

## Effect of the environmental condition of *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews cultivation on phytochemical concentration

### Efecto de la condición ambiental del cultivo de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews sobre la concentración de fitoquímicos

Diego Ibarra-Cantún<sup>1</sup>; Adriana Delgado-Alvarado<sup>1\*</sup>; Braulio Edgar Herrera-Cabrera<sup>1</sup>; Ramón Marcos Soto-Hernández<sup>2</sup>; Víctor Manuel Salazar-Rojas<sup>3</sup>; María Isabel Aguilar<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Colegio de Postgraduados-Campus Puebla, Programa de Estrategias para el Desarrollo Agrícola Regional. Boulevard Forjadores de Puebla núm. 205, Santiago Momoxpan, San Pedro Cholula, Puebla, C. P. 72760, MÉXICO.

<sup>2</sup>Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo, Programa de Botánica. Carretera México-Texcoco km 38.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México, C. P. 56230, MÉXICO.

<sup>3</sup>Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Av. de los Barrios núm. 1, Los Reyes Iztacala Tlalnepantla, Estado de México, C. P. 54090, MÉXICO.

<sup>4</sup>Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de Farmacia, Facultad de Química. Av. Universidad núm. 3000, Col. Universidad Nacional Autónoma de México, CU, Ciudad de México, C. P. 04510, MÉXICO.

\*Corresponding author: adah@colpos.mx, tel. 01 (222) 2851445 ext. 2026.

#### Abstract

In vanilla, compounds that exhibit antimicrobial activity are synthesized; however, the variation in phytochemicals present in the plant structures of this species is little known, in relation to the environmental condition and the crop system. The objective of this research was to quantify the variation in phytochemicals in leaf, stem, flower, green fruit and cured fruit from two vanilla chemotypes (QI and QVI) grown in *acahual* (native and introduced secondary vegetation) and shade mesh systems. Vanilla chemotypes were collected during the flowering period and at harvest in four locations in the Totonacapan region, Mexico. The concentration of total phenolic compounds, total tannins, hydrolysable tannins, condensed tannins, flavonoids, saponins and triterpenes was analyzed in methanolic extracts by spectrophotometric methods. The phytochemicals accumulated at different concentrations in the vanilla plant tissues in relation to the condition of the crop management system and the chemotype. *Acahual* cultivation favored the concentration of total phenolic compounds, total, hydrolysable and condensed tannins, and total triterpenes, while the values obtained with shade mesh were higher in saponins. QVI accumulated the highest concentration of phytochemicals, with the exception of hydrolysable tannins that showed no statistical difference between chemotypes. The environmental condition affected the phytochemical concentration in the plant structures of vanilla. Elevation was the environmental variable that most impacted the accumulation of phytochemicals, since it showed an inverse effect on the concentration of total triterpenes, total tannins and condensed tannins.

**Keywords:** *acahual*, shade mesh, secondary metabolites, chemotypes, vanilla.

#### Resumen

En la vainilla se sintetizan compuestos que presentan actividad antimicrobiana; no obstante, la variación de fitoquímicos presentes en las estructuras vegetales de esta especie es poco conocida, en relación con la condición ambiental y el sistema de cultivo. El objetivo de esta investigación fue cuantificar la variación de fitoquímicos en hoja, tallo, flor, fruto verde y fruto beneficiado de dos quimiotipos (QI y QVI) de vainilla cultivados en *acahual* (vegetación secundaria nativa e introducida) y malla sombra. Los quimiotipos de vainilla se recolectaron durante el periodo de floración y a la cosecha en cuatro localidades de la región del Totonacapan, México. La concentración de compuestos fenólicos totales, taninos totales, taninos hidrolizables, taninos condensados, flavonoides, saponinas y triterpenos se analizó en extractos metanólicos por métodos espectrofotométricos. Los fitoquímicos se acumularon a diferente concentración en los tejidos de la planta de vainilla en relación con la condición del sistema de manejo de cultivo y del quimiotipo. El cultivo en *acahual* favoreció la concentración de compuestos fenólicos totales, taninos totales, hidrolizables y condensados, así como de triterpenos totales; mientras que los valores obtenidos con malla sombra fueron mayores en saponinas. El QVI acumuló la concentración mayor de fitoquímicos, con excepción de los taninos hidrolizables que no mostraron diferencia estadística entre quimiotipos. La condición ambiental afectó la concentración de fitoquímicos en las estructuras vegetales de la vainilla. La altitud fue la variable ambiental que más impactó en la acumulación de fitoquímicos, ya que mostró un efecto inverso en la concentración de triterpenos totales, taninos totales y taninos condensados.

**Palabras clave:** *acahual*, malla sombra, metabolitos secundarios, quimiotipos, vainilla.

Please cite this article as follows (APA 6): Ibarra-Cantún, D., Delgado-Alvarado, A., Herrera-Cabrera, B. E., Soto-Hernández, R. M., Salazar-Rojas, V. M., & Aguilar, M. I. (2018). Effect of the environmental condition of *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews cultivation on phytochemical concentration. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 24(2), 151-165. doi: 10.5154/r.rchsh.2017.08.031

Received: August 26, 2017/ Accepted: March 23, 2018.



Revista Chapingo  
Serie Horticultura

[www.chapingo.mx/revistas/horticultura](http://www.chapingo.mx/revistas/horticultura)

## Introduction

Since prehispanic times, vanilla has been used in traditional medicine for its various healing properties, as well as for being a preservative, flavoring and aromatic agent in various foods (Tamura, Hata, & Chida, 2010). Vanilla is attributed with anticarcinogenic (Ferguson, 1994), antimutagenic, anti-inflammatory (Bythrow, 2005), antimicrobial (Shanmugavalli, Umashankar, & Raheem, 2009), and high antioxidant capacity properties (Tai, Sawano, Yazama, & Ito, 2011), among others. However, studies on these properties in vanilla are mainly restricted to the fruit (pod) and the extract of cured vanilla, where the presence of tannins, phenolic acids and flavonoids, among other components, have been reported (Gurnani, Kapoor, Mehta, Gupta, & Mehta, 2014). Research on phytochemical contents in plant structures (leaves and stems) is limited but could be of biological interest as indicated by Palama, Fock, Choi, Verpoorte, and Kodja (2010), due to the presence of bioactive compounds in the vanilla.

Different vanilla crop management systems are used within the Totonacapan region of Mexico; one of them is the so-called *acahual* (native and introduced secondary vegetation) system, where the vanilla plants are established in host trees of citrus (*Citrus sinensis*), *pichoco* (*Erythrina* sp.) and *cocuile* (*Gliricidia sepium*), among others. This agroforestry arrangement provides between 50 and 70 % shade and the ventilation required by the crop for its optimal development. The other system is shade mesh (50 to 80 % shade), which provides intensive production, in conjunction with irrigation and application of agrochemicals; in this case, artificial (concrete post) or live hosts are used (Barrera-Rodríguez, Jaramillo-Villanueva, Escobedo-Garrido, & Herrera-Cabrera, 2011).

In *V. planifolia*, six chemotypes or subpopulations with variations in the composition and typical concentration of the major secondary metabolites (vanillin, *p*-hydroxybenzaldehyde, vanillic acid and *p*-hydroxybenzoic acid) (Salazar-Rojas et al., 2012) that define the commercial quality of the aroma of vanilla have been detected (Ranadive, 1992). These chemotypes are defined as local phytochemical adaptations of a species, genetically controlled and related to the interaction with their habitat, in addition to having zero or minimal modifications in their morphology and physiology (Gross et al., 2009). These are cultivated in both *acahual* and shade mesh systems in the Totonacapan region.

Under the hypothesis that the environmental condition in the vanilla crop management system determines the presence and content of phytochemical components in the different plant structures of the species, the

## Introducción

Desde la época prehispánica, la vainilla se ha utilizado en la medicina tradicional por sus diversas propiedades curativas, además de ser un agente conservador, saborizante y aromático en diversos alimentos (Tamura, Hata, & Chida, 2010). Algunas de las propiedades que se le atribuyen a la vainilla son anticarcinogénicas (Ferguson, 1994), antimutagénicas, antiinflamatorias (Bythrow, 2005), antimicrobianas (Shanmugavalli, Umashankar, & Raheem, 2009), alta capacidad antioxidante (Tai, Sawano, Yazama, & Ito, 2011), entre otros. Sin embargo, los estudios de estas propiedades en la vainilla se restringen principalmente al fruto (vaina) y al extracto de vainilla beneficiada, donde se ha reportado la presencia de taninos, ácidos fenólicos, flavonoides, entre otros (Gurnani, Kapoor, Mehta, Gupta, & Mehta, 2014). Las investigaciones sobre los contenidos de fitoquímicos en las estructuras de la planta (hojas y tallos) son limitados, pero podrían ser de interés biológico como lo señalan Palama, Fock, Choi, Verpoorte, y Kodja (2010), por la presencia de compuestos bioactivos en la vainilla.

En México existen diferentes sistemas de manejo del cultivo de vainilla dentro de la región del Totonacapan; uno de ellos es el sistema de *acahual* (vegetación secundaria nativa e introducida), donde las plantas de vainilla se establecen en tutores de árboles de cítricos (*Citrus sinensis*), *pichoco* (*Erythrina* sp.), *cocuile* (*Gliricidia sepium*), entre otros. Este arreglo agroforestal brinda entre 50 y 70 % de sombra y la ventilación necesaria que requiere el cultivo para su óptimo desarrollo. El otro sistema es de malla sombra (50 a 80 % de sombra), el cual presenta una producción intensiva, con riego y aplicación de agroquímicos; en este caso se utilizan tutores artificiales (poste de concreto) o vivos (Barrera-Rodríguez, Jaramillo-Villanueva, Escobedo-Garrido, & Herrera-Cabrera, 2011).

En *V. planifolia* se ha detectado que existen seis quimiotipos o subpoblaciones con variaciones en la composición y concentración típica de los metabolitos secundarios mayoritarios (vainillina, *p*-hidroxibenzaldehído, ácido vanílicico y ácido *p*-hidroxibenzoico) (Salazar-Rojas et al., 2012) que definen la calidad comercial del aroma de la vainilla (Ranadive, 1992). Dichos quimiotipos se definen como adaptaciones fitoquímicas locales de una especie, genéticamente controladas y relacionadas con la interacción con su hábitat, además de presentar modificaciones nulas o mínimas en su morfología y fisiología (Gross et al., 2009). Estos se cultivan tanto en *acahual* como en malla sombra en la región del Totonacapan.

Bajo la hipótesis de que la condición ambiental en el sistema de manejo del cultivo de vainilla determina la

aim of this research was to quantify the variation in total phenolic compounds, total tannins, hydrolysable tannins, condensed tannins, flavonoids, saponins and total triterpenes, in leaf, stem, flower, fruit (green and cured) of two chemotypes (QI and QVI) of vanilla grown in *acahual* and shade mesh systems in the Totonacapan region of Mexico.

## Materials and methods

### Plant material

The plants used corresponded to two *V. planifolia* chemotypes (QI and QVI) obtained from different genotypes (Genotype VI and Genotype III, respectively) (Herrera-Cabrera, Hernández-Ruíz, & Delgado-Alvarado, 2016), which were collected in *acahual* and shade mesh systems at locations within the Totonacapan region of Mexico (Table 1). During the flowering period (from April to May 2013), one-meter-long cuttings were collected from the base to the tip to obtain leaves, stems and flowers. In order to obtain fruits with the same state of maturity, the flowers of the two chemotypes were manually pollinated and marked. The fruits were harvested 32 weeks after pollination and were subjected in a uniform way to a traditional curing process (Xochipa-Morante, Delgado-Alvarado, Herrera-Cabrera, Escobedo-Garrido, & Arévalo-Galarza, 2016).

### Preparation of extracts for quantification

**Total phenolic compounds, total tannins, hydrolysable tannins, condensed tannins and flavonoids:** Extracts from each fresh tissue (leaf, stem, flower, green fruit and cured fruit) were prepared in methanol at a concentration of 50 mg·mL<sup>-1</sup>. The samples were placed in an ultrasonic bath (AutoScience AS5150B) for 30 min; subsequently, the extracts were filtered and stored in glass vials at -20 °C until analysis.

**Saponins:** Five 5 mL of distilled water were added to 1 g of fresh sample of each tissue and taken to an ultrasonic bath (AutoScience AS5150B) for a period of 20 min at 10-min intervals.

**Total triterpenes:** Five mL of 70 % ethanol (v/v) were added to 1 g of fresh sample and left to macerate for 10 h. The extract was centrifuged at 3,344 g for 5 min and the supernatant was evaporated in a rotaevaporator (Heidolph, Laborota 4000); subsequently, the plant residue was washed four times with butanol:water (1:1), where the aqueous phase was discarded and the organic one was evaporated in a rotaevaporator. Ethyl ether was added to the residue and kept at 4 °C for 12 h. Finally, the residue was dried and stored at -20 °C for further analysis.

presencia y contenido de componentes fitoquímicos en las diferentes estructuras vegetales de la especie, se planteó como objetivo del trabajo cuantificar la variación de compuestos fenólicos totales, taninos totales, taninos hidrolizables, taninos condensados, flavonoides, saponinas y triterpenos totales, en hoja, tallo, flor, fruto (verde y beneficiado) de dos quimiotipos (QI y QVI) de vainilla cultivados en *acahual* y malla sombra en la región del Totonacapan, México.

## Materiales y métodos

### Material vegetal

Las plantas utilizadas correspondieron a dos quimiotipos de *V. planifolia* (QI y QVI) de genotipo diferente (Genotipo VI y Genotipo III, respectivamente) (Herrera-Cabrera, Hernández-Ruíz, & Delgado-Alvarado, 2016); los cuales se recolectaron en *acahual* y malla sombra en localidades de la región del Totonacapan, México (Cuadro 1). Durante el periodo de floración (de abril a mayo de 2013) se recolectaron esquejes de un metro de longitud, de la base a la punta, para obtener hojas, tallos y flores. Con el fin de obtener frutos con un mismo estado de madurez, las flores de los dos quimiotipos se polinizaron manualmente y se marcaron. Los frutos se recolectaron 32 semanas después de la polinización y se sometieron de manera uniforme a un proceso tradicional de beneficiado (Xochipa-Morante, Delgado-Alvarado, Herrera-Cabrera, Escobedo-Garrido, & Arévalo-Galarza, 2016).

### Preparación de extractos para cuantificación

**Compuestos fenólicos totales, taninos totales, taninos hidrolizables, taninos condensados y flavonoides:** De cada tejido fresco (hoja, tallo, flor, fruto verde y fruto beneficiado) se prepararon extractos en metanol a una concentración de 50 mg·mL<sup>-1</sup>. Las muestras se colocaron en un baño ultrasónico (AutoScience AS5150B) durante 30 min; posteriormente, los extractos se filtraron y almacenaron en viales de vidrio a -20 °C hasta su análisis.

**Saponinas:** Se agregaron 5 mL de agua destilada a 1 g de muestra fresca de cada tejido y se llevó a un baño ultrasónico (AutoScience AS5150B) por un lapso de 20 min con intervalos de 10 min.

**Triterpenos totales:** A 1 g de muestra fresca se adicionaron 5 mL de etanol al 70 % (v/v) y se dejó en maceración por 10 h. El extracto se centrifugó a 3,354 g por 5 min y el sobrenadante se evaporó en rotaevaporador (Heidolph, Laborota 4000), posteriormente el residuo vegetal se lavó cuatro veces con butanol:agua (1:1), donde la fase acuosa se descartó y la orgánica se evaporó en rotaevaporador. Al residuo se le agregó éter etílico y se mantuvo a 4 °C

**Table 1. Location of sites where the *Vanilla planifolia* collections were made in different management systems in the Totonacapan region, Mexico.****Cuadro 1. Ubicación de localidades donde se realizaron las colectas de *Vanilla planifolia* en diferente sistema de manejo de la región del Totonacapan, México**

Management system/ Sistema de manejo	Chemotype/ Genotype/ Quimiotipo/ Genotipo	Community, municipality, state/Localidad, municipio, estado	Elevation (masl)/ Altitud (msnm)	AT <sup>1</sup> (°C)/ TP <sup>1</sup> (°C)	RH (%)/ HR (%)	IR (%)/ RI (%)	Climate*/Clima*
Acahual	QI/GVI	Finca 20 Soles, Papantla, Veracruz. 20° 25' 38.91" LN, 97° 18' 44.47" LO	180	23.5	75	79	Aw1(x') Warm sub-humid, average annual temperature greater than 22 °C and temperature of the coldest month greater than 18 °C. Precipitation of the driest month less than 60 mm; summer rains with winter rain percentage greater than 10.2 % of the annual total./ Aw1(x') Cálido subhúmedo, temperatura media anual mayor de 22 °C y temperatura del mes más frío mayor de 18 °C. Precipitación del mes más seco menor de 60 mm; lluvias de verano y porcentaje de lluvia invernal mayor al 10.2 % del total anual.
	QVI/GIII	1° Mayo, Papantla, Veracruz. 20° 17' 45.18" LN, 97° 15' 51.96" LO	100	27.5	72	60	Am(f) Warm humid, average annual temperature greater than 22 °C and temperature of the coldest month greater than 18 °C. Precipitation of the driest month less than 60 mm; summer rains with winter rain percentage greater than 10.2 % of the annual total./ Am(f) Cálido húmedo, temperatura media anual mayor de 22 °C y temperatura del mes más frío mayor de 18 °C. Precipitación del mes más seco menor de 60 mm; lluvias de verano y porcentaje de lluvia invernal mayor al 10.2 % del total anual.
Shade mesh/ Malla sombra	QI/GVI	Pantepec, Puebla. 20° 30' 17.63" LN, 97° 53' 22.70" LO	290	29.0	66	30	Am(f) Warm humid, average annual temperature greater than 22 °C and temperature of the coldest month greater than 18 °C. Precipitation of the driest month less than 60 mm; summer rains with winter rain percentage greater than 10.2 % of the annual total./ Am(f) Cálido húmedo, temperatura media anual mayor de 22 °C y temperatura del mes más frío mayor de 18 °C. Precipitación del mes más seco menor de 60 mm; lluvias de verano y porcentaje de lluvia invernal mayor al 10.2 % del total anual.
	QVI/GIII	Puntilla Aldama, San Rafael, Veracruz. 20° 14' 4.49" LN, 96° 54' 13.75" LO	12	22.5	90	45	Am(f) Warm humid, average annual temperature greater than 22 °C and temperature of the coldest month greater than 18 °C. Precipitation of the driest month less than 60 mm; summer rains with winter rain percentage greater than 10.2 % of the annual total./ Am(f) Cálido húmedo, temperatura media anual mayor de 22 °C y temperatura del mes más frío mayor de 18 °C. Precipitación del mes más seco menor de 60 mm; lluvias de verano y porcentaje de lluvia invernal mayor al 10.2 % del total anual.

<sup>1</sup>AT: average temperature; RH: relative humidity; IR: intercepted radiation. \*Source: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO, 2012).

<sup>1</sup>TP: temperatura promedio; HR: humedad relativa; IR: radiación interceptada. \*Fuente: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO, 2012).

Prior to quantification, the moisture content of all tissues was determined in a thermobalance (Ohaus MB45) to express the concentration of secondary metabolites based on dry matter (DM).

#### Quantification of phytochemicals

**Total phenolic compounds:** The analysis was carried out using the method described by Singleton and Rossi (1965), with some modifications. First, 250 µL of 50 % Folin-Ciocalteu reagent (v/v) were added to 50 µL of the extract with methanol and then the mixture was left to

por 12 h. Finalmente el residuo se secó y almacenó a -20 °C para su posterior análisis.

Previo a la cuantificación, 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).

#### Cuantificación de fitoquímicos

**Compuestos fenólicos totales:** El análisis se realizó mediante el método descrito por Singleton y Rossi (1965),



stand in the dark for 8 min; subsequently, 1.25 mL of 5 % sodium carbonate (v/v) were added and it was again left to stand for 30 min in the dark at room temperature. The absorbance reading of the mixture was performed at 725 nm in a UV-Vis spectrophotometer (Evolution 300, Thermo Scientific). The results were expressed in mg equivalents of tannic acid per g of DM, for which a standard curve ( $y = 2.0364x - 0.0016$ ,  $R^2 = 0.9942$ ) was obtained with tannic acid (Sigma Aldrich).

**Total tannins:** They were determined using the method described by Makkar, Bluemmel, Borowy, and Becker (1993). Two hundred mg of PVPP (polyvinylpyrrolidone), 2 mL of methanolic extract and 2 mL of distilled water were placed in a test tube previously lined with aluminum foil. The mixture was vortexed and left to stand for 15 min in the dark at 4 °C. Subsequently, it was again stirred and filtered, and an aliquot of 150 µL was taken and brought to 1 mL with distilled water. Next, 50 µL of this extract were taken, 450 µL of distilled water and 250 µL of 50 % Folin-Ciocalteu reagent (v/v) were added, and it was stirred and left to rest for 8 min, after which 1.25 mL of 5 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (v/v) were added. It was again stirred and left to stand under dark conditions at room temperature for 30 min. Finally, the absorbance reading was performed at 725 nm in a UV-Vis spectrophotometer (Evolution 300, Thermo Scientific). The results were expressed in mg of tannic acid (Sigma Aldrich) per g of DM, based on the equation provided by the standard curve ( $y = 2.0977x - 0.0241$ ,  $R^2 = 0.9919$ ).

**Condensed tannins (proanthocyanidins):** It was carried out according to the method proposed by Porter, Hrstich, and Chan (1986), with some modifications. Three mL of 1-butanol-HCl and 100 µL of 2 % ferric chloride (w/v) in 2 N HCl were added to 500 µL of the methanolic extract. The solution was placed in a water bath at 80 °C for 15 min. Finally, the absorbance at 550 nm was recorded in a UV-Vis spectrophotometer (Evolution 300, Thermo Scientific). The concentration of condensed tannins was calculated according to the following equation and the result was expressed in  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  DM:

$$\text{Condensed tannins} = \frac{(A_{550 \text{ nm}} \times 78.26 \times \text{Dilution factor})}{\% \text{ DM}}$$

where  $A$  is the absorbance at 550 nm, % DM the percentage of dry matter and 78.26 the correction factor.

**Hydrolysable tannins:** The content of hydrolysable tannins was calculated by means of the difference between total tannins and condensed tannins. The results were expressed in  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  DM (García-Ferrer, Bolaños-Aguilar, Lagunes-Espinoza, Ramos-Juárez, & Osorio-Arce, 2016).

con algunas modificaciones. A 50 µL del extracto con metanol se agregaron 250 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu al 50 % (v/v) y se dejó reposar en oscuridad durante 8 min, posteriormente se adicionaron 1.25 mL de carbonato de sodio al 5 % (v/v) y nuevamente se dejó reposar por 30 min en oscuridad a temperatura ambiente. La lectura de absorbancia de la mezcla se realizó a 725 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Evolution 300, Thermo Scientific). Los resultados se expresaron en mg equivalente de ácido tánico por g de MS, para lo cual se obtuvo como referencia una curva estándar ( $y = 2.0364x - 0.0016$ ,  $R^2 = 0.9942$ ) con ácido tánico (Sigma Aldrich).

**Taninos totales:** Se determinaron de acuerdo con el método descrito por Makkar, Bluemmel, Borowy, y Becker (1993). En un tubo de ensayo, previamente forrado con papel aluminio, se colocaron 200 mg de PVPP (polivinilpirrolidona), 2 mL de extracto metanólico y 2 mL de agua destilada, se agitó en vórtex y se dejó reposar por 15 min en oscuridad a 4 °C. Posteriormente, se volvió a agitar, se filtró, se tomó una alícuota de 150 µL y se aforó a 1 mL con agua destilada. De este extracto se tomaron 50 µL, se agregaron 450 µL de agua destilada y 250 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu al 50 % (v/v), se agitó y dejó reposar por 8 min para después agregar 1.25 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 5 % (v/v); nuevamente se agitó y se dejó reposar en condiciones de oscuridad a temperatura ambiente durante 30 min. Finalmente, se realizó la lectura de absorbancia a 725 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Evolution 300, Thermo Scientific). Los resultados se expresaron en mg de ácido tánico (Sigma Aldrich) por g de MS, con base en la ecuación proporcionada por la curva estándar ( $y = 2.0977x - 0.0241$ ,  $R^2 = 0.9919$ ).

**Taninos condensados (proantocianidinas):** Se realizó de acuerdo con el método propuesto por Porter, Hrstich, y Chan (1986), con algunas modificaciones. A 500 µL del extracto metanólico se le adicionaron 3 mL de 1-butanol-HCl y 100 µL de cloruro férrico al 2 % (p/v) en HCl 2 N. La solución se colocó en baño maría a 80 °C durante 15 min. Finalmente se registró la absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Evolution 300, Thermo Scientific). La concentración de taninos condensados se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación y el resultado se expresó en  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  MS:

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

donde  $A$  es la absorbancia a 550 nm, % MS el porcentaje de materia seca y 78.26 el factor de corrección.

**Taninos hidrolizables:** El contenido de taninos hidrolizables se calculó por medio de la diferencia de taninos totales y taninos condensados. Los resultados

**Total flavonoids:** They were determined using the methodology proposed by Chang, Yang, Wen, and Chern (2002), with some modifications. First, 500  $\mu\text{L}$  of the extract with methanol, 1.5 mL of 80 % ethanol (v/v), 100  $\mu\text{L}$  of 20 % aluminum chloride hexahydrate solution (w/v), 100  $\mu\text{L}$  of 1 M potassium acetate, and 2.8 mL of distilled water were placed in a test tube. The mixture was stirred and incubated for 30 min at room temperature. The absorbance reading was performed at 415 nm in a UV-Vis spectrophotometer (Evolution 300 Thermo Scientific). The results were expressed in mg equivalents of quercetin (Sigma Aldrich) per g of DM, from the equation obtained from the standard curve prepared with quercetin ( $y = 6.0986x - 0.0004$ ,  $R^2 = 0.9952$ ).

**Saponins:** They were determined by the sulfuric acid-vanillin method described by Hiai, Oura, and Nakajima (1976). Five  $\mu\text{L}$  of the extract, 95  $\mu\text{L}$  of water, 1 mL of concentrated sulfuric acid and 100  $\mu\text{L}$  of a fresh solution of 8 % vanillin (w/v) in ethanol were mixed in a test tube. Subsequently, the mixture was incubated at 60 °C for 20 min and then placed in an ice bath. The absorbance was read at 544 nm in a UV-Vis spectrophotometer (Evolution 300, Thermo Scientific). As a reference, a standard curve ( $y = 0.0033x + 0.0786$ ,  $R^2 = 0.9919$ ) was obtained with quillaja saponin (Sigma Aldrich). The results were expressed in  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  DM.

**Total triterpenes:** The colorimetric method with vanillin-acetic acid described by Fan and He (2006) was used, with some modifications. First, 100  $\mu\text{L}$  of 5 % vanillin (w/v) and 400  $\mu\text{L}$  of perchloric acid were added to 0.5 mg of extract; the mixture was kept at 60 °C for 15 min. The tubes were left to cool to room temperature and 2.5 mL of acetic acid were added to them. The absorbance was obtained at 550 nm in a UV-Vis spectrophotometer (Evolution 300 Thermo Scientific). The results were expressed in  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  DM from a standard curve ( $y = 0.0125x - 0.0274$ ,  $R^2 = 0.9949$ ) prepared with oleanolic acid (Sigma Aldrich).

### Statistical analysis

The effect of plant structure, chemotype and management system was analyzed as a source of variation on the concentration of phytochemicals in *V. planifolia*. Twenty treatments with nine replicates of different plants were evaluated, with a total of 180 samples. The experimental design used was a factorial arrangement with three factors (two management systems, two chemotypes and five plant structures) (Statistical Analysis System [SAS], 2002) and the comparison of means for each source of variation was performed using Tukey's test (SAS, 2002). In addition, in order to know the association between environmental and phytochemical (content and type) variables, a

se expresaron en  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  MS (García-Ferrer, Bolaños-Aguilar, Lagunes-Espinoza, Ramos-Juárez, & Osorio-Arce, 2016).

**Flavonoides totales:** Se utilizó la metodología propuesta por Chang, Yang, Wen, y Chern (2002), con algunas modificaciones. En un tubo de ensayo se colocaron 500  $\mu\text{L}$  del extracto con metanol, 1.5 mL de etanol al 80 % (v/v), 100  $\mu\text{L}$  de solución de cloruro de aluminio hexahidratado al 20 % (p/v), 100  $\mu\text{L}$  de acetato de potasio 1 M y 2.8 mL de agua destilada. La mezcla se agitó e incubó por 30 min a temperatura ambiente. La lectura de la absorbancia se realizó a 415 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Evolution 300 Thermo Scientific). Los resultados se expresaron en mg equivalentes de quercetina (Sigma Aldrich) por g de MS, a partir de la ecuación obtenida de la curva estándar preparada con quercetina ( $y = 6.0986x - 0.0004$ ,  $R^2 = 0.9952$ ).

**Saponinas:** Se determinaron por el método de ácido sulfúrico-vainillina descrito por Hiai, Oura, y Nakajima (1976). En un tubo de ensayo se mezclaron 5  $\mu\text{L}$  del extracto, 95  $\mu\text{L}$  de agua, 1 mL de ácido sulfúrico concentrado y 100  $\mu\text{L}$  de una solución fresca de vainillina al 8 % (p/v) en etanol. Posteriormente, la mezcla se incubó a 60 °C durante 20 min y después se colocó en baño con hielo. La absorbancia se leyó a 544 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Evolution 300, Thermo Scientific). Como referencia, se obtuvo una curva estándar ( $y = 0.0033x + 0.0786$ ,  $R^2 = 0.9919$ ) con saponina de quillaja (Sigma Aldrich). Los resultados se expresaron en  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  MS.

**Triterpenos totales:** Se utilizó el método colorimétrico vainillina-ácido acético descrito por Fan y He (2006), con algunas modificaciones. A 0.5 mg de extracto se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de vainillina al 5 % (p/v) y 400  $\mu\text{L}$  de ácido perclórico; la mezcla se mantuvo a 60 °C durante 15 min. Los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se les adicionaron 2.5 mL de ácido acético. La absorbancia se obtuvo 550 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Evolution 300 Thermo Scientific). Los resultados se expresaron en  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  MS a partir de una curva estándar ( $y = 0.0125x - 0.0274$ ,  $R^2 = 0.9949$ ) preparada con ácido oleanólico (Sigma Aldrich).

### Análisis estadístico

El efecto de la estructura vegetal, quimiotipo y sistema de manejo se analizó como fuente de variación sobre la concentración de fitoquímicos en *V. planifolia*. Se evaluaron 20 tratamientos con nueve repeticiones de plantas distintas, con un total de 180 muestras. El diseño experimental empleado fue un arreglo factorial con tres factores (dos sistemas de manejo, dos

canonical correlation analysis was performed according to the PROC CANCORR procedure (SAS, 2002).

## Results and discussion

The average values obtained in the concentration of phytochemicals by management system, chemotype and plant structure showed high statistical significance ( $P \leq 0.0001$ ), with the exception of flavonoids in the management system (Table 2). The total phenolic compounds, total tannins, flavonoids, saponins and triterpenes showed coefficients of variation between 0.9 and 17.2 %, while the condensed and hydrolysable tannins were between 25.9 and 27.8 %, respectively. The above indicates consistency in the information with the statistical model used in biological systems, which allows having coefficients of variation greater than 20 %.

### Effect of the management system on phytochemicals

Within the management system factor, all phytochemicals showed significant statistical difference ( $P \leq 0.05$ ) in their concentration, except for flavonoids that showed no variation between management systems (Table 3). In the *acahual* system, with 60-70 % intercepted radiation, the vanilla tissues had a higher concentration of total phenolic

quimiotipos y cinco estructuras vegetales) (Statistical Analysis System [SAS], 2002) y la comparación de medias para cada fuente de variación se realizó mediante la prueba de Tukey (SAS, 2002). Además, con la finalidad de conocer la asociación entre variables ambientales y fitoquímicos (contenido y tipo), se realizó un análisis de correlaciones canónicas de acuerdo con el procedimiento PROC CANCORR (SAS, 2002).

## Resultados y discusión

Los valores promedio obtenidos en la concentración de fitoquímicos por sistema de manejo, quimiotipo y estructura vegetal mostraron significancia estadística alta ( $P \leq 0.0001$ ), con excepción de flavonoides en el sistema de manejo (Cuadro 2). Los compuestos fenólicos totales, taninos totales, flavonoides, saponinas y triterpenos presentaron coeficientes de variación entre 0.9 y 17.2 %; mientras que los taninos condensados e hidrolizables entre 25.9 y 27.8 %, respectivamente. Lo anterior indica consistencia en la información con el modelo estadístico empleado en sistemas biológicos, el cual permite tener coeficientes de variación superiores a 20 %.

### Efecto del sistema de manejo sobre los fitoquímicos

Dentro del factor sistema de manejo, todos los fitoquímicos presentaron diferencia estadística

**Table 2. Means, coefficients of variation and mean squares of secondary metabolites of *Vanilla planifolia* in the Totonacapan region, Mexico.**

**Cuadro 2. Medias, coeficientes de variación y cuadrados medios de metabolitos secundarios de *Vanilla planifolia* de la región del Totonacapan, México.**

Phytochemical/Fitoquímico	Mean (mg·g <sup>-1</sup> DM <sup>1</sup> )/ Media (mg·g <sup>-1</sup> MS <sup>1</sup> )	CV (%)	Mean squares / Cuadrados medios			
			Management system/ Sistema de manejo	Chemotype/ Quimiotipo	Plant structure/ Estructura vegetal	Error
Total phenolic compounds/ Compuestos fenólicos totales	14.70	14.204	0.337***	2.862***	3.285***	0.034
Total tannins/Taninos totales	3.06	17.283	0.094***	0.054***	0.040***	0.002
Hydrolysable tannins/ Taninos hidrolizables	1.85	27.806	0.046***	0.017***	0.015***	0.033
Condensed tannins/ Taninos condensados	1.21	25.914	0.024***	0.057***	0.052***	0.0009
Flavonoids/Flavonoides	7.45	16.502	0.008 <sup>ns</sup>	0.601***	0.0662***	0.015
Saponins/Saponinas	1.04	9.678	0.017***	0.087***	0.100***	0.0001
Total triterpenes/ Triterpenos totales	20.13	0.931	4.523***	4.145***	2.980***	0.0003

<sup>1</sup>DM: dry matter; CV: coefficient of variation; \*\*\*:  $P \leq 0.0001$ ; ns: not significant.

<sup>1</sup>MS: materia seca; CV: coeficiente de variación; \*\*\*:  $P \leq 0.0001$ ; ns: no significativo.

compounds, total tannins, hydrolysable tannins, condensed tannins and total triterpenes, while in shade mesh, with 30-45 % intercepted radiation, the concentration was only higher in saponins (Table 3), possibly because this condition favors the synthesis of steroidal saponins that are found almost exclusively in monocotyledonous plants (Sparg, Light, & van Staden, 2004), like vanilla. The difference in the concentration of phytochemicals between management systems could be due to particular environmental characteristics, such as temperature, relative humidity, elevation and luminosity (intercepted); even this last factor in some epiphytic species has a great impact on the production of phytochemicals (Cach-Pérez, Andrade, & Reyes-García, 2014).

significativa ( $P \leq 0.05$ ) en su concentración, a excepción de los flavonoides que no mostraron variación entre sistemas de manejo (Cuadro 3). En el sistema acahual, con una radiación interceptada de 60 a 70 %, los tejidos de vainilla tuvieron una concentración mayor de compuestos fenólicos totales, taninos totales, taninos hidrolizables, taninos condensados y triterpenos totales, mientras que en malla sombra, con una radiación interceptada de 30 a 45 %, la concentración solo fue mayor en saponinas (Cuadro 3), debido posiblemente a que esta condición favorece la síntesis de saponinas esteroidales que se encuentran casi exclusivamente en plantas monocotiledóneas (Sparg, Light, & van Staden, 2004), como la vainilla. La diferencia en la concentración de fitoquímicos entre sistemas de manejo podría

**Table 3. Average amount of phytochemicals in the management system, chemotype and plant tissue of *Vanilla planifolia* J. in the Totonacapan region, Mexico.**

**Cuadro 3. Promedio de fitoquímicos en sistema de manejo, quimiotipo y tejido vegetal de *Vanilla planifolia* J. de la región del Totonacapan, México.**

Factors/ Factores	Total phenolic compounds/ Compuestos fenólicos totales	Total tannins/ Taninos totales	Hydrolysable tannins/ Taninos hidrolizables	Condensed tannins/ Taninos condensados	Flavonoids/ Flavonoides	Saponins/ Saponinas	Total triterpenes/ Triterpenos totales
	(mg·g <sup>-1</sup> DM)/(mg·g <sup>-1</sup> MS)						
<b>Management system/ Sistema de manejo</b>							
Acahual	15.93 a <sup>2</sup>	3.41 a	2.06 a	1.34 a	7.37 a	0.90 b	21.57 a
Shade mesh/ Malla sombra	13.48 b	2.72 b	1.65 b	1.07 b	7.53 a	1.19 a	18.69 b
LSD/DMSH	0.84	0.21	0.18	0.14	0.58	0.12	0.87
<b>Chemotype/ Quimiotipo</b>							
QI	13.89 b	2.71 b	1.86 a	0.85 b	6.74 b	0.97 b	16.42 b
QVI	15.42 a	3.42 a	1.85 a	1.56 a	8.16 a	1.12 a	23.84 a
LSD/DMSH	0.94	0.21	0.18	0.14	0.58	0.12	0.87
<b>Plant tissue/ Tejido vegetal</b>							
Leaf/Hoja	10.01 c	3.84 a	1.63 bc	2.21 a	7.16 bc	0.52 c	14.86 d
Stem/Tallo	9.03 c	3.20 b	1.92 ab	1.28 b	4.51 d	0.33 c	16.68 cd
Flower/Flor	9.51 c	2.77 bc	1.47 c	1.29 b	6.46 c	0.05 d	17.43 c
Green fruit/ Fruto verde	21.50 b	3.05 b	2.01 ab	1.04 b	11.05 a	2.34 a	22.91 b
Cured fruit/ Fruto beneficiado	23.47 a	2.46 c	2.25 a	0.21 c	8.05 b	1.98 b	28.77 a
LSD/DMSH	1.88	0.46	0.4	0.32	1.29	0.27	1.94

<sup>2</sup>Means with the same letters within each column do not differ statistically (Tukey,  $P \leq 0.05$ ). LSD: least significant difference.

<sup>2</sup>Medias con letras iguales dentro de cada columna no difieren estadísticamente (Tukey,  $P \leq 0.05$ ). DMSH: diferencia mínima significativa honesta.



Although soil nutrient content is a critical factor in the physiological responses of most plants, in species of hemiepiphytic habits (as in vanilla) this is not the case, since this habit allows alternating the functioning of aerial roots and epiphytic habits when there is a nutritional or hydric stress factor, both temporal and spatial. In addition, a large number of species of the family Orchidaceae (*V. planifolia*) have mycorrhizae in their nutrition system that cushion changes in mineral disposition (Canestraro, Mora, & Watkins, 2014). Therefore, the soil as such only serves the host of the vanilla plants, which suggests that it had little influence on the production of phytochemicals.

### Effect of the chemotype on phytochemicals

The results of this study showed that even though the plant structures of both chemotypes had the same phytochemicals, the QVI chemotype showed a greater concentration of total phenolic compounds, total tannins, flavonoids, saponins and, especially, condensed tannins and total triterpenes, which on average had 84 and 45 % higher concentration levels compared to the QI chemotype (Table 3). In this regard, Herrera-Cabrera, Salazar-Rojas, Delgado-Alvarado, Campos-Contreras, and Cervantes-Vargas (2012) mention that the QVI chemotype has been one of the vanilla germplasm clones most cultivated and used by farmers of the Totonacapan region, while the QI chemotype has been little cultivated and is not of commercial interest.

The chemo-typological variation that exists in vanilla germplasm originated through a process of human selection, based on the aroma and uses that the Totonac producers have given it for more than 250 years (Delgado-Alvarado, Salazar-Rojas, & Herrera-Cabrera, 2014). The use of the QVI chemotype by farmers suggests that, in this material, the synthesis of secondary metabolites that allow the survival of the plant in natural environments and under cultivation is favored. This indicates that this chemotype is more sensitive to stress conditions, so it develops a greater defense mechanism than the QI chemotype.

The adaptive process in relation to secondary metabolites has been observed as a product of coevolution with the enemies of plants (Moore, Andrew, Külheim, & Foley, 2014). Although targeted, intense and permanent selection would force the quantitative variation of phytochemicals to deteriorate, many other selective forces intervene in these compounds, such as herbivores (Lankau, 2007), pathogens, competitors (Kliebenstein, Rowe, & Denby, 2005) and abiotic stresses (Burchard, Bilger, & Weissenböck, 2000).

deberse a las características ambientales particulares, como temperatura, humedad relativa, altitud y luminosidad (interceptada), incluso este último factor en algunas especies epifitas tiene gran influencia sobre la producción de fitoquímicos (Cach-Pérez, Andrade, & Reyes-García, 2014).

Si bien el contenido nutrimental del suelo es un factor crítico en las respuestas fisiológicas de la mayoría de las plantas, en las especies de hábitos hemiepipítos (como en la vainilla) no es así, ya que dicho hábito permite alternar el funcionamiento de raíces aéreas y hábitos epífitos cuando existe un factor de estrés nutricional o hídrico, tanto temporal como espacial. Además, un gran número de especies de la familia Orchidaceae (*V. planifolia*) presentan micorrizas en su sistema de nutrición que amortiguan los cambios en la disposición de minerales (Canestraro, Mora, & Watkins, 2014). Por lo anterior, el suelo como tal solo le sirve al tutor de las plantas de vainilla, lo que sugiere que tuvo poca influencia en la producción de fitoquímicos.

### Efecto del quimiotipo sobre los fitoquímicos

Los resultados de este estudio evidenciaron que, aun cuando las estructuras de las plantas de ambos quimiotipos presentaron los mismos fitoquímicos, el quimiotipo QVI mostró predominancia de compuestos fenólicos totales, taninos totales, flavonoides, saponinas y, especialmente, taninos condensados y triterpenos totales, que en promedio tuvieron 84 y 45 % más concentración respecto del quimiotipo QI (Cuadro 3). Al respecto, Herrera-Cabrera, Salazar-Rojas, Delgado-Alvarado, Campos-Contreras, y Cervantes-Vargas (2012) mencionan que el quimiotipo QVI ha sido uno de los clones del germoplasma de vainilla más cultivado y utilizado por los agricultores de la región del Totonacapan; en tanto que el quimiotipo QI se ha cultivado poco y no es de interés comercial.

La variación quimiotípica que existe en el germoplasma de vainilla se originó a través de un proceso de selección humana, basado en el aroma y usos que los productores totonacos le han dado por más de 250 años (Delgado-Alvarado, Salazar-Rojas, & Herrera-Cabrera, 2014). El uso del quimiotipo QVI por los agricultores sugiere que en este material se ve favorecida la síntesis de metabolitos secundarios que permiten la supervivencia de la planta en entornos naturales y bajo cultivo. Lo anterior indica que este quimiotipo es más sensible a las condiciones de estrés, por lo que desarrolla un mecanismo de defensa mayor que el quimiotipo QI.

El proceso adaptativo en relación con los metabolitos secundarios se ha observado como un producto de la coevolución con los enemigos de las plantas (Moore,

## Effect of plant tissue on phytochemicals

Within plant species, there is a wide variation in the concentration of phytochemicals in tissues depending on the structure of the plant (Tahvanainen, Niemelä, & Henttonen, 1991), which coincides with this study, where the concentration of metabolites was different in relation to the type of plant structure. For example, the leaf had the highest concentration of total tannins ( $3.84 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ DM}$ ) and condensed tannins ( $2.21 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ DM}$ ), while the cured fruits had the lowest concentration of these compounds (Table 3). Generally, these metabolites are found at high concentrations in leaves and stems because they serve as a defense against herbivores, since they have an astringent flavor that causes adverse effects (Provenza et al., 1990).

It was noteworthy that the hydrolysable tannins had the highest value in cured fruits ( $2.25 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ DM}$ ), although it did not differ statistically from those obtained in stem and green fruit (Table 3). It should be noted that the concentration of hydrolysable tannins was obtained by difference, and because it is a gravimetric method it could influence the observed trend (Makkar, 2003).

Although it has been reported that the most abundant tannins in plant tissues are the condensate ones, recently a high concentration of hydrolysable tannins was reported in fruits such as raspberry ( $3.26 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ), blueberry ( $2.7 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) and pomegranate ( $1.77 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ), among others (Smeriglio, Barreca, Bellico, & Trombetta, 2017). The amount of condensed tannins in vanilla tissues (stems, green fruits and cured ones) is valuable and important for their health effects (Olivas-Aguirre et al., 2015).

In green fruits, the highest amount of flavonoids ( $11.05 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ DM}$ ) was detected (Table 3). In orchid species such as *Phalaenopsis* spp., the concentration of flavonoids ranges from 1.7 (root) to  $4.98 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  (leaf) (Minh et al., 2016), which reveals that vanilla fruits have a significant amount of this phytochemical. However, in cured fruits the concentration of flavonoids was lower, since they are possibly thermosensitive and during curing they degrade (Liu, Wang, & Cai, 2015).

The highest concentration of saponins ( $2.34 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ DM}$ ) was also found in green fruits. Variations in the distribution, composition and amount of saponins in the plant may be due to the different needs they have to protect themselves. In *Phytolacca dodecandra* and *Dioscorea pseudojaponica*, during the development of the fruits and tubers, the maximum accumulation of saponins was observed, presumably to avoid loss and thus ensure the maturation of the seeds and the protection of the reproductive organs (Lin, Chen, Liu, & Yang, 2009; Ndamba, Lemmich, & Mølgaard, 1993). However, in some species the production of saponins

Andrew, Külheim, & Foley, 2014). A pesar de que la selección dirigida, intensa y permanente forzaría a deteriorar la variación cuantitativa de fitoquímicos, muchas otras fuerzas selectivas intervienen sobre estos compuestos, como herbívoros (Lankau, 2007), patógenos, competidores (Kliebenstein, Rowe, & Denby, 2005) y estreses abióticos (Burchard, Bilger, & Weissenböck, 2000).

## Efecto del tejido vegetal sobre los compuestos fitoquímicos

Dentro de las especies vegetales se ha mostrado una variación amplia en la concentración de fitoquímicos en los tejidos dependiendo de la estructura de la planta (Tahvanainen, Niemelä, & Henttonen, 1991), lo cual coincide con este estudio, donde la concentración de metabolitos fue diferente en relación con el tipo de estructura vegetal. Por ejemplo, la hoja tuvo la concentración más alta de taninos totales ( $3.84 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ MS}$ ) y taninos condensados ( $2.21 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ MS}$ ), mientras que los frutos beneficiados presentaron la concentración menor de estos compuestos (Cuadro 3). Generalmente, estos metabolitos se encuentran en concentraciones altas en hojas y tallos, debido a que sirven como defensa contra herbívoros, ya que proporcionan sabor astringente que causa hostilidad (Provenza et al., 1990).

Fue notable que los taninos hidrolizables presentaron el valor más alto en frutos beneficiados ( $2.25 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ MS}$ ), aunque no difirió estadísticamente de los obtenidos en tallo y fruto verde (Cuadro 3). Cabe destacar que la concentración de taninos hidrolizables se obtuvo por diferencia, y debido a que es un método gravimétrico pudo influir en la tendencia observada (Makkar, 2003).

Aunque se ha identificado que los taninos más abundantes en los tejidos vegetales son los condensados, recientemente se ha reportado una concentración alta de taninos hidrolizables en frutos como frambuesa ( $3.26 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ), zarzamora ( $2.7 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ), granada ( $1.77 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ), entre otros (Smeriglio, Barreca, Bellico, & Trombetta, 2017). La cantidad de taninos condensados que presentan los tejidos de vainilla (tallos, frutos verdes y beneficiados) es valiosa e importante por sus efectos en la salud (Olivas-Aguirre et al., 2015).

En frutos verdes se detectó la cantidad mayor de flavonoides ( $11.05 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ MS}$ ) (Cuadro 3). En especies de orquídeas como *Phalaenopsis* spp., la concentración de flavonoides es de 1.7 (raíz) a  $4.98 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  (hoja) (Minh et al., 2016), lo que revela que los frutos de vainilla tienen una cantidad importante de este fitoquímico. Sin embargo, en frutos beneficiados la concentración de flavonoides fue menor, ya que posiblemente son

was in response to biotic (herbivory or pathogen attack) or abiotic (moisture, light, lack of nutrients and temperature) stress (De Costa, Yendo, Fleck, Gosmann, & Fett-Neto, 2013).

Although in green fruits a concentration greater than 20 mg·g<sup>-1</sup> DM of total phenolic compounds and total triterpenes was detected, in cured fruit they were higher (23.47 mg·g<sup>-1</sup> and 28.77 mg·g<sup>-1</sup>, respectively) (Table 3). This is because during fruit curing a complex mixture originated due to the hydrolysis of the precursors (non-volatile glycosylated forms) of the aroma through the activity of the enzyme D-β-glucosidase, which converts them to their volatile forms (Odoux, 2000; Ranadive, 1992). In this way, in addition to vanillin (which is the most abundant compound, 10 to 20 mg·g<sup>-1</sup>), more than 200 components are produced, such as shikimate pathway derivatives, terpenes, furan derivatives, esters, aromatic acids, ketones, phenols, aldehydes, carbonyls and alcohols (Sinha, Sharma, & Sharma, 2008), which provide the flavor and aroma of vanilla.

#### Relationship between environmental and phytochemical variables

The analysis of canonical correlations identified a high correlation (0.91 and  $r^2 = 0.83$ ) between the environmental parameters and the phytochemical content in each management system. The most significant correlations were observed between elevation and the content of total triterpenes (-0.34218\*\*\*), total tannins (0.34036\*\*\*) and condensed tannins (-0.4246\*\*\*), as well as between relative humidity and condensed tannins (0.29691\*\*\*). The variables relative humidity and intercepted radiation did not show a significant correlation with the production of total phenolic compounds, saponins and total triterpenes (Table 4).

Figure 1 shows that the first two factors of the canonical correlation analysis explained 95.76 % of the total variance. In addition, it shows the structural correlation between environmental and phytochemical variables, where it was distinguished that at higher elevations (Ele) there is a lower content of total and condensed tannins, flavonoids and triterpenes.

#### Conclusions

The environmental condition of the management system affected the concentration of the phytochemicals evaluated, except for the flavonoids. The *acahual* system favored the accumulation of total phenolic compounds, total, hydrolysable and condensed tannins, and total triterpenes, while with shade mesh a higher concentration of saponins was obtained. The QVI chemotype showed a greater accumulation of total phenolic compounds, total and condensed tannins,

termosensibles y durante el beneficio se degradan (Liu, Wang, & Cai, 2015).

También en frutos verdes se presentó la concentración más alta de saponinas (2.34 mg·g<sup>-1</sup> MS). Las variaciones en la distribución, composición y cantidad de saponinas en la planta pueden deberse a las diferentes necesidades que tienen para protegerse. En *Phytolacca dodecandra* y *Dioscorea pseudojaponica*, durante el desarrollo de los frutos y tubérculos, se observó la acumulación máxima de saponinas, presumiblemente para evitar pérdida y así asegurar la maduración de las semillas y la protección de los órganos reproductivos (Lin, Chen, Liu, & Yang, 2009; Ndamba, Lemmich, & Mølgaard, 1993). No obstante, en algunas especies la producción de saponinas fue en respuesta al estrés biótico (herbivoría o ataque de patógenos) o abiótico (humedad, luz, falta de nutrientes y temperatura) (De Costa, Yendo, Fleck, Gosmann, & Fett-Neto, 2013).

Aun cuando en frutos verdes se detectó una concentración superior a 20 mg·g<sup>-1</sup> MS de compuestos fenólicos totales y triterpenos totales, en frutos beneficiados fueron superiores (23.47 mg·g<sup>-1</sup> y 28.77 mg·g<sup>-1</sup>, respectivamente) (Cuadro 3). Esto debido a que durante el beneficio de los frutos se forma una mezcla compleja originada por la hidrólisis de los precursores (formas glucosiladas no-volátiles) del aroma mediante la actividad de la enzima D-β-glucosidasa, la cual los convierte a sus formas volátiles (Odoux, 2000; Ranadive, 1992). De esta manera, además de la vainillina (que es el compuesto más abundante, 10 a 20 mg·g<sup>-1</sup>), se producen más de 200 componentes, como derivados de la ruta del shikimato, terpenos, derivados de furano, ésteres, ácidos aromáticos, cetonas, fenoles, aldehídos, carbonilos y alcoholes (Sinha, Sharma, & Sharma, 2008), que le proporcionan el sabor y aroma a la vainilla.

#### Relación entre variables ambientales y fitoquímicos

El análisis de correlaciones canónicas identificó una correlación alta (0.91 y  $r^2 = 0.83$ ) entre los parámetros ambientales y el contenido de fitoquímicos en cada sistema de manejo. Las correlaciones con mayor significancia se observaron entre altitud y el contenido de triterpenos totales (-0.34218\*\*\*), taninos totales (0.34036\*\*\*) y taninos condensados (-0.4246\*\*\*). Al igual que entre humedad relativa y taninos condensados (0.29691\*\*\*). Las variables humedad relativa y radiación interceptada no mostraron correlación significativa con la producción de compuestos fenólicos totales, saponinas y triterpenos totales (Cuadro 4).

En la Figura 1 se observa que los dos primeros factores del análisis de correlaciones canónicas explicaron 95.76 % de la varianza total. Además, se muestra la

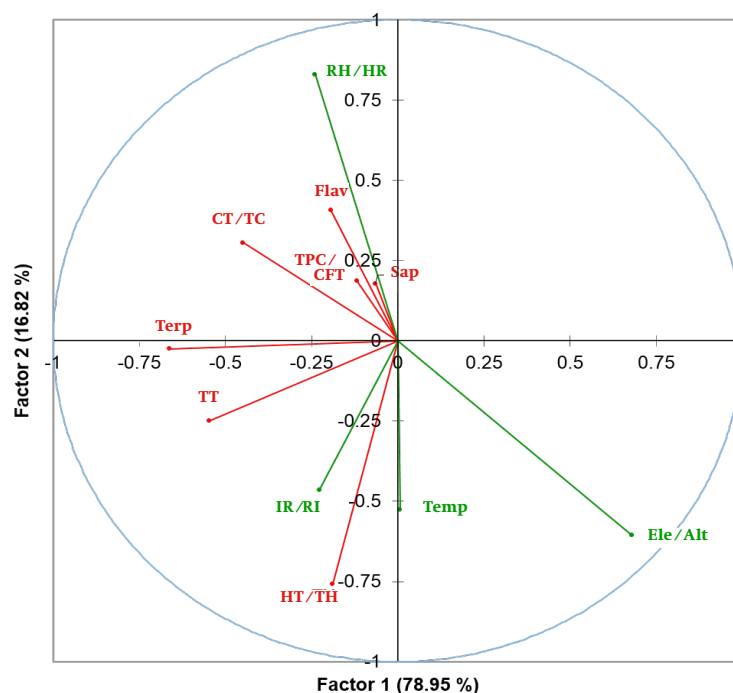
**Table 4. Matrix of correlation between phytochemical compounds and environmental variables in the cultivation of *Vanilla planifolia* in the Totonacapan region, Mexico.**

**Cuadro 4. Matriz de correlación entre compuestos fitoquímicos y variables ambientales en el cultivo de *Vanilla planifolia* en la región Totonacapan, México.**

Compounds / Compuestos	Elevation (masl) / Altitud (msnm)	Temperature (°C) / Temperatura (C°)	Relative Humidity (%) / Humedad relativa	Intercepted Radiation (%) / Radiación interceptada (%)
Total phenolic compounds / Compuestos fenólicos totales	-0.07604 <sup>ns</sup>	0.05792 <sup>ns</sup>	0.02879 <sup>ns</sup>	-0.09986 <sup>ns</sup>
Total tannins / Taninos totales	-0.34036 <sup>***</sup>	-0.0844 <sup>ns</sup>	0.11794 <sup>ns</sup>	0.2861 <sup>**</sup>
Hydrolysable tannins / Taninos hidrolizables	0.07534 <sup>ns</sup>	0.16938 <sup>*</sup>	-0.22449 <sup>**</sup>	0.1876 <sup>*</sup>
Condensed tannins / Taninos condensados	-0.4246 <sup>***</sup>	-0.22246 <sup>**</sup>	0.29691 <sup>***</sup>	0.1744 <sup>*</sup>
Flavonoids / Flavonoides	-0.22347 <sup>*</sup>	-0.07846 <sup>ns</sup>	0.17005 <sup>*</sup>	-0.02598 <sup>ns</sup>
Saponins / Saponinas	-0.04007 <sup>ns</sup>	0.02536 <sup>ns</sup>	0.05208 <sup>ns</sup>	-0.14604 <sup>ns</sup>
Total triterpenes / Triterpenos totales	-0.34218 <sup>***</sup>	0.13037 <sup>ns</sup>	0.05572 <sup>ns</sup>	0.02489 <sup>ns</sup>

Canonical correlation: 0.91 and  $r^2 = 0.83$ . \*\*\*:  $P < 0.001$  highly significant; \*\*:  $P < 0.01$  very significant; \*:  $P < 0.05$  significant; ns: not significant.

Correlación canónica: 0.91 y  $r^2 = 0.83$ . \*\*\*:  $P < 0.001$  altamente significativo; \*\*:  $P < 0.01$  muy significativo; \*:  $P < 0.05$  significativo; ns: no significativo.



**Figure 1. Graphical representation of the structural correlation coefficients of the first two factors in the interaction of environmental (■) and phytochemical (■) variables of *Vanilla planifolia* tissues. Elevation (Ele), temperature (Temp), relative humidity (RH), intercepted radiation (IR), total phenolic compounds (TPC), total tannins (TT), hydrolysable tannins (HT), condensed tannins (CT), flavonoids (Flav), saponins (Sap) and total triterpenes (Terp).**

**Figura 1. 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 planifolia*. Altitud (Alt), temperatura (Temp), humedad relativa (HR), radiación interceptada (RI), compuestos fenólicos totales (CFT), taninos totales (TT), taninos hidrolizables (TH), taninos condensados (TC), flavonoides (Flav), saponinas (Sap) y triterpenos totales (Terp).**



flavonoids, saponins and total triterpenes, with respect to the QI chemotype.

On the other hand, elevation was the environmental condition that had the greatest impact on the accumulation of metabolites in the plant structures of the vanilla, since it inversely affected the concentration of triterpenes, and total and condensed tannins, followed by intercepted radiation and relative humidity. The cured fruit showed the highest accumulation of total phenolic compounds, hydrolysable tannins and triterpenes, while leaf, stem, flower and green fruit had the highest values of total and condensed tannins. The flavonoids and saponins had their highest concentration in green fruits, followed by cured fruits.

### Acknowledgments

The authors thank the SAGARPA-CONACYT fund for the economic support received through project 2012-04-190442 entitled "Applied research strategy for the strengthening, innovation and competitiveness of vanilla in Mexico" (SP 14).

### End of English version

### References / Referencias

- Barrera-Rodríguez, A. I., Jaramillo-Villanueva, J. L., Escobedo-Garrido, J. S., & Herrera-Cabrera, B. E. (2011). Rentabilidad y competitividad de los sistemas de producción de vainilla (*Vanilla planifolia* J.) en la región del Totonacapan, México. *Agrociencia*, 45(5), 625-638. Retrieved from <http://www.colpos.mx/agrociencia/Bimestral/2011/jul-ago/art-8.pdf>
- Burchard, P., Bilger, W., & Weissenböck, G. (2000). Contribution of hydroxycinnamates and flavonoids to epidermal shielding of UV-A and UV-B radiation in developing rye primary leaves as assessed by ultraviolet-induced chlorophyll fluorescence measurements. *Plant, Cell & Environment*, 23(12), 1373-1380. doi: 10.1046/j.1365-3040.2000.00633.x
- Bythrow, J. D. (2005). Vanilla as a medicinal plant. *Seminars in integrative medicine*, 3(4), 129-131. doi: doi.org/10.1016/j.sigm.2006.03.001
- Cach-Pérez, M. J., Andrade, J. L., & Reyes-García, C. (2014). La susceptibilidad de la bromeliáceas epífitas al cambio climático. *Botanical Sciences*, 92(2), 157-168. doi: 10.17129/botsci.55
- Canestraro, B. K., Moran, R. C., & Watkins, J. E. (2014). Reproductive and physiological ecology of climbing and terrestrial *Polybotrya* (Dryopteridaceae) at the La Selva Biological Station, Costa Rica. *International Journal of Plant Sciences*, 175(4), 432-441. doi: 10.1086/675576

correlación estructural entre las variables ambientales y los fitoquímicos, donde se distinguió que a mayor altitud (Alt), menor contenido de taninos totales y condensados, flavonoides y triterpenos.

### Conclusiones

La condición ambiental del sistema de manejo afectó la concentración de los fitoquímicos evaluados, excepto la de flavonoides. El sistema acahual favoreció la acumulación de compuestos fenólicos totales, taninos totales, hidrolizables y condensados, y triterpenos totales; mientras que con malla sombra se obtuvo mayor concentración de saponinas. El quimiotipo QVI mostró mayor acumulación de compuestos fenólicos totales, taninos totales y condensados, flavonoides, saponinas y triterpenos totales, respecto del quimiotipo QI.

Por otro lado, la altitud fue la condición ambiental que tuvo un impacto mayor en la acumulación de metabolitos en las estructuras vegetales de la vainilla, ya que afectó inversamente la concentración de triterpenos, y taninos totales y condensados, seguido de la radiación interceptada y humedad relativa. El fruto beneficiado mostró la acumulación mayor de compuestos fenólicos totales, taninos hidrolizables y triterpenos. Por su parte, la hoja, tallo, flor y fruto verde presentaron los valores más altos de taninos totales y condensados. Los flavonoides y saponinas tuvieron su mayor concentración en frutos verdes, seguido de frutos beneficiados.

### Agradecimientos

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

### Fin de la versión en español

- Chang, C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 176-182. Retrieved from <https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html?id=56e7bc5d40485449e6223f71&assetKey=AS%3A339806593798145%401458027613155>
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). (2012). Portal de Geoinformación. Sistema Nacional De Información Sobre Biodiversidad. México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la biodiversidad. Retrieved from <http://www.conabio.gob.mx/informacion/gis/>
- De Costa, F., Yendo, A. C., Fleck, J. D., Gosmann, G., & Fett-Neto, A. G. (2013). Accumulation of a bioactive

- triterpene saponin fraction of *Quillaja brasiliensis* leaves is associated with abiotic and biotic stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 66, 56-62. doi: 10.1016/j.plaphy.2013.02.003
- Delgado-Alvarado, A., Salazar-Rojas, V. M., & Herrera-Cabrera B. E. (2014). Polimorfismo químico de componentes del aroma en germoplasma de *Vanilla* spp de la región del Totonacapan, Puebla-Veracruz, México. In: Araya-Fernández, C., Cordero-Solórzano, R., Paniagua-Vásquez, A., & Azofeifa-Bolaños, J. B. (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](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/168849/I_Seminario_Internacional_de_Vainilla.pdf)
- Fan, J. P., & He, C. H. (2006). Simultaneous quantification of three major bioactive triterpene acids in the leaves of *Diospyros kaki* by high-performance liquid chromatography method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(3), 950-956. doi: 10.1016/j.jpba.2006.01.044
- Ferguson, L. R. (1994). Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 307(1), 395-410. doi: 10.1016/0027-5107(94)90313-1
- García-Ferrer, L., Bolaños-Aguilar, D., Lagunes-Espinoza, L. C., Ramos-Juárez, J., & Osorio-Arce, M. M. (2016). Concentración de compuestos fenólicos en fabáceas forrajeras tropicales en edad diferente del rebrote. *Agrociencia*, 50(4), 429-440. Retrieved from <https://www.colpos.mx/agrocien/Bimestral/2016/may-jun/art-4.pdf>
- Gross, M., Lewinsohn, E., Tadmor, Y., Bar, E., Dudai, N., Cohen, Y., & Friedma, J. (2009). The inheritance of volatile phenylpropenes in bitter fennel (*Foeniculum vulgare* Mill. var. *vulgare* Apiaceae) chemotypes and their distribution within the plant. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37(4), 308-316. doi: 10.1016/j.bse.2009.05.007
- Gurnani, N., Kapoor, N., Mehta, D., Gupta, M., & Mehta, B. K. (2014). Characterization of chemical groups and identification of novel volatile constituents in organic solvent extracts of cured Indian Vanilla beans by GC-MS. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 22(5), 769-776. doi: 10.5829/idosi.mejsr.2014.22.05.21935
- Herrera-Cabrera, B. E., Hernández-Ruiz, J., & Delgado-Alvarado, A. (2016). Variación de aroma en *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews silvestre y cultivada. *Agroproductividad*, 9(1), 10-17. Retrieved from [http://www.colpos.mx/wb\\_pdf/Agroproductividad/2016/AGROPRODUCTIVIDAD\\_I\\_2016.pdf](http://www.colpos.mx/wb_pdf/Agroproductividad/2016/AGROPRODUCTIVIDAD_I_2016.pdf)
- Herrera-Cabrera, B. E., Salazar-Rojas, V. M., Delgado-Alvarado, A., Campos-Contreras, J., & Cervantes-Vargas, J. (2012). Use and conservation of *Vanilla planifolia* J. in the Totonacapan Region, México. *European Journal of Environmental Sciences*, 2(1), 43-50. Retrieved from <http://ejes.cz/index.php/ejes/article/view/78>.
- Hiai, S., Oura, H., & Nakajima, T. (1976). Color reaction of some sapogenins and saponins with vanillin and sulfuric acid. *Planta Medica*, 29(2), 116-122. doi: 10.1055/s-0028-1097639
- Kliebenstein, D. J., Rowe, H. C., & Denby, K. J. (2005). Secondary metabolites influence *Arabidopsis/Botrytis* interactions: variation in host production and pathogen susceptibility. *The Plant Journal*, 44(1), 25-36. doi: 10.1111/j.1365-3113.2005.02508.x
- Lankau, R. A. (2007). Specialist and generalist herbivores exert opposing selection on a chemical defense. *New Phytologist*, 175(1), 176-184. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02090.x
- Lin, J. T., Chen, S. L., Liu, S. C., & Yang, D. J. (2009). Effect of harvest time on saponins in Yam (*Dioscorea pseudojaponica* Yamamoto). *Journal of Food and Drug Analysis*, 7(2), 116-122. Retrieved from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20093159747>
- Liu, Y., Wang, H., & Cai, X. (2015). Optimization of the extraction of total flavonoids from *Scutellaria baicalensis* Georgi using the response surface methodology. *Journal of Food Science and Technology*, 52(4), 2336-2343. doi: 10.1007/s13197-014-1275-0
- Makkar, H. P. S. (2003). *Quantification of tannins in tree and shrub foliage: A laboratory manual* (pp. 9-10). Dordrecht: Springer Netherlands. doi: 10.1007/978-94-017-0273-7
- Makkar, H. P. S., Blüemmel, M., Borowy, N. K., & Becker, K. (1993). Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 61(2), 161-165. doi: 10.1002/jsfa.2740610205
- Minh, T. N., Khang, D. T., Tuyen, P. T., Minh, L. T., Anh, L. H., Quan, N. V., ... Xuan, T. D. (2016). Phenolic compounds and antioxidant activity of *Phalaenopsis* orchid hybrids. *Antioxidants*, 5(3), 1-12. doi: 10.3390/antiox5030031
- Moore, B. D., Andrew, R. L., Külheim, C., & Foley, W. J. (2014). Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. *New Phytologist*, 201(3), 733-750. doi: 10.1111/nph.12526
- Ndamba, J., Lemmich, E., & Mølgaard, P. (1993). Investigation of the diurnal, ontogenetic and seasonal variation in the molluscicidal saponin content of *Phytolacca dodecandra* aqueous berry extracts. *Phytochemistry*, 35(1), 95-99. doi: 10.1016/S0031-9422(00)90515-6
- Odoux, É. (2000). Changes in vanillin and glucovanillin concentrations during the various stages of the process traditionally used for curing *Vanilla fragrans* beans in Réunion. *Fruits*, 55(2), 119-125. Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=704165>
- Olivas-Aguirre, F. J., Wall-Medrano, A., González-Aguilar, G. A., López-Díaz, J. A., Álvarez-Parrilla, E., de la Rosa, L., & Ramos-Jiménez, A. (2015). Taninos hidrolizables: bioquímica, aspectos nutricionales y analíticos y efectos en la salud. *Nutrición Hospitalaria*, 31(1), 55-66. doi: 10.3305/nh.2015.31.1.7699

- Palama, T. L., Fock, I., Choi, Y. H., Verpoorte, R., & Kodja, H. (2010). Biological variation of *Vanilla planifolia* leaf metabolome. *Phytochemistry*, 71(5), 567-573. doi: 10.1016/j.phytochem.2009.12.011
- Porter, L. J., Hrstich, L. N., & Chan, B. G. (1986). The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry*, 25(1), 223-230. doi: 10.1016/S0031-9422(00)94533-3
- Provenza, F. D., Burritt, E. A., Clausen, T. P., Bryant, J. P., Reichardt, P. B., & Distel, R. A. (1990). Conditioned flavor aversion: A mechanism for goats to avoid condensed tannins in blackbush. *The American Naturalist*, 136(6), 810-828. doi: 10.1086/285133
- Ranadive, A. S. (1992). Vanillin and related flavor compounds in vanilla extract made from beans of various global origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(10), 1922-1924. doi: 10.1021/jf00022a039
- Salazar-Rojas, V. M., Herrera-Cabrera, B. E., 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(5), 875-887. doi: 10.1007/s10722-011-9729-y
- Shanmugavalli, N., Umashankar, V., & Raheem, A. (2009). Antimicrobial activity of *Vanilla planifolia*. *Indian Journal of Science and Technology*, 2(3), 37-40. Retrieved from <http://www.indjst.org/index.php/indjst/article/view/29411/25419>
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158. Retrieved from <http://www.ajevonline.org/content/16/3/144>
- Sinha, A. K., Sharma, U. K., & Sharma, N. (2008). A comprehensive review on vanilla flavor: extraction, isolation and quantification of vanillin and others constituents. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 59(4), 299-326. doi: 10.1080/09687630701539350
- Smeriglio, A., Barreca, D., Belloco, E., & Trombetta, D. (2017). Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects. *British Journal of Pharmacology*, 174(11), 1244-1262. doi: 10.1111/bph.13630
- Sparg, S. G., Light, M. E., & van Staden, J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*, 94, 219-243. doi: 10.1016/j.jep.2004.05.016
- Statistical Analysis System (SAS). (2002). *Statistical Analysis Software version 9.0*. United States of America: SAS Institute Inc. North Caroline.
- Tahvanainen, J., Niemelä, P., & Henttonen, H. (1991). Chemical aspects of herbivory in boreal forest-feeding by small rodents, hares and crevils. In: Palo, R. T., & Robbins, C. T. (Eds.), *Plant Defenses against Mammalian Herbivory* (pp. 115-131). United States of America: CRC Press.
- 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(2), 170-177. doi: 10.1016/j.bbagen.2010.11.004
- Tamura, H., Hata, Y., & Chida, M. (2010). Aroma profile of vanilla in bourbon beans. In: Ho, C. T., Mussinan, C. J., Shahidi, F., & Tratas, E. (Eds.), *Recent Advances in Food and Flavor Chemistry* (pp.139-140). Cambridge, United Kingdom: Ed. RSC Publishing.
- 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. Retrieved from <http://132.248.9.34/hevila/Agroproductividad/2016/vol9/no1/8.pdf>

