totales, que son los compuestos responsables de la capacidad antioxidante (Carocho *et al.*, 2013; Oroian *et al.*, 2015; Pisoschi y Pop, 2015).

Cuadro 3.7 Medias, desviación estándar (DS) y coeficiente de variación (CV) del CI_{50} ($mg \cdot mL^{-1} MS$) de la actividad antioxidante por el método de DPPH de extractos de hoja, tallo, flor, fruto verde y fruto beneficiado de *Vanilla pompona* Schiede de la localidad de Cazuelas y Morelos, México.

Tejido	CI_{50} frente a radical DPPH					
	Cazuelas			Morelos		
	Media $mg \cdot mL^{-1} MS$	DS (\pm)	CV (%)	Media $mg \cdot mL^{-1} MS$	DS (\pm)	CV (%)
Hoja	2.97 ^a	0.337	11.345	2.99 ^a	0.597	19.931
Fv29	5.79 ^b	0.667	11.522	4.07 ^{ab}	0.035	0.854
Fv36	6.56 ^{bc}	0.289	4.403			
Fv31	7.79 ^{bcd}	0.084	1.078	4.44 ^{ab}	0.161	3.623
Flor	7.78 ^{bcd}	0.190	2.443	5.10 ^b	0.141	2.765
Fb31	8.69 ^{cd}	0.147	1.689	8.36 ^c	0.548	6.557
Fb36	9.25 ^d	0.306	3.304			
Fb29	11.57 ^e	0.329	2.842	12.90 ^d	1.137	8.809
Tallo	14.20 ^f	2.144	14.889	13.60 ^d	0.715	5.258
DMS	2.24			1.75		

Letras diferentes dentro de columnas indican diferencia estadística según Tukey ($P < 0.05$), Fv29= fruto verde de 29 semanas, Fv31= fruto verde de 31 semanas, Fv36= fruto verde de 36 semanas, Fb29= fruto beneficiado de 29 semanas, Fb31= fruto beneficiado de 31 semanas, Fb36: fruto beneficiado de 36 semanas.

En la localidad de Cazuelas el ensayo ORAC mostró en hoja una actividad antioxidante mayor con la fracción hidrofílica ($120555.10 \mu M TE \cdot g^{-1} MS$). Pero en la fracción lipofílica, esta localidad tuvo valores altos en los frutos verdes de 29, 31 y 36 semanas (5212.75 a $5273.68 \mu M TE \cdot g^{-1} MS$), en comparación con hoja, tallo, flor y frutos beneficiados. En la capacidad antioxidante total (hidrofílica + lipofílica) la hoja ($120974.30 \mu M TE \cdot g^{-1} MS$) tuvo valores altos, seguido de los frutos verdes de 29, 31 y 36 semanas en un rango de 56036.50 a $57674.00 \mu M TE \cdot g^{-1} MS$, mientras que los frutos beneficiados de 29, 31 y 36 semanas tuvieron los valores más bajos (5016.00 a $5078.10 \mu M TE \cdot g^{-1} MS$) (Cuadro 3.8)

Cuadro 3.8 Medias, desviación estándar (DS) y coeficiente de variación (CV) de la actividad antioxidante por el método de ORAC de extractos de hoja, tallo, flor, fruto verde y fruto beneficiado de *Vanilla pompona* Schiede de la localidad de Cazuelas, Veracruz, México.

Tejido	ORAC/fracción hidrofílica			ORAC/total		
	Media	DS (\pm)	CV (%)	Media	DS (\pm)	CV (%)
	$\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}\text{MS}$			$\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}\text{MS}$		
Hoja	120555.10 ^a	701.674	0.582	120974.30 ^a	689.057	0.570
Fv29	51998.30 ^b	1456.564	2.801	57211.00 ^b	1424.364	2.490
Fv31	52400.30 ^b	156.791	0.299	57674.00 ^b	281.910	0.489
Fv36	50816.50 ^b	242.350	0.477	56036.50 ^b	238.756	0.426
Tallo	28767.80 ^c	1572.946	5.468	29034.30 ^c	1616.976	5.569
Flor	16631.10 ^d	42.516	0.256	18321.70 ^d	106.350	0.580
Fb31	3576.10 ^e	7.937	0.222	5017.40 ^e	75.187	1.499
Fb36	3639.50 ^e	79.083	2.173	5078.10 ^e	108.713	2.141
Fb29	3646.20 ^e	59.471	1.631	5016.00 ^e	207.764	4.142
DMS	2171.10			2200.90		
	ORAC/fracción lipofílica					
	Media	DS (\pm)	CV (%)			
Fv29	5212.75 ^a	70.207	1.347			
Fv31	5273.68 ^a	174.518	3.309			
Fv36	5220.05 ^a	68.986	1.322			
Flor	1690.57 ^b	64.880	3.838			
Fb31	1441.28 ^{bc}	81.953	5.686			
Fb36	1438.61 ^{bc}	39.575	2.751			
Fb29	1369.81 ^c	150.810	11.010			
Hoja	419.14 ^d	12.624	3.012			
Tallo	266.49 ^d	47.779	17.929			
DMS	266.03					

Letras diferentes dentro de columnas indican diferencia estadística según Tukey ($P < 0.05$), Fv29= fruto verde de 29 semanas, Fv31= fruto verde de 31 semanas, Fv36= fruto verde de 36 semanas, Fb29= fruto beneficiado de 29 semanas, Fb31= fruto beneficiado de 31 semanas, Fb36: fruto beneficiado de 36 semanas.

En la localidad de Morelos, la capacidad antioxidante evaluada por medio del ensayo ORAC/fracción hidrofílica mostró que también la hoja ($125781.80 \mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}\text{MS}$) tuvo los valores más altos seguido de frutos verdes de 29 y 31 semanas en un rango de 64013.10 a $64139.10 \mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}\text{MS}$. Mientras que en la fracción lipofílica se obtuvo la mayor capacidad antioxidante

en los frutos de 29 y 31 semanas en un rango de 5355.40 a 6169.60 $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}\text{MS}$. En la capacidad antioxidante total (hidrofílica + lipofílica) se obtuvieron valores mayores en hoja (125982.50 $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}\text{MS}$) y en frutos verdes de 29 y 31 semanas (69368.50 a 70308.70 $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}\text{MS}$) (Cuadro 3.9).

Cuadro 3.9 Medias, desviación estándar (DS) y coeficiente de variación (CV) de la actividad antioxidante por el método de ORAC de extractos de hoja, tallo, flor, fruto verde y fruto beneficiado de *Vanilla pompona* Schiede de la localidad de Morelos, Oaxaca, México.

Tejido	ORAC/fracción hidrofílica			ORAC/total		
	Media	DS (\pm)	CV (%)	Media	DS (\pm)	CV (%)
	$\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}\text{MS}$			$\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}\text{MS}$		
Hoja	125781.80 ^a	2135.388	1.698	125982.50 ^a	2094.770	1.663
Fv31	64139.10 ^b	11.429	0.018	70308.70 ^b	128.274	0.182
Fv29	64013.10 ^b	189.186	0.296	69368.50 ^b	379.217	0.547
Tallo	28540.70 ^c	8.246	0.029	28587.50 ^c	6.402	0.022
Flor	16368.70 ^d	84.081	0.514	17420.70 ^d	242.122	1.390
Fb29	3088.10 ^e	42.466	1.375	4303.10 ^e	96.620	2.245
Fb31	3159.20 ^e	65.929	2.087	4466.50 ^e	42.485	0.951
DMS	2262.30			2264.50		
	ORAC/fracción lipofílica					
	Media	DS (\pm)	CV (%)			
Fv31	6169.60 ^a	132.081	2.141			
Fv29	5355.40 ^b	232.988	4.351			
Fb31	1307.30 ^c	23.500	1.798			
Fb29	1215.00 ^c	54.154	4.457			
Flor	1051.90 ^c	193.726	18.416			
Hoja	144.36 ^d	7.673	5.320			
Tallo	46.80 ^d	7.876	16.823			
DMS	368.59					

Letras diferentes dentro de columnas indican diferencia estadística según Tukey ($P < 0.05$), Fv29= fruto verde de 29 semanas, Fv31= fruto verde de 31 semanas, Fv36= fruto verde de 36 semanas, Fb29= fruto beneficiado de 29 semanas, Fb31= fruto beneficiado de 31 semanas, Fb36: fruto beneficiado de 36 semanas.

Correlaciones de fitoquímicos de estructuras vegetales y reproductivas de V. pompona con su capacidad antioxidante

Se analizó la correlación de todas las muestras de hoja, tallo, flor, fruto verde y beneficiado de 29, 31 y 36 semanas de maduración de *V. pompona* de manera conjunta, entre: 1) se utilizó los promedios de la capacidad antioxidante determinada por el ensayo de DPPH/CI₅₀ y los promedios de los compuestos fenólicos totales (CFT), flavonoides totales (FLAVT), triterpenos totales (TRIT) y saponinas totales (SAPT); 2) capacidad antioxidante valorada por la técnica ORAC y CFT, FLAT, TRIT y SAPT; 3) capacidad antioxidante valorada por DPPH/CI₅₀ con capacidad antioxidante valorada por ORAC.

Las correlaciones del ensayo DPPH/CI₅₀ con el contenido de fitoquímicos mostraron correlaciones negativas con la concentración de CFT (-0.657***) y con FLAVT (-0.571***), es decir que a una concentración mayor de CFT y FLAVT en los tejidos hubo una capacidad antioxidante más alta (Cuadro 3.10), lo que sugiere que bajo este ensayo estos compuestos son responsables de la actividad antioxidante de los tejidos analizados de *V. pompona*, como se ha mostrado también en *Vanilla planifolia* (Ibarra-Cantún *et al.*, 2017). Mientras que por el ensayo de ORAC/fracción hidrofílica se detectó una correlación altamente significativa con FLAVT (0.679***), una correlación significativa con CFT (0.389*) y con saponinas totales (0.391*). Estos hallazgos coinciden con los documentados para frutos beneficiados de *V. planifolia*, sobre la correlación que muestran los CFT y la actividad antioxidante determinada por los ensayos de ORAC y DPPH (Dudonné *et al.*, 2009, Ibarra-Cantún *et al.*, 2017), debido a que los fenoles tienen uno o más anillos aromáticos que llevan uno o más grupos OH, que les permiten atrapar radicales libres formando radicales fenoxilo estabilizados (Thaipong *et al.*, 2006; Becker-Pertuzatti *et al.*, 2014).

Cuadro 3.10 Análisis de correlación (R) entre la actividad antioxidante y fitoquímicos en hoja, tallo, flor, fruto verde y beneficiado de 29, 31 y 36 semanas.

	Compuestos fenólicos totales	Flavonoides totales	Triterpenos totales	Saponinas totales	DPPH (IC₅₀)	ORAC Fracción hidrofílica	ORAC Fracción lipofílica	ORAC Total (hidrofílica + lipofílica)
Compuestos fenólicos totales	1	0.518***	0.674***	0.321**	-0.657***	0.389*	0.783***	0.429**
Flavonoides totales		1	-0.069 ^{NS}	-0.012 ^{NS}	-0.571***	0.679***	-0.088 ^{NS}	0.667***
Triterpenos totales			1	0.516***	-0.269 ^{NS}	0.187 ^{NS}	0.776***	0.229 ^{NS}
Saponinas totales				1	-0.210 ^{NS}	0.391*	0.495**	0.415**
DPPH (IC ₅₀)					1	-0.668***	-0.439**	0.684***
ORAC/fracción hidrofílica						1	0.155	0.999***
ORAC/fracción lipofílica							1	0.209
ORAC/total (hidrofílica+ lipofílica)								1

***=P<0.0001, **=P<0.005, *=<0,05, NS=estadísticamente no significativo.

En tanto que la capacidad antioxidante ORAC/fracción lipofílica (ORACL) presento una alta correlación con CFT (0.783***), con SAPT (0.495**) y con TRIT (0.776***), debido a que los terpenos tienen potencial como antioxidantes (Drago-Serrano *et al.*, 2006; Teow *et al.*, 2007), al igual que los CFT (Barrón-Yáñez *et al.*, 2011) y SAPT (Cheok *et al.*, 2014).

En el método ORACT (hidrofílica + lipofílica), se obtuvieron correlaciones positivas con compuestos fenólicos totales (0.429**), flavonoides totales (0.667***) y saponinas totales (0.415**).

Las correlaciones entre los métodos de evaluación de la capacidad antioxidante mostraron correlaciones negativas del ensayo DPPH/IC₅₀ con ORACH (-0.668***), ORACL (-0.439**), y correlación positiva de la capacidad antioxidante total (ORACT) con DPPH/IC₅₀ (0.684***). La capacidad antioxidante de ORACH tuvo una correlación altamente significativa con la capacidad antioxidante total (ORACT) (0.999***). En otros estudios también se han encontrado correlaciones entre el ensayo ORAC y DPPH, debido a que estos ensayos tienen una predicción similar de la actividad antioxidante (Awika *et al.*, 2003; Dudonné *et al.*, 2009; Thaipong *et al.* 2006).

Correlaciones de fitoquímicos de frutos verdes y beneficiados de V. pompona con su capacidad antioxidante

La correlación del ensayo DPPH expresada como concentración inhibidora media (CI₅₀) con la concentración de CFT (-0.779***), FLAVT (-0.593**), TRIT (-0.491*) y saponinas totales (-0.415*) mostraron valores negativos debido a que, a mayor actividad antioxidante, el valor de CI₅₀ es menor (Kedare y Singh, 2011) (Cuadro 3.11). En el ensayo ORACH y ORACL, las correlaciones fueron significativas y positivas con CFT (0.874***, 0.882***), FLAVT (0.601**),

0.600**), TRIT (0.671***, 0.716***) y saponinas totales (0.591**, 0.625**). Con el valor de ORACT, se obtuvieron correlaciones positivas con CFT (0.875***), FLAVT (0.601**), TRIT (0.675***) y SAPT (0.594**) (Cuadro 3.11).

Estos resultados sugieren que CFT y FLAVT son los compuestos responsables de la capacidad antioxidante y sus estructuras tienen la capacidad de actuar frente a especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, por transferencia de electrones y transferencia de un átomo de hidrógeno. Los flavonoides en especial pueden desactivar el oxígeno singlete, tienen propiedades quelantes de hierro y son captadores de radicales superóxido, además los CFT y FLAVT se caracterizan por ser compuestos con polaridad alta a intermedia lo cual se evidenció al tener altas correlaciones con el método ORAC/Fracción hidrofílica y DPPH, ya que en estos ensayos principalmente actúan compuestos con alta polaridad (Carocho y Ferreira, 2013; Garrido *et al.*, 2013; Zapata *et al.*, 2014). Mientras que los terpenos y saponinas pueden tener efecto en especies reactivas, ya que actúan sobre radicales libres de oxígeno, superóxido y grupos hidroxilo reactivos, así mismo, los terpenos se caracterizan por ser compuestos de baja polaridad por lo que se tuvo una alta correlación con ORAC/Fracción lipofílica (Drago-Serrano *et al.*, 2006; Vickers *et al.*, 2009; Chan *et al.*, 2013).

Cuadro 3.11 Análisis de correlación (R) entre la actividad antioxidante y fitoquímicos en fruto verde y beneficiado de 29, 31 y 36 semanas.

	Compuestos fenólicos totales	Flavonoides totales	Triterpenos totales	Saponinas totales	DPPH (CI ₅₀)	ORAC Fracción hidrofílica	ORAC Fracción lipofílica	ORAC Total (hidrofílica + lipofílica)
Compuestos fenólicos totales	1	0.823***	0.768***	0.473**	-0.779***	0.874***	0.882***	0.875***
Flavonoides totales		1	0.491**	0.213 ^{NS}	-0.593**	0.601**	0.600**	0.601**
Triterpenos totales			1	0.576**	-0.491*	0.671***	0.716***	0.675***
Saponinas totales				1	-0.415*	0.591**	0.625**	0.594**
DPPH (CI ₅₀)					1	-0.844***	-0.830***	-0.843***
ORAC/fracción hidrofílica						1	0.992***	0.99996***
ORAC/fracción lipofílica							1	0.993***
ORAC/total (hidrofílica + lipofílica)								1

***=P<0.0001, **=P<0.005, *<0,05, NS=estadísticamente no significativo.

3.4 CONCLUSIONES

En este trabajo se evaluó la capacidad antioxidante de hoja, tallo, flor, fruto verde y fruto beneficiado de 29, 31 y 36 semanas de maduración de *Vanilla pompona* procedentes de dos localidades. Por tejido, la hoja mostró la capacidad antioxidante mayor por los ensayos de DPPH, ORAC/fracción hidrofílica y ORAC/total. Los frutos verdes de 29, 31 y 36 semanas de maduración tuvieron la capacidad antioxidante mayor por el ensayo ORAC/fracción lipofílica. Entre localidades, el material vegetal procedente de Morelos presentó la capacidad antioxidante más alta por el ensayo DPPH/CI₅₀, ORAC/fracción hidrofílica, y ORAC/total. Mientras que los tejidos procedentes de la localidad de Cazuelas mostraron la capacidad antioxidante mayor en el ensayo ORAC/fracción lipofílica. Los frutos beneficiados mostraron una capacidad antioxidante significativamente menor que los frutos verdes en ambas localidades.

La capacidad antioxidante evaluada por DPPH y ORAC/fracción hidrofílica de los tejidos de la planta de *Vanilla pompona* tuvieron una correlación altamente significativa con los compuestos fenólicos totales, los flavonoides y significativa con las saponinas. La capacidad antioxidante determinada en la fracción lipofílica por el ensayo ORAC tuvo una alta correlación con compuestos fenólicos totales, triterpenos totales y saponinas totales.

3.5 LITERATURA CITADA

- Awika JM, Rooney LW, Wu X, Prior RL, Cisneros-Zevallos L. 2003. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 6657-6662.
- Barrón-Yáñez RM, García-Mateos M, Soto-Hernández MR, Colinas-León T, Kite G. 2011. Flavonoides y actividad antioxidante de *Calia secundiflora* (Ort.) Yakovlev. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 34: 151-157.

- Becker-Pertuzatti P, Teixeira-Barcia M, Rodríguez D, Nogueira-da-Cruz PN, Hermosín-Gutiérrez I, Smith R, Teixeira-Godoy HT. 2014. Antioxidant activity of hydrophilic and lipophilic extracts of Brazilian blueberries. *Food Chemistry*. 164: 81-88.
- Cao G, Alessio HM, Cutler RG. 1993. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*. 14: 303-311.
- Cao G, Prior RL. 1999. Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. *Methods in Enzymology*. 299: 50-62.
- Carocho M, Ferreira IC. 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*. 51: 15-25.
- Chan K. W, Khong NM, Iqbal S, Ismail M. 2013. Isolation and antioxidative properties of phenolics-saponins rich fraction from defatted rice bran. *Journal of cereal science*. 57: 480-485.
- Chandra HM, Ramalingam S. 2011. Antioxidant potentials of skin, pulp, and seed fractions of commercially important tomato cultivars. *Food Science and Biotechnology*. 20: 15-21.
- Chandra S, Khan S, Avula B, Lata H, Yang MH, ElSohly MA, Khan IA. 2014. Assessment of total phenolic and flavonoid content, antioxidant properties, and yield of aeroponically and conventionally grown leafy vegetables and fruit crops: A comparative study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2014: 1-9.
- Cheok CY, Salman HAK, Sulaiman R. 2014. Extraction and quantification of saponins: A review. *Food Research International*. 59: 16-40.

- Drago-Serrano M E, López-López M, Sainz-Espuñes TDR. 2006. Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 37: 58-68.
- Dong Z, Gu F, Xu F, Wang Q. 2014. Comparison of four kinds of extraction techniques and kinetics of microwave-assisted extraction of vanillin from *Vanilla planifolia* Andrews. *Food chemistry*. 149: 54-61.
- Dudonné S, Vitrac X, Coutière P, Woillez M, Mérillon JM. 2009. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 1768-1774.
- Embuscado ME. 2015. Spices and herbs: natural sources of antioxidants—a mini review. *Journal of Functional Foods*. 18: 811-819.
- Farhan H, Rammal H, Hijazi A, Badran B. 2012. Preliminary phytochemical screening and extraction of polyphenol from stems and leaves of a Lebanese plant *Malva parviflora* L. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*. 4: 55-59.
- Garrido G, Ortiz M, Pozo P. 2013. Fenoles y flavonoides totales y actividad antioxidante de extractos de hojas de *Lampaya medicinalis* F. Phil. *Journal of Pharmacy and Pharmacognosy Research*. 1: 30-38.
- González GMC, Soto HM, Kite G, Martínez VM. 2007. Actividad antioxidante de flavonoides del tallo de orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK var. *berlandieri* Schauer). *Revista Fitotecnia Mexicana*. 30: 43-49.

- Haytowitz DB, Bhagwat S. 2010. USDA database for the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of selected foods, Release 2. US Department of Agriculture, 10-48.
- Ibarra-Cantún D. 2017. Estudio del contenido de compuestos fitoquímicos en hoja, tallo, flor, fruto verde y beneficiado de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews de la región del Totonacapan, México, Tesis Doctorado, Colegio de Postgraduados Campus Puebla. Programa en Estrategias Para el Desarrollo Agrícola Regional. 146 pp.
- Kedare SB, Singh RP. 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*. 48: 412-422.
- Matsukawa R, Dubinsky Z, Kishimoto E, Masaki K, Masuda Y, Takeuchi T, Karube I. 1997. A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. *Journal of Applied Phycology*. 9: 29-35.
- Molyneux P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal Science Technology*. 26: 2011-2019.
- Mourtzinis I, Konteles S, Kalogeropoulos N, Karathanos VT. 2009. Thermal oxidation of vanillin affects its antioxidant and antimicrobial properties. *Food Chemistry*. 114: 791-797.
- Oroian M, Escriche I. 2015. Antioxidants: characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*. 74: 10-36.
- Pietta P, Simonetti P, Mauri P. 1998. Antioxidant Activity of selected medicinal Plants. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 46: 4487-4490.
- Pisoschi AM, Negulescu GP. 2011. Methods for total antioxidant activity determination: a review. *Biochemistry and Analytical Biochemistry*. 1: 1-10.

- Pisoschi AM, Pop A. 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 97: 55-74.
- Pineda AD, Salucci M, Lázaro R., Maiani G., Ferro-Luzzi A. 1999. Capacidad antioxidante y potencial de sinergismo entre los principales constituyentes antioxidantes de algunos alimentos. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos e Instituto Nacional de Nutrición de Italia. *Rev Cubana Aliment Nutr*. 13: 104-111.
- Prior RL, Hoang HA, Gu L, Wu X, Bacchiocca M, Howard L, Hampsch-Woodill M, Huang D, Ou B, Jacob R. 2003. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 3273-3279.
- SAS. 2002. SAS/STAT. User guide, version 9.0. SAS Institute Inc, North Carolina.
- Silva-Beltrán NP, Ruiz-Cruz S, Cira-Chávez LA, Estrada-Alvarado MI, Ornelas-Paz JDJ, López-Mata MA, Del-Toro-Sánchez CL, Ayala-Zavala JF, Márquez-Ríos E. 2015. Total phenolic, flavonoid, tomatine, and tomatidine contents and antioxidant and antimicrobial activities of extracts of tomato plant. *International Journal of Analytical Chemistry*. 2015: 1-10.
- Shyamala BN, Naidu MM, Sulochanamma G, Srinivas P. 2007. Studies on the antioxidant activities of natural vanilla extract and its constituent compounds through in vitro models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 7738-7743.
- Tai A., Sawano T., Yazama F., Ito H. 2011. Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assays. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 1810: 170-177.

- Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Hakins KB. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of food composition and analysis*. 19: 669-675.
- Teow CC, Truong V, McFeeters RF, Thompson RL, Pecota KV, Yencho GC. 2007. Antioxidant activities, phenolic and *B*-carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colours. *Food Chemistry*. 103: 829-838.
- Toor RK, Savage GP, Lister CE. 2009. Release of antioxidant components from tomatoes determined by an in vitro digestion method. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 60: 119-129.
- Vickers CE, Gershenzon J, Lerdau MT, Loreto F. 2009. A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress. *Nature Chemical Biology*. 5: 283-291.
- Zapata S, Piedrahita AM, Rojano B. 2014. Capacidad atrapadora de radicalales oxígeno (ORAC) y fenoles totales de frutas y hortalizas de Colombia. *Perspectivas en Nutrición Humana*. 16: 25-36.

CONCLUSIONES GENERALES

Los fitoquímicos tienen un papel muy importante en las plantas, debido a sus diversas funciones como protección ante depredadores, bacterias, hongos, atracción de polinizadores, protección ante la radiación UV. Además, de que las condiciones del ambiente donde crecen las plantas pueden tener efecto en la producción de estos compuestos.

De acuerdo a la hipótesis que se planteo acerca de que la presencia y abundancia de fitoquímicos, además de la capacidad antioxidante en hojas, tallos, flores, frutos verdes y frutos beneficiados de *V. pompona* se ve influenciada por la condición ambiental en la que se encuentra. Se establecieron las siguientes conclusiones generales.

La presencia de fitoquímicos en *V. pompona*, basado en las pruebas cualitativas por agentes cromógenos, en orden de importancia mostró presencia de saponinas, flavonoides, terpenos, ácidos fenólicos y alcaloides. Mientras que por la prueba en cromatografía en capa fina se detectó presencia de saponinas, ácidos fenólicos, flavonoides, alcaloides en extractos de metanol, y los terpenos se detectaron con presencia mayor en el extracto de hexano. Las muestras de la localidad de Morelos mostraron mayor número de bandas en la mayoría de los grupos de fitoquímicos. Estos análisis mostraron de manera cualitativa el perfil de fitoquímicos que presentan las estructuras de la planta de *V. pompona*.

El contenido de fitoquímicos vario en relación con el tejido y la localidad de recolecta de *V. pompona*. Por tejido, el fruto verde de 36 semanas tuvo la concentración mayor de compuestos fenólicos totales, triterpenos totales y saponinas totales. La flor y hoja tuvieron la concentración más alta de flavonoides. Por localidad, Morelos tuvo la concentración mayor de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales, y la localidad de Cazuelas tuvo un contenido mayor de

saponinas totales y triterpenos totales principalmente en frutos verdes. Los frutos beneficiados de las dos localidades tuvieron concentraciones más bajas de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales que los frutos verdes. En Cazuelas, la temperatura media anual y el régimen de humedad del suelo tuvieron efecto directo en la acumulación de triterpenos totales y saponinas totales.

La capacidad antioxidante por los ensayos de DPPH/CI₅₀, ORAC/fracción hidrofílica y ORAC/total fue mayor en la hoja seguida de los frutos verdes. La localidad de Morelos obtuvo la mayor capacidad antioxidante en los ensayos de DPPH/CI₅₀, ORAC/fracción hidrofílica, y ORAC/total. La localidad de Cazuelas mostro la mayor capacidad antioxidante en el ensayo ORAC/fracción lipofílica. Los frutos beneficiados tuvieron concentraciones bajas de fitoquímicos y capacidad antioxidante baja en comparación con los frutos verdes. Se obtuvo correlaciones de la capacidad antioxidante con los fitoquímicos. La capacidad antioxidante de los frutos verdes y beneficiados analizada por DPPH/CI₅₀ y ORAC/fracción hidrofílica presentó una correlación alta con el contenido de compuestos fenólicos totales seguido de los flavonoides; y la capacidad antioxidante analizada por ORAC/fracción lipofílica mostró una alta correlación con compuestos fenólicos totales, triterpenos totales, saponinas totales y flavonoides totales.

Los resultados del trabajo sugieren que las estructuras vegetales y reproductivas de *V. pompona* tiene un potencial alto para producir compuestos de interés en la farmacología, aunque aún falta hacer estudios más específicos. Además, los análisis más detallados sobre el aroma de los frutos beneficiados, darán soporte para un uso diferente al de saborizante y aromatizante, lo cual puede generar más interés en productores para cultivarla, darle un manejo y conservar a este recurso fitogenético que actualmente se encuentra en peligro debido a la fragmentación de sus poblaciones.

ANEXOS

Anexo 1A. Identificación de metabolitos secundarios mediante pruebas por agentes cromógenos en hoja, tallo, flor, fruto sin beneficiar y fruto beneficiado de *V. pompona* Schiede.

1.1A. Saponinas

Testigo: Saponina reactivo

1.1.1A. Índice afrosimétrico o Prueba de espuma

Se colocó un gramo de tejido vegetal en un tubo de ensaye y se adicionó 10 ml de agua destilada. Después se agito por 1 minuto. La formación de espuma en la superficie indica la presencia de saponinas.

1.1.2A. Prueba de Rosenthaler

A 100 μL del extracto, se agregó 50 μL de reactivo de Rosenthaler y 50 μL de H_2SO_4 al 100 %. El cambio de color a violeta indica la presencia de saponinas.

1.2A. Alcaloides

Testigo: *Lupinus*

1.2.1A. Dragendorff

Se adicionó a 100 μL del extracto, 200 μL del reactivo Dragendorff. La formación de un precipitado marrón indica la presencia de alcaloides.

1.2.2A. Wagner

A 100 μL del extracto, se agregó 100 μL de HCL 4N. Se centrifugo a 7000 rpm durante 2 minutos y se agregó 150 μL de reactivo Wagner. Un precipitado color café-rojizo indica la presencia de alcaloides.

1.2.3A. Hager

A 100 μL del extracto, se agregó 100 μL de HCL 4N. Se centrifugo a 7000 rpm durante 2 minutos y se agregó 150 μL de Ácido pícrico. La formación de un precipitado amarillo indica la presencia alcaloides.

1.3A. Flavonoides

Testigo: Quercetina 0.5 mg mL⁻¹

1.3.1A. HCl + Mg⁺²

A 100 µL del extracto, se agregó 200 µL HCL concentrado. Enseguida se adicionó un 4 mg de cinta de Magnesio. La formación de espuma rojiza indica la presencia de flavonoides.

1.3.2A. HCl 4N + NaOH 10 %

A 100 µL del extracto, se le agregó 200 µL de NaOH 10 % (la reacción presento un color amarillo intenso). Después se añadió 300 µL de HCl 4N. La formación de una solución incolora indica la presencia de flavonoides.

1.3.3A. NH₄OH/UV

A 100 µL del extracto, se le agregó 100 µL de NH₄OH. Después se observó en una lámpara UV a 365 nm. La prueba positiva presenta fluorescencia.

1.4A. Taninos

Testigo: Acido tánico 0.5 mg mL⁻¹

1.4.1A. FeCl₃ 2 %

A 100 µL del extracto, se le agregó 40 µL de FeCl₃ al 2 %. Una coloración azul obscuro a negro verdoso indica la presencia de taninos.

1.4.2A. Acetato de plomo al 2 %

A 100 µL del extracto, se le agregó 40 µL de acetato de plomo al 2%. Un precipitado blanco indica la presencia de taninos.

1.5A. Ácidos fenólicos

Testigo: Acido gálico 0.5 mg mL⁻¹

1.5.1A. FeCl₃ 10 %

A 100 µL del extracto, se le agregó 200 µL de FeCl₃ al 10 %. La formación de un color negro azulado indica la presencia de ácidos fenólicos.

1.6A Terpenos

Testigo: Clavo

1.6.1A Acetato de cobre 2 %

A 100 μL del extracto, se le agregó 200 μL de acetato de cobre al 2 %. La formación de una coloración verde esmeralda indica la presencia de diterpenos.

1.6.2A Liebermann-Burchard

A 100 μL del extracto, se le agregó 50 μL de cloroformo, 9 μL de anhídrido acético y 9 μL de ácido acético glacial. La mezcla se puso en agua caliente por 2 minutos a 55 $^{\circ}\text{C}$ y se enfrió con agua con hielo por 2 minutos. Posteriormente se agregó 18 μL de H_2SO_4 concentrado. La formación de un color verde azulado indica la presencia de triterpenos.

1.6.3A Prueba de Salkowski

A 100 μL del extracto, se le adicionó 100 μL de cloroformo y 100 μL de H_2SO_4 . La formación de una coloración rojo azulado o cherry indica prueba positiva.

Anexo 1B. Identificación de fitoquímicos en *Vanilla pompona* por agentes cromógenos.

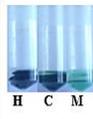
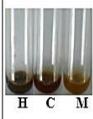
Saponinas						
	Controles (+)	Hoja	Tallo	flor	Fruto sin beneficiar	Fruto beneficiado
Rosenthaler						
Espuma Índice afrosimétrico						

Figura 1.1B Identificación de Saponinas de la localidad de Cazuelas. Hexano= H; Cloroformo= C; Metanol= M.

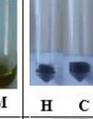
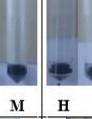
Saponinas			
	Controles (+)	Hoja	Tallo
Rosenthaler			
Espuma			

Figura 1.2B Identificación de Saponinas de la localidad Puntilla Aldama. Hexano= H; Cloroformo= C; Metanol= M.

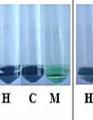
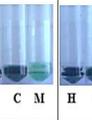
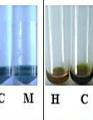
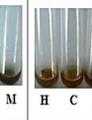
Saponinas						
	Controles (+)	Hoja	Tallo	flor	Fruto sin beneficiar	Fruto beneficiado
Rosenthaler						
Espuma						

Figura 1.3B Identificación de Saponinas de la localidad de Morelos. Hexano= H; Cloroformo= C; Metanol= M.

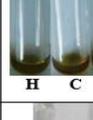
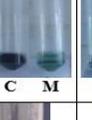
Saponinas			
	Controles (+)	Hoja	Tallo
Rosenthaler			
Espuma			

Figura 1.4B Identificación de Saponinas de la localidad Hidalgo. Hexano= H; Cloroformo= C; Metanol= M.

Saponinas									
	Controles (+)			Hoja			Tallo		
Rosenthaler									
	H	C	M	H	C	M	H	C	M
Espuma									

Figura 1.5B Identificación de Saponinas de la localidad Primavera Morelos. Hexano= H; Cloroformo= C; Metanol= M.

Alcaloides																		
	Controles (+)			Hoja			Tallo			flor			Fruto sin beneficiar			Fruto beneficiado		
Dragendorff																		
	H	C	M	H	C	M	H	C	M	H	C	M	H	C	M	H	C	M
Wagner																		
	H	C	M	H	C	M	H	C	M	H	C	M	H	C	M	H	C	M
Hager																		
	H	C	M	H	C	M	H	C	M	H	C	M	H	C	M	H	C	M

Figura 1.6B Identificación de alcaloides en la localidad de Cazuelas. Hexano= H; Cloroformo= C; Metanol= M.

Alcaloides						
	Controles (+)			Hoja		Tallo
Dragendorff						
	H	C	M	H	C	M
Wagner						
	H	C	M	H	C	M
Hager						
	H	C	M	H	C	M

Figura 1.7B Identificación de alcaloides en la localidad de Puntilla Aldama.

Alcaloides																		
	Controles (+)			Hoja			Tallo			flor			Fruto sin beneficiar			Fruto beneficiado		
Dragendorff																		
	H	C	M	H	C	M	H	C	M	H	C	M	H	C	M	H	C	M
Wagner																		
	H	C	M	H	C	M	H	C	M	H	C	M	H	C	M	H	C	M
Hager																		
	H	C	M	H	C	M	H	C	M	H	C	M	H	C	M	H	C	M

Figura 1.8B Identificación de alcaloides en la localidad de Morelos.

Alcaloides						
	Controles (+)			Hoja		Tallo
Dragendorff						
	H	C	M	H	C	M
Wagner						
	H	C	M	H	C	M
Hager						
	H	C	M	H	C	M

Figura 1.9B Identificación de alcaloides en la localidad de Hidalgo.

Alcaloides						
	Controles (+)		Hoja		Tallo	
Dragendorff						
Wagner						
Hager						

Figura 1.10B Identificación de alcaloides en la localidad de Primavera Morelos.

Flavonoides									
	Controles (+)		Hoja		Tallo		flor	Fruto sin beneficiar	Fruto beneficiado
HCl+Mg ²⁺									
NaOH y HCl									
NH ₄ OH(UV)									

Figura 1.11B Identificación de Flavonoides en la localidad de Cazuelas. Hexano= H; Cloroformo= C; Metanol= M.

Flavonoides						
	Controles (+)		Hoja		Tallo	
HCl+Mg ²⁺						
NaOH y HCl						
NH ₄ OH (UV)						

Figura 1.12B Identificación de Flavonoides en la localidad de Puntilla Aldama.

Flavonoides									
	Controles (+)		Hoja		Tallo		flor	Fruto sin beneficiar	Fruto beneficiado
HCl+Mg ²⁺									
NaOH y HCl									
NH ₄ OH (UV)									

Figura 1.13B Identificación de Flavonoides en la localidad de Morelos.

Flavonoides						
	Controles (+)		Hoja		Tallo	
HCl+Mg ²⁺						
NaOH y HCl						
NH ₄ OH (UV)						

Figura 1.14B Identificación de Flavonoides en la localidad de Hidalgo.

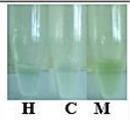
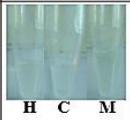
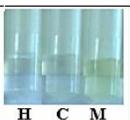
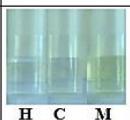
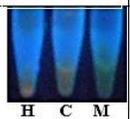
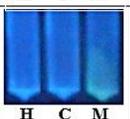
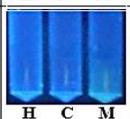
Flavonoides			
	Controles (+)	Hoja	Tallo
HCl+Mg ²⁺			
NaOH y HCl			
NH ₄ OH (UV)			

Figura 1.15B Identificación de Flavonoides en la localidad de Primavera Morelos.

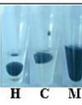
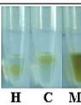
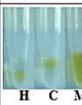
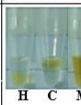
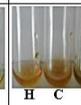
Taninos						
	Controles (+)	Hoja	Tallo	flor	Fruto sin beneficiar	Fruto beneficiado
FeCl ₃						
Acetato de plomo						

Figura 1.16B Identificación de Taninos en la localidad de Cazuelas. Hexano= H; Cloroformo= C; Metanol= M.

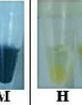
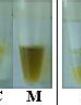
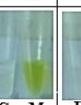
Taninos			
	Controles (+)	Hoja	Tallo
FeCl ₃			
Acetato de plomo			

Figura 1.17B Identificación de Taninos en la localidad de Puntilla Aldama.

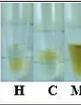
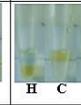
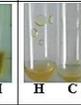
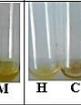
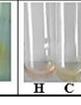
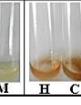
Taninos						
	Controles (+)	Hoja	Tallo	flor	Fruto sin beneficiar	Fruto beneficiado
FeCl ₃						
Acetato de plomo						

Figura 1.18B. Identificación de Taninos en la localidad de Morelos.

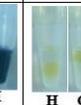
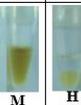
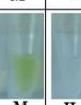
Taninos			
	Controles (+)	Hoja	Tallo
FeCl ₃			
Acetato de plomo			

Figura 1.19B Identificación de Taninos en la localidad de Hidalgo.

Taninos			
	Controles (+)	Hoja	Tallo
FeCl ₃			
Acetato de plomo			

Figura 1.20B. Identificación de Taninos en la localidad de Primavera Morelos.

Acidos fenólicos						
	Controles (+)	Hoja	Tallo	flor	Fruto sin beneficiar	Fruto beneficiado
FeCl ₃ al 10%						

Figura 1.21B Identificación de ácidos fenólicos en la localidad de Cazuelas.

Acidos Fenólicos			
	Controles (+)	Hoja	Tallo
FeCl ₃ al 10%			

Figura 1.22B Identificación de ácidos fenólicos en la localidad de Puntilla Aldama.

Acidos fenólicos						
	Controles (+)	Hoja	Tallo	flor	Fruto sin beneficiar	Fruto beneficiado
FeCl ₃ al 10%						

Figura 1.23B Identificación de ácidos fenólicos en la localidad de Morelos. Hexano= H; Cloroformo= C; Metanol= M.

Acidos Fenólicos			
	Controles (+)	Hoja	Tallo
FeCl ₃ al 10%			

Figura 1.24B Identificación de ácidos fenólicos en la localidad de Hidalgo.

Acidos Fenólicos			
	Controles (+)	Hoja	Tallo
FeCl ₃ al 10%			

Figura 1.25B Identificación de ácidos fenólicos en la localidad de Primavera Morelos.

Terpenos						
	Controles (+)	Hoja	Tallo	flor	Fruto sin beneficiar	Fruto beneficiado
Acetato de cobre						
	H C M	H C M	H C M	H C M	H C M	H C M
Liebermann Burchard						
	H C M	H C M	H C M	H C M	H C M	H C M
Salkowski						
	H C M	H C M	H C M	H C M	H C M	H C M

Figura 1.26B Identificación de terpenos en la localidad de Cazuelas. Hexano= H; Cloroformo= C; Metanol= M.

Terpenos			
	Controles (+)	Hoja	Tallo
Acetato de cobre			
	H C M	H C M	H C M
Liebermann Burchard			
	H C M	H C M	H C M
Salkowski			
	H C M	H C M	H C M

Figura 1.27B Identificación de terpenos en la localidad de Puntilla Aldama.

Terpenos						
	Controles (+)	Hoja	Tallo	flor	Fruto sin beneficiar	Fruto beneficiado
Acetato de cobre						
	H C M	H C M	H C M	H C M	H C M	H C M
Liebermann Burchard						
	H C M	H C M	H C M	H C M	H C M	H C M
Salkowski						
	H C M	H C M	H C M	H C M	H C M	H C M

Figura 1.28B Identificación de terpenos en la localidad de Morelos.

Terpenos			
	Controles (+)	Hoja	Tallo
Acetato de cobre			
	H C M	H C M	H C M
Liebermann Burchard			
	H C M	H C M	H C M
Salkowski			
	H C M	H C M	H C M

Figura 1.29B Identificación de terpenos en la localidad de Hidalgo.

Terpenos			
	Controles (+)	Hoja	Tallo
Acetato de cobre			
	H C M	H C M	H C M
Liebermann Burchard			
	H C M	H C M	H C M
Salkowski			
	H C M	H C M	H C M

Figura 1.30B Identificación de terpenos en la localidad de Primavera Morelos.

Anexo 1.C. Identificación de compuestos fitoquímicos mediante cromatografía en capa fina (CCF) en hoja, tallo, flor, fruto verde y beneficiado de *Vanilla pompona* Schiede.

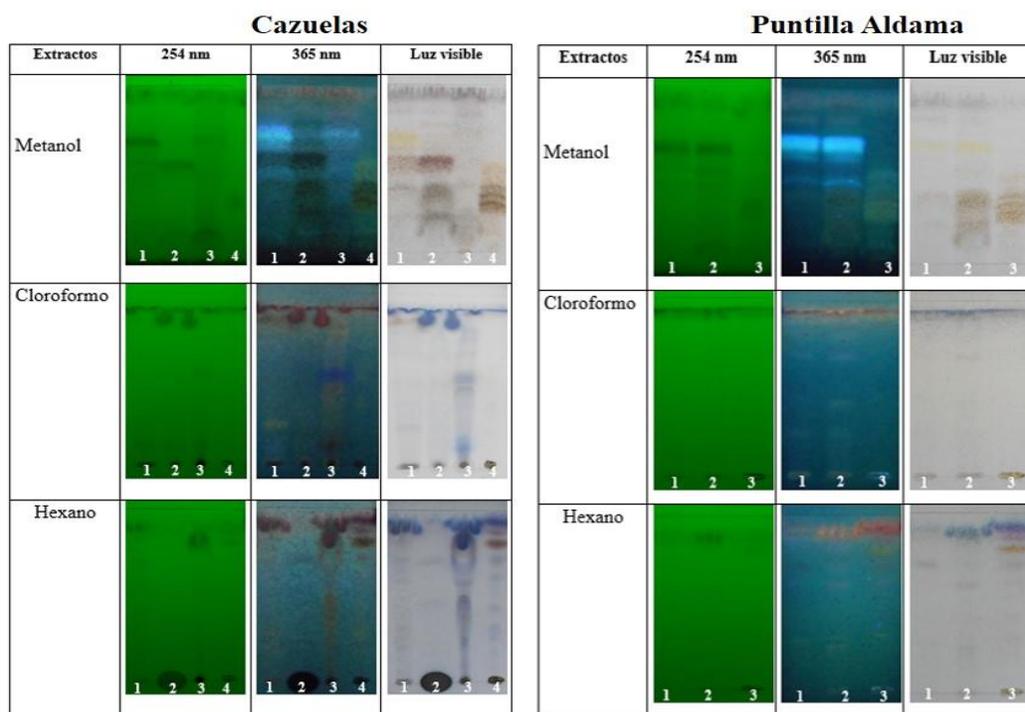


Figura 1.1C Identificación de saponinas en la localidad de Cazuelas y Puntilla Aldama. 1=Hoja; 2=Tallo; 3=Flor; 4=Testigo.

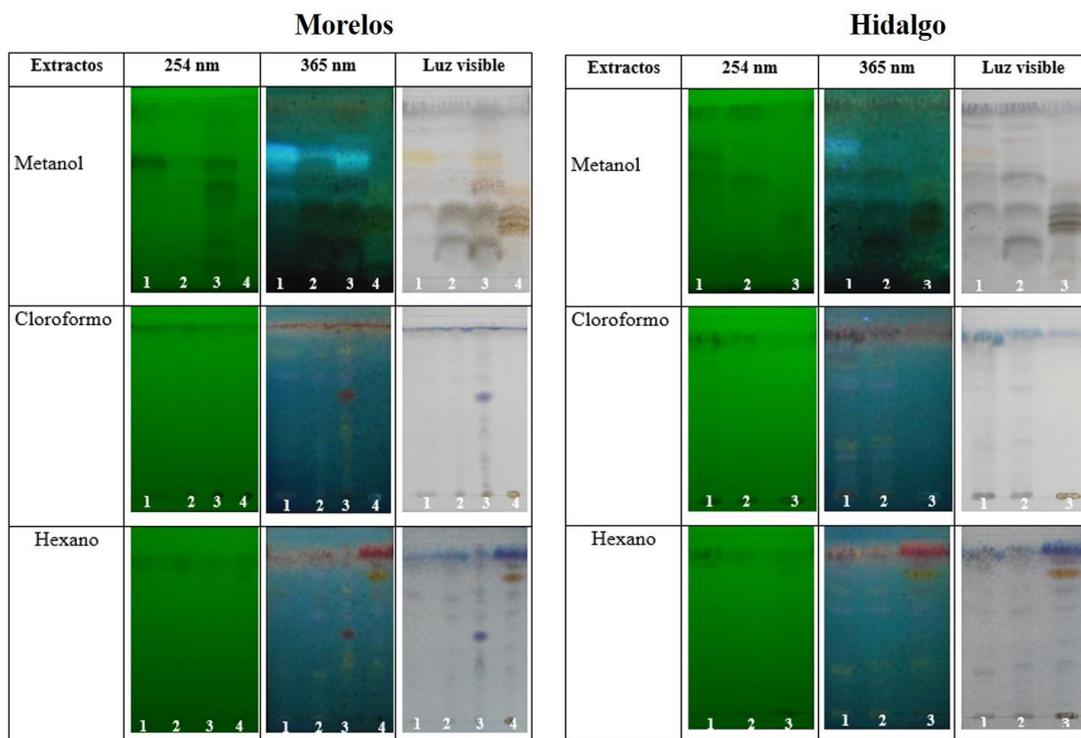


Figura 1.2C Identificación de saponinas en la localidad de Morelos e Hidalgo. 1=Hoja; 2=Tallo; 3=Flor; 4=Testigo.

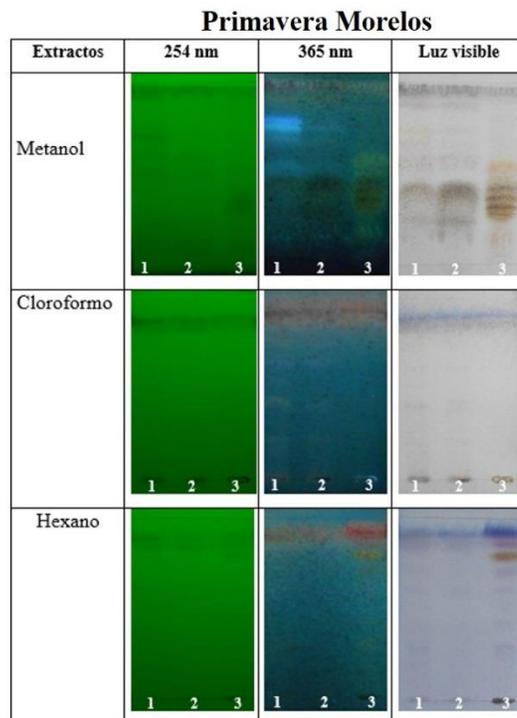


Figura 1.3C Identificación de saponinas en la localidad de Primavera Morelos. 1=Hoja; 2=Tallo; 3=Testigo.

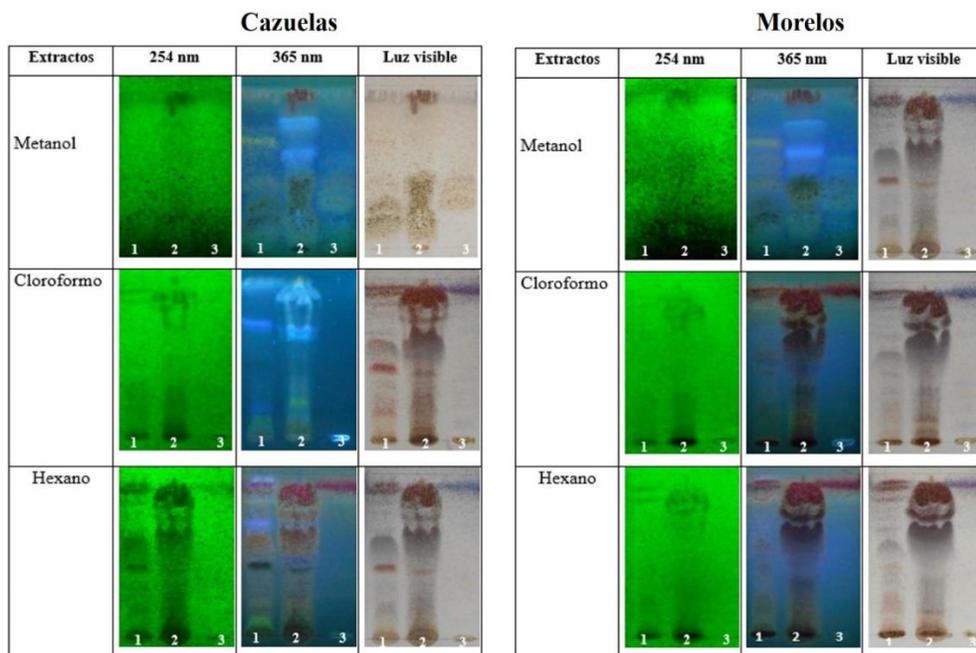


Figura 1.4C Identificación de saponinas de fruto verde y beneficiado en la localidad de Cazuelas y Morelos. 1= fruto verde; 2= fruto beneficiado; 3=Testigo.

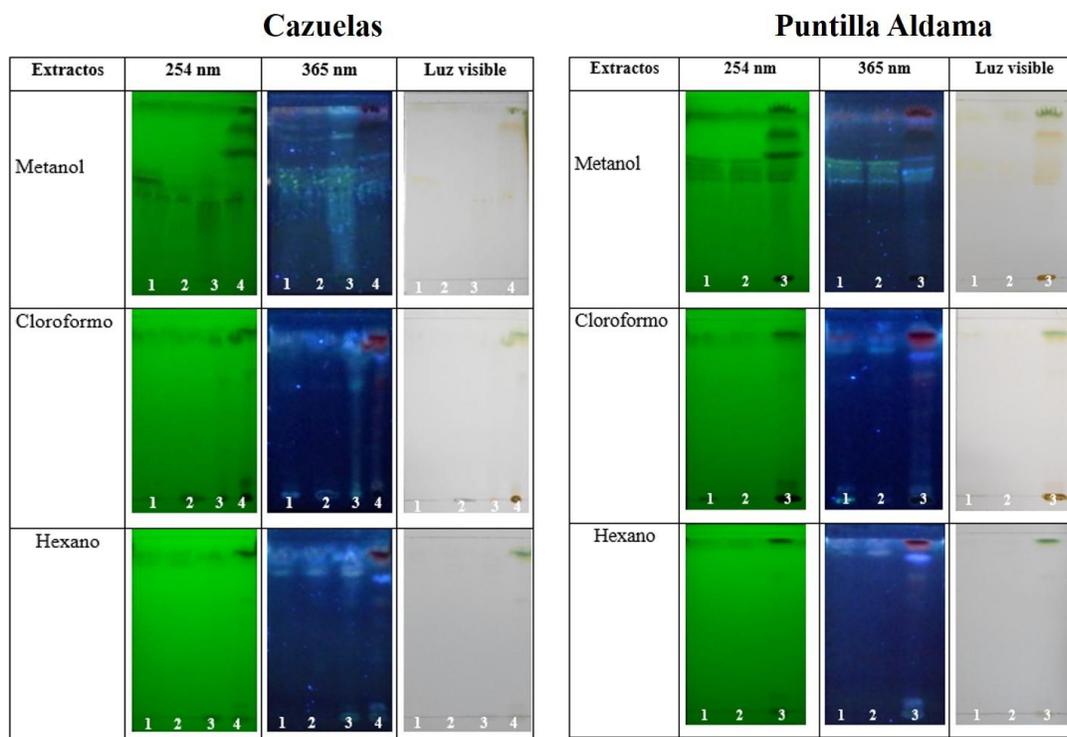


Figura 1.5C Identificación de alcaloides en la localidad de Cazuelas y Puntilla Aldama. 1=Hoja; 2=Tallo; 3=Flor; 4=Testigo.

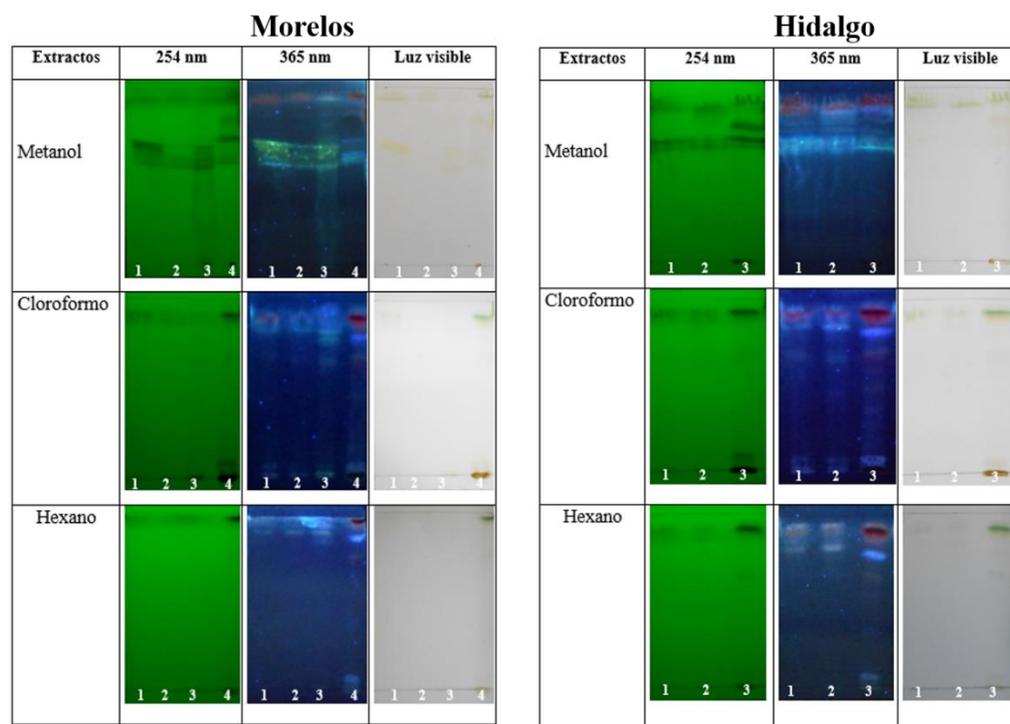


Figura 1.6C Identificación de alcaloides en la localidad de Morelos e Hidalgo. 1=Hoja; 2=Tallo; 3=Flor; 4=Testigo.

Primavera Morelos

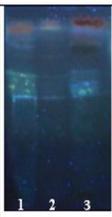
Extractos	254 nm	365 nm	Luz visible
Metanol			
Cloroformo			
Hexano			

Figura 1.7C Identificación de alcaloides en la localidad de Primavera Morelos. 1=Hoja; 2=Tallo; 3=Testigo.

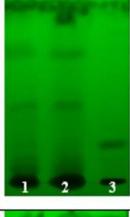
Cazuelas				Morelos			
Extractos	254 nm	365 nm	Luz visible	Extractos	254 nm	365 nm	Luz visible
Metanol				Metanol			
Cloroformo				Cloroformo			
Hexano				Hexano			

Figura 1.8C Identificación de alcaloides de fruto verde y beneficiado en la localidad Cazuelas y Morelos. 1= fruto verde; 2= fruto beneficiado; 3=Testigo.

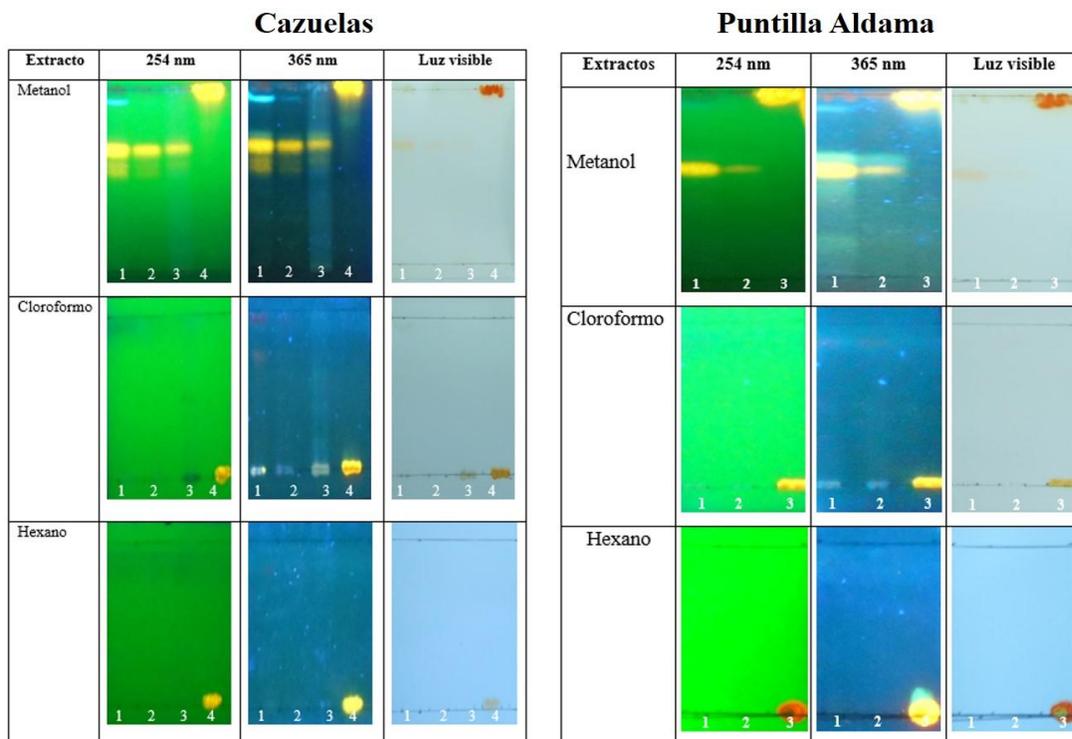


Figura 1.9C Identificación de flavonoides en la localidad de Cazuelas y Puntilla Aldama. 1=Hoja; 2=Tallo; 3=Flor; 4=Testigo.

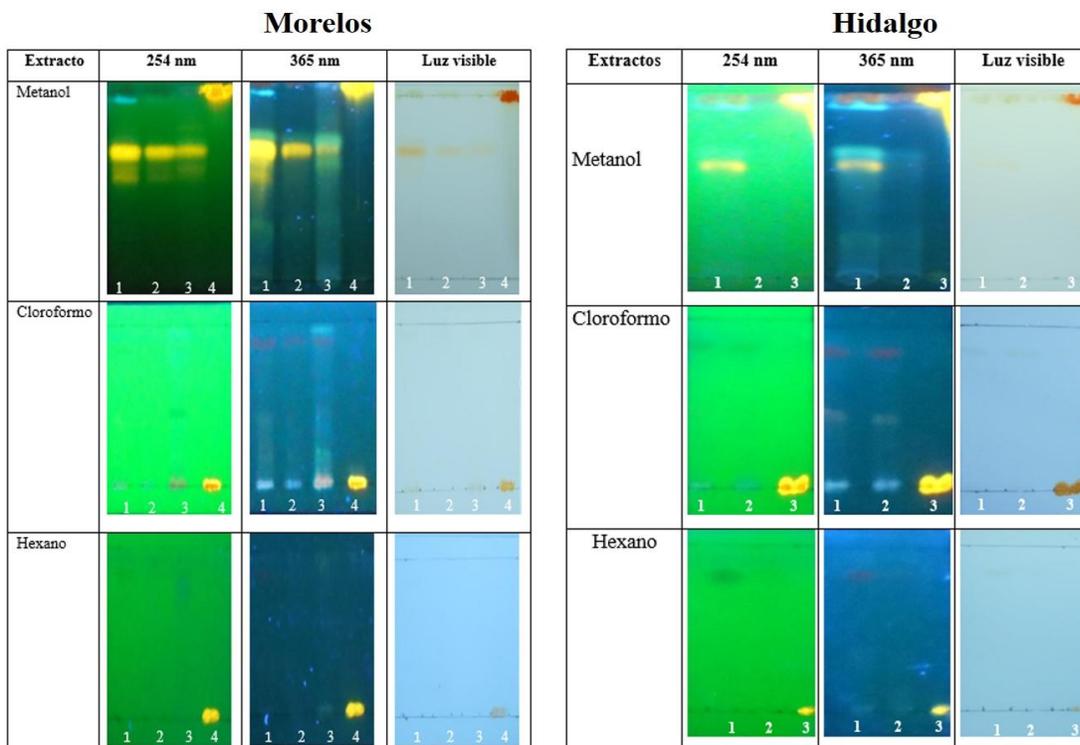


Figura 1.10C Identificación de flavonoides en la localidad de Morelos e Hidalgo. 1=Hoja; 2=Tallo; 3=Flor; 4=Testigo.

Primavera Morelos

Extractos	254 nm	365 nm	Luz visible
Metanol			
Cloroformo			
Hexano			

Figura 1.11C Identificación de flavonoides en la localidad de Primavera Morelos. 1=Hoja; 2=Tallo; 3= Testigo.

Cazuelas

Extractos	254 nm	365 nm	Luz visible
Metanol			
Cloroformo			
Hexano			

Morelos

Extractos	254 nm	365 nm	Luz visible
Metanol			
Cloroformo			
Hexano			

Figura 1.12C Identificación de flavonoides de fruto verde y beneficiado en la localidad Cazuelas y Morelos. 1= fruto verde; 2= fruto beneficiado; 3=Testigo.

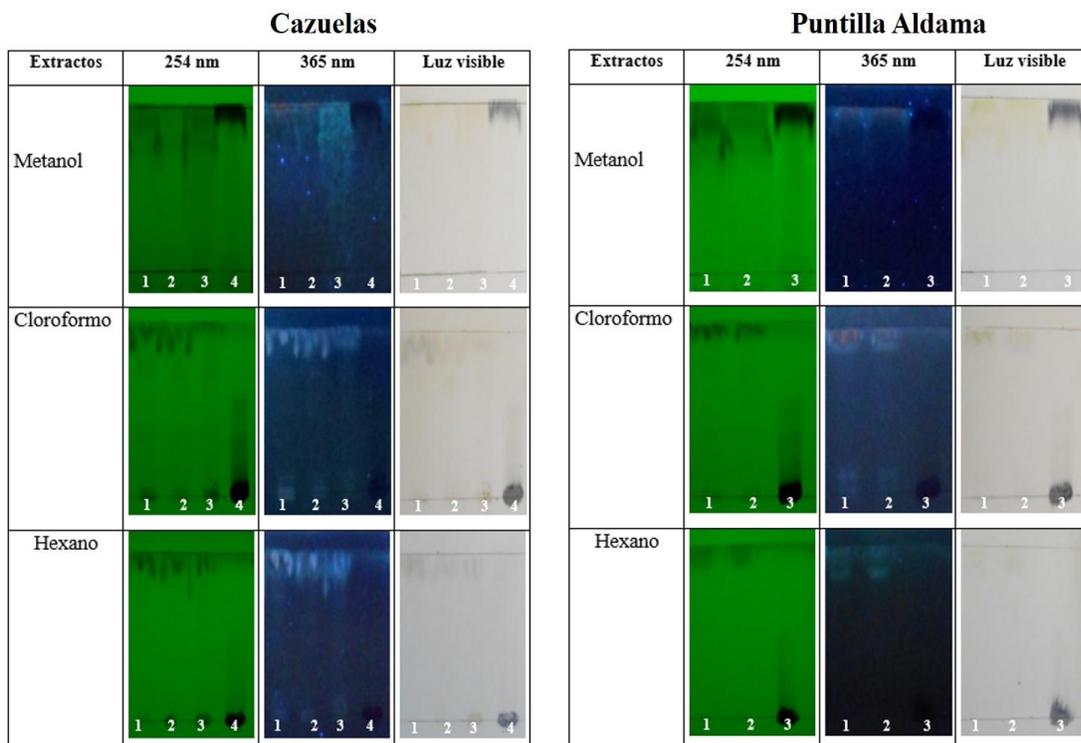


Figura 1.13C Identificación de taninos en la localidad de Cazuelas y Puntilla Aldama. 1=Hoja; 2=Tallo; 3=Flor; 4=Testigo.

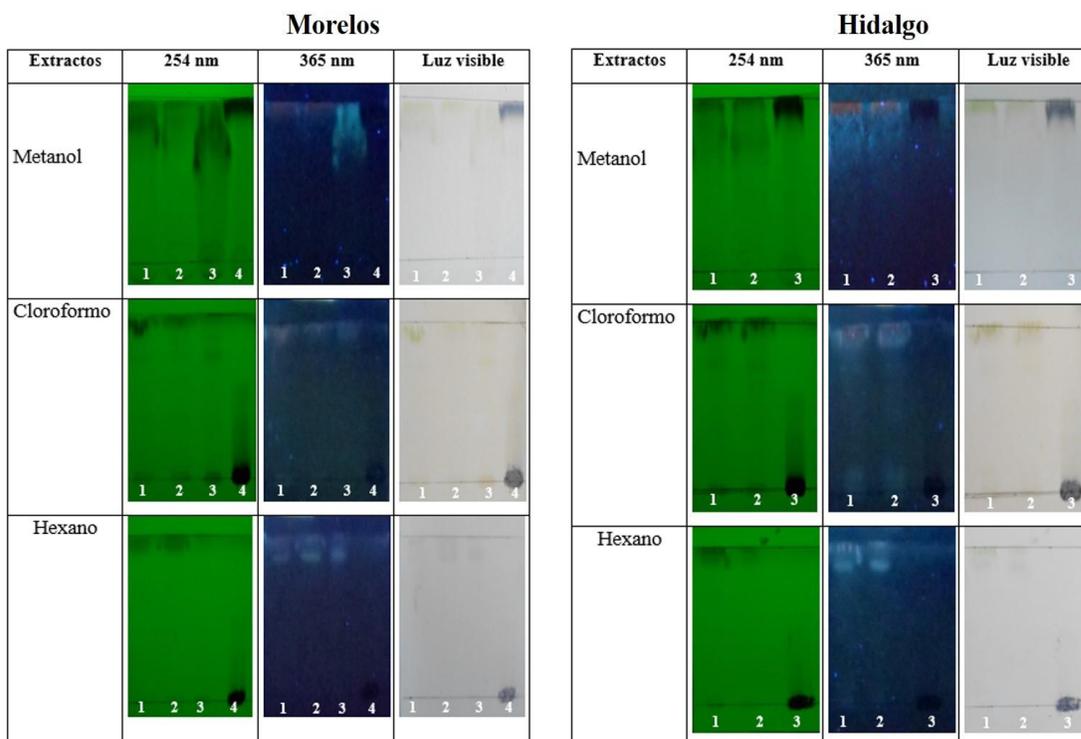


Figura 1.14C Identificación de taninos en la localidad de Morelos e Hidalgo. 1=Hoja; 2=Tallo; 3=Flor; 4=Testigo.

Primavera Morelos

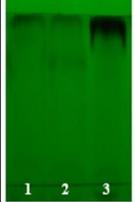
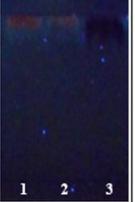
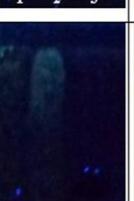
Extractos	254 nm	365 nm	Luz visible
Metanol			
Cloroformo			
Hexano			

Figura 1.15C Identificación de taninos en la localidad de Primavera Morelos. 1=Hoja; 2=Tallo; 3=Testigo.

Cazuelas

Extractos	254 nm	365 nm	Luz visible
Metanol			
Cloroformo			
Hexano			

Morelos

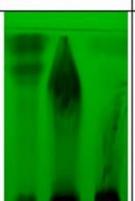
Extractos	254 nm	365 nm	Luz visible
Metanol			
Cloroformo			
Hexano			

Figura 1.16C Identificación de taninos de fruto verde y beneficiado en la localidad Cazuelas y Morelos. 1= fruto verde; 2= fruto beneficiado; 3=Testigo.

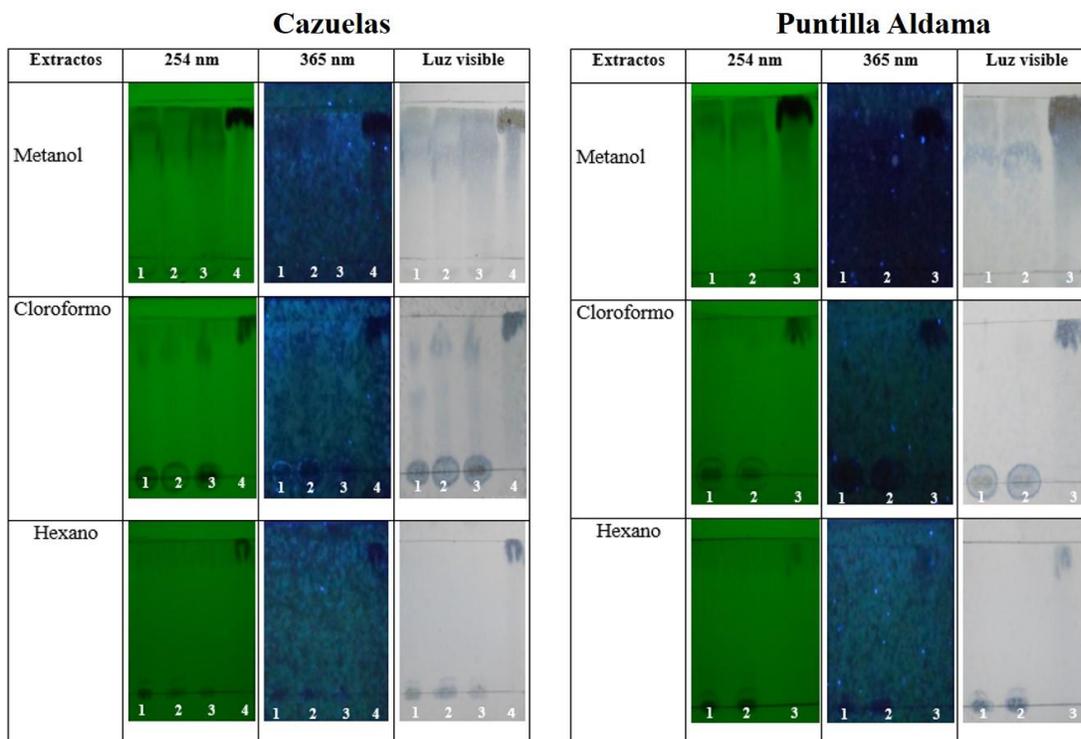


Figura 1.17C Identificación de ácidos fenólicos en la localidad de Cazuelas y Puntilla Aldama. 1=Hoja; 2=Tallo; 3=Flor; 4=Testigo.

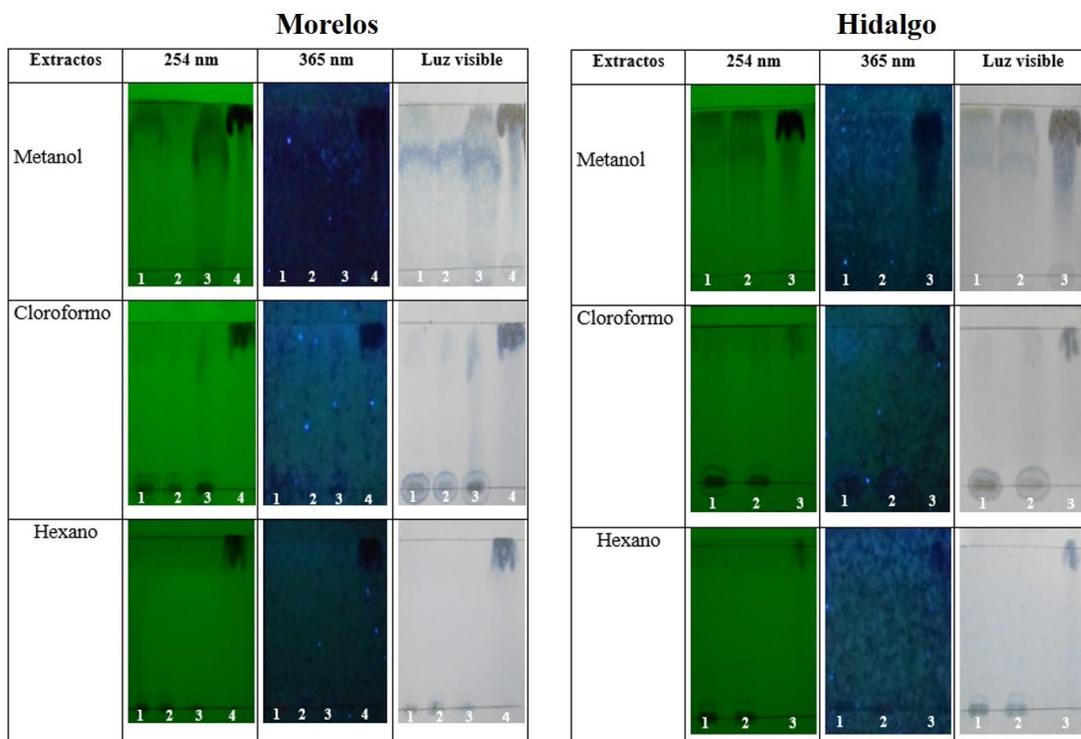


Figura 1.18C Identificación de ácidos fenólicos en la localidad de Morelos e Hidalgo. 1=Hoja; 2=Tallo; 3=Flor; 4=Testigo.

Primavera Morelos

Extractos	254 nm	365 nm	Luz visible
Metanol			
Cloroformo			
Hexano			

Figura 1.19C Identificación de ácidos fenólicos en la localidad de Primavera Morelos. 1=Hoja; 2=Tallo; 3=Testigo.

Cazuelas

Extractos	254 nm	365 nm	Luz visible
Metanol			
Cloroformo			
Hexano			

Morelos

Extractos	254 nm	365 nm	Luz visible
Metanol			
Cloroformo			
Hexano			

Figura 1.20C Identificación de ácidos fenólicos de fruto verde y beneficiado en la localidad Cazuelas y Morelos. 1= fruto verde; 2= fruto beneficiado; 3=Testigo.

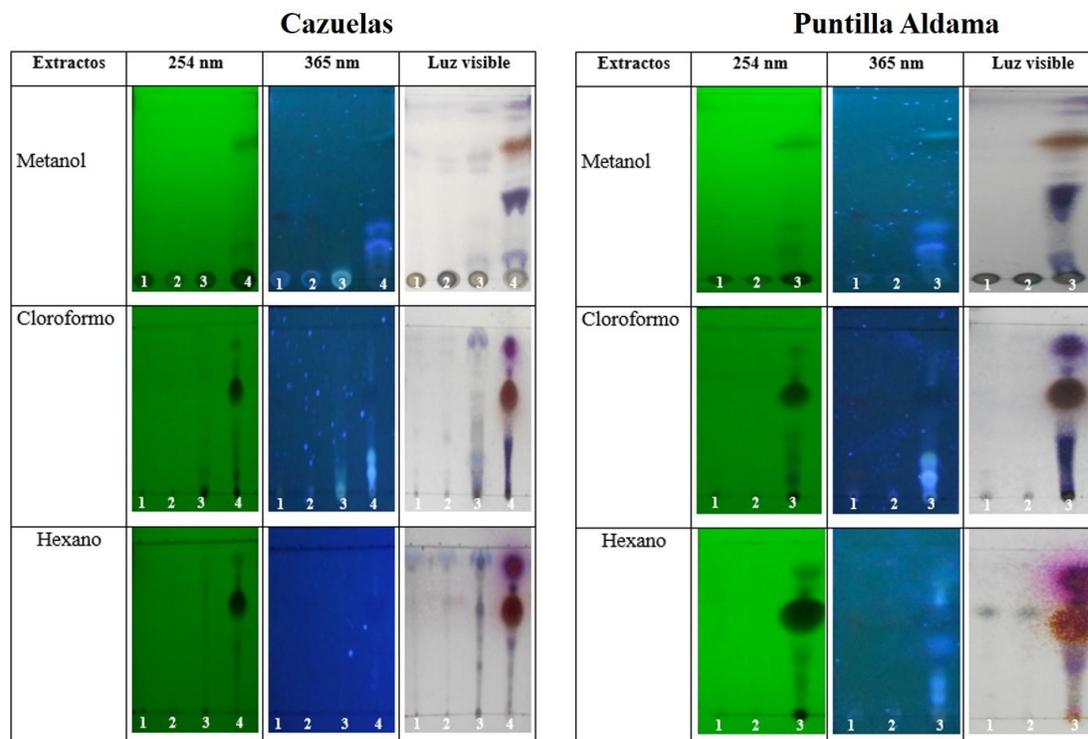


Figura 1.21C Identificación de terpenos en la localidad de Cazuelas y Puntilla Aldama. 1=Hoja; 2=Tallo; 3=Flor; 4=Testigo.

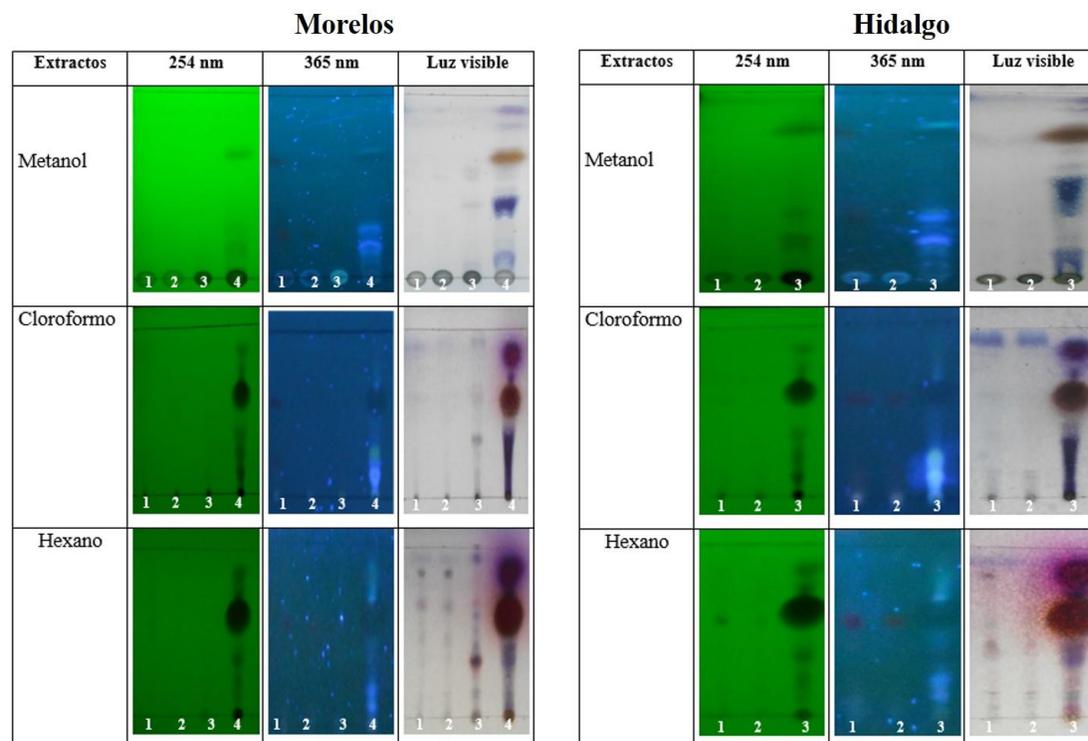


Figura 1.22C Identificación de terpenos en la localidad de Morelos e Hidalgo. 1=Hoja; 2=Tallo; 3=Flor; 4=Testigo.

Primavera Morelos

Extractos	254 nm	365 nm	Luz visible
Metanol			
Cloroformo			
Hexano			

Figura 1.23C Identificación de terpenos en la localidad de Primavera Morelos. 1=Hoja; 2=Tallo; 3=Testigo.

Cazuelas

Extractos	254 nm	365 nm	Luz visible
Metanol			
Cloroformo			
Hexano			

Morelos

Extractos	254 nm	365 nm	Luz visible
Metanol			
Cloroformo			
Hexano			

Figura 1.24C Identificación de terpenos de fruto verde y beneficiado en la localidad Cazuelas y Morelos. 1= fruto verde; 2= fruto beneficiado; 3=Testigo.

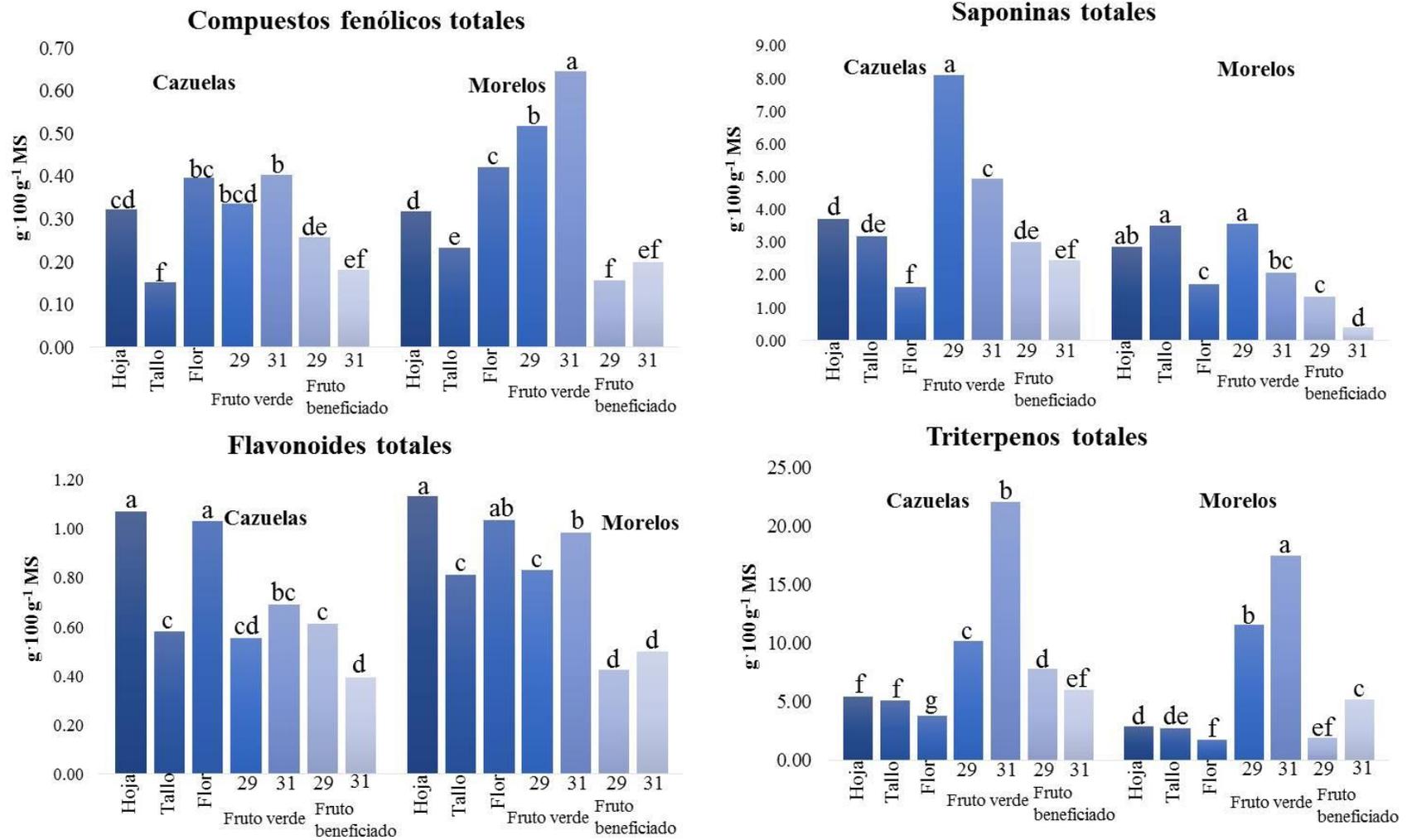


Figura 2.1A Concentración de compuestos fenólicos totales, flavonoides, saponinas totales y triterpenos en diferentes tejidos de *Vanilla pompona* Schiede procedentes de las localidades de Cazuelas, Papantla, Veracruz y Morelos, Santa Cruz Itundujia, Oaxaca.

Cuadro 2.1A Prueba de medias para la interacción de Localidad*Tejido en *Vanilla pompona* Schiede en los sitios de recolecta en Veracruz y Oaxaca, México.

Localidad	Tejido	Compuestos	Flavonoides	Triterpenos	Saponinas
		fenólicos totales	totales	totales	totales
		g·100 g ⁻¹ MS			
Cazuelas	Hoja	0.322 ^a	1.071 ^a	5.461 ^a	3.693 ^a
Morelos	Hoja	0.318 ^a	1.131 ^a	2.934 ^b	2.850 ^b
	DMS	0.039	0.136	0.552	0.541
Cazuelas	Tallo	0.151 ^b	0.582 ^b	5.093 ^a	3.190 ^a
Morelos	Tallo	0.232 ^a	0.811 ^a	2.759 ^b	3.516 ^a
	DMS	0.026	0.076	0.382	0.413
Cazuelas	Flor	0.396 ^a	1.032 ^a	3.775 ^a	1.624 ^a
Morelos	Flor	0.421 ^a	1.035 ^a	1.750 ^b	1.725 ^a
	DMS	0.047	0.102	0.248	0.460
Cazuelas	Fv29	0.337 ^b	0.553 ^b	10.223 ^b	8.088 ^a
Morelos	Fv29	0.519 ^a	0.833 ^a	11.560 ^a	3.553 ^b
	DMS	0.063	0.127	0.726	1.159
Cazuelas	Fv31	0.404 ^b	0.690 ^b	22.093 ^a	4.925 ^a
Morelos	Fv31	0.647 ^a	0.983 ^a	17.490 ^b	2.080 ^b
	DMS	0.063	0.118	2.166	0.854
Cazuelas	Fb29	0.257 ^a	0.612 ^a	7.787 ^a	3.005 ^a
Morelos	Fb29	0.157 ^b	0.427 ^b	1.928 ^b	1.323 ^b
	DMS	0.013	0.040	0.528	0.387
Cazuelas	Fb31	0.180 ^b	0.393 ^b	6.013 ^a	2.438 ^a
Morelos	Fb31	0.199 ^a	0.501 ^a	5.200 ^b	0.394 ^b
	DMS	0.0103	0.027	0.682	0.389

Letras diferentes dentro de columnas indican diferencia estadística según Tukey ($\alpha=0.05$); Fv29= fruto verde de 29 semanas; Fv31= fruto verde de 31 semanas; Fv36= fruto verde de 36 semanas; Fb29= fruto beneficiado de 29 semanas; Fb31= fruto beneficiado de 31 semanas; Fb36= fruto beneficiado de 36 semanas; DMS= diferencia minima significativa.