

VARIACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES, FLAVONOIDES Y TANINOS EN *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews DE LA HUASTECA HIDALGUENSE, MÉXICO

VARIATION OF PHENOLIC COMPOUNDS, FLAVONOIDS AND TANNINS IN *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews IN THE HUASTECA HIDALGUENSE, MEXICO

Guadalupe Andrade-Andrade¹, Adriana Delgado-Alvarado¹, B. Edgar Herrera-Cabrera¹,
Lourdes Arévalo-Galarza², Laura Caso-Barrera¹

¹Estrategias para el Desarrollo Agrícola Regional. Campus Puebla. Colegio de Postgraduados. 72760. Cholula, Puebla. (gdlandrade@hotmail.com, adah@colpos.mx*, behc@colpos.mx, lauracaso2004@yahoo.com). ²Fruticultura. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México. (larevalo@colpos.mx).

RESUMEN

Los fitoquímicos o metabolitos secundarios pueden ser compuestos bioactivos, con peso molecular bajo, que generalmente protegen a la planta contra plagas, bacterias, estrés ambiental, radiación UV u otros factores. En vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) se sintetizan compuestos que muestran inhibición microbiana contra fitopatógenos; pero, el tipo de fitoquímicos en las estructuras vegetales de esta especie es poco conocido. Bajo la hipótesis de que el tipo y concentración de fitoquímicos varía de acuerdo con el tejido vegetal y el sitio de recolecta de la planta, el objetivo del estudio fue detectar el tipo de fitoquímicos y cuantificar la concentración de compuestos fenólicos totales (CFT), taninos totales (TT), taninos condensados (TC) y flavonoides (Flav) en hoja, tallo, flor y fruto (vaina) beneficiado de vainilla, de tres sitios (Huizotlaco, Coacuilco y Contepec) de la Huasteca Hidalguense de México. Los diferentes tipos de metabolitos se identificaron en los extractos de metanol, cloroformo y hexano mediante cromatografía en capa fina (CCF). CFT, TT, TC y Flav se cuantificaron en los extractos metanólicos de las cuatro estructuras vegetales mediante métodos espectrofotométricos. CCF mostró la presencia de Flav, saponinas y terpenoides. La vaina presentó la concentración mayor de CFT (749.608 mg 100 g⁻¹) y TT (102.141 mg 100 g⁻¹) y la hoja tuvo la concentración mayor de Flav (127.023 mg 100 g⁻¹) y taninos condensados (40.992 mg 100 g⁻¹). Entre los sitios de recolecta, Coacuilco destacó la concentración mayor de Flav y TT y Contepec por la concentración mayor de CFT y TC.

ABSTRACT

Phytochemicals or secondary metabolites can be bioactive compounds, with a low molecular weight, which generally protect the plant against pests, bacteria, environmental stress, UV radiation, or other factors. In vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) compounds are synthesized that show microbial inhibition against phytopathogens; however, the type of phytochemicals in the vegetative structures of this species is scarcely known. Under the hypothesis that the type and concentration of phytochemicals varies according to the plant tissue and the site of plant collection, the objective of the study was to detect the type of phytochemicals and to quantify the concentration of total phenolic compounds (TPC), total tannins (TT), condensed tannins (CT) and flavonoids (Flav) in leaf, stem, flower and cured fruit (pod) from vanilla, from three sites (Huizotlaco, Coacuilco and Contepec) of the Huasteca Hidalguense in México. The different types of metabolites were identified in methanol, chloroform and hexane extracts through thin-layer chromatography (TLC). TPC, TT, CT and Flav were quantified in the methanol extracts of the four vegetative structures through spectrophotometric methods. TLC showed the presence of Flav, saponins and terpenoids. The pod presented the highest concentration of TPC (749.608 mg 100 g⁻¹) and TT (102.141 mg 100 g⁻¹), and the leaf had the highest concentration of Flav (127.023 mg 100 g⁻¹) and condensed tannins (40.992 mg 100 g⁻¹). Among the collection sites, Coacuilco stood out for the highest concentration of Flav and TT, and Contepec for the highest concentration of TPC and CT.

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: octubre, 2016. Aprobado: abril, 2017.

Publicado como ARTÍCULO en Agrociencia 52: 55-66. 2018.

Key words: *Vanilla planifolia*, secondary metabolites, plant tissues, phytochemical analysis.

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

INTRODUCCIÓN

La vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) es una orquídea originaria de México y Centroamérica, se distingue por que es la única del género con importancia económica y la segunda especia aromática más costosa en la industria alimenticia, después del azafrán (Anilkumar, 2004). La vainilla se cultiva tradicionalmente en la región del Totonacapan de México, que comprende los estados de Puebla y Veracruz, y en otras regiones con condiciones agroclimáticas apropiadas para su cultivo, en Chiapas, Oaxaca, Tabasco, San Luís Potosí e Hidalgo (Castro-Bobadilla y García-Franco, 2007).

Las estructuras vegetales de las plantas contienen compuestos químicos que pueden desempeñar funciones de protección contra patógenos, radiación UV, plagas y comunicación para atraer polinizadores, u otras (Mazid *et al.*, 2011; Pagare *et al.*, 2015). En algunas orquídeas con uso medicinal se han identificado numerosos metabolitos secundarios que justifican sus propiedades medicinales, como alcaloides, flavonoides, fenantrenos, antocianinas, esteroides y terpenoides, particularmente en los extractos de las flores y las hojas (Pérez, 2010; Hossain, 2011). Los aztecas utilizaban la vainilla en el tratamiento de histeria, fiebre, impotencia y reumatismo (Bruman, 1948).

El fruto maduro de la vainilla se ha estudiado y utilizado como agente antioxidante, antimicrobiano, antiinflamatorio y anticancerígeno (Sinha *et al.*, 2008; Shanmugavalli *et al.*, 2009). Los estudios se han realizado mayormente en el fruto beneficiado de la vainilla (Pérez-Silva *et al.*, 2006; Sinha *et al.*, 2008) y se han descrito alrededor de 200 metabolitos del aroma, identificados estructuralmente como ácidos orgánicos, éteres, ésteres, alcoholes, compuestos fenólicos y carbonilos (Klimes y Lamparsky, 1976). De estos compuestos casi un tercio son aromáticos volátiles, entre ellos destacan, por su concentración alta e importancia en el aroma cuatro compuestos fenólicos: ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido vanílico, *p*-hidroxibenzaldehído y vainillina; este último es el compuesto más abundante (Pérez-Silva *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2006). Existe información de los metabolitos volátiles en el extracto de los frutos beneficiados,

INTRODUCTION

Vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) is an orchid native of México and Central America, which stands out because it is the only of its genus with economic importance and the second most expensive aromatic spice in the food industry, after saffron (Anilkumar, 2004). Vanilla is cultivated traditionally in the region of Totonacapan in México, which covers the states of Puebla and Veracruz, and in other regions with agroclimate conditions that are appropriate for its cultivation, in Chiapas, Oaxaca, Tabasco, San Luís Potosí and Hidalgo (Castro-Bobadilla and García-Franco, 2007).

The vegetative structures of plants contain chemical compounds that can carry out functions of protection against pathogens, UV radiation, pests and communication to attract pollinators, or others (Mazid *et al.*, 2011; Pagare *et al.*, 2015). In some orchids with medicinal use, numerous secondary metabolites have been identified that justify its medicinal properties, such as alkaloids, flavonoids, phenanthrenes, anthocyanins, sterols and terpenoids, particularly in the flower extracts and in the leaves (Pérez, 2010; Hossain, 2011). The Aztecs used vanilla in the treatment of hysteria, fever, impotence, and rheumatism (Bruman, 1948).

The mature vanilla fruit has been studied and used as an antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, and anti-cancerous agent (Sinha *et al.*, 2008; Shanmugavalli *et al.*, 2009). The studies have been performed mostly in the cured vanilla fruit (Pérez-Silva *et al.*, 2006; Sinha *et al.*, 2008), and around 200 metabolites of the aroma have been described, identified structurally as organic acids, ethers, esters, alcohols, phenolic compounds and carbonyls (Klimes and Lamparsky, 1976). Of these compounds almost a third are volatile aromatics, among which four phenolic compounds stand out because of their high concentration and importance of the aroma: *p*-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, *p*-hydroxybenzaldehyde and vanillin; the latter is the most abundant compound (Pérez-Silva *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2006). There is information about the volatile metabolites in the extract of the cured fruits, but their type and quantity in other structures and their variation with the development stage of the plant and the environment are scarcely

pero se conoce poco su tipo y cantidad en otras estructuras y su variación con la etapa de desarrollo de la planta y el ambiente (Shanmugavalli *et al.*, 2009). Sun *et al.* (2001) identificaron en extractos de acetato de etilo de la hoja y el tallo compuestos fenólicos, como *p*-etoximetilfenol, *p*-butoximetilfenol, vainillina y dos identificados por primera vez en esta especie, *p*-hidroxi-2-metoxicinamaldehído y ácido 3,4-dihidroxifenilacético, con propiedades insecticidas. Shanmugavalli *et al.* (2009) mencionaron que entre los metabolitos, particularmente en hoja, algunos tienen actividad contra patógenos, como *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.

La hipótesis de este estudio fue que el tipo y la cantidad de fitoquímicos varían entre los tejidos vegetales y sitios de recolecta de la planta; el objetivo fue identificar el perfil de fitoquímicos y cuantificar la variación de los compuestos fenólicos totales, taninos totales, taninos condensados y flavonoides en hoja, tallo, flor y vaina beneficiada de vainilla de plantas recolectadas en Huizotlaco, Coacuilco y Contepec, en la Huasteca Hidalguense, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolecta de material vegetal

Los tejidos vegetales se recolectaron en plantaciones de Huizotlaco, Coacuilco y Contepec en Hidalgo, México (Figura 1, Cuadro 1). La recolecta de hoja, tallo y flor se realizó durante la etapa de floración en mayo de 2014. Los frutos de las plantas de cada sitio se recolectaron 32 semanas después de la polinización y se beneficiaron con el proceso tradicional (Beneficio Primero de Mayo, Papantla, Veracruz) por el maestro beneficiador Veremundo Rodríguez.

Análisis cualitativo por cromatografía en capa fina (CCF)

Preparación de extractos. A partir de hojas, tallos y flores frescos triturados y hexano y metanol en proporción 1:5 (tejido: disolvente) se obtuvieron los extractos con diferente polaridad (Recio-Iglesias, 1999); el extracto de vaina beneficiada se obtuvo sólo con metanol por la disponibilidad baja de la muestra (Jadhav *et al.*, 2009). Las muestras se colocaron en un sonicador (Auto Science, modelo A5515OB) por 30 min, a frecuencia de 5.5, se mantuvieron en maceración a temperatura ambiente por 24 h, se filtraron y almacenaron en viales de vidrio a -20°C hasta el momento de su análisis.

understood (Shanmugavalli *et al.*, 2009). Sun *et al.* (2001) identified phenolic compounds in ethyl acetate extracts from the leaf and the stem, such as *p*-ethoxymethylphenol, *p*-butoxymethylphenol, vanillin and two identified for the first time in this species, *p*-hydroxy-2-methoxycinnamaldehyde and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, with insecticide properties. Shanmugavalli *et al.* (2009) mentioned that among the metabolites, particularly in the leaf, some have activity against pathogens such as *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*.

The hypothesis of this study was that the type and the quantity of phytochemicals varies between plant tissues and plant collection sites; the objective was to identify the profile of phytochemicals and to quantify the variation of the total phenolic compounds, total tannins, condensed tannins, and flavonoids in leaf, stem, flower and cured pod from vanilla plants collected in Huizotlaco, Coacuilco and Contepec, in the Huasteca Hidalguense, México.

MATERIALS AND METHODS

Plant material collection

The plant tissues were collected in plantations in Huizotlaco, Coacuilco and Contepec in Hidalgo, México (Figure 1, Table 1). Collecting of the leaves, stems and flowers was done during the flowering stage in May 2014. The fruits of the plants from each site were collected 32 weeks after pollination and cured with the traditional process (Beneficio Primero de Mayo, Papantla, Veracruz) by the curing master Veremundo Rodríguez.

Quantitative analysis by thin-layer chromatography (TLC)

Preparation of extracts. From crushed fresh leaves, stems and flowers, and hexane and methanol in 1:5 proportion (tissue:solvent), extracts with different polarity were obtained (Recio-Iglesias, 1999); the extract from the cured pod was obtained only with methanol because of the low availability of the sample (Jadhav *et al.*, 2009). The samples were placed in a sonicator (Auto Science, model A5515OB) for 30 min, at a frequency of 5.5, they were kept in maceration at room temperature for 24 h, filtered and stored in glass vials at -20°C until the time of their analysis.

Identification of groups of compounds. 15 to 20 μL of the extracts were applied to silica gel plates 60, F₂₅₄ (Sigma-Aldrich). The eluents and chromogenic agents were specific for the detection of each group of metabolite (Wagner and Bladt,

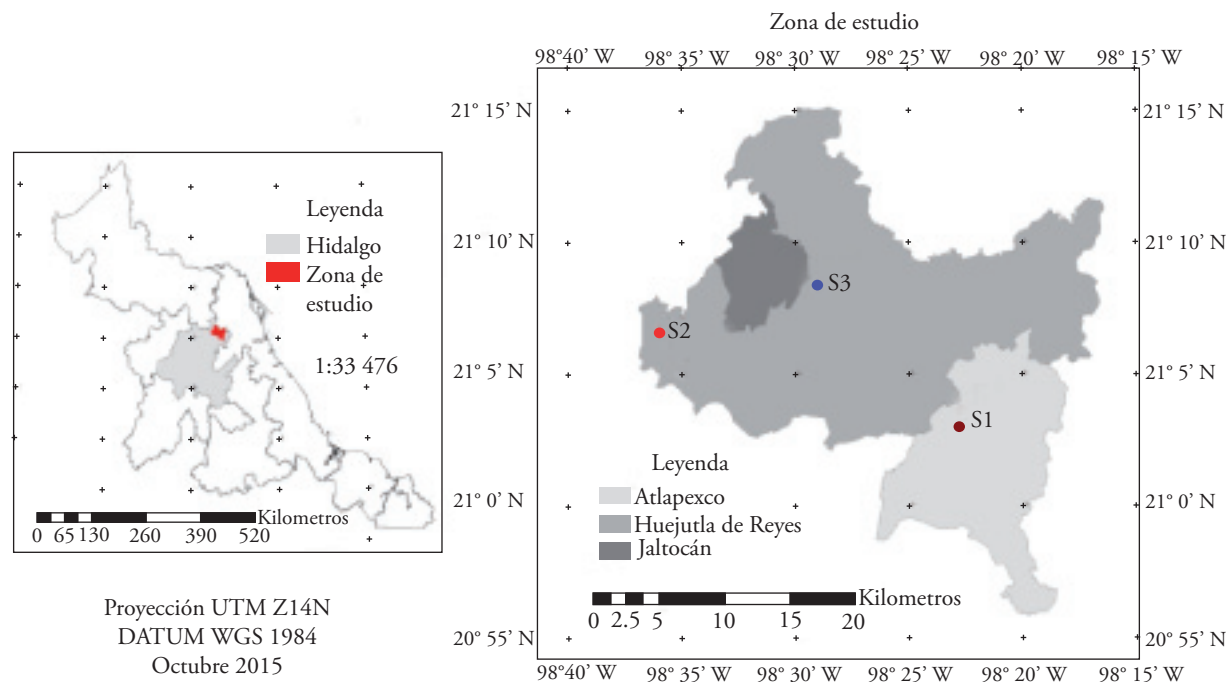


Figura 1. Ubicación geográfica de los sitios de recolecta de estructuras de vainilla en la Huasteca Hidalguense, México. S1: Huizotlaco, S2: Coacuilco, S3: Contepec.
Figure 1. Geographic location of the collection sites of vanilla structures in the Huasteca Hidalguense, México. S1: Huizotlaco, S2: Coacuilco, S3: Contepec.

Identificación de los grupos de compuestos. A placas de gel de sílice 60, F₂₅₄ (Sigma-Aldrich) se aplicaron de 15 a 20 μ L de los extractos. Los eluyentes y agentes cromogénicos fueron específicos para la detección de cada grupo de metabolito (Wagner y Bladl, 1996), en el caso de flavonoides las placas se visualizaron con luz ultravioleta (UVLMS-38 El series 3UVTM Lamp) a 365 nm.

1996); in the case of flavonoids the plates were visualized with ultraviolet light (UVLMS-38 El series 3UVTM Lamp) at 365 nm.

Quantitative analysis

Leaves and stems were obtained from the superior and inferior ends and the middle region of a meter of cutting from the plant, and small pieces were sectioned, extracted with

Cuadro 1. Ubicación de poblaciones de plantas de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews en la Huasteca Hidalguense, México.
Table 1. Location of plant populations of *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews in the Huasteca Hidalguense, México.

Municipio	Localidad	Longitud (grados)	Latitud (grados)	Altitud (m)	Clima
Atlapexco	Huizotlaco	-98.38	21.05	285	Am (f) Cálido húmedo, temperatura media anual mayor de 22 °C y temperatura del mes más frío mayor de 18 °C.
Huejutla	Coacuilco	-98.60	21.11	400	A (f) Cálido húmedo, temperatura media anual mayor de 22 °C y temperatura del mes más frío mayor de 18 °C.
Huejutla	Contepec	-98.49	21.14	352	(A)C(m)(f) Semicálido húmedo del grupo C, temperatura media anual mayor de 18 °C, temperatura del mes más frío menor de 18 °C.

(CONABIO, 2012).

Análisis cuantitativo

Hojas y tallo se obtuvieron de los extremos superior e inferior y de la región media de un metro de esqueje de la planta, se seccionaron en trozos pequeños, se extrajeron con metanol y se mantuvieron en la misma forma que se describió antes. A cada tejido se le determinó el contenido de humedad para expresar la concentración de los metabolitos secundarios con base en la materia seca (MS).

Compuestos fenólicos totales. Estos compuestos se cuantificaron con el método propuesto por Singleton *et al.* (1999), a 725 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Evolution 300, Thermo Scientific). La curva estándar ($y=1.6571x-0.016$, $R^2=0.9932$) se preparó con ácido gálico (Sigma). Los resultados se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico por 100 g de materia seca.

Taninos totales. Estos compuestos se cuantificaron con el método descrito por Makkar *et al.* (1993), a 725 nm en un espectrofotómetro UV/VIS (Evolution 300 Thermo Scientific). Los resultados se expresaron en mg de ácido tánico (Sigma) por 100 g de materia seca, con base en la ecuación de la curva estándar ($y=1.6571x-0.016$, $R^2=0.9932$).

Taninos condensados. Estos compuestos se cuantificaron con el método propuesto por Makkar *et al.* (1993), a 550 nm en un espectrofotómetro UV/VIS (Evolution 300 Thermo Scientific). Los resultados se expresaron en mg de ácido tánico (Sigma) por 100 g de materia seca de acuerdo con la ecuación:

$$\text{Taninos condensados (\%)} = \frac{(A_{550nm} \times 78.26 \times \text{Factor de dilución})}{\%MS}$$

dónde A es absorbancia, 78.26 es el factor de corrección, % MS es porcentaje de materia seca.

Flavonoides. Estos compuestos se cuantificaron con el método de Chang *et al.* (2002) a 415 nm en un espectrofotómetro UV/VIS (Evolution 300, Thermo Scientific). Los resultados se expresaron en mg equivalentes de quercetina (Sigma) por 100 g de materia seca de acuerdo con la ecuación de la curva estándar ($y=6.0143x-0.0084$, $R^2=0.9984$).

El beneficiado del fruto se realizó siguiendo la descripción de Xochipa-Morante *et al.* (2016).

Análisis estadístico

Para analizar los resultados de las pruebas cualitativas por cromatografía en capa fina se obtuvieron tablas de contingencia. La concentración de los compuestos fenólicos totales, taninos totales, taninos condensados y flavonoides, de nueve repeticiones de

metanol and kept in the same manner as described before. The humidity content was determined for each tissue to express the concentration of the secondary metabolites based on dry matter (DM).

Total phenolic compounds. These compounds were quantified with the method proposed by Singleton *et al.* (1999), at 725 nm in a UV-Vis spectrophotometer (Evolution 300, Thermo Scientific). The standard curve ($y=1.6571x-0.016$, $R^2=0.9932$) was prepared with gallic acid (Sigma). The results were expressed in mg gallic acid equivalent per 100 g of dry matter.

Total tannins. These compounds were quantified with the method described by Makkar *et al.* (1993), at 725 nm in a UV/VIS spectrophotometer (Evolution 300 Thermo Scientific). The results were expressed in mg of tannic acid (Sigma) per 100 g of dry matter, based on the standard curve equation ($y=1.6571x-0.016$, $R^2=0.9932$).

Condensed tannins. These compounds were quantified with the method proposed by Makkar *et al.* (1993), at 550 nm in a UV/VIS spectrophotometer (Evolution 300 Thermo Scientific). The results were expressed in mg of tannic acid (Sigma) per 100 g of dry matter, according to the following equation:

$$\text{Taninos condensados (\%)} = \frac{(A_{550nm} \times 78.26 \times \text{Factor de dilución})}{\%MS}$$

where A is absorbance, 78.26 is the correction factor, % DM is the percentage of dry matter.

Flavonoids. These compounds were quantified according to the method suggested by Chang *et al.* (2002) at 415 nm in a UV/VIS spectrophotometer (Evolution 300, Thermo Scientific). The results were expressed in equivalent mg of quercetin (Sigma) per 100 g of dry matter, according to the standard curve equation ($y=6.0143x-0.0084$, $R^2=0.9984$).

The curing process of fruit was carried out following the description by Xochipa-Morante *et al.* (2016).

Statistical analysis

Contingency tables were obtained to analyze the results of the qualitative tests by thin-layer chromatography. ANOVA was performed for the concentration of total phenolic compounds, total tannins, condensed tannins and flavonoids, from nine repetitions of leaf and stem, and four of flower and cured pod, from each collection site. The difference between means per collection and between tissues was evaluated with the Tukey test ($\alpha=0.05$) with the SAS statistical package version 9.0 (SAS Institute Inc., 2002).

hoja y tallo, y cuatro de flor y vaina beneficiada, de cada sitio de recolecta, se realizó ANDEVA. La diferencia entre medias por recolecta y entre tejidos se evaluó con la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) con el paquete estadístico SAS versión 9.0 (SAS Institute Inc., 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis cualitativo por cromatografía en capa fina

Los grupos de fitoquímicos más abundantes, identificados por CCF, variaron entre los tejidos (Cuadro 2): 1) los terpenoides (17 a 20 bandas) se producen comúnmente en tejidos vegetales, flores y ocasionalmente en raíces (Dudareva *et al.*, 2004), su presencia en vainilla pudo deberse a que es el grupo de metabolitos secundarios vegetales más abundante y diverso en estructura química, y su papel es importante en las interacciones planta-insecto, planta-patógeno y planta-planta (Paschold *et al.* 2006); 2) las saponinas (16 a 18 bandas) son un tipo de terpenoide, habitualmente participan activamente en los procesos de regulación del crecimiento vegetal y las

RESULTS AND DISCUSSION

Qualitative analysis by thin-layer chromatography

The most abundant phytochemical groups, identified by TLC, varied between the tissues (Table 2): 1) terpenoids (17 to 20 bands) are produced commonly in vegetative tissues, flowers and occasionally roots (Dudareva *et al.*, 2004); their presence in vanilla could be because it is the most abundant and diverse group of plant secondary metabolites in chemical structure, and their role is important in plant-insect, plant-pathogen, and plant-plant interactions (Paschold *et al.* 2006); 2) saponins (16 to 18 bands) are a type of terpenoid; they usually participate actively in the regulation processes of plant growth and the variations in their distribution, composition and concentration in plants is attributed to the species' reactions to the environment (Moses *et al.*, 2014), and 3) flavonoids (14-18 bands); their synthesis in plants is recognized as a reaction to infection from microorganisms (Dixon *et al.*, 1983), and they help combat oxidative stress and

Cuadro 2. Número de bandas por grupo químico, observadas en cromatografía en capa fina, en extractos de hoja (H), tallo (T), flor (F) y vaina beneficiada (Vb) de *Vanilla planifolia* de tres sitios de recolecta de la Huasteca Hidalguense, México.
Table 2. Number of bands per chemical group, observed in thin-layer chromatography, in *Vanilla planifolia* leaf (H), stem (T), flower (F) and cured pod (Vb) from three collection sites in the Huasteca Hidalguense, México.

Sitio de recolecta	Tejido	Flav*	Sap	Tan	Alc	CFT	Terp**	Total
	Número de bandas							
Huizotlaco	H	5	5	1	2	2	5	20
	T	4	4	1	2	1	2	14
	F	5	4	1	2	1	4	17
	Vb	1	3	1	2	2	6	15
Total		15	16	4	8	6	17	66
Coacuilco	H	6	4	0	2	2	5	19
	T	6	5	1	2	1	5	20
	F	5	4	1	2	2	3	17
	Vb	1	3	1	2	2	5	14
Total		18	16	3	8	7	18	70
Contepec	H	4	7	0	2	2	7	22
	T	4	7	0	2	2	5	20
	F	5	2	0	2	2	3	14
	Vb	1	2	1	2	3	5	14
Total		14	18	1	8	9	20	70

*Extractos metanólicos de flavonoides, saponinas, taninos, alcaloides y compuestos fenólicos totales; **extracto hexánico de terpenoides.

♦ *Methanol extracts of flavonoids, saponins, tannins, alkaloids and total phenolic compounds; **hexanic extract of terpenoids.

variaciones en su distribución, composición y concentración en las plantas también se atribuyen a las reacciones de las especies al ambiente (Moses *et al.*, 2014) y 3) flavonoides (14-18 bandas), su síntesis en las plantas se reconoce como una reacción a infección por microorganismos (Dixon *et al.*, 1983), ayudan a combatir el estrés oxidativo y actúan como reguladores del crecimiento (Kumar y Pandey, 2013). En general, las hojas presentaron diversidad mayor de metabolitos (19 a 22 bandas), quizá por su actividad metabólica mayor, que además de la fotosíntesis, la exposición a la luz modula la síntesis y presencia de fitoquímicos que protegen a las plantas contra patógenos o herbívoros; esos compuestos pueden incluso depositarse en el exterior de las hojas, como ceras y cutina (Vivanco *et al.*, 2005).

La presencia de metabolitos por tejido dependió del sitio de recolecta. Los flavonoides mostraron más bandas (6) en hojas y tallos de Coacuilco; las hojas y tallos de Contepec destacaron por el número mayor correspondiente a saponinas (7 bandas), terpenoides en hoja (7) y compuestos fenólicos totales en vaina beneficiada (3). En los tejidos de los tres sitios de recolecta hubo menos bandas (1-2) de taninos y alcaloides (Cuadro 2). Shanmugavalli *et al.* (2009) documentaron resultados similares, ya que detectaron trazas de estos dos grupos en hojas y tallos de *V. planifolia*, en condiciones naturales, en India.

Análisis cuantitativo

Los principales grupos de fitoquímicos en tejidos mostraron coeficientes de variación (CV) entre 7 y 15 %, el mayor correspondió a los taninos condensados. En todas las variables se observaron diferencias altamente significativas ($p < 0.0001$) (Cuadro 3).

La concentración de los componentes fitoquímicos varió ampliamente entre los sitios de recolecta. El material vegetal de Contepec tuvo la concentración mayor de compuestos fenólicos totales y taninos totales. El de Coacuilco tuvo la concentración mayor de flavonoides y taninos condensados, y el de Huizotlaco presentó la concentración menor de todos los componentes evaluados (Cuadro 4).

La vaina beneficiada presentó la concentración mayor de compuestos fenólicos totales (Cuadro 4), aparentemente porque contribuyen ampliamente (1 000 a 3 000 mg 100 g⁻¹ MS) al aroma de las vainas beneficiadas (Shina *et al.*, 2008) y favorecen la ac-

act as growth regulators (Kumar and Pandey, 2013). In general, the leaves presented a higher diversity of metabolites (19 to 22 bands), perhaps because of their higher metabolic activity, since in addition to photosynthesis, exposure to light modulates the synthesis and presence of phytochemicals that protect plants against pathogens or herbivores; these compounds may even be deposited outside the leaves as waxes and cutin (Vivanco *et al.*, 2005).

The presence of metabolites by tissue depended on the collection site. The flavonoids showed more bands (6) in leaves and stems from Coacuilco; the leaves and stems from Contepec stood out for the higher number of saponins (7 bands), terpenoids in leaf (7), and total phenolic compounds in cured pod (3). In the tissues from the three collection sites there were less bands (1-2) of tannins and alkaloids (Table 2). Shanmugavalli *et al.* (2009) documented similar results, since they detected traces of these two groups in leaves and stems of *V. planifolia* under natural conditions, in India.

Quantitative analysis

The principal groups of phytochemicals in tissues showed coefficients of variation (CV) of between 7 and 15 %, the highest corresponded to condensed tannins. In all the variables, highly significant differences were observed ($p < 0.0001$) (Table 3).

The concentration of phytochemical components varied widely between the collection sites. The plant material from Contepec had the highest concentration of total phenolic compounds, and total tannins. The material from Coacuilco had the highest concentration of flavonoids and condensed tannins, and from Huizotlaco it presented the lowest concentration of all the components evaluated (Table 4).

The cured pod presented the highest concentration of total phenolic compounds (Table 4), apparently because they contribute widely (1 000 to 3 000 mg 100 g⁻¹ DM) to the aroma of the cured pods (Shina *et al.*, 2008) and favor the antioxidant activity of cured pod extracts (Rojas-López and Cañizares-Macías, 2013).

The leaf was the tissue with highest concentration of flavonoids, but its content was considerably less

Cuadro 3. Media, coeficiente de variación (CV) y cuadrados medios de componentes fitoquímicos por sitio de recolecta y tejido y su interacción en *Vanilla planifolia* de la Huasteca Hidalguense, México.**Table 3. Mean, coefficient of variation (CV) and mean squares of phytochemical components per collection site and tissue, and their interaction in *Vanilla planifolia* from the Huasteca Hidalguense, México.**

Variable (mg·100 g ⁻¹ MS)	Media	CV (%)	Cuadrados medios			
			Sitio	Tejido	Sitio*Tejido	Error
Compuestos fenólicos totales	302.844	7.580	44 666.961***	1 008 918.109***	7936.734***	526.935
Flavonoides	94.236	10.940	12 654.398***	16 701.632***	2241.404***	106.287
Taninos totales	56.197	11.021	12 99.700***	103 69.071***	1011.244 ***	38.367
Taninos condensados	23.179	14.250	332.960***	5223.171***	822.119***	10.909

*** p<0.0001 y CV: coeficiente de variación. ♦ *** p < 0.0001 and CV: coefficient of variation.

tividad antioxidante de extractos de vainas curadas (Rojas-López y Cañizares-Macías, 2013).

La hoja fue el tejido con concentración mayor de flavonoides, pero su contenido fue considerablemente menor al del té (*Camelia sinensis*) (611 mg 100 g⁻¹ MS), el cual tiene gran capacidad antioxidante (Pereira *et al.*, 2014) (Cuadro 4). La vaina beneficiada mostró la concentración mayor de taninos totales, pero correspondió a menos de la mitad en algunos frutos frescos, como el arándano (233 mg 100 g⁻¹) (Vázquez-Flores *et al.*, 2012), o incluso frutos que

than in tea (*Camelia sinensis*) (611 mg 100 g⁻¹ DM), which has high antioxidant capacity (Pereira *et al.*, 2014) (Table 4). The cured pod showed the highest concentration of total tannins, but corresponded to less than half in some of fresh fruits, such as cranberry (233 mg 100 g⁻¹) (Vázquez-Flores *et al.*, 2012), or even fruits that are cured like roasted coffee (270 mg 100 g⁻¹) (Savolainen, 1992). The leaves showed the highest concentration of condensed tannins and the stems followed; these compounds can contribute to the protection of the tissues, which like others are

Cuadro 4. Componentes químicos por sitio de recolecta y en los tejidos de la planta de *Vanilla planifolia* de la Huasteca Hidalguense, México.**Table 4. Chemical components per collection site and in *Vanilla planifolia* plant tissues of the Huasteca Hidalguense, México.**

Factor	Compuestos fenólicos totales	Flavonoides	Taninos totales	Taninos condensados
	(mg·100 g ⁻¹ MS)			
Sitio de recolecta				
Huizotlaco	252.352c	88.168b	50.236b	22.897b
Coacuilco	318.977b	120.417a	64.009a	27.529c
Contepec	335.099a	74.915c	54.345b	19.654a
DMS	15.952	7.164	4.119	2.444
Tejido				
Hoja	166.245d	127.023a	52.414b	40.992a
Tallo	212.372c	64.243c	46.250c	28.572b
Flor	298.692b	71.026c	41.145c	8.336c
Vb	749.608a	111.860b	102.141a	0.382d
DMS	21.503	9.632	5.664	3.202

Valores promedio con la misma letra en una columna y por factor no son estadísticamente diferentes (Tukey p≤0.05). Vb: vaina beneficiada y DMS: diferencia mínima significativa. ♦ Average values with the same letter in a column and per factor are not statistically different (Tukey p≤0.05). Vb: cured pod and DMS: minimum significant difference.

tienen un proceso de beneficio, como el café tostado (270 mg 100 g⁻¹) (Savolainen, 1992). Las hoja mostraron la concentración mayor de taninos condensados y les siguieron los tallos; estos compuestos pueden contribuir a la protección de los tejidos, que como otros están expuestos a patógenos, herbívoros y radiación UV (Brillouet *et al.*, 2013).

La concentración mayor de compuestos fenólicos totales se observó en flores y vaina beneficiada de Contepec, respecto a los otros sitios de recolecta y tejidos. Esto coincidió con los resultados de los componentes del aroma (principalmente compuestos fenólicos) en vainas beneficiadas del mismo sitio de recolecta, que mostraron concentración alta de ácido vanílico y media de vainillina (Delgado-Alvarado *et al.*, 2016). Hojas, tallos y flores de Coacuilco y la vaina beneficiada de Contepec mostraron concentración mayor de flavonoides y taninos totales (Cuadro 5). La concentración mayor de taninos condensados la presentaron los tallos de Coacuilco, las hojas procedentes de Huizotlaco y las flores y la vaina beneficiada de Contepec (Cuadro 5). Estas diferencias entre

exposed to pathogens, herbivores and UV radiation (Brillouet *et al.*, 2013).

The highest concentration of total phenolic compounds was observed in flowers and cured pod from Contepec, compared to the other collection sites and tissues. This agreed with the results of the aroma components (mainly phenolic compounds) in cured pods from the same collection site, which showed high concentration of vanillic acid and medium concentration of vanillin (Delgado-Alvarado *et al.*, 2016). The leaves, stems and flowers from Coacuilco and the cured pod from Contepec showed a higher concentration of flavonoids and total tannins (Table 5). The highest concentration of condensed tannins was shown by stems from Coacuilco, leaves from Huizotlaco, and flowers and cured pod from Contepec (Table 5). These differences between collection sites can be attributed to the conditions of each site; Coacuilco is at a higher altitude compared to the other sites (Table 1), so the temperature differs and can generate stress in the plants and favor the production of these compounds.

Cuadro 5. Concentración de fenoles totales (CFT), flavonoides (Flav), taninos totales (TT) y taninos condensados (TC) en tejidos de *Vanilla planifolia* recolectados en localidades de la Huasteca Hidalguense, México.

Table 5. Concentration of total phenols (CFT), flavonoids (Flav), total tannins (TT) and condensed tannins (TC) in *Vanilla planifolia* tissues collected in localities of the Huasteca Hidalguense, México.

Sitio de recolecta/tejido	CFT	Flav	TT	TC
	(mg·100 g ⁻¹ MS)			
Huizotlaco				
Hoja	125.591d	122.708a	52.326b	46.106a
Tallo	160.024c	48.295c	37.424c	23.152b
Flor	183.469b	74.947b	37.731c	4.586c
Vb	719.115a	113.388a	86.869a	0.213c
DMS	22.545	17.382	8.323	7.357
Coacuilco				
Hoja	194.510d	143.505a	55.525bc	33.969b
Tallo	252.850c	120.361ab	66.858b	52.775a
Flor	335.290b	81.059b	43.430c	7.123c
Vb	731.490a	107.914c	97.265a	0.407d
DMS	53.63	24.411	13.177	6.418
Contepec				
Hoja	164.500d	108.773a	49.390b	42.048a
Tallo	224.240c	42.779b	34.468c	16.051b
Flor	377.320b	57.071c	42.275bc	13.30b
Vb	798.220a	114.280a	122.290a	0.526c
DMS	30.507	7.059	8.808	3.872

Medias con la misma letra en cada variable y por cada sitio de recolecta no son estadísticamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$). Vb: vaina beneficiada. ♦ Means with the same letter in each variable and for each collection site are not statistically different (Tukey $p \leq 0.05$). Vb: cured pod.

sitios de recolecta pueden atribuirse a las condiciones de cada sitio; Coacuilco está a altitud mayor, respecto a los otros sitios (Cuadro 1), por lo que la temperatura difiere y puede generar estrés en las plantas y favorecer la producción de esos compuestos.

Cola parchycarpa y *Cola lepidota* crecen en condiciones geográficas y ambientales diferentes y el sitio de recolecta determina la presencia y concentración de fitoquímicos en las estructuras vegetales (Ene-Obong *et al.*, 2016). Además, en *V. planifolia* las diferencias entre tejidos también pueden asociarse a la etapa de desarrollo y condiciones de crecimiento de la planta, puesto que los tejidos más jóvenes tienden a concentrar cantidad mayor de fitoquímicos (Palama *et al.*, 2010). Esos metabolitos suelen transportarse de la raíz a los tallos y las hojas, vía xilema o floema, y almacenarse en estructuras reproductivas, como flores y vainas (Wink y Schimmer, 2010).

Con base en lo anterior, la región de recolecta de mayor interés podrían ser Coacuilco, porque las hojas y tallos recolectados ahí presentaron la concentración mayor de flavonoides y taninos totales, y Contepec porque las vainas y las flores presentaron la concentración mayor de compuestos fenólicos totales y taninos condensados. En contraste, en Huizotlaco todos los tejidos vegetales mostraron la concentración menor de metabolitos secundarios. Estos resultados permiten sugerir la conveniencia de investigar el efecto de otros factores que favorezcan la síntesis de metabolitos en la planta de vainilla.

CONCLUSIONES

La concentración de los componentes fitoquímicos varió en función del tejido y del sitio de la recolecta de vainilla. Entre los tejidos, la hoja tuvo la mayor concentración de flavonoides y taninos condensados, la vaina beneficiada tuvo la concentración mayor de compuestos fenólicos totales y taninos totales. Las plantas recolectadas en Coacuilco y Contepec tuvieron contenido mayor de compuestos fenólicos, flavonoides y taninos (totales y condensados) y las de Huizotlaco tuvieron perfil diferente con las concentraciones menores de los fitoquímicos.

Cola parchycarpa and *Cola lepidota* grow in different geographic and environmental conditions and the collection site determines the presence and concentration of phytochemicals in the vegetative structures (Ene-Obong *et al.*, 2016). Also, in *V. planifolia* the differences between tissues can also be associated to the development stage and growth conditions of the plant, since the younger tissues tend to concentrate a higher amount of phytochemicals (Palama *et al.*, 2010). These metabolites are usually transported from the root to the stems and the leaves, via xylem or phloem, and stored in reproductive structures such as flowers and pods (Wink and Schimmer, 2010).

Based on this, the collection region of greatest interest could be Coacuilco, because the leaves and stems collected there presented the highest concentration of total flavonoids and total tannins, and Contepec because the pods and flowers presented the highest concentration of total phenolic compounds and condensed tannins. In contrast, all the plant tissues in Huizotlaco showed the lowest concentration of secondary metabolites. These results allow suggesting the convenience of researching the effect of other factors that favor the synthesis of metabolites in the vanilla plant.

CONCLUSIONS

The concentration of phytochemical components varied in function of the tissue and the collection site of vanilla. Among the tissues, the leaf had the highest concentration of flavonoids and condensed tannins, the cured pod had the highest concentration of total phenolic compounds and total tannins. The plants collected in Coacuilco and Contepec had higher content of phenolic compounds, flavonoids and tannins (total and condensed) and those from Huizotlaco had a different profile with the lowest concentrations of the phytochemicals.

—End of the English version—

—*—

AGRADECIMIENTOS

Al fondo SAGARPA-CONACYT a través del proyecto 2012-04-190442 “Estrategia de investigación aplicada para el fortalecimiento, innovación y competitividad de la vainilla en México” (SP-14).

LITERATURA CITADA

- Anilkumar, A.S. 2004. Vanilla cultivation: a profitable agri-based enterprise. Kerala Calling: 26-30.
- Brillouet, J.-M., C. Romieu, B. Schoefs, K. Solymosi, V. Cheynier, H. Fulcrand, J. Verdeil, and Conéjéro, G. 2013. The tannosome is an organelle forming condensed tannins in the chlorophyllous organs of *Tracheophyta*. Ann. Bot. 112: 1003–1014.
- Bruman, H. 1948. The culture history of Mexican vanilla. Hisp. Am. Hist. Rev. 28: 360-376.
- Castro-Bobadilla, G. and J. G. García-Franco. 2007. Vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) crop systems in the Totonacapan area of Veracruz, Mexico: Biological and productivity evaluation. J. Food Agric. Environ. 5: 136-139.
- Chang, C., M. Yang, H. Wen, and J. Chern. 2002. Estimation of total flavonoids content in propolis by two complementary colorimetric methods. J. Food Drug Anal. 10: 176-182.
- CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad). 2012. Portal de Geoinformación. Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/informacion/gis/> Fecha de consulta: Agosto 2015.
- Delgado-Alvarado, A., G. Andrade-Andrade, B. H. Herrera-Cabrera, M. L. Arévalo-Galarza. 2016. Perfil del aroma de vainilla beneficiada (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) de la Huasteca hidalguense, México. Agroproductividad 9 (suplemento):15-16
- Dixon R. A., P. M. Dey, and C. J. Lamb. 1983. Phytoalexins: enzymology and molecular biology. Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 55:1–136.
- Dudareva, N., E. Pichersky, J. Gershenzon. 2004. Biochemistry of plant volatiles, Plant Physiol. 135: 1893-1902.
- Ene-Obong, H. N., H. O. Okudu, and U. V. Asumugha. 2016. Nutrient and phytochemical composition of two varieties of Monkey kola (*Cola parchycarpa* and *Cola lepidota*): An underutilized fruit. Food Chem. 6: 194-203.
- Hossain, M. M. 2011. Therapeutic orchids: traditional uses and recent advances-an overview. Fitoterapia 82: 102-140.
- Jadhav, D., B. N. Rekha, P. R. Gogate, and V. K. Rathod. 2009. Extraction of vanillin from vanilla pods: A comparison study of conventional soxhlet and ultrasound assisted extraction. J Food Eng. 93: 421-426
- Klimes, I., and D. Lamparsky. 1976. Vanilla volatiles -a comprehensive analysis. Int. Flavours Food Addit. 7:272-291.
- Kumar, S., and A. K. Pandey. 2013. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. Scientific World J. 2013:1-16.
- Makkar, H. P. S., M. Blummel, N. K. Borowy, and K. Becker. 1993. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. J. Sci. Food. Agric. 61: 161-165.
- Mazid, M., T. A. Khan, and F. Mohammad. 2011. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. Biol. Med. 3: 232-249.
- Moses, T., K. K. Papadopoulou, and A. Osbourn. 2014. Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 49: 439–462.
- Pagare, S., M. Bhatia, N. Tripathi, S. Pagare, and Y. K. Bansal. 2015. Secondary metabolites of plants and their role: Overview. Curr. Trends Biotechnol. Pharm. 9: 293-304.
- Palama, T. L., I. Fock, Y. H. Choi, R. Verpoorte, and H. Kodja. 2010. Biological variation of *Vanilla planifolia* leaf metabolome. Phytochemistry. 71: 567-573.
- Paschold, A., R. Halitschke, and I. T. Baldwin. 2006. Using ‘mute’ plants to translate volatile signals. Plant J. 145: 275–291.
- Pereira, V. P., F. J. Knor, J. C. R. Velloso, and F. L. Beltrame. 2014. Determination of phenolic compounds and antioxidant activity of green, black and white teas of *Camelia sinensis* (L) Kuntze, Theaceae. Rev. Bras. Med. Campinas. 16: 490-498.
- Pérez G., R. M. 2010. Orchids: A review of uses in traditional medicine, its phytochemistry and pharmacology. J. Med. Plants Res. 4: 592-638.
- Pérez-Silva, A., E. Odoux, P. Brat, F. Ribeyre, G. Rodríguez-Jiménez, V. Robles-Olvera, M. A. García-Alvarado, and Z. Günata. 2006. GC–MS and GC-olfactometry analysis of aroma compounds in a representative organic aroma extract from cured vanilla (*Vanilla planifolia* G. Jackson) beans. Food Chem. 99: 728–735.
- Recio-Iglesias, M. C. 1999. Métodos generales de extracción y purificación de principios activos de drogas. In: Farmacognosia general. Ed. A.M. Villar del Fresno, Madrid, pp: 83-98.
- Rojas-López, A. and M. Cañizares-Macías 2013. Antioxidant Capacity in Vanilla Extracts Obtained by Applying Focused Microwaves. Food Nutr. Sci. 4: 244-253.
- SAS Institute Inc. 2002. SAS/STAT[®] 9.0. User's guide. Cary, NC. SAS Institute Inc. 421 p.
- Savolainen, H. 1992. Tannin content of tea and coffee. J. Appl. Toxicol., 12: 191–192.
- Shanmugavalli, N., V. Umashankar, and Raheem. 2009. Antimicrobial activity of *Vanilla planifolia*. Indian J. Sci. Technol. 2: 37-40.
- Sharma, A., S. C. Verma, N. Saxena, N. Chadda, N. P. Singh, and A. K. Sinha. 2006. Microwave and ultrasound assisted extraction of vanillin and its quantification by high performance liquid chromatography in *Vanilla planifolia*. J. Sep. Sci. 29: 613-619.
- Singleton, V. L., R. Orthofer, R. M. Lamuela-Raventos. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Method. Enzymol. 299: 152–178.
- Sinha, A. K., U. K. Sharma, and N. Sharma. 2008. A comprehensive review on vanilla flavor: extraction, isolation and quantification of vanillin and others constituents. Int. J. Food Sci. Nutr. 59: 299–326.
- Sun, R., J. N. Sacalis, C. K. Chin, and C. C. Still. 2001. Bioactive aromatic compounds from leaves and stem of *Vanilla*. J. Agric. Food Chem. 49: 5161-5164.

- Vázquez-Flores, A. A., E. Álvarez-Parrilla, J. A. López-Díaz, A. Walll-Medrano, y L. A. de la Rosa. 2012. Taninos hidrolizables y condensados: naturaleza química, ventaja y desventajas. *Tecnociencia Chihuahua* 6: 84-93.
- Vivanco, J. M., E. Cosío, V. M. Loyola-Vargas, y H. E. Flores. 2005. Mecanismos químicos de defensa en las plantas. *Investigación Ciencia* 341: 68-75.
- Wagner, H., and S. Bladt. 1996. *Plant Drug Analysis: A thin Layer Chromatography Atlas*. 2d. Ed. Springer Verlag. New York.
- Wink, M., and O. Schimmer. 2010. Introduction. In: M. Wink. *Annual plant review. Function and biotechnology of plant secondary metabolites*. Wiley-Blackwell, United Kingdom, pp: 1-16.
- Xochipa-Morante, R. C., A. Delgado-Alvarado, B. E. Herrera-Cabrera, J. S. Escobedo-Garrido, y L. Arévalo-Galarza. 2016. Influencia del proceso de beneficiado tradicional mexicano en los compuestos del aroma de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews. *Agroproductividad* 9: 55-62.