

Efecto del ambiente sobre ácido vainílico y características físicas en frutos de vainilla en Oaxaca, México.

J. Hernandez-Ruiz ^{a,*}, B.E. Herrera-Cabrera ^b, A. Delgado-Alvarado ^b, A.I. Mireles-Arriaga ^b, J.E. Ruiz-Nieto ^b

a Universidad de Guanajuato, División de Ciencias de la Vida, Departamento de Agronomía. Km 9 carretera Irapuato-Silao, Ex Hacienda. El Copal. C.P. 36500. Irapuato, Guanajuato, México. * hernandez.jesus@ugto.mx

b. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas–Campus Puebla. Boulevard Forjadores de Puebla No 205 Santiago Momoxpan, San Pedro Cholula, C.P. 72760. Puebla, México

RESUMEN

La calidad organoléptica en los frutos de vainilla es determinada principalmente por cuatro compuestos, vainillina, p-hidroxibenzaldehído, ácido vainílico y ácido 4-hidroxibenzoico. En condiciones de cultivo, el ácido vainílico es influenciado por las características de la zona de cultivo. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar la concentración de Ac. Vainílico y características físicas en frutos de poblaciones silvestres de *V. planifolia* en relación con los factores ambientales presentes en seis sitios del estado de Oaxaca, México. En frutos de vainilla se evaluaron 10 variables físicas (largo, diámetro, grosor, color, brillo, flexibilidad, Grosor/Flexibilidad, humedad, pH y actividad de agua) y la concentración de Ac. Vainílico determinada por HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Las características físicas de los frutos beneficiados no mostraron diferencias significativas. El efecto de las características de la zona ecológica y del sitio de colecta sobre el contenido de Ac. vainílico comprobó diferencias altamente significativas ($p < 0.0001$) y formó tres grupos de medias, donde la variable ambiental régimen de humedad en el suelo es la que influye en la concentración del compuesto fenólico evaluado..

Palabras clave: ácido 4-hidroxibenzoico, frutos beneficiados, vainilla silvestre

ABSTRACT

The organoleptic quality in the vanilla fruits was determined by four compounds: vanillin, p-hydroxybenzaldehyde, vanillic acid and 4-hydroxybenzoic acid. Under growing conditions, vanillic acid is influenced by the characteristics of the growing area. Therefore, the objective of this work was to determine the concentration of vanillic acid in wild populations of *V. planifolia* in relation to environmental factors presented in six sites in the state of Oaxaca, Mexico. 10 physical variables were evaluated in fruits (length, diameter, thickness, color, brightness, flexibility, thickness / flexibility, humidity, pH and water activity) and concentration of vanillic acid was determined by HPLC (High resolution liquid chromatography). The physical characteristics of the benefited fruits and the effect of the characteristics of the ecological zone and the collection site on the content of vanillic acid proved highly significant differences ($p < 0.0001$) and formed three groups of means, where the environmental variable soil moisture regime is the one that influences the concentration of the phenolic compound evaluated..

Keywords: 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid, benefited fruits, wild vanilla

INTRODUCCIÓN

Vanilla planifolia es una orquídea con frutos aromáticos, originaria de México (Verpoorte, 2011). El sabor y aroma de las vainas son de suma importancia en la industria de alimentos, perfumes y en preparaciones farmacéuticas (Walton *et al.*, 2003; Reineccius, 2013). Los especímenes silvestres y cultivares de la especie conforman el acervo genético primario de vainilla (Soto-Arenas, 2010), sin embargo, la mayoría de las poblaciones silvestres se ubican en el estado de Oaxaca (Hernandez *et al.*, 2016), por lo que resulta de gran importancia conocer su concentración de compuestos aromáticos para generar estrategias de conservación y aprovechamiento de la especie (Herrera-Cabrera *et al.*, 2016).

La determinación de la calidad organoléptica en los frutos de vainilla es determinada principalmente por cuatro compuestos, vainillina (4-hidroxibenzoaldehído), p-hidroxibenzaldehído, ácido vainílico (ácido 4-hidroxibenzoico), p-hidroxibenzaldehído, ácido vainílico (ácido 4-hidroxibenzoico).

3-metoxibenzoico) y ácido 4-hidroxibenzoico (Sharma *et al.*, 2006). Dentro de los compuestos fenólicos que determinan el aroma de *V. planifolia* en condiciones de cultivo, el ácido vainílico es altamente influenciado por las características ambientales de la zona de cultivo (Salazar-Rojas *et al.*, 2011). La vainillina es afectada principalmente por el estado de madurez y método de curado del fruto (Ranadive, 1992) y la concentración de hidroxibenzaldehído y ácido hidroxibenzoico podrían estar determinados por factores intrínsecos de la especie, como variaciones genéticas de tipo polimórfico (Salazar-Rojas *et al.*, 2011).

En los cultivares de vainilla se ha reportado la existencia de seis quimiotipos, provenientes de un proceso de selección y domesticación realizado por grupos Totonacos en México (Herrera-Cabrera *et al.*, 2012). El cual ha modificado la concentración de los tres compuestos menores: ácido hidroxibenzoico, ácido vainílico e hidroxibenzaldehído, sobre el contenido de vainillina, apoyado en la reproducción clonal de la especie (Salazar-Rojas *et al.*, 2011).

En poblaciones naturales las plantas expresan variación en la composición aromática como resultado de la expresión genética en combinación con factores ambientales (Majetic *et al.*, 2009), esto debido a que, en la mayoría de las especies con frutos aromáticos, estos sirven para atraer a los diseminadores de semillas y de esta manera garantizar el éxito reproductivo y evolutivo (Corlett, 2011; Mardon *et al.*, 2010). Por tal razón, el objetivo del presente trabajo fue cuantificar la concentración de ácido vainílico en frutos de vainilla en relación con los factores ambientales donde se desarrollan las poblaciones silvestres del estado de Oaxaca, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Basados en la distribución potencial de *V. planifolia* silvestre de Hernandez-Ruiz et al. (2016), se eligieron seis sitios para coleccionar frutos verdes del estado de Oaxaca para coleccionar frutos verdes (Tabla I).

Tabla I. Factores ambientales de los sitios de colecta de los frutos verdes de *V. planifolia*.

Sitio	Clima	Precipitación media anual (mm)	Altitud (msnm)	Régimen de humedad del suelo*	Zona ecológica
Cerro caída	Am	> 4000	109	Údico Tipo I	Templada húmeda
Cerro hoja	Am	> 4000	200	Údico Tipo I	Templada húmeda
Usila	Am	2500 a 4000	148	Údico Tipo I	Templada húmeda
Lalopa	A(f)	1500 a 2000	885	Údico Tipo II	Templada húmeda
Cerro azul	Am	1500 a 2000	329	Ústico	Tropical húmeda
Pluma Hidalgo	Aw1	1500 a 2000	920	Ústico	Templada húmeda del pacífico

*Údico tipo I: 330 a 365 días de humedad, Údico tipo II: 270 a 330 días de humedad, Ústico 270 a 180 días de humedad.

Frutos

Flores de *Vanilla planifolia* G. Jack, de seis sitios del estado de Oaxaca fueron etiquetadas y polinizadas manualmente durante la segunda semana de abril y la primera de mayo de 2015 (Tabla 1). Los frutos fueron colectados a las 28 semanas posteriores a la polinización y sometidos a un proceso de beneficiado tradicional de 14 semanas (Xochipa-Morante *et al.*, 2016).

Análisis de características físicas

En los frutos beneficiados se midieron las siguientes variables: longitud (mm), diámetro (mm) y grosor (mm) por medio de un vernier Digimatic Caliper Mitutoyo Mod. CD-6C; color determinado por L*, a* y b* mediante el

colorímetro MiniScan by Hunterlab; textura evaluada con el texturómetro Precision Scientific Cat. 73510 (software Texture Exponent 32); pH se midió con el potenciómetro marca de HANNA modelo pH 11, directamente en la parte central del fruto con un electrodo HANNA HI 1330; porcentaje de humedad se determinó con 0.500g de fruto beneficiado molido mediante una termo balanza HAUS modelo MB45; actividad de agua (AW) se determinó con 3cm de la parte central del fruto beneficiado mediante el equipo Aqualab modelo 3.

Extracción

Los frutos beneficiados se refrigeraron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 hrs y se trituraron en un molino de carga Kurps Gx4100 de 25000 rpm. Posteriormente 0.5 mg de tejido se depositaron en viales de 20 mL en los cuales se adicionó 8 mL de una solución compuesta de agua y éter etílico grado HPLC (1:1) la cual se mantuvo en refrigeración por 24 hrs a 4°C . La mezcla de tejido y solución (extracto) se colocó en un agitador (Thermo Scientific Cimatec) por 30 min a una velocidad de 6 stir para después dejarle en refrigeración por 24 hrs a 4°C . Posteriormente el extracto se agito a 6 stir durante 5 min y se tomó 3mL del extracto con una jeringa y se filtraron con acrodiscos de 1 mL (PALL Life Sciences, membrana GHP, 13 mm), para colocarlo en viales de 2 mL.

Análisis HPLC

Se uso el reactivo ácido vainílico grado HPLC (Sigma-Aldrich Co., USA). Los extractos se analizaron mediante un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) Series 200 marca Perkin Elmer, detector UV-VIS, con una columna C18 $5\text{ }\mu\text{m}$ 250x4.6 mm (Serie 08010034K), volumen de inyección: $10\text{ }\mu\text{L}$, flujo: 1.0 mL min^{-1} , fase móvil isocrática (H_3PO_4 0.01M: metanol (75:25) y solución metanol: agua (50:50), temperatura $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, tiempo de corrida 30 min, y detección a 254nm.

Análisis estadístico

Las propiedades físicas de las vainas se analizaron mediante un modelo equivalente al diseño completamente al azar, desbalanceado (PROC GLM, SAS, 2002). Para el análisis del Ac. Vainílico se realizó dos diseños estadísticos: 1) Análisis del efecto de las variables ambientales (precipitación, régimen de humedad del suelo y zona ecológica) que determina la distribución de la especie (Hernandez-Ruiz *et al.* 2016) sobre la concentración del compuesto aromático como fuente de variación. y 2) Análisis de la concentración del Ac. Vainílico en los sitios de *V. planifolia*. Se consideró al sitio como fuente de variación. Se evaluaron 6 tratamientos con 3 repeticiones. En ambos casos, los datos por tratamiento se analizaron mediante un modelo equivalente al diseño completamente al azar, desbalanceado (PROC GLM, SAS, 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las características físicas de los frutos beneficiadas no mostraron diferencias significativas (Tabla II), lo cual se relaciona con dos aspectos, primero que estas variables no son influenciadas por el sitio de colecta, son determinadas por la selección homogénea de los frutos de vainilla después del beneficiado. Segundo que la selección homogénea de los frutos, sumado a la utilización de un mismo tipo de beneficiado no afecto a la preparación de los extractos, con lo que se logró comparar de manera eficaz el efecto del sitio y la concentración de Ac. Vainílico en poblaciones silvestres de *V. planifolia*.

Tabla II. Medias y coeficientes de las 10 variables físicas evaluadas en seis sitios de colecta de *Vanilla planifolia* del estado de Oaxaca.

Variable	Media	Coeficiente de variación	Cuadrados medios	
			Error	Sitio
Largo (mm)	16.311	9.145	2.225	4.524 ^{NS}
Diámetro (mm)	7.022	11.692	0.674	0.897 ^{NS}
Grosor (mm)	0.897	4.921	0.033	0.004 ^{NS}
Croma (color)	4.178	11.968	0.250	0.918 ^{NS}
Hue (brillo)	224.052	1.735	15.104	4.479 ^{NS}
Flexibilidad(g)	126.191	0.764	0.929	1.436 ^{NS}
Gros/Flex (mm)	34.479	4.931	2.890	0.467 ^{NS}
pH	4.694	0.435	0.000	0.001 ^{NS}
Humedad (%)	32.389	2.571	0.693	1.171 ^{NS}
Aw	0.852	2.311	0.001	0.010 ^{NS}

NS= Estadísticamente no significativo

Cromatografía

En las condiciones evaluadas por HPLC, el tiempo de retención del ácido vainílico fue en promedio de 17.10 min.

Efecto del ambiente sobre la concentración de Ac. Vainílico

El efecto de las características de la zona ecológica, sobre el contenido del compuesto fenólico (Tabla III), comprobó que existe diferencia significativa ($p < 0.0001$) sobre la concentración. Esta variación concuerda con lo reportado por Ranadive (1992) y Salazar-Rojas et al. (2012).

Tabla III. Media y coeficiente de variación de Ac. Vainílico en seis sitios de colecta de *Vanilla planifolia* del estado de Oaxaca.

Variable	Media (ppm [‡])	Coeficiente de variación
Ac. vainílico	829.56***	17.00

***= $P < 0.0001$, [‡] mg·kg⁻¹ de vainilla beneficiada

Efecto del sitio de colectas sobre la concentración de compuestos aromáticos

El análisis del efecto de los sitios colecta sobre el contenido de Ac. Vainílico comprobó diferencias altamente significativas ($p < 0.0001$). De tal manera que existe diferencia entre cada uno de los sitios analizados, lo que infiere que cada población natural expresa plasticidad fenotípica en la composición aromática (Cosacov et al., 2013).

Tabla IV. Media y coeficiente de variación de Ac. Vanílico en seis sitios de colecta de *Vanilla planifolia* del estado de Oaxaca.

Variables	Media (ppm [‡])	Coefficiente de variación
Ac. vainílico	853.16***	11.25

***= $P < 0.0001$, [‡] mg·kg⁻¹ de vainilla beneficiada

La concentración de ácido vainílico formo tres grupos de medias. El sitio con mayor contenido correspondió a Usila (1117.65 ± 155ppm). El segundo grupo lo conforma Lalopa (875.5 ± 77 ppm), el tercer grupo con menor contenido lo forman los sitios cerro azul, pluma Hidalgo, Cerro hoja y Cerro caída donde la concentración del compuesto es respectivamente 651.5 ± 56 ppm, 715.7 ± 120 ppm, 806.8 ± 62 ppm y 810.1 ± 26 ppm (Fig.1). El ácido vainílico se ha reportado en concentraciones que llegan a las 2000 ppm (Westcott *et al.*, 1993; Sostaric *et al.*, 2000). En condiciones de cultivo la concentración de ácido vainílico es influenciado por la cantidad de precipitación (Salazar-Rojas *et al.*, 2011), sin embargo, en poblaciones silvestres se observó que la concentración de este compuesto responde al régimen de humedad del suelo, dado que Usila, sitio con mayor concentración (1117.65 ± 155ppm), se sitúa en un régimen de humedad de 330 a 365 días y el sitio con menor concentración (651.5 ± 56 ppm) se localiza en un régimen de humedad de 180 a 270 días.

Ácido vainílico		
Sitio	Media (ppm [‡])	Grupo
Usila	1117.64 ^a	G1
Lalopa	875.51 ^{ab}	G2
Cerro caída	810.1 ^b	G3
Cerro Hoja	806.88 ^b	
Pluma Hidalgo	715.71 ^b	
Cerro Azul	651.54 ^b	

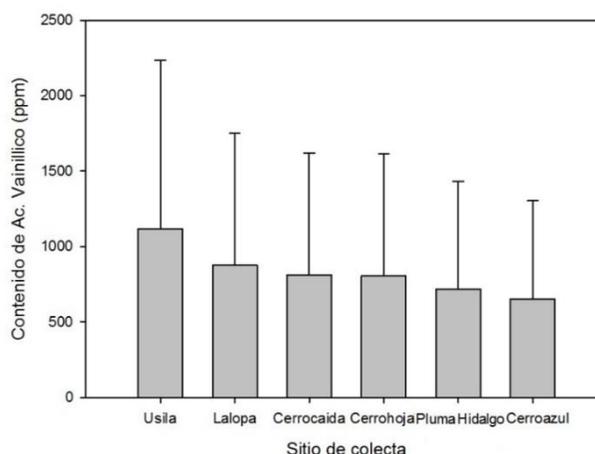


Figura 1. Contenido medio de Ácido vainílico en los seis sitios de colectas de *V. planifolia* en el estado de Oaxaca-México ([‡] = mg.kg⁻¹ de vainilla beneficiada; letras diferentes indican diferencia estadística, Tukey $\alpha=0.05$).

De acuerdo con las principales características aromáticas de *V. planifolia* se considera que el material silvestre o poco cultivado, posee valores más altos en la proporción de compuestos menores como lo es el ac. vainílico en relación con la vainillina (Herrera-Cabrera *et al.*, 2016). Dicho planteamiento se confirma al comparar valores encontrados en los individuos que conforman los grupos de Oaxaca en relación al quimiotipo que se considera en un estado silvestre (QI), en la región del Totonacapan (Tabla V), donde su valor de ac. vainílico es de 794 en contraste el valor del quimiotipo que ha llevado un proceso de domesticación el cual tiene un valor de 411 a 755.

Tabla V. Comparativa de la concentración de ácido vainílico de los grupos del estado de Oaxaca en relación al quimiotipo más silvestre (QI) y el mayormente domesticado (Q VI) de *V. planifolia* en la Región Totonacapan Puebla-Veracruz.

Quimiotipo	ácido vainílico (ppm)
Oaxaca	
Grupo I	1117.64
Grupo II	875.51
Grupo III	810.10-651.54
<i>V. planifolia</i> Oax. ¹	1315

Puebla-Veracruz	
Q I ²	794
Q VI ²	411-755

¹Pérez-Silva *et al.*, 2006

²Salazar-Rojas *et al.*, 2011

CONCLUSIÓN

Las características de la zona ecológica como y del sitio de colecta de los frutos de vainilla bajo condiciones silvestres afectan la concentración de Ac. vainílico. Las condiciones ambientales en el estado de Oaxaca propicio que la concentración de Ac. vainílico formara tres grupos de medias. El sitio con mayor contenido correspondió a Usila (1117.65 ± 155 ppm). El segundo grupo lo conforma Lalopa (875.5 ± 77 ppm), el tercer grupo con menor contenido lo forman los sitios Cerro azul, pluma Hidalgo, Cerro hoja y Cerro caída donde la concentración del compuesto es respectivamente 651.5 ± 56 ppm, 715.7 ± 120 ppm, 806.8 ± 62 ppm y 810.1 ± 26 ppm. En frutos producidos por plantas de vainilla bajo condiciones silvestres la concentración de Ac. Vainílico está influenciada por el régimen de humedad del suelo.

BIBLIOGRAFÍA

- Corlett, R. T. (2011). How to be a frugivore (in a changing world). *Acta Oecologica*, 37(6), 674–681.
- Cosacov, A., Cocucci, A. A., & Sérsic, A. N. (2013). Geographical differentiation in floral traits across the distribution range of the Patagonian oil-secreting *Calceolaria polyrhiza*: do pollinators matter? *Annals of Botany*, mct239.
- Hernández-Ruíz, J., Herrera-Cabrera, B. E., Delgado-Alvarado, A., Salazar-Rojas, V. M., Bustamante-Gonzalez, Á., Campos-Contreras, J. E., & Ramírez-Juarez, J. (2016). Potential distribution and geographic characteristics of wild populations of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae) Oaxaca, Mexico. *Revista de biología tropical*, 64(1), 235-246.
- Herrera-Cabrera, B. E., Hernández-Ruíz, J., & Delgado-Alvarado, A. (2016). variación de aroma en *Vanilla planifolia* Jacks. Ex Andrews silvestre y cultivada. *Agroproductividad*, 9 (1), 10-17.
- Herrera-Cabrera, B. E., Salazar-Rojas, V. M., Delgado-Alvarado, A., Contreras, J., Contreras, C., & Cervantes-Vargas, J. (2012). Use and conservation of *Vanilla planifolia* J. in the Totonacapan Region, México. *European Journal of Environmental Sciences*, 2(1) 43-50.
- Majetic, C. J., Raguso, R. A., & Ashman, T.-L. (2009). Sources of floral scent variation. *Plant Signaling & Behavior*, 4(2), 129-131.
- Mardon, J., Saunders, S. M., Anderson, M. J., Couchoux, C., & Bonadonna, F. (2010). Species, Gender, and Identity: Cracking Petrels' Sociochemical Code. *Chemical Senses*.
- Pérez-Silva, A., Odoux, E., Brat, P., Ribeyre, F., Rodriguez-Jimenes, G., Robles-Olvera, V., Günata, Z. (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 Chemistry*, 99(4), 728-735.
- Ranadive, A. S. (1992). Vanillin and related flavor compounds in vanilla extracts made from beans of various global origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(10), 1922-1924.
- Reineccius, G. (2013). *Source book of flavors*. Springer Science & Business Media
- Salazar-Rojas, V. M., Herrera-Cabrera, B. E., 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(5), 875-887.

- SAS (2002) SAS/STAT Users guide, version 9. SAS Institute Inc, North Carolina.
- Sharma, A., Verma, S. C., Saxena, N., Chadda, N., Singh, N. P., & Sinha, A. K. (2006). Microwave- and ultrasound-assisted extraction of vanillin and its quantification by high-performance liquid chromatography in *Vanilla planifolia*. *Journal of Separation Science*, 29(5), 613-619.
- Sostaric, T., Boyce, M. C., & Spickett, E. E. (2000). Analysis of the Volatile Components in Vanilla Extracts and Flavorings by Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(12), 5802-5807
- Soto-Arenas, M. A., & Dressler, R. L. (2010). A revision of the Mexican and Central American species of *Vanilla Plumier ex Miller* with a characterization of their ITS region of the nuclear ribosomal DNA. *Lankesteriana*, 9(2), 85-354.
- Verpoorte, R. (2011). Prologue. in: odoux e, grisoni M (eds), *Vanilla (medicinal and aromatic plants-industrial profiles)*. crc press.
- Walton, N. J., Mayer, M. J., & Narbad, A. (2003). Vanillin. *Phytochemistry*, 63(5), 505-515.
- Westcott, R. J., Cheetham, P. S. J., & Barraclough, A. J. (1993). Use of organized viable vanilla plant aerial roots for the production of natural vanillin. *Phytochemistry*, 35(1), 135-138.
- Xochipa-Morante, R. C., Delgado-Alvarado, A., Herrera-Cabrera, B. E., 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. *Agroproductividad*, 9(1), 55-62