

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CONTRIBUCIÓN AL CONOCIMIENTO TAXONÓMICO  
DEL GÉNERO *CALOPHYLLUM* (GUTTIFERAE):  
QUIMIOTIPOS DE *C. REKOI* STANDL. Y  
*C. BRASILIENSE* CAMBESS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

P R E S E N T A

**IRMA SUSTAITA ARANDA**

DIRECTOR DE TESIS:  
DR. RICARDO REYES CHILPA

MÉXICO, D. F.

2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Hoja de Datos del Jurado

### 1. Datos del alumno

Sustaita  
Aranda  
Irma  
54217224  
Universidad Nacional Autonoma de México  
Facultad de Ciencias  
080142944

### 2. Datos del Tutor

Dr  
Ricardo  
Reyes  
Chilpa

### 3. Datos del sinodal 1

Dra  
María Cristina  
Perez Amador  
Barron

### 4. Datos del sinodal 2

Dr  
Fernando  
Chiang  
Cabrera

### 5. Datos del sinodal 3

Dr  
Mariano  
Martinez  
Vazquez

### 6. Datos del sinodal 4

M en C  
Lucio  
Lozada  
Perez

### 7. Datos del trabajo escrito

Contribucion al conocimiento taxonomico del genero *Calophyllum* (Guttiferae):  
Quimiotipos de *C rekoii* Standl y *C brasiliense* Cambess  
80 p  
2007

## AGRADECIMIENTOS

Antes que nada deseo agradecer al Dr. Mario Sousa, curador del herbario MEXU, por su buena disposición y su actitud siempre amable.

Agradezco a mis sinodales:

Dr. Ricardo Reyes Chilpa  
Dra. Ma. Cristina Pérez Amador Barrón (de la Facultad de Ciencias, UNAM)  
Dr. Fernando Chiang Cabrera (del Instituto de Biología, UNAM)  
Dr. Mariano Martínez Vázquez (del Instituto de Química, UNAM)  
M. en C. Lucio Lozada Pérez (de la Facultad de Ciencias, UNAM)

Agradezco también la revisión y observaciones de:

Dra. Ma. Cristina Pérez Amador Barrón (de la Facultad de Ciencias, UNAM)  
Dr. Fernando Chiang Cabrera (del Instituto de Biología, UNAM)  
Dr. Mariano Martínez Vázquez (del Instituto de Química, UNAM)  
M. en C. Lucio Lozada Pérez (de la Facultad de Ciencias, UNAM)  
Dra. Hilda Araceli Zavaleta Mancera (del Colegio de Posgraduados de Chapingo)  
M. en C. Ana Lidia Pérez Castorena (del Instituto de Química, UNAM)  
M. en C. Elizabeth Estrada Muñiz (del Cinvestav, Instituto Politécnico)  
Dr. Manuel Jiménez Estrada (del Instituto de Química, UNAM)

Agradezco la amistad y apoyo de:

Dr. Alfonso Gil Magos Guerrero (de la Facultad de Medicina, UNAM)  
Dra. Hilda Araceli Zavaleta Mancera (del Colegio de Posgraduados de Chapingo)  
Dr. Mariano Martínez Vázquez (del Instituto de Química, UNAM)  
Dra. Lucy Ibáñez Vázquez (de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú)  
M. en C. Mariana Domínguez López (del Instituto de Química, UNAM)  
M. en C. Rosario Ruíz (del Instituto de Química, UNAM)  
Así como de Lizbeth, Estrella y la jamaiquina Tajan (del Instituto de Química, UNAM)

Agradezco al personal del Instituto de Biología, del Instituto de Química y del Instituto de Geografía por su ayuda, así como a toda la gente que de una o de otra manera contribuyó a la realización de esta tesis.

Agradezco a mis amigos y familiares de quienes he recibido un apoyo gigantesco, sin el cual no hubiera podido llevar a cabo esta investigación. Agradezco la luz, el amor y la sabiduría que he recibido de mis hijos Fany, Puki y Oliver, a los que bien podría considerar “niños avatares”

Agradezco a los profesores y a todos aquellos que han estimulado y alentado mi desarrollo intelectual.

Agradezco a quienes han sido el motivo para que iniciara, y finalmente pudiera terminar esta investigación, a pesar de todos los obstáculos que aparecieron en el camino: Miguel Ángel López Aguilar, Alfonso Torres del Río y Santiago Miguel Hernández López.

Por último agradezco al *deva* “María” o “sakbalamté” por las lecciones sobre la luz y la oscuridad, y al Dr. Blas Pablo Reko por mostrarme el camino mágico de la mitología y la filología.

DEDICO ESTA TESIS A MIS AMADOS HIJOS:

FANY, PUKI Y OLIVER

## ÍNDICE DE CONTENIDO.

ANTECEDENTES p. 1

TAXONOMÍA DE *CALOPHYLLUM* p. 1

Historia taxonómica de *Calophyllum* p. 1

Morfología foliar de *Calophyllum* p. 6

QUÍMICA DE *CALOPHYLLUM* p. 8

Historia química de *Calophyllum* p. 8

Relación biogenética entre cumarinas y cromanonas p.10

Quimiotipos de *Calophyllum* p. 12

Técnicas del análisis quimiosistemático p.18

MATERIALES Y MÉTODOS p. 20

ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA p. 20

ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA FOLIAR p. 21

ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LOS PC p.21

RESULTADOS p.22

PATRONES MORFOLÓGICOS FOLIARES (PMF) p. 22

PATRONES CROMATOGRÁFICOS (PC) p. 28

DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LOS PC p. 31

DISCUSIÓN p.38

CONCLUSIONES p.46

APÉNDICES p.47

REFERENCIAS p.78

## RESUMEN.

En un intento por dilucidar la jerarquía del taxón México-centroamericano *Calophyllum rekoii* Standl. (Guttiferae) y determinar si es, o no, una variedad de *C. brasiliense* Cambess., se estudiaron 99 especímenes de herbario. El estudio consistió en la comparación de la morfología foliar de dichos especímenes y su análisis por cromatografía en capa fina. Los resultados obtenidos son los siguientes:

Se identificaron cuatro patrones morfológicos foliares (PMF), dos pertenecientes a *C. rekoii* (PMF rekoii 1 y PMF rekoii 2) y dos a *C. brasiliense* (PMF brasiliense 1 y PMF brasiliense 2). EL PMF rekoii 2 presenta variaciones que se agrupan en las siguientes submorfologías PMF rekoii 2 a, PMF rekoii 2 b, PMF rekoii 2 c, y PMF rekoii 2 d.

Se encontraron cinco patrones cromatográficos (PC) en *C. rekoii* (PC rekoii 1, PC rekoii 2 (a y b), PC rekoii 3, PC rekoii 4 y PC rekoii 5), y sólo dos en *C. brasiliense* (PC brasiliense 1 y PC brasiliense 2).

Los resultados obtenidos indican que, de acuerdo con los criterios morfológicos de las hojas de *Calophyllum* (D'Arcy & Keating, 1979; Stevens, 1980), *C. rekoii* podría ser una especie diferente de *C. brasiliense*. Sin embargo, el análisis de los PC parece indicar que no existen diferencias notables entre los compuestos de estas dos especies.

Respecto a las variaciones encontradas dentro de *C. rekoii*, tanto el análisis de los PMF, como el de los PC, indican la existencia de dos taxa. Es decir, que el taxón México-centroamericano estaría formado por dos especies, una de ellas con variedades.

## INTRODUCCIÓN

Para poder estudiar de una manera ágil y eficiente a las poblaciones de seres vivos es necesario contar con una base sistemática sólida. Una clasificación incompleta, imprecisa y ambigua de los organismos entorpece el avance de las investigaciones. Muchas de las clasificaciones vegetales que se usan actualmente son obsoletas; pues se hicieron a principios del siglo pasado y desde entonces no han sido examinadas críticamente (Jones Jr., 1988).

El género *Calophyllum*, constituido por árboles tropicales, es un miembro de la familia Guttiferae. Este género, aunque posee importancia económica, pues la mayoría de sus especies son maderables, ha sido poco estudiado. Sin embargo, recientemente ha recibido gran atención, ya que se ha descubierto que algunas de sus especies poseen compuestos que actúan contra el VIH, causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Estrada, 2001; Reyes *et al.*, 2004; Huerta *et al.*, 2004)

Al profundizar en el estudio de tales sustancias, se ha puesto en evidencia el escaso conocimiento que se tiene de las especies de este taxón, especialmente de las americanas. En las especies del Viejo Mundo, Stevens (1980) ha realizado una excelente labor sistemática, sin embargo; las especies del Nuevo Mundo, nunca han sido revisadas plenamente.

En la actualidad, la clasificación de *Calophyllum* en América se basa en una revisión de Standley (1932). Este autor reconoce muy pocas especies y considera como variedades de la especie brasileña *Calophyllum brasiliense* a los taxa de México-Centroamérica y las Antillas. Sin embargo, D'Arcy & Keating (1979), después de estudiar la anatomía foliar de varias especies de *Calophyllum*, declaran que los taxa considerados como variedades por Standley, son en realidad especies.

El objetivo de la presente investigación es, en primer lugar, presentar evidencias de que *C. rekoi* es una especie y no una variedad de *C. brasiliense* y promover la revisión del género *Calophyllum* en América. Como objetivo secundario, se busca estudiar la diversidad química y morfológica foliar del taxón México-centroamericano de *Calophyllum*, para determinar si en él pueden reconocerse dos especies diferentes.



# ANTECEDENTES

## Taxonomía de *Calophyllum*

### HISTORIA TAXONÓMICA DEL GÉNERO *CALOPHYLLUM*

El género *Calophyllum* es complejo y difícil de clasificar. Todos los taxónomos que lo han estudiado hablan de la confusión y la frustración que experimentan al tratar de diferenciar sus especies, ya que parece imposible establecer límites definitivos entre ellas. Standley (1932), refiriéndose a *Calophyllum rekoii* dice:

Es posible que el estudio de una mayor cantidad de ejemplares provenientes de México y Centroamérica esclarezca la relación de todas estas variantes y permita separar algunas de ellas específicamente. Sin embargo, sospecho que el material adicional meramente complicará la materia y enfatizará la futilidad de un intento de separación.

Por su parte, Vesque en 1893, dice acerca de *Calophyllum pentapetalum* (una especie del oeste de Malasia): "...sería necesario tener el valor de realizar la fusión y distinguir simplemente variedades." (Citado por Stevens, 1980).

Según Stevens (1980), el género *Calophyllum* agrupa alrededor de 187 especies; 179 en el Viejo Mundo, principalmente en Indo-Malasia y sólo 8 en el Nuevo Mundo, desde México hasta Argentina y el Caribe. La mayoría de las especies son árboles de tamaño mediano, aunque hay algunos muy altos y otros son arbustos. El bosque lluvioso húmedo tropical de las tierras bajas es el hábitat de la mayoría de las especies; pero algunas se encuentran en lugares más secos o a mayores altitudes, y muchas en zonas inundadas. Las características principales del género son: corteza fisurada en forma de diamante, látex generalmente amarillo; hojas decusadas, pecioladas, enteras, coriáceas, con venas laterales paralelas, muy juntas; inflorescencias terminales o axilares, con flores por lo común hermafroditas; fruto drupáceo; pelos bizarros; enorme variación en plántulas y juveniles; presencia de taninos, gran diversidad de xantonas y cumarinas y ausencia completa de alcaloides (Stevens, 1980).

### *Calophyllum* en el Viejo Mundo

En 1753, Linneo menciona por primera vez a *Calophyllum* en su obra *Species Plantarum*. Más de medio siglo después, Willdenow (1811) revisa algunas especies del género, pero es Choisy (1849), quien emprende una revisión más amplia; sin embargo, la clasificación de este autor es confusa (Stevens, 1980). Algunos años después Planchon et Triana (1862) revisan los géneros estudiados por Choisy, tratando de aclarar la confusión existente y reconocen un total de 29 especies en el Viejo Mundo (nueve de las cuales son descritas por ellos). Pasan casi 30 años antes de que vuelva a intentarse otra revisión, esta es realizada por Vesque (1889), quien además proporciona detalladas descripciones de la lámina foliar. Él divide a las especies del Viejo Mundo en cuatro secciones: *Inophyllum* Vesque, *Microphyllum* Vesque, *Apetalum* Vesque e *Hipodermata* Vesque; y reconoce 35 especies y además 17 especies adicionales que no incluye en las secciones mencionadas (Stevens, 1980).

Casi un siglo después las especies del Viejo Mundo vuelven a ser examinadas por Stevens (1980). Este autor, quien realiza una excelente y colosal labor taxonómica, estudia 7000 ejemplares de herbario. Él describe 69 especies; reconoce la existencia de 179 especies en el Viejo Mundo (12 de ellas con variedades); y no valida los taxa supraespecíficos propuestos por Vesque.

Por último, las revisiones locales del género en el Viejo Mundo fueron hechas por los siguiente autores: *Madagascar*: Perrier de la Bâtie (1951); *India y Sri Lanka*: Wight (1839), 1840), Thwaites (1858), Anderson y Hooker (1874), Maheshwari (1960); *Sudeste de Asia*: Pierre (1885), Pitard (1910); Gagnepain (1940); *Malasia*: Miquel (1854, 1859, 1861), Henderson y Wyatt-Smith (1956), Whitmore (1973); *Papuasias*: Stevens (1974); *Pacífico sur*: Smith y Darwin (1974) (Stevens, 1980).

### ***Calophyllum* en el Nuevo Mundo**

Se considera que la cantidad de especies de *Calophyllum* en América es mucho menor que en el Viejo Mundo (Stevens, 1980). El cuadro 1 muestra las especies que han sido descritas en el Nuevo Mundo, ordenadas según la fecha de su descripción. Aunque ahí aparecen 18 especies, el número es menor, pues varios de esos nombres son sinónimos. En la presente investigación se considera, como lo hacen D'Arcy & Keating (1979), que en América existe cuatro especies principales (según los siguientes criterios: la amplitud de su distribución, la información que existe sobre ellas en internet, y su importancia histórica). Esas especies son: *C. calaba*, *C. longifolium*, *C. reko*i y *C. brasiliense*. *C. calaba* se extiende por todas las Antillas; *C. longifolium* se encuentra principalmente en Panamá; *C. brasiliense* se localiza en Brasil, mientras que *C. reko*i se extiende desde el sur de México hasta Costa Rica (D'Arcy & Keating, 1979, Standley, 1932). Las especies menos conocidas, cuya información es escasa, o casi nula son: *C. lucidum*, *C. mariae*, *C. angulare*, *C. nubicola*, *C. piaroanum*, *C. ellipticum* y *C. brasiliense* var. *elongatum*.

**Cuadro 1.** Listado de las especies descritas en el Nuevo Mundo, ordenadas según la fecha de su descripción (Standley, 1932; D'Arcy & Keating, 1979; Castillo & Gil, 1991; García, 1992; MOBOT).

ESPECIE	DESCRITA POR:	AÑO	LOCALIDAD DE COLECTA DEL ESPÉCIMEN TIPO
<i>C. calaba</i> L.	Karl von Linneo	1753	Es un protólogo con un ejemplar de las Antillas.
<i>C. calaba</i> Jacq.	Nicolai Josephy Jacquin	1763	No hay espécimen tipo
<i>C. longifolium</i> Willd.	C. L. Willdenow	1811	Perú
<i>C. brasiliense</i> Cambess.	Jacobo Cambessedes	1827	Brasil, Espiritu Santo
<i>C. lucidum</i> Benth.	George Bentham	1843	Guyana
<i>C. mariae</i> Planch. & Triana	Jules Emile Planchon y José Jerónimo Triana	1861	Colombia
<i>C. brasiliense</i> var. <i>elongatum</i> Engl.	Adolf Engler	1863	Brasil
<i>C. brasiliense</i> subsp. <i>longifolium</i> (Willd.) Vesque	Julien Vesque	1893	Desconocida
<i>C. reko</i> i Standl.	Paul Carpenter Standley	1919	México, Oaxaca
<i>C. chiapense</i> Standl.	Paul Carpenter Standley	1919	México, Chiapas
<i>C. antillanum</i> Britton	J. Britton	1924	No hay espécimen tipo

<i>C. jacquinii</i> Fawc. & Rendle	W. Fawcett y A. B. Rendle	1926	Jamaica
<i>C. ellipticum</i> Rusby	H. H. Rusby	1927	Bolivia, Beni
<i>C. brasiliense</i> Cambess. var. <i>rekoi</i> Standl.	Paul Carpenter Standley	1932	No hay espécimen tipo
<i>C. brasiliense</i> Cambess. var. <i>antillanum</i> Britton	Paul Carpenter Standley	1932	No hay espécimen tipo
<i>C. angulare</i> A. C. Sm.	A. C. Smith	1933	Brasil, Matto Grosso
<i>C. nubicola</i> D'Arcy & Keating	W. G. D'Arcy y R. C. Keating	1979	Panamá
<i>C. piaroanum</i> A. Castillo & C. Gil	Anibal Castillo y Celia Gil	1991	Venezuela

Como ya se mencionó, en el cuadro anterior aparecen 18 especies; sin embargo, el número es menor, pues varios nombres son sinónimos. La mayoría de esos sinónimos corresponden al taxón antillano *Calophyllum calaba*: *C. calaba* L., *C. calaba* Jacq., *C. jacquinii* Fawc. & Rendle, *C. antillanum* Britton, *C. brasiliense* Cambess. var. *antillanum* (Britton) (Howard, 1962; D'Arcy & Keating, 1979; MOBOT). Actualmente, en el último de los nombres se ha cambiado el término *antillanum* por *antilliense* (MOBOT).

El conocimiento taxonómico de las especies *Calophyllum* se inicia al mismo tiempo en el Viejo y en el Nuevo Mundo. Linneo (1753) incluyó dos especies de *Calophyllum* en la primera edición de *Species Plantarum*, esas especies eran *C. inophyllum* y *C. calaba*. Pero el último de estos taxa no estaba representado por un tipo nomenclatural, sino por un protólogo formado por tres especies: una de ellas originaria de India, otra de Sri Lanka y la tercera, de las Antillas. (Stevens, 1980; D'Arcy & Keating, 1979; Howard, 1962). Esta confusión de nombres es la que produce los subsiguientes sinónimos de la especie antillana, al tratar de diferenciarla de la especie de Sri Lanka, a la que se le asigna oficialmente el nombre *C. calaba* L. Aunque, al parecer, el epíteto específico “*calaba*” era de origen antillano (Stevens, 1980).

*Calophyllum calaba* es la primera especie americana de *Calophyllum* que se describe (*C. calaba* L., 1753; *C. calaba* Jacq., 1763). La segunda es *C. longifolium* (1811); la tercera *C. brasiliense* (1827) y la cuarta *C. lucidum* (1843). Estas especies se describen antes de que Planchon & Triana (1862) y Vesque (1889) publique su revisión de las especies del Viejo Mundo. En la taxonomía de las especies americanas tales botánicos ejercen poca influencia. Planchon & Triana describen, en 1893, sólo una especie: *C. mariae*, mientras que Vesque reduce a subespecie de *C. brasiliense* a la especie panameña *C. longifolium*; aunque, según D'Arcy & Keating, eso se debió a una confusión de ejemplares (D'Arcy & Keating 1979). Al parecer, Vesque también dividió en subespecies a la especie brasileña *C. brasiliense*, como puede verse en el siguiente nombre: *C. brasiliense* subsp. *verum* var. *α genuina* (D'Arcy & Keating, 1979); sin embargo, actualmente ya no se mencionan dichas subespecies. Por último, Vesque no aplica a las especies americanas la división en taxa supraespecíficos que usa para las especies del Viejo Mundo.

El siguiente botánico que revisa el género *Calophyllum* en América es Paul Carpenter Standley, un especialista en la flora centroamericana. Antes de él sólo se habían estudiado los taxa de Sudamérica y Panamá. Standley (1919) describe primero dos especies: *C.*

*rekoi* y *C. chiapense*, pero posteriormente, las reduce a una variedad de *C. brasiliense*; y lo mismo hace con la especie antillana *C. calaba* (Standley, 1932). Casi 50 años después D'Arcy & Keating (1979) hacen un estudio anatómico de las hojas de varias especies americanas de *Calophyllum* y se muestran en desacuerdo con Standley, considerando que *C. rekoi* y *C. calaba* son especies y no variedades de *C. brasiliense*. El gran revisor de *Calophyllum* en el Viejo Mundo, Peter F. Stevens (1980) no examina las especies del Nuevo Mundo. Como puede verse, las especies americanas de dicho género nunca han sido revisadas profundamente, desde mi punto de vista la mejor revisión es la de D'Arcy & Keating (1979); sin embargo, tampoco es suficiente.

### ***Calophyllum brasiliense* Cambess.**

La especie *Calophyllum brasiliense* Cambess. fue descrita por Jacobo Cambessedes en 1827, en la revista *Flora Brasiliae Meridionalis*. Su espécimen tipo (*St. Hilaire 330*) se colectó en Brasil, en la provincia de Espírito Santo (D'Arcy & Keating, 1979). Acerca de la morfología foliar de esta especie, dice Standley (1932), que la costa adaxial de los ejemplares brasileños es casi totalmente sulcada. Mientras que D'Arcy & Keating (1979) dicen del ejemplar que ellos estudian (*Claussen 237*, de Minas Gerais) que tiene una vena media plana o ligeramente cóncava adaxialmente y una frecuencia de venación espaciada de 15-18/1 cm. *Calophyllum brasiliense* es considerada la especie más importante en el nuevo Mundo. Existe la creencia generalizada de que este taxón es el origen de todos (o la mayoría) de los otros taxa americanos de este género, aunque nadie explica porque. La propuesta de Standley (1932) de reducir a variedades de esta especie a los taxa México-centroamericano y antillano sigue vigente hasta el momento. Pero aún más, actualmente existe la tendencia a considerar a los dos taxa mencionados, junto con algunos más, como sinónimos de esta especie brasileña (MOBOT). Prácticamente se considera que *C. brasiliense* es la única especie representante de *Calophyllum* en América.

### ***Calophyllum rekoi* Standl.**

En 1919 Paul C. Standley describe dos especies mexicanas de *Calophyllum*. A una de éstas la nombra *Calophyllum rekoi* Standl. en honor del Dr. Reko<sup>1</sup>, quien colectó el espécimen tipo. A la otra, *Calophyllum chiapense* Standl., por que su espécimen tipo fue colectado en Chiapas. (Standley, 1923). En 1923, en su obra titulada "*Trees and shrubs of Mexico*" presenta las características de estas dos especies (Standley, 1923). A partir de esa información se ha construido el cuadro 2.

---

<sup>1</sup> El Dr. Blas Pablo Reko, médico de origen austriaco, fue uno de los iniciadores de la Sociedad Botánica de México, al lado de personalidades como el Dr. Faustino Miranda, el Prof. Maximino Martínez, el Dr. Ladislao Paray, etc. El Dr. Reko fue un pionero en el trabajo etnobotánico en México y jugó un papel muy importante en el conocimiento de varias plantas mexicanas sagradas. Entre sus obras se encuentran: "*De los nombres botánicos aztecas*" (1919) y "*Mitobotánica zapoteca*" (1945), así como varios artículos publicados en las revistas "El México antiguo" y el "Boletín de la Sociedad Botánica de México".

**Cuadro 2.** Especies mexicanas de *Calophyllum* descritas por Standley.

	<i>C. rekoii</i> Standl.	<i>C. chiapense</i> Standl.
Localidad tipo	Oaxaca, Cerro Espino, 600msnm	Chiapas, Los Pinos, cerca de Tonalá
Forma hoja	Elípticas, elíptico oblongas	Elípticas, elíptico obovadas
Largo hoja	10-16 cm.	6.5-8.5 cm.
Ancho hoja	4-6 cm.	2-4 cm.
Largo pecíolo	22-23 mm.	8-10 mm.
Inflorescencia	7 flores	5 flores
Ancho flor	8 mm.	8-10 mm.
No. estambres	7-12	Numerosos
Fruto	4-5 cm.	
Nombre local	“Cimarrón, “cedro cimarrón”	“Leche de María”

Standley propone estas dos especies considerando sólo los ejemplares de las localidades tipo (Standley, 1923) y sin tomar en cuenta los caracteres morfológicos más importantes de las hojas de este género: la prominencia de la costa y la frecuencia de las venas secundarias.

En 1932, este mismo autor publica un pequeño artículo en el cual expone los resultados de la observación de 55 ejemplares de *Calophyllum* en el U. S. National Herbarium. Al parecer, tales ejemplares corresponden a plantas colectadas en México, Centroamérica, Sudamérica y las Antillas (Standley, 1932). Como consecuencia de dicha observación decide: 1) integrar la especie *Calophyllum chiapense* a la especie *Calophyllum rekoii* y 2) reducir esta última a una variedad de *C. brasiliense*, nombrando al taxón México-centroamericano de la siguiente manera: *Calophyllum brasiliense* Cambess. var. *rekoii* Standl.

Años después, D’Arcey & Keating (1979), realizan un estudio anatómico de las hojas de varias especies americanas de *Calophyllum*. Como resultado de dicho estudio, ellos consideran que el taxón México-centroamericano de *Calophyllum* es una especie y no una variedad de *C. brasiliense*. Al hacerlo, retoman el nombre original de la especie: *Calophyllum rekoii* Standl. D’Arcey & Keating (1979) expresan así su opinión: “Es completamente irrazonable considerar al centroamericano *C. rekoii* como coespecífico del brasileño *C. brasiliense*”, y exponen las principales diferencias entre estas dos especies. El cuadro que se presenta a continuación muestra tales diferencias.

**Cuadro 3.** Diferencias entre *C. rekoii* Standl. y *C. brasiliense* Cambess., según D’Arcey & Keating (1979).

	<i>C. rekoii</i> Standl.	<i>C. brasiliense</i> Cambess.
Ramitas	Notablemente anguladas	Subredondeadas
Vena central (Costa) adaxial	Cresta baja redondeada	Plana o ligeramente cóncava
Hipodermis	Presente	Ausente
Ductos secretores laminares	Pequeños	Grandes

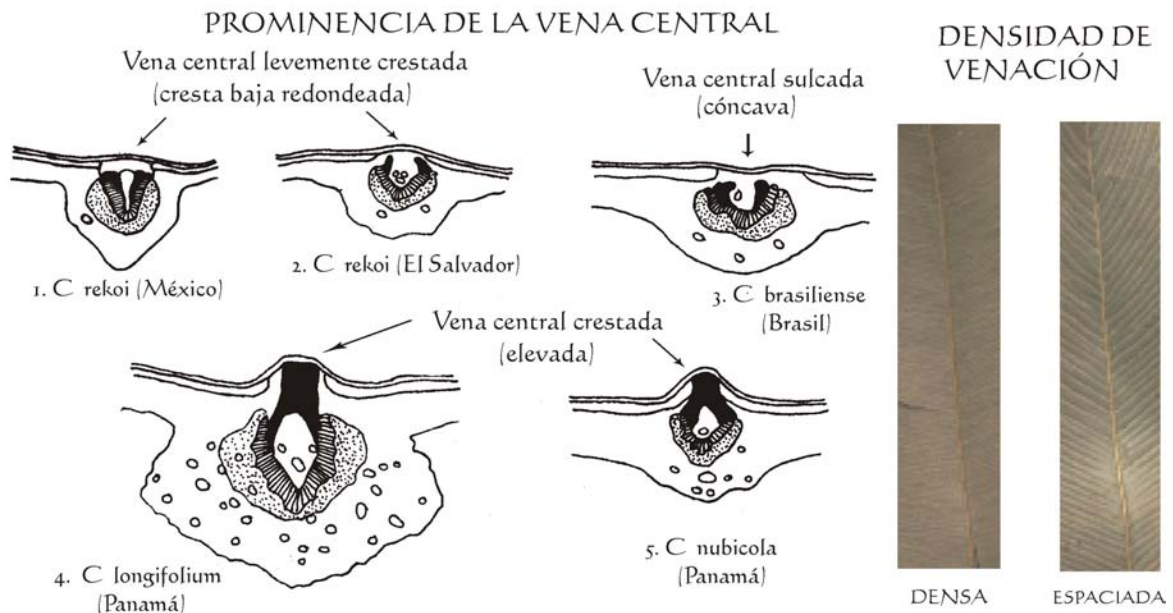
## MORFOLOGÍA FOLIAR DE *CALOPHYLLUM*

Los miembros de la familia Guttiferae se caracterizan porque sus hojas poseen rasgos histológicos muy regulares y altamente organizados (D'Arcy & Keating, 1979). Las especies de *Calophyllum* pueden reconocerse simplemente por sus hojas, y es por esta razón que la morfología foliar posee un elevado valor taxonómico. Las características que se toman en cuenta para la identificación y clasificación de dichas especies son: la forma, el tamaño, la dureza, la prominencia del margen, el color de la hoja al secar, pero sobre todo, la forma de la vena media (costa) y la densidad de la venación secundaria. (D'Arcy & Keating, 1979; Stevens, 1980).

En la clasificación se toman en cuenta los caracteres tanto adaxiales (haz), como abaxiales (envés) de la lámina foliar. En la presente investigación se usan sólo los caracteres de la superficie adaxial, por lo que únicamente se mencionarán estas características. Stevens (1980) sugiere que la costa crestada es un carácter más primitivo que la costa sulcada. Las venas secundarias de las hojas de *Calophyllum* son muy peculiares, pues se encuentran regularmente espaciadas, paralelas una con respecto a la otra y perpendiculares a la vena media. El espaciamiento de estas venas secundarias paralelas varía según la especie. D'Arcy & Keating (1979) presentan dos métodos para evaluar el grado de espaciamiento, el primero de ellos consiste en medir la distancia que hay entre una vena y otra, y dividir esta medida entre la altura de la vena, a esta razón se la llama radio frecuencia/altura. Este método, por ser muy difícil y complejo, no se utilizó en la presente investigación. En el segundo método, se cuentan las venas que caben en 1 cm. Stevens (1980) reduce el espacio de conteo a 5 mm.; sin embargo, complica el método distinguiendo entre venas y canales laticíferos. En el presente estudio, el conteo se realizó en un espacio de 5mm, sin distinción de venas y canales laticíferos.

La figura 1 muestra algunos esquemas de cortes transversales de hojas de especies americanas de *Calophyllum*, donde puede verse la anatomía de la vena media. Los dibujos, así como los datos del cuadro 4 han sido tomados del artículo de D'Arcy & Keating (1979). Las dos primeras imágenes de la figura pertenecen a *Calophyllum rekoii*; la tercera a *C. brasiliense*; y la cuarta y quinta, a las especies panameñas *C. longifolium* y *C. nubicola*, respectivamente. En los cortes de *C. rekoii* puede verse la forma levemente crestada de la vena media, en comparación con la forma sulcada de *C. brasiliense* y las fuertemente crestadas de *C. longifolium* y *C. nubicola*. En dicha figura también se muestra una fotografía de dos diferentes tipos de hojas de *C. rekoii*, donde puede verse la diferencia en la venación.

## CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE LAS HOJAS DE CALOPHYLLUM



**Figura. 1.** Cortes transversales de hojas de especies americanas de *Calophyllum*, donde se observa la forma de la vena central. Dibujos tomados de D'Arcy & Keating, (1979). Fotografías de las hojas de *C. rekoii* donde se ven los dos tipos de venación, para más información véase la sección de resultados de la presente investigación.

**Cuadro 4.** Características de la vena central (costa) y las venas laterales (densidad de venación) de algunas especies americanas de *Calophyllum*. Datos tomados de D'Arcy & Keating, 1979)

No.	ESPECIE	EJEMPLAR	SITIO DE COLECTA	COSTA	DENSIDAD DE VENACIÓN
1	<i>C. rekoii</i>	Reko 3557 (US)	México, Oaxaca	Cresta baja redondeada	8-10/5 mm
2	<i>C. rekoii</i>	Calderón 147 (MO)	El Salvador	Cresta baja redondeada	12-13/5 mm
3	<i>C. brasiliense</i>	Claussen 237 (MO)	Brasil, Minas Gerais	Cóncava	7-9/5 mm
4	<i>C. longifolium</i>	Croat 8532 (MO)	Panamá, Isla Barro Colorado	Elevada	11-14/5 mm
5	<i>C. nubicola</i>	Mori & Kallunki 7301 (MO)	Panamá, Cerro Jefe	Elevada	15/5 mm

## Química de *Calophyllum*

### HISTORIA QUÍMICA DEL GÉNERO *CALOPHYLLUM*

El primer análisis químico de *Calophyllum* se llevó a cabo en 1919, al estudiar el aceite de las semillas de *C. inophyllum*. Varios años después, en 1950, J. Polonsky y A. Ormancey-Potier, determinan la estructura del calofilólido, el inofilólido y el ácido calofílico (Loan-Chinh, 1996). Hegnauer, en 1966, hace una revisión de los metabolitos encontrados hasta esa fecha en *Calophyllum*. Él menciona la existencia de aceites esenciales semejantes al del sándalo; cianógenos en las hojas, corteza y raíz de *C. inophyllum*; taninos en la corteza y madera de *C. inophyllum* y *C. brasiliense*; saponinas en las hojas de *C. calaba* y la corteza, hojas y frutos de *C. inophyllum*; xantonas en la madera de *C. brasiliense* y cumarinas en *C. inophyllum* (Hegnauer, 1966). Stevens (1980) cita estos datos y agrega algunos detalles más.

En 1996, Loan-Chinh revisa los metabolitos de *Calophyllum* aislados hasta ese momento y describe una enorme cantidad de lípidos en las semillas; triterpenos en la corteza y hojas; xantonas en la madera y la corteza; cumarinas en las hojas, corteza, látex y frutos; cromanonas en las hojas, corteza y frutos y algunos pocos esteroides y biflavonoides (Loan-Chinh, 1996).

### Componentes de los Quimiotipos de *Calophyllum*

El interés de la presente investigación se centra sólo en dos tipos de metabolitos: flavonoides y triterpenos. El género *Calophyllum* posee una amplia variedad de triterpenos de diferentes grupos; del grupo de los fridelanos: fridelina, fridelán 3 $\beta$ -28 diol, canofilol y canofilal; del grupo de los oleananos: ácido canofílico, apetalactona,  $\beta$ -amirina y acetato de eritrodil-3; del grupo de los lupanos: ácido betulínico; del grupo de los taraxeranos: taraxerol y taraxerona; y, por último, del grupo de los adiananos: 3 $\beta$ -simiarénol (Loan-Chinh, 1996).

Las cumarinas y las cromanonas, sustancias flavonoides, son los componentes más importantes de los quimiotipos de *Calophyllum*. Biogenéticamente, estos dos metabolitos se hallan estrechamente relacionados; sin embargo, las cromanonas reciben menos atención que las cumarinas y frecuentemente se olvida la relación que hay entre ellos. Además, no existe una clasificación que incluya a cumarinas y cromanonas en la misma categoría, ni un término para designar la unidad que forman esos dos metabolitos. Aunque Gautier et al. (1972) y Ramiandrasoa et al. (1983) han usado en sus publicaciones el nombre “neoflavonoides” para referirse a tales compuestos; sin embargo, ese término no es totalmente correcto, ya que no puede aplicarse ni a todas las cumarinas, ni a todas las cromanonas de *Calophyllum*, sino sólo a una parte de ellas: las que tienen un sustituyente fenil en el carbono 4. El uso que Gautier et al. (1972) hacen del término es correcto, pues sólo se refieren a las 4-fenil cumarinas y las 4-fenil cromanonas: inofilólido y ácido



calofílico, respectivamente. En cambio, Ramiandrasoa et al. (1983) lo usan para designar también a las 4-alquil cumarinas y las 4-alquil cromanonas.

El vocablo “neoflavonoide” se acuñó a principios de 1960, ante la necesidad de contar con un término que describiera a un nuevo grupo de flavonoides encontrados en el género *Dalbergia* de la familia Leguminosae-Papilionatae (Eyton, 1966). Las estructuras moleculares de esos nuevos compuestos tenían un sustituyente fenil en el carbono 4, a diferencia de los flavonoides que tienen ese mismo tipo de sustituyente en el carbono 2 y los isoflavonoides que lo tienen en el carbono 3 (Eyton, 1966).

Sin embargo, en las cumarinas y cromanonas de *Calophyllum*, el carbono 4 puede estar sustituido con un fenilo o con un alquilo; de manera que el término neoflavonoide sólo puede aplicarse parcialmente a dichos compuestos. Esa característica de *Calophyllum* es muy importante y acerca de ella dicen Ramiandrasoa et al. (1983): “Esta dualidad de sustituyentes fenilo o alquilo en la posición 4 no tiene equivalente en las otras familias de compuestos y constituye una originalidad biogenética de los neoflavonoides aislados de las gutíferas.”

Posteriormente se explicará la relación biogenética de dichos compuestos, pero primero se hablará de la estructura y clasificación de las cumarinas. Las cumarinas de *Calophyllum* además de estar sustituidas en el carbono 4, también lo están en los carbonos 6 y 8, con un acilo o un prenilo, frecuentemente las cadenas de acilo y/o prenilo se cierran formando anillos de pirano o furano. De acuerdo al tipo de sustituyente que porten en la carbono 4, dichas cumarinas se clasifican como 4-fenilo o 4-alquilo; como 6-acilo y 8-acilo por la posición del sustituyente acilo, y como pirano o furano cumarinas según el tipo de ciclo que formen las cadenas de acilo o prenilo al cerrarse (Loan-Chinh, 1996). Las pirano cumarinas se clasifican en pirano cumarinas tricíclicas (cuando es la cadena de prenilo la que se cierra) y dipirano cumarinas tetracíclicas (cuando se cierran ambas cadenas), a estas últimas se les denomina pseudocalanólidos si se originan a partir de una cumarina 6-acilo (McKee et al. 1998). Las cumarinas también se pueden clasificar como 4-alquil, 4-fenil cumarinas o 4-alquil, 4-fenil dihidro 3,4 cumarinas, aunque estas últimas son sumamente raras (Ramiandrasoa et al., 1983), véase el esquema de la figura 3. No existe un término para nombrar a las cumarinas cuyas cadenas de acilo y prenilo no se ciclizan, excepto el de “cumarinas preniladas” que no me parece muy preciso.

El género *Mammea* es un pariente muy cercano de *Calophyllum* y posee una gran cantidad de cumarinas semejantes a las de este último, aunque en muchas de ellas no se ciclizan las cadenas de acilo o prenilo y al parecer no hay dipiranocumarinas. Crombie et al. crearon en 1966 una clasificación para tales cumarinas (Crombie et al., 1987); es importante conocer esa clasificación, por una parte, por que varias de las cumarinas encontradas en *Mammea* aparecen también en *Calophyllum* y por otra, porque es muy sistemática. A continuación se cita:

El nombre mammea es seguido por una letra que designa el tipo de sustituyente en el carbono 4 (A = fenil, B = propil, C = pentil, D = 1-metilpropil, y E = 1-acetoxipropil), una línea separa ésta de una segunda letra que designa si esta presente un grupo 6-acil u 8-acil (A = 6-acil, B = 8-acil); y una tercera letra que designa el tipo de sustituyente acil (A = 3-metilbutiril, B = 2-

metilbutiril, C = butiril, y D = 2.metilpropionil). Donde el sustituyente prenil ha sido modificado por ciclización, la tercera letra es seguida por el prefijo ciclo y una cuarta letra que indica el tipo de heterociclización (ciclo D = 2,2-dimetilcromeno, ciclo E = 3-hidroxi-2,2-dimetilhidropirano y ciclo F = 2-(1-hidroxi-1-metiletil) hidroxifuran). (Crombie et al., 1987)

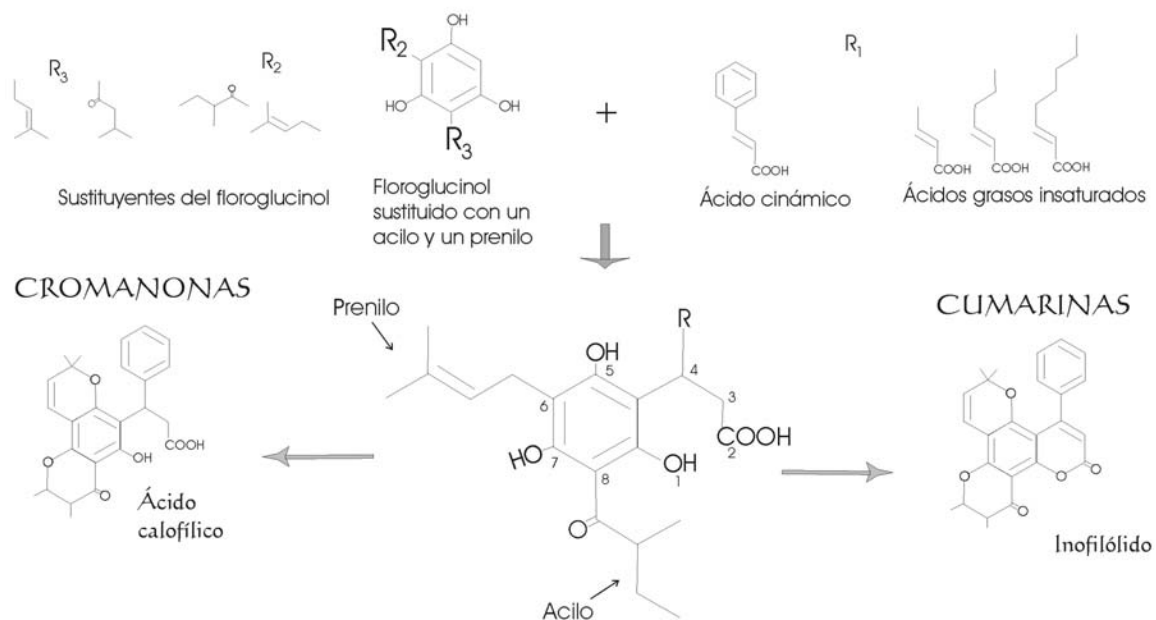
### **Relación biogénica entre cumarinas y cromanonas**

La relación biogénica entre cumarinas y cromanonas fue demostrada por Gautier *et al.* desde 1972, en un breve artículo titulado : “On the biosynthesis of Neoflavanoids”; sin embargo, tal relación parece ser desconocida por la mayoría de los investigadores que publican sobre estos metabolitos, pues casi nadie la menciona, o al menos nadie le da importancia. Considero que el conocimiento de la relación entre cumarinas y cromanonas es vital para comprender la existencia de los quimiotipos; aquí se intentará hacer evidente tal relación, aunque no se profundizara mucho en el tema, pues el espacio y el tiempo no lo permiten. La figura 2 muestra un esquema de la biogénesis de las cumarinas y las cromanonas basado en los esquemas de Gautier *et al.* (1972) y Ramiandrasoa *et al.* (1983). En este esquema las estructuras se han dibujado al revés de cómo aparecen en los esquemas originales, es decir, con el sustituyente del carbono 4 hacia arriba en vez de hacia abajo.

La síntesis se inicia cuando una molécula de floroglucinol sustituido con un prenilo (R<sub>2</sub>) y un acilo (R<sub>3</sub>) se une a una molécula de ácido cinámico (para formar una molécula 4-fenil), o a un ácido graso insaturado (para formar una molécula 4-alquil). Esta unión crea la molécula precursora que puede dar lugar, tanto a una cumarina, como a una cromanona. Para formar una cumarina es necesario que haya una deshidrogenación, para producir un doble enlace entre los carbonos 3 y 4; así como una unión del carboxilo con el hidroxilo contiguo, para crear el anillo de lactona típico de las cumarinas. Por el contrario, para que se produzca una cromanona, es indispensable que no se forme ni el anillo de lactona, ni el doble enlace entre los carbonos 3 y 4. Además, es absolutamente necesario que se ciclice la cadena de acilo, la cual formará el anillo 2,3-dimetil de cromanona, típico de estas moléculas. (Gautier *et al.*, 1972; Ramiandrasoa *et al.*, 1983).

Después de esta explicación de la biogénesis se hace evidente la relación que hay entre las cumarinas y las cromanonas de *Calophyllum*. Pero para decirlo de una manera aún más clara y que no quede ninguna duda: las cromanonas son casi cumarinas, sólo hay dos diferencias principales entre ellas: la formación del anillo de lactona y el doble enlace entre los carbonos 3 y 4. En casi todo lo demás son iguales, hay 4-fenil cromanonas y 4-alquil cromanonas; 6-acil cromanonas y 8-acil cromanonas. Aunque, también hay diferencias importantes, como el hecho de que no haya furanocromanonas, ni cromanonas en las que no se ciclice la cadena de acilo, y existen mecanismos para que no se forme el anillo de lactona, es decir, para que las cromanonas no se conviertan en cumarinas, así como algunas otras diferencias. Sin embargo, las semejanzas son mayores que las diferencias y además, en algunas cumarinas aparecen algunas características típicas de las cromanonas. (Sustaita en prep.).

## BIOGÉNESIS DE CUMARINAS Y CROMANONAS (Gautier et al. 1972)



## BIOGÉNESIS DE CUMARINAS (Ramiandrasoa et al. 1983)

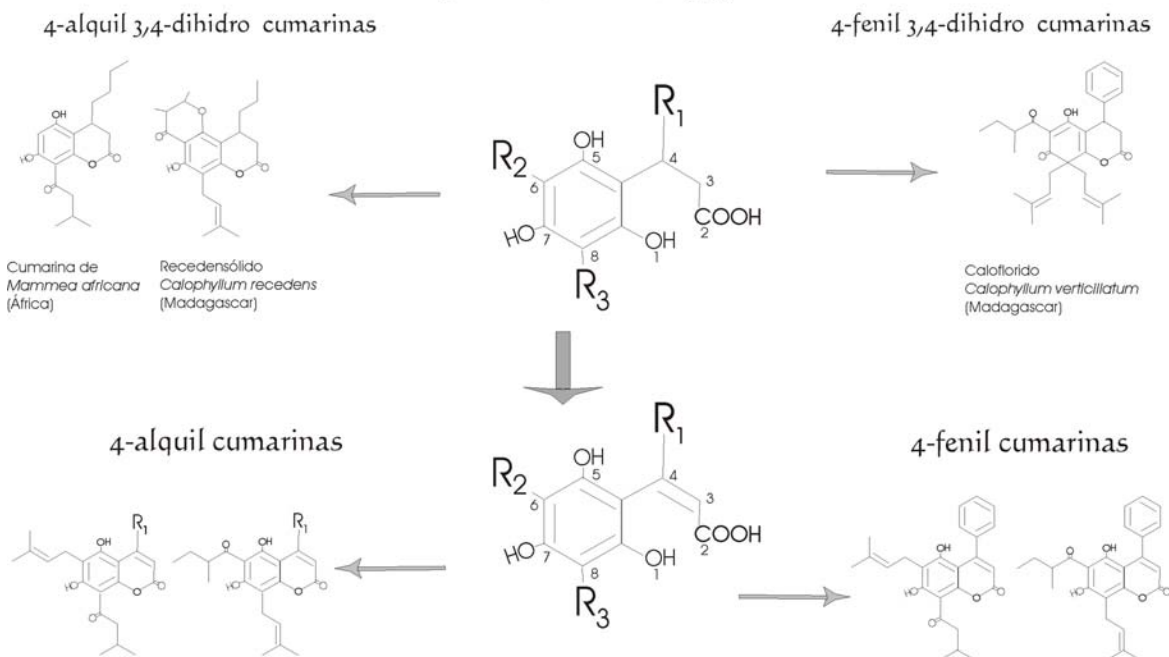


Figura 2. Esquema de la biogénesis de las cumarinas y cromanonas de *Calophyllum*, adaptado de los esquemas propuestos por Gautier *et al.*, 1972 y Ramiandrasoa *et al.*, 1983.

## QUIMIOTIPOS DE *CALOPHYLLUM*

### Quimiotipos de Sri Lanka

En las fuentes consultadas no se encontró la definición del término quimiotipo, por lo que aquí se ha creado una a partir de la experiencia obtenida en esta investigación. Un quimiotipo es un conjunto característico de sustancias extraídas de un organismo (o una parte de éste) bajo condiciones específicas. Al comparar los quimiotipos de diferentes organismos, se obtiene una indicación de la variación genética en esa población (o poblaciones) expresada a nivel bioquímico. Un quimiotipo es una unidad arbitraria, el nivel de variación al que se aplica el término es elegido por el investigador de acuerdo con los objetivos de su estudio. Por ejemplo, Bandara *et al.* (1986), consideran como quimiotipos diferentes a las cumarinas y las cromanonas; McKee *et al.* (1998), en cambio, consideran como quimiotipos diferentes a variantes estructurales de las cumarinas, o aún a las diferentes proporciones de los mismos tipos de cumarinas.

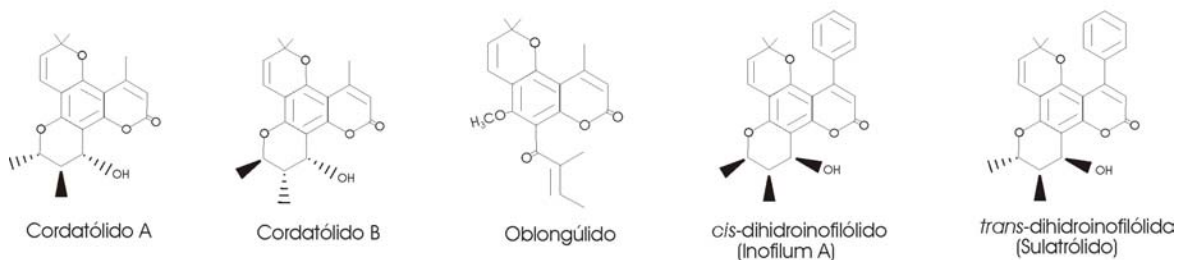
En 1986 Bandara *et al.* reportan la existencia de dos quimiotipos en las especies de *Calophyllum* nativas de Sri Lanka (Bandara *et al.*, 1986). Primero ellos aíslan las sustancias presentes en los extractos de éter de petróleo de las hojas de *C. moonii* y *C. walkeri* y encuentran que la primera contiene cumarinas (dihidroinofilólidos), mientras que la segunda contiene una cromanona (ác. calozeylánico). Luego, hacen una revisión bibliográfica de las sustancias aisladas de otras especies de *Calophyllum* en esa isla y vuelven a encontrar que unas especies contienen cumarinas y otras cromanonas. Junto con las cumarinas y las cromanonas se aíslan también diversos triterpenos, sin embargo, a estos compuestos no se les da mucha importancia; lo que determina los tipos químicos es la presencia de cumarinas o de cromanonas. El cuadro 5 muestra los nombres de las sustancias aisladas de cada especie, mientras que en la fig. 3 se pueden ver las estructuras de tales sustancias.

**Cuadro 5.** Quimiotipos de las especies de *Calophyllum* en Sri Lanka.

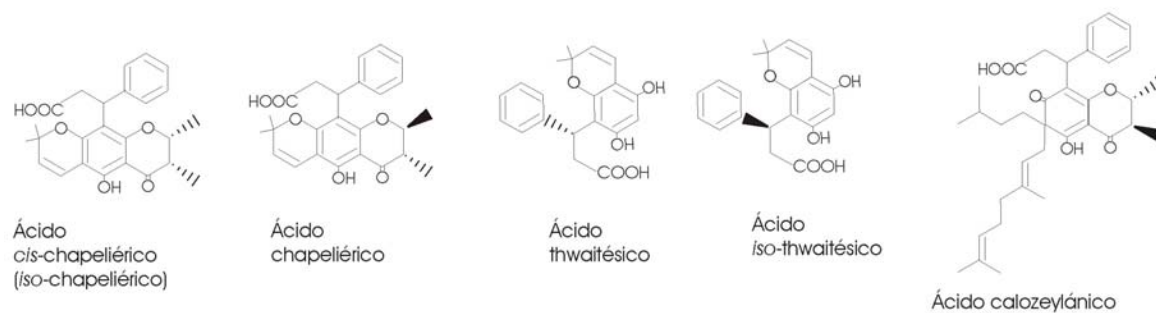
ESPECIES	TRITERPENOS	CUMARINAS	CROMANONAS
<i>C. calaba</i>	Fridelina, Fridelan-3 $\beta$ -ol Fridelan-3 $\beta$ , 28-diol, Canofilol, Canofilal Ácido canofilico		Ácido chapelierico (cis y trans)
<i>C. cordato-oblogum</i>	Fridelina Canofilol	Cordatólidos A y B oblongúlido	
<i>C. lankaensis</i>	Fridelina, Canofilol, Canofilal, Apetalactona		Ácidos calozeylánico, Thwaitésico e isothwaitésico
<i>C. moonii</i>	Fridelina, apetalactona	Dihidroinofilólido (cis y trans)	
<i>C. thwaitesii</i>	Fridelina, canofilol, apetalactona		Ácidos calozeylánico y thwaitésico
<i>C. trapezifolium</i>	Fridelina, canofilol		Ácido calozeylánico
<i>C. walkeri</i>	Fridelina, canofilol		Ácido calozeylánico

## COMPUESTOS DE LOS QUIMIOTIPOS DE SRI LANKA

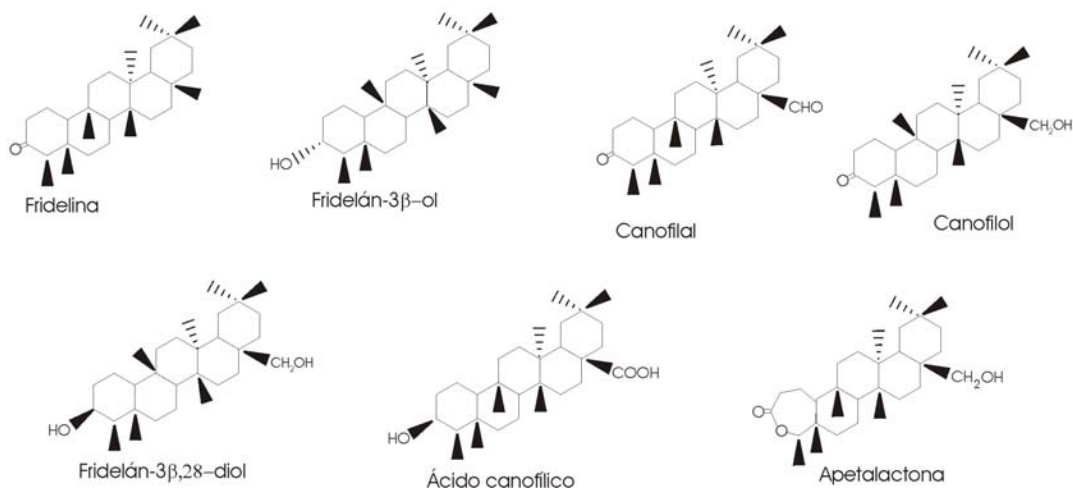
### CUMARINAS



### CROMANONAS



### TRITERPENOS



**Figura 3.** Cumarinas, cromanonas y triterpenos constituyentes de los quimiotipos de Sri Lanka. Basado en Bandara et al., 1986.

## Quimiotipos de México

A finales de la década de los 90' se descubren en México dos quimiotipos de *Calophyllum*. Las sustancias componentes de estos quimiotipos se aislaron del extracto hexánico de las hojas. El QT 1 corresponde a hojas recolectadas en la Sierra de Santa Marta, Volcán de San Martín Pajapan, Veracruz. Mientras que el QT 2 se recolectó en la Reserva de Biología Tropical de la UNAM, "Los Tuxtlas", Veracruz (Estrada, 2001; Reyes *et al.*, 2004; Huerta *et al.*, 2004; Aguilar, 2005). El cuadro 6 muestra los nombres de las sustancias correspondientes a cada QT y la figura 4, las estructuras moleculares de dichas sustancias. En las publicaciones originales (Huerta, 2004; Huerta *et al.*, 2004), se designa como "isómero estructural del ácido *iso*-apetálico" a la cromanona que aquí aparece como ácido calolóngico, pero este último nombre es más preciso (comunic. personal con Reyes).

**Cuadro 6.** Quimiotipos de *Calophyllum* hallados en México. Aislados del extracto hexánico de las hojas.

QT	TRITERPENOS	CUMARINAS	CROMANONAS
QT1	fridelina y canofilol	Mammeas A/BA, A/BB, B/BA, B/BB, C/OA, C/OB, B/BA ciclo F y B/BB ciclo F	
QT2	fridelina y canofilol	Calanólidos A, B, C y sulatrólido	Ácidos apetálico, <i>iso</i> -apetálico y calolóngico (isómero estructural del ác. <i>iso</i> -apetálico)

## Quimiotipos en otras partes de América

Se han reportado otros grupos de cumarinas y cromanonas aisladas de ejemplares americanos de *Calophyllum*. El cuadro 7 muestra los datos de esos compuestos y en las figuras 5 y 6 pueden apreciarse sus estructuras.

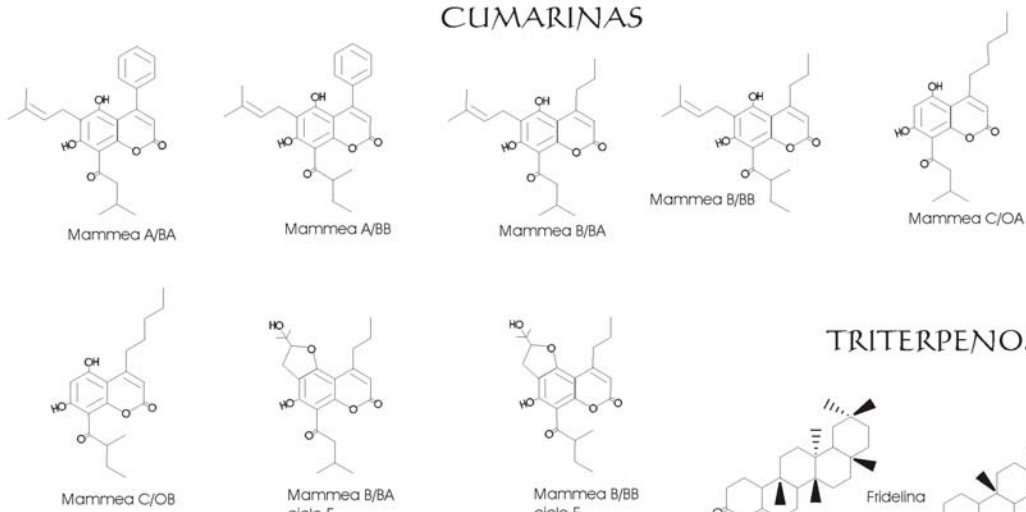
**Cuadro 7.** Sustancias reportadas para los taxa americanos de *Calophyllum*

CROMANONAS	LUGAR	EXTRACTO	REFERENCIA
Ácidos brasiliénsico e <i>iso</i> -brasiliénsico	Costa Rica	Hexánico de la resina de la corteza	Stout <i>et al.</i> , 1968
Ácidos apetálico e <i>iso</i> -apetálico, <i>iso</i> -calolóngico, blancoico y tres más a los que no se da nombre	No mencionado	Pentano-hexánico de las semillas	Platner <i>et al.</i> , 1974
Ácidos brasiliensofílicos A, B y C e <i>iso</i> -brasiliensofílicos A, B y C	México	Acetato de etilo-hexánico de la corteza	Cottiglia <i>et al.</i> , 2004
CUMARINAS			
Calofilólido, calanona, mammea B/BB, brasimarinas A, B y C, calanólidos A y C, inofilumes A, C, D y E, calocumarina A	Brasil	Acetónico de la corteza	Ito <i>et al.</i> , 2003

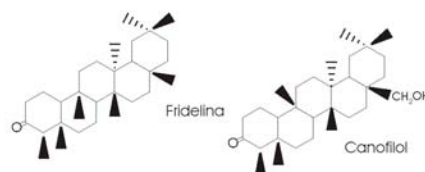
# QUIMIOTIPOS DE MÉXICO

## QUIMIOTIPO 1

### CUMARINAS

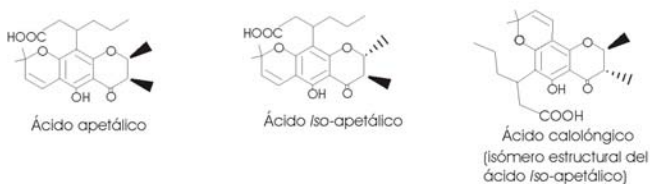


### TRITERPENOS

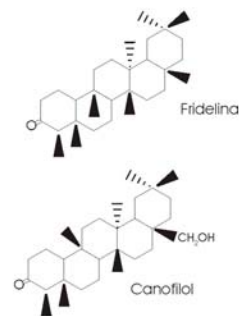


## QUIMIOTIPO 2

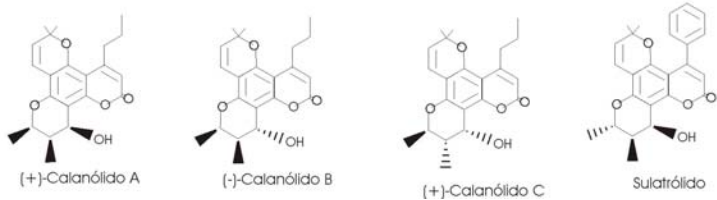
### CROMANONAS



### TRITERPENOS

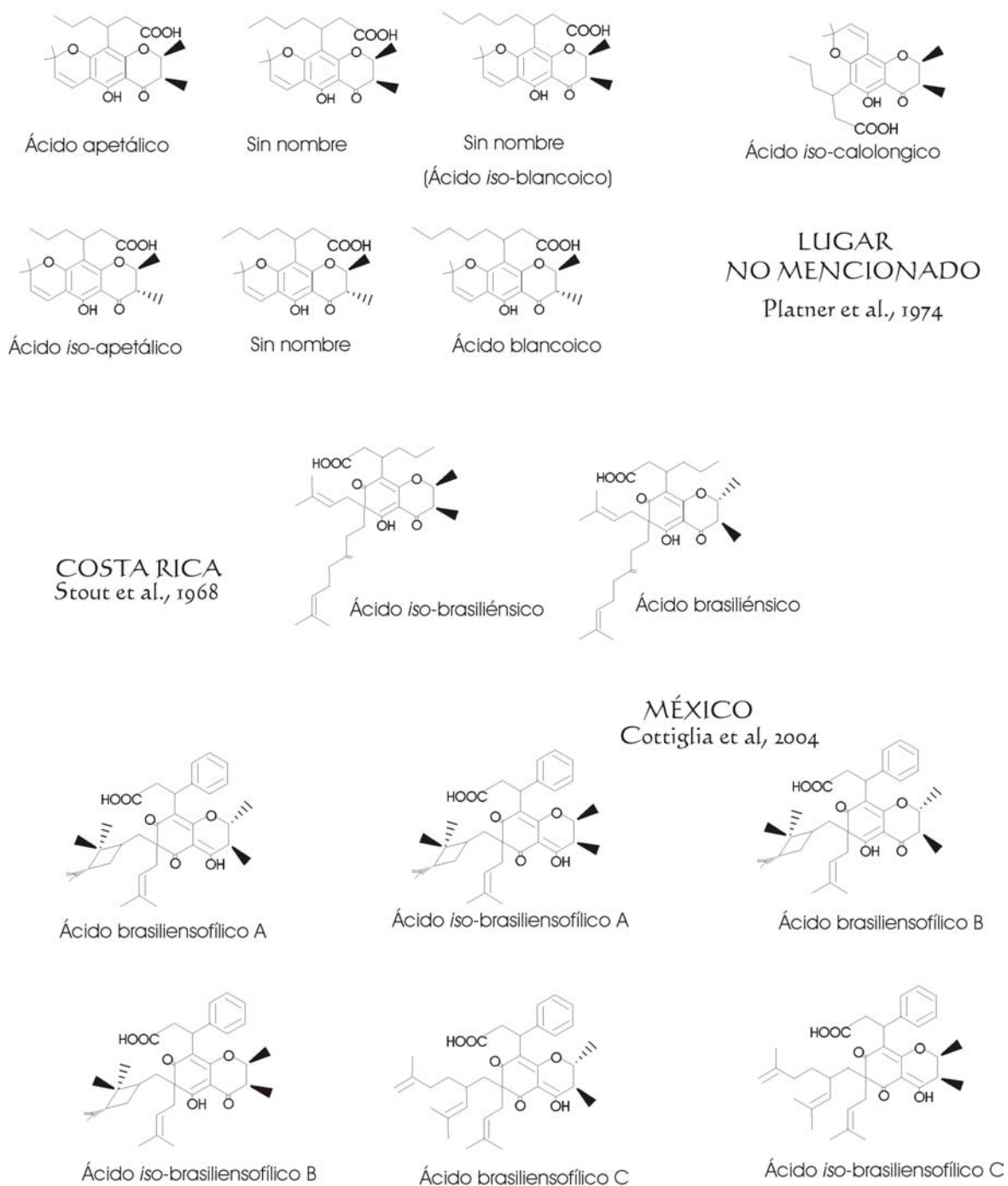


### CUMARINAS



**Figura 4.** Estructuras de los compuestos aislados del extracto hexánico de las hojas del taxón mexicano de *Calophyllum*. Basado en Estrada (2001), Huerta *et al.* (2004).

## CROMANONAS



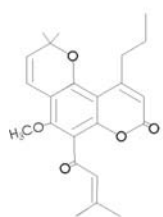
**Figura 5.** Otros grupos de compuestos cromanónicos encontrados en América.



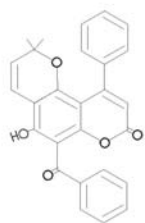
# CUMARINAS

Ito et al., 2003

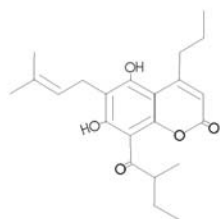
## BRASIL



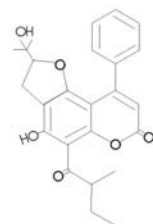
Calofilólido



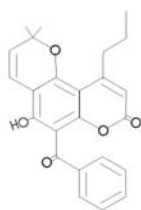
Calanona



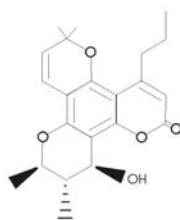
Mammea B/BB



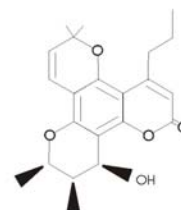
Brasimarina B



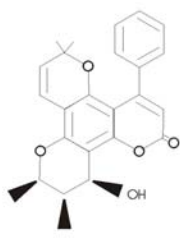
Brasimarina A



Calanólido A



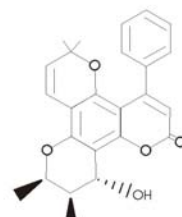
Calanólido C



Inófilum A



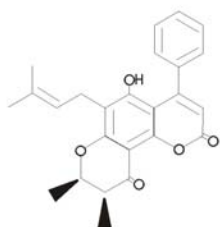
Inófilum C



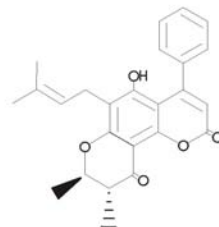
Inófilum D



Inófilum E



Brasimarina C



Calocumarina A

**Figura 6.** Compuestos cumarínicos hallados en la especie brasileña *Calophyllum brasiliense*.

## TÉCNICAS DE ANÁLISIS QUIMIOSISTEMÁTICO

### Quimiosistemática

La quimiosistemática vegetal es la rama de la botánica que clasifica y explica las relaciones entre las plantas por medio del estudio de los constituyentes químicos de éstas. (Jones, Jr., 1988). A nivel empírico, esta ciencia se ha practicado durante toda la historia de la humanidad, al diferenciar a las plantas por su color, sabor, olor, toxicidad o valor medicinal y al extraer de ellas perfumes, tintes, sustancias medicinales y venenos. A nivel científico, sin embargo, se empieza a aplicar en el siglo XIX y sólo se utiliza ampliamente a partir de 1940, cuando el desarrollo de las técnicas cromatográficas y espectroscópicas facilitan la identificación de los compuestos extraídos de las plantas. (Jones, Jr., 1988).

Las sustancias utilizadas en los estudios quimiotaxonómicos son aquéllas conocidas como micromoléculas o metabolitos secundarios: flavonoides, alcaloides, terpenoides, aminoácidos, etc. De ellos, los más ampliamente utilizados son los flavonoides por las siguientes razones: 1) se encuentran en la mayoría de las plantas, 2) son fáciles de aislar e identificar aún a partir de pequeñas cantidades de material vegetal, 3) poseen una estructura muy variable, 4) su variación tiene una base genética demostrada, 5) son muy estables químicamente, de manera que mantienen sus estructura aún en el material recolectado muchos años atrás, y 6) generalmente pueden usarse en todos los niveles taxonómicos (Jones Jr. 1988).

### Cromatografía en Capa Fina

La cromatografía es un método que consiste en la separación y detección de las sustancias componentes de una mezcla. El proceso de separación consiste en el flujo de una fase móvil (gas, líquido o fluido supercrítico) a través de una fase estacionaria (sólido o líquido fijado en un sólido). Hay varios tipos de cromatografía, siendo la más común la de absorción; en ésta, la fase estacionaria es un sólido (Touchstone, 1992).

La cromatografía de absorción puede realizarse tanto en columna como en capa. En el primer caso, la fase estacionaria es empacada en un tubo de vidrio; en el segundo, se aplica sobre un soporte, que puede ser una placa de vidrio o una lámina de plástico o aluminio. Los absorbentes más usados son: gel de sílice (dióxido de silicio), alúmina (óxido de aluminio), *kieselguhr* (tierra de diatomeas) y celulosa; el gel de sílice es el más común. Frecuentemente el absorbente contiene dos indicadores UV, los cuales proporcionan un fondo contrastante. Tales indicadores son: el silicato de zinc, que fluoresce cuando es expuesto a la luz UV de 254 nm y da un fondo verde amarillento; y las sales de Na de hidroxipurinas de los ácidos sulfónicos, las cuales fluorescen al exponerse a longitudes de onda de 366 nm y proporcionan un fondo púrpura. (Touchstone, 1992)

En la cromatografía en capa fina las capas de absorbente son muy finas, y tienen como soporte sólo láminas delgadas de aluminio o plástico. Se llama desarrollo al proceso que consiste en el desplazamiento de la fase móvil a través de la fase estacionaria, lo cual se

debe a la acción capilar de esta última. En la cromatografía en capa fina, la muestra se aplica en el extremo inferior de la placa, la cual es sumergida en la fase móvil con la muestra justo encima del nivel líquido y cuando el frente de la fase móvil llega al tope de la placa ésta se retira. (Touchstone, 1992)

Después que la muestra se ha separado en sus diversos componentes, es necesario hacerlos visibles, este método se llama visualización. Las técnicas para la visualización de los componentes pueden ser: físicas o químicas, las primeras no son destructivas, como la luz UV y los vapores de yodo. Las segundas son destructivas pues producen un cambio permanente en la identidad de la sustancia. El revelador químico más ampliamente usado es el ácido sulfúrico, el cual reacciona al calentarse, formando áreas carbonizadas de color marrón (Touchstone, 1992)

A la fase estacionaria de la cromatografía en capa fina, una vez que ha sido desarrollada y visualizada, se le llama cromatograma. En dicho cromatograma, el gradiente de polaridad va de la parte inferior, donde se aplica la sustancia; a la parte superior, donde llega el frente de la fase móvil. Aunque esto es aplicable sólo en fase normal; en fase inversa, el gradiente de polaridad es contrario (Touchstone, 1992)



Las sustancias se clasifican en polares y no polares, dependiendo de su capacidad para establecer enlaces electrostáticos. Los compuestos polares poseen una gran capacidad para establecer tales enlaces, algunos de ellos son hidrofílicos. Entre estos compuestos se encuentran las sales cristalizadas como el NaCl, azúcares y algunos alcoholes, aldehídos y cetonas. Los compuestos no polares son insolubles en el agua, ya que no pueden establecer enlaces electrostáticos. A este grupo pertenecen las grasas y las ceras, cuya estructura consiste en hidrocarburos saturados, con

muy pocos o ningún grupo funcional polar. Tales compuestos son solubles sólo en disolventes no polares como el benceno y el hexano. Al gradiente de polaridad de los disolventes se le llama serie elutrópica (Touchstone, 1992).

A lo largo del desarrollo cromatográfico, los compuestos polares son detenidos por la fase estacionaria, permaneciendo en la parte inferior de la placa; mientras que las sustancias no polares se desplazan hacia arriba, con la fase móvil.

La posición de una sustancia en un cromatograma se expresa por medio del valor **R<sub>f</sub>** (factor de retención). Primero se mide la distancia que ha recorrido el compuesto, la distancia se mide al centro de la mancha y luego esta medida se divide entre la distancia que recorrió el disolvente, desde el inicio hasta la parte superior de la placa. Los valores R<sub>f</sub> se encuentran entre 0 y 0.999 y no tienen unidades.

$$R_f = \frac{\text{Distancia del compuesto a partir del origen}}{\text{Distancia del frente del solvente a partir del origen}}$$

## MATERIALES Y MÉTODOS

En el Herbario Nacional del Instituto de Biología (MEXU) de la Universidad Nacional Autónoma de México se observaron todos los ejemplares del género *Calophyllum*, se recopiló la información contenida en las fichas de todos ellos y se tomó nota de las características morfológicas. Para el estudio se eligieron 99 especímenes, la mayoría de ellos clasificados como *Calophyllum brasiliense* Cambess. var. *rekoii* Standl. y solo algunos como *Calophyllum brasiliense* Cambess. De estos ejemplares se tomaron muestras para el análisis químico, el cual se llevó a cabo en los laboratorios 2-5 y 2-10 del Departamento de Productos Naturales del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

### Análisis por cromatografía en capa fina

De cada ejemplar seleccionado se tomó una muestra de hoja de aproximadamente 2 cm cuadrados. En el laboratorio, cada uno de estos fragmentos se partió en pedazos más pequeños, mismos que se colocaron en un pequeño frasco de cristal de 5 ml de capacidad y se cubrieron con 1 ml de hexano. Los frascos se taparon y se dejaron reposar por tres días; pasado ese tiempo, se obtuvo el extracto hexánico de las hojas. Se cortaron varias placas de gel de sílice (Merck de 0.25 mm de espesor, con soporte de aluminio) en rectángulos de 6 por 5 cm y en cada uno de éstos, se marcaron los puntos en los que se aplicarían las alícuotas de los extractos hexánicos. En cada placa se colocaron las siguientes referencias: mameas A/BA y A/BB (componentes principales del QT rekoii 1), ácidos apetalico e *iso*-apetalico (componentes principales del QT rekoii 2) extractos hexánicos de las hojas de los QT rekoii 1 y QT rekoii 2. Luego, con un capilar, se tomaron alícuotas de los extractos hexánicos y se aplicaron en los puntos marcados en la placa.

Después, se preparó una mezcla de hexano-acetato de etilo 8:2. La mezcla fue vertida en una cámara de vidrio, donde se colocaron sucesivamente cada una de las placas. Una vez desarrolladas, las placas se revelaron. En el proceso de visualización se utilizó un revelador físico: luz UV de onda larga (366 nm), y uno químico: sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 2 N. La visualización con luz UV se llevó a cabo en una cámara de luz UV, ahí se introdujeron una a una las placas para observar si mostraban manchas fluorescentes. Después, las placas se asperjaron con la solución de sulfato cérico y se calentaron hasta que aparecieron las manchas. Se preparó un segundo grupo de placas que no fueron reveladas con sulfato cérico; esto se hizo para poder observarlas con luz UV todas las veces que fuera necesario. Una vez revelados las placas, se compararon los patrones obtenidos con aquéllos correspondientes a los QT rekoii 1 y QT rekoii 2; y con las manchas correspondientes a los compuestos de referencia. Posteriormente se determinó el Rf de cada una de las manchas observadas en los cromatogramas y se construyeron varios esquemas de los patrones cromatográficos.

## **Análisis de la morfología foliar**

Después de obtener los resultados del análisis químico, se llevaron a cabo repetidas observaciones de los ejemplares de herbario seleccionados. Esto se hizo para evaluar las diferencias o semejanzas de la morfología foliar de dichos especímenes con el fin de determinar si había una relación entre los patrones cromatográficos hallados y las morfologías foliares. En cada ejemplar se tomaron en cuenta los siguientes factores:

1. Características morfológicas de las hojas.
2. Zona en la que fueron colectados los ejemplares.
3. Patrón cromatográfico.

Las características morfológicas analizadas fueron las siguientes:

1. Largo de la hoja: distancia medida de la base al ápice de la lámina foliar.
2. Ancho de la hoja: distancia medida de una orilla a la otra, en la zona media de la lámina foliar.
3. Radio largo/ancho: cociente de la división del largo entre el ancho de la hoja.
4. Costa: prominencia de la vena central, en la superficie adaxial de la lámina foliar.
5. Densidad de venación: cantidad de venas secundarias en 5 mm. en la superficie adaxial de la lámina foliar.
6. Color de la hoja: color de la superficie adaxial de la lámina foliar, de la vena central, de las venas laterales y de los márgenes.

## **Análisis de la distribución geográfica de los patrones cromatográficos**

Una vez que se obtuvo la información del análisis químico y de la morfología foliar, se procedió a elaborar un mapa de la distribución geográfica de los patrones cromatográficos. Así mismo se llevó a cabo un análisis de covarianza para determinar si había alguna relación entre los diferentes patrones cromatográficos y las siguientes variables geográficas: latitud, longitud, altitud y tipo de vegetación. Para esta última variable, se utilizó la clasificación de Miranda y Hernández (1963).

Se acudió al Instituto de Geografía de la Universidad Nacional Autónoma de México para consultar varias cartas y así ubicar con precisión todos los puntos en el mapa. Se dibujaron tres mapas: México, Centroamérica y Sudamérica. En éstos, se marcaron los puntos de las localidades de recolecta de los especímenes del herbario. Luego, se hizo una lista de las localidades de recolecta numeradas y se asociaron a su patrón cromatográfico, a sus variables geográficas y a su morfología foliar. Después, se procedió a analizarlos.

## RESULTADOS

Se llevó a cabo el análisis de 99 especímenes de herbario de dos taxa americanos de *Calophyllum*. El primero de ellos, nativo de la zona México-centroamericana, es llamado desde 1932 *Calophyllum brasiliense* var. *rekoi* Standl. por la mayoría de los botánicos. Aquí será denominado *Calophyllum rekoi* Standl., como lo hacen D'Arcy & Keating (1979), por las razones expuestas anteriormente. El segundo taxón corresponde a la especie brasileña *Calophyllum brasiliense* Cambess. El análisis se realizó por medio de la comparación de la morfología foliar y del patrón cromatográfico de los extractos hexánicos en cromatografía en capa fina fase normal.

### Patrones Morfológicos Foliare (PMF)

La mayoría de los ejemplares pertenecen al taxón México-centroamericano *C. rekoi* y sólo algunos pocos a la especie brasileña *C. brasiliense*. Las variables de la morfología foliar se clasificaron de la siguiente manera de acuerdo a los datos obtenidos:

1. Tamaño de la Hoja (TH): pequeño (5.0-10.0 cm), mediano (10.1-15.0 cm) y grande (15.1-20.0 cm).
2. Radio Largo/Ancho (RL/A): hoja muy ancha (1.4-2.0), hoja medianamente ancha (2.1-2.7) y hoja estrecha (2.8-3.7).
3. Costa (C): crestada (fuertemente elevada en toda su longitud), sulcada (hundida en toda su longitud), sulcada-elevada (con un surco y luego una ligera elevación en un 30%, un 50% o un 75% de su longitud), sulcada-plana (con un surco y luego plana). También se clasifica en: C1 (costa típica de la morfología foliar 1), C2 (costa típica de la morfología foliar 2) y C3 (costa que es una mezcla de las dos anteriores).
4. Venación (V) espaciada (6-8 venas en 5 mm), media (10-12 venas en 5 mm) y densa (15-20 venas en 5 mm).

Se identificaron cuatro Patrones Morfológicos Foliare (PMF), dos pertenecientes a *Calophyllum rekoi* y dos a *Calophyllum brasiliense*. A los PMF de *C. rekoi* se les llamó: PMF rekoi 1 y PMF rekoi 2; a los de *C. brasiliense*: PMF brasiliense 1 y PMF brasiliense 2. El PMF rekoi 2 presenta variaciones que se agrupan en las siguientes submorfologías PMF rekoi 2 a, PMF rekoi 2 b, PMF rekoi 2 c, y PMF rekoi 2 d. Se construyó una gráfica de las variables de los PMF rekoi, se aplicó una prueba de t a los datos para evaluar la diferencia o semejanza entre tales patrones y se tomó una fotografía de los cuatro PMF (véase figura 8). A continuación se describen las características principales de estos patrones.

#### PMF rekoi 1

Las hojas son pequeñas y estrechas (5.5-10 cm por 2-3.5 cm, con un RL/A de 1.9-3.5), sólo muy pocas son de mayor tamaño (12-16 cm por 4.3-5.2 cm, con un RL/A de 3.6-3.7). El color de la lámina foliar es generalmente marrón oscuro y no hay diferencia evidente entre éste y el color de la costa y los márgenes. La costa es prominente, alta, bien definida y se levanta como una muralla, en su inicio esta constituida por dos bordes, los cuales al unirse

forman la vena central única. En algunos especímenes estos bordes, que son altos desde el principio, permanecen una cierta distancia sin unirse, creando un estrecho y profundo surco. En la gran mayoría de los ejemplares la venación secundaria es muy densa (15-(20)/5 mm.), aunque en un ejemplar el conteo fue de 10/5 mm. Además, la venación es indefinida, es decir, las venas secundarias no se distinguen claramente, pues son poco prominentes y se confunden unas con otras, dando a la hoja lámina foliar una apariencia lisa, véase la figura 8.

### **PMF rekoi 2**

Las hojas son pequeñas (5-10 cm) o medianas (10-15 cm) aunque hay algunas grandes (15-20 cm). La mayor parte son anchas o medianamente anchas con un R L/A de 1.7-2.8. El color de la lámina foliar es generalmente verde oliva, con el margen de la hoja, la vena central y las venas secundarias en color marfil. A diferencia del PMF rekoi 1, la costa presenta un color diferente al resto de la lámina foliar y se eleva gradualmente; no como un muro, sino como una suave colina por la que ascienden las venas laterales. La costa comienza con un surco, en algunos especímenes estrecho, en otros, muy amplio, casi plano y de color oscuro. Este surco se prolonga de un 30% a un 50% de la longitud total de la lámina foliar. Es más largo, ancho y evidente en las hojas anchas y robustas, mientras que en las estrechas, de venación más densa, es más cerrado y corto. Los bordes de este surco son muy poco prominentes, por lo que el surco se forma por una depresión en el tejido, y no por la elevación de los bordes. Conforme se acerca al ápice, la costa se desvanece y adelgaza, quedando casi plana. La venación es espaciada, generalmente de (6)8-10/5 mm, aunque algunos pocos especímenes presentan una mayor densidad (12/5 mm); las venas secundarias están bien definidas.

### **Variantes del PMF rekoi 2**

Los ejemplares agrupados en los subpatrones PMF rekoi 2a, PMF rekoi 2b, PMF rekoi 2c y PMF rekoi 2d, poseen básicamente las características del PMF rekoi 2. El criterio que se ha seguido para agrupar a las hojas en tales PMF ha sido el tipo de PC que presentaron sus extractos. El PMF rekoi 2a corresponde al PC rekoi 2; el PMF rekoi 2b corresponde al PC rekoi 3; el PMF rekoi 2c corresponde al PC rekoi 4 y el PMF rekoi 2d corresponde al PC rekoi 5 (véase más adelante la descripción de los PC). Las hojas en las cuales se detectó el PC2, se tomaron como el modelo del rango de variación del PMF rekoi 2, al conjunto de características de estas hojas se les llamó PC rekoi 2a, muchas de estas hojas presentan las características típicas del PMF rekoi 2, pero también hay algunas muy variables.

El PMF rekoi 2d, a pesar de lo pequeño de la muestra, posee todo el rango de variación foliar de la MF rekoi 2a. Sin embargo, los PMF rekoi 2b y PMF rekoi 2c, presentan menos variaciones y más características típicas del PMF rekoi 2, además puede percibirse una ligera diferencia entre estos dos PMF. Las hojas del primero son principalmente pequeñas, mientras que las del segundo son más medianas que pequeñas. Aunque, en lo referente a anchura, poseen la misma proporción de hojas anchas y medianamente anchas, y muy pocas estrechas. En lo relativo a la costa, las hojas correspondientes al PMF rekoi 2b, parecen presentar todos los tipos; mientras que las del PMF rekoi 2c, no presentan la tipo 1.

Y, en cuanto a la venación, las hojas del PMF rekoi 2b poseen, en general, una venación más densa que la de las hojas del PMF rekoi 2c.

### **PMF brasiliense 1**

Las hojas son básicamente pequeñas, medianamente anchas, elípticas, oblongas u obovadas (8.0-10.3 por 4.0-4.3) con un RL/A de 1.9-2.4, color amarillo ocre, con el margen color rojo óxido. La costa es estrechamente sulcada, de color marrón oscuro, los bordes del surco no son evidentes, parece como si estuvieran metidos en él. Dicho surco llega un poco más allá de la mitad de la longitud total de la lámina foliar, después la costa es plana y su color se va haciendo cada vez más claro. La venación es espaciada (8-10/5 mm) en la parte media de la lámina foliar y más densa hacia los extremos de ésta.

### **PMF brasiliense 2**

Las hojas son pequeñas, de alrededor de 8 cm, elípticas, color avellana con un tinte rosado; el margen toma un color rojo óxido o canela, según la incidencia de la luz. La costa es sulcada, mas amplia que en la MF brasiliense 1, y con los bordes del surco visibles. El surco se cierra progresivamente, recorriendo un 75% de la longitud total, al cerrarse forma una planicie. La venación es densa e indefinida ((12)-15/5mm).



**Cuadro 8.** Prueba de t: Comparación de medias independientes (2 colas) de las variables de los patrones morfológicos foliares.

Variable	PMF reko	N	Valor Inferior	Valor Superior	Rango	Media	Desviación típica	Error típico
Largo de la Hoja	1	10	5.5	16.0	10.5	8.9000	3.1471	0.9952
	2 a	37	6.8	18.0	11.2	11.0189	2.9677	0.4879
	2 b	23	5.0	15.0	10	10.5870	2.6561	0.5338
	2 c	12	5.2	10.5	5.3	8.3333	1.6239	0.4688
	2 d	10	8.0	17.0	9	12.7300	3.2260	1.0201
Radio Largo/Ancho	1	10	1.9	3.7	1.8	2.9700	0.6701	0.2119
	2 a	37	1.7	3.2	1.5	2.3784	0.3583	0.0589
	2 b	23	1.4	2.8	1.4	2.0609	0.3272	0.0682
	2 c	12	1.8	3.0	1.2	2.2083	0.3476	0.1003
	2 d	10	2.0	3.3	1.3	2.4800	0.3994	0.1263
Costa	1	10	1	1	0	1.0000	0.0000	0.0000
	2 a	37	1	3	2	2.0541	0.4046	0.0665
	2 b	23	1	3	2	2.0870	0.7928	0.1653
	2 c	12	2	3	1	2.5000	0.5222	0.1508
	2 d	10	1	3	2	2.1000	0.7379	0.2333
Venación	1	10	10	20	10	15.0000	2.3570	0.7454
	2 a	37	8	15	7	9.5405	1.5383	0.2529
	2 b	23	8	12	4	9.0435	1.1862	0.2473
	2 c	12	6	15	9	9.9167	2.0207	0.5833
	2 d	10	8	15	7	9.7000	2.3118	0.7311

Comparación de los PMF reko	VARIABLES	t	Significancia 2 colas
PMF reko 1 y PMF reko 2 a	Largo de la hoja	-1.979	0.054
	Radio largo/ancho	3.783	0.000
	Costa	-8.173	0.000
	Venación	8.838	0.000
PMF reko 1 y PMF reko 2 d	Largo de la hoja	-2.687	0.015
	Radio largo/ancho	1.986	0.062
	Costa	-4.714	0.000
	Venación	5.076	0.006
PMF reko 2 a y PMF reko 2 d	Largo de la hoja	-1.589	0.119
	Radio largo/ancho	-0.777	0.441
	Costa	-0.263	0.794
	Venación	-0.260	0.796
PMF reko 2 a y PMF reko 2 b	Largo de la hoja	0.570	0.571
	Radio largo/ancho	3.448	0.001
	Costa	-0.213	0.832
	Venación	1.323	0.191
PMF reko 2 a y PMF reko 2 c	Largo de la hoja	2.979	0.005
	Radio largo/ancho	1.438	0.157
	Costa	-3.086	0.003
	Venación	-0.680	0.500
PMF reko 3 y PMF reko 2 c	Largo de la hoja	2.679	0.011
	Radio largo/ancho	-1.239	0.224
	Costa	-1.624	0.114
	Venación	-1.617	0.115

## VARIABLES DE LA MORFOLOGÍA FOLIAR

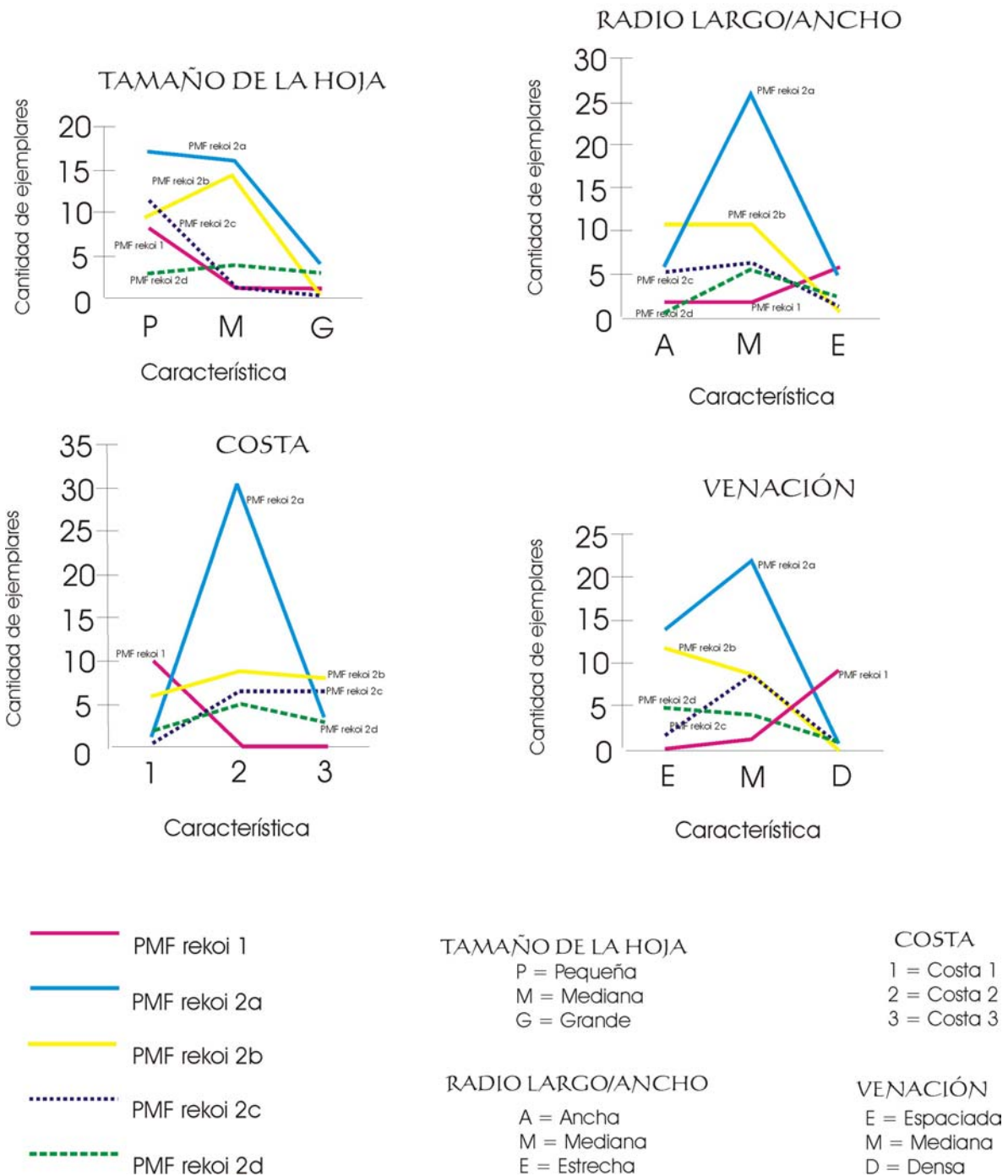
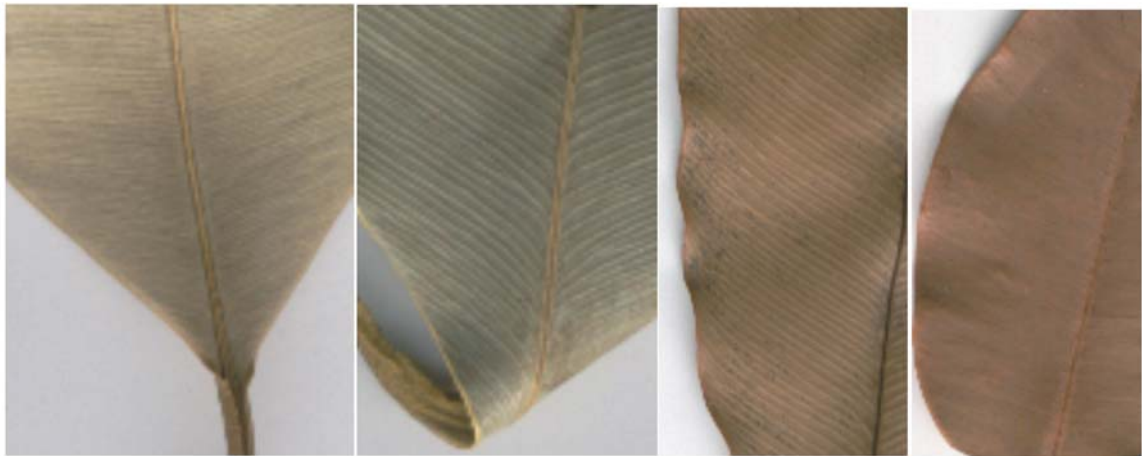


Figura 7. Representación gráfica de las variables de los Patrones Morfológicos Foliar.

PATRONES MORFOLÓGICOS FOLIARES DE  
*C. REKOI* Y *C. BRASILIENSE*



PMF rekoii 1

PMF rekoii 2

PMF brasiliense 1

PMF brasiliense 2

Figura 8. Patrones Morfológicos Foliar de *C. rekoii* y *C. brasiliense*.

PATRONES CROMATOGRÁFICOS DE  
*C. REKOI* Y *C. BRASILIENSE*



1. PC rekoii 1
2. PC rekoii 2
2. PC rekoii 3
4. PC rekoii 4
5. PC rekoii 5

6. PC brasiliense 1
7. PC brasiliense 2

1 2 3 4 5 6 7

Figura 9. Patrones Cromatográficos de *C. rekoii* y *C. brasiliense*.

## Patrones Cromatográficos (PC)

Se detectaron cinco patrones cromatográficos en la especie México-centroamericana *Calophyllum rekoii* y dos en la especie brasileña *Calophyllum brasiliense*. Se construyó un esquema del contorno de las manchas de todos los patrones, que incluye la información obtenida por los revelados con sulfato cérico y luz UV de onda larga. También se elaboraron dos esquemas a color: el primero de éstos muestra los PC rekoii 1 y PC rekoii 2, ya conocidos; el segundo, exhibe todos los patrones. Así mismo se dibujaron las estructuras de las moléculas correspondientes a los PC rekoii 1 y PC rekoii 2, ordenándolas de acuerdo a sus valores de Rf. También se construyó una tabla con todos los valores Rf y se describieron todas las manchas de cada patrón. Partiendo de esa información, se intentó encontrar un patrón de distribución de los compuestos en el cromatograma. Todas las tablas y esquemas mencionadas se encuentran en el Apéndice 3 “Análisis inferencial del cromatograma”; aquí sólo se muestra la imagen de los patrones cromatográficos (Fig. 9). Por otra parte, en el apéndice 4 se presenta las fotografías de las placas cromatográficas reveladas con sulfato cérico. Se incluyen ahí todas las placas que se hicieron; una parte de esas placas (las primeras cuatro de la segunda página fueron elaboradas por Elizabeth Estrada. Los números que aparecen bajo los PC corresponden a los números representados en los mapas de distribución (figs. 11 y 12), al listado de los especímenes estudiados del cuadro 9, y al esquema de los PC de la fig. 10.

### DESCRIPCIÓN DE LOS PATRONES CROMATOGRÁFICOS.

#### PC rekoii 1

En las placas reveladas con sulfato cérico este patrón aparece como una hilera vertical de manchas circulares. Entre ellas sobresale una mancha grande, de casi el doble de diámetro que las demás, con un Rf de 0.58 y que corresponde a la mezcla de cumarinas mammea A/BA + A/BB. Arriba de esta mancha se encuentra una mancha pequeña con un Rf de 0.66. Y por debajo de la mancha de canofilol (Rf = 0.47), se encuentran otras 3 manchas pequeñas correspondientes a los siguientes Rf: 0.41, 0.34 y 0.27. El cromatograma revelado con luz UV de onda larga, muestra tres manchas fluorescentes bien definidas. Una de estas manchas es, por supuesto, la mancha grande (Rf = 0.58), correspondiente a mammea A/BA + A/BB; la segunda es la mancha que se encuentra sobre ella (Rf = 0.66); y la tercera, es una mancha que se localiza exactamente debajo de la mancha grande, tiene un Rf de 0.52 y no es visible en el revelado con sulfato cérico.

Existe una enorme probabilidad de que estas tres manchas correspondan a las tres primeras cumarinas obtenidas por cromatografía en columna: mammea B/BA + B/BB, mammea A/BA + A/BB y mammea C/BA + C/BB. La cuarta cumarina, mammea B/BA ciclo F + B/BB ciclo F, es probable que esté representada por las manchas Rf = 0.41 o Rf = 0.34. Aunque no hay una indicación clara de una mancha fluorescente en esa zona, lo cual podría deberse a que la concentración de este compuesto es baja. Seguramente una de estas dos manchas es un triterpeno y la otra, la furanocumarina.

## PC rekoi 2

### PC rekoi 2a

En el cromatograma revelado con sulfato cérico, este patrón consta sólo de una mancha alargada, fusiforme, de color marrón con un  $R_f$  de 0.30. En el revelado con luz UV de onda larga, la mancha es difícil de distinguir, ya que tiene un color marrón oscuro opaco que se confunde con el fondo púrpura de la placa. Esta mancha corresponde a dos cromononas: ácido apetalico e *iso*-apetalico.

### PC rekoi 2b

En el cromatograma revelado con sulfato cérico, este patrón consta, como el anterior, de una mancha alargada, fusiforme, de color marrón con un  $R_f$  de 0.30. Sólo que, varios días después de ser revelada; aparece en el centro de esta mancha, otra de color azul índigo. En el revelado con luz UV de onda larga, en cambio, desde el principio se observan tres manchas. Las tres son pequeñas y circulares, dos de ellas son de color marrón; la tercera es amarilla fluorescente, y se encuentra en medio de las otras dos. La mancha inferior ( $R_f = 0.26$ ) corresponde al ácido apetalico, mientras que la superior ( $R_f = 0.35$ ), al ácido *iso*-apetalico y al ácido calolónico (comunic. pers. con Aguilar; Plattner et al., 1974). La mancha central ( $R_f = 0.29$ ) corresponde evidentemente a dipirano cumarinas (calanólidos A, B, C y sulatrólido). Aunque, como se verá en el apéndice 3 de esta tesis, dicha mancha fluorescente, debe corresponder a sólo uno de los dos tipos de dipiranocumarinas; sin embargo, no se observa otra mancha fluorescente.

## PC rekoi 3

En el cromatograma revelado con sulfato cérico este patrón está formado por dos manchas; la primera de ellas es pequeña y circular, de color azul índigo ( $R_f = 0.27$ ) y la segunda es alargada y fusiforme ( $R_f = 0.15$ ), semejante a la mancha del PC rekoi 2, pero más pequeña. Sin embargo, el revelado con luz UV de onda larga muestra cuatro pequeñas manchas circulares fluorescentes, siendo la más fuerte, la correspondiente a la mancha de color azul índigo. Sobre ésta se encuentra otra mancha ( $R_f = 0.34$ ) cuya fluorescencia es muy débil. Esta mancha es invisible en el revelado con sulfato cérico. La mancha alargada que se encuentra bajo la mancha azul índigo consta en realidad de dos pequeñas manchas fluorescentes ( $R_f = 0.18$  y  $0.13$ ).

Al parecer, estas manchas corresponden a cuatro diferentes tipos de cumarinas, siendo la mancha azul índigo, con seguridad, una dipiranocumarina (véase el Apéndice 3 de esta tesis, así como el artículo de Mc Kee et al., 1998). Esta mancha es semejante a la del PC rekoi 2b, sin embargo, las dos manchas no tienen el mismo  $R_f$ , la del PC rekoi 2b está ligeramente por encima de la del PC rekoi 3. Además, en este último patrón, la mancha, al ser revelada con sulfato cérico aparece inmediatamente; no es necesario esperar varios días

para poder verla. Tal vez la mancha fluorescente con  $R_f = 0.34$  represente a una monofuranocumarina por dos razones: primero, por que se encuentra en una zona semejante a aquella donde debería estar la monofuranocumarina del PC rekoi 1; segundo, por que no parece ser una dipiranocumarina, pues no es de color azul índigo. Respecto a las dos manchas fluorescentes que conforman la mancha alargada, ellas podrían corresponder a un par *cis-trans*, tal vez la calocumarina A y la brasimarina C, cumarinas del QT brasiliense 1 (Ito et al., 2003).

#### **PC rekoi 4**

En el cromatograma revelado con sulfato cérico, este patrón aparece como una sola mancha, de la misma forma y tamaño que la de cromanona del PC rekoi 2a. Sin embargo, esta mancha posee un  $R_f$  notablemente más bajo ( $R_f = 0.18$ ). Al ser revelada con luz UV de onda larga no muestra fluorescencia; su color es marrón oscuro opaco. Seguramente es una mancha formada por cromanonas, pero diferentes del ácido apetalico. Recientemente Cottiglia et al. (2004) reportaron la presencia de nuevas cromanonas en plantas de *Calophyllum* colectadas en Sotepan, Veracruz. El descubrimiento de estos compuestos, llamados ácidos brasiliensofilicos A, B y C, es importante, pues son 4-fenil cromanonas y hasta ahora sólo se habían encontrado 4-alkil cromanonas en América (Plattner et al., 1974; Stout et al., 1968). Es probable que estos compuestos, pero en una etapa biogenética más avanzada, sean los constituyentes del PC rekoi 4. Si en los ácidos brasiliensofilicos se perdiera la cadena modificada de la estructura geminal, quedando sólo la cadena de prenilo, y luego esta última se ciclisara, el resultado sería una cromanona idéntica al ácido chapelierico (Sustaita en prep.). Como el ácido chapelierico parece una estructura más polar que los ácidos brasiliensofilicos, se considera aquí que ese podría ser el compuesto representado por la mancha de cromanona del PC rekoi 4.

#### **PC rekoi 5**

En el cromatograma revelado con sulfato cérico, aparecen una serie de manchas circulares (las superiores a veces un poco aplanadas), que se extienden hacia arriba y hacia abajo del  $R_f$  0.50. Estas manchas son similares a las del PC rekoi 1, pero no se ajustan completamente a este patrón, están un poco más arriba o más abajo; o faltan o aparecen manchas fluorescentes con un  $R_f$  muy bajo, donde no las presenta el PC rekoi 1. En el cromatograma revelado con luz UV de onda larga se observan varias manchas fluorescentes y ninguna como las de cromanona. El esquema muestra sólo uno de estos levemente diferentes grupos de manchas. Se ha elegido el más semejante al PC rekoi 1, pero hay otros que exhiben manchas fluorescentes más abajo. Muy probablemente las sustancias que conforman este patrón sean diferentes tipos de cumarinas.

#### **PC brasiliense 1**

En el cromatograma revelado con sulfato cérico, este patrón aparece como un grupo de tres manchas circulares del mismo tamaño: la primera directamente por encima de la mancha de canofilol; la segunda, debajo de la mancha de este compuesto, y la tercera aún más abajo. Los  $R_f$  de estas manchas son: 0.52, 0.41, 0.27 respectivamente. Sin embargo, el revelado

con luz UV de onda larga muestra tres manchas fluorescentes, de las cuales sólo una coincide con las anteriores. Los Rf son: 0.72, 0.41 y 0.30. No aparece mancha alguna de cromanona. Es muy probable que este patrón esté constituido por varios tipos de cumarinas. Un artículo recientemente publicado por Ito, et al., (2003), reporta el aislamiento de varias cumarinas en la especie brasileña *C. brasiliense*. El material para este estudio fue colectado en Santa Catarina, estado vecino de Paraná, lugar donde ha sido detectado el PC brasiliense 1. Existen grandes probabilidades de que los compuestos reportados en dicho artículo, sean los integrantes de dicho patrón.

### **PC brasiliense 2**

Tanto en el cromatograma revelado con sulfato cérico, como en el revelado con luz UV de onda larga, aparece una sola mancha; muy semejante a la del PC rekoï 2 a, sin ninguna fluorescencia. Es muy probable que contenga ácido apetalico e *iso*-apetalico o cromanonas muy semejantes a éstas.

## **Distribución geográfica de los PC**

Se analizaron 81 especímenes recolectados en México, 11 recolectados en Centroamérica y sólo siete en Sudamérica. La mayor parte del análisis se centró en los especímenes mexicanos, debido a que sus datos son más abundantes y completos. Estos datos han sido verificados y complementados consultando diversas cartas geográficas de México (véase la cartografía en la sección de Referencias). La verificación y complementación de los datos centro y sudamericanos fue más difícil. Se trató por lo menos de obtener la latitud y longitud geográficas (faltantes en muchos ejemplares), para poder ubicar los puntos en el mapa. Respecto a la altitud, muchos ejemplares carecen de este dato, y lo mismo sucede con el tipo de vegetación. Pero, además, la clasificación de esta última variable, en Centro y Sudamérica, es diferente a la utilizada preferentemente en México (Miranda y Hernández, 1963). De esta manera, el objeto primordial del análisis, son los datos de los ejemplares mexicanos. Por otra parte, se aplicó a los datos una prueba estadística de correlación bivariada de dos colas; pero dicha prueba no arrojó resultados significativos. No parece haber relación entre los patrones cromatográficos y las variables geográficas. Se elaboraron tres mapas de distribución; el primero de ellos, de México; el segundo, de Centroamérica; y el tercero, de Sudamérica (figuras 8 y 9).

### **PC rekoï 1**

El PC rekoï 1 tiene una frecuencia de aparición muy baja y una limitada zona de distribución en México, concentrándose en un sitio muy pequeño, en la zona de los Chimalapas. Sin embargo, también se encuentra en una localidad de Guerrero y el material del cual se aisló el PC rekoï 1, fue colectado en la Sierra de Santa Martha, Veracruz, región cercana al Golfo de México (véase el mapa). Estos dos hechos podrían indicar que la zona de distribución del PC rekoï 1 es más amplia y que la muestra es pequeña. Aunque, por otra parte, es también significativo el hecho de que el PC rekoï 1 aparezca con tanta abundancia en una zona tan pequeña; y no se encuentre en la vertiente del Pacífico (salvo el caso antes mencionado); ni en la región sureste: Chiapas, Tabasco, Campeche y Quintana Roo. Claro

que, de los últimos tres estados se han tomado muy pocas muestras, sin embargo, de la región de la selva lacandona (Chiapas y parte de Tabasco), la cantidad de muestras es bastante buena, pero aún así, no aparece el PC rekoï 1 (ni el PC rekoï 2). Si sólo se observa el mapa de distribución de México, parece como si el PC rekoï 1, se encontrara sólo en la pequeña área antes mencionada y no avanzara más al sureste. No obstante, cuando se observa el mapa de Centroamérica, se ve que dicho PC, avanza por todo el territorio centroamericano, empezando por Belice y Guatemala. Esto parece indicar que el PC rekoï 1 se encuentra agrupado en ciertas zonas.

### **PC rekoï 2**

El PC rekoï 2 es el más abundante de todos; se distribuye ampliamente en gran parte de la zona tropical de México, excepto en la región de la selva lacandona, y área circundante. Igual que el PC rekoï 1, parece detenerse en la zona oeste de Chiapas y Tabasco, y de la misma manera que el PC rekoï 1, aparece posteriormente en la zona centroamericana. Sólo que, esta vez es bastante más escaso, lo cual se debe, sin duda, a la baja cantidad de muestras. Tres especímenes de Sudamérica presentaron en el análisis cromatográfico una mancha semejante a la del PC rekoï 2. Los dos primeros, de Colombia y Perú, respectivamente, poseen morfologías foliares más parecidas a *C. rekoï* que a *C. brasiliense*. El tercero, es un ejemplar brasileño, cuya morfología foliar es muy semejante a la reconocida como típica de *C. brasiliense*. Por esta razón, los dos primeros fueron marcados como poseedores del PC rekoï 2; en cambio, el tercero se determinó como PC brasiliense 2. Este último PC es considerado diferente del PC rekoï 2; aunque, en realidad, las manchas de estos tres especímenes son indistinguibles.

### **PC rekoï 3, PC rekoï 4 y PC rekoï 5**

El PC rekoï 3 es el segundo en abundancia y también se distribuye ampliamente; en Oaxaca (cerca de la zona de los Chimalapas), en Chiapas (selva lacandona), en parte de Tabasco, Campeche, Quintana Roo y varias zonas de Veracruz. También se encuentra en Centroamérica. En cambio, el PC rekoï 4 tiene una distribución limitada, concentrada en la zona de la selva lacandona, aunque también tiene algunos representantes en Tabasco, Veracruz y Campeche. Dicho PC parece relacionarse en su distribución con el PC rekoï 3, de hecho, en el área de la selva lacandona, sólo se encuentran estos dos patrones. También se encuentra en Centroamérica. En cuanto al PC rekoï 5, este conflictivo patrón se encuentra en dos zonas: una de ellas se ubica en los estados de Jalisco, Colima y Michoacán; la otra, en la región entre Chiapas y Oaxaca, cercana al Golfo de Tehuantepec. En Centroamérica no se detectó, pero esto se debe probablemente a la escasa cantidad de muestras.

### **PC brasiliense 1 y PC brasiliense 2**

Ahora, en lo concerniente a los patrones de *C. brasiliense*, el PC brasiliense 1 no se encuentra ni en México, ni en Centroamérica. Se localiza en la zona Sudeste y Sur de Brasil, cerca de la costa. Un ejemplar boliviano mostró un PC similar, pero las hojas de este espécimen eran de diferente color de las brasileñas, por lo cual no se le tomó en cuenta; aunque si se marcó su ubicación en el mapa. Es probable que el PC brasiliense 2 contenga

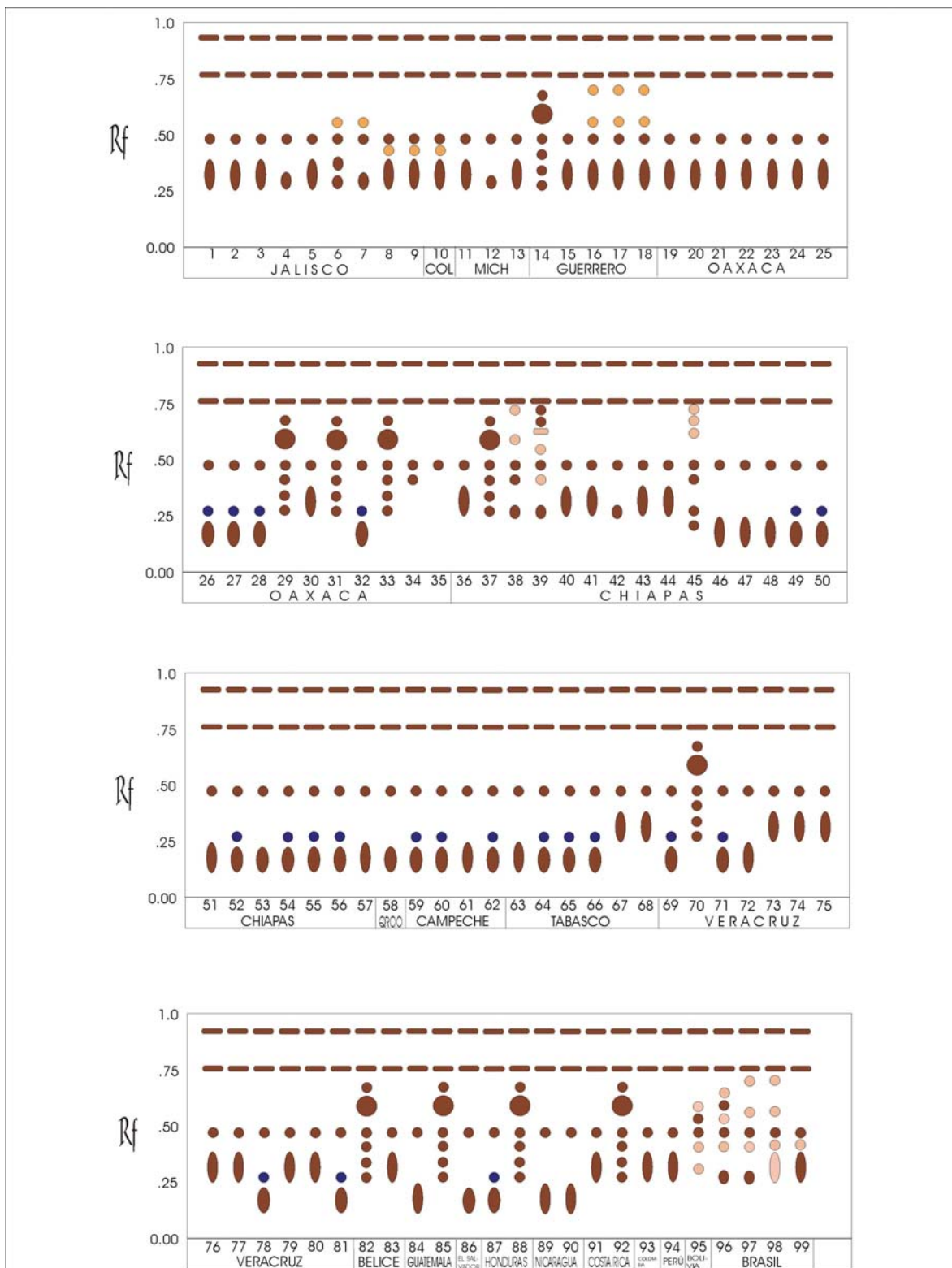


chromonomas semejantes a las del PC 2, pues posee una mancha muy similar a la de éste. Sin embargo, aquí se le considera como un PC diferente del PC por dos razones. La primera de ellas es por que la morfología del ejemplar del que se obtuvo el extracto es diferente de la correspondiente al PC rekoi 2. La segunda razón es que el ejemplar mencionado se colectó en una región muy alejada del lugar donde se encuentra el PC rekoi 2.

**Cuadro 9.** Listado de los especímenes estudiados, donde se muestra el PC, el PMF y la distribución en los mapas.

No. mapa	Patrón Cromatográfico	Patrón Morfológico Foliar	Especimen	País	Entidad
1	PC rekoi 2	PMF rekoi 2 a	<i>A. Delgado et al. 181</i>	México	Jalisco
2	PC rekoi 2	PMF rekoi 2 a	<i>L. M. Villareal de P. et al. 9630</i>	México	Jalisco
3	PC rekoi 2	PMF rekoi 2 a	<i>Hernández et al. 3022</i>	México	Jalisco
4	PC rekoi 2	PMF rekoi 2 a	<i>G. Castillo C. et al. 10287</i>	México	Jalisco
5	PC rekoi 2	PMF rekoi 2 a	<i>E. J. Lott 2546</i>	México	Jalisco
6	PC rekoi 5	PMF rekoi 2 d	<i>A. Pérez J. 817</i>	México	Jalisco
7	PC rekoi 5	PMF rekoi 2 d	<i>R. Cuevas et al 3091</i>	México	Jalisco
8	PC rekoi 2	PMF rekoi 2 a	<i>F. J. Santana et al. 6356</i>	México	Jalisco
9	PC rekoi 5	PMF rekoi 2 d	<i>L. Robles H. 525</i>	México	Jalisco
10	PC rekoi 5	PMF rekoi 2 d	<i>B. P. Reko s. n.</i>	México	Colima
11	PC rekoi 2	PMF rekoi 2 a	<i>B. Guerrero C. 757</i>	México	Michoacán
12	PC rekoi 5	PMF rekoi 2 d	<i>B. Guerrero C. 327</i>	México	Michoacán
13	PC rekoi 2	PMF rekoi 2 a	<i>E. Guerrero C. 434</i>	México	Michoacán
14	PC rekoi 1	PMF rekoi 1	<i>J. C. Soto N. et al. 5183</i>	México	Guerrero
15	PC rekoi 2	PMF rekoi 2 a	<i>J. C. Soto N. 11724</i>	México	Guerrero
16	PC rekoi 2	PMF rekoi 2 a	<i>J. Freeland et al. 132</i>	México	Guerrero
17	PC rekoi 2	PMF rekoi 2 a	<i>D. H. Lorence et al. 3829</i>	México	Guerrero
18	PC rekoi 2	PMF rekoi 2 a	<i>R. E. González F. 418</i>	México	Guerrero
19	PC rekoi 2	PMF rekoi 2 a	<i>R. Torres C. et al. s. n.</i>	México	Oaxaca
20	PC rekoi 2	PMF rekoi 2 a	<i>C. Conzatti 4380</i>	México	Oaxaca
21	PC rekoi 2	PMF rekoi 2 a	<i>R. Torres et al. 2617</i>	México	Oaxaca
22	PC rekoi 2	PMF rekoi 2 a	<i>J. Rivera H. et al. 1095</i>	México	Oaxaca
23	PC rekoi 2	PMF rekoi 2 a	<i>T. D. Pennington et al. 9328</i>	México	Oaxaca
24	PC rekoi 2	PMF rekoi 2 a	<i>E. Martínez et al. 23937</i>	México	Oaxaca
25	PC rekoi 2	PMF rekoi 2 a	<i>A. Campos V. et al. 3636</i>	México	Oaxaca
26	PC rekoi 3	PMF rekoi 2 a	<i>F. Miranda 4165</i>	México	Oaxaca
27	PC rekoi 3	PMF rekoi 2 a	<i>R. Cedillo T. et al. 1134</i>	México	Oaxaca
28	PC rekoi 3	PMF rekoi 2 a	<i>R. Torres C. et al. 11167</i>	México	Oaxaca
29	PC rekoi 1	PMF rekoi 1	<i>H. Hernández G. 2107</i>	México	Oaxaca
30	PC rekoi 2	PMF rekoi 2 a	<i>H. Hernández G. 462</i>	México	Oaxaca
31	PC rekoi 1	PMF rekoi 1	<i>P. Vera C. et al. 119</i>	México	Oaxaca
32	PC rekoi 3	PMF rekoi 2 b	<i>H. Hernández G. 1892</i>	México	Oaxaca
33	PC rekoi 1	PMF rekoi 1	<i>S. Salas M. et al. 1745 bis</i>	México	Oaxaca
34	PC rekoi 5	PMF rekoi 2 d	<i>S. Maya J. 3719</i>	México	Oaxaca
35	PC rekoi 2	PMF rekoi 2 a	<i>T. Wendt et al. 5140</i>	México	Oaxaca
36	PC rekoi 2	PMF rekoi 2 a	<i>F. Miranda 6610</i>	México	Chiapas
37	PC rekoi 1	PMF rekoi 1	<i>L. González Q. 3511</i>	México	Chiapas
38	PC rekoi 5	PMF rekoi 2 d	<i>F. Miranda 7253</i>	México	Chiapas
39	PC rekoi 5	PMF rekoi 2 d	<i>D. E. Breedlove 52786</i>	México	Chiapas
40	PC rekoi 2	PMF rekoi 2 a	<i>D. E. Breedlove 20613</i>	México	Chiapas
41	PC rekoi 2	PMF rekoi 2 a	<i>J. Chavelas P. et al. 2022</i>	México	Chiapas
42	PC rekoi 5	PMF rekoi 2 d	<i>D. E. Breedlove et al. 30649</i>	México	Chiapas
43	PC rekoi 2	PMF rekoi 2 a	<i>D. E. Breedlove 50694</i>	México	Chiapas

44	PC rekoi 2	PMF rekoi 2 a	<i>F. Miranda 5947</i>	México	Chiapa
45	PC rekoi 5	PMF rekoi 2 d	<i>E. Ventura et al. 492</i>	México	Chiapas
46	PC rekoi 4	PMF rekoi 2 c	<i>T. D. Pennington et al. 9172</i>	México	Chiapas
47	PC rekoi 4	PMF rekoi 2 c	<i>A. Duran et al. 424</i>	México	Chiapas
48	PC rekoi 4	PMF rekoi 2 c	<i>J. L. López G. 18</i>	México	Chiapas
49	PC rekoi 3	PMF rekoi 2 b	<i>D. E. Breedlove et al. 29838</i>	México	Chiapas
50	PC rekoi 3	PMF rekoi 2 b	<i>J. I. Calzada 2747</i>	México	Chiapas
51	PC rekoi 4	PMF rekoi 2 c	<i>S. Levi T. et al. s. n.</i>	México	Chiapas
52	PC rekoi 3	PMF rekoi 2 b	<i>J. Meave et al 13596</i>	México	Chiapas
53	PC rekoi 4	PMF rekoi 2 c	<i>E. Martínez S. 7417</i>	México	Chiapas
54	PC rekoi 3	PMF rekoi 2 b	<i>E. Martínez S. et al. 12437</i>	México	Chiapas
55	PC rekoi 3	PMF rekoi 2 b	<i>A. Reyes G. et al. 2261</i>	México	Chiapas
56	PC rekoi 3	PMF rekoi 2 b	<i>E. Martínez S. et al. 25197</i>	México	Chiapas
57	PC rekoi 4	PMF rekoi 2 c	<i>E. Martínez S. et al. 25248</i>	México	Chiapas
58	PC rekoi 3	PMF rekoi 2 b	<i>E. Cabrera et al. 4190</i>	México	Quintana Roo
59	PC rekoi 3	PMF rekoi 2 b	<i>J. S. Marroquín 230</i>	México	Campeche
60	PC rekoi 3	PMF rekoi 2 b	<i>E. Hernández X. 190</i>	México	Campeche
61	PC rekoi 4	PMF rekoi 2 c	<i>E. Martínez S. et al. 28135</i>	México	Campeche
62	PC rekoi 3	PMF rekoi 2 b	<i>E. Martínez S. et al. 29325</i>	México	Campeche
63	PC rekoi 4	PMF rekoi 2 c	<i>A. Novelo et al 174</i>	México	Tabasco
64	PC rekoi 3	PMF rekoi 2 b	<i>J. I. Calzada 2333</i>	México	Tabasco
65	PC rekoi 3	PMF rekoi 2 b	<i>González L. et al. 243</i>	México	Tabasco
66	PC rekoi 3	PMF rekoi 2 b	<i>C. L. Gilly et al. 216</i>	México	Tabasco
67	PC rekoi 2	PMF rekoi 2 a	<i>González L. et al. 10708</i>	México	Tabasco
68	PC rekoi 2	PMF rekoi 2 a	<i>A. Ma. Hanan A. et al. 963</i>	México	Tabasco
69	PC rekoi 3	PMF rekoi 2 b	<i>A. D. L. Orozco S. 320</i>	México	Veracruz
70	PC rekoi 1	PMF rekoi 1	<i>T. Wendt et al. 3648</i>	México	Veracruz
71	PC rekoi 3	PMF rekoi 2 b	<i>B. P. Reko s. n.</i>	México	Veracruz
72	PC rekoi 4	PMF rekoi 2 c	<i>J. M. León Cázares C. 118</i>	México	Veracruz
73	PC rekoi 2	PMF rekoi 2 a	<i>Antonio 1474</i>	México	Veracruz
74	PC rekoi 2	PMF rekoi 2 a	<i>R. Cedillo T. et al. 2581</i>	México	Veracruz
75	PC rekoi 2	PMF rekoi 2 a	<i>M. Sousa 4527</i>	México	Veracruz
76	PC rekoi 2	PMF rekoi 2 a	<i>R. Cedillo T. 2853</i>	México	Veracruz
77	PC rekoi 2	PMF rekoi 2 a	<i>R. Cedillo T. 2753</i>	México	Veracruz
78	PC rekoi 3	PMF rekoi 2 b	<i>R. Cedillo T. 3501</i>	México	Veracruz
79	PC rekoi 2	PMF rekoi 2 a	<i>J. Ibarra M. 953</i>	México	Veracruz
80	PC rekoi 2	PMF rekoi 2 a	<i>J. Ibarra M. 757</i>	México	Veracruz
81	PC rekoi 3	PMF rekoi 2 b	<i>C. Gutiérrez B. 1030</i>	México	Veracruz
82	PC rekoi 1	PMF rekoi 1	<i>P. H. Gentle 3153</i>	Belice	Stann Creek
83	PC rekoi 2	PMF rekoi 2 a	<i>P. H. Gentle 5347</i>	Belice	Toledo
84	PC rekoi 4	PMF rekoi 2 c	<i>C. L. Lundell et al. 20547</i>	Guatemala	Petén
85	PC rekoi 1	PMF rekoi 1	<i>M. Véliz s. n.</i>	Guatemala	Chiquimula
86	PC rekoi 3	PMF rekoi 2 b	<i>J. Linares et al 5012</i>	El Salvador	Santa Ana
87	PC rekoi 3	PMF rekoi 2 b	<i>C. Nelson 7324</i>	Honduras	Comayagua
88	PC rekoi 1	PMF rekoi 1	<i>R. Liesner 26394</i>	Honduras	Atlántida
89	PC rekoi 4	PMF rekoi 2 c	<i>J. C. Sandino 4858</i>	Nicaragua	Zelaya
90	PC rekoi 4	PMF rekoi 2 c	<i>P. Moreno 23761</i>	Nicaragua	Zelaya
91	PC rekoi 2	PMF rekoi 2 a	<i>R. Liesner 14149</i>	Costa Rica	Alajuela
92	PC rekoi 1	PMF rekoi 1	<i>R. Aguilar 691</i>	Costa Rica	Aguas Buenas
93	PC rekoi 2	PMF rekoi 2 a	<i>A. Gentry 40436</i>	Colombia	Valle del Cauca
94	PC rekoi 2	PMF rekoi 2 a	<i>A. Gentry et al. 20774</i>	Perú	Loreto
95	PC brasiliense 1	PMF brasiliense 1	<i>I. G. Vargas et al. s. n.</i>	Bolivia	Santa Cruz
96	PC brasiliense 1	PMF brasiliense 1	<i>G. Hatschbach et al. s. n.</i>	Brasil	Minas Gerais
97	PC brasiliense 1	PMF brasiliense 1	<i>G. Hatschbach et al. 67202</i>	Brasil	Minas Gerais
98	PC brasiliense 1	PMF brasiliense 1	<i>J. M. Silva 1064</i>	Brasil	Paraná
99	PC brasiliense 2	PMF brasiliense 2	<i>W. R. Anderson 10778</i>	Brasil	Pará



**Figura 10.** Esquema de los patrones cromatográficos (como se ven en el revelado con sulfato cérico), ordenados según su distribución geográfica.

## DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LOS PATRONES CROMATOGRÁFICOS

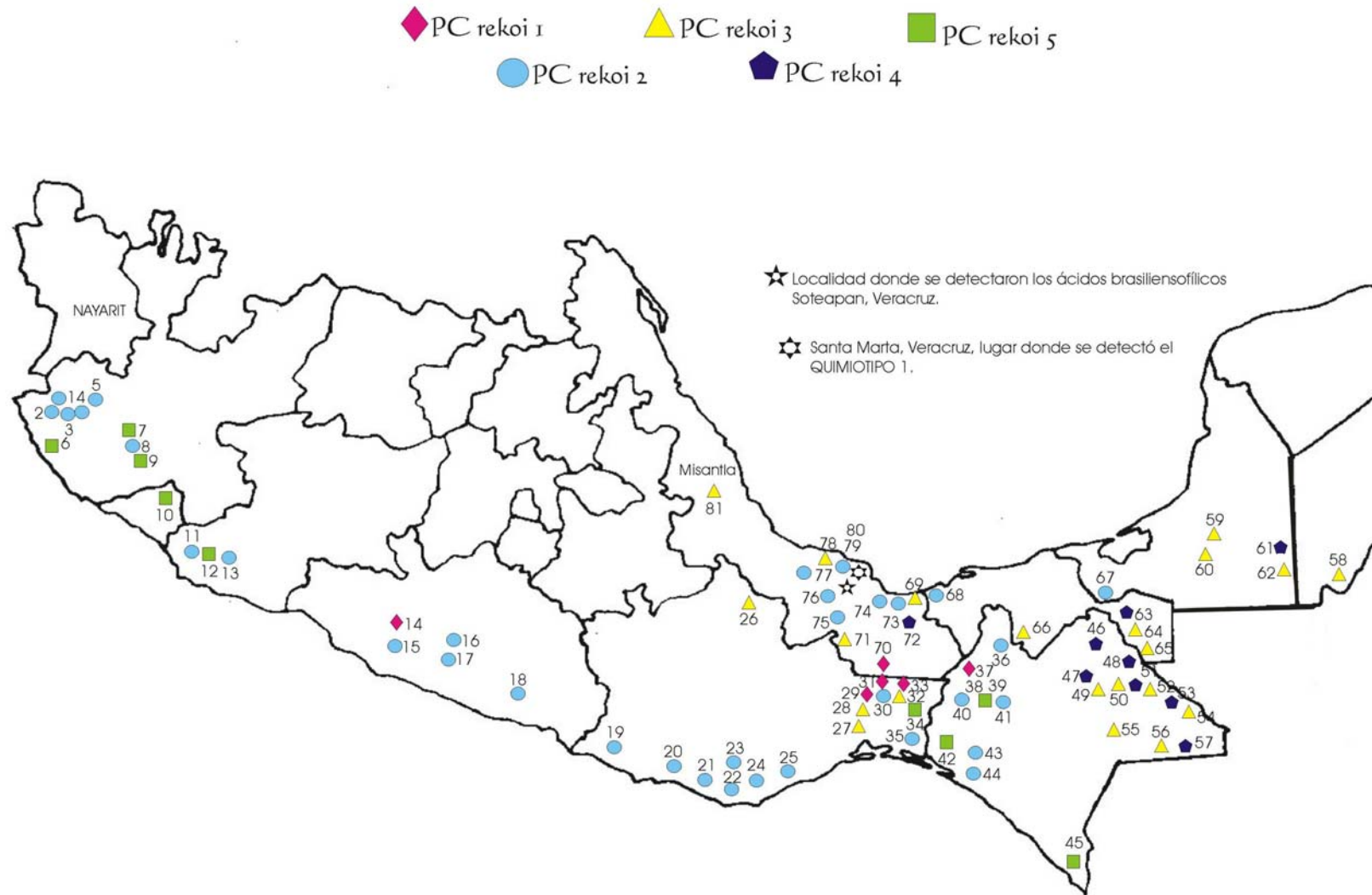
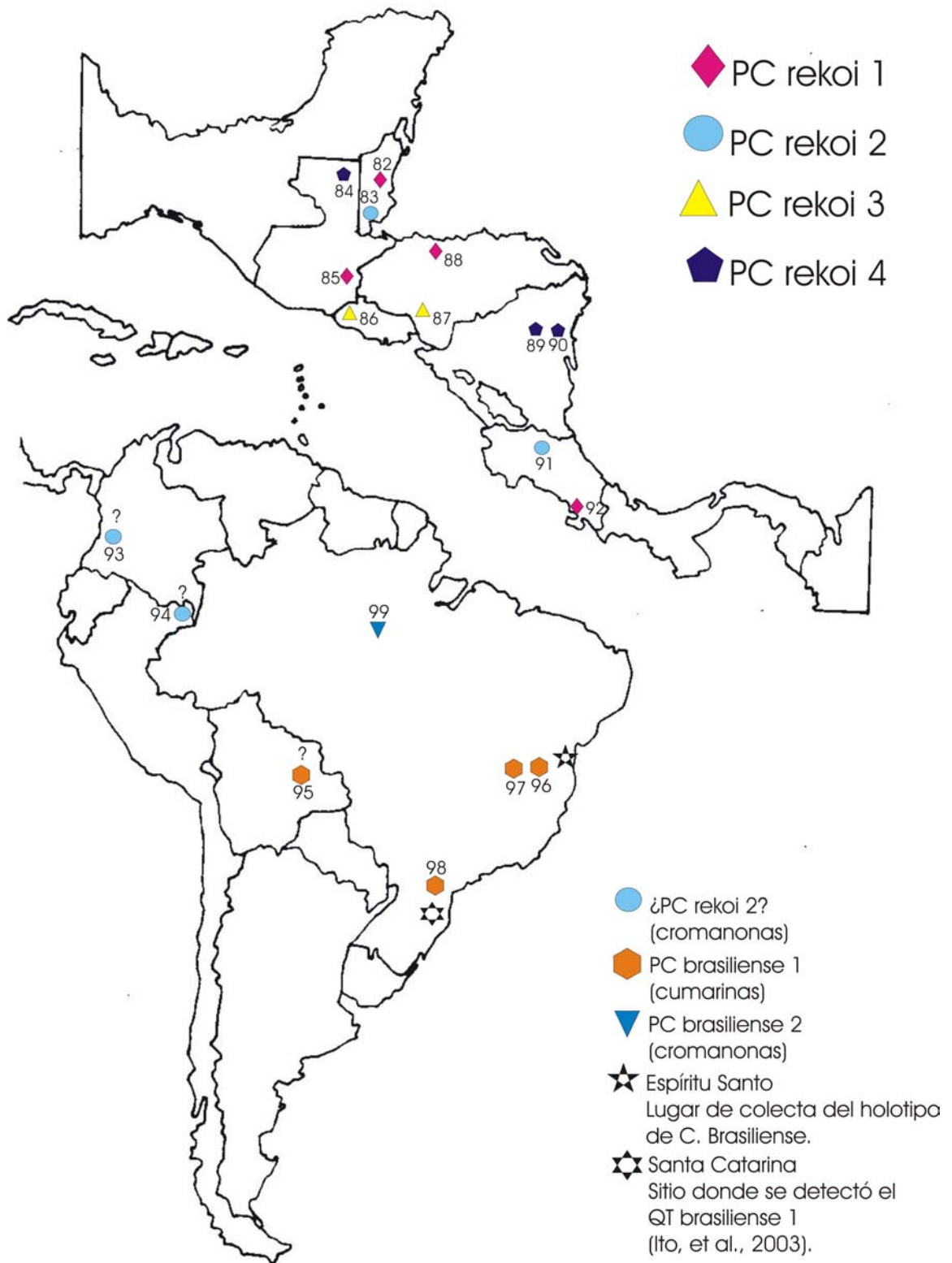


Figura 11. Mapa de distribución de los Patrones Cromatográficos de *C. rekoii* en México.



**Figura 12.** Mapa de distribución de los Patrones Cromatográficos de *C. rekoï* y *C. brasiliense* en Centro y Sudamérica.

## DISCUSIÓN

### Validez del uso de los quimiotipos como marcadores taxonómicos

La controversia acerca de la validez del uso de las micromoléculas (metabolitos secundarios: alcaloides, flavonoides, terpenoides, etc.) como marcadores taxonómicos es antigua. Algunos científicos han llegado a opinar que tales moléculas son sólo productos de desecho y que, por lo tanto, no tienen ningún valor taxonómico. Otros, por el contrario, los consideran como valiosos elementos, indispensables en la determinación taxonómica. La mayoría, sin embargo, cree que son marcadores imprecisos, no totalmente confiables. La razón de esta desconfianza se debe a que las micromoléculas están muy influenciadas por las condiciones ambientales, lo que las hace variables y por esto, se prefiere a los caracteres morfológicos o a las macromoléculas como marcadores taxonómicos (Gottlieb, 1982; Jones Jr., 1988).

Sin embargo, desde el punto de vista de la Panbiogeografía, que es la rama más vanguardista dentro de la Biogeografía y que se basa en los más recientes descubrimientos de la biología molecular, la concepción dicotómica entre organismos y ambiente es considerada sumamente reduccionista y linear (Craw et al., 1999; Espinosa & Llorente, 1993; Espinosa et al., 2002). Como alternativa, la Panbiogeografía propone una aproximación construccionista en la que no hay diferencia entre genes y ambiente. En ese esquema, los caracteres morfológicos son producidos a través de un proceso epigenético (conjunto de rasgos orgánismicos y ambientales). La Panbiogeografía sostiene que:

Un organismo y su ambiente no existen antes de su relación. Así, un gen sólo puede ser funcionalmente definido en un contexto de desarrollo específico, y el ambiente de un organismo sólo puede ser identificado en relación al organismo. Este ambiente juega un rol esencial en la construcción de su fenotipo, y recíprocamente, el organismo selecciona y modifica (o sea construye) este ambiente fuera de los recursos que están disponibles.

Un punto de vista construccionista de la herencia y del desarrollo conduce al concepto de fenotipos que son construidos cada generación más bien que transmitidos entre generaciones.... La información de desarrollo requerida para la formación de caracteres o rasgos no yace ni en los genes ni en el ambiente, sino en la relación contingente entre ellos. Como la información no está localizada en los genes o en cualquier entidad particular, el control del desarrollo no reside en el genoma, sino que está diseminado a través del sistema de desarrollo, el cual está en constante circulación. (Craw et al., 1999)

Dentro de este marco panbiogeográfico los metabolitos secundarios tienen el mismo valor como marcadores taxonómicos que los metabolitos primarios o que los caracteres morfológicos. Si bien es cierto que es más difícil interpretar el mensaje proporcionado por los metabolitos secundarios que el proporcionado por los otros dos tipos de marcadores. Tal vez ello se deba a que todavía no se considera al ambiente como parte del organismo. Los metabolitos secundarios comunican una importante información acerca de la parte del organismo que es “ambiente”, ellos son el enlace entre estas dos dimensiones.

A pesar de que muchos estudios quimiotaxonómicos han comprobado el valor de los metabolitos secundarios como marcadores taxonómicos (Jones, Jr., 1988), el trabajo con tales metabolitos es difícil, pues los resultados proporcionan continuas sorpresas. Ejemplo de esto es el siguiente caso: En 1960 Alston y Turner demostraron la hibridación entre especies de *Baptisia* (Fabaceae) mediante el uso de patrones cromatográficos de los flavonoides de estas especies. Examinaron los perfiles de los flavonoides de los dos progenitores y encontraron que eran mutuamente excluyentes en todos, o en al menos varios compuestos. Alston y Turner descubrieron que algunos compuestos específicos de la especie de cada progenitor se encontraban juntos en los híbridos, y llamaron a este fenómeno “perfil aditivo”. Eso dio lugar al siguiente postulado: “cuando se hibridizan dos progenitores químicamente distintos, la generación F<sub>1</sub> muestra un perfil aditivo de los dos tipos parentales” (Jones, Jr., 1988).

Sin embargo, investigaciones posteriores mostraron resultados que contradecían tal postulado. En 1982 Crawford y Giannasi estudiaron los flavonoides de especies de *Rhododendron* (Ericaceae) y sus híbridos, pero ellos no encontraron un perfil aditivo en la herencia de sus flavonoides, sino, perfiles variables. Tiempo después, Giannasi et al. hicieron un análisis de especies de *Solidago* (Asteraceae) y descubrieron, dentro del mismo género perfiles aditivos y variables, pero además encontraron que muchos híbridos producían compuestos que no aparecían en los progenitores. La conclusión que se deriva de las discrepancias de los estudios mencionados es que “se necesita una investigación profunda sobre la herencia de los flavonoides y su expresión en especies diploides y poliploides” (Jones, Jr., 1988).

La experiencia obtenida en el estudio de los quimiotipos de *Calophyllum* no es muy diferente de la anterior, está también llena de sorpresas, enigmas y paradojas, como se verá a continuación. Stevens (1980) considera que en Sri Lanka hay 10 especies de *Calophyllum*: *C. thwaitesii*, *C. trapezifolium*, *C. walkeri*, *C. cuneifolium*, *C. calaba* (var. *calaba* y var. *worthingtonii*), *C. bracteatum*, *C. cordato-oblongum*, *C. moonii*, *C. tomentosum* y *C. vergens*. Él afirma que las primeras cinco especies están evidentemente relacionadas entre sí; mientras que las últimas cinco no muestran una clara relación ni entre ellas mismas, ni con las cinco primeras. De manera que, puede decirse que en Sri Lanka hay dos grupos de especies. Por otra parte, Bandara et al. (1986) encuentran que en Sri Lanka hay dos grupos químicos: uno con cumarinas y otro con cromanonas. Ellos estudian cuatro especies del primer grupo de Stevens: *C. thwaitesii*, *C. trapezifolium* (que incluye a *C. lankaensis*), *C. walkeri* y *C. calaba* (ellos no mencionan la variedad, aquí se ha supuesto que se trata de la var. *calaba*), este grupo contiene cromanonas. Del segundo grupo de Stevens, ellos estudian sólo dos especies: *C. cordato-oblongum* y *C. moonii*. Este grupo contiene cumarinas.

De los datos obtenidos por Bandara et al. (1986), se puede concluir que los quimiotipos de *Calophyllum* son excelentes marcadores taxonómicos, pues se adecuan por completo a la clasificación de Stevens (1980). Por una parte, se observa una clara diferencia entre los dos grupos de especies, uno tiene cumarinas, el otro cromanonas. Por otra, en las dos especies que no están estrechamente relacionadas, y que contienen cumarinas, la diferencia es también clara y bien definida: una especie contiene 4-alkil dipiranocumarinas, la otra 4-fenil dipiranocumarinas. Mientras que, en el grupo de especies claramente emparentadas,

que tiene cromanonas, todas estas sustancias pertenecen al mismo grupo: 4-fenil cromanonas, además de que un mismo compuesto es compartido por varias especies.

Sin embargo, al conocer los datos de los quimiotipos de México (Estrada, 2001; Huerta et al., 2004; Reyes et al., 2004), todo se complica. En primer lugar, las cumarinas del QT rekoï 1 no son típicas del género *Calophyllum*, sino del género *Mammea*, un pariente cercano. (Estrada, 2001; Stevens, 1980). En el género *Mammea* predominan las cumarinas en las cuales las cadenas de acilo y/o prenilo no se ciclizan, en algunas se cicliza la cadena de prenilo formando monopirano o monofurano cumarinas (Crombie et al., 1966, 1967, 1970, 1985, 1987; Carpenter, 1970; Crichton, 1978). Por el contrario, en *Calophyllum*, durante mucho tiempo se aislaron una gran cantidad de cumarinas del tipo dipirano, algunas del tipo monopirano y ninguna del tipo monofurano o del tipo que tiene las dos cadenas sin ciclizar (Mc Kee, et al., 1998). En 2001, Estrada reporta el aislamiento (en el taxón mexicano de *Calophyllum*) de varias cumarinas idénticas a las halladas en *Mammea*. Y, curiosamente, en ese mismo año, Guilet et al. (2001) dan a conocer la existencia de una gran cantidad de monofurano cumarinas en una especie de Malasia: *Calophyllum dispar*.

En segundo lugar, en los quimiotipos de México, no hay una separación absoluta entre cumarinas y cromanonas: el QT rekoï 2b tiene tanto dipirano cumarinas como cromanonas. Aunque, también hay otros quimiotipos que contienen sólo cromanonas, empezando por el QT rekoï 2a, y, si se toman como quimiotipos a los grupos de compuestos de *Calophyllum* reportados por otros autores, se tienen tres quimiotipos más: 1) ácido brasiliénico (Stout et al., 1968), 2) ácidos apetalico, blancoico y otros (Plattner et al., 1974) y 3) ácidos brasiliensofilicos (Cottiglia et al., 2004). Esto parece indicar que no es muy frecuente que se encuentren juntas las cumarinas y las cromanonas. En tercer lugar, la diferencia estructural entre los QT rekoï 1 y QT rekoï 2 es mayor que la existente entre los quimiotipos de Sri Lanka. En cuarto lugar, parece haber una gran semejanza entre los quimiotipos de *C. rekoï* y *C. brasiliense*. Esta última especie parece tener un quimiotipo con algunas cumarinas iguales y otras semejantes a las del QT rekoï 1 (Ito et al., 2003) y otro con cromanonas con un patrón cromatográfico igual al del QT rekoï 2a.

Ahora, respecto a la correlación de caracteres morfológicos y químicos, los resultados obtenidos en la presente investigación indican que ni las cumarinas ni las cromanonas están asociadas de manera absoluta a las características morfológicas principales estudiadas aquí: la forma de la costa (vena central) y la densidad de venación. Se ha tomado como base de la clasificación a los caracteres morfológicos y, por el momento, sólo puede decirse que los quimiotipos (cumarinas y cromanonas) parecen ser más útiles para distinguir taxa geográficamente cercanos que para determinar la relación filogenética entre taxa geográficamente lejanos.

## **Distribución geográfica de los PC**

Al observar los tres mapas de distribución de los Patrones Cromatográficos (PC) de *Calophyllum*, se deduce que México y Centroamérica (exceptuando a Panamá), forman una unidad de distribución del género, pues comparten los mismos PC. Por otra parte, hay dos



ejemplares sudamericanos, uno de Colombia y otro de Perú, que presentan un PC semejante al del PC rekoi 2a y un patrón morfológico foliar (PMF) más semejante a los PMFs de *C. rekoi*, que a los de *C. brasiliense*; esto podría indicar que en Sudamérica podría haber algunos representantes de *C. rekoi*. En lo concerniente a los PCs de *C. brasiliense*, el PC brasiliense 1 no aparece ni en México ni en Centroamérica, mientras que el PC brasiliense 2 es igual al PC rekoi 2a, sin embargo, se considera diferente por que el PMF que lo contiene es diferente de los PMF de *C. rekoi*.

Pennington & Sarukhán (1968) afirman que *Calophyllum* tiene una amplia distribución, desde Nayarit hasta Chiapas, en la vertiente del Pacífico; y desde Veracruz hasta Quintana Roo, en la vertiente del Golfo. Gómez Pompa (1966), por otra parte, dice que el límite norte de la distribución de *Calophyllum*, en la vertiente del Golfo, se encuentra en Misantla, Veracruz. Los datos de los ejemplares del herbario confirman lo expresado por dichos autores. Respecto al hecho de que en el mapa no esté representado el género en el estado de Nayarit, cabe aclarar que, cuando se tomaron las muestras, no se encontraron ejemplares colectados en tal entidad. Sin embargo, en una visita posterior, se encontró un ejemplar de esa localidad, ese espécimen es el *Rogers Mc Vaugh 19125*, colectado el 18 de septiembre de 1960.

En el análisis de la distribución geográfica se usaron cuatro variables: latitud, longitud, altitud y tipo de vegetación. La clasificación utilizada aquí para la vegetación es la de Miranda y Hernández (Miranda y Hernández, 1963; Miranda, 1952). Se ha elegido tal clasificación por dos razones: La primera, esta clasificación es la más usada en las fichas de herbario; muy pocas utilizan los términos de Rzedowski, Holdridge o Beard. La segunda, es la que mejor describe las selvas de México. Pennington & Sarukhán (1968) dicen que, en México, *Calophyllum* se distribuye en toda el área de selva alta y mediana. Los datos de las fichas del herbario muestran, sin embargo que también se encuentra en zonas más frías, como los bosques de pino y encino y el bosque caducifolio. Igualmente, la variación altitudinal de este taxón, es mayor que el mencionado por dichos autores. Ellos aseveran que ésta va desde el nivel del mar hasta los 600 o 650 m., sin embargo, las fichas del herbario registran, con cierta frecuencia, altitudes de alrededor de 1000 msnm, llegando hasta los 1200 msnm. Por último, el espécimen colectado en selva baja caducifolia (así lo dice la ficha), es un caso muy raro, pues este tipo de selva es demasiado seca para *Calophyllum*.

Respecto al análisis de los datos, se aplicó una prueba estadística de correlación bivariada de dos colas, a fin de evaluar la relación entre los PCs y las variables geográficas, pero tal prueba no mostró resultados significativos. No obstante, en el mapa de México se observa que los PCs se agrupan en ciertas zonas, lo que parece indicar alguna afinidad con ciertas características geográficas. En general, el mapa parece indicar que los PC rekoi 2 y PC rekoi 5 se distribuyen principalmente en la vertiente del Pacífico, en zonas de selva mediana subcaducifolia y bosque caducifolio, y bosque de pino y/o encino. Esa región es más seca, más fría y de mayor altitud que la zona de la selva alta perennifolia, donde se distribuyen los PC rekoi 1, PC rekoi 5 y PC rekoi 4. Estos dos últimos también se distribuyen en la selva mediana subperennifolia.

## Distribución geográfica de los PMF

La forma de la vena central (costa y la frecuencia de aparición de las venas laterales en las hojas de *Calophyllum*, son caracteres a los que se atribuye un elevado valor taxonómico y que han sido utilizados en la determinación de especies (Stevens, 1980; D'Arcy & Keating, 1989). El análisis de la morfología foliar de los especímenes del herbario, muestra dos PMFs principales en el área México-centroamericana: el **PMF rekoi 1**, en el que la vena central es muy prominente (crestada), la venación lateral es densa e indefinida, el color de la lámina foliar es marrón oscuro, y el color de la costa, las venas laterales y los márgenes es igual al de la lámina foliar. Y el **PMF rekoi 2**, en el cual la costa es al principio sulcada y luego levemente elevada, la venación lateral es espaciada, el color de la lámina foliar es verde oliva y el color de la costa, las venas laterales y los márgenes no es igual al de la lámina foliar, sino de color marfil.

Estos dos PMFs son muy importantes, pues aparecen también en otras especies americanas de *Calophyllum* y son, por lo tanto, el modelo con el que se evaluarán esas otras especies. Sin embargo, antes de hacerlo, es preciso aclarar un punto acerca de los PMFs rekoi: se trata de la diferencia de color entre ellos. Varios investigadores a los que he mencionado las características de estos PMFs, me han dicho que es probable que la diferencia de color en las hojas no se deba a una característica intrínseca de las plantas, sino a la manera en que los ejemplares fueron secados; ellos piensan que tal vez se usó alcohol para secarlos. No creo que la diferencia en el color de los ejemplares se deba a esa causa, por las siguientes razones:

1. Martin (1995) dice acerca de ese tipo de secado: “El tratamiento con alcohol produce especímenes desagradables, ennegrecidos y quebradizos...” La gran mayoría de los especímenes observados en el herbario no tenían esa apariencia desagradable. Tal vez dos o tres podrían haberla tenido, pero puedo asegurar que ninguno de aquellos en los que se detectó el PC rekoi 1 (correspondiente al PMF rekoi1) lo tenía. Así que el color marrón de estos especímenes no puede atribuirse al secado con alcohol.
2. Muestras de hojas colectadas (hace como 6 años) para la extracción de los QT rekoi 1 y QT rekoi 2 (Estrada, 2001; Huerta et al., 2004; Reyes et al., 2004), y que no han sido sometidas a ningún tipo de secado especial, presentan ahora ligeras diferencias de color, las hojas correspondientes al grupo del que se extrajo el QT rekoi 2, muestran un color verde oliva, con la costa y los márgenes en color marfil. En cambio, las hojas pertenecientes al grupo del cual se extrajo el QT rekoi 1, muestran un color verde oliva más débil y mezclado con avellana claro. La diferencia entre el color de los márgenes y la costa y el color de la lámina foliar es menor que la del otro tipo de hoja. La Dra. Zavaleta (experta en anatomía vegetal) opina que tal vez esa diferencia en el color de las hojas se deba a una mayor presencia de fenoles en las hojas del PMF rekoi 1.
3. Las hojas de los ejemplares panameños y algunos brasileños tienen un color diferente al de los ejemplares México-centroamericanos; ellos poseen un tono cálido sobre un fondo marrón claro, lo que crea colores como el canela claro, el palo de rosa o el amarillo ocre. Además, el margen de la hoja es ferrugíneo (de color óxido

de hierro). Esto también apoya la idea de que algunas hojas poseen más compuestos que se oxidan fácilmente y que es lo que hace que tengan colores diferentes.

4. Stevens (1980) en su clasificación de las especies de *Calophyllum* del Viejo Mundo distingue varios tonos en el color de las hojas al secar y considera a estas variantes caracteres taxonómicos. Él describe colores como el sepia (pardo rojizo), el verde oliva, el avellana claro, el avellana claro oliváceo y varios tonos de marrón: amarillento, anaranjado, grisáceo, verdoso. También menciona que en algunas especies, el margen de la hoja es pálido o descolorido con respecto al color de la lámina foliar.

Los PMF rekoí 1 y 2 serán tomados aquí como el modelo para evaluar la morfología foliar de las otras especies americanas de *Calophyllum* por las siguientes razones: 1) porque a pesar de la gran diversidad morfológica estos dos PMFs sobresalen, 2) porque pueden reconocerse en otras especies americanas de *Calophyllum*, 3) porque los PMF rekoí están mucho más extendidos que los PMF brasiliense.

De la distribución de los PMFs de *Calophyllum* en la zona México-centroamericana no hay mucho que decir, más que repetir lo que ya se dijo de la distribución de los PCs. Sin embargo, su distribución en otras partes de América es muy interesante y vale la pena mencionarla, aunque sea someramente. El PMF rekoí 2 puede reconocerse en la especie antillana *C. calaba* y en la colombiana *C. mariae*. Mientras que las características esenciales del PMF rekoí 1 se encuentra en las especies panameñas *C. longifolium*, *C. nubicola* y *Calophyllum* sp.<sup>1</sup>, así como en la brasileña *C. angulare* (D'Arcy & Keating, 1979). Por otra parte, los PMF brasiliense 1 y 2, se encuentran sólo en Sudamérica. Las características básicas de estos PMF son: una costa totalmente sulcada y un tono cálido en el color de las hojas. *C. lucidum* es otra especie sudamericana, ella tiene un PMF muy semejante al PMF brasiliense 2, con la única diferencia evidente de que su color no es cálido, sino verde oliva. Tal vez el ejemplar brasileño de Pará al que se ha asignado aquí el PMF brasiliense 2, y que en la ficha del herbario aparece determinado como *C. brasiliense*, no sea un representante de esta especie, sino de *C. lucidum*.

En síntesis, la distribución de los PMFs tiene las siguientes características:

1. Los PMFs rekoí 1 y 2 se ubican tanto en la zona México-centroamericana, como en Sudamérica; mientras que los PMFs brasiliense 1 y 2 se localizan sólo en Sudamérica.

---

<sup>1</sup> En Panamá hay dos especies de *Calophyllum* (D'Arcy & Keating, 1979): *C. longifolium*, la más conocida y, de todas las especies americanas, la que tiene las hojas más grandes. La otra especie es *C. nubicola*, descrita en 1979 por D'Arcy & Keating. A diferencia de la especie anterior, ésta posee hojas pequeñas y muy anchas. Sin embargo, las hojas de estas dos especies son semejantes porque poseen una costa poderosamente crestada y una elevada frecuencia de venación. Pero existe una especie más. En el herbario MEXU hay un ejemplar panameño (Nevers *et al.* 4236); determinado por B. Hammel (1985) como *C. nubicola*, con un signo de interrogación. Este ejemplar no pertenece a *C. nubicola*, pues no concuerda con la descripción dada por D'Arcy & Keating (1979), ni se parece al ejemplar de esta especie que se encuentra en el herbario MEXU y que fue determinado por estos mismos autores. Es este un taxón diferente a los dos anteriores; sus hojas, pequeñas y alargadas, parecen una miniatura de las de *C. longifolium*. Su costa es poderosamente crestada y su frecuencia de venación es muy alta. Por lo tanto, puede decirse que en Panamá hay tres taxa semejantes a la MF rekoí 1.

2. En las Antillas se encuentra sólo el PMF rekoi 2; y en Panamá sólo el PMF rekoi 1.

Esta distribución de los PMFs plantea varias interrogantes, de las cuales, las más importantes parecen ser: ¿Por qué no hay PMF rekoi 1 en las Antillas y no hay PMF rekoi 2 en Panamá?, ¿por qué los PMFs brasileños no se han extendido a Centroamérica y las Antillas?, ¿por qué hay dos centros de gran diversidad (zona México-centroamericana y Sudamérica) separadas por una zona (Panamá) que sólo contiene uno de los PMFs principales? Seguramente, la respuesta a estas preguntas se encuentra en la historia geológica de América. Sin embargo, ésta es sumamente compleja, como puede verse en el libro “The Great American Biotic Interchange” (Stehli & Webb, 1985; Smith, 1985; Donnelly, 1985; Gose, 1985; Savin & Douglas, 1985; Simpson & Neff, 1985). Y la tarea titánica de hallar la respuesta a las preguntas anteriores está mucho más allá de los límites de la presente investigación.

Sin embargo, considero importante dar a conocer estos datos, ya que podrían ser útiles a los estudios biogeográficos, pues parece que la distribución de *Calophyllum* tiene características vicariantes (Craw et al. 1999; Espinosa & Llorente, 1993; Espinosa et al., 2002; Steli & Webb, 1985). Y por otra parte, quiero expresar que a mí me parece que, tanto *C. calaba*, como las especies panameñas, se derivaron de *C. rekoi*. Tengo algunos argumentos que apoyan mi punto de vista, sin embargo, la exposición minuciosa de ellos supondría alargar muchísimo la presente investigación; el desarrollo de tal idea tendrá que ser objeto de otra tesis.

## Jerarquía del taxón México-centroamericano

### ¿ES *CALOPHYLLUM REKOI* UNA VARIEDAD DE *C. BRASILIENSE*?

D'Arcy & Keating (1979), quienes hacen un estudio anatómico de las hojas de varias especies de *Calophyllum*, opinan de manera tajante que *C. rekoi* es diferente de la especie brasileña, como puede percibirse en las siguientes citas:

Es completamente irrazonable considerar al centroamericano *C. rekoi* como coespecífico del brasileño *C. brasiliense*. Superficialmente los especímenes son diferentes, *C. brasiliense* tiene ramas subredondeadas, mientras que *C. rekoi* tiene ramas notablemente anguladas. *Calophyllum rekoi* tiene una hipodermis y los ductos laminares son de aproximadamente sólo la mitad de los de *C. brasiliense*.

Partiendo de este trabajo, llega a ser claro que ni *C. longifolium*, ni *C. rekoi* pueden justificarse como taxa infraespecíficos de *C. brasiliense*.

Por otra parte, no existen evidencias ni argumentos que apoyen la afirmación de que *C. rekoi* es una variedad de *C. brasiliense*. Como se vio en la sección de antecedentes, en América el género *Calophyllum* nunca ha sido revisado cabalmente; ni tampoco existen teorías que expliquen la relación de los diferentes taxa americanos de dicho género.

## ¿EL TAXÓN MÉXICO-CENTROAMERICANO CONTIENE DOS ESPECIES?

Respecto al taxón méxico-centroamericano, los resultados de la presente investigación parecen indicar que podría estar formado por dos especies, una de ellas con variedades. En dicho taxón se observan dos patrones morfológicos foliares (PMF) distintos en varios caracteres: prominencia de la costa, frecuencia de venación, color, tamaño y anchura. Según el criterio morfológico foliar (D'Arcy & Keating, 1979; Stevens, 1980) esta diferencia indicaría la existencia de dos especies diferentes. Pero, además, existen dos quimiotipos bastante diferentes entre sí, los cuales, según el criterio quimitaxonómico (Bandara et al., 1986; Mc Kee et al., 1998), apoyan la existencia de dos especies diferentes.

Eso ocurre con los QT rekoï 1 y QT rekoï 2, correspondientes a los PC rekoï 1 y PC rekoï 2, pero hay tres patrones cromatográficos más, ¿corresponderían estos a especies diferentes? Aquí se considera que no. Aunque las manchas en el cromatograma muestran diferencias que indican la presencia de compuestos diferentes a aquellos del QT rekoï 1 y QT rekoï 2, el análisis de la morfología foliar de los especímenes a los que pertenecen dichos patrones cromatográficos no muestra una diferencia significativa entre éstos y aquellos del PMF rekoï 2.

La prueba de t, con la que se evalúa que tan distintos o semejantes son los diferentes PMF no proporciona una diferencia significativa entre las submorfologías y el PMF rekoï 2, pero sí lo hace con respecto al PMF rekoï 1. Esta misma situación se observa en el gráfico, donde los trazos del PMF rekoï 2a, parecen contraponerse a los del PMF rekoï 1. Por el contrario, los trazos de los PMF rekoï 2b, 2c y 2d, parecen acoplarse, en la mayoría de los casos, al del PMF rekoï 2a. Por otra parte, el PC rekoï 5 es parecido al PC rekoï 1 (QT rekoï 1), por lo cual, surge la duda de si su diferencia con respecto a este último no será un error de apreciación, o un error metodológico en el análisis de las muestras. Pues, además, en su distribución geográfica, ocupa localidades que podrían corresponder al PC rekoï 1, si su distribución fuera más amplia. Sin embargo, su PMF es más similar al PMF rekoï 2 a, que al PMF rekoï 1, como puede observarse en la prueba de t y el gráfico de trazos.

Por lo tanto, de acuerdo con estos resultados se considera que las tres submorfologías foliares no corresponderían a especies, sino a variedades de un taxón representado por el PMF rekoï 2. El cuadro 10 muestra esas supuestas especies y variedades.

**Cuadro 12.** Especies y variedades supuestas en el taxón méxico-centroamericano, de acuerdo a los datos obtenidos en la presente investigación.

ESPECIES Y VARIETADES	PATRÓN MORFOLÓGICO FOLIAR	PATRÓN CROMATOGRÁFICO
Especie 1	PMF rekoï 1	PC rekoï 1
Especie 2	PMF rekoï 2	PC rekoï 2
Variedades de la Especie 2	PMF rekoï 2 a PMF rekoï 2 b PMF rekoï 2 c PMF rekoï 2 d	PC rekoï 2 PC rekoï 3 PC rekoï 4 PC rekoï 5

## CONCLUSIONES.

Según lo que pudo deducirse a través del análisis cromatográfico de los extractos hexánicos de las hojas de los taxa México-centroamericano y brasileño de *Calophyllum*, no hay mucha diferencia entre ellos; al contrario, parece haber una gran semejanza. Sin embargo, en el análisis de la morfología foliar sí se observa una diferencia que parece significativa; y D'Arcy & Keating (1979), quienes estudiaron las hojas de estos dos taxa de manera bastante más profunda, consideran que son dos especies diferentes.

La opinión de D'Arcy & Keating, aunada al hecho de que: 1) no existen evidencias ni argumentos que apoyen la afirmación de que el taxón México-centroamericano es una variedad de la especie brasileña *C. brasiliense* y 2) el género nunca ha sido revisado profundamente, inclinan la balanza a favor de que el taxón México-centroamericano no es una variedad de *C. brasiliense*. Sin embargo, aquí no se descarta la posibilidad de que sí lo sea. Lo que se recomienda es que se haga una revisión exhaustiva de los taxa americanos de *Calophyllum* para que se demuestre que efectivamente el taxón México-centroamericano es una variedad de la especie brasileña *Calophyllum brasiliense*.

Respecto a las diferencias tanto químicas como morfológicas observadas dentro del taxón México-centroamericano, aquí se considera que es muy probable que indiquen la existencia de dos especies (no sólo de una) diferentes a la especie brasileña *Calophyllum brasiliense*.

Por último, se considera que la presente investigación ha hecho una contribución al conocimiento del género *Calophyllum* tanto en el terreno taxonómico, como en el químico. En este último, se ha aportado una muestra de la variación química dentro del taxón México-centroamericano de *Calophyllum*.

# APÉNDICE 1

## MEDIDAS DE LAS VARIABLES MORFOLÓGICAS FOLIARES Y GEOGRÁFICAS

### MÉXICO

No. mapa	No. ficha	PC	LOC	TH	AH	RL/A	C	V	LAT (N)	LONG (W)	ALT (msnm)	VEG
1	199144	2	JAL	16.5	6.0	2.7	2	8	20.41	105.30	800	BE
2	541291	2	JAL	8.3	4.1	2.0	2	12	20.38	105.31	980	SMSC
3	223254	2	JAL	11.5	5.5	2.1	2	8	20.36	105.30	780	BPE
4	742489	2	JAL	10.5	4.5	2.3	2	12	20.38	105.25	1000	BPE
5	449190	2	JAL	16.0	7.0	2.3	2	10	20.36	105.78	900	BC
6	271663	5	JAL	15.0	4.5	3.3	3	8	19.75	105.26	500	SMSC
7	739269	5	JAL	13.8	6.3	2.2	2	8	19.60	104.41	500	SMSC
8	744044	2	JAL	14.6	6.0	2.4	2	10	19.58	104.40	500	SMSC
9	612099	5	JAL	16.0	5.6	2.8	2	8	19.50	104.30	735	BE
10	56715	5	COL	17.0	8.0	2.1	2	10	19.31	103.73	800	BPE
11	780152	2	MICH	12.0	5.8	2.1	2	10	18.61	103.53	250	SMSC
12	877342	5	MICH	15.5	5.5	2.8	3	10	18.58	103.48	200	SMSC
13	756689	2	MICH	15.0	6.0	2.5	2	10	18.58	103.48	200	SMSC
14	521522	1	GRO	5.5	2.8	2.0	1	15	17.18	100.38	1100	BC
15	748867	2	GRO	11.0	4.3	2.5	2	10	17.30	100.28	680	SMSC
16	149642	2	GRO	7.5	3.2	2.3	2	10	17.05	99.58	200	SMSC
17	361500	2	GRO	11.5	3.7	3.1	2	10	16.91	99.73	200	SMSC
18	929120	2	GRO	13.0	5.1	2.5	2	8	16.90	98.73	350	SMSC
19	426340	2	OAX	12.5	5.3	2.3	3	8	16.36	97.75	400	SMSC
20	528839	2	OAX	18.0	5.8	3.1	1	8	16.25	97.38	450	SMSC
21	412033	2	OAX	14.0	5.5	2.5	2	10	16.11	97.10	710	BP
22	904612	2	OAX	12.5	5.5	2.3	2	10	15.90	96.38	640	SMSC
23	171335	2	OAX	14.8	4.8	3.1	2	8	15.95	96.36	400	SMSC
24	1013411	2	OAX	8.5	3.5	2.4	2	10	16.0	95.58	490	S
25	530255	2	OAX	8.5	3.5	2.4	2	10	16.31	95.50	750	SBC
26	59382	3	OAX	12.3	7.5	1.6	2	10	18.08	96.11	20	SAP
27	425484	3	OAX	11.0	5.5	2.0	3	10	16.76	94.65	230	SAP
28	501894	3	OAX	12.5	5.5	2.3	1	8	16.83	94.75	400	SAP
29	606437	1	OAX	8.0	3.0	2.7	1	15	16.86	94.73	350	SMSC
30	486220	2	OAX	6.8	3.8	1.8	2	15	16.91	94.66	300	SAP
31	469069	1	OAX	7.0	2.0	3.5	1	15	16.96	94.65	400	SAP
32	608084	3	OAX	10.5	5.3	2.0	2	10	16.90	94.65	230	SMSC
33	913946	1	OAX	16.0	4.3	3.7	1	10	17.13	94.35	300	SAP
34	690888	5	OAX	10.0	3.8	2.6	1	15	16.65	94.10	1200	BPE
35	607980	2	OAX	9.5	3.6	2.6	2	10	16.46	94.20	690	SMSC
36	72250	2	CHIS	8.0	4.5	1.7	2	8	17.53	93.11	150	SMSC
37	105826	1	CHIS	10.0	5.2	1.9	1	15	17.33	93.58	300	SAP
38	65986	5	CHIS	12.5	5.2	2.4	1	12	16.68	93.73	900	SMSC
39	390158	5	CHIS	8.0	3.7	2.2	2	8	16.68	93.73	870	BPE
40	227095	2	CHIS	9.5	4.5	2.1	3	8	16.68	93.73	1000	BPE

No. mapa	No. ficha	PC	LOC	TH	AH	RL/A	C	V	LAT (N)	LONG (W)	ALT (msnm)	VEG
41	143064	2	CHIS	15.5	5.5	2.8	3	8	17.35	93.0	410	SAP
42	230556	5	CHIS	8.5	3.5	2.4	3	10	16.28	93.90	250	SMSC
43	405339	2	CHIS	7.0	3.0	2.3	2	12	16.26	93.30	850	SMSC
44	71519	2	CHIS	10.5	4.5	2.3	2	10	16.05	93.28	900	SMSC
45	859993	5	CHIS	11.0	5.5	2.0	2	8	14.90	92.11	250	SAP
46	171372	4	CHIS	8.5	3.5	2.4	3	15	17.21	91.71	350	SAP
47	817038	4	CHIS	9.0	3.5	2.6	2	10	16.98	91.60	950	SAP
48	857674	4	CHIS	10.5	4.5	2.3	3	10	17.01	91.25	195	SAP
49	247099	3	CHIS	11.5	5.0	2.3	3	8	16.83	91.45	800	SAP
50	863171	3	CHIS	7.5	3.4	1.7	2	8	16.80	91.25	750	SAP

51	938203	4	CHIS	8.5	4.5	1.8	2	10	16.73	91.08	400	SAP
52	362436	3	CHIS	14.5	7.0	2.1	3	8	16.71	91.01	350	SAP
53	417498	4	CHIS	7.5	3.5	2.1	2	8	16.40	90.88	200	SAP
54	588597	3	CHIS	8.5	4.0	2.1	3	10	16.71	90.90	200	SAP
55	596107	3	CHIS	9.0	4.2	2.1	2	12	16.40	91.21	330	SAP
56	595629	3	CHIS	8.0	4.2	1.9	2	10	16.11	91.06	150	SAP
57	631572	4	CHIS	9.5	4.5	2.1	2	10	16.11	91.91	150	S
58	405632	3	QRO	8.0	4.0	2.0	2	8	17.83	88.83	20	SMSP
59	106069	3	CAMP	12.5	5.5	2.3	3	8	18.63	90.68	65	SMSP
60	189441	3	CAMP	8.5	4.5	1.9	2	10	18.55	90.75	60	SMSP
61	810884	4	CAMP	8.2	4.4	1.9	2	10	17.98	89.35	129	SMSP
62	838589	3	CAMP	6.5	3.0	2.2	2	10	17.98	89.35	185	SMSP
63	270726	4	TAB	5.2	1.7	3.0	2	10	17.78	91.53	30	SAP
64	241666	3	TAB	12.2	5.4	2.2	1	8	17.85	91.51	170	SAP
65	177152	3	TAB	15.0	8.5	1.8	1	8	17.58	91.58	40	SAP
66	55650	3	TAB	15.0	3.8	2.2	3	10	17.55	92.95	40	SAP
67	145171	2	TAB	12.0	4.5	2.7	3	8	17.63	93.53	25	SAP
68	931569	2	TAB	8.5	3.6	2.4	2	10	18.2	94.08	22	SAP
69	260826	3	VER	12.0	7.0	1.7	1	8	18.05	94.10	50	SAP
70	486605	1	VER	9.5	3.0	3.2	1	15	17.09	94.48	150	SAP
71	56721	3	VER	13.0	7.0	1.8	3	8	17.41	95.18	25	SAP
72	94995	4	VER	10.0	5.2	1.9	3	6	18.05	94.49	50	SAP
73	748904	2	VER	9.5	4.5	2.1	2	8	18.08	94.43	65	SAP
74	696112	2	VER	9.5	4.8	2.0	2	8	18.23	94.61	5	SAP
75	168416	2	VER	8.5	4.2	2.0	2	10	18.35	95.16	200	SAP
76	766235	2	VER	7.5	3.3	2.3	2	10	18.55	95.06	200	SAP
77	521387	2	VER	8.5	4.0	2.1	2	10	18.56	95.05	200	SAP
78	520955	3	VER	12.5	5.5	2.3	2	8	18.60	95.05	300	SAP
79	394409	2	VER	8.5	3.6	2.4	2	10	18.58	95.10	160	SAP
80	699118	2	VER	12.0	5.0	2.4	2	10	18.58	95.10	160	SAP
81	396815	3	VER	5.0	3.5	1.4	3	8	19.18	96.30	50	SBSC

#### CENTROAMÉRICA

No. mapa	No. ficha	PC	LOC	TH	AH	RL/A	C	V	LAT (N)	LONG (W)	ALT (msnm)
82	89266	1	BEL	6.6	2.0	3.3	1	15	16.81	88.61	
83	513815	2	BEL	8.5	4.5	1.9	2	8	16.45	88.75	
84	499584	4	GUAT	10.0	5.0	2.0	3	10	17.46	89.56	
85	896114	1	GUAT	12.0	3.5	3.4	1	20	14.81	89.40	500
86	1018578	3	SALV	11.0	4.0	2.7	1	10	14.00	89.55	
87	523428	3	HOND	13.5	4.8	2.8	1	10	14.46	87.63	200
88	631269	1	HOND	6.7	2.8	2.4	1	15	15.70	86.85	150
89	463164	4	NICAR	6.5	3.2	2.0	3	10	12.86	85.10	
90	464585	4	NICAR	6.6	2.8	2.4	3	10	13.13	84.91	90
91	668188	2	C.RICA	11.7	3.6	3.2	1	8	10.46	84.50	600
92	953669	1	C.RICA	7.7	2.1	3.6	1	15	8.70	83.51	72

#### SUDAMÉRICA

No. mapa	No. ficha	PC	LOC	TH	AH	RL/A	C	V	LAT (N Y S)	LONG (W)	ALT (msnm)
93	936914	2*	COLOMBIA	15.0	4.8	3.1	1	12	4.00	77.25	10
94	887756	2*	PERÚ	19.0	8.0	2.4	2	10	-4.75	69.86	120
95	940106	1*	BOLIVIA	8.5	4.0	2.1	4	10	-17.38	63.66	380
96	253871	1	BRASIL	10.3	4.3	2.4	5	8	-18.26	43.65	
97	848985	1	BRASIL	8.5	4.0	2.1	5	10			
98	640388	1	BRASIL	8.0	4.3	1.9	5	10	-25.93	48.61	
99	263521	2	BRASIL	8.5	4.0	2.1	4	15	-8.00	57.08	350

\*Los dos primeros especímenes (936914 y 887756) presentan una mancha de cromonona semejante a la del PC rekoii 2 a, o a la del PC brasiliense 2, pero la morfología de estas hojas es semejante a la especie *C. rekoii*. El espécimen boliviano (940106) tiene un patrón de manchas semejante al de el PC brasiliense 1.



## APÉNDICE 2

### ESPECÍMENES DEL HERBARIO

#### EJEMPLARES COLECTADOS EN MÉXICO

1. **México:** Jalisco: Municipio (Puerto Vallarta) (20° 25' N, 105° 18' W), 800msnm. 20 septiembre 1976. *A. Delgado, R. Hernández, L. Trejo 181*. A 20 Km. de Pto. Vallarta. Entre el Tuito y Pto. Vallarta. Encinar. Árbol 4.5 m., fruto verde, inmaduro. (MEXU 199144)
2. **México:** Jalisco: Municipio (Cabo Corrientes): El Tuito (20° 23' N, 105° 19' W), 980 msnm. 26 diciembre 1976. *Luz Ma. Villarreal de Puga, E. Faudón, Cardona Ramírez 9630*. Det. R. Ramírez 2 marzo 1989. Brecha 3 Km. al N del Tuito. Bosque tropical. Árbol 8 m, flor, ornamental. (MEXU 541291)
3. **México:** Jalisco: Municipio (Cabo Corrientes) (20° 22' N, 105° 18' W), 780 msnm. 24 noviembre 1976. *R. Hernández M., A. solís, E. Matuda 3022*. Det. R. Hernández M. El Tuito Carretera Chamela-Pto. Vallarta, 20-25 Km antes de Pto. Vallarta. Bosque de pino-encino. Suelo profundo, pardo, ondulado. Árbol 6-7 m. (MEXU 223254)
4. **México:** Jalisco: Municipio Cabo Corrientes: El Tuito 20° 23' 30" N, 105° 15' 00" W, 1000 msnm. Km. 25 febrero 1979. *G. Castillo C., P. Zamora C., R. Acevedo R. 10287*. Det. P. Zamora G. Km. 7 del poblado Provincia por camino a El Cuale. Pinar y encinar, primaria, a orilla del arroyo. Suelo pardo pedregoso. Árbol 8 m.(MEXU 742489)
5. **México:** Jalisco: Municipio Talpa de Allende (20° 22' N, 105° 47' W), 900 msnm. 30 mayo 1985. *Emily J. Lott. 2546*. Camino a la mina de Cuale, 7.6 Km. al E de la carretera Pto. Vallarta-Barra de Navidad. Manchón de bosque mesófilo, dentro de una zona de bosque de pino-encino. Árbol 20 m., frutos viejos, cafés, látex amarillo. (MEXU 449190)
6. **México:** Jalisco: Municipio (Tomatlán) (19° 45' N, 105° 16' W), 500 msnm. 18 enero 1974. *Alfredo Pérez J. 817*. Det. A. Pérez J. Faldas del cerro Huehuenton, 33 Km. al N de Chamela. Árbol 25 m. (MEXU 271663)
7. **México:** Jalisco: Municipio Casimiro Castillo 19° 36' 43" N, 104° 25' 16" W, 500msnm. 14 julio 1988. *B. Cuevas, de Niz 3091*. 0.5-1.5 Km al NE de Casimiro Castillo 15-17 Km al SSW de Autlán. Bosque tropical subperennifolio. *Sloanea, Ficus, Calophyllum, Licaria*. Árbol 20-25 m., flores blancas. (MEXU 739269)
8. **México:** Jalisco: Municipio Casimiro Castillo: Reserva de la Biosfera Sierra de Manatlán 19° 35' 16" N, 104° 24' 48" W, 500 msnm. 3 agosto 1993. *F. J. Santana, B. F. Benz 6356*. Det. F. J. Santana M. Base del cerro La Petaca, 1 Km. al SE de Casimiro Castillo. Bosque tropical subcaducifolio, *Brosimum, Sloanea, Hura, Licaria*. Árbol 12 m., fruto, flores blancas. (MEXU 744044)
9. **México:** Jalisco: Municipio Cuautitlán: Cuautitlán 19° 30' N, 104° 18' W, 735 msnm. 26 julio 1988. *L. Robles H. 525*. Det. R. Cuevas. 500 m del Vigía rumbo a Las Canoas. Bosque de *Quercus*, vegetación secundaria. Árbol 5 m. (MEXU 612099)
10. **México:** Colima: Municipio Comala (19° 19' N, 103° 44' W), 800 msnm. s. f. *Dr. Reko* s. n. Hacienda de San Antonio. (MEXU 56715)
11. **México:** Michoacán: Municipio Aquila (18° 37' N, 103° 32' W), 250 msnm. 1 marzo 1980. *B. Guerrero C. 757*. El Tenamaste, 4 Km de Aquila, río arriba. Selva mediana, primaria, riparia, mojotal. Suelo pardo arenoso, arcilloso. Clima cálido subhúmedo. Árbol 11 m., fruto... (MEXU 780152)
12. **México:** Michoacán: Municipio Aquila (18° 35' N, 103° 29' W), 200 msnm. 4 diciembre 1979. *B. Guerrero C. 327*. La Mina. Selva mediana, primaria, riparia. Suelo café pardo, aluvial. Clima cálido subhúmedo. Árbol, 20-30 m., abundante, fruto... (MEXU 877342)
13. **México:** Michoacán: Municipio Aquila (18° 35' N, 103° 29' W), 200 msnm. 8 diciembre 1979. *B. Guerrero C. 484*. La Mina. Selva mediana primaria, riparia, clima cálido subhúmedo. Suelo café pardo arenoso. Árbol 25 m., abundante, flor... (MEXU 756689)
14. **México:** Guerrero: Municipio (Atoyac de Álvarez) (17° 11' N, 100° 23' W), 1100 msnm. 5 junio 1983. *José C. Soto Núñez, Esteban M. Martínez, Guillermo Silva R., T. P. Ramamoorthy 5183*. Det. Clara H. Ramos. El Ranchito. 11 Km al NE de Paraíso. Bosque mesófilo de montaña de afinidad tropical. Árbol 20-30 m., lechoso, fruto... (MEXU 521522)
15. **México:** Guerrero: Municipio (Atoyac de Álvarez): San Andrés (17° 18' N, 100° 17' W), 680 msnm. 17 diciembre 1985. *C. Soto Núñez 11724*. 18 Km al NE de Atoyac. Árbol 25 m., frondoso, fruto...(MEXU 748867)
16. **México:** Guerrero: Municipio (Acapulco): Acapulco (17° 03' N, 99° 35' W, 200 msnm). 3 febrero 1971. *J. Freeland, L. Spetzman 132*. Carretera 95, 24.3 mi. del círculo Diana, a lo largo de un arroyo. Árbol grande fruto ½ in. (MEXU 149642)
17. **México:** Guerrero: Municipio (Acapulco): Acapulco (16° 55' N, 99° 44' W), 200 msnm. 22 enero 1982. *David H. Lorence, J. Millar, R. Cedillo T. 3829*, Det. D. L. Ruta Acapulco a México ca. 16 Km al N de Acapulco por camino. Selva riparia alterada Árbol 15 m., ocasional, fruto verde. (MEXU 361500)
18. **México:** Guerrero: Municipio San Luis Acatlán (16° 54' N, 98° 44' W), 350 msnm. 26 noviembre 1983. *Rosa Estela González Flores 418*. Det. R. E. González. 1 Km al N de Horcasitas, Km 11 del camino a Iliatenco. Bosque tropical perennifolio, cañada, suelo somero. Árbol 20 m, abundante, regular, fruto verde. (MEXU 929120)
19. **México:** Oaxaca: Municipio (Santiago Jamiltepec) (16° 22' N, 97° 45' W, 400 msnm). 22 octubre 1982. *R. Torres C., E. Martínez S., J. L. Villaseñor*. Det. B. Hammel 1986. 1.5 Km al N del Rosario y 13 Km al N de Jamiltepec, camino a San José de las flores. Selva mediana, vegetación secundaria. Suelo arenoso. Árbol 12 m. (MEXU 426340)

- 20. México:** Oaxaca: Municipio (San Miguel Panixtlahuaca) (16°15' N, 97° 23' W), 450 msnm. 2 diciembre 1921. *C. Conzatti. 4380*. Fide Prof. Standley. Río Tepeixtlahuaca. (Nombrado *Calophyllum longipes* slan)(MEXU 528839)
- 21. México:** Oaxaca: Municipio (San Gabriel Mixtepec) (16° 07' N, 97° 06' W), 710 msnm. 19 marzo 1983. *R. Torres, P. Tenorio, C. Romero 2617*. 10 Km. al SE de Piedra Larga, camino a Pto. Escondido, o 3 Km. al NW de San Gabriel Mixtepec, camino a Sola de Vega. Vegetación secundaria de *Pinus*. Árbol 4-5 m. con fruto inmaduro. (MEXU 412833)
- 22. México:** Oaxaca: Municipio (Pluma Hidalgo): Santa Magdalena 15° 54' 48" N, 96° 23' 11" W, 640 msnm. 23 febrero 1999. *Jaime Rivera H., S. Salas M., M. Elorsa C. 1095*. Det. J. Rivera H. 1999. 2.7 Km NW brecha hacia Pluma. Selva mediana subperennifolia. Árbol 30 m., fruto...(MEXU 904612)
- 23. México:** Oaxaca: Municipio (Pluma Hidalgo) (15° 57' N, 96° 22' W), 400 msnm. 22 noviembre 1967. *T. D. Pennington, J. Sarukhan K. 9328*. Carretera a Pochutla. Suelos volcánicos. Árbol 12 m., dap 30 cm., fruto... (MEXU 171333)
- 24. México:** Oaxaca: Municipio San Carlos Yautepec 16° 00' 39" N, 95° 58' 03" W, 490 msnm. 17 noviembre 1999. *E. Martínez. J. Castrejón 23937*. 1 Km. al N de Miguel Chongos. Sabana. Árbol 8 m., fruto, látex amarillo. (MEXU 1013411)
- 25. México:** Oaxaca: Municipio Santo Domingo Tehuantepec 16° 19' N, 95° 30' W, 750 msnm. 6 mayo 1991. *Álvaro Campos V., R. Torres 3636*. Camino a cerro el Arenal, por Arroyo Leche María, al NW de Buenos Aires. Selva baja caducifolia. Árbol 10 m., fruto verde, "leche maría". (MEXU 530255)
- 26. México:** Oaxaca: Municipio (San Juan Bautista Tuxtepec) (18° 01' N, 96° 07' W, 50 msnm). 9 septiembre 1947. *F. Miranda 4165*. Comisariado Mata de Caña. (MEXU 59382)
- 27. México:** Oaxaca: Municipio (San Miguel Chimalapa) (16° 46' N, 94° 46' W), 230 msnm. 23 febrero 1982. *Refugio Cedillo T., Rafael Torres C. 1134*. Det. Leticia Torres C. 16 Km. al NE de Lázaro Cárdenas, camino a Sta. Ma. Chimalapa. Selva alta perennifolia. Árbol 15 m. fruto (MEXU 425484)
- 28. México:** Oaxaca: Municipio Santa María Chimalapa 16° 50' N, 94° 45' W, 400 msnm. 21 enero 1988. *Rafael Torres C., E. Martínez 11167*. Det. B. Hammel 1990. Los Ángeles, antes Arroyo Seco 23.3 Km., al E de Lázaro Cárdenas, hacia Sta. Ma. Chimalapa, entrando por el Mezquite. Selva alta perennifolia. Árbol 40 m., fruto verde, "barí". (MEXU 501894)
- 29. México:** Oaxaca: Municipio Santa María Chimalapa 16° 52' N, 94° 44' W, 350 msnm. 27 febrero 1986. *Heriberto Hernández G. 2107*. "El callejón", vieja vereda a Lázaro Cárdenas, cerca del camino actual que sale a Arroyo Chocolate, subiendo a la falda NE de Cerro Azul-Escalapa. Ca. 8 Km. al SW de Sta. Ma. Selva transicional a bosque mesófilo de montaña, con *Tapirira*, *Liquidambar*, *Sloanea*, *Calophyllum*, *Terminalia*, *Mosquitoxylum*, *Tabebuia*, *Dialium*, *Enterolobium schomburgkii*. Suelo café, profundo. Árbol 20 m, dap 40 cm.... (MEXU 606437)
- 30. México:** Oaxaca: Municipio Santa María Chimalapa 16° 55' N, 94° 40' W, 300 msnm. 29 septiembre 1984. *H. Hernández G. 462*. Det. T. Wendt 1986. Cafetales, cerca de Sta. María, con *Vochysia*, *Andira galeottiana*, *Terminalia*, *Enterolobium schomburgkii*, *Cassia moschata*, *Hymenaea*, *Apeiba*, *Guazuma*, *Didimopanax*, *Inga*. Suelos profundos, pendientes ligeras o fuertes. Árbol 18 m., dap 50 cm. (MEXU 486220)
- 31. México:** Oaxaca: Municipio Santa María Chimalapa 16° 58' 17" N, 94° 39' 45" W, 360-430 msnm. 24 noviembre 1985. *P. Vera Caletti, T. Wendt, H. Hernández G., C. González L. 119*. Río Verde, 7 Km en línea recta al NNE de Sta. Ma. Chimalapa. Selva alta perennifolia, con *Dialium guianense*, *Sloanea*, *Tapirira*, *Terminalia*, *Calophyllum*, *Sloanea tuerckheimii*. Con orientación N, suelos profundos. (MEXU 469069)
- 32. México:** Oaxaca: Municipio Santa María Chimalapa 16° 54' N, 94° 39' 30" W, 230 msnm. 7 diciembre 1985. *Heriberto Hernández G. 1892*. Arroyo Rancho Viejo, ca. 3-4 Km al E de Sta. Ma. Cañada con selva rodeada por encinar, con *Poulsenia*, *Ficus*, *Brosimum*, *Tapirira*, *Spondias*, *Calophyllum*, *Morinda*, *Laplacea*, *Sloanea*. Suelo negro pedregoso. Árbol 18 m.(MEXU 608084)
- 33. México:** Oaxaca: Municipio Santa María Chimalapa 17° 08' 40" N, 94° 21' 28" W, 300 msnm. 18 mayo 1998. *Silvia Salas M., J. Rivera H., R. García, Y. Arellanes, A. Sánchez 1745 bis*. Det. J. Rivera H. 1999. San Antonio Nuevo Paraíso, a 2 Km en línea recta al W, en cerro Camedor. Selva alta perennifolia. Árbol 8 m.... (MEXU 913946)
- 34. México:** Oaxaca: Municipio (San Pedro Tapanatepec) 16° 39' N, 94° 06' W, 1200 msnm. 4-5 agosto 1986. *Salomón Maya J. 3719*. Det. F. Chiang 96. Arroyo entre Cerro Verde y Cerro Amargo, al S del camino Benito Juárez-La ciénega, ca. 8 Km en línea recta al SE de Benito Juárez, ca. 32 Km en línea recta al NNE de San Pedro Tapanatepec. Cañada con bosque de *Ficus*, *Spondias*, *Bursera*, *Tapirira*, con pino-encino en las pendientes fuertes arenosas. Árbol 20 m.... (MEXU 690888)
- 35. México:** Oaxaca: Municipio Santo Domingo Zanatepec 16° 28' 30" N, 94° 12' 30" W, 690 msnm. 19 noviembre 1985. *T. Wendt, P. Vera C. 5140*. Det. T. Wendt, 1993. Ca. 16 Km. al S de Col. Rodolfo (*sic*) Figueroa, por el camino nuevo al Jicaro (Pascual Fuentes). Ca. 7 Km. en línea recta al N de San Pedro Tapanatepec. Selva mediana en cañada rodeada por transición de selva baja caducifolia y pinar. Árbol 12 m, dap 40 cm....(MEXU 607980)
- 36. México:** Chiapas: Municipio Pichucalco (17° 32' N, 93° 07' W, 150 msnm). 22 agosto 1950. *Faustino Miranda s. n.* NE de Pichucalco hacia el Embarcadero. (MEXU 72250)
- 37. México:** Chiapas: Municipio Ostucán (17° 20' N, 93° 35' W), 300 msnm. 7 abril 1966. *L. González Quintero 3511*. 20 Km al NW de Raudales. Ladera de roca ígnea con vegetación de bosque tropical lluvioso. Árbol 30 m. (MEXU 105826)
- 38. México:** Chiapas: Municipio Cintalapa (16° 41' N, 93° 44' W, 900 msnm). 10 agosto 1951. *Miranda 7253*. La Chamarra, 80 Km. NO Cintalapa. (MEXU 65986)

- 39. México:** Chiapas: Municipio Cintalapa (16° 41' N, 93° 44' W), 870 msnm. 14 septiembre 1981. *D. E. Breedlove* 52786. 23 Km. al W de las cruces, a lo largo de la carretera a la estación de microondas La Mina. Ridge with *Pinus* and *Quercus* and streams with seasonal Evergreen Forest. (MEXU 390158)
- 40. México:** Chiapas: Municipio Cintalapa (16° 41' N, 93° 44' W), 1000 msnm. 16 octubre 1971. *Breedlove, R. F. Thorne* 20613. Cerca de la estación de microrondas La Mina, 12 Km. S de Mexican Highway 190, cerca de Rizo de Oro. (MEXU 227095)
- 41. México:** Chiapas: Municipio Tuxtla Gutiérrez (17° 21' N, 93° 00' W), 410 msnm. julio 1965. *J. Chavelas P., González L., L. A. Pérez J.* s. n. Cuadrante 63 A. Flora del N de Chiapas y zonas adyacentes. Comisión de Dioscoreáceas, INIF. Selva alta perennifolia con *Ficus insipida*, *Guatteria anomala*, *Spondias mombin*. (MEXU 143064)
- 42. México:** Chiapas: Municipio Arriaga (16° 17' N, 93° 54' W), 250msnm. 23 diciembre 1972. *D. E. Breedlove, R. F. Thorne* 30649. Slope with Tropical deciduous Forest stream, 6 Km. north of Arriaga. (MEXU 230556)
- 43. México:** Chiapas: Municipio Villa Corzo (16° 16' N, 93° 18' W), 850 msnm. 6 abril 1981. *D. E. Breedlove* 50694. Step canyon with seasonal evergreen forest and slopes of *Quercus*, 65 Km. S of Mexican highway 190 on road from Tuxtla Gutiérrez to Nueva Concordia. (MEXU 405339)
- 44. México:** Chiapas: Municipio Villa Flores (16° 03' N, 93° 17' W, 900 msnm). 27 enero 1950. *Miranda* 5947. Rancho Lindavista, 24 Km E Villa Flores. (MEXU 71519)
- 45. México:** Chiapas: Municipio Tuxtla Chico: Tuxtla Chico (14° 54' N, 92° 07' W), 250 msnm. 13 octubre 1984. *E. Ventura, E. López* 492. Det. C. Rodríguez. Bosque, terreno plano. Árbol 25 m. (MEXU 859993)
- 46. México:** Chiapas: Municipio Palenque 17° 13' N, 91° 43' W, 250-450 msnm. 11septiembre 1967. *T. P. Pennington, J. Sarukhán K.* 9172. Zona comprendida entre los ríos Chancalah, Chocohlahito y Tulijá. Selva Lacandona. Selva mediana-alta perennifolia. Suelos derivados de margas calizas muy arcillosas, con topografía ondulada. Árbol 18 m. (MEXU 171372)
- 47. México:** Chiapas: Municipio Ocosingo: Nahá 16° 59' N, 91° 36' W, 950 msnm. 10 julio 1995. *Alejandro Durán F., samuel Levy T.* 424. Det. José García P. 27.0 Km. al SE de Palenque, por la carretera fronteriza hasta el cruce Chancalah, después 55.6 Km. por el camino de terracería hacia Monte Libano. Suelo: rendzinas y litosoles. Árbol 10 m. (MEXU 817038)
- 48. México:** Chiapas: Municipio Ocosingo 17° 01' 36" N, 91° 15' 45" W, 195 msnm. 18, 25 enero 1996. *J. Luis López-García* s. n. 4Km al SE del poblado del Ejido Nuevo Francisco León. En Río La Florida, zona norte. Acahual arbóreo muy perturbado. Topografía plana, inundado. Árbol 26 m. (MEXU 857674)
- 49. México:** Chiapas: Municipio Ocosingo (16° 50' N, 91° 27' W), 800 msnm. 27 noviembre 1972. *D. E. Breddlove, R. L. Dressler* 29838. Junto a Laguna Ocotol Grande. Bosque lluvioso de montaña, *Hauya*, *Pinus*, *Clusia*, *Ficus*, *Persea*, *Calatola*. Árbol 40 pies. (MEXU 247099)
- 50. México:** Chiapas: Municipio Ocosingo 16° 48' N, 91° 15' W, 750 msnm. 9 octubre 1976. *J. I. Calzada* 2747. Alrededores del Nuevo Centro de Población Velasco Suárez Selva Lacandona. Selva alta perennifolia primaria. Suelo negro, arcilloso, delgado, rocas calcáreas. Árbol 20 m. (MEXU 863171)
- 51. México:** Chiapas: Municipio Ocosingo 16° 44' N, 91° 05' W, 400 msnm. 24 junio 1994. *Samuel Levi T., Alejandro Durán F.* s. n. Det. José García P. Comunidad lacandona de Lacanhá-Chansayab. 130 Km. al SE de Palenque, por la carretera fronteriza hasta el cruce San Javier, después a 8 Km hacia el W. Clima húmedo con lluvias en verano. Suelos rendzinas y litosoles. Bosque tropical perennifolio. Árbol 60 m. (MEXU 938203)
- 52. México:** Chiapas: Municipio Ocosingo (16° 43' N, 91° 01' W), 350 msnm. 5 junio 1982. *Jorge Meave, Miguel Ángel Soto, Rafael Durán* 13596. Det. Miguel Angel Soto Arenas. Centro Arqueológico Bonampak. Selva alta perennifolia. Árbol 30 m., muy abundante. (MEXU 362436)
- 53. México:** Chiapas: Municipio Ocosingo (16° 41' N, 90° 53' W), 200 msnm. 18 agosto 1984. *E. Martínez S.* 7417. Det. E. M. Martínez S., 1986. A 10 Km. al SE de Crucero Corozal, camino a Boca Lacantún. Selva alta perennifolia. Árbol 35 m., con fruto, látex blanco. (MEXU 417498)
- 54. México:** Chiapas: Municipio Ocosingo (16° 43' N, 90° 54' W), 200 msnm. 12 junio 1985. *Esteban M. Martínez S., G. Aguilar* 12437. Det. J. I. Calzada. A 5 Km. al SE de Crucero Corozal, camino Palenque-Boca Lacantún. Selva alta perennifolia. Árbol 60 m. (MEXU 588597)
- 55. México:** Chiapas: Municipio Ocosingo 16° 24' N, 91° 13' W, 330 msnm. 23 agosto 1993. *A. Reyes-García y M. Sousa* S. 2261. 3 Km. al NO de la colonia Benito Juárez Miramar, sobre el camino a la Laguna Miramar, cerca del Río Azul, tributario del río Jataté. (MEXU 596107)
- 56. México:** Chiapas: Municipio Ocosingo: Ixcán (16° 07' N, 91° 04' W), 150 msnm. 7 septiembre 1992. *Martínez* 25197. Sobre río Lacantún. Selva alta perennifolia. Árbol 15 m. (MEXU 595629)
- 57. México:** Chiapas: Municipio Ocosingo (16° 07' N, 90° 55' W), 150 msnm. 8 septiembre 1992. *E. Martínez S., C. H. Ramos, R. Lombera* 25248. A 2 Km. al N de estación Chajul. Árbol 10 m. (MEXU 631572)
- 58. México:** Quintana Roo: Municipio (Othon P. Blanco) (18° 30' N, 88° 17' W, 20 msnm). 23 diciembre 1982. *E. Cabrera y H. de Cabrera* 4190. Det. F. Ramos M. 1983. A 2Km. al N de Estero Franco, sobre el camino de la Unión. Selva mediana con *Manilkara*, *Aspidosperma* y *Alseis*. Árbol 15 m. (MEXU 405632)
- 59. México:** Campeche: Municipio (Carmen): Escárcega 18° 38' N, 90° 41' W, 65 msnm. 19 julio 1963. *J. S. Marroquín* 230. Det. J. Marroquín. Campo experimental "El Tormento". (MEXU 106069)

- 60. México:** Campeche: Municipio (Carmen) (18° 33' N, 90° 45' W, 60 msnm). 29 diciembre 1965. *E. Hernández X. ES-190*. Det. J. Chavelas 1965. Det. R. M. Monjaraz 1984. Km. 5 de la carretera Escárcega-Candelaria. Selva mediana subperennifolia de *Manilkara zapotilla-Acacia*. Árbol 15 m. (MEXU 189441)
- 61. México:** Campeche: Municipio (Champotón): Calakmul 17° 59' 15" N, 89° 21' 42" W, 129 msnm. 6 agosto 1997. *E. Martínez S., D. Álvarez, S. Ramírez 28135*. A 2 Km. al NW de Dos Naciones, camino a Ley del Fomento Agropecuario. Selva baja caducifolia inundable. Árbol 10 m. (MEXU 810884)
- 62. México:** Campeche: Municipio (Champotón): Calakmul 17° 59' 01" N, 89° 21' 41" W, 185 msnm. 23 octubre 1997. *E. Martínez S. D. Álvarez, S. Ramírez, E. Lira. E. Madrid 29325*. Det. E. Martínez 1998. A 1.5 Km. al NE de Dos Naciones camino a Ley de Fomento Agropecuario. (MEXU 838598)
- 63. México:** Tabasco: Municipio (Balancán) (17° 47' N, 91° 32' W, 30 msnm). 8 diciembre 1975. *A. Novelo et al. 174*. A 100 m del límite con México (sic) sobre la carretera 15-E Tab., selva alta perennifolia, primaria. Suelo arcilloso con roca calcárea. Árbol 40 m.... (MEXU 270726)
- 64. México:** Tabasco: Municipio (Balancán) (17° 51' N, 91° 31' W), 170 msnm. 1 abril 1976. *Juan Ismael Calzada 2333*. Carretera W-O, desviación para el Ejido Francisco I. Madero. Selva alta perennifolia, primaria. Suelo negro, arcilloso, superficial. Ábol. 12 m.... (MEXU 241666)
- 65. México:** Tabasco: Municipio (Emiliano Zapata) (17° 35' N, 91° 35' W, 40 msnm). 4 diciembre 1966. *González L., Hernández P. GH 243*. Km. 3.5, carretera Tenosique-Zapata, sobre la desviación a Balancán... (MEXU 177152)
- 66. México:** Tabasco: Municipio (Teapa) (17° 33' N, 92° 57' W, 40 msnm). 15 septiembre 1944. *C. L. Gilly y E. Hernández Xolocotzi 216*. A lo largo de la orilla del Río Azufre sobre el sendero entre el Campamento San Joaquín, Chiapas y Teapa. Árbol 10 m.... (MEXU 55658)
- 67. México:** Tabasco: Municipio (Huimanguillo) (17° 38' N, 93° 32' W, 25 msnm). 4 abril 1962. *González Leija, V. Garza 10708*. Km. 59 Carretera Mal Paso-Huimanguillo C-49-A. Selva de *Gutteria anomala, Spondias mombin, Terminalia amazonia*. Árbol 25 m. (MEXU 145171)
- 68. México:** Tabasco: Municipio Cárdenas 18° 12' N, 94° 05' W, 22 msnm. 11 junio 1997. *Ana Ma. Hanan Alipi, Alfredo Pérez, Pedro Tenorio 963*. Det. Clara Ramos. Camino a Sánchez Magallanes a 41 Km. de Cuauhtemotzin. Riparia, a orillas del Río Tonalá. Árbol 6 m.... (MEXU 931569)
- 69. México:** Veracruz: Municipio (Las Choapas) 18° 03' N, 94° 06' W, 50 msnm. 26 octubre 1973. *A. D. L. Orozco S. 320*. Det. A. Orozco. 2 Km. del río Tonalá, rumbo a Coatzacoalcos. Selva baja inundable primaria. Árbol de 10-12 m., muy abundante. (MEXU 260826)
- 70. México:** Veracruz: Municipio Hidalgotitlán 17° 15' N, 94° 29' W, 150 msnm. 11 marzo 1982. *Tom Wendt, A. Villalobos C., I. Navarrete 3684*. Det. Ba. Hammel 1986. Lomitas al Se de Poblado 6. Lomerío con suelos profundos, área quemada hace 6-7 años. Pendientes y crestas con jimbal de *Olmea, Cecropia, Heliocarpus* y árboles grandes esparcidos, áreas abrigadas con manchones de selvas de *Calophyllum, Symphonia, Dialium, Guarea, Pithecellobium*. Árbol 18-20 m., dap 50 cm. (MEXU 486605)
- 71. México:** Veracruz: Municipio (Jesús Carranza): Santa Lucrecia (17° 25' N, 103°44' W), 25 msnm. 1923. B. P. Reko s. n. (MEXU 56721)
- 72. México:** Veracruz: Municipio Coatzacoalcos 18° 03' N, 94° 25' W, msnm. Julio 1962. *J. M. León Cázares s. n.* Identif. J. M. León C. Cerca de Nanchital, asociación con *Vochysia hondurensis*. (MEXU 94995)
- 73. México:** Veracruz: Municipio Coatzacoalcos 18° 05' N, 94° 26' W, 65msnm. 9 agosto 1971. *Antonio 1474*. Det. B. Hammel 1986. 1.5 Km de la carretera Coatzacoalcos-Villahermosa. Mapa 73/A19. Selva de *Calophyllum*, primaria. Árbol 12 m., abundante, perenne, fruto. (MEXU 748904)
- 74. México:** Veracruz: Municipio (Pajapan) (18° 14' N, 94° 37' W, 5 msnm). 18 noviembre 1983. *R. Cedillo Trigos, R. Vogt, 2581*. Det. G. Ibarra M. '86. San Andrés Tuxtla. Río Agua Dulce a 1Km. al NE de Jicacal. (MEXU 696212)
- 75. México:** Veracruz: Municipio Catemaco (18° 21' N, 95° 10' W, 200msnm). 4 marzo 1975. *Mario Sousa 4527*. Det. M. Sousa. Río Chuniapa. (MEXU 168416)
- 76. México:** Veracruz: Municipio Catemaco 18° 33' N, 95° 04' W, 200 msnm. 30 octubre 1984. *R. Cedillo Trigos 2853*. Det. R. Cedillo Trigos. La Palma 24 Km al N de Catemaco, camino a Montepío. Selva alta perennifolia, relicto. (MEXU 766235)
- 77. México:** Veracruz: Municipio Catemaco: Puente de Palma (18° 33' N, 95° 04' W, 200 msnm). 25 junio 1984. *Refugio Cedillo Trigos 2753*. Tuxtlas, 25 Km N de Catemaco. Ripario. Árbol 10 m. (MEXU 521837)
- 78. México:** Veracruz: Municipio Catemaco: Pta. Levisa (18° 36' N, 95° 03' W), 300 msnm. 22 enero 1985. *Refugio Cedillo Trigos 3501*. Det. G. Ibarra M. 1990. 7 Km. al NE de Laguna de Santecomapan. Vegetación riparia. Árbol 10 m. (MEXU 520955)
- 79. México:** Veracruz: Municipio San Andrés Tuxtla (18° 35' N, 95° 06' W), 160 msnm. 29 octubre 1983. *Guillermo Ibarra Manríquez 953*. Det. G. Ibarra M. 1984. L 67. Árbol 15 m. (MEXU 394409)
- 80. México:** Veracruz: Municipio San Andrés Tuxtla: EBTT (95° 06' N, 18° 35' W), 160 msnm. 22 julio 1983. *Guillermo Ibarra Manríquez 757*. Det. G. Ibarra M. Selva alta perennifolia, borde. Árbol 20 m. (MEXU 699118)
- 81. México:** Veracruz: Municipio Veracruz 19° 11' N, 90° 18' W, 50 msnm. 22 octubre 1981. *C. Gutiérrez B. 1030*. Det. C. Gutiérrez B. Ranchería Nevería. Carretera Antigua Nacional Xalapa, Ver. Selva baja subcaducifolia, secundaria. Zona inundable (medio inundada). Suelo negro arenoso, cálido. Árbol 10 m. (MEXU 396815)

## EJEMPLARES COLECTADOS EN CENTROAMÉRICA

- 82. Honduras** (Belice): Stann Creek Valley (16° 49' N, 88°37' W). 23 enero 1940. *Percy A. Gentle 3153*. Det. Lundell 1940. Cumbre Baboon, en la alta cumbre de una colina. (MEXU 89266)
- 83. Honduras** (Belice): Toledo 16° 27' N, 88° 45' W, msnm 26 abril 1945. *Percy H. Gentle 5347*. Cerca de san Antonio, a lo largo de la ensenada Moffredye. Árbol... (MEXU 513815)
- 84. Guatemala**: Petén: Uaxactun (17° 28' N, 89° 34' W), 23 enero 1977. *C. L. Lundell, Elias Contreras 20547*. Det. B. Hammel 88. Sobre la carretera secundaria Dos Lagunas, aproximadamente 2 Km W. Selva zapotal, ramonal. Árbol 21 m, dap 45.7 cm, fruto verde... (MEXU 499584)
- 85. Guatemala**: Chiquimula: Jocotán: Tachoche (14° 49' N, 89° 24' W), 500 msnm. 18 julio 1988. *M. Véliz MV 98.6380*. Det. M. Véliz 22/VII/1998. Herbario BIGUA, Escuela de Biología USA c. Árbol muy frecuente, látex amarillo, corteza del tallo con tonos amrillentos, n. v. Mario, maderable. (MEXU 896114)
- 86. El Salvador**: Municipio Santa Ana: Santa Ana (14° 00' N, 89° 33' W). 25 junio 2002. *José Linares y Carlos A. Martínez 5012*. Río Amayo, ca. 9 Km al NE de la Ciudad de Santa Ana (centro), por la carretera a Metapán. Veg. riparia y potreros. Árbol 10 m, raro, a la orilla del río. (MEXU 1018578)
- 87. Honduras**: Departamento de Comayagua: La Ceiba (14°28' N, 87°38' W), 200 msnm. 6-15 febrero 1981. *Cirilo Nelson, et al. 7324*. Det. C. Nelson. Universidad Nacional Autónoma de Honduras. Orilla de Río Yure; bosque de vega tropical, 15 Km E de Lago Yojoa, n.v. zapotillo (MEXU 523428)
- 88. Honduras**: Atlántida: 15° 43' N, 86° 51' W, 80-180 msnm. 16 mayo 1993. *Ronald L. Liesner 26394*. Det. B. Hammel 1994. Campamento Quebrada Grande, ca. 10 Km. SW de la Ceiba, en la base de la cuesta N del Pico Bonito, cuesta NW del campamento. Bosque primario con parches secundarios. Árbol 35 m... (MEXU 631269)
- 89. Nicaragua**: Departamento Zelaya: Kurinwacito (12° 52' N, 85° 06' W). 15 marzo 1984. *Juan C. Sandino 4858*. Herb. Nac. Nicaragua. Det. B. Hammel 1985. 50 Km SE de Río Blanco. Bosque tropical húmedo. Árbol 25 m. dap 75 cm, corteza con grietas, muy amargo, fr. pequeños color verde, n. v. María. (MEXU 463164)
- 90. Nicaragua**: Departamento Zelaya: Kurinwacito 13° 08' N, 84° 55' W, 80-100 msnm. 18-22 marzo 1984. *Pedro P. Moreno 23761*. Det. W. D. Stevens 1984. Árbol 30 m, flores en yema, n. v. María. (MEXU 464585)
- 91. Costa Rica**: Provincia Alajuela 10° 28' N, 84° 30' W. 9 abril 1983. *Ronald Liesner 14149* (MO). Det. B. Hammel 1985 (MO). 22Km NE de Quesada, by air 4 Km. W de Muelle San Carlos, Disturbed, seasonally dry forest. Slender 8 m tree, fr. green, latex cream color. (MEXU 668188)
- 92. Costa Rica**: Aguas Buenas: Puntarenas 8° 42' 20" N, 83° 31' 30" W, 50-150 msnm. 22 noviembre 1991. *Reinaldo Aguilar 691*. Det. B. Hammel, II, 1992. Herbario Nac. Costa Rica (CR) INBiod. (MO). Reserva forestal Golfo Dulce. Sector oeste. Árbol 38 m. dap 40 cm Frutos verdes brotes y hojas nuevas ferrugíneos. (MEXU 953669)

## EJEMPLARES COLECTADOS EN SUDAMÉRICA

- 93. Colombia**: Departamento Valle (Valle del Cauca): Bahía de Málaga 4.0' N 77.15' W (04°00' N, 77°15' W), 0-20 msnm. 17 febrero 1983. *Al Gentry, A. Juncosa & H. Mazuera 40436*. Det. B. Hammel 1988. Missouri Botanical Garden Herbarium (MO). Pacific Ocean near mouth of Quebrada La Sierpe. Tree 15 m, fruits green. (MEXU 936914)
- 94. Perú**: Departamento Loreto: Provincia Maynas 04° 45' S, 69°52' W, ca. 120msnm. 22 noviembre 1977. *Al Gentry, J. Revilla 20774*. Det. R. Liesner 1983. Río Yavari, Emilia Peruvian Village above Atalaya del Norte; seasonally inundated Tahuampa forest. Tree 30 m, bark vertically ridged, fruits green. (MEXU 887756)
- 95. Bolivia**: Santa Cruz: Provincia Ichilo: 17° 23' 35" S, 63° 40' 17" W, ca. 380msnm. 30 septiembre 1996. *Israel G. Vargas, M. Saldías, J. Balcazar, S. Jiménez, E. Chávez* s. n. Det. I.G. Vargas 1996. Herbario del oriente boliviano (USZ) Fundación amigos de la naturaleza (FAN). Saliendo 5-8 Km al norte de Buena Vista, por el camino hacia Madrejón. Bosque original muy intervenido con vegetación al margen de potreros... (MEXU 940106)
- 96. Brasil**: Minas Gerais: Municipio Diamantina: Biri-biri (18° 16' S, 43° 39' W), 25 noviembre 1975. *G. Hatschbach, W. Anderson, R. Barneby et B. Gates* s. n. Prefeitura Municipal de Curitiba Museo Botánico Municipal. Arvoreta de 4 m, flor alvescente, campo, margem de córrego. (MEXU 253871)
- 97. Brasil**: Minas Gerais: Municipio Joaquim Felício, 17 noviembre 1997. *G. Hatschbach, M. Hatschbach E. Barbosa 67202*. Det. G. Hatschbach 1998. Prefeitura Municipal de Curitiba Museo Botánico Municipal. Serra do Cabral. Árvore 5 m, flor alva. Campo rupestre margem do córrego. (MEXU 848985)
- 98. Brasil**: Paraná: Municipio Guaratuba: Candeias (25° 56' S, 48° 37' W), msnm 23 diciembre 1991. *J. M. Silva 1064*. Det. G. Hatschbach 1993. Prefeitura Municipal de Curitiba Museo Botánico Municipal. Árvore 6 m, flor creme. Restinga arborea 3m. (MEXU 640388)
- 99. Brasil**: Estado do Pará: Alto Tapajós 8°S, 57° 5' W (08° 00' N, 57° 05' W), ca. 300-400 msnm 11 febrero 1974. *W. R. Anderson, S. G. Fonsêca, R. Reis dos Santos and R. Souza 10778*. New York Botanical Garden. *Micropholis* sp. = *Sideroxylon* Det. B. Maguire, 1976. Det. como *Calophyllum brasiliense* Cambess. por J. I. Calzada 25 febrero 1994. Río Cururú. Sandy cerrado 6-8 Km S of Village. Shrub 2.5 m tall; fruit green. (MEXU 263521)

## APÉNDICE 3

# ANÁLISIS INFERENCIAL DEL CROMATOGRAMA

### **Análisis de los Patrones Cromatográficos.**

#### INTRODUCCIÓN

El objetivo inicial de la presente investigación (sugerida por mi director de tesis) era sólo detectar la presencia de los patrones cromatográficos PC rekoi 1 y PC rekoi 2, y ubicar en un mapa el sitio de colecta de los ejemplares de herbario portadores de tales PC, para conocer la distribución y proporción relativa de los quimiotipos QT1 y QT2 representados por tales PC. Era pues, una investigación muy sencilla, sin embargo, el hallazgo de nuevos datos empezó a complicarla: el artículo de D'Arcy & Keating (1979) que afirmaba que *Calophyllum rekoi* era una especie y no una variedad de la especie brasileña *C. brasiliense*; el artículo de Ito *et al.* (2003) que reportaba la presencia de una gran cantidad de cumarinas en *C. brasiliense*; el artículo de Cottiglia *et al.* (2004) que reportaba el descubrimiento de nuevas cromononas en un árbol de *Calophyllum* nativo de México; pero sobre todo, la aparición de nuevos patrones cromatográficos de los extractos de las hojas de los ejemplares de herbario; así como el reconocimiento de determinados patrones morfológicos en dichas hojas.

La idea de hacer una tesis muy fácil era seductora, sin embargo, mi curiosidad intelectual no podía resignarse a abandonar la exploración de los nuevos datos, así que continué adelante. Necesitaba un método para inferir el tipo de compuestos representados por los nuevos patrones cromatográficos que había encontrado y determinar si se relacionaban con los compuestos hallados por Ito *et al.* (2003) y Cottiglia *et al.* (2004). Pregunté a algunos compañeros químicos y consulté algunos libros de cromatografía en capa fina, pero no encontré el método que buscaba. Entonces, después de una larga reflexión, se me ocurrió una forma de obtener la información que necesitaba. A ese método es a lo que llamo “Análisis inferencial del cromatograma”, el cual consiste en los siguientes puntos:

1. Conocer las premisas básicas de la técnica de cromatografía en capa fina (el gradiente de polaridad de la placa cromatográfica, de los solventes y de los compuestos en general; los factores que afectan la reproducibilidad de los valores Rf; los factores que determinan la forma y el tamaño de las manchas).
2. Conocer las características de los tipos de compuestos con los que se trabaja (si fluorescen o no al ser expuestos a la luz UV de onda larga; si tienen sustituyentes polares tales como hidroxilos o ácidos carboxílicos, o, si por el contrario, poseen sustituyentes no polares como largas cadenas de hidrocarburos)
3. Tener una base de datos de la variación estructural de las moléculas que se estudian (por ejemplo, las estructuras moleculares todos los tipos de cumarinas de *Calophyllum*) para conocer el tipo de estructuras que es probable encontrar.
4. Determinar con precisión la identidad de las manchas de un PC de referencia del que se tenga una gran cantidad de información (las estructuras moleculares de las sustancias que lo constituyen, la secuencia de obtención de tales compuestos y la identidad de algunas de las manchas de su PC).
5. Encontrar una manera de distinguir el tipo de compuestos representados por las manchas.
6. Encontrar una relación entre las estructuras moleculares de las sustancias ya conocidas y su posición en el cromatograma.
7. Con base en todo el conocimiento anterior, tratar de determinar la identidad de las manchas de los nuevos patrones cromatográficos.

Algunos químicos han visto con desconfianza mi método. Creo que tal desconfianza de debe, por una parte, a que no están acostumbrados a que la cromatografía en capa fina aparezca en primer plano, pues se considera una técnica menor, auxiliar de otras más importantes, como la cromatografía en columna. Por otra parte, creo que se debe también a que la exposición de mi método todavía no era muy clara. Ahora he tratado de estructurarla mejor, aunque todavía tiene varios puntos débiles, algunos conceptos que aún no han madurado por completo. Sin embargo, debo decir, que mi investigación es totalmente científica: está basada en una

minuciosa observación, en el análisis y síntesis de una gran cantidad de información proveniente de diferentes fuentes bibliográficas, así como de mi propia experiencia en el laboratorio y también en mi conocimiento de la estructura molecular de las sustancias que constituyen los quimiotipos de *Calophyllum*. Pues, estoy preparando una monografía sobre la variación de la estructura molecular y la biogénesis de las cumarinas y cromanonas de *Calophyllum* (Sustaita en prep.). Además, la exposición de mi método proviene del sincero deseo de hacer una contribución al conocimiento del género *Calophyllum*. Considero que la información obtenida con dicho método tiene un valor predictivo que puede ayudar a lograr mayores avances en la comprensión de la variabilidad química de las especies de *Calophyllum*. Así pues, pido de ustedes, los lectores de esta tesis, tolerancia para mis fallas y una mente abierta para percibir lo que de bueno hay en ella.

## PATRONES CROMATOGRÁFICOS DE REFERENCIA

Los patrones cromatográficos de referencia: PC rekoí 1 y PC rekoí 2, corresponden a los quimiotipos QT rekoí 1 y QT rekoí 2 estudiados con anterioridad (Estrada, 2001; Huerta *et al.*, 2004). Las sustancias componentes de dichos quimiotipos se aislaron por medio de cromatografía en columna y su estructura molecular se determinó, entre otros métodos, por resonancia magnética nuclear. De manera que, tanto la estructura de las moléculas representadas por las manchas de los PC rekoí 1 y PC rekoí 2, como su gradiente de polaridad eran ya conocidas. Sin embargo, no existía un esquema cromatográfico en el que se definiera con precisión la identidad de cada mancha, ni su Rf; sólo se conocían con certeza algunas de ellas. De manera que fue necesario inferir esos datos por el siguiente método:

1. Se tomaron como referencia las manchas cuya identidad y ubicación en el cromatograma se conocían con certeza (mezcla de mammea A/BA + A/BB; mezcla de ácidos apetalico e iso-apetalico; y canofilol).
2. Se ordenaron los compuestos del QT rekoí 1 y QT rekoí 2 en la secuencia en que fueron obtenidos en la cromatografía en columna. Dentro de esa secuencia se ubicaron los compuestos cuya posición en el cromatograma era conocida, para saber cuantos compuestos había por encima y por debajo de ellos y de que tipo eran.
3. Se determinó el tipo de compuestos (cumarinas, cromanonas o triterpenos) al que pertenecían las manchas. Esto se hizo por medio de la observación de los cromatogramas revelados con sulfato cérico y los revelados con luz UV de onda larga.

Los compuestos de un extracto se separan de la misma manera por cromatografía en columna que por cromatografía en capa fina. De ahí que, conociendo la identidad y la secuencia de obtención de los compuestos aislados por cromatografía en columna, pueda conocerse la identidad de las manchas del cromatograma. En teoría, cada mancha del cromatograma debe corresponder a uno de los compuestos obtenidos por cromatografía en columna; sin embargo, en la práctica surgen varias dificultades, siendo las principales:

- 1) que los cromatogramas revelados con sulfato cérico no proporcionan mucha información sobre la naturaleza de los compuestos, salvo en el caso de las dipirano cumarinas, las cuales se manifiestan como manchas de color azul índigo (McKee *et al.*, 1998). Me refiero sólo a la cromatografía de los compuestos de *Calophyllum* estudiados aquí (cumarinas, cromanonas y triterpenos), no a la cromatografía de los extractos de otras plantas, donde los patrones cromatográficos están formados por manchas de diferentes colores. En los cromatogramas obtenidos aquí todas las manchas son de color marrón. Aunque, si el revelado se hace de una manera muy cuidadosa, sobre todo al aplicar calor a la placa, puede observarse cierta diferencia en el color de las manchas, aunque esta es tenue y tiende a desaparecer con el tiempo. Además, el lograr la aplicación “exacta” de revelador y de temperatura es muy difícil.
- 2) que algunos compuestos no son visibles cuando se revelan con sulfato cérico (el conocimiento de este fenómeno lo obtuve por experiencia propia al comparar las placas reveladas con sulfato cérico con las reveladas con luz UV de onda larga y ver que algunas manchas que aparecían en las segundas, no lo hacían en las primeras. También observé el fenómeno contrario, que muchas manchas visibles con el sulfato cérico, no lo eran bajo la luz UV de onda larga.
- 3) que los compuestos que tienen una polaridad semejante aparecen muy juntos o sobrelapados, de manera que no pueden distinguirse unos de otros.

4) que algunas manchas de dos compuestos, aunque no tengan una polaridad muy similar, forman una sola mancha alargada, en vez de aparecer como manchas separadas, tal es el caso de los pares *cis-trans* de las cromanonas.

Después de conocer y evaluar las dificultades antes mencionadas, se procedió a encontrarles una solución. Esta se basó principalmente en una observación minuciosa de los cromatogramas, en la comparación de aquellos revelados con sulfato cérico con los revelados con luz UV de onda larga y en combinar la información proporcionada por ambos métodos de revelado. El revelado con luz UV de onda larga muestra sólo algunos tipos de compuestos, pero ejerce una importante función discriminadora, permitiendo distinguir los tres tipos principales. Con este revelado, las cumarinas aparecen como manchas fluorescentes (amarillas o azules) sobre un fondo púrpura; los triterpenos no son visibles; y las cromanonas se muestran como manchas color marrón oscuro opaco, difíciles de distinguir del fondo púrpura. Por su parte, el revelado con sulfato cérico hace visibles la mayor parte de las manchas, aunque no proporciona mucha información acerca de su naturaleza, excepto en el caso de las dipirano cumarinas, las cuales se manifiestan como manchas de color azul índigo, contrastando con el color marrón oscuro de las otras manchas. Después de inferir la probable identidad de las manchas correspondientes a los PC rekoï 1 y PC rekoï 2; se construyó un esquema cromatográfico (Fig.1). Así mismo, se dibujaron las estructuras moleculares de los compuestos de los QT rekoï 1 y QT rekoï 2, ordenándolas de acuerdo a su polaridad, expresada en valores de R<sub>f</sub> (Fig. 2).

## NUEVOS PATRONES CROMATOGRÁFICOS.

Primero se determinó la probable naturaleza de los compuestos (cumarinas, cromanonas, triterpenos) representados por las manchas de los nuevos patrones; lo cual se hizo por medio de la observación de los cromatogramas revelados con sulfato cérico y con luz UV de onda larga. Luego, se compararon las manchas de los nuevos patrones con aquéllas de los ya conocidos, observando que tan diferentes o semejantes eran en la forma, el tamaño, el color, la fluorescencia y la posición. Si una mancha correspondiente a un patrón desconocido era muy semejante a otra de uno conocido, entonces se consideraba que había muchas probabilidades de que tal mancha fuera la manifestación del mismo compuesto (o uno muy similar) al ya conocido. Si, por otra parte, tal mancha era evidentemente diferente, entonces se asumía que representaba a un compuesto distinto también. Pero además, se consideró que se podía ir más allá, que podía inferirse el tipo de cumarinas, cromanonas o triterpenos representados por tales manchas. Aunque, tal análisis se centró principalmente en las cumarinas.

Se estudió el cromatograma junto con las estructuras de las moléculas correspondientes a las manchas de los patrones cromatográficos conocidos; y se observó que había una relación entre las estructuras de las moléculas y la posición de sus correspondientes manchas en el cromatograma. En general, las cumarinas que tenían las cadenas de acilo y prenilo no ciclizadas, se ubicaban en la parte superior del cromatograma, mientras que las que tenían las dos cadenas ciclizadas (dipirano cumarinas), lo hacían en la parte inferior, cerca de las manchas de cromanona. De esta manera, si se observaba una mancha fluorescente situada en la parte superior, podía pensarse que era más probable que correspondiera a una cumarina con las cadenas no ciclizadas, que a una dipirano cumarina. Pero además, se hizo una revisión bibliográfica de las estructuras de cumarinas, cromanonas y triterpenos de *Calophyllum* reportadas hasta ahora, para tener una idea de las estructuras que era probable encontrar.

## DISTRIBUCIÓN DE LOS COMPUESTOS EN EL CROMATOGRAMA

. El extracto hexánico de los QT rekoï 1 y QT rekoï 2a y b contiene los siguientes tipos de compuestos:

1. Cumarinas y/o cromanonas.
2. Triterpenos de diferentes polaridades que se distribuyen a lo largo de todo el cromatograma. En los quimiotipos de *C. rekoï* sólo se ha determinado la identidad de dos de ellos: la fridelina y el canofilol, pero existen por lo menos tres más. En la especie del Viejo Mundo, *Calophyllum inophyllum*, se encontraron fridelina, canofilol, canofilal, ác. canofílico, β-amirina, y acetato de 3-eritrodol (Loan Chinh, 1996). En las especies zeylanesas, además de los tres primeros compuestos, se detectaron fridelán 3β-ol y 3β,28 diol, y apetalactona (Bandara *et al.*, 1986). En todos los patrones



cromatográficos analizados, se observan manchas que parecen corresponder con precisión a las de fridelina y canofilol. Posiblemente estos dos triterpenos se hallan en todas o casi todas las especies de *Calophyllum*.

3. Ceras, que son compuestos muy hidrófobos, formados por largas cadenas de hidrocarburos. Estas sustancias se localizan en el extremo superior del cromatograma y su identidad no se conoce con precisión (Estrada, 2001; comunic. pers. con Aguilar).
4. Saponósidos triterpénicos. Los saponósidos son sustancias formadas por una estructura esteroídica o triterpénica llamada genina, y un grupo de azúcares, llamado heterósido. (Brunneton, 1991). La identidad de estos compuestos tampoco se conoce con precisión (comunic. pers. con Aguilar). Dichas sustancias son muy hidrofílicas, pues poseen gran cantidad de azúcares, así que se ubican en el extremo inferior del cromatograma. Estos compuestos no son importantes para el tema que se trata aquí, los cito sólo para hacer más evidente la diferencia de polaridad de las sustancias aisladas del extracto hexánico, así como del gradiente de polaridad del cromatograma.

La acetona es un disolvente bastante más polar (hidrofílico) que el hexano. En los extractos hechos con este disolvente se encontraron, además de muchos de los compuestos presentes en el extracto hexánico, otras sustancias: ácido shiquímico y amentoflavona. (Estrada, 2001). En el extracto acetónico del QT rekoí 1 también se encuentra una cumarina, la *iso*-mammeigina (mammea A/BA ciclo D), que no se halla en el extracto hexánico del mismo quimiotipo (Estrada, 2001). Esta cumarina es importante y de ella se hablará después.

La mitad inferior del cromatograma (por abajo del Rf 0.50) posee más manchas que la superior. Esto sucede tanto en el cromatograma revelado con sulfato cérico, como en el revelado con luz UV de onda larga. Las manchas semejantes a las de cromanona del PC rekoí 2, aparecen sólo en la parte inferior. En cambio, las manchas principales del PC rekoí 1, correspondientes a cumarinas con las cadenas de acilo y prenilo no ciclizadas, aparecen en la parte superior. Al ordenar los compuestos correspondientes a los PC rekoí 1 y PC rekoí 2, según la secuencia en que fueron obtenidos por cromatografía en columna, se obtiene el siguiente gradiente:

1. Fridelina + *iso*-mammeigina Rf = 0.76
2. Mammea B/BA + A/BB Rf = 0.66
3. Mammea A/BA + A/BB Rf = 0.58
4. Mammea C/BA + C/BB Rf = 0.52
5. Canofilol Rf = 0.47
6. Mammea B/BA ciclo F + B/BB ciclo F Rf = ¿0.41 o 0.34?
7. Ácido *iso*-apetálico + ácido calolóngico Rf = 0.35
8. Calanólidos A, B y C + sulatrólido Rf = ¿0.30?
9. Ácido apetálico Rf = 0.26

El primer compuesto, la *iso*-mammeigina (mammea A/BA ciclo D) fue aislado del extracto acetónico del QT rekoí 1, junto con la fridelina (Estrada, 2001). Por esto, se le asigna aquí un Rf igual al de este último compuesto, aunque el Rf de la *iso*-mammeigina puede estar un poco más arriba o más abajo del de la fridelina. Se ha retomado esta cumarina para compararla con una mancha fluorescente del PC brasiliense 1, que se ubica también cerca de la fridelina. Los compuestos cumarínicos 2, 3, 4 y 6 fueron aislados del extracto hexánico del QT rekoí 1 (Estrada, 2001), mientras que los compuestos 7, 8 y 9 corresponden al extracto hexánico del QT brasiliense 2. La fridelina y el canofilol son los dos triterpenos que sirven como punto de referencia.

Después de observar cuidadosamente los esquemas cromatográficos se llegó a las siguientes conclusiones:

#### Cumarinas

1. El sustituyente 4-fenilo confiere una mayor polaridad que el 4-alquilo (La mammea A/BA + A/BB aparece 8 puntos\* por debajo de la mammea B/BA + B/BB).
2. El tipo de sustituyente acilo, A (3-metilbutiril) y B (2-metilbutiril), no marca una diferencia apreciable en la polaridad. (Las cumarinas BA y BB se ubican en el mismo lugar).

---

\* Se ha utilizado el término “puntos” para designar la diferencia en el RF, es este caso:  $0.66 - 0.58 = 8$  puntos.

3. La ausencia de la cadena de prenilo hace a la cumarina más polar. (La mammea C/BA + C/BB se localiza 14 puntos por debajo de la mammea B/BA + B/BB).
4. Las monofurano cumarinas son bastante más polares que las monopirano cumarinas. (La mammea B/BA ciclo F + B/BB ciclo F se encuentra 42 puntos por debajo de la *iso*-mammeigina (mammea A/BA ciclo D)).
5. La ciclación de las cadenas de acilo y prenilo vuelven a la cumarina más polar. (Los calanólidos se encuentran muy por debajo de sus equivalentes no ciclados mammea B/BA + B/BB y A/BA + A/BB).
6. Tal vez las 4-alquil dipiranocumarinas correspondan a la mancha con  $R_f = 0.30$  y las 4-fenil dipiranocumarinas, a la mancha con  $R_f = 0.27$ . En el QT rekoï 2b, hay 4-alquil y 4-fenil dipiranocumarinas (calanólido y sulatrólido respectivamente); y, como ya se vio, el sustituyente 4-fenilo parece ser más polar que el 4-alquilo. Por lo tanto, la mancha azul índigo en el revelado con sulfato cérico del PC rekoï 2b, no puede corresponder a los dos tipos de dipiranocumarinas, sino sólo a uno de ellos. McKee *et al.* (1998) utiliza la técnica de cromatografía en capa fina para detectar dipiranocumarinas, colocando como referencia calanólido B y sulatrólido (sustancias representantes de las 4-alquil y 4-fenil dipiranocumarinas, respectivamente). De donde se deduce que estos dos tipos de cumarinas tienen un  $R_f$  diferente; pues, si ocuparan el mismo sitio, no tendría sentido poner dos referencias, hubiera bastado con sólo una de las dos. El PC rekoï 3 tiene una mancha azul índigo, como la del PC rekoï 2b, pero con un  $R_f$  menor. Si las manchas azul índigo corresponden a dipiranocumarinas (McKee *et al.*, 1998) y el sustituyente 4-fenilo es más polar que el 4-alquilo; entonces, la mancha del PC rekoï 2b, representaría a una 4-fenil dipiranocumarina. Aunque, también es cierto que la distancia entre estas dos manchas no es tan grande como la distancia que hay entre las de mammea B/BA + B/BB y mammea A/BA + A/BB. La mancha azul índigo del PC rekoï 2b correspondería a los calanólidos; mientras que la mancha correspondiente al sulatrólido, podría estar encubierta por la mancha de cromanona.
7. Tal vez las 4-alquil y 4-fenil monofuranocumarinas estén representadas respectivamente por las manchas con  $R_f = 0.41$  y  $0.34$ . (En la secuencia de extracción por cromatografía en columna del extracto hexánico del QT rekoï 1, la 4-alquil monofurano cumarina mammea B/BA + B/BB ciclo F se ubica después del canofilol y antes de otro triterpeno. En el cromatograma revelado con luz UV de onda larga, no se ve la mancha fluorescente que corresponde a estas cumarinas; y en el revelado con sulfato cérico, se ven tres manchas marrón debajo de la mancha de canofilol. Por otra parte, en el PC rekoï 3 hay una mancha fluorescente con un  $R_f$  de  $0.34$  (no visible en el revelado con sulfato cérico), y en los PC rekoï 5 y PC brasiliense 1, hay manchas fluorescentes con un  $R_f = 0.41$ . Es probable que las manchas con  $R_f = 0.41$ , correspondan a 4-alquil monofuranocumarinas; y que la mancha con  $R_f = 0.34$  corresponda a 4-fenil monofuranocumarinas.

#### **Cromanonas**

1. Las cromanonas (ácidos apetalico e *iso*-apetalico y ácido calolóngico), tienen una polaridad semejante a la de las dipirano cumarinas.
2. Las moléculas de cromanona se presentan en pares *cis-trans*, según lo observado aquí y en lo reportado en la literatura (Stout *et al.*, 1968; Plattner *et al.*, 1974; Bandara *et al.*, 1986; Cottiglia *et al.* 2004).
3. La posición *cis* o *trans* en uno de los sustituyentes metilo del anillo de cromanona marca una gran diferencia de polaridad. (El ácido apetalico *cis* metilo se encuentra 9 puntos por debajo del ácido *iso*-apetalico *trans* metilo (Plattner *et al.*, 1974; comunic. pers. con Aguilar). Esto podría complicar el análisis de la relación entre la estructura molecular y su posición en el cromatograma, pues varias moléculas de cumarinas tienen variantes *cis* o *trans*.

#### **Triterpenos**

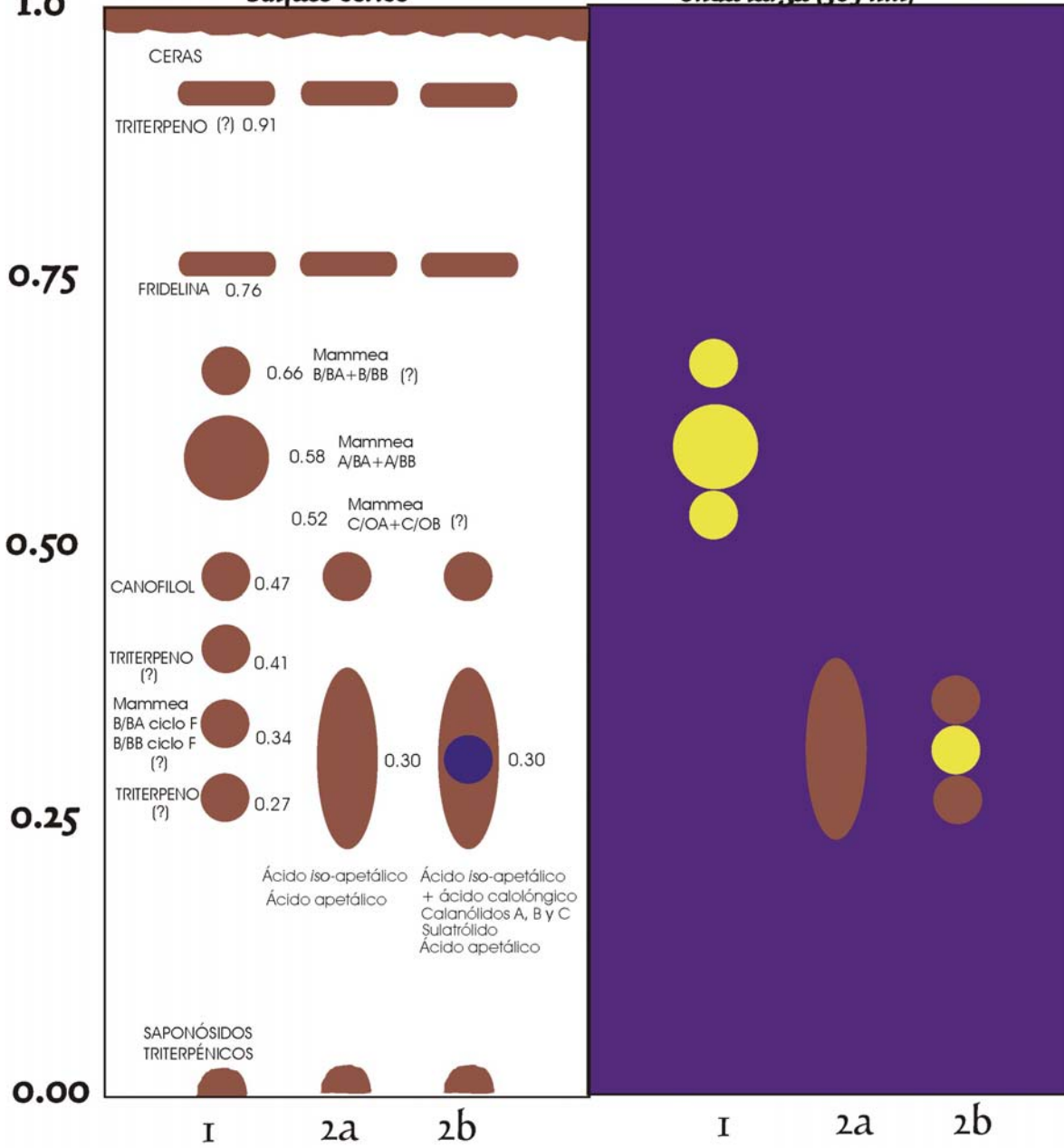
La presencia de un sustituyente hidroxilo marca una enorme diferencia de polaridad. (El canofilol se localiza 29 puntos por debajo de la fridelina).

**NO POLAR**  
(hidrofóbico)

**I.O**

**Revelado con sulfato cérico**

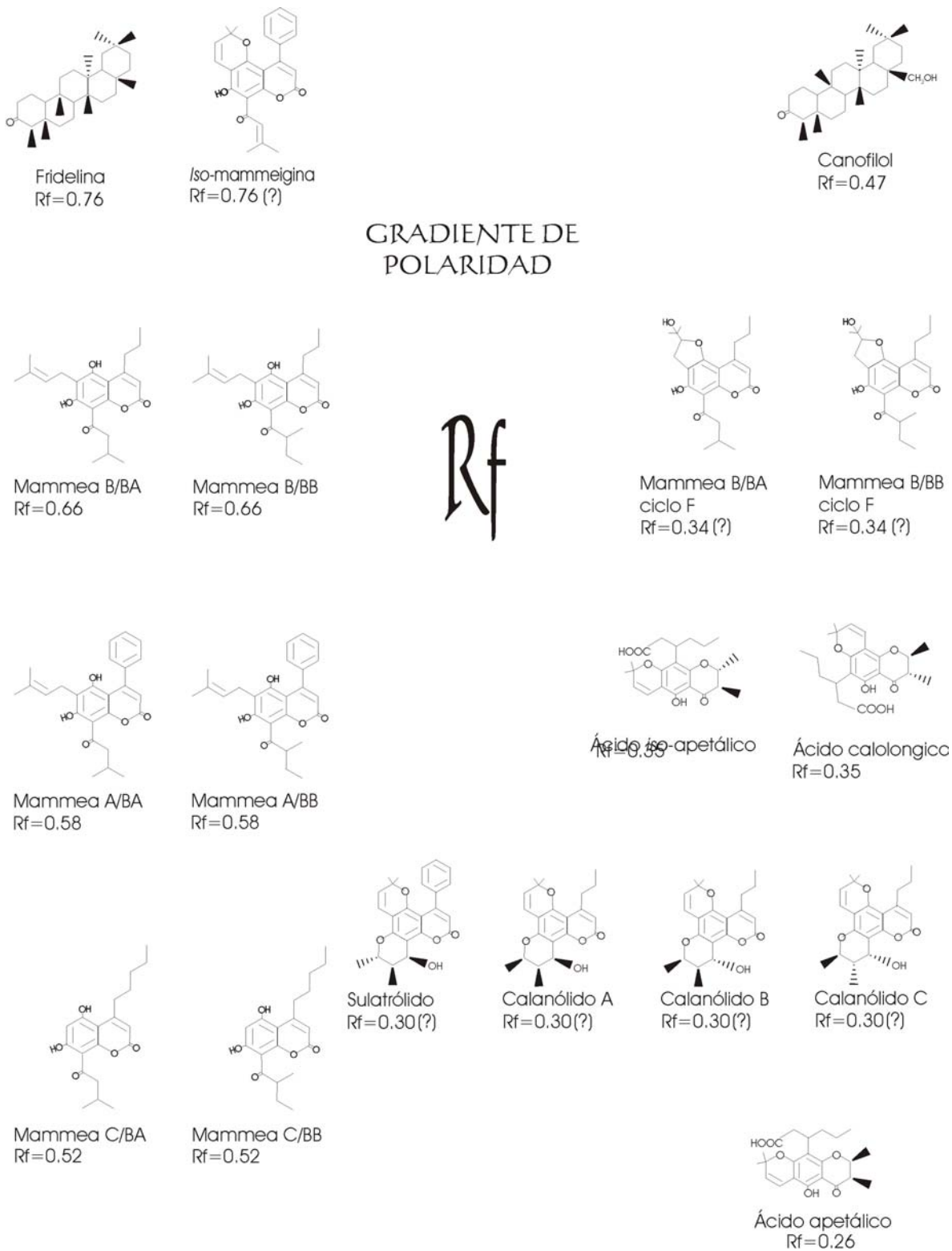
**Revelado con luz UV de onda larga (365 nm)**



**POLAR**  
(hidrofílico)

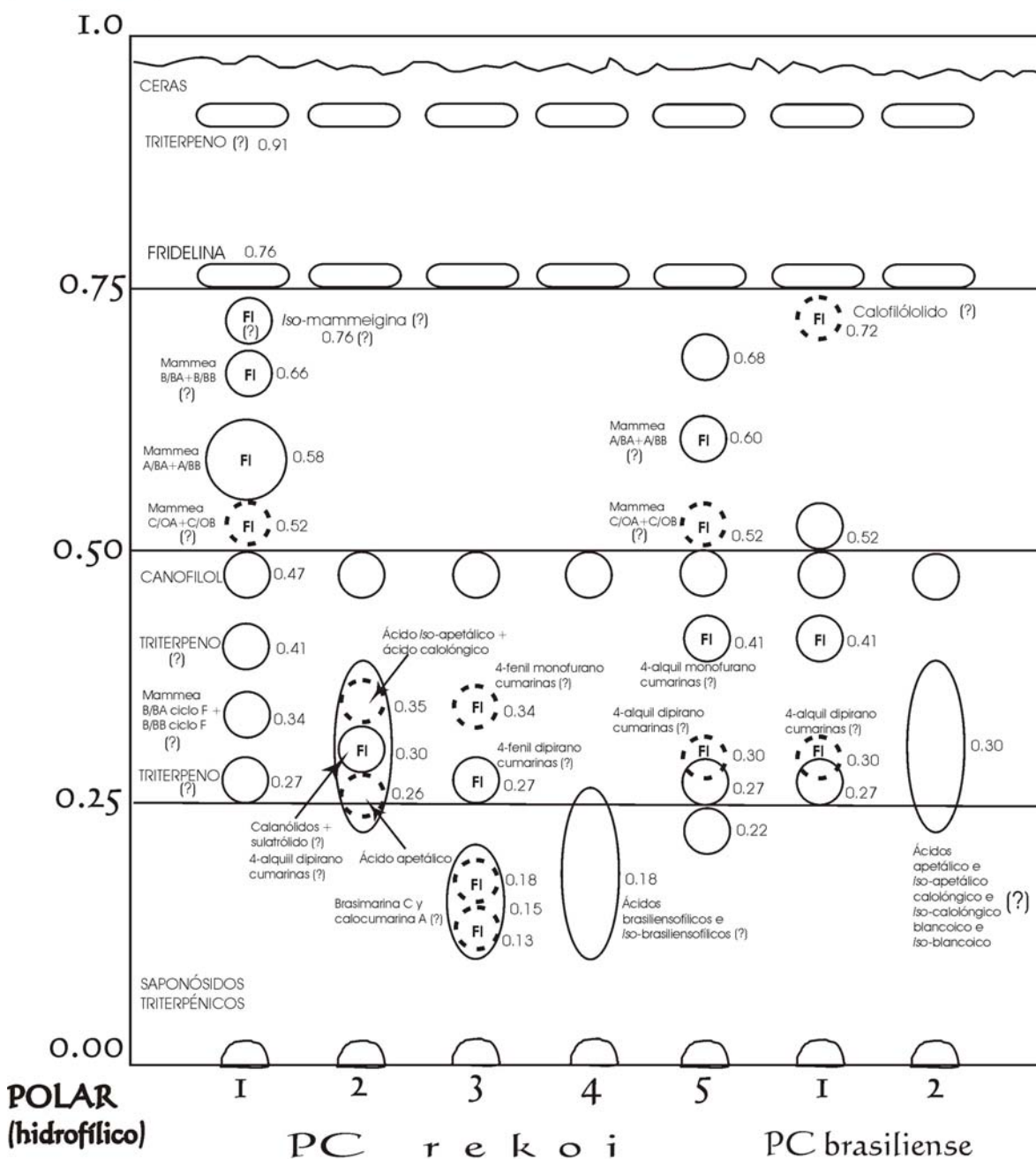
**PC      r e k o i**

**Figura 1.** Esquema de los patrones de manchas de los PC rekoi 1 y PC rekoi 2 a y b. Cromatogramas revelados con sulfato cérico y con luz UV de onda larga y desarrollados con una mezcla de hexano-acetato de etilo 8:2.



**Figura 2.** Estructura molecular y gradiente de polaridad (expresado en valores de R<sub>f</sub>) de los compuestos constituyentes de los QT rekoí 1 y 2: cumarinas, cromanonas y triterpenos.

**NO POLAR  
(hidrofóbico)**



Manchas visibles sólo con luz UV de onda larga

FI Manchas fluorescentes

**Figura 3.** Esquema general de los patrones cromatográficos de *C. rekoii* y *C. brasiliense*. Cromatogramas revelados con sulfato cérico y con luz UV de onda larga y desarrollados con una mezcla de hexano-acetato de etilo 8:2.

## DESCRIPCIÓN DE LOS PATRONES CROMATOGRÁFICOS

La siguiente descripción de los PC aparece también en la sección de Resultados de la presente investigación. Pero se ha vuelto a repetir aquí para no perder la unidad de esta sección y para que las descripciones puedan compararse con los esquemas y cuadros que aquí se encuentran.

### PC rekoï 1

En las placas reveladas con sulfato cérico este patrón aparece como una hilera vertical de manchas circulares. Entre ellas sobresale una mancha grande, de casi el doble de diámetro que las demás, con un  $R_f$  de 0.58 y que corresponde a la mezcla de cumarinas mammea A/BA + A/BB. Arriba de esta mancha se encuentra una mancha pequeña con un  $R_f$  de 0.66. Y por debajo de la mancha de canofilol ( $R_f = 0.47$ ), se encuentran otras 3 manchas pequeñas correspondientes a los siguientes  $R_f$ : 0.41, 0.34 y 0.27. El cromatograma revelado con luz UV de onda larga, muestra tres manchas fluorescentes bien definidas. Una de estas manchas es, por supuesto, la mancha grande ( $R_f = 0.58$ ), correspondiente a mammea A/BA + A/BB; la segunda es la mancha que se encuentra sobre ella ( $R_f = 0.66$ ); y la tercera, es una mancha que se localiza exactamente debajo de la mancha grande, tiene un  $R_f$  de 0.52 y no es visible en el revelado con sulfato cérico.

Existe una enorme probabilidad de que estas tres manchas correspondan a las tres primeras cumarinas obtenidas por cromatografía en columna: mammea B/BA + B/BB, mammea A/BA + A/BB y mammea C/BA + C/BB. La cuarta cumarina, mammea B/BA ciclo F + B/BB ciclo F, es probable que esté representada por las manchas  $R_f = 0.41$  o  $R_f = 0.34$ . Aunque no hay una indicación clara de una mancha fluorescente en esa zona, lo cual podría deberse a que la concentración de este compuesto es baja. Seguramente una de estas dos manchas es un triterpeno y la otra, la furano cumarina. En los esquemas (Fig. 1 y 3) se han marcado las presuntas identidades de las manchas de este patrón, para las estructuras véase la Fig. 2.

### PC rekoï 2

El PC rekoï 2 corresponde al QT rekoï 2 descrito en la sección de Antecedentes. Dicho QT, conformado por cromanonas (ác. apetalico e iso-apetalico y ác. calolónico) y dipiranocumarinas (sulatrólido y calanólidos A, B y C), es el que se ha reportado en una publicación (Huerta *et al.*, 2004); sin embargo, no es el único. Se han detectado variantes de este QT, pero esas variantes no se han dado a conocer. Una de tales variantes es una que no contiene dipiranocumarinas (y, al parecer, tampoco ác. calolónico), sino sólo ácidos apetalico e iso-apetalico. En los cromatogramas de la presente investigación aparece con frecuencia un PC semejante al correspondiente al QT 2, pero sin la mancha azul (en el revelado con sulfato cérico) o la mancha fluorescente (en el revelado con luz UV de onda larga). Considero que ese PC corresponde al QT que sólo contiene ácidos apetalico e iso-apetalico y lo he llamado PC rekoï 2a, mientras que al PC que presenta indicios de dipirano cumarinas lo he llamado PC rekoï 2b.

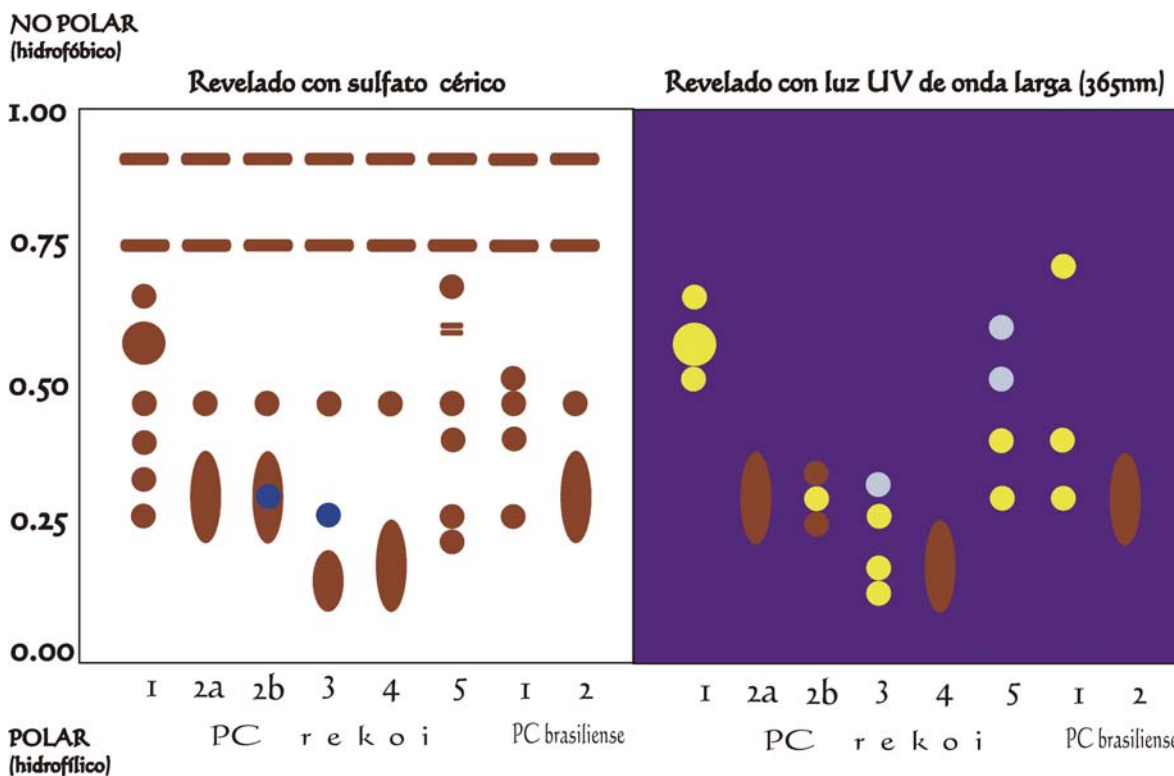
### PC rekoï 2a

En el cromatograma revelado con sulfato cérico, este patrón consta sólo de una mancha alargada, fusiforme, de color marrón con un  $R_f$  de 0.30. En el revelado con luz UV de onda larga, la mancha es difícil de distinguir, ya que tiene un color marrón oscuro opaco que se confunde con el fondo púrpura de la placa. Esta mancha corresponde probablemente al par de cromanonas: ácido apetalico e iso-apetalico.

### PC rekoï 2b

En el cromatograma revelado con sulfato cérico, este patrón consta, como el anterior, de una mancha alargada, fusiforme, de color marrón con un  $R_f$  de 0.30. Sólo que, varios días después de ser revelada; aparece en el centro de esta mancha, otra de color azul índigo. En el revelado con luz UV de onda larga, en cambio, desde el principio se observan tres manchas. Las tres son pequeñas y circulares, dos de ellas son de color marrón; la tercera es amarilla fluorescente, y se encuentra en medio de las otras dos. La mancha inferior ( $R_f = 0.26$ ) corresponde al ácido apetalico, mientras que la superior ( $R_f = 0.35$ ), al ácido iso-apetalico y al

ácido calolónico (comunic. pers. con Aguilar; Plattner *et al.*, 1974). La mancha central ( $R_f = 0.29$ ) corresponde evidentemente a dipirano cumarinas (calanólidos A, B, C y sulatrólido). Aunque, como ya se discutió anteriormente, dicha mancha fluorescente, debe corresponder a sólo una de los dos tipos de dipiranocumarinas; sin embargo, no se observa otra mancha fluorescente.



**Figura 4.** Esquema de los patrones cromatográficos de *C. rekoii* y *C. brasiliense*. Cromatogramas revelados con sulfato cérico y con luz UV de onda larga y desarrollados con una mezcla de hexano-acetato de etilo 8:2.

### PC rekoii 3

En el cromatograma revelado con sulfato cérico este patrón está formado por dos manchas; la primera de ellas es pequeña y circular, de color azul índigo ( $R_f = 0.27$ ) y la segunda es alargada y fusiforme ( $R_f = 0.15$ ), semejante a la mancha del PC rekoii 2, pero más pequeña. Sin embargo, el revelado con luz UV de onda larga muestra cuatro pequeñas manchas circulares fluorescentes, siendo la más fuerte, la correspondiente a la mancha de color azul índigo. Sobre ésta se encuentra otra mancha ( $R_f = 0.34$ ) cuya fluorescencia es muy débil. Esta mancha es invisible en el revelado con sulfato cérico. La mancha alargada que se encuentra bajo la mancha azul índigo consta en realidad de dos pequeñas manchas fluorescentes ( $R_f = 0.18$  y  $0.13$ ).

Al parecer, estas manchas corresponden a cuatro diferentes tipos de cumarinas, siendo la mancha azul índigo, con seguridad, una dipiranocumarina. Esta mancha es semejante a la del PC rekoii 2b, sin embargo, las dos manchas no tienen el mismo  $R_f$ , la del PC rekoii 2b está ligeramente por encima de la del PC rekoii 3. Además, en este último patrón, la mancha, al ser revelada con sulfato cérico aparece inmediatamente; no es necesario esperar varios días para poder verla. Tal vez la mancha fluorescente con  $R_f = 0.34$  represente a una monofurano cumarina por dos razones: primero, por que se encuentra en una zona semejante a aquella donde debería estar la monofurano cumarina del PC rekoii 1; segundo, por que no parece ser una dipirano cumarina, pues no es de color azul índigo. Respecto a las dos manchas fluorescentes que conforman la mancha alargada,

ellas podrían corresponder a un par *cis-trans*, tal vez la calocumarina A y la brasimarina C, cumarinas del QT brasiliense 1 (Ito et al., 2003).

#### **PC rekoï 4**

En el cromatograma revelado con sulfato cérico, este patrón aparece como una sola mancha, de la misma forma y tamaño que la de cromanona del PC rekoï 2a. Sin embargo, esta mancha posee un Rf notablemente más bajo (Rf = 0.18). Al ser revelada con luz UV de onda larga no muestra fluorescencia; su color es marrón oscuro opaco. Seguramente es una mancha formada por cromanonas, pero diferente del ácido apetalico. Recientemente Cottiglia *et al.* (2004) reportaron la presencia de nuevas cromanonas en plantas de *Calophyllum* colectadas en Sotepan, Veracruz. El descubrimiento de estos compuestos, llamados ácidos brasiliensofílicos A, B y C, es importante, pues son 4-fenil cromanonas y hasta ahora sólo se habían encontrado 4-alkil cromanonas en América (Plattner *et al.*, 1974; Stout *et al.*, 1968; Huerta *et al.*, 2004). Es probable que estos compuestos, pero en una etapa biogenética más avanzada (véase el esquema biogenético en la sección de Antecedentes), sean los constituyentes del PC rekoï 4. Si en los ácidos brasiliensofílicos se perdiera la cadena modificada de la estructura geminal, quedando sólo la cadena de prenilo, y luego esta última se ciclizara, el resultado sería una cromanona idéntica al ácido chapeliérico. Como el ácido chapeliérico parece una estructura más polar que los ácidos brasiliensofílicos, se considera aquí que ese podría ser el compuesto representado por la mancha de cromanona del PC rekoï 4.

#### **PC rekoï 5**

En el cromatograma revelado con sulfato cérico, aparecen una serie de manchas circulares (las superiores a veces un poco aplanadas), que se extienden hacia arriba y hacia abajo del Rf 0.50. Estas manchas son similares a las del PC rekoï 1, pero no se ajustan completamente a este patrón, están un poco más arriba o más abajo; o faltan o aparecen manchas fluorescentes con un Rf muy bajo, donde no las presenta el PC rekoï 1. En el cromatograma revelado con luz UV de onda larga se observan varias manchas fluorescentes y ninguna como las de cromanona. El esquema muestra sólo uno de estos levemente diferentes grupos de manchas. Se ha elegido el más semejante al PC rekoï 1, pero hay otros que exhiben manchas fluorescentes más abajo. Muy probablemente las sustancias que conforman este patrón sean diferentes tipos de cumarinas.

#### **PC brasiliense 1**

En el cromatograma revelado con sulfato cérico este patrón aparece como un grupo de tres manchas circulares del mismo tamaño: la primera directamente por encima de la mancha de canofilol; la segunda, debajo de la mancha de este compuesto, y la tercera aún más abajo. Los Rf de estas manchas son: 0.52, 0.41, 0.27 respectivamente. Sin embargo, el revelado con luz UV de onda larga muestra tres manchas fluorescentes, de las cuales sólo una coincide con las anteriores. Los Rf son: 0.72, 0.41 y 0.30. No aparece mancha alguna de cromanona. Es muy probable que este patrón esté constituido por varios tipos de cumarinas. Un artículo recientemente publicado por Ito, *et al.*, (2003), reporta el aislamiento de varias cumarinas en la especie brasileña *C. brasiliense*. El material para este estudio fue colectado en Santa Catarina, estado vecino de Paraná, lugar donde ha sido detectado el PC brasiliense 1. Existen grandes probabilidades de que los compuestos reportados en dicho artículo, sean los integrantes de dicho patrón.

#### **PC brasiliense 2**

Tanto en el cromatograma revelado con sulfato cérico, como en el revelado con luz UV de onda larga, aparece una sola mancha; muy semejante a la del PC rekoï 2 a, sin ninguna fluorescencia. Es muy probable que contenga ácido apetalico e *iso*-apetalico o cromanonas muy semejantes a éstas.



**Cuadro 1.** Características de las manchas de los patrones cromatográficos de *C. rekoï*

**PC rekoï 1**

Mancha (Rf)	Visible con (revelador)	Identidad	Clase de estructura
0.91	SC	Desconocida	¿Triterpeno?
0.76	SC	Fridelina	Triterpeno
0.66	SC y UV (fl)	Mammea B/BA+ B/BB	Cumarina (4-alquil, 8-acil, apirano*, afurano*)
0.58	SC y UV (fl)	Mammea A/BA+ A/BB	Cumarina (4-alquil, 8-acil, apirano*, afurano*)
0.52	UV (fl)	Mammea C/BA+ C/BB	Cumarina (4-alquil, 8-acil, apirano*, afurano*, aprenilo*)
0.47	SC	Canofilol	Triterpeno
0.41	SC	Desconocida	¿Triterpeno?
0.34	SC	Mammea B/BA+ B/BB ciclo F	Cumarina (4-alquil, 8-acil, monofurano)
0.27	SC	Desconocida	¿Triterpeno?

apirano\* = sin anillos de pirano; afurano\* = sin anillos de furano; aprenilo\* = sin anillo de prenilo

**PC rekoï 2**

Mancha (Rf)	Visible con (revelador)	Identidad	Clase de estructura
0.91	SC	Desconocida	¿Triterpeno?
0.76	SC	Fridelina	Triterpeno
0.47	SC	Canofilol	Triterpeno
0.30	SC	2 a	Cromanonas
0.35	UV	mancha total de cromanona	Cromanona
0.26	UV	ác. <i>iso</i> -apetálico	Cromanona
		ác. apetálico	Cromanona
0.30	SC	2 b	Cromanonas y dipiranocumarinas
0.35	UV	Mancha total de cromanona	Cromanona
0.30	UV (fl)	ác. <i>iso</i> -apetálico	Cumarina (4-alquil, 8-acil, dipirano)
		calanólidos A, B, C y	Cumarina (4-alquil, 8-acil, dipirano)
0.26	UV	sulatrólido	cromanona
		ác. apetálico	

**PC rekoï 3**

Mancha (Rf)	Visible con (revelador)	Identidad	Clase de estructura probable
0.91	SC	Desconocida	¿Triterpeno?
0.76	SC	Fridelina	
0.47	SC	Canofilol	
0.34	UV (fl)	Desconocida	Cumarina (tal vez furano o 4-alquil dipirano)
0.27	SC y UV (fl)	Desconocida	Cumarina (tal vez 4-fenil dipirano)
0.15	SC	Mancha total de cumarinas	
0.18	UV (fl)	Desconocida	Cumarina (tal vez 4-alquil o 4-fenil monopirano)
0.13	UV (fl)	Desconocida	Cumarina (tal vez 4-alquil o 4-fenil monopirano)

SC = sulfato cérico UV = ultravioleta fl = fluorescente

**PC rekoi 4**

Mancha (Rf)	Visible con (revelador)	Identidad	Clase de estructura probable
0.91 0.76 0.47 0.18	SC SC SC SC y UV	Desconocida Fridelina Canofilol Desconocida	¿Triterpeno?  Cromanona (tal vez ácido brasiliense)

**PC rekoi 5**

Mancha (Rf)	Visible con (revelador)	Identidad	Clase de estructura probable
0.91 0.76 0.68 0.60 0.52 0.47 0.41 0.30 0.27 0.22	SC SC SC SC y UV (fl) UV (fl) SC SC y UV (fl) UV (fl) SC SC	Desconocida Fridelina Desconocida Desconocida Desconocida Canofilol Desconocida Desconocida Desconocida Desconocida	¿Triterpeno?  ¿Triterpeno? Cumarina (tal vez semejante a mammea A/BA o A/BB) Cumarina (tal vez semejante a mammea C/BA o C/BB)  Cumarina (tal vez furano) Cumarina (tal vez dipirano) ¿Triterpeno? ¿Triterpeno?

SC = sulfato cérico    UV = ultravioleta    fl = fluorescente

**Cuadro 2.** Características de las manchas de los patrones cromatográficos de *C. brasiliense*.

**PC brasiliense 1**

Mancha (Rf)	Visible con (revelador)	Identidad	Clase de estructura probable
0.91 0.76 0.72 0.52 0.47 0.41 0.30 0.27	SC SC UV (fl) SC SC SC y UV (fl) UV (fl) SC	Desconocida Fridelina Desconocida Desconocida Canofilol Desconocida Desconocida Desconocida	Triterpeno  Cumarina (tal vez calofilólido) ¿Triterpeno?  Cumarina (tal vez brasimarina B) Cumarina (tal vez dipirano) ¿Triterpeno?

**PC brasiliense 2**

Mancha (Rf)	Visible con (revelador)	Identidad	Clase de estructura probable
0.91 0.76 0.47 0.30	SC SC SC SC y UV	Desconocida Fridelina Canofilol Desconocida	¿Triterpeno?  Cromanonas (seguramente semejantes al ác. apetalico)

SC = sulfato cérico    UV = ultravioleta    fl = fluorescente

## Quimiotipos de *C. rekoï* y *C. brasiliense*

La comparación de los quimiotipos de las especies México-centroamericana y brasileña es un elemento fundamental en la presente investigación. Sin embargo, la información obtenida por medio de la técnica de cromatografía en capa fina, es muy pobre, de manera que no puede conocerse con certeza la composición química de las manchas observadas. De los resultados obtenidos aquí, puede afirmarse sólo lo siguiente:

1. Tres ejemplares brasileños presentaron un patrón de manchas fluorescentes, diferente de los patrones de *Calophyllum rekoï*.
2. Otro ejemplar brasileño presentó una mancha igual a la mancha de cromanona del PC rekoï 2a, correspondiente al QT rekoï 2a.
3. Es muy probable que el PC brasiliense 1 (con manchas fluorescentes) esté constituido por diferentes tipos de cumarinas; mientras que el PC brasiliense 2 (con una mancha como la de cromanona), lo esté por cromanonas.
4. Por lo tanto, puede decirse que la especie *C. brasiliense* tiene un quimiotipo con cumarinas y otro con cromanonas, como la especie *C. rekoï*.

Sin embargo, la identidad de los compuestos que conforman el PC brasiliense 1 y el PC brasiliense 2, puede inferirse. Esto se hará por medio del análisis de las estructuras de los compuestos encontrados por otros investigadores en los taxa americanos de *Calophyllum*. El siguiente análisis está basado principalmente en dos artículos: Ito *et al.* (2003) y Plattner *et al.* (1974). Primero se discutirá la probable identidad de los componentes del PC brasiliense 2, y luego, las del PC brasiliense 1.

### CROMANONAS DE *C. BRASILIENSE*: QT brasiliense 2 (PC brasiliense 2)

El PC brasiliense 2 consiste de una mancha no fluorescente, semejante en todo: forma, tamaño, color y R<sub>f</sub>, a la del PC rekoï 2 (correspondiente al QT rekoï 2a). Por lo cual, es muy probable que tal mancha represente a los compuestos cromanónicos del QT rekoï 2a: ácido apetalico y ácido *iso*-apetalico, o algunas leves variantes de estos compuestos. Con el objeto de reforzar esta inferencia, se revisaron las fuentes bibliográficas en busca de reportes de cromanonas en la especie brasileña *C. brasiliense*. Sin embargo, no se encontró algún artículo que confirmara la presencia de cromanonas en plantas de *Calophyllum* nativas del territorio brasileño. Pues, aunque en la literatura se reporta la presencia de cromanonas en la especie *C. brasiliense*, las plantas estudiadas pertenecen a la zona México-centroamericana; o, no se menciona el sitio de la colecta.

No obstante, hay un artículo (Plattner *et al.*, 1974) que proporciona una gran cantidad de información acerca de los ácidos apetalico e *iso*-apetalico, así como de otras moléculas semejantes a ellos. A partir de esta información puede conjeturarse la identidad de los compuestos representados por la mancha de cromanona del PC brasiliense 2. En 1974, Plattner *et al.* publican un artículo que muestra varias estructuras cromanónicas semejantes al ácido apetalico. El artículo dice que los compuestos se obtuvieron del extracto pentano-hexano de granos de semillas de *C. brasiliense*, desafortunadamente, no se menciona el lugar de colecta. Esas semillas pudieron provenir de plantas sudamericanas, mexicanas, centroamericanas o antillanas.

Plattner *et al.* (1974) encuentran siete diferentes estructuras; una de ellas corresponde al ácido *iso*-calolónico. Las otras seis son muy semejantes al ácido apetalico, y conforman tres pares *cis-trans* (de uno de los sustituyentes metilo del anillo de cromanona). El primer par está formado por el ácido apetalico y el ácido *iso*-apetalico. El segundo par está formado por dos estructuras muy parecidas a estos ácidos. Estas estructuras, a las que Plattner *et al.* no dan nombre, difieren del primer par sólo en que poseen un metilo más en la cadena hidrocarbonada de la parte superior de la estructura. El tercer par lo constituyen el ácido blancoico y otra cromanona, a la que tampoco se da nombre; pero que puede llamarse ácido *iso*-blancoico, pues es la variante *cis* del ácido blancoico. (Véase el cuadro 7 de la sección de Antecedentes y la figura 5 de este apéndice)

Plattner *et al.* (1974), dicen que el conjunto de compuestos aislados por ellos se divide en dos grupos de diferente polaridad. El grupo principal, que contiene ácido apetalico y ácido *iso*-calolónico, es un poco más

móvil que el grupo que contiene ácido *iso*-apetálico y ácido blancoico. Esta información indica dos cosas importantes:

1. Si el grupo de compuestos aislados por Plattner *et al.* (1974) se encuentra representado por dos manchas, y si el constituyente de una de ellas es el ácido apetálico, y el de la otra, el ácido *iso*-apetálico; entonces, estas manchas deben tener, respectivamente, el mismo Rf que las dos manchas de cromanona del PC rekoï 2a.
2. Todos los compuestos *cis* aislados por Plattner *et al.* (1974) (incluyendo el ácido *iso*-calolóngico), se reúnen en una sola mancha y todos los compuestos *trans*, se agrupan en otra mancha. Esto significa que cualquiera de los pares *cis-trans* mencionados anteriormente, estaría representado por dos manchas (o una sola mancha alargada) iguales a las del PC rekoï 2a, con el mismo Rf. De esta manera, una mancha de cromanona igual a la del PC rekoï 2a (formada por ácido apetálico y por ácido *iso*-apetálico); podría estar constituida por el par ácido blancoico-ácido *iso*-blancoico, o por el par ácido calolóngico-ácido *iso*-calolóngico. Plattner *et al.* (1974) aíslan sólo ácido *iso*-calolóngico (*cis*); pero Huerta *et al.* (2004), encuentra ácido calolóngico (*trans*), en el QT rekoï 2b de *C. rekoï*. A primera vista, las estructuras de este último par de ácidos, no parecen ser iguales a los de los ácidos apetálico e *iso*-apetálico; sin embargo son muy semejantes, pues poseen las mismas partes que éstos, sólo que ordenadas de manera diferente. (véase la siguiente figura y el cuadro 7 de la sección de Antecedentes).

Por lo tanto, puede inferirse que la mancha de cromanona del PC brasiliense 2 podría estar formada por: el par ácido apetálico-ácido *iso*-apetálico; o por el par ácido blancoico-ácido *iso*-blancoico; o por el par ácido calolóngico-ácido *iso*-calolóngico; o por el par de los compuestos a los que Plattner *et al.* no dieron nombre; o por una mezcla de todos, o algunos de estos compuestos, o por otras cromanonas semejantes a las mencionadas. En resumen, se considera aquí que lo más probable es que la mancha de cromanona del PC brasiliense 2, esté formada por un par *cis-trans* de 4-alkil cromanonas con las cadenas de prenilo ciclizadas. Es poco probable que esté constituida por los ácidos brasiliensicos o brasiliensofílicos (véase más arriba la discusión acerca del PC rekoï 4).

### CUMARINAS DE *C. BRASILIENSE*: QT brasiliense 1 (PC brasiliense 1)

En 2003, Ito *et al.* publican un artículo en el cual reportan la existencia de una gran diversidad de cumarinas (y xantonas) en la especie brasileña *Calophyllum brasiliense*. Al conjunto de cumarinas aisladas por ellos, se le ha llamado aquí QT brasiliense 1. Se ha hecho esto en parte por que es el primer quimiotipo descrito para la especie brasileña; y en parte por que varios de sus compuestos son iguales o parecidos a los del QT rekoï 1.

Se realizó un análisis comparativo de las cumarinas de la especie brasileña y la centroamericana. Pero, antes de mostrar los resultados de tal análisis, se aclarará que el QT brasileño se obtuvo del extracto acetónico de la corteza, mientras que los quimiotipos (incluyendo los PC) de *C. rekoï*, se han obtenido del extracto hexánico de las hojas. Aquí se considera que los quimiotipos mexicanos y el quimiotipo brasileño pueden compararse. En favor de tal suposición, puede decirse: Primero, que las cumarinas y las cromanonas de otras especies de *Calophyllum* se han aislado de la corteza, de las hojas y de otras partes de la planta. Segundo, que hasta ahora no se ha reportado que las cumarinas de las hojas sean diferentes de las de la corteza. Tercero, los compuestos del extracto acetónico del QT rekoï 1, no difieren mucho de aquéllos del extracto hexánico del mismo quimiotipo. Como puede verse en el siguiente cuadro.

**Cuadro 3.** Comparación de los extractos hexánico y acetónico de las hojas del QT rekoï 1 de *C. rekoï* (Estrada, 2001).

EXTRACTO HEXÁNICO	EXTRACTO ACETÓNICO
Cera (776.5 mg)	
Friedelina (45.9 mg)	Friedelina + <i>iso</i> -mammeigina
Mammea B/BA + B/BB (5.0 mg)	
Mammea A/BA + A/BB (720.6 mg)	Mammea A/BA + A/BB (174.7 mg)
Canofilol + mammea C/BA + C/BB (83.0 mg)	Canofilol (70.9 mg)
Mammea B/BA ciclo F + B/BB ciclo F (30.0 mg)	Mammea B/BA ciclo F + B/BB ciclo F (102.3 mg)
Triterpeno	Triterpeno (5.6 mg)

El cuadro 4 muestra las cumarinas aisladas, en la secuencia en que aparecen en el artículo.

**Cuadro 4.** Cumarinas aisladas del extracto acetónico de la corteza del tronco de *C. brasiliense*, de Santa Catarina, Brasil (Ito, 2003).

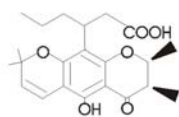
FRACCIÓN 4	FRACCIÓN 5	FRACCIÓN 6
<b>Hexano-acetona 85:15</b>	<b>Hexano-acetona 4:1</b>	<b>Hexano-acetona 3:1</b>
Brasimarina A (5.2 mg) Brasimarina B (2.7 mg) Mammea B/BB (3.2 mg) Calanona (1.9 mg) Calofilólido (6.3 mg)	Brasimarina B (2.9 mg) Inófilum C (10.7 mg) Inófilum A (2.1 mg) Calanólido A (2.6 mg) Calanólido C (2.4 mg) Inófilum D (1.9 mg)	Inófilum E (2.4 mg) Calocumarina A (1.26 mg)

Como resultado de la observación comparativa de estos dos grupos de cumarinas, se desprenden las siguientes afirmaciones:

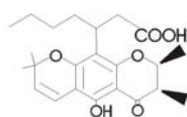
1. El quimiotipo de *C. brasiliense* contiene una gran variedad de cumarinas; algunas de ellas iguales y otras semejantes a aquellas de los quimiotipos de *C. rekoii*. Tanto las cumarinas de *C. brasiliense*, como las de *C. rekoii*, son 8-acil cumarinas, la mayoría de ellas con un sustituyente 4-fenilo o 4-propilo. El QT brasiliense 1 parece una mezcla de las cumarinas de los dos quimiotipos de *C. rekoii*. (Véase fig. 6).
2. Existe una probabilidad grande de que el QT brasiliense 1 corresponda al PC brasiliense 1 (de los tres especímenes brasileños estudiados en la presente investigación). Tal afirmación se basa en los siguientes razonamientos: 1) La corteza de la cual se aisló el QT brasiliense 1, se colectó en Santa Catarina (Ito *et al.*, 2003); estado vecino de Paraná; y los ejemplares de herbario, en los que se detectó el PC brasiliense 1, fueron colectados en Paraná y Minas Gerais. Por lo tanto, es muy probable que se trate del mismo taxón y posea los mismos compuestos. 2) Es muy probable que la mancha fluorescente con  $R_f = 0.72$  del PC brasiliense 1, corresponda al calofilólido del QT brasiliense 1 (ver fig. 6) El calofilólido es el análogo 4-alkil de la *iso*-mammeigina; y, como se vio anteriormente, los substituyentes 4-alkil y 4-fenil tienen una polaridad diferente, aunque no muy grande. Así pues, las manchas de calofilólido y de *iso*-mammeigina deben tener un  $R_f$  semejante. En el PC brasiliense 1 hay una mancha fluorescente en la parte superior del cromatograma, cerca de la friedelina, con un  $R_f$  de 0.72. Por otra parte, del extracto acetónico del QT rekoii 1, se aisló la *iso*-mammeigina, junto con la fridelina. De donde se deduce que la mancha fluorescente del PC brasiliense 1, corresponden a la cumarina calofilólido.
3. Aunque los quimiotipos de estas dos especies son parecidos (el QT brasiliense 1 es semejante al QT rekoii 1 y es muy probable que el QT brasiliense 2 sea semejante el QT rekoii 2), sus morfologías foliares son diferentes.

## CROMANONAS

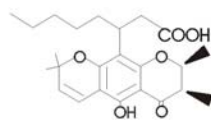
### C I S



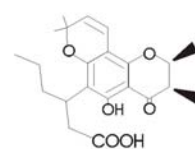
Ácido apetalico



Sin nombre

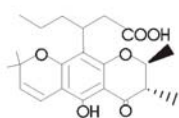


Sin nombre  
(Ácido *iso*-blancoico)

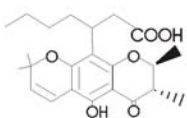


Ácido *iso*-calolongoico

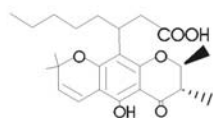
### T R A N S



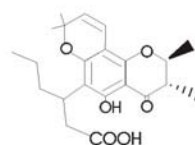
Ácido *iso*-apetalico



Sin nombre

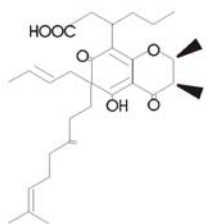


Ácido blancoico

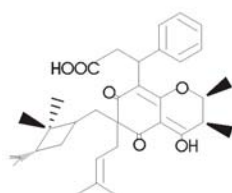


Ácido calolongoico

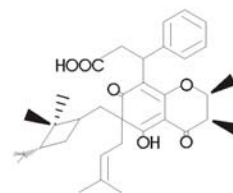
### C I S



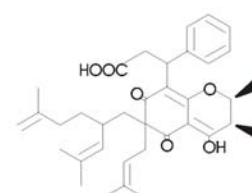
Ácido *iso*-brasilienico



Ácido *iso*-brasilienosofilico A

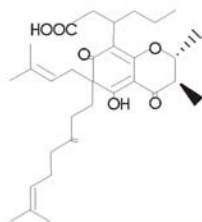


Ácido *iso*-brasilienosofilico B

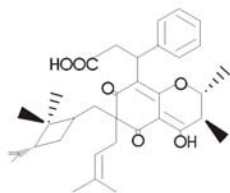


Ácido *iso*-brasilienosofilico C

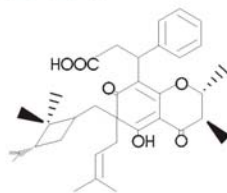
### T R A N S



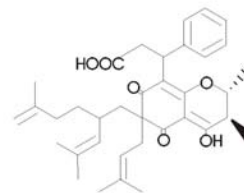
Ácido brasilienico



Ácido brasilienosofilico A



Ácido brasilienosofilico B

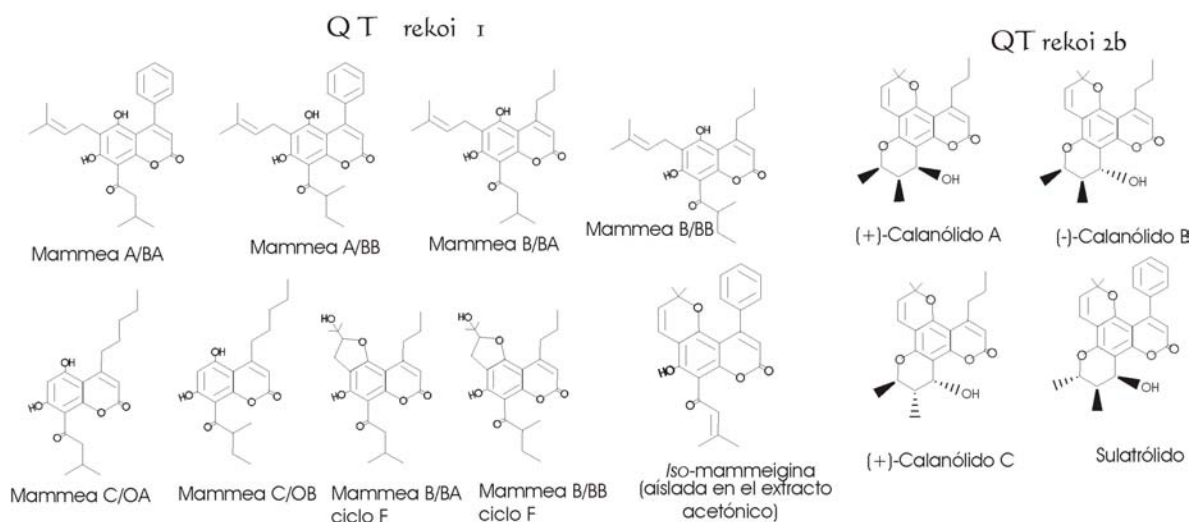


Ácido brasilienosofilico C

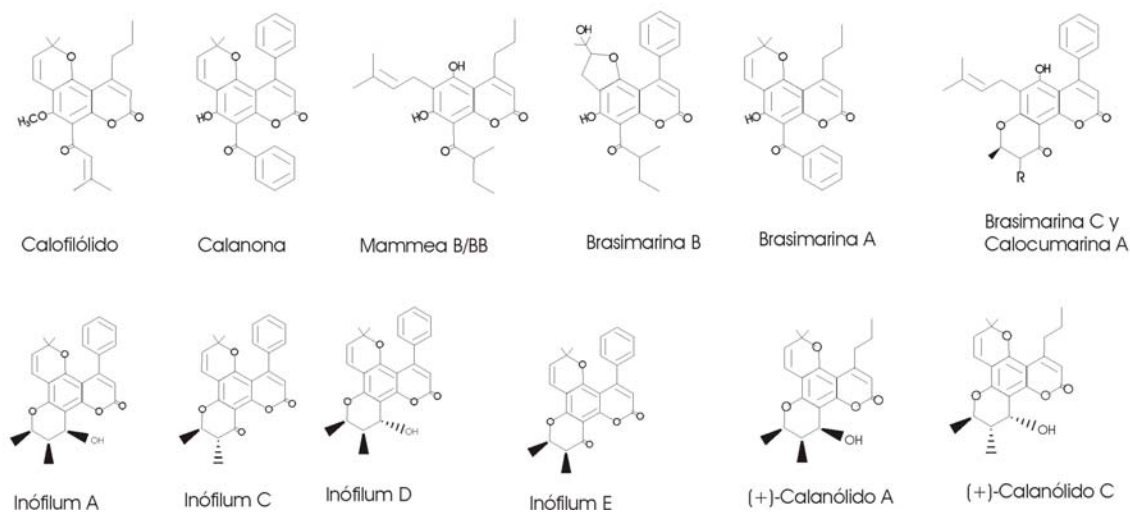
**Figura 5.** Estructuras de las cromanonas reportadas para los taxa americanos de *Calophyllum*. Aquí puede verse como se presentan en pares *cis-trans*.

## CUMARINAS

### Calophyllum rekoii (especie México-centroamericana)



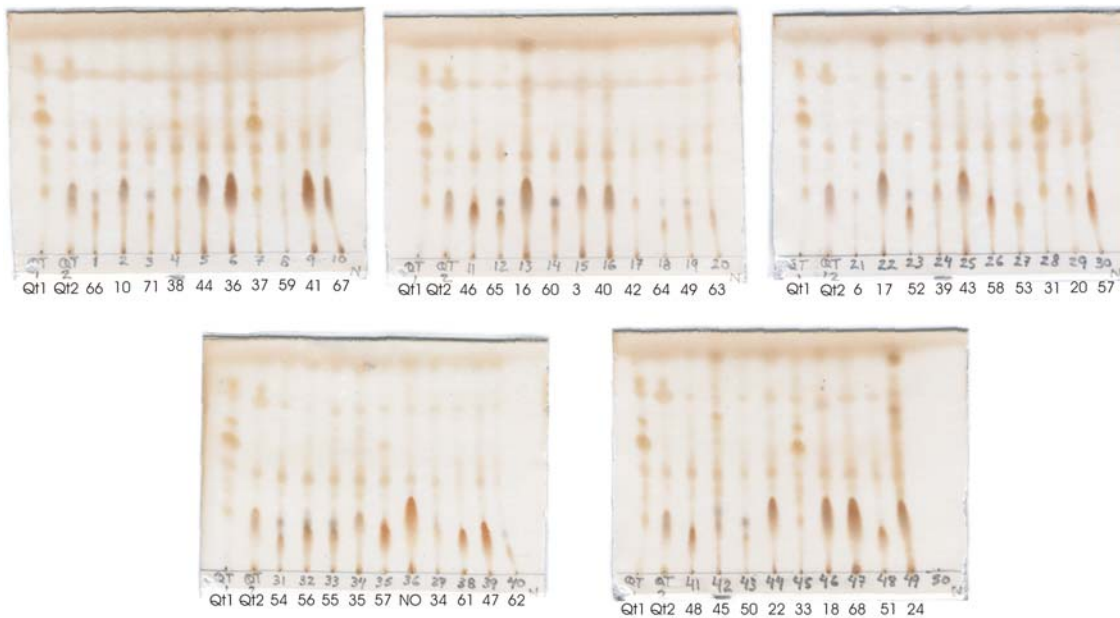
### Calophyllum brasiliense (especie brasileña)



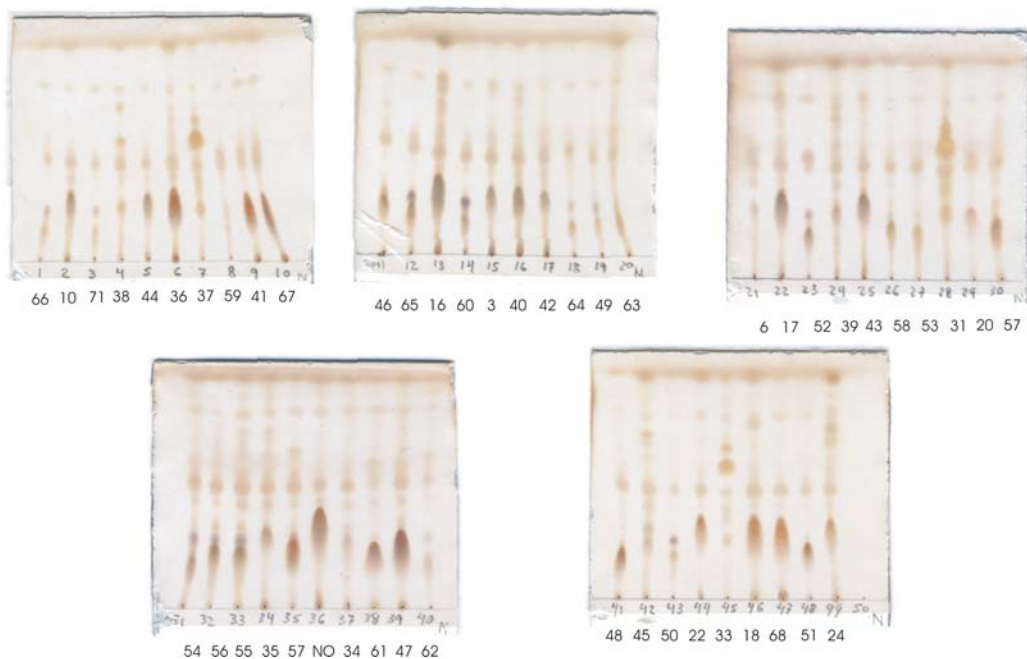
**Figura 6.** Estructuras de las cumarinas de los quimiotipos brasileño QT brasileño 1; y México-centroamericanos QT rekoii 1 y QT rekoii 2 b.

# APÉNDICE 4 FOTOGRAFÍAS DE LOS CROMATOGRAMAS (REVELADO CON SULFATO CÉRICO)

HEXANO-ACETATO DE ETILO 8:2

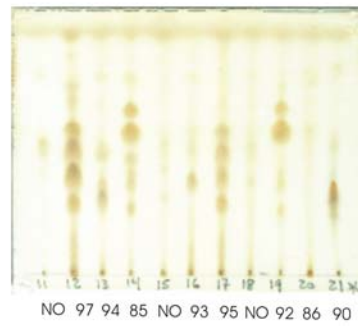
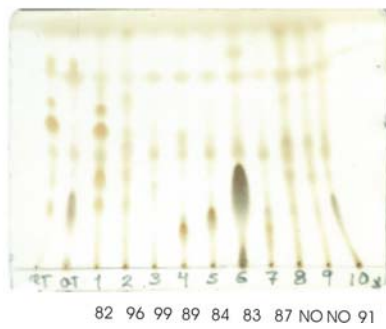
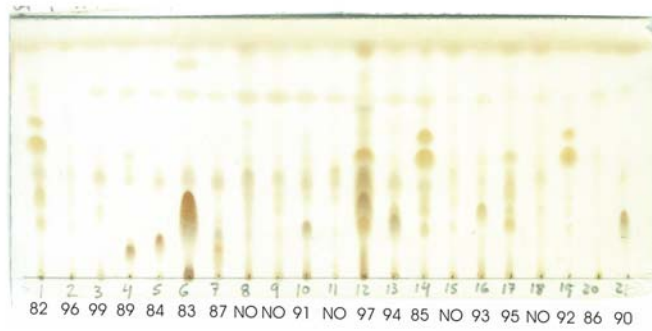
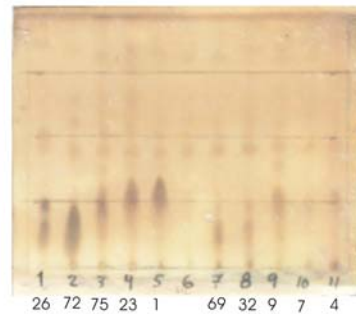
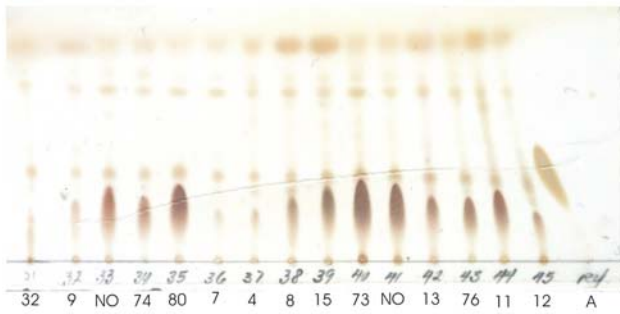
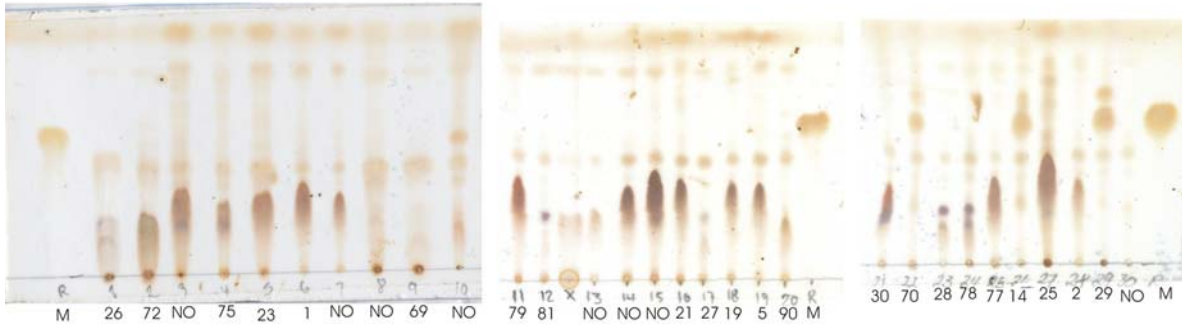


HEXANO-ACETATO DE ETILO 8:2

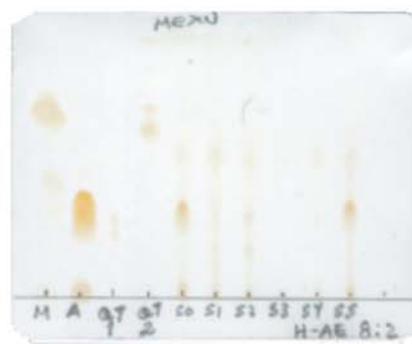
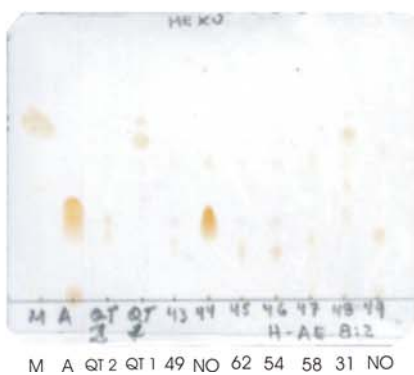
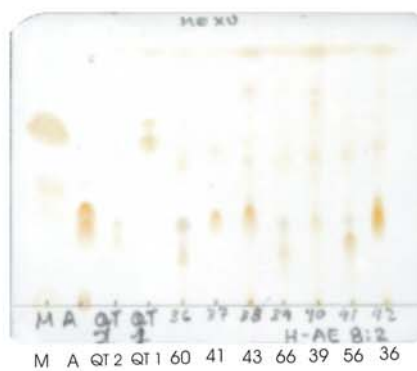
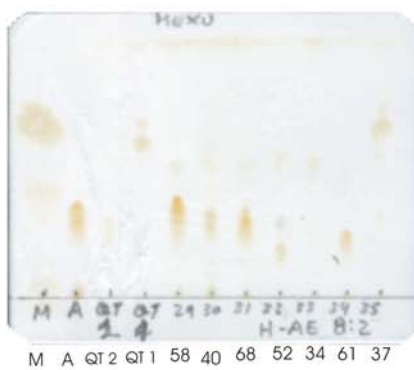
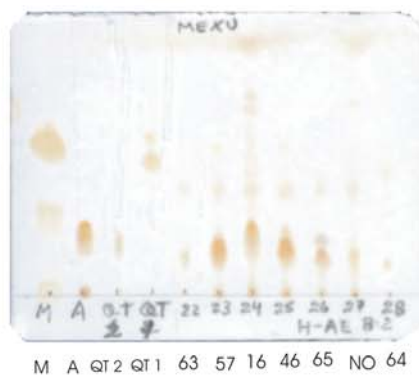
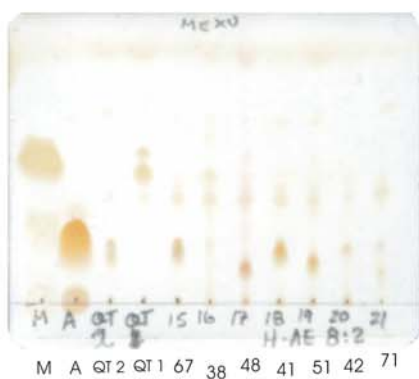
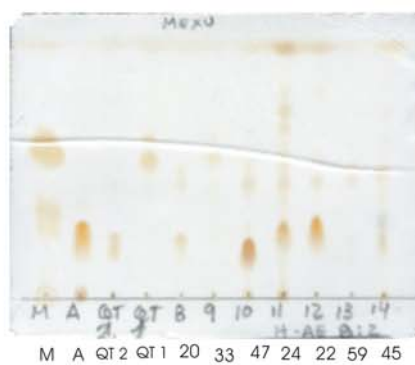
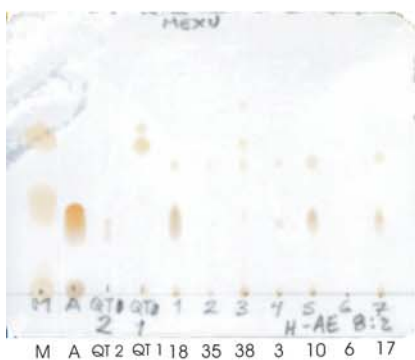




# HEXANO-ACETATO DE ETILO 8:2



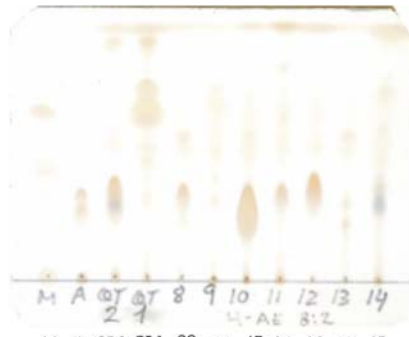
# HEXANO-ACETATO DE ETILO 8:2



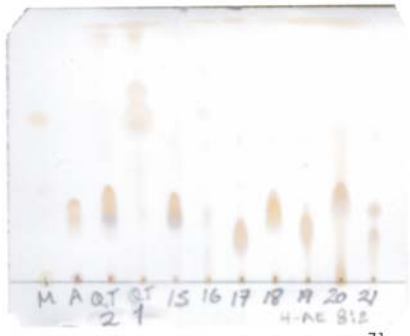
# HEXANO-ACETATO DE ETILO 8:2



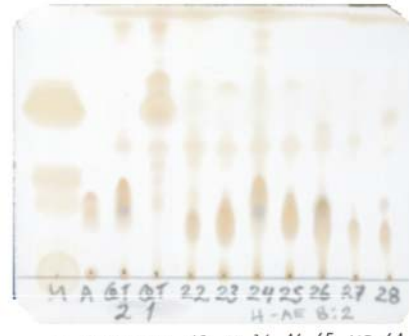
M A QT 2 QT 1 18 35 38 3 10 6 17



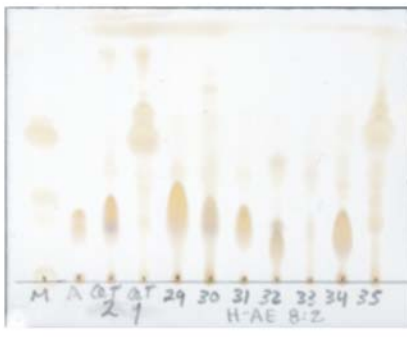
M A QT 2 QT 1 20 33 47 24 22 59 45



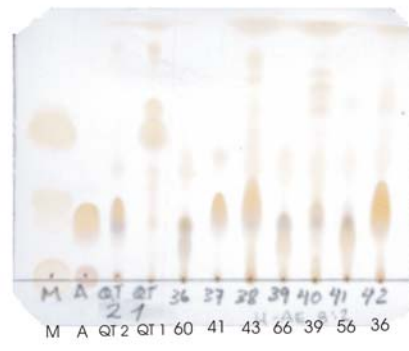
M A QT 2 QT 1 67 38 48 41 51 42 71



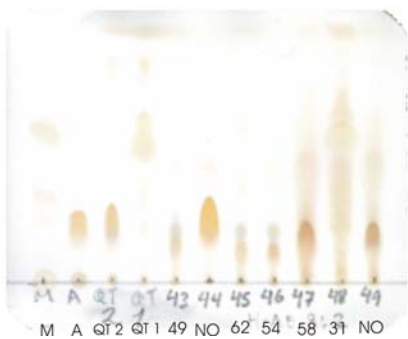
M A QT 2 QT 1 63 57 16 46 65 NO 64



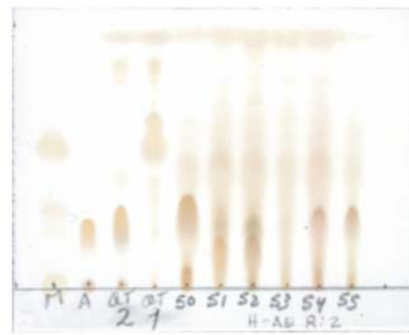
M A QT 2 QT 1 58 40 68 52 34 61 37



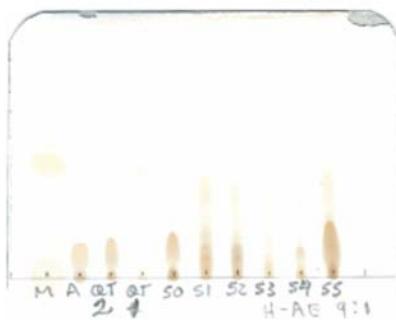
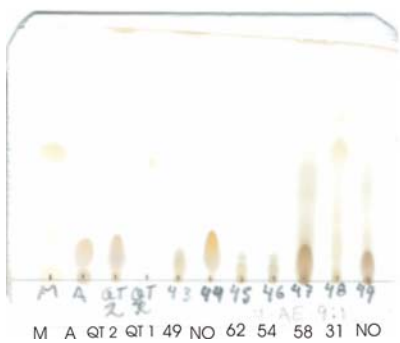
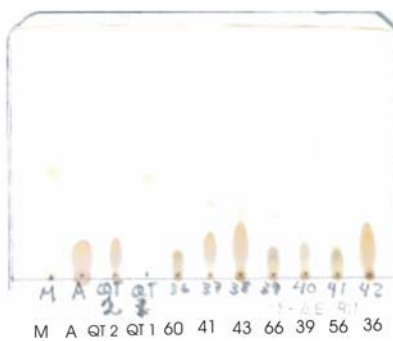
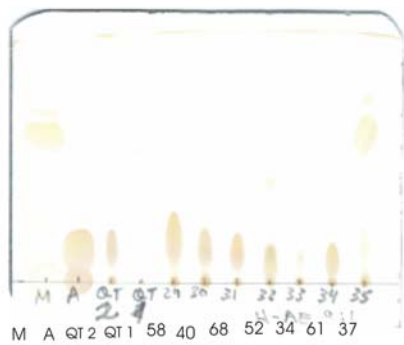
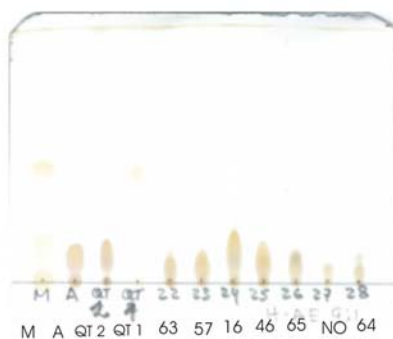
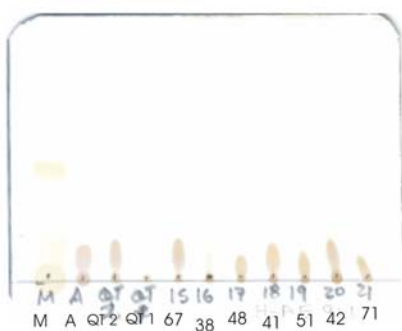
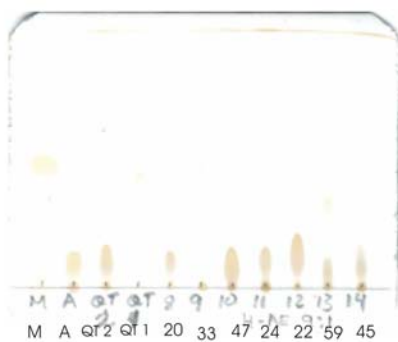
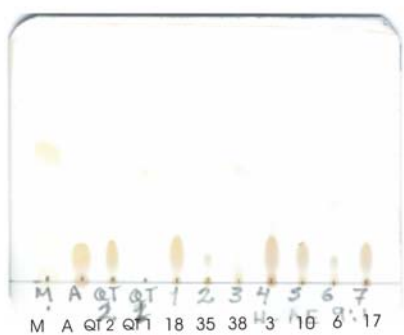
M A QT 2 QT 1 60 41 43 66 39 56 36



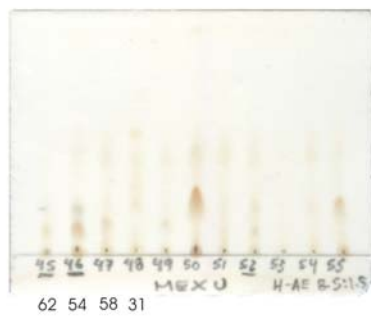
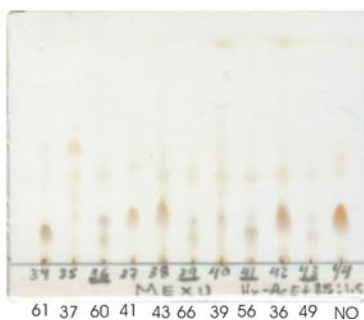
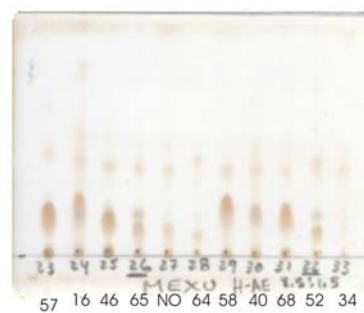
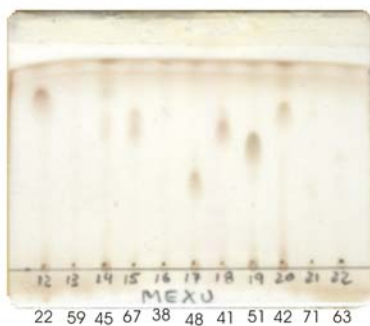
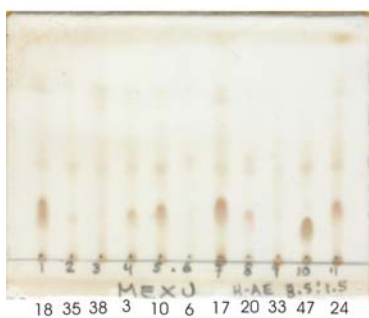
M A QT 2 QT 1 49 NO 62 54 58 31 NO



# HEXANO-ACETATO DE ETILO 9:1



# HEXANO-ACETATO DE ETILO 8.5:1.5



# REFERENCIAS

## BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Aguilar B.**, E. A. 2005. Efecto de los metabolitos secundarios de *Calophyllum brasiliense* en los hongos colonizadores de las hojas: estudio *in vitro*. Tesis. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Bandara**, M. R., H. R.W. Dharmaratne, S. Sotheeswaran & S. Balasubramaniam. 1986. Two chemically distinct groups of *Calophyllum* species from Sri Lanka. *Phytochemistry* **25**: 425-428.
- Bruneton**, J., 1991. Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. Ed. Mc Graw Hill, México, 536 pp.
- Carpenter**, I., E. J. Mc Garry, F. Scheinmann. 1970. The neoflavonoids and 4-alkylcoumarins from *Mammea africana* G. Don. *Tetrahedron Letters* **46**: 3983-3986.
- Castillo**, A. & C. Gil, 1991. *Calophyllum piaroanum*. *Ernstia* **1**: 41-44.
- Cottiglia**, F., B. Dhanapal, O. Sticher & J. Heilmann, 2004. New Chromanone Acids with Antibacterial Activity from *Calophyllum brasiliense*. *J. Nat. Prod.* **67**: 537-541.
- Craw** R. C., J. R. Grehan & M. J. Heads. 1999. *Panbiogeography: Tracking the History of Life*. Oxford University Press. New York. 229 pp.
- Crichton, E. G. & P. G. Waterman. 1978. Dihydromammea C/OB: a new coumarin from the seed of *Mammea africana*. *Phytochemistry*, **17**: 1783-1786.
- Crombie**, L. & D. E. Games. 1966. Isolation and structure of mammea A/BA, A/AB and A/BB: a group of 4-aryl-coumarin extractives of *Mammea americana* L. *Tetrahedron Letters* **1966**:145-149.
- Crombie**, L., D. E. Games, & A. Mc Cormick. 1967. Extractives of *Mammea americana* L. Part II. The 4-Phenylcoumarins. Isolation and Structure of mammea A/AA, A/A ciclo D, A/BA, A(AB, and A/BB. *J. Chem. Soc. (C)*. **1967**: 2553-2559.
- Crombie**, L., D. E. Games, N. J. Haskins, & G. F. Reed. 1970. Identification of nine new 5,6-annulated relatives of the mammea coumarins B/BA, B/BB & B/BC. *Tetrahedron Letters* **1970**: 3975-3978.
- Crombie**, L., D. E. Games, N. J. Haskins, & G. F. Reed. 1970. Identification of new mammea coumarins A/AA-A/AB, B/AB, and two of the 6-acyl family, B/AA (isomammein) and B/AB. *Tetrahedron Letters* **1970**: 3979-3982.
- Crombie**, L., R. C. F. Jones, & Ch. J. Palmer. 1985. Synthesis of mammeins and surangin A. *Tetrahedron Letters*. **26**: 2929-2932.
- Crombie**, L., R. C. F. Jones, & Ch. J. Palmer. 1985. Synthesis of the insecticidal 1'-acetoxy-mammeins and surangin B. *Tetrahedron Letters* **26**: 2933-2936.
- Crombie**, L., R. C. F. Jones, & Ch. J. Palmer. 1987. Synthesis of the *Mammea* coumarins. Part 1. The coumarins of the Mammea A, B, and C series. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*: 317-331.
- Cronquist**, A. 1981. *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. Ed. Columbia University-Press, New York. 1262 pp.
- D'Arcy**, W. G. & R. C. Keating. 1979. Anatomical support for the taxonomy of *Calophyllum* (Guttiferae) in Panama. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **66**: 557-571.
- Domínguez**, X. A., 1973. Métodos de investigación fotoquímica. Ed. Limusa, México, 281 pp.
- Espinosa O.**, D. & J. Llorente B. 1993. *Fundamentos de Biogeografías Filogenéticas*. México, UNAM. 133 pp.
- Espinosa O.**, D., J. J. Morrone, J. Llorente B. & O. Flores V. 2000. Introducción al análisis de patrones en biogeografía histórica. México, UNAM. 133 pp.
- Estrada M.**, E., 2001. *Cumarinas y xantonas de Calophyllum brasiliense: evaluación de su actividad antiviral, citotóxica y antibacteriana*. Tesis de Maestría. Fac. de Ciencias, UNAM.
- Eyton**, W. B., W. D. Ollis, I. O. Sutherland, O. R. Gottlieb, M. Taveira, Magalhães, & L. M. Jackman. 1966. The neoflavonoid group of natural products-I. *Tetrahedron*. **21**: 2683-2696.
- Fisher**, E. & F. A. M. Dos Santos. 2001. Demography, phenology and sex of *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae) trees in the Atlantic forest. *Journal of Tropical Ecology* (2001) **17**: 903-909.
- García B.**, H. 1992. *Flora medicinal de Colombia*. Botánica médica. Tomo II. 2a.edic. Tercer Mundo. Bogotá.
- Gautier**, J., A. Cave, G. Kunesch & J. Polonsky. 1972. On the biosynthesis of Neoflavonoids. *Experientia* **28**: 759-761.
- Gómez Pompa**, A. 1966. *Estudios botánicos en le región de Misantla, Veracruz*, Ed. IMRNR, México. 173 pp.

- González P., M. de la P. A.** Identificación y determinación de metabolitos secundarios en los frutos de *Calophyllum brasilienses* Cambess. var. *rekoii* Standl. Tesis. UAM Unidad Ixtapalapa.
- Gottlieb, O. R.** 1982. Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology. An Essay into a Novel Botanical Discipline. Ed. Springer-Verlag, Berlin. 170 pp.
- Greene, E. C., Jr.** 1932. Santa Maria: a neotropical timber of *Calophyllum*. Trop. Woods **30**: 9-16.
- Guerreiro, E., G., Kunesch & J. Polonsky,** 1971, Les constituants des graines de *Calophyllum chapelieri* (Guttiferae), Phytochemistry, **10**: 2139-2145.
- Guilet, D., J. J. Hélesbeux, D. Séraphin, T. Sévenet. P. Richomme & J. Bruneton,** 2001. Novel Cytotoxic 4-Phenylcoumarinas from *Calophyllum dispar*. J. Nat. Prod. **64**: 563-568.
- Hegnauer, R.,** 1966. Chemotaxonomie der Pflanzen, Band. 4. Birkhäuser, Basel & Stuttgart, 551 pp.
- Hillis, D. M., C. Moritz, & B. K. Mable.** 1996. Molecular Systematics. 2a. Edición. Sinauer Associates, Inc. Sunderland. 655 pp.
- Howard, R. A.** 1962. Some Guttiferae of the Lesser Antillas. Journal of the Arnold Arboretum. **43**: 389-399.
- Huerta R. M., M del C. Basualdo, F. Abe, M. Jiménez, C. Soler, & R. Reyes.** 2004. HIV-1 Inhibitory Compounds from *Calophyllum brasiliense* leaves. Biol. Pharm. Bull. **27**: 1471-1475.
- Huerta R. M.,** 2004. Evaluación de la actividad inhibidora de metabolitos secundarios de clusiaceae mexicanas sobre el VIH-1. Tesis Doctorado (Doctorado en Ciencias Biomédicas)-UNAM, Facultad de Medicina.
- Ito. Ch., M. Itoigawa, Y. Mishima. V. Cechinel, F. Enjo, H. Tokuda, H. Nishino & H. Furukawa.** 2003. Chemical Constituents of *Calophyllum brasiliense* 2. Structure of Three New Coumarins and Cancer Chemopreventive Activity of 4- Substituted Coumarins. J. Nat. Prod. 2003, **66**: 368-371.
- Jones, S. B.** 1988. Sistemática vegetal. Ed. Mc Graw Hill. México, 536 pp.
- Little, E., F. Wadsworth. & J. Marrero.** 1967. Árboles comunes de Puerto Rico y las Islas Vírgenes. Ed. UPR. Puerto Rico, 405 pp.
- Loan-Chinh, Tran.** 1996. Contribution à l'étude du genre *Calophyllum*: Botanique, Chimie et pharmacologie. Thèse de Docteur en Pharmacie. Faculté de Pharmacie, Université de Bourgogne.
- Martin, G. J.,** 1995. Ethnobotany. A methods manual. Ed. Chapman & Hall, London, 240 pp.
- McKee, T. C., C. D. Covington, R. W. Fuller, H. R. Bokesch, S. Young, J. H. Cardellina II, M. R. Kadushin, D. D. Soejarto, P. F. Stevens, G. M. Cragg & M. R. Boyd,** 1998. Pyranocoumarins from Tropic Species of the Genus *Calophyllum*: A Chemotaxonomic Study of Extracts in the National Cancer Institute Collection. J. Nat. Prod. **61**: 1252-1256.
- Miranda, F.,** 1952. La vegetación de Chiapas. Primera parte. Ediciones del gobierno de Chiapas, Tuxtla Gutiérrez, 334 pp.
- Miranda, F. & E. Hernández X.** 1963. Los tipos de vegetación de México y su clasificación. Bol. Soc. Botánica de México **28**: 29-179.
- Pennington, T. D. & J. Sarukhán,** 1968. Manual para la identificación de los principales árboles tropicales de México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y FAO, México, 521 pp.
- Plattner, R. D., G. F., Spencer, D. Weisleder & R. Kleiman.** 1974. Chromanone acids in *Calophyllum brasiliense* seed oil. Phytochemistry, **13**: 2597-2602.
- Ramiandrasoa, F., N. Kunesch, J. Poisson, & G. Kunesch.** 1983. Le calofloride, intermédiaire d'un type nouveau de la biogenèse des néoflavonoïdes. Tetrahedron **39**: 3923-3928.
- Reyes Ch., R., E. Estrada, T. Ramírez, B. Amekraz, A. Aumelas, Ch. K. Jankowski, & M. Vázquez.** 2004. Cytotoxic effects of mammea type coumarins from *Calophyllum brasiliense*. Life Sciences **75**: 1635-1647.
- Rzedowski, J.,** 1978. Vegetación de México, Ed. Limusa, México, 432 p.
- Shen Y. Ch., L. T. Wang, A. T. Khalil & Y. H. Kuo,** 2004, Chromanones and Dihydrocoumarins from *Calophyllum blancoi*. Chem. Pharm. Bull. **52**: 402-405.
- Smith D. L.** 1985. Caribbean Plate Relative Motions. Pp. 17-48. In: The Great American Interchange. Ed. by Francis G. Stehli and S. David Webb. Plenum, New York, 532 pp.
- Standley, P. C.** 1923. Trees and shrubs of Mexico (Gleicheniaceae- Betulaceae) Vol 23. Pte1. Government Printing Office, Smithsonian Institution United States Herbarium, Washington.
- Standley, P. C.** 1932. Revision of some American species of *Calophyllum*. Trop. Woods **30**: 6-9.
- Stehli F. G. & S. D. Webb.** 1985. A Kaleidoscope of Plates, Faunal and Floral Dispersals, and Sea Level Changes. Pp. 3-16. In: The Great American Interchange. Ed. by Francis G. Stehli and S. David Webb. Plenum, New York, 532 pp.
- Stevens, P. F.** 1980. A revision of the old world species of *Calophyllum*, (Guttiferae). Journal of the Arnold Arboretum **61**:117-699.



- Stout, G. M., M. M. Krahn & G. D. Breck, 1968. Tetrahedron Letters. **29**: 3285-3290.
- Touchstone, J. C. 1992. Practice of thin layer chromatography. Ed John Wiley & Sons. New York, 377 pp.

### CARTOGRAFÍA.

- Palacios R. G. & A. Palacios R. G. 2001. Por las carreteras de México 2002, Guía Roji, México, D. F.
- Cea-Herrera, M. E. et al. 1980. División Municipal. Esc. 1:4000 000. Atlas Nacional de México. Instituto de Geografía, UNAM, México.
- INEGI.1981. Acapulco (E14-11). Carta Topográfica. Esc 1:250 000. México.
- INEGI.1986. Chetumal (E16-4-7) Carta Topográfica. Esc 1:250 000. México
- INEGI.1981. Chilpancingo (E14-8). Carta Topográfica. Esc 1:250 000. México
- INEGI.1997. Ciudad del Carmen (15-6). Carta Topográfica. Esc 1:250 000. México
- INEGI.1997. Coahuila de Zaragoza (E15-6). Carta Topográfica. Esc 1:250 000. México
- CETENAL.1997. Colima (E13-3). Carta Topográfica. Esc 1:250 000. México
- INEGI.1998. Felipe Carrillo Puerto (E16-1). Carta Topográfica. Esc 1:250 000. México
- INEGI.1998. Juchitán (E15-10, D15-1). Carta Topográfica. Esc 1:250 000. México
- INEGI.1998. Las Margaritas (E15-12, D15-3). Carta Topográfica. Esc 1:250 000. México
- INEGI. 1998. Lázaro Cárdenas (E13-6-9). Carta Topográfica. Esc 1:250 000. México
- INEGI. 1981. Manzanillo (E13-2-5). Carta Topográfica. Esc 1:250 000. México
- INEGI. 1998. Minatitlán (E15-7). Carta Topográfica. Esc 1:250 000. México
- INEGI. 1986. Puerto Vallarta (F13-11). Carta Topográfica. Esc 1:250 000. México
- INEGI. 1986. Tenosique (E15-9). Carta Topográfica. Esc 1:250 000. México
- INEGI. 1986. Tuxtla Gutiérrez (E15-11). Carta Topográfica. Esc 1:250 000. México
- INEGI. 1982. Veracruz (E14-3). Carta Topográfica. Esc 1:250 000. México
- INEGI. 1982. Villahermosa (E15-8). Carta Topográfica. Esc 1:250 000. México
- INEGI. 1982. Zihuatanejo (E14-7-10). Carta Topográfica. Esc 1:250 000. México.