



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

Efecto de los nutrientes sobre el crecimiento de plántulas de  
*Calophyllum brasiliense* y la biosíntesis de metabolitos secundarios  
de interés farmacológico.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

JORGE IVAN CASTILLO ARELLANO



TUTOR: DRA. HELIA REYNA OSUNA FERNÁNDEZ  
CO-TUTOR: DR. RICARDO REYES CHILPA

MÉXICO, D.F.

2009



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  
Castillo  
Arellano  
Jorge Ivan  
55 75 85 22  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
300125258
  
2. Dra.  
Helia Reyna  
Osuna  
Fernández
  
3. Dr.  
Ricardo  
Reyes  
Chilpa
  
4. Dra.  
María Isabel  
Saad  
Villegas
  
5. M. en C.  
Beatriz  
Zúñiga  
Ruiz
  
6. M. en C.  
Sol  
Cristians  
Nizawa

## **DEDICATORIA.**

A la memoria de mi amada hermana Gabriela Castillo Arellano (1981 – 2008)  
quien siempre me transmitió su ejemplo, sus ideales y su cariño.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi Familia, a Mamá, que siempre ha vigilando mi desarrollo como a una plantita para evitar que me torciera y perdiera el camino.

A mis hermanos Gaby, Gabriel, Claudia y Ulises que siempre creyeron en que terminaría una carrera, a mi prima Paty Cebreros a la que considero una hermana mayor y a su esposo Salvador, que siempre me han puesto el ejemplo.

A mis asesores la Dra. Helia Reyna Osuna Fernández quien me permitió desarrollar mi creatividad y tomar muchas de las decisiones importantes de este trabajo, al Dr. Ricardo Reyes Chilpa quien me presento a *Calophyllum brasiliense* y me ayudo para dar inicio a esta tesis a pesar de que no me conocía, y después para concluir los experimentos y terminar la tesis.

A mis otros tres asesores no formales la Dra. Alicia Brechú Franco, el Dr. Guillermo Laguna Hernández y la Dra. María Isabel Saad Villegas, gracias por su apoyo, sus comentarios, sus críticas y recomendaciones. Al Dr. Marius Mumbrú de la Universidad de Barcelona por su amistad e importante contribución a la parte final de la tesis con sus conocimientos en HPLC.

A mis amigos Paty Hernández, Carlos Zapata, Gaby Luna, Araceli Arandal, y Alejandra Rodríguez que me ayudaron a cuidar mis plantitas durante más de un año a pesar de la lluvia, el frío, el calor o lo tarde que fuera. A mi amigo el matemático Damián Pérez García que se arriesgo a subir a los árboles más altos para alcanzar los ejemplares de herbario. Al biólogo Eduardo Aguilar Bañuelos compañero y amigo en el Instituto de Química por su amistad y por el gran apoyo en la purificación de los compuestos activos. A la bióloga Ana Vianey Rivera Santamaría por su apoyo en la parte de estadística. A mis amigas y amigos: Karla Cid, Catalina Juárez, Alejandra Matías, Daniela Reyes, Alejandra Llorente y Miguel Alva.

A mi profesor de Ecología el Dr. Zenón Cano Santana, ya que gracias a sus maravillosas clases pude desarrollar la idea presentada en este trabajo, a la M. en C. María Eugenia Muñiz Díaz de León por su apoyo y paciencia en el laboratorio. A la M. en C. Beatriz Zúñiga Ruiz del taller de química por su apoyo en el inicio de la tesis y como revisora del trabajo final. A mis profesores Rubén Castellanos de plantas y Aurora Zlotnik de anatomía vegetal porque me enseñaron lo maravillosas que eran las plantas y lo importante que son para todos.

Al Dr. Arturo Navarro de la Facultad de Química, por prestarnos sus instalaciones para terminar la parte de HPLC, a la Dra. Alma Orozco del Instituto de Ecología y a la Dra. María Campos del Centro Medico Siglo XXI por sus críticas y comentarios.

De la UAM- Xochimilco del laboratorio de aguas y suelos, el M. en C. Benjamín Miramontes Flores, Mario y José Carlos por todo el apoyo que me brindaron para poder terminar la parte de suelos. A la profesora Marisa Osuna Fernández por cuidar de

mis plantitas durante la última parte de mis experimentos y por todo el apoyo brindado junto con sus alumnos para llevar a las plantitas sobrevivientes de vuelta a los Tuxtlas, al Dr. Gilberto Díaz por su disposición para trabajar la parte de Fitoquímica.

A todas las personas de Veracruz que me apoyaron en la búsqueda y colecta de *Calophyllum*: Don Marcelino Ortega, Don Andrés Ortega, Don Naul Tirado, Don Arnulfo Díaz, Don Ricardo Lindsey; Don Bulmaro, Don Heraclio, Don Heladio Velasco, a las personas del Proyecto de la Reserva Sierra de Santa Marta, A.C. (RRSSM) Rosy y a su esposo Conrado. También a los directores de la Reserva de los Tuxtlas el Dr. Martín Ricker y la bióloga Rosamond Coates.

También quiero agradecer a mi padrino y médico de cabecera Carlos Escalona y al médico especialista Jose Luis Campos gracias a su atención, paciencia y tratamiento puede recuperarme de mi enfermedad para terminar la tesis.

## INDICE GENERAL

<b>RESUMEN</b> .....	<b>8</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>10</b>
<b>ANTECEDENTES DE <i>CALOPHYLLUM BRASILIENSE</i></b> .....	<b>12</b>
EL GÉNERO <i>CALOPHYLLUM</i> (CLUSIACEAE).....	12
DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA DE <i>CALOPHYLLUM BRASILIENSE</i> .....	12
HÁBITAT DE <i>CALOPHYLLUM BRASILIENSE</i> . .....	14
DEPREDADORES NATURALES DE <i>CALOPHYLLUM BRASILIENSE</i> . .....	14
GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE <i>CALOPHYLLUM BRASILIENSE</i> . .....	15
FISIOLOGÍA DE LAS PLÁNTULAS DE <i>CALOPHYLLUM BRASILIENSE</i> . .....	17
ECOLOGÍA DE POBLACIONES DE <i>CALOPHYLLUM BRASILIENSE</i> . .....	19
FITOQUÍMICA Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE <i>CALOPHYLLUM BRASILIENSE</i> .....	21
<b>Actividad antiviral.</b> .....	<b>21</b>
<b>Actividad anticancerígena.</b> .....	<b>23</b>
<b>Actividad antiinflamatoria y analgésica.</b> .....	<b>24</b>
<b>Actividad antimicrobiana.</b> .....	<b>25</b>
<b>Actividad antiparasitaria.</b> .....	<b>26</b>
<b>Actividad plaguicida y fungicida.</b> .....	<b>27</b>
INFORMACIÓN FITOQUÍMICA DE <i>CALOPHYLLUM BRASILIENSE</i> EN MÉXICO.....	28
EFECTO DE NUTRIENTES Y HORMONAS EN LA FENOLOGÍA Y LA QUÍMICA DE PLANTAS.	31
COMPOSICIÓN DE LOS SUELOS DE LA REGIÓN DE LOS TUXTLAS .....	34
INFORMACIÓN GENERAL DE LA VERMICULITA .....	35
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>37</b>
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	37
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>38</b>
OBJETIVOS PARTICULARES .....	38
<b>MÉTODO</b> .....	<b>39</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>46</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>77</b>
<b>LITERATURA CITADA.</b> .....	<b>78</b>
<b>ANEXOS</b>	
<b>ESPECÍMENES DE HERBARIO.</b>	
<b>SOLUCIONES HIDROPÓNICAS</b>	
<b>TEMPERATURAS DEL INVERNADERO.</b> .....	<b>88</b>

## INDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Actividad anti-VIH de algunas cumarinas naturales.....	23
Tabla 2. Propiedades físicas y químicas de los primeros 30cm del suelo de dos localidades de la región de los Tuxtlas.....	47
Tabla 3. Prueba de tukey para determinar diferencias en el diámetro transversal de los frutos de las dos localidades.....	52
Tabla 4. Prueba de tukey para determinar diferencia en la masa de los frutos de las dos localidades.....	53
Tabla 5. Establecimiento de plántulas de <i>C. brasiliense</i> en condiciones de invernadero.....	58
Tabla 6. Prueba de t-student para la longitud aérea.....	59
Tabla 7. ANADEVa para el crecimiento de plántulas en diferentes tratamientos.	61
Tabla 8. Matriz de resultados del crecimiento de plántulas en diferentes tratamientos.....	61
Tabla 9. Supervivencia de plántulas de <i>Calophyllum brasiliense</i> en tratamientos.	62
Tabla 10. Estadística comparativa de masa foliar.....	64
Tabla 11. Comparaciones múltiples de la masa foliar por tratamiento.....	64
Tabla 12. Patrones cromatográficos de las plántulas en tratamiento nutricional..	65
Tabla 13. Correlación entre la masa foliar y el rendimiento de los extractos.....	67
Tabla 14. Resultados de CLAR de Apt, cal B y cal C de las muestras analizadas.....	71
Tabla 15. Pruebas de Kruskal-Wallis y ANADEVa para CLAR.....	72

## INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Diametro de los frutos de <i>C. brasiliense</i> por localidad.....	52
Gráfico 2. Peso de los frutos de <i>C. brasiliense</i> por localidad.....	53
Gráfico 3. Contenido de humedad de semillas de <i>C. brasiliense</i> .....	54
Gráfico 4. Porcentajes de germinación por localidad.....	56
Gráfico 5 y 6. Histogramas de frecuencia del crecimiento de plántulas de <i>Calophyllum brasiliense</i> únicamente con el aporte de nutrientes de la semilla por localidad.....	59
Gráficos 7. Histogramas de frecuencia de crecimiento de plántulas en solución completa.....	61
Gráficos 8. Histogramas de frecuencias de crecimiento de plántulas en suelos de la selva.....	61
Gráficos 9. Histogramas de frecuencia de crecimiento de plántulas -K.....	61
Gráficos 10. Histogramas de frecuencias de crecimiento de plántulas -Ca.....	61
Gráfico 11. Rendimientos de la fracción hexánica de los extractos de las plántulas en tratamiento nutricional y de árboles silvestres.....	66
Gráfico 12. Correlación entre la masa foliar y el rendimiento de los extractos.....	67

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol adulto de <i>Calophyllum brasiliense</i> .....	13
Figura 2. Estructuras de los calanólidos A y B.....	22
Figura 3. Componentes químicos aislados de <i>Calophyllum brasiliense</i> Qtp1.....	28
Figura 4. Componentes químicos aislados de <i>Calophyllum brasiliense</i> Qtp 2.....	29
Figura 5. Componentes químicos comunes a los quimiotipos 1 y 2 de <i>C.</i> <i>brasiliense</i> .....	30
Figura 6. Biosíntesis de neoflavonoides o 4-aril- o 4-alquil- cumarinas.....	31
Figura 7. Tipos de suelos de la región de los Tuxtlas.....	34
Figura 8. Estructura de la vermiculita con una representación de iones de sodio en el espacio interlaminar.....	35
Figura 9. Quimiotipos y compuestos de <i>Calophyllum brasiliense</i> en CCF.....	43
Figura 10. Ácido apetalico.....	43
Figura 11. Mamea A/BA.....	43
Figura 12. Calanólido B.....	43
Figura 13. Mapa de la distribución nacional de <i>Calophyllum brasiliense</i> en México.....	46
Figura 14. Etapas de la germinación de semillas de <i>Calophyllum brasiliense</i> .....	57
Figura 15. Plántulas de <i>C. brasiliense</i> establecidas con los nutrientes de la semilla.....	59
Figura 16. Patrones cromatográficos de los quimiotipos (QT) de árboles silvestres (A- J) analizadas por CCF y CLAR.....	69

## RESUMEN

El árbol tropical *Calophyllum brasiliense* Cambess. (Clusiaceae) presenta dos poblaciones en México con diferente composición química en las hojas. La primera denominada quimiotipo 1 (Qtp1), contiene cumarinas tipo mammea, características de especies del género *Mammea* y poseen alta actividad citotóxica contra células tumorales humanas *in vitro*. La segunda llamada quimiotipo 2 (Qtp2), contiene como compuestos mayoritarios cromanonas, principalmente ácido apetalico, y como compuestos minoritarios dipiranocumarinas tetracíclicas, como el (+)-calanólido A, el (-)-calanólido B, el (+)-calanólido C y el soulatrólido. Los calanólidos son inhibidores específicos y potentes, *in vitro*, del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1).

Se desconoce si la existencia de los dos quimiotipos se debe a factores ambientales, ó genéticos. En el presente estudio se examinó la influencia de los nutrientes del suelo en la producción de metabolitos secundarios, tanto en árboles silvestres, como en plántulas establecidas en invernadero. Las plántulas se cultivaron desde semilla en un sistema hidropónico bajo diferentes tratamientos nutricionales diseñados a partir de los estudios edafológicos en los sitios de colecta. Las muestras de hojas de cada ejemplar silvestre o cultivado se extrajeron con hexano, con el fin de determinar su quimiotipo por cromatografía en capa fina (CCF). Extractos seleccionados por alto contenido de calanólidos se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) para cuantificar su contenido de ácido apetalico, calanólido B y calanolido C.

El análisis edafológico indicó que las zonas donde crece esta especie presentan suelos pobres y solo se observaron pequeñas diferencias en  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Mg}^{2+}$  entre sitios. El

tamaño de los frutos y semillas de *Calophyllum brasiliense* colectados en dos localidades no mostraron diferencias significativas. Los tratamientos hidropónicos fueron: a) control. solución completa de Hogland modificada, b) deficiente en  $\text{Ca}^{2+}$ , c) deficiente en  $\text{K}^+$ . Tanto la deficiencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , como de  $\text{K}^+$ , ocasionó la mortalidad del 50-57% y 25-31% de las plántulas respecto al control y una disminución significativa (>50%) en la altura y en la masa foliar de las sobrevivientes. La correlación entre la masa foliar y el rendimiento del extracto fue negativa, indicando que las plántulas con mejor nutrición tienden a producir mayor biomasa y menor cantidad de metabolitos secundarios.

Los patrones cromatográficos observados por CCF y los rendimientos estimados por CLAR (en mg/g de hoja peso seco) mostraron que los árboles silvestres presentan una gran variabilidad en su contenido de metabolitos secundarios. Por ejemplo, el contenido de ácido apetalico varió de 0 a 9.8, el calanólido B (0 a 4.8) y calanólido C (0.31 a 1.21). Resultados similares se observaron con las plántulas control. Sólo se examinó el efecto de la deficiencia de  $\text{Ca}^{2+}$  que ocasionó, aparentemente, una fuerte disminución en el rendimiento de ácido apetalico (0 a 3.2), calanólido B (0 a 2.16) y calanólido C (0 a 0.19). Sin embargo, el análisis estadístico mostró que solo existen diferencias significativas en el rendimiento del calanólido B de las plántulas con deficiencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , como de  $\text{K}^+$ , comparadas con árboles silvestres ( $p = 0.006$ ). Estos resultados sugieren que existe una gran variabilidad intraespecífica e intrapoblacional en el contenido de metabolitos secundarios. También sugieren que la existencia de los dos quimitipos se debe principalmente al factor genético y no al nutricional, es decir, podrían ser dos poblaciones de la misma especie en un proceso de divergencia evolutiva.

## INTRODUCCIÓN

Además de los metabolitos primarios esenciales (carbohidratos, lípidos, aminoácidos y ácidos nucleicos). Las plantas superiores son capaces de sintetizar una amplia variedad de compuestos de bajo peso molecular llamados los metabolitos secundarios. Estos pueden ser definidos como compuestos que no tienen un papel reconocido en el mantenimiento y en los procesos fundamentales de la vida de las plantas que los sintetizan, pero tienen un papel importante en la interacción de la planta con su ambiente. La producción de estos compuestos es a menudo bajo (menos de 1% del peso seco) y dependen fuertemente del estado fisiológico y de desarrollo de la planta. Muchos metabolitos secundarios tienen una estructura única y compleja y su producción es a menudo potenciada por condiciones de estrés biótico y abiótico. En algunos casos los metabolitos secundarios son almacenados en células específicas y/o en los órganos de las plantas como las vacuolas (Oyama y Espinoza, 1986; Cano-Santana, 1987; Oksman e Inzé, 2004).

Al menos 100,000 metabolitos secundarios han sido descubiertos, principalmente del reino vegetal. Los metabolitos secundarios presentan una enorme diversidad química y cada planta tiene su propio conjunto característico de metabolitos secundarios (Oksman e Inzé, 2004) generalmente con un origen biosintético común. Los metabolitos secundarios de las plantas pueden ser clasificados en cinco grupos principales: policétidos, isoprenoides, alcaloides, fenilpropanoides y flavonoides. Los policétidos son producidos por la ruta biosintética del mevalonato-acetato; los isoprenoides (terpenoides y esteroides) son derivados del precursor de cinco carbonos, el isopentil difosfato (IPP) producido por la vía clásica del mevalonato o por la vía del

Metileritrol 4-fosfato (MEP o Rohmer o no-mevalonato); los alcaloides son sintetizados a partir de aminoácidos. Los fenilpropanoides tienen una unidad C6-C3 que se deriva de un aminoácido aromático (fenilalanina o tirosina). Los flavonoides son sintetizados por la combinación de fenilpropanoides y policétidos (Bruneton, 2001; Oksman e Inzé, 2004). Las rutas biosintéticas de los metabolitos secundarios son a menudo largas y complejas, con múltiples pasos catalizados por varias enzimas y en gran parte desconocidos (Oksman e Inzé, 2004). Se acepta en general que los metabolitos secundarios son importantes para la supervivencia de la planta en los ecosistemas, por ejemplo, poseen actividad antimicrobiana e insecticida, para disuadir a posibles depredadores, desalentar a otras especies de plantas que compiten por recursos, atraer a los polinizadores o simbioses y promover los intereses de la planta con otras especies (Kosuke *et al.*, 2006). Además de la importancia que tienen para la planta en sí, los metabolitos secundarios han sido de interés para los seres humanos durante siglos por ser la base en la elaboración de productos farmacéuticos colorantes y plaguicidas (Cano-Santana, 1987; Oksman e Inzé, 2004). Sin embargo, las defensas de la planta cambian fenológicamente y en respuesta al daño del herbívoro, a la disponibilidad de la luz y a otros factores ambientales (Cronin y Hay 1996a, b, c).

Dentro de estos factores, la nutrición mineral puede afectar la síntesis de metabolitos secundarios. Debido a esto en el presente estudio se desarrollaron plántulas a partir de semillas para ser sometidas a diferentes condiciones nutricionales. Por lo que se establecieron las condiciones propicias de germinación y el seguimiento del desarrollo de las plántulas en condiciones de invernadero para evaluar los tratamientos aplicados en el contenido de las cumarinas: calanólido B y calanólido C, y de la cromanona: ácido apetalico.

## **Antecedentes de *Calophyllum brasiliense***

### **El género *Calophyllum* (Clusiaceae).**

El género *Calophyllum* esta compuesto por cerca de 180 – 200 especies confinadas a las zonas tropicales húmedas del planeta. Especies de este género son ricas en metabolitos secundarios como xantonas y cumarinas. En América Latina una de las especies más abundantes y ampliamente distribuidas es *Calophyllum brasiliense* Cambess (Clusiaceae), esta es una planta medicinal conocida como “Barí”, “Santa María”, Sacbalamté (Chiapas), “Cedro cimarrón”, “Ocú” (Oaxaca), “Guaya” (Tabasco), “Palo María” (Nayarit), “guanadi” (Brasil) (CONABIO, 2005). Esta planta ha sido usada en la medicina tradicional para tratar una amplia variedad de enfermedades como: bronquitis, disturbios hepáticos y gástricos, dolor, inflamación, diabetes, hipertensión, diarrea, herpes y reumatismo. Adicionalmente algunos grupos etnicos de Sudamérica, como los Baraja de la cuenca del amazonas, beben la infusión de la corteza para tratar la diarrea, mientras que los Palikur usan la infusión de la planta mezclada con *Coutarea hexandra* para tratar la diabetes y las lombrices (Mesía-Vela *et al.*, 2001).

### **Descripción taxonómica de *Calophyllum brasiliense***

*Calophyllum brasiliense* (figura 1) es el único representante de su género en México, es un árbol perennifolio, de 20 a 30 m de alto (hasta 50 m), dioico (Vozzo, 2003; CONABIO, 2005); algunos autores mencionan que los árboles de *C. brasiliense* presentan flores masculinas y hermafroditas: andromonoicas (Fischer y Dos Santos,

2001). Las flores se encuentran en panículas axilares de 2.3 a 5 cm de largo, son blancas, numerosas y pequeñas, ligeramente fragantes, actinomorfas; con frutos de tipo drupa de 1.8 a 2.5 a 3 cm de largo, aunque también ha sido clasificada como baya (Vozzo, 2003); semillas ovoides o esféricas de 1.7 a 2.2 cm de largo y ancho, de color blanco amarillentas y sin endospermo.

La anatomía foliar de *C. brasiliense* presenta nervaduras laterales paralelas entre sí y perpendiculares a la nervadura central, estomas anomocíticos en la cara abaxial, tricomas glandulares, cámara subepidérmica junto a la superficie adaxial, mesófilo dorsiventral y haz vascular colateral en forma de V en la nervadura central, además de cristales de oxalato de calcio y ductos secretores (Junior *et al.*, 2005). Mediante métodos histoquímicos se ha determinado que los compuestos fenólicos están presentes en pequeñas cantidades en las hojas, el tallo, y son evidentes en la epidermis, la corteza, los radios del parénquima y la médula. Otros autores también los describen en el tallo, el pecíolo y especialmente en los conductos secretores (Mundo, 2007).

En cuanto a la anatomía y propiedades físicas de la madera de *Calophyllum brasiliense* esta se describe de textura fina, distribución de poros difusa, parénquima paratraqueal, radios tipo III y las fibras tienen potencial para elaboración de papel (Casasola-Díaz, 1988).



**Figura 1. Árbol adulto de *Calophyllum brasiliense*.**

### **Hábitat de *Calophyllum brasiliense*.**

*Calophyllum brasiliense* crece de forma silvestre, habita en zonas bajas e inundables del bosque primario y clímax, principalmente en selva baja, mediana y alta perennifolia, aunque también crece en bosque de encino, pino-encino, bosque tropical subcaducifolio y caducifolio, se desarrolla sobre pendientes ligeras o pronunciadas, en cañadas, y a orilla de las carreteras. Prospera en suelos de material calizo, ígneo y metamórfico. Presenta un crecimiento medianamente lento, germinación de tipo hipogeo, tarda aproximadamente 8 semanas con un porcentaje de 70 a 80% de germinación (CONABIO, 2005; DeCarvalho *et al.*, 2006). No ha sido posible propagarlo por medios asexuales (Fischer y Dos Santos, 2001).

Entre las ocho especies de *Calophyllum* encontradas en el continente americano, *Calophyllum brasiliense* es la más ampliamente distribuida (Stevens, P. 1980), y es un árbol de gran plasticidad ecológica que está presente en diferentes tipos de vegetación. Debido a su preferencia por los suelos saturados de agua, son considerados especialistas en este hábitat y está presente frecuentemente en el bosque de galería (Ripario) (Souza *et al.*, 2007).

### **Depredadores naturales de *Calophyllum brasiliense*.**

Las tasas de ataque de patógenos es mayor en especies arbóreas del Amazonas con frutos de pulpa de color brillante (a menudo dispersados por los primates) (Pringle *et al.*, 2007). Entre los enemigos naturales de *Calophyllum brasiliense* se encuentran larvas de insectos del género *Endotribelos*, pertenecientes a la familia de Chironomidae (Diptera) que son minadores de los frutos de muchas especies de árboles tropicales,

entre los que se encuentran especies del género *Calophyllum*, *Talauma*, *Picus*, *Annona*, entre otras (Oliveira-Roque *et al.* 2005). Otro insecto es *Parlatoria proteus*, un coccidio que ataca a *Calophyllum brasiliense* (Cooperative Plant Pest Report, 1978), así como el coleoptero descortezador *Araptus pallidus* el cual ataca a *Calophyllum brasiliense* (Vazquez-Moreno *et al.*, 2003). Así mismo, dos especies de hongos son capaces de atacar la madera de *C. brasiliense*, como *Nectria sp.* con una incidencia del 20% de la población y *Trichoderma longibrachiatum* con una incidencia del 40% (Hanada *et al.*, 2003). Otros hongos que habitan en las hojas de *C. brasiliense* son *Rhizoctonia repens*, *Aspergillus japonicus var. japonicus*, *Trichoderma viridae*, *Curvularia lunata var. aerea* y *Pestalotiopsis neglecta* (Aguilar-Bañuelos, 2005). También se menciona que las poblaciones de *Calophyllum brasiliense var. rekoii* de Centroamérica son atacadas por una enfermedad epidérmica vascular causada por una especie de hongo del género *Cephalosporium sp.* (Crandall, 1949).

### **Germinación de semillas de *Calophyllum brasiliense*.**

En términos generales, los tres factores que inciden sobre la germinación de la semilla son el sustrato, la temperatura y la iluminación (Lines *et al.*, 2006). Así mismo estudios sobre las técnicas de cuidado de semillas de plantas como *Blepharocalix salicifolius*, *Calophyllum brasiliense* y *Ocotea spixiana* indican que germinan mejor cuando son colectadas del árbol materno y sin pulpa (Ramos y Monteiro, 1998).

Lines y colaboradores, 2006, determinaron que la madurez fisiológica de las semillas de *C. brasiliense* se alcanzaba a los 92 días después de la antesis. La semilla germina en un menor tiempo y en un mayor porcentaje, cuando el contenido de

humedad es más elevado, siendo el mejor sustrato la arena. Respecto a la temperatura, los mayores porcentajes se presentaron a 28° C, el fotoperíodo no presentó efecto alguno. La viabilidad de la semilla disminuyó rápidamente después de un mes de almacenamiento y se intensificó conforme se redujo el contenido de humedad.

Las semillas de *C. brasiliense* presentaron niveles de germinación entre el 70% y el 100%; y es comparable a la de otras especies forestales del bosque tropical como *Brosimum alicastrum*, *Hymenolobium mesoamericanum*, *Lacmellea panamensis* y *Vochysia allenii* (Zentsch y Díaz, 1977; Gonzalez y Quiros, 1993).

Las semillas de *C. brasiliense* no son fotoblásticas y sobreviven por un período mayor a tres meses enterradas en sustratos saturados de agua, pero la germinación solamente tiene lugar en suelos bien drenados (Marques y Joly, 2000-B).

En base a la viabilidad y el contenido de humedad las semillas de *C. brasiliense* fueron catalogadas como recalcitrantes, pues son sensibles a la desecación y a las bajas temperaturas (Vásquez *et al.*, 2005; Carvalho *et al.* 2006).

### **Fisiología de las plántulas de *Calophyllum brasiliense*.**

Las plántulas de *C. brasiliense* parecen estar bien adaptadas a su medio ambiente inundado, debido a que suelos sobresaturados no inhiben el crecimiento de las plántulas y no se presentan cambios morfológicos aparentes en la parte aérea de plantas sumergidas. Raíces nuevas y raíces aéreas de las plantas hacen posible la subsistencia y sustituyen las viejas raíces en mal estado, en contraste con muchas especies típicas de áreas inundadas donde el crecimiento es inhibido por estrés por oxígeno. La dispersión de las semillas, la ausencia de respuesta fotoblástica, así como la capacidad de las semillas y las plántulas de sobrevivir y crecer en suelos inundados contribuyen a que la amplia distribución geográfica de *C. brasiliense* siempre este asociada con suelos constantemente inundados (Marques y Joly, 2000-A). Experimentos de germinación y supervivencia de plántulas de árboles de pantano de 11 especies, sugiere que las semillas de algunas especies, notablemente *Calophyllum brasiliense*, *Carapa guianensis* y *Prioria copaifera*, no germinaron en agua estancada y que las plántulas no sobrevivieron a periodos de seis semanas en los que estuvieron sumergidas; sin embargo, utilizan una gama de mecanismos de escape a la inundación que les permiten existir en los bosques de pantano, por ejemplo utilizar los sitios proporcionados por los contrafuertes del árbol *Pterocarpus officinalis* para la germinación y posterior establecimiento de plántulas de estas especies (Urquhart, 2004).

Las tasas de mortalidad para plántulas de *C. brasiliense* en hábitats sin inundación, inundables con agua dulce y manglares fueron de 98, 50 y 46% respectivamente, mientras que la mortalidad de plantas juveniles para los tres hábitats

fue de 0, 24 y 7%. La mortalidad para árboles inmaduros en los tres hábitats fue de 0, 6 y 6%. En el estado maduro no se detectó mortalidad. Los árboles hermafroditas de *C. brasiliense* de las zonas inundables producían 15 veces más flores y 80 veces más frutos que aquellos en los manglares. Se encontró que los árboles con flores masculinas tienden a estar presentes en los hábitats difíciles mientras que la mayoría de las femeninas se producen en los lugares más favorables, por lo tanto las tendencias sexuales indican que los manglares pueden ser un hábitat muy duro y difícil para la reproducción de *C. brasiliense* (Fischer y Dos Santos, 2001).

La fisiología de plántulas de *Calophyllum brasiliense* ha sido estudiada en diversas condiciones edafoclimáticas. Por ejemplo, en un gradiente altitudinal (2600 a 4500 m s.n.m.) con suelos ácidos y de baja fertilidad, hasta suelos fértiles, las plántulas han mostrado un 80% de mortalidad en casi todas las parcelas durante los dos primeros años de establecimiento (Vieira *et al.*, 2003; Calvo-Alvarado *et al.*, 2007). Mientras que en otros experimentos se encontró que *C. brasiliense* creció mejor cuando los micronutrientes fueron agregados a la composta y al suelo (Wightman *et al.*, 2001).

### **Ecología de poblaciones de *Calophyllum brasiliense*.**

La estructura poblacional y de edades de *Calophyllum brasiliense* en un censo con 1658 plantas en un área de suelo inundable de 3600m<sup>2</sup> en São Paulo Brasil, mostró que después de un año este número se incrementó a 1706. La estructura de edades no cambió durante el período de estudio, con un alto número de plántulas (0.2m) y juveniles (> 0.2 – 2m) y un pequeño número de subadultos (> 2 – 10m) y adultos (> 10m). La mortalidad en plántulas (29.7%) y juveniles (5.3%) se debió principalmente a la erosión y deposición durante la temporada de lluvias ya que las plantas fueron enterradas. La mortalidad en subadultos (0.7%) y adultos (0%) fue muy baja. La dispersión de frutos por murciélagos o agua, sobrevivencia de la semilla bajo condiciones hipóxicas, tolerancia de las semillas al anegamiento y estructura de edades con una significativa predominancia de plántulas, explican el crecimiento de la población y porque *C. brasiliense* fue la especie más abundante en el bosque estudiado (Marques y Joly, 2000-A).

En otra población de *C. brasiliense* de Minas Gerais, Brasil se estudiaron por electroforesis de isoenzimas 30 individuos adultos, 30 jóvenes y 100 plántulas. Se encontraron 22 alelos distribuidos en 14 locus enzimáticos, 8 de los cuales fueron monomórficos y 6 polimórficos. Los índices de diversidad estimados para la población revelaron un número pequeño de alelos para cada locus. Los valores observados para la media de heterocigocidad fueron 0.191, 0.138 y 0.141, para plántulas, jóvenes y adultos respectivamente. Por lo tanto, la mayor parte de la variabilidad genética se produjo entre las plántulas. El índice de fijación fue positivo para plántulas, jóvenes y adultos. Este índice fue más alto para los adultos, lo cual puede deberse a que el área

de estudio ha sido recientemente colonizada o los adultos se adaptan más al establecimiento en áreas inundables. Existe selección para el establecimiento de plántulas, lo que sería partidario de homocigosis (Kawaguici y Kageyama, 2001).

En otro análisis electroforético de isoenzimas realizado en bosques riparios en el sur del estado de Minas Gerais, Brasil, se encontró un bajo número de alelos por locus en las dos poblaciones, pob I (1.75) y pob II (1.50), mostrando frecuencias alélicas y de heterocigocidad que indican baja variabilidad genética, índice de fijación bajo, evidenciando ausencia de endogamia y un flujo genético entre las dos poblaciones lo bastante fuerte para contraponerse a los efectos de la deriva génica (Botrel *et al.* 2006). Otro análisis de electroforesis de isoenzimas en el bosque de Galería en Minas Gerais, Brasil mostró una alta heterocigocidad para dos poblaciones de esta especie. El coeficiente estimado de coancentría de las poblaciones mostró una estructura espacial positiva en clases de distancias pequeñas, lo que indica que individuos cercanos están emparentados (Souza *et al.*, 2007). Sin embargo el flujo genético entre las dos poblaciones estudiadas no es suficiente para contraponerse a los efectos de la deriva génica, por lo que es necesario mejorar la preservación y el mantenimiento de las poblaciones naturales de *C. brasiliense*, ya que esta especie demostró fragilidad a factores que ponen en peligro su variabilidad genética (Souza *et al.*, 2007)

## **Fitoquímica y actividad biológica de *Calophyllum brasiliense***

Un estudio de 18 especies del género *Calophyllum* identificó 131 compuestos diferentes, entre esteroides, terpenos, flavonoides, cumarinas, xantonas y benzopiranos (McKee *et al.*, 1998; Chang-Ri *et al.*, 2003). Las pruebas histoquímicas han demostrado la presencia de compuestos fenólicos principalmente localizados sobre los canales secretores del tallo, pecíolo y lámina de la hoja (Sartori, N. *et al.*, 1999; Mesía-Vela *et al.*, 2001; Junior *et al.*, 2005).

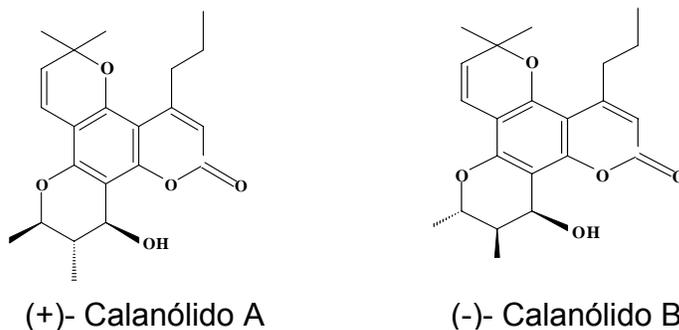
Entre los diferentes compuestos que se han aislado del aceite de semillas de *C. brasiliense* se encuentran: los ácidos brasiliensico e inofiloidico (Stout, G. *et al.*, 1968), y los ácidos de cromanonas (Plattner, R. *et al.*, 1974).

### **Actividad antiviral.**

El descubrimiento más importante sobre la actividad farmacológica del género *Calophyllum* ocurrió en 1992, cuando investigadores del National Cancer Institute (NCI), una dependencia de los Institutos Nacionales para la Salud de Estados Unidos de América, reportaron el aislamiento de cumarinas, que llamaron calanolidos. El (+)-calanolido A (figura 2), una nueva dipiranocumarina se obtuvo del árbol malayo *Calophyllum lanigerum* var. *austrocoriaceum* colectado en Sarawak, Malasia. El (-)-calanolido B (figura 2), fue aislado de *Calophyllum teysmannii* var. *inophylloide*. Ambos compuestos presentaron una potente actividad contra el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) (Kashman *et al.*, 1992; McKee-Tawnya *et al.*, 1998; Butler, 2005). Estos compuestos fueron activos contra cepas de VIH-1, resistentes a diversos inhibidores, tanto nucleosídicos como no nucleosídicos, de la transcriptasa reversa y

se encuentran en desarrollo como quimioterapéutico para el SIDA. El primer estudio *in vivo* del (+)-calanolido A en humanos fue llevado a cabo en junio de 1997 (McKee Tawnya *et al.*, 1998).

Los derechos para desarrollar estos compuestos fueron licenciados a la compañía Sarawak Medichem Pharmaceuticals la cual ha desarrollado al (+)-Calanolido A como uno de los más prometedores candidatos en la terapia anti-SIDA, se encuentra en estudios clínicos Fase III. El calanolido A tuvo actividad contra todas las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* que fueron probadas, incluyendo algunas que son resistentes a fármacos antituberculosis estándar. Esta propiedad es única entre los agentes antivirales y pueden permitir un mejor tratamiento de los pacientes infectados con el VIH y la tuberculosis. Otras cumarinas tetracíclicas como el calanolido B (Costatólido), dihidrocalanolido B y oxocalanolido se encuentran también en desarrollo preclínico por Sarawak Medichem y el NCI (Butler, 2005).



**Figura 2. Estructuras de los calanolidos A y B**

Numerosas piranocumarinas han sido aisladas de varias especies de *Calophyllum*. Estos compuestos se clasifican en tres grupos estructurales básicos: (a) dipiranocumarinas tetracíclicas en las que el anillo C tiene un grupo *gem*-dimetilo, ejemplos incluyen (+)-calanolido A, (-)-calanolido B, los inofilums y los cordatolidos; (b) dipiranocumarinas tetracíclicas con anillos pirano C y D en las posiciones de los anillos

A y D, por ejemplo, los grupos *gem*-dimetilo que se encuentran en el anillo D, como en los pseudocalanolidos, y (c) piranocurinas tricíclicas, que contienen un equivalente no ciclizado del anillo D de la estructura de los calanólidos (tabla 1). Miembros individuales de estos tres grupos estructurales pueden variar también con respecto al sustituyente del C-4 sobre el anillo lactona de la cumarina, dicho sustituyente puede ser metil, *n*-propil, o fenil (McKee Tawnya *et al.*, 1998).

**Tabla 1. Actividad anti-VIH de algunas cumarinas naturales**

Cumarinas Naturales.	Recurso vegetal.	Actividad Anti-VIH
(+)-Calanolido A	<i>Callophyllum lanigerum</i>	0.1 $\mu\text{M}^{\text{a,b,c}}$
(-)-Calanolido B	<i>Callophyllum lanigerum</i>	0.4 $\mu\text{M}^{\text{a,b,c}}$
Inofilum B	<i>Calophyllum inophyllum</i>	1.4 $\mu\text{M}^{\text{d}}$
Inofilum P	<i>Calophyllum inophyllum</i>	1.6 $\mu\text{M}^{\text{d}}$
Cordatolido A	<i>C. cordato-oblongum</i>	19.3 $\mu\text{M}^{\text{d,e}}$
Cordatolido B	<i>C. cordato-oblongum</i>	11.7 $\mu\text{M}^{\text{d,e}}$
Suksdorfina	<i>Lomatium suksdorfi</i>	2.6 $\mu\text{M}^{\text{a,e}}$
Imperatorina	<i>Ferula sumbul</i>	100 $\mu\text{g/ml}^{\text{f}}$
Coriandrina	<i>Coriandrium sativum</i>	*

<sup>a</sup>EC<sub>50</sub>. <sup>b</sup>Efectos citopáticos inducidos-VIH, <sup>c</sup>Formación de Sincitio, <sup>d</sup>IC<sub>50</sub>, <sup>e</sup>Replicación de VIH-1, <sup>f</sup>CC<sub>50</sub>, \*IC<sub>50</sub>, EC<sub>50</sub> – No Disponible.

Fuente: Kashman *et al.*, 1992; Kostova, 2006.

### Actividad anticancerígena.

Varios compuestos con actividad anticancerígena han sido aislados de *C. brasiliense*, las más importantes son las cumarinas, por ejemplo: el calofiloide y la mammea B/BB mostraron actividad citotóxica contra células HL-60 e inducen apoptosis en células HL-60 mediante la activación de las caspasas 3 y 9, que es activado por la disfunción mitocondrial (Ito *et al.*, 2006), la cumarina tricíclica GUT-70, muestra una potente actividad antileucémica (IC<sub>50</sub> 2-5 $\mu\text{M}$ ) mediante la activación de las caspasas 2, 3, 8 y 9 (Kimura *et al.*, 2005). Otras cumarinas con propiedades antineoplásicas como la mammea A/BA y A/BB, han demostrado su capacidad para reducir la sobrevivencia de

las células BMK (células de riñón de cría de ratón) al inducir apoptosis y disminuir el grado de necrosis; produciendo una reducción de los tumores experimentales en 83% en los animales al final del tratamiento (Ruiz-Marcial *et al.*, 2007).

Algunas xantonas, cumarinas y flavonoides aislados de *C. brasiliense* han demostrado actuar como sustratos y tener actividad inhibidora de las sulfotransferasas SULT1A1 y SULT2A1 (Mesía-Vela *et al.*, 2001).

#### **Actividad antiinflamatoria y analgésica.**

Cinco compuestos fenólicos aislados de hojas e identificados como hiperina (hiperósido), amentoflavona, quercetina, ácido gálico y ácido protocatechuico, presentaron actividad analgésica significativa (Da Silva *et al.*, 2001).

Algunas fracciones obtenidas de diferentes órganos (raíces, flores y frutos) de *C. brasiliense*, fueron activos para tratar inflamación y dolor. Dos compuestos puros aislados de la fracción de clorofórmica de la raíz, identificados como friedelina y 1,5-dihidroxixantona, mostraron considerables propiedades analgésicas, particularmente en la disminución de dolor, el cual fue más potente que el ácido acetilsalicílico y el acetaminofen (Isaias *et al.*, 2004).

El extracto metanólico de *C. brasiliense* ha mostrado actividad inhibitoria sobre las contracciones inducidas por acetilcolina en duodeno de rata e íleon de cobayo, validando su uso en la medicina tradicional para el tratamiento de los desordenes intestinales (Emendörfer *et al.*, 2005).

El extracto diclorometánico de la corteza de *C. brasiliense* ha demostrado su utilidad para tratar úlceras gástricas al disminuir el volumen del fluido gástrico, la

actividad es atribuida a las xantonas y flavonoides que posee este árbol (Sartori, 1999). Lo anterior ha sido comprobado en un estudio donde se probaron cuatro xantonas, un derivado acetilado y dos cumarinas (mammea A/BA y mammea C/OA) demostrando su actividad sobre enzima  $H^+$ ,  $K^+$ -ATPasa gástrica aislada del estómago de perro. Todos los compuestos mostraron inhibición de la enzima  $H^+$ ,  $K^+$ -ATPasa con potencia variada, lo que puede explicar al menos en parte las propiedades gastroprotectoras indicadas por la medicina tradicional (Reyes-Chilpa, 2006).

*C. brasiliense* posee también compuestos con actividad antihipertensiva, esto se descubrió mediante la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina al aplicar extractos de *C. brasiliense* (Braga-Fernao *et al.*, 2007). La infusión de *C. brasiliense* no mostró actividad hipoglucemiante en ratas diabéticas (Ramo y Rodríguez, 1977).

#### **Actividad antimicrobiana.**

Seis ácidos de cromononas aislados de la corteza de *C. brasiliense*: Los ácidos brasiliensofilicos A, B y C, y los ácidos Isobrasiliensofilicos A, B y C, mostraron actividad alta contra *Bacillus cereus*, pero solo moderada contra *Staphylococcus epidermidis*. Cabe mencionar que las cromononas 1 y 2 fueron las más activas. Ninguno de los compuestos fueron citotóxicos contra células KB, Jurkat T y células cancerígenas de un miosarcoma por arriba de los 20 $\mu$ g/mL (Cottiglia *et al.*, 2004).

Otros compuestos como el ácido gálico, epicatequina, ácido protocatechuico, friedelina y 1,5-dihidroxixantona, mammea A/BA, mammea A/AA, Jacareubina, 1,3,5,6-Tetrahidroxi-2-(3,3-dimetilalil) xantona y 6-Deoxijacareubina aislados de *C. brasiliense* mostraron actividad contra levaduras y bacterias patógenas por: el ácido brasiliensico.

Los resultados indicaron que todas las partes de la planta exhiben actividad antimicrobiana contra bacterias Gram(+) como *Staphylococcus aureus*, validando el uso popular de esta planta para el tratamiento de procesos infecciosos (Pretto *et al.*, 2004; Yasunaka *et al.*, 2005).

#### **Actividad antiparasitaria.**

Los compuestos de la forma 4-fenilcumarina extraídas de la fracciones hexánicas y acetónicas de *Calophyllum brasiliense* mostraron actividad tripanocida contra epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (Reyes-Chilpa *et al.*, 2002). El compuesto conocido como mammea A/BB mostró actividad significativa contra la forma promastigote y amastigote de *Leishmania amazonensis*. La cumarina mammea A/BB no mostró citotoxicidad contra macrófagos J774G8 en cultivo, cuando estas fueron probadas a altas concentraciones que inhibieron al promastigote de *L. amazonensis* tratados con 3.0 µg/mL de la cumarina mammea A/BB por 72 horas (Brenzan *et al.*, 2007).

La cumarina (-)Mammea A/BB proveniente de las fracciones de los extractos hidroalcohólicos de las partes aéreas de la planta, mostró actividad moluscicida significativa contra *Biomphalaria glabrata* (Gasparotto *et al.*, 2005).

#### **Actividad plaguicida y fungicida.**

El duramen de *Calophyllum brasiliense* es conocido por ser altamente resistente a hongos y termitas, su actividad inhibitoria al crecimiento de hongos se encontró en los extractos metanólico, acetónico y acuoso de 83%, 59% y 21% respectivamente, de los

cuales se aislaron 5 xantonas preniladas: 6-desoxijacareubina (I), 1,5-dihidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-3-metoxi-xantona (II), jacareubina (III) y 1,3,5-trihidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona (IV) y 1,3,5,6-tetrahidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona (V). Las xantonas III, IV, y V, fueron las más abundantes e inhibieron a 0.25 mg/mL el crecimiento micelial de *Postia placenta*. La actividad inhibitoria de estas xantonas fue del rango de 55.5% para la xantona V y hasta 68.8% para la mezcla de xantonas III y IV. Las xantonas de *C. brasiliense* juegan un papel defensivo contra la destrucción de la madera por hongos (Reyes-Chilpa *et al.*, 1997). Sin embargo en un estudio previo se menciona que ninguno de los extractos de *C. brasiliense* extraídos por un gradiente de polaridad, mostraron actividad mortal sobre las termitas, únicamente mostraron una actividad repelente (Carter *et al.*, 1983).

### Información fitoquímica de *Calophyllum brasiliense* en México.

Estudios realizados en México, han reportado que *Calophyllum brasiliense* tiene dos variedades químicas con diferencias químicas y anatómicas en la hoja; la primera variedad denominada Quimiotipo 1 contiene cumarinas tipo mammea, que son características de especies del género *Mammea* (figura 3) y poseen alta actividad citotóxica contra células tumorales humanas *in vitro* (Reyes-Chilpa *et al.*, 2004). Estos compuestos son muy abundantes en las hojas por lo cual sería factible su extracción, sin embargo, este quimiotipo ha sido detectado solo en dos localidades<sup>1</sup> en estudios preliminares y por tanto se encuentra en peligro de extinción (Aguilar-Bañuelos, 2005).

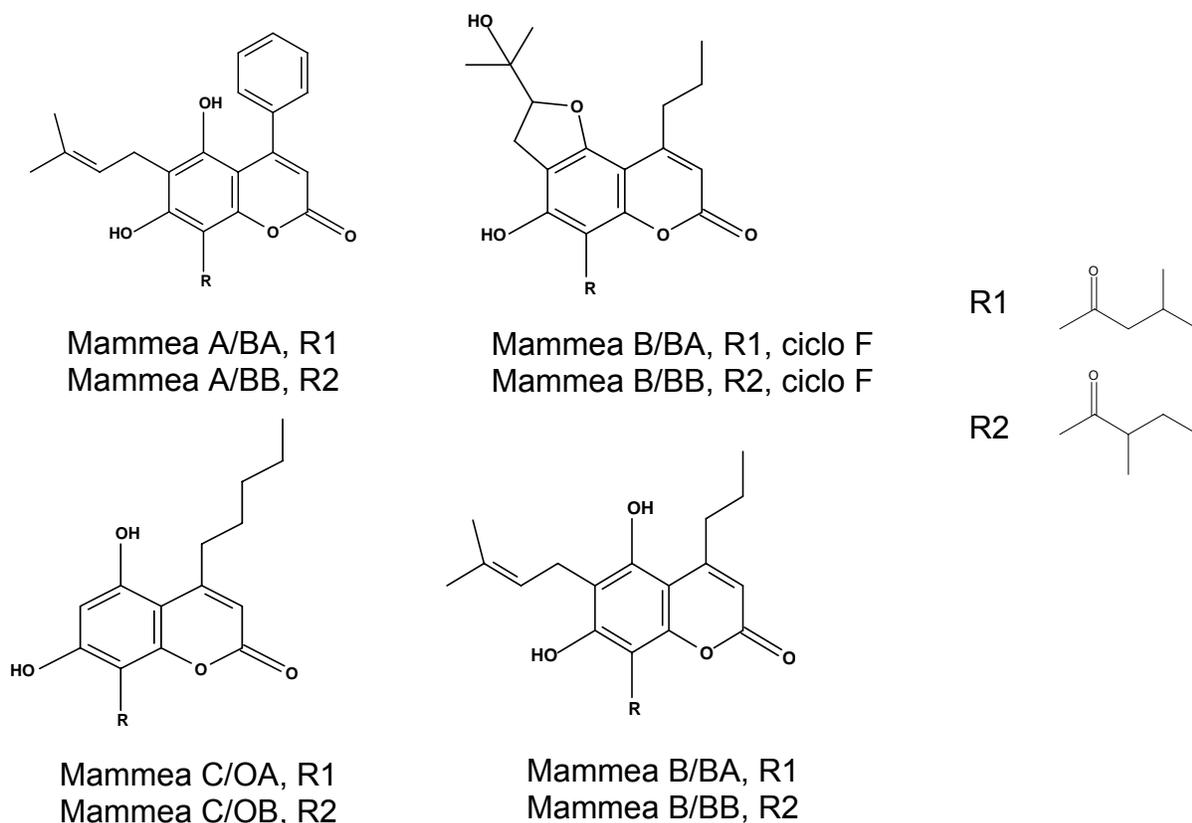
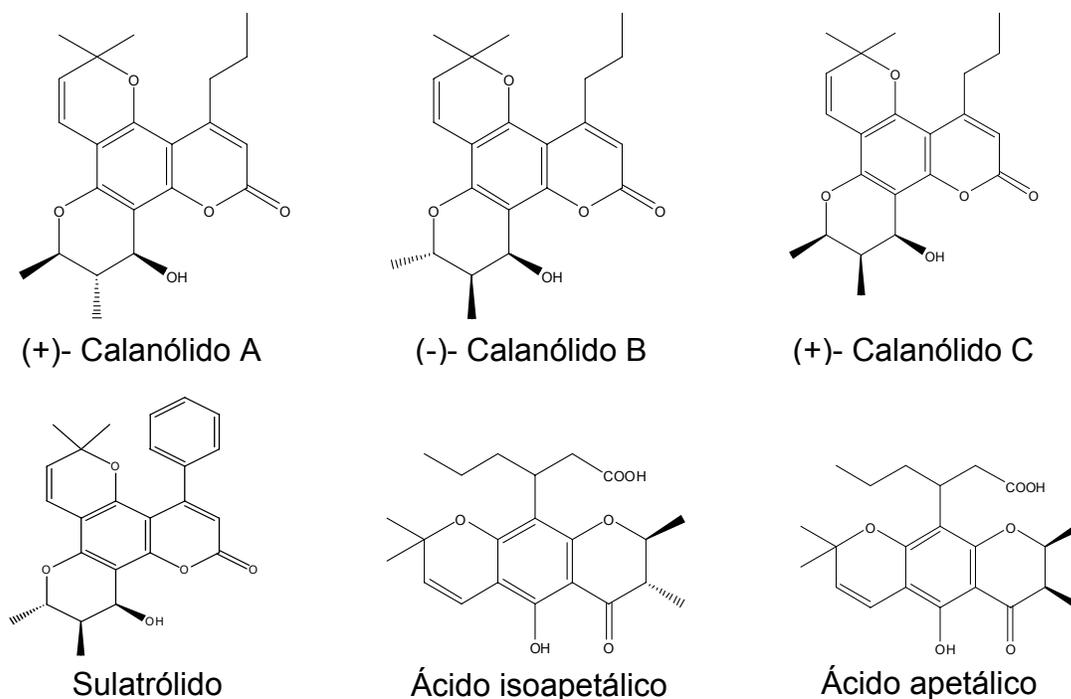


Figura 3. Componentes químicos aislados de *Calophyllum brasiliense* Qtp1.

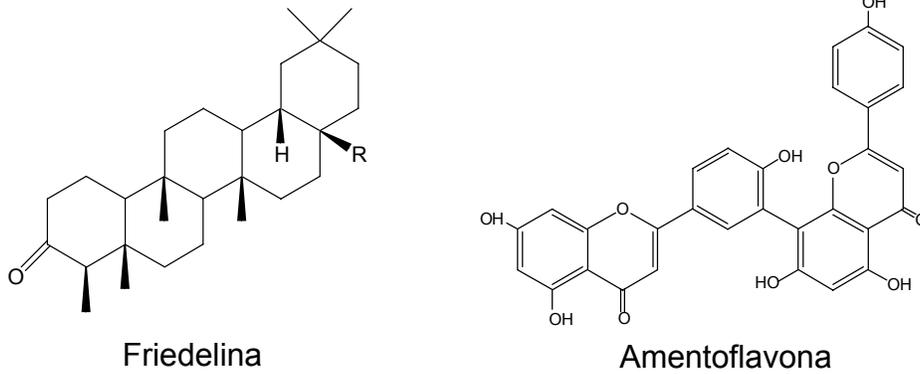
<sup>1</sup> Las localidades son la de Benigno Mendoza en Veracruz y en la Hacienda de San Antonio en Colima.

Por otra parte, la segunda variedad química de *C. brasiliense*, llamada quimiotipo 2, contiene como compuestos minoritarios dipirano cumarinas tetracíclicas, como el (+)-calanólido A, el (-)-calanólido B, el (+)-calanólido C y el soulatrólido, los compuestos mayoritarios son cromanonas, principalmente el ácido apetalico (figura 4). Este quimiotipo se identificó en ejemplares colectados en la Reserva de Biología Tropical de la UNAM, en “Los Tuxtlas”, Veracruz. Los calanólidos son inhibidores específicos y potentes *in vitro* del VIH-1 (Huerta *et al.*, 2004), incluso en cepas resistentes a AZT y piridinona (Kashman *et al.*, 1992). Desafortunadamente, dichos compuestos se encuentran en bajas concentraciones en el extracto hexánico de las hojas; siendo mayoritarios otros compuestos inactivos como el ácido apetalico y los triterpenos friedelina y canofilol (Huerta *et al.*, 2004). En contraste existen abundantes poblaciones de este quimiotipo en las zonas tropicales de México (Reyes-Chilpa, 2004).



**Figura 4. Componentes químicos aislados de *Calophyllum brasiliense* Qtp 2.**

Cabe señalar que existen compuestos comunes a ambos quimiotipos, que destacan por su abundancia, estos son: friedelina, el canofilol (triterpenos) y la amentoflavona (biflavonoide) (figura 5).



**Figura 5. Componentes químicos comunes a los quimiotipos 1 y 2 de *C. brasiliense*.**

**Friedelina, R= Me, Canofilol, R = CH<sub>2</sub>OH. Amentoflavona.**

## Efecto de nutrientes y hormonas en la fenología y la química de plantas.

La biosíntesis de cumarinas es regulada por el desarrollo y es dependiente del tejido vegetal. También es inducida en respuesta a un amplio número de factores estresantes bióticos y abióticos como las deficiencias nutricionales, señales químicas como las hormonas vegetales y metabolitos, así como xenobióticos (Cabello-Hurtado *et al.*, 1998; Kosuke *et al.*, 2006).

En el caso de los neoflavonoides o 4-aryl- o 4-alkyl- cumarinas han existido dificultades para determinar la biogénesis. Gautier y colaboradores (1972) suministraron fenilalanina marcada radiactivamente en el carbono 3 a plántulas jóvenes de *Calophyllum inophyllum* y posteriormente aislaron ácido calofilico e inofilido. Estos resultados permitieron plantear una ruta biogenética que incluye los siguientes pasos (figura 6). El resocinol o fluoroglucinol (ambas de origen policétido) son los precursores del anillo aromático condensado de las cumarinas. La  $\beta$ -adición de dichos precursores a una unidad cinnamil (por ejemplo ácido cinámico ó el éster pirofosfato del alcohol cinámico, ambos derivados de la fenilalanina) daría origen al resto del esqueleto, sintetizándose de esta forma las 4-aryl-cumarinas. En el caso de las 4-alkyl-cumarinas, el precursor difiere ya que es un ácido carboxílico  $\alpha\beta$  insaturado, siendo entonces el sustituyente en posición 4 de tipo alifático.

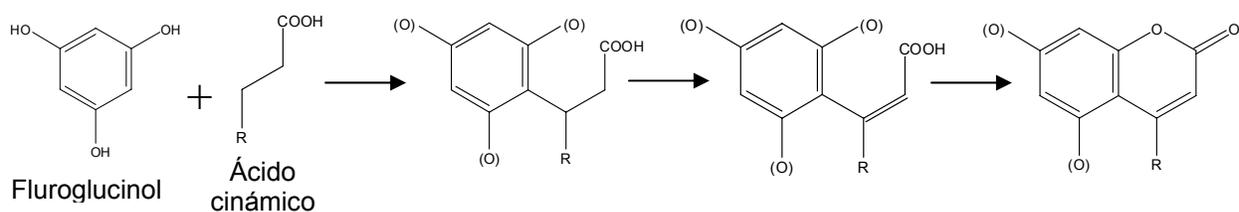


Figura 6. Biosíntesis de neoflavonoides o 4-aryl- o 4-alkyl- cumarinas.

La influencia de los nutrientes del suelo (N, K y P), sobre la producción de furanocumarinas en la planta conocida como chirivía o apio del campo (*Pastinaca sativa*) mostraron que la disponibilidad de nutrientes afectaba la concentración de cuatro de las seis furanocumarinas presentes, pero la espondina y angelicina fueron la excepción; aunque parte de la variación de la producción de furanocumarinas en *Pastinaca sativa* están bajo el control genético (Zangerl y Berenbaum, 1987).

Un estudio del efecto de los nutrientes sobre la biosíntesis de metabolitos secundarios se observa en la planta conocida como papa de Jerusalén o patata de Judea (*Helianthus tuberosus*), que sintetiza fitoalexinas de cumarinas del tipo 7-hidroxilado (Por ejemplo, ayapina y escopoletina) en el tubérculo de la planta. Estos dos compuestos se acumularon en respuesta al tratamiento con elicitadores químicos como  $\text{CuCl}_2$ , o la sacarosa, pero no responde al  $\text{MnCl}_2$  (Cabello-Hurtado *et al.*, 1998).

Otro estudio que ejemplifica la morfología de la hoja, la anatomía, y el contenido de macronutrientes del suelo realizados en Costa Rica con seis especies de árboles, entre ellos *C. brasiliense*, se encontró que las hojas de los estados sucesionales tempranos presentaron características escleromórficas; estas son micrófilas, gruesas, con alta densidad estomática y el parénquima en empalizada formada por tres capas de células. El contenido nutricional (N, P y K) fue el más bajo en este estado sucesional. A medida que la sucesión avanzó, estas características cambiaron. Las hojas fueron más mesomórficas conforme el contenido de nutrientes incrementó en el sistema, como una consecuencia de los cambios en la estructura de la comunidad forestal y las condiciones ambientales (Boeger y Wisniewski, 2002).

En experimentos con árboles nativos sobre pastizales degradados en tierras bajas de Costa Rica sí la influencia de plantaciones diseñadas en mezcla o

monoespecíficas, sobre el crecimiento de los árboles y el ciclaje de nutrientes mostrando que *C. brasiliense* tuvo la más baja tasa de descomposición de las hojas desprendidas del árbol (23%) durante un período de 12 meses (Byard *et al.*, 1996).

Un estudio publicado recientemente sobre la variación estadísticamente significativa en la producción de piranocumarinas en el árbol *Calophyllum inophyllum* trabajado en cultivo de tejidos bajo diferentes condiciones nutricionales apoya la hipótesis de que el contenido nutricional del suelo puede ser el factor más importante para la biosíntesis de los diferentes tipos de cumarinas (Kiran *et al.*, 2007).

## Composición de los suelos de la Región de los Tuxtlas

En los Tuxtlas, zona de colecta de las semillas empleadas en este estudio, existe una gran variedad de tipos de suelos (figura 7), los cuales son producto de la alteración de materiales volcánicos expulsados por los volcanes San Martín Tuxtla, Santa Marta y San Martín Pajapan. Las condiciones ecogeoGráficas que se establecen allí, han dado origen a una diversidad importante de suelos. El sustrato de la sierra consiste principalmente de rocas ígneas (basalto y andesitas) mezclado con cenizas volcánicas. Los suelos derivados de este material y sometidos a una alteración de ambiente tropical muestran horizontes poco desarrollados y varían en el contenido de materia orgánica. Entre los grupos más importantes, por su extensión, están los luvisoles y acrisoles con 34.2% de la superficie de la sierra, los andosoles en 21%, feozems en 18% y vertisoles en 13% (Guevara *et al.*, 2006).

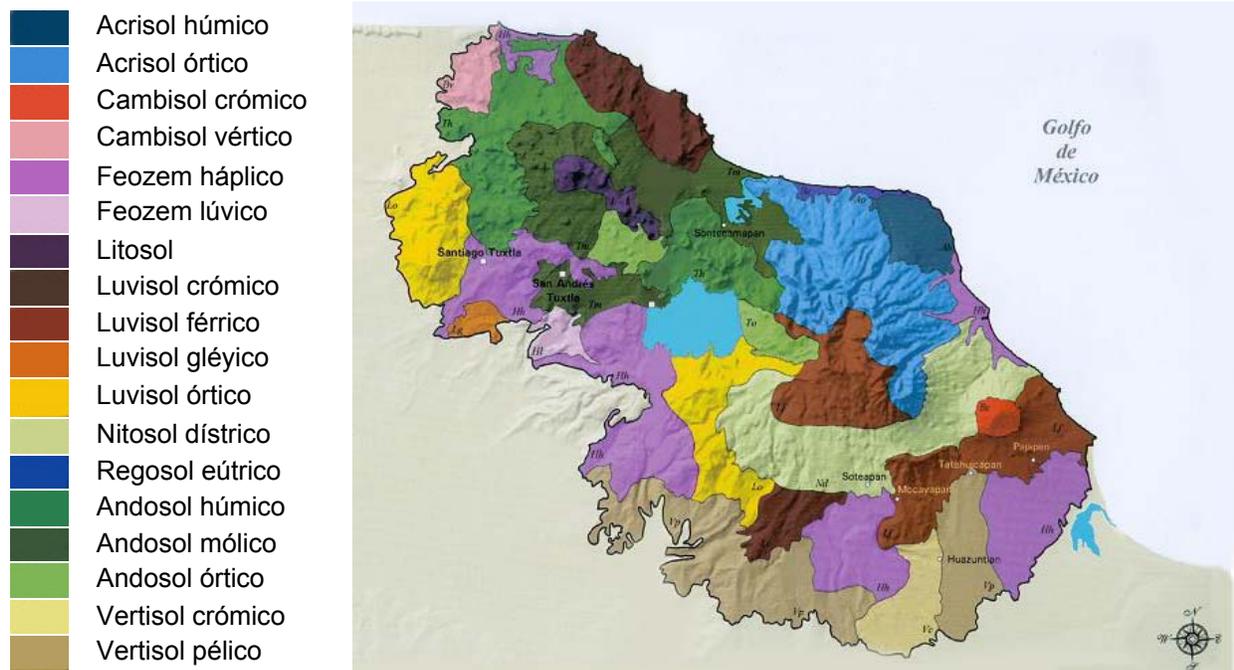
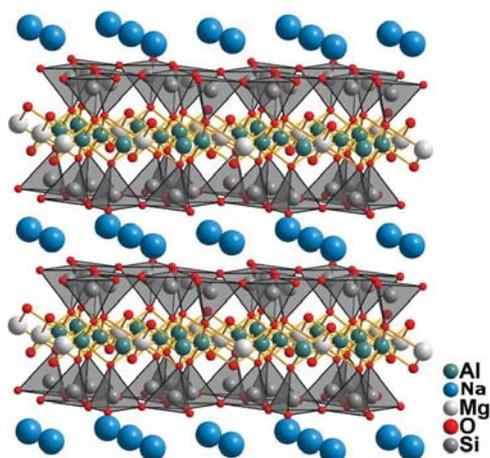
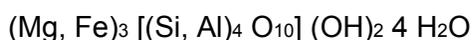


Figura 7. Tipos de suelos de la Región de los Tuxtlas (Guevara *et al.*, 2006).

## Información general de la vermiculita

Para investigar la influencia de los macronutrientes en la composición de las hojas de plántulas de *C. brasiliense* objeto de esta tesis se empleó vermiculita. La vermiculita es un aluminosilicato hidratado de hierro y de magnesio, perteneciente a la familia de los filosilicatos que poseen una estructura cristalina de tipo mica-laminar del tipo 2:1 (figura 8), donde la carga es principalmente negativa con cationes que atraviesan la zona intralaminar (Gomes *et al.*, 2007; De Sousa, 2008). Contiene pequeñas cantidades de cromo, manganeso, fósforo, azufre y cloro. Tiene alta porosidad y baja densidad, posee propiedades características de la arcilla, entre ellos una alta capacidad de intercambio iónico, la capacidad para formar complejos con sustancias orgánicas una distancia variable entre las capas de la red cristalina según el tamaño del catión intercambiable (Rajarao *et al.*, 2003). La Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC) de la vermiculita es de 120 – 150 cmol (+) Kg<sup>-1</sup> (Porta-Casanellas, 1999).



**Figura 8.** Estructura de la vermiculita con una representación de iones de sodio en el espacio interlaminar (De Sousa, R. 2008).

Cuando se calienta la vermiculita entre 650 y 1000°C presenta una curiosa propiedad de expansión, debido a la repentina transformación del agua en vapor; la presión ejercida por el vapor promueve la eliminación de vapores y la deformación axial de los minerales. Este fenómeno es llamado exfoliación y el aumento en el volumen inicial es entre 15 y 25 veces (Rajarao *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2007).

La vermiculita comercial se ha ampliado a varios usos debido a su baja conductividad térmica, acústica y eléctrica; no se rompe o se deteriora, no es perjudicial para la salud, es inodora, puede absorber hasta cinco veces su peso en agua y tiene las características necesarias para materiales de filtración, para el acondicionamiento de los suelos por la liberación lenta de nutrientes y de apoyo en la aplicación de los insecticidas (Rajarao *et al.*, 2003).

## JUSTIFICACIÓN

Este trabajo tiene como finalidad aportar información útil enfocada a encontrar las condiciones para el desarrollo de las plántulas en las que se optimice la producción de los compuestos activos de interés para la elaboración de fitomedicamentos; así como difundir información de los usos e importancia de esta especie para proteger sus zonas de distribución (selva alta perennifolia) ya que la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, la incluye dentro de las especies amenazadas.

### Planteamiento del problema

Actualmente no se sabe cuales son los factores ambientales (humedad, luz, nutrientes, herbívora) o genéticos que influyen en la síntesis de metabolitos secundarios de *C. brasiliense*, tanto para el quimiotipo 1, como para el quimiotipo 2. La literatura indica que los nutrientes afectan la producción de cumarinas en plantas y que poblaciones de las especies del género *Calophyllum* presentan una variabilidad importante en la biosíntesis de cumarinas. Con base en lo anterior, se realizó el presente estudio para examinar tanto en condiciones de campo (Región de los Tuxtlas, Veracruz), como en plántulas cultivadas en condiciones de invernadero, la producción de metabolitos secundarios en plántulas sometidas a diferentes tratamientos nutricionales.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto de los nutrientes del suelo sobre el crecimiento y producción de metabolitos secundarios de interés farmacológico en plántulas de la especie arbórea *Calophyllum brasiliense*.

### **Objetivos particulares**

1. Determinar la distribución geográfica de *C. brasiliense* en el territorio Nacional.
2. Describir las propiedades fisicoquímicas del suelo donde se desarrolla *C. brasiliense* en la región de los Tuxtlas.
3. Determinar las condiciones propicias para la germinación y establecimiento de plántulas de *C. brasiliense*.
4. Evaluar la tasa de crecimiento de las plantas de *C. brasiliense* desarrolladas bajo condiciones de invernadero.
5. Conocer el efecto de la concentración de nutrientes en la producción de metabolitos secundarios de plántulas de *C. brasiliense*.
6. Comparar las concentraciones de algunos metabolitos secundarios, en especial el ácido apetalico y los calanólidos B y C en hojas de plántulas de *C. brasiliense* (Quimiotipos 1 y 2) tratadas con solución nutritiva completa, deficiente en potasio (K) y deficiente en calcio (Ca).
7. Aportar información que contribuya a determinar si las poblaciones pertenecientes a los quimiotipos 1 y 2 de *C. brasiliense* son dos especies diferentes.

## MÉTODO

### 6.1. Búsqueda de información.

Se realizó una búsqueda especializada en bases de datos bibliográficos CAB, Biosis, Pascal, Medline, CAS, Int.Pharm.Abs, Paperchem, Agris, Biol. & Agric. Index, Geobase, Embase, ToxFile, Zoological Record Online, Energy SciTec, Agricola, Holding Library: AGL, Elsevier Biobase, TGG Health&Wellness y Mantis, y de herbarios como el MEXU, el IPN y el IMSS, para la ubicación de las localidades de colecta y para generar un mapa de distribución nacional.

### 6.2. Colectas en campo.

Se llevó a cabo una colecta en el Potrero del Sr. Naúl Tirado en el Ejido de Benigno Mendoza, Mpio. Tatahuicapan de Juárez, Veracruz (N 18° 18' 23.9'' O 94° 46' 15.0'' Alt. 322 m s.n.m.). Vegetación: Relictos de selva alta perennifolia. En la actualidad la región es una zona ganadera. Se colectó semillas y suelo bajo un árbol maduro de 30 m del Qtp 1<sup>1</sup>.

Una segunda colecta en el potrero del Sr. Arnulfo Díaz en la localidad de Tecuanapa, Mpio. Tatahuicapan de Juárez, Veracruz (N 18° 24' 19.7'' O 94° 45' 40.8'' Alt. 25 m s. n. m.). Vegetación: Relictos de selva alta perennifolia, en la actualidad la región es una zona ganadera. Se colectó semillas de un árbol maduro del Qtp 2 que se encuentra junto a un nacimiento de agua.

---

<sup>1</sup> Se detectó la presencia de otro árbol maduro del Qtp 2 de 10m de altura justo a 2m de distancia en una visita subsecuente en enero de 2007 (Vease resultados de la fitoquímica en la página 82).

Una tercera colecta en la Estación de Biología Tropical “Los Tuxtlas” (N 18°35' 2.01" O 95° 4'27.60") en la porción sur del estado de Veracruz 173 m s.n.m. Vegetación: selva alta Perennifolia (Zona Protegida). Se colectó suelo dentro de la zona núcleo bajo un árbol maduro del Qtp 2.

### **6.3. Análisis edafológico.**

Se determinaron las características fisicoquímicas de los suelos de las localidades de Benigno Mendoza y de La Reserva de los Tuxtlas, Ver., de los primeros 30 cm de profundidad de cada perfil; se tomaron muestras cada 10 cm de profundidad. El análisis se realizó hasta esta profundidad debido a que la raíz de las plántulas no excedía los 30 cm. El suelo fue secado a temperatura ambiente y tamizado con tamiz del no. 10.

- Se determinó el pH: método potenciómetro.
- Materia orgánica: por degradación con dicromato de potasio, Jackson (1958).
- Textura: método del hidrómetro de Bouyoucos (1951).
- Ca y Mg intercambiables: método de Versenato, Cheng y Bray (1951).
- Potasio intercambiable: método espectroflamómetro, Jackson (1970).
- Fósforo intercambiable: Extracción por acetato de amonio, Pratt (1965).
- Nitratos: Método del ácido salicílico, Robarge *et al* (1983).
- Contenido de humedad y porcentaje de saturación.
- Color de acuerdo a la Tabla de Munsell.

### **6.4. Caracterización morfofisiológica de las semillas y frutos.**

Se pesaron 30 frutos y semillas en balanza analítica, se midió el eje ecuatorial de cada uno con vernier. Se determinó el contenido de humedad de las semillas de acuerdo a

las especificaciones del ISTA de 1992, partidas a la mitad con el endocarpio y deshidratadas a 130 °C por 6, 24, 48 y 72 horas.

### **6.5. Germinación de semillas y establecimiento de plántulas.**

Las semillas (562) se sembraron en charolas de 60x30 cm en vermiculita (0-3 mm), en oscuridad, bajo condiciones de invernadero y aisladas del resto de otras plantas. Las semillas germinadas se transplantaron a bolsas de vivero individuales de 10x10 cm con vermiculita (0-3 mm) cuando la radícula tenía una longitud mínima de 5 cm. Las plántulas continuaron su desarrollo en las bolsas, hasta que se detuvo su crecimiento (120 días aprox.).

### **6.7. Tratamientos nutricionales.**

Después de los 120 días de desarrollo las plántulas de las localidades de Benigno Mendoza (BM) y Tecuanapa (Tecua) fueron colocadas en lotes de forma aleatoria en los siguientes tratamientos nutricionales<sup>2</sup>:

Cultivadas en vermiculita con deficiencia en potasio (17 plántulas de BM y 19 de Tecua)

Cultivadas en vermiculita con deficiencia en calcio (19 plántulas de BM y 18 de Tecua).

Cultivadas en Suelo de Benigno Mendoza esterilizado (50 plántulas de Tecua).

Cultivadas en suelo de los Tuxtlas esterilizado (40 plántulas de BM).

Cultivadas en vermiculita con solución completa (35 plántulas de BM y 50 de Tecua).

Se cosecharon todas las hojas maduras de las plántulas de todos los tratamientos después de 7 meses, se secaron a 30 °C durante una semana y se pesaron para determinar la masa foliar.

---

<sup>2</sup> La preparación de soluciones nutritivas stock se muestra en el anexo I.

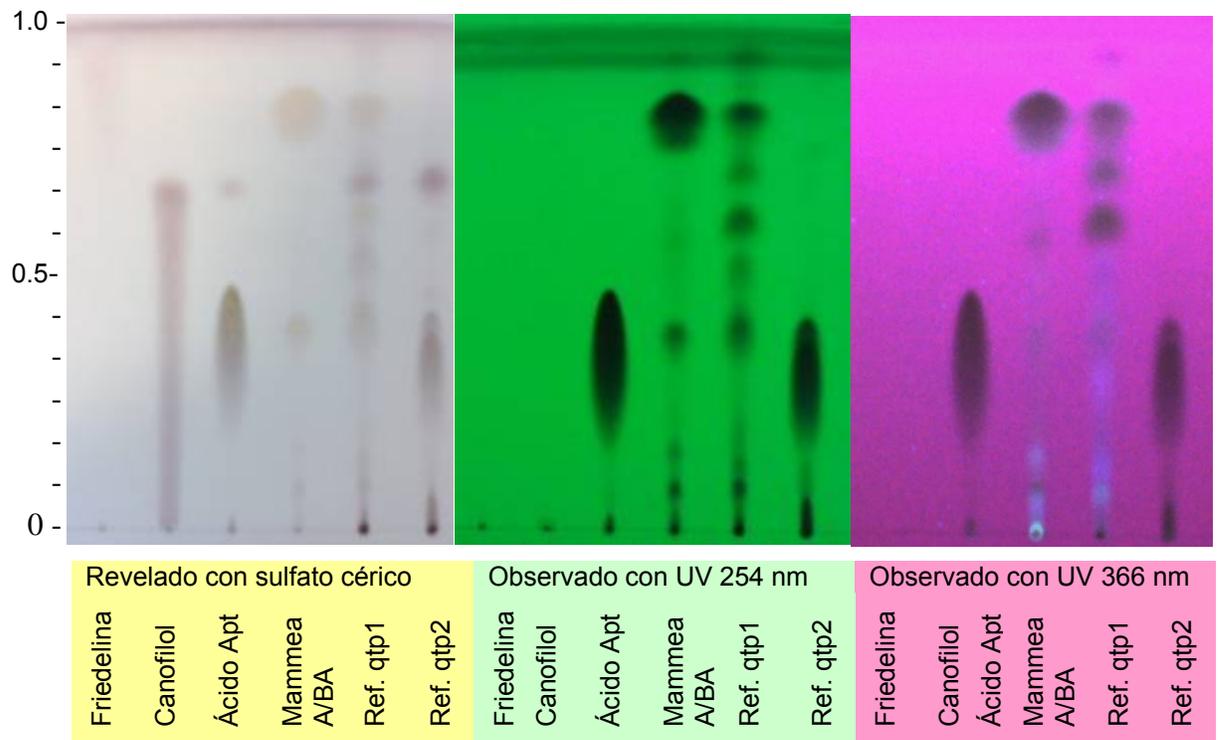
## 6.8. Fitoquímica de hojas

El procedimiento para el estudio de las hojas<sup>3</sup> fue el siguiente: extracción con hexano a temperatura ambiente de 1 a 4 hojas de cada plántula hasta agotamiento. Filtración de extractos utilizando filtros de papel de 55 mm de diámetro No. 2 Whatman. Concentración de los extractos a presión reducida en Rotavapor BÜCHI R-205, el concentrado se recuperó con diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) en viales de 4mL con tara. Evaporación de solventes (diclorometano-hexano) de los viales a 30 °C por 1 semana. El extracto de cada plántula se analizó por cromatografía capa fina (GF-254, Merck) a una concentración de 60 mg/mL con una fase móvil de hexano-acetato de etilo 8:2. Los cromatofolios se observaron con radiación ultravioleta a longitud de onda de 254 nm y 366 nm y finalmente un revelado permanente con sulfato cérico 1N en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. Se determinó el quimiotipo de cada plántula con base a las siguientes muestras auténticas: quimiotipo 1: extracto de hexano de las hojas de un árbol de Benigno Mendoza, Ver. (figura 9), así como mammea A/BA quimiotipo 2 (figura 11), extracto de hexano de las hojas de un árbol de San Andrés Tuxtla, Ver (figura 9), así como ácido apetalico (figura 10) y calanólido B (Fig. 12). La friedelina y el canofilol están presentes en ambos quimiotipos (figura 9).

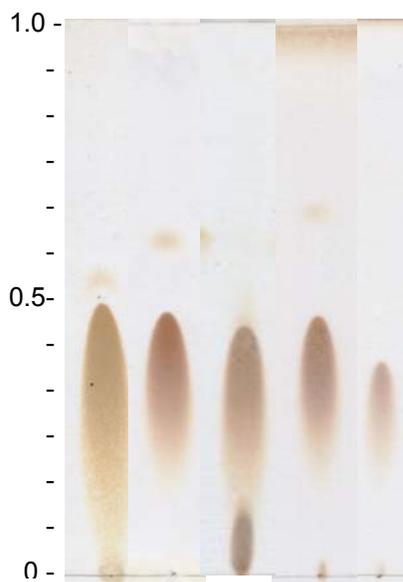
Todas las plántulas de BM y Tecua cultivadas con Deficiencia en Calcio, fueron analizadas antes de ser sometidas al tratamiento, cuando habían sido regadas solo con agua desionizada y recibían el aporte nutricional de las semillas.

---

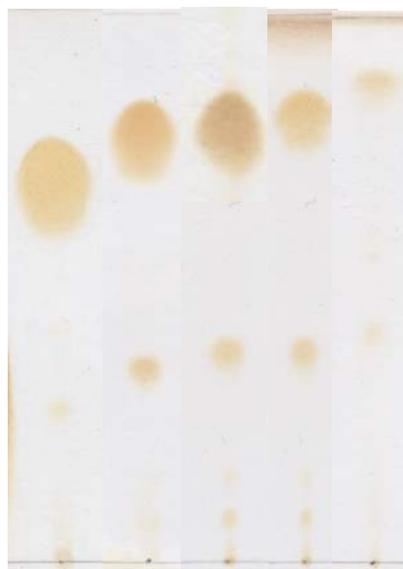
<sup>3</sup> Se decidió utilizar únicamente la masa foliar para analizar la química de la planta apoyado en un estudio de cuantificación de 10 cumarinas de la especie hermana *Mammea americana* con CLAR-PDA en raíz (0.75%), hoja (0.64%), núcleo de la semilla (0.48%), piel del fruto (ectocarpio) (0.11%), tallo (0.08%), cubierta seminal (0.02%) y fruto fresco (<0.01%) (Yang *et al.*, 2006).



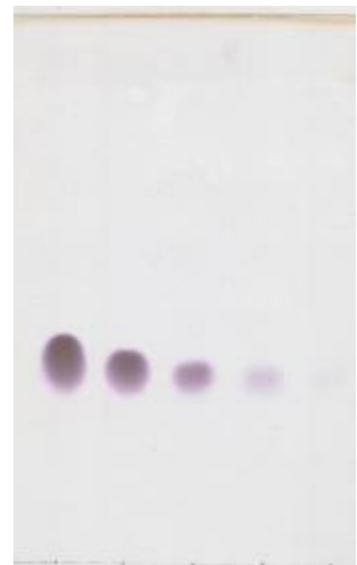
**Figura 9. Quimiotipos y Compuestos de Calophyllum brasiliense en CCF.**



**Figura 10. Ácido Apetálico (60, 40, 30, 20 y 5 mg/mL). Revelado con sulfato cérico**



**Figura 11. Mamea A/BA (60, 40, 30, 20 y 5 mg/mL). Revelado con sulfato cérico**



**Figura 12. Calanólido B (20, 10, 5, 2.5 y 0.5 mg/mL). Revelado con sulfato cérico**

## 6.9. Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR<sup>4</sup>).

### 6.9.1 Elaboración de curvas de calibración.

Se elaboraron las curvas de calibración de tres compuestos proporcionados por el laboratorio del Dr. Ricardo Reyes que fueron: ácido apetalico en concentraciones [10, 25, 50, 100 mg mL<sup>-1</sup>], calanolido B [5, 25, 50, 100 mg mL<sup>-1</sup>] y calanolido C [5, 25, 50 mg mL<sup>-1</sup>] por CLAR utilizando una Columna Kromasil 100 C-18 5µm 25x0.46cm, en una fase móvil de acetonitrilo – agua (60:40). Cada muestra fue ajustada a una concentración de 750µg/mL. A una presión de 1694 PSI en un sistema Waters 1525 Binary CLAR Pump, con un flujo de 1ml/min y los cromatogramas fueron registrados en un detector UV (HPLC) Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector establecido para detectar a 284 nm.

### 6.9.2 Cuantificación de metabolitos en extractos.

Se determinó la concentración de los tres compuestos en extractos de hoja de las plántulas con alto y bajo rendimiento encontradas por CCF de los lotes de tratamientos nutricionales utilizando una Columna Kromasil 100 C-18 5µm 25x0.46cm, utilizando una fase móvil isocrática de acetonitrilo–agua (60:40), inyectando 20 µL a una concentración de 7500 µg mL<sup>-1</sup> de cada una de las muestras en la fase móvil, los tiempos de corrida fueron de 40 minutos con una tasa de flujo de 1mL·min<sup>-1</sup> y los cromatogramas fueron registrados en un detector UV (HPLC) Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector establecido para detectar a una longitud de onda de 284 nm.

---

<sup>4</sup> En inglés se llama High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

### **6.10. Análisis estadístico.**

Se utilizó estadística no paramétrica debido a la heterogeneidad en el tamaño de los lotes de plántulas cultivadas. Para la valoración de la masa y el diámetro de los frutos se utilizó la prueba de Tukey; para determinar el tiempo requerido para el contenido de humedad se utilizó regresión lineal y Análisis de Varianza (ANADEVA). Para comparar el crecimiento de plántulas antes de ser sometidas a tratamientos nutricionales se utilizó la prueba de t-student, para el análisis de crecimiento de las plántulas expuestas a diferentes tratamientos nutricionales se utilizó un ANADEVA y prueba de Tukey. Para la masa foliar y el rendimiento de extractos se utilizó una prueba de Tukey y se hizo una correlación lineal entre la masa foliar y el rendimiento de los extractos. Para la comparación de los rendimientos de ácido apetalico, calanólido B y calanólido C por CLAR se utilizó el ANADEVA y la prueba de Kruskal-Wallis.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Distribución de *Calophyllum brasiliense* en México.

*C. brasiliense* se distribuye en México a lo largo de la zona costera del territorio nacional, por la parte del pacífico en los estados de Nayarit, Jalisco, Michoacán, Oaxaca y Chiapas; por la parte del Golfo se distribuye en Veracruz, Tabasco, Campeche, Yucatán y Quintana Roo (figura 13), de acuerdo a los ejemplares de herbario y los registros previos (Huerta-Reyes *et al.*, 2004; Aguilar-Bañuelos, 2005; CONABIO, 2005; Aranda, 2006).



Figura 13. Mapa de la distribución nacional de *Calophyllum brasiliense* en México.

## 7.2. Análisis de Suelo.

Los dos suelos analizados mostraron un bajo contenido de macronutrientes, bajo pH y alta capacidad para retener la humedad (tabla 2), sin embargo desde el punto de vista agrónomo no se observan diferencias en el contenido de nutrientes y se clasifican como suelos pobres (Martínez-Sánchez, 2006).

**Tabla 2. Propiedades físicas y químicas de los primeros 30cm del suelo de dos localidades de la Región de los Tuxtlas (valores promedio).**

Variable/Sub Horizonte	Loc. Benigno Mendoza (Fragmento conservado) Suelo del Quimiotipo 1.	Loc. San Andrés Tuxtla (Zona núcleo) Suelo del Quimiotipo 2.
Tipo de Suelo	Nitrosol districo* Acrisol**	Luvisol crómico* Luvisol**
pH (pasta de saturación)	4.57	5.56
Conductividad Eléctrica ( $\mu$ mhos y centi siemens)	193	382.67
Color (Tabla de Munsell)	5YR3/3 y 5YR3/4 Dark reddish brown	10YR2/2 Very Dark Brown y 7.5YR3/2 Dark Brown
Humedad del suelo secado a temperatura ambiente (%)	7.66	6.29
Saturación (%)	54.87	59.23
Nitratos (cmol/Kg)	0.0027	0.0023
Potasio (cmol/Kg)	0.0117	0.0203
Fosforo (cmol/Kg)	0.0028	0.0036
Calcio (cmol/Kg)	0.032	0.1617
Magnesio (cmol/Kg)	2.23	5.6867
Contenido de Materia orgánica (%)	4.91	4.16
Contenido de Carbono (%)	2.45	2.08
Arcillas (%)	72.67	62
Limos (%)	24	36
Arenas (%)	3.33	2
Clase Textural	Arcilloso	Arcilloso y Arcillo-Limoso

\* Guevara y colaboradores, (2006).

\*\* INEGI (2009).

Los suelos de la localidad de Benigno Mendoza se clasifica como nitrosol dístico, para la localidad de San Andrés Tuxtla (Zona Núcleo) se clasifica como luvisol crómico y para la localidad de Tecuanapa se clasifican como feozem háplico (Guevara et al., 2006).

También mencionan que los suelos con textura de tipo arcillosa ocupa el 48.5% de las muestras analizadas en su estudio. Esta clase de textura se encuentra en la parte sur y sureste del volcán Santa Marta, el área de San Fernando, Soteapan, Benito Juárez, Poblado de Santa Marta, Huazuntlan, Tatahuicapan, Pajapan y Benigno Mendoza, presentándose en muchos casos contenidos de arcilla mayores a 75%. Estos resultados coinciden con los resultados obtenidos del análisis de suelos que se llevó a cabo para la Localidad de Benigno Mendoza. Sin embargo, en el caso de la textura del suelo de San Andrés Tuxtla (dentro de la zona núcleo) se obtuvieron resultados similares a los de Benigno Mendoza (arcillosa, arcillo-limosa), y para esta localidad Guevara, S. *et al* (2006) mencionan que la textura es principalmente franco arcillo arenosa, franco arcillosa y franca, representando el 17.45 de sus muestras.

Para el caso de la localidad de Tecuanapa Guevara y colaboradores, (2006), mencionan que la textura del suelo es de tipo franco arcillo limosa.

Respecto al color del suelo mencionan que para la región de los Tuxtlas los colores el suelo son rojo, rojo amarillento, pardo, pardo oscuro, pardo amarillento y pardo grisáceo. Las localidades con horizontes de color rojo y pardo rojizos oscuros (2.5YR4/6 y 2.5YR3/4) son Pajapan, San Juan Volador y Benigno Mendoza, lo cual coincide con nuestros resultados para la localidad de Benigno Mendoza. Aunque también mencionan que suelos con color rojo amarillento (5YR4/6) son de los más abundantes en su estudio con 14.5% y están presentes también en Benigno Mendoza.

En el caso de la localidad de San Andres Tuxtla, Guevara y colaboradores, (2006), mencionan que hay suelos de color Pardo amarillento (10YR5/4) y pardo grisáceo oscuro (10YR4/2) y pardo grisáceo (10YR5/2), lo cual es un poco discordante con los resultados que nosotros obtuvimos, que es café muy oscuro (10YR2/2) y café oscuro (7.5YR3/2).

Para la localidad de Tecuanapa, Guevara y colaboradores, (2006), mencionan que hay suelos de color pardo (7.5YR4/4 y 10YR4/3), que es el más común en la zona de estudio; pardo oscuro (7.5YR4/6) y pardo amarillento oscuro (10YR4/4 y 10YR3/4).

Respecto a las propiedades químicas del suelo en la Región de los Tuxtlas según Guevara y colaboradores, (2006), el intervalo de pH va de 3.6 a 6.5 con una media de  $4.9 \pm 0.7$ , y nuestros resultados se encuentran dentro de este intervalo (4.5 para Benigno Mendoza). Los suelos con valores de pH menores a 4.5 (que son de reacción extremadamente ácida) se localizan en Benigno Mendoza, poblado de Santa Marta, Venustiano Carranza, Ejido Morelos y en los horizontes subsuperficiales de los sitios de Buena vista, San Fernando y Caudillo-Vigía (Guevara et al., 2006).

El valor de pH entre 5.3 – 6.0 es de reacción moderadamente ácida, los suelos con este valor están en Huazuntlán, La Florida, Zapotitlan, Catemaco, San Andrés Tuxtla (horizonte superficial), Tatahuicapan (horizonte superficial) y Catemaco-Sontecomapan (horizonte superficial), como el que se obtuvo en el suelo de La zona núcleo de la Estación de la UNAM en el municipio de San Andrés Tuxtla para este estudio (5.5 para San Andres Tuxtla).

Para la localidad de Tecuanapa, Guevara y colaboradores, (2006), menciona dos intervalos de pH para los suelos de esta localidad, el primero está entre 4.5 – 5.3, que son de reacción fuertemente ácida, pero solamente se encuentran en los horizontes

superficiales; y el segundo pH entre 6.0 – 7.0, que son de reacción cercana a la neutra y se encuentran en los horizontes subsuperficiales.

Para el contenido de carbono Guevara y colaboradores, (2006), mencionan que los suelos con un contenido de carbono en el intervalo de 2 a 4% se encuentran en los suelos de Pajapan-San Juan Volador, Benigno Mendoza-Tatahuicapan, Huazuntlán, Buenavista, Soteapan, Santa Rosa, Barroso, San Andrés Tuxtla, Catemaco-Sontecomapan, Zapotitlán, Sapoapan, Venustiano Carranza y Caudillo-Vigía. Nuestros resultados concuerdan con los datos antes mencionados.

Para la localidad de Tecuanapa Guevara, S. *et al* (2006) mencionan un contenido de materia orgánica en el intervalo de 4 a 6% respectivamente.

Para el contenido de bases intercambiables ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{K}^{+}$ ) Guevara y colaboradores, (2006), menciona que para la localidad de Benigno Mendoza, los suelos presentan valores menores a  $3 \text{ cmol Kg}^{-1}$  y en el intervalo de  $3 - 7 \text{ cmol Kg}^{-1}$  que son valores bajos. Mientras que los suelos de la localidad de San Andrés Tuxtla presenta bases intercambiables en los intervalos de  $15 - 25 \text{ cmol Kg}^{-1}$  que son valores altos y mayores a  $25 \text{ cmol Kg}^{-1}$  que son valores muy altos.

Para la localidad de Tecuanapa Guevara y colaboradores, (2006), menciona que los suelos presentan bases intercambiables en intervalos menores a  $3 \text{ cmol Kg}^{-1}$ , de  $3 - 7 \text{ cmol Kg}^{-1}$  que son valores bajos; y de  $7-15 \text{ cmol Kg}^{-1}$  que son valores medios.

Guevara y colaboradores, (2006), mencionan que los valores mayores a  $15 \text{ cmol Kg}^{-1}$  se presentan en los terrenos que sostienen un uso agrícola intensivo, lo que significa que la aplicación de insumos trae consigo el aumento de cationes en el suelo. Además la heterogeneidad en los tipos de suelo ha permitido el establecimiento de diversas comunidades vegetales entre las que se encuentra la selva alta perennifolia, la cual ha

sido fuertemente impactada por actividades agropecuarias como la ganadería y la agricultura, restringiéndola a las áreas más inaccesibles con pendientes pronunciadas, suelos pobres y pedregosos, que no son aptos para la agricultura, como las laderas y las cimas de los volcanes.

### 7.3. Longitud y peso de los frutos y semillas.

El diámetro de los frutos (gráfico 1) de las localidades de Benigno Mendoza y Tecuanapa coincide con los valores descritos en la literatura de 1.8 a 3 cm (Fischer y Dos Santos, 2001; Vozzo, 2003; CONABIO, 2005) y no hay diferencias significativas entre las dos localidades (tabla 3).

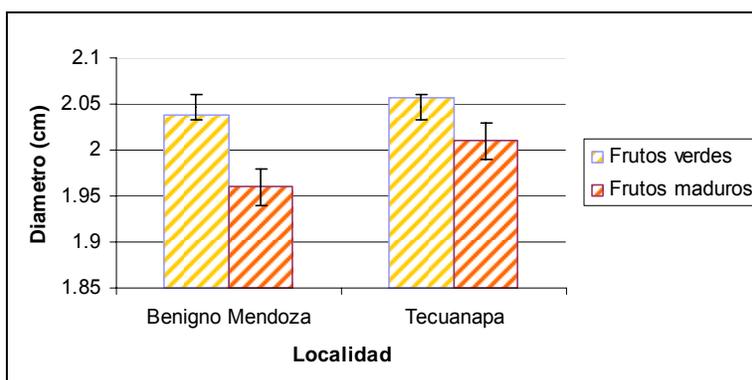


Gráfico 1. Diametro de los frutos de *C. brasiliense* por localidad.

Tabla 3. Prueba de Tukey para determinar diferencias en el diámetro transversal de los frutos de las dos localidades.

Loc. BM	Loc. Tecua	Diferencia de medias	Error típico	Sig. ( $\alpha=0.05$ )	Intervalo de confianza para la media al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Frutos maduros	Frutos maduros	-0.05000	0.04840	0.731	-0.1780	0.0780
Frutos verdes	Frutos verdes	-0.01942	0.03184	0.929	-0.1036	0.0648

No hay diferencias significativas en el diámetro transversal de los frutos en el mismo estado de desarrollo entre las dos localidades.

Sin embargo, la masa de los frutos (gráfico 2) entre las dos localidades muestran una diferencia estadística importante (tabla 4), esto puede estar asociado a que en la localidad de Benigno Mendoza los árboles presentaban fructificación un mes antes de la fecha registrada en la literatura que es en diciembre y enero (Orozco y Vásquez, 1982), mientras que en la localidad de Tecuanapa la fructificación coincidió con la literatura y

esto sugiere que los frutos hayan estado expuestos a la desecación durante un tiempo mayor en Benigno Mendoza, ya que la fructificación en Tecuanapa se encuentra dentro del intervalo reportado en la bibliografía (Orozco y Vásquez, 1982; De Carvalho et al., 2006).

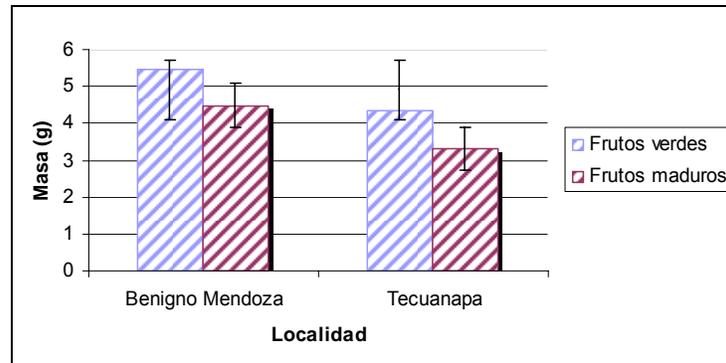


Gráfico 2. Peso de los frutos de *C. brasiliense* por localidad.

Tabla 4. Prueba de Tukey para determinar diferencia en la masa de los frutos de las dos localidades.

Loc. BM	Loc. Tecua	Diferencia de medias	Error típico	Sig. ( $\alpha=0.05$ )	Intervalo de confianza para la media al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Frutos maduros	Frutos maduros	1.1690	0.3735	0.014	0.184	2.154
Frutos verdes	Frutos verdes	1.1188	0.2564	0.000	0.443	1.795

Se encontró que había diferencias significativas en la masa de los frutos en el mismo estado de desarrollo entre las dos localidades.

#### 7.4. Contenido de humedad.

El contenido de humedad de las semillas se encuentran en el intervalo de 46 a 52 % (gráfico 3), muy cercano al descrito para las semillas de *C. brasiliense*, (55.3% de humedad recién colectadas según De Carvalho *et al.*, 2006), además la mayor cantidad de semillas germinadas se presento en los meses de Febrero y Marzo, disminuyendo notablemente después de los 3 meses de siembra como se describe en la literatura (Vasquez *et al.*, 2005; De Carvalho *et al.*, 2006; Lines *et al.*, 2006).

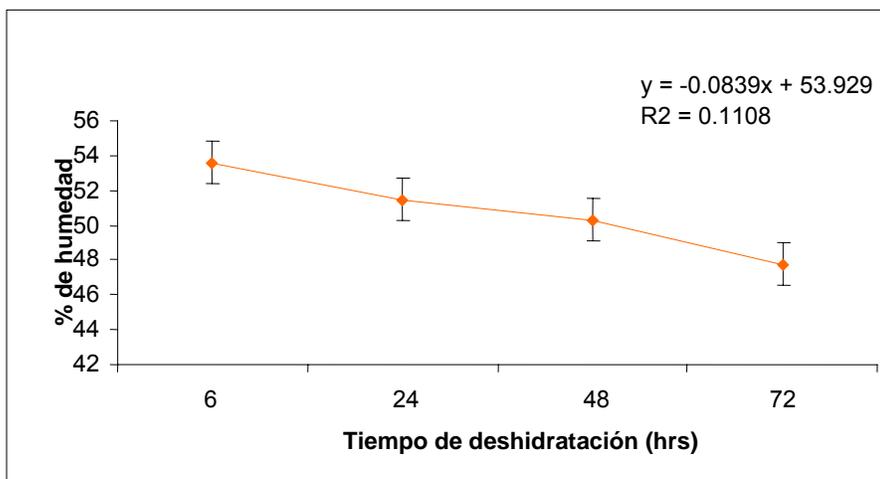


Gráfico 3. Contenido de humedad de semillas de *C. brasiliense*.

En la estadística se observa que hay una correlación baja y negativa ( $R = -0.332$  con  $p < 0.01$ ) y el ANADEVIA indica que no hay diferencias significativas ( $p < 0.000$ ) entre el número de horas y la humedad de la semilla. Por lo que el tiempo no es relevante para llevar a cabo la prueba de contenido de humedad, para deshidratar las semillas de esta especie solo con 6 horas a 130 °C es suficiente.

## 7.5. Germinación de semillas de *Calophyllum brasiliense* por localidad.

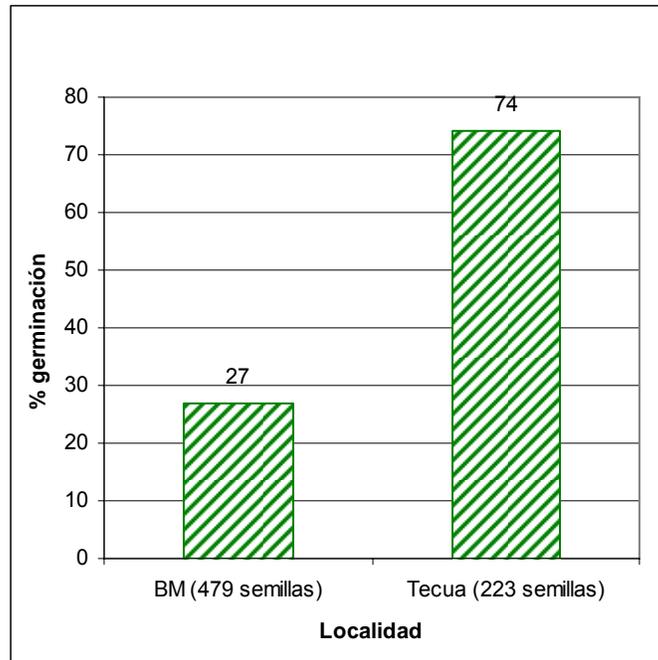
Los porcentajes de germinación (figura 14) de la localidad de Benigno Mendoza después de 9 meses<sup>1</sup> son bajos (gráfico 4) comparados con los reportados en la literatura, ya que el intervalo en el cual se encuentran reportados es de 70 a 100% de germinación, para frutos recién cortados del árbol y en condiciones controladas (Zentsch y Díaz, 1977; CONABIO, 2005). Desafortunadamente, para nuestra colecta no fue posible cumplir con esta condición ya que en la mayoría de los casos se colectaron indiscriminadamente los frutos premaduros y maduros que se encontraban bajo los árboles, lo cual en cierto momento generó la posibilidad de que animales como el murciélago *Artibeus jamaicensis*, que dispersan las semillas de este árbol en un radio de 500 m (Orozco y Vásquez, 1982; Marques y Joly, 2000-B; King, 2003-A; Ribeiro, 2005) hubieran transportado frutos y semillas de otros quimiotipos de un lugar a otro<sup>2</sup>. Además por información de nuestro guía y por visitas en años subsecuentes a los sitios de colecta, nos enteramos que en la localidad de Benigno Mendoza los árboles presentaban fructificación un mes antes de la fecha registrada en la literatura, que es en diciembre y enero (Orozco y Vásquez, 1982), mientras que en la localidad de Tecuanapa la fructificación coincidió perfectamente con la literatura. Al realizar la colecta en Benigno Mendoza, los frutos ya tenían aproximadamente un mes de haber sido dispersados y por esa razón, el porcentaje de germinación aparenta ser más bajo

---

<sup>1</sup> Tiempo en el cual se registró la última semilla germinada colectada.

<sup>2</sup> Sin embargo, se descubrió que había en realidad dos árboles adultos de *C. brasiliense* cohabitando en el mismo sitio, el mayor tenía 30 metros de altura y pertenece al quimiotipo 1, el segundo tenía 10 metros de altura y pertenece al quimiotipo 2 (véase la fitoquímica de los árboles silvestres).

en Benigno Mendoza, mientras que el de Tecuanapa se encuentra dentro del intervalo reportado en la bibliografía (Orozco y Vásquez, 1982).



**Gráfico 4. Porcentajes de germinación por localidad.**

Otro condición que posiblemente propicio un bajo porcentaje de germinación fue la temperatura<sup>3</sup>, ya que en la región los Tuxtlas la temperatura promedio anual varía de 18 a 22 °C, pero dependiendo de la localidad, la altura y la temporada, registrando temperaturas extremas entre 12 y 35 °C (Puebla-Olivares y Winker, 2004, Gobierno del Estado de Veracruz, 2009). Sin embargo, el descontrol de esta variable queda excusada debido a que se deseaba lograr adaptar la mayor cantidad de plántulas posibles para el experimento en las condiciones del invernadero de la Facultad de Ciencias, UNAM, en el Distrito Federal, con el fin de evitar una alta tasa de mortalidad

<sup>3</sup> Las variaciones mensuales de temperatura del invernadero están disponibles en los Anexos.

en el estadio de plántula y evitar un sesgo en los resultados de crecimiento y fitoquímica que más adelante se presentarán.

El tipo de sustrato utilizado para la germinación de semillas que resultó más adecuado para el experimento fue la vermiculita.

Ya que la semilla de *C. brasiliense* es clasificada como recalcitrante es muy probable que el contenido de humedad en las semillas y los frutos maduros que se colectaron del suelo haya sido insuficiente para mantener vivo al embrión por la cual se perdió viabilidad, una posible reducción en el contenido de humedad causa la pérdida de integridad de las membranas y una desintegración nuclear, tal como se describe en la literatura en semillas de caucho secadas al sol; además, las semillas de plantas tropicales contienen altas concentraciones de compuestos fenólicos y enzimas fenolicoxidasas, las cuales normalmente están localizadas en sitios específicos dentro de las células, pero durante la desecación dichos compuestos son oxidados (Lines *et al.*, 2006).



Figura 14. Etapas de la germinación de semillas de *Calophyllum brasiliense*.

## 7.6. Establecimiento de plántulas.

Del total de semillas germinadas, se logró mantener a la mayoría con vida hasta establecerse como plántulas<sup>4</sup> (tabla 5). Debido a que en esta etapa las plántulas presentan una alta tasa de mortalidad de entre 29.7 a 98% (Marques y Joly, 2000-A; Fischer y Dos Santos, 2001; Calvo-Alvarado, *et al.*, 2007). Se mantuvieron las plántulas (figura 15) en condiciones de invernadero que asemejaran las descritas en la literatura, donde las plántulas de *C. brasiliense* en el estado de sucesión temprana tienen mejores condiciones de sobrevivencia que en nivel de sucesión clímax, niveles de luz más altos, menos herbivoría y mayor crecimiento y sobrevivencia que en las zonas altas de montaña (King, 2003-B).

<b>Tabla 5. Establecimiento de Plántulas de <i>C. brasiliense</i> en condiciones de invernadero.</b>		
	<b>Localidad Benigno Mendoza</b>	<b>Localidad Tecuanapa</b>
<b>Total de semillas</b>	479	223
<b>No. semillas germinadas (%)</b>	129 (27%)	166 (74%)
<b>Mortalidad de semillas(%)</b>	15 (11.62% de las semillas germinadas)	46 (27.7% de las semillas germinadas)
<b>Plántulas establecidas (%)</b>	114 (100%)	120 (99.17%)
<b>Mortalidad de plántulas(%)</b>	0 (0%)	1 (0.83% de plántulas)

La altura máxima alcanzada por las plántulas de las localidades de Benigno Mendoza y Tecuanapa, con los nutrientes proporcionados por la semilla, fueron comparados estadísticamente (gráficos 5, 6) y (tabla 6) y se encontró que no había diferencias significativas entre las dos localidades ( $p=0.25$ ). Estos resultados sugieren la idea de que las dos poblaciones sin importar el fenotipo y el quimiotipo pertenecen a la misma especie.

<sup>4</sup>Se definió como plántula al estado fisiológico en el que se observa la elongación del tallo, pigmentación verde y surgimiento de las primeras hojas.

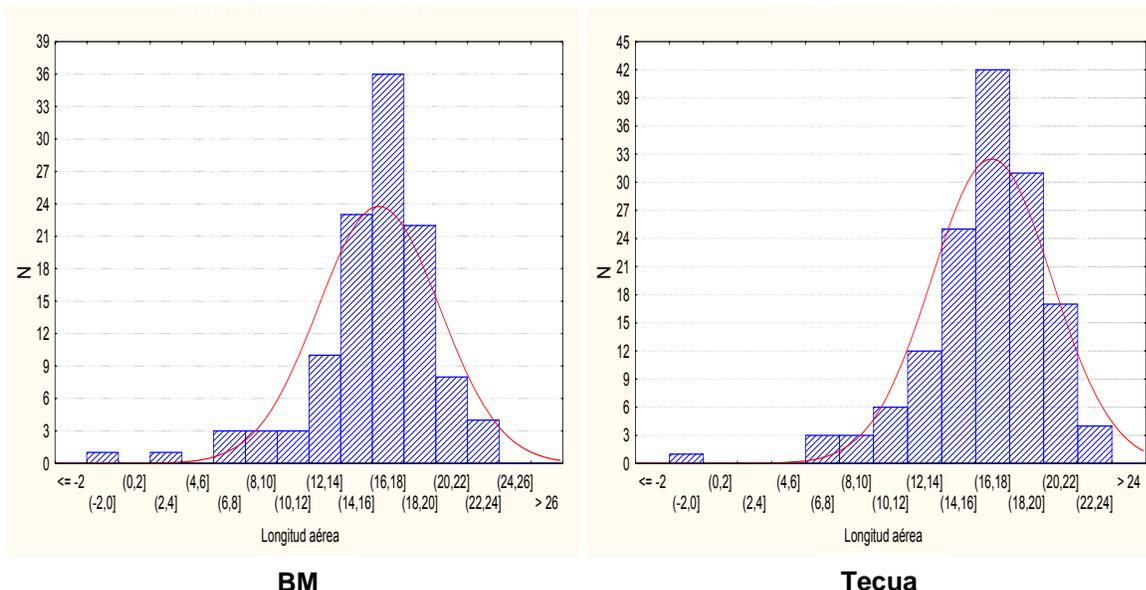


Gráfico 5 y 6. Histogramas de frecuencia del crecimiento de plántulas de *Calophyllum brasiliense* únicamente con el aporte de nutrientes de la semilla por localidad.

Tabla 6. Prueba de T-student para la altura del tallo.

Loc. Benigno Mendoza (n=114) Promedio	Loc. Tecuanapa (n=119) Promedio	t-value	df	p
16.40	16.92	-1.127	255	0.26

Se observa que NO hay diferencias significativas ( $p=0.25$ )



Figura 15. Plántulas de *C. brasiliense* establecidas con los nutrientes de la semilla.

## **7.7. Crecimiento de plántulas bajo tratamientos nutricionales.**

El motivo por el cual se eligieron los tratamientos nutricionales de solución completa, -Ca y -K, esta basado en el análisis edafológico previo realizado en las localidades donde habitan el Qtp1 y el Qtp2 (tabla 2). No se realizaron los experimentos con exceso de calcio y potasio, bajo el argumento de que las plántulas de esta especie son sensibles y mueren en ambientes salinos (Fischer y Dos Santos, 2001).

El crecimiento de las plántulas entre los tratamientos mostró pocas diferencias significativas (gráficos del 7 al 10), el análisis estadístico mostró que las dos únicas diferencias, se observaron entre las plántulas regadas con solución completa de ambas localidades, comparadas con los demás tratamientos nutricionales (Tablas 7 y 8), ya que mostraron un desarrollo muy pronunciado (entre tres y cuatro veces más que los otros tratamientos) que se asocia a la buena nutrición que recibieron y que esta descrito también en la literatura (Wightman *et al.*, 2001). La otra diferencia fue entre el tratamiento de deficiencia en potasio de Tecuanapa, comparada con el tratamiento de cultivo en suelo de las dos localidades (Tablas 7 y 8), lo cual sugiere que esta población puede alcanzar una talla ligeramente mejor en estas condiciones.

La falta de diferencias estadísticas significativas en el crecimiento entre los demás tratamientos nutricionales, apoya la idea de que sin importar el quimiotipo de las dos poblaciones, éstas siguen un desarrollo idéntico en condiciones de estrés nutricional como si fueran una misma población.

### Histogramas de frecuencia del crecimiento de plántulas en tratamientos nutricionales.

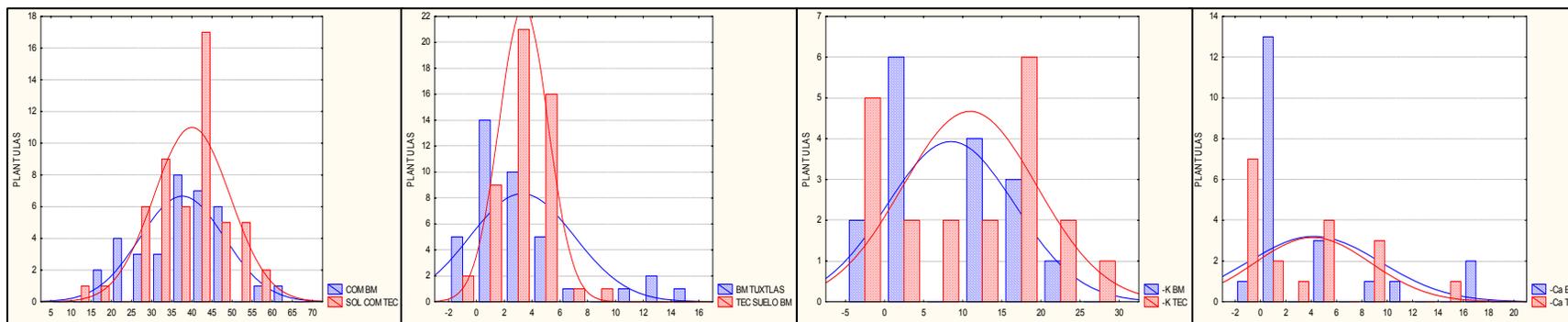


Gráfico 7. Solución completa.

Gráfico 8. Suelos de la selva

Gráfico 9. Deficiencia en K.

Gráfico 10. Deficiencia en Ca.

Tabla 7. ANADEVIA para el Crecimiento de plántulas en diferentes tratamientos

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	40181.79	1	40181.79	798.8324	0.00
Intra-grupos	66824.35	7	54.353	189.7855	0.00
Total	12223.06	243	50.30		

Tabla 8. Prueba de Tukey del crecimiento de plántulas en diferentes tratamientos.

	BM Sol completa	BM suelo Tuxtlas	BM (-K)	BM (-Ca)	TECUA Solución completa	TECUA suelo BM	TECUA (-K)	TECUA (-Ca)
<b>BM Sol completa</b>		0,000032	0,000032	0,000032	0,784645	0,000032	0,000032	0,000032
<b>BM en suelo de Tuxtlas</b>	0,000032		0,216902	0,999735	0,000032	1,000000	0,002692	0,999918
<b>BM (-K)</b>	0,000032	0,216902		0,620626	0,000032	0,200249	0,973279	0,632640
<b>BM (-Ca)</b>	0,000032	0,999735	0,620626		0,000032	0,999828	0,055661	1,000000
<b>TECUA Solución completa</b>	0,784645	0,000032	0,000032	0,000032		0,000032	0,000032	0,000032
<b>TECUA en suelo de BM</b>	0,000032	1,000000	0,200249	0,999828	0,000032		0,001775	0,999953
<b>TECUA (-K)</b>	0,000032	0,002692	0,973279	0,055661	0,000032	0,001775		0,067545
<b>TECUA (-Ca)</b>	0,000032	0,999918	0,632640	1,000000	0,000032	0,999953	0,067545	

Las plántulas de las dos localidades cultivadas en otros suelos, mostraron necrosis de forma punteada sobre las hojas, evidencia de que comenzaban a presentar deficiencias nutricionales. Esta característica indica infección por hongos, hay que revisar.

Todas las plántulas de las dos localidades que crecieron con deficiencias en potasio (-K), mostraron necrosis en los márgenes de las hojas, que es un síntoma específico de la deficiencia en potasio (Salisbury y Ross, 1992).

Las plántulas de las dos localidades que crecieron con deficiencias en calcio (-Ca), mostraron clorosis en las hojas, que es un síntoma específico de la deficiencia de calcio (Salisbury y Ross, 1992).

Ninguna de las plántulas de los tratamientos alcanzó el crecimiento promedio anual descrito en la literatura de 1.29 m (Piotto *et al.*, 2003). Sin embargo, la sobrevivencia en el establecimiento de las plántulas (tabla 5) y después de ser cultivadas en solución completa y en suelos de las localidades (tabla 9) fue superior al descrito en la literatura (Butterfield y Espinoza, 1995).

<b>Tabla 9. Sobrevivencia de Plántulas de <i>Calophyllum brasiliense</i> en tratamientos.</b>		
	<b>Localidad Benigno Mendoza</b>	<b>Localidad Tecuanapa</b>
<b>Sobrevivencia en Sol. Completa n (%)</b>	35 (100%)	50 (100%)
<b>Mortalidad en Sol. Comp n (%)</b>	0 (0%)	0 (0%)
<b>Sobrevivencia en Intercambio de suelos n (%)</b>	39 (100%)	50 (100%)
<b>Mortalidad en suelos n (%)</b>	0 (0%)	0 (0%)
<b>Sobrevivencia en Deficiencia de Potasio n (%)</b>	11 (68.75%)	15 (75%)
<b>Mortalidad Def. Potasio n (%)</b>	5 (31.25%)	5 (25%)
<b>Sobrevivencia en Deficiencia de Calcio n (%)</b>	9 (42.85%)	9 (50%)
<b>Mortalidad Def. Calcio n (%)</b>	12 (57.14%)	9 (50%)

Se ha reportado que el aprovechamiento y optimización de los nutrientes por parte de las plantas del bosque clímax está por encima de las plantas pioneras (Stewart *et al.*, 1992). Ya que aparentemente muestran una mayor afectación por la falta de nutrientes específicos, en especial el fosforo y los nitratos, en comparación con las especies climax, *C. brasiliense* es una de las especies que conforman el bosque tropical climax (Vilela De Resende *et al.*, 2000). Sin embargo, King, (2003-B) señala que *C. brasiliense* tiene una mayor sobrevivencia en el estado de sucesión temprana asociándola con el carácter de especie pionera, mientras otros autores claramente la catalogan como especie clímax (MacDougall y Kellman, 1992; Vilela De Resende *et al.*, 2000).

## 7.8. Masa foliar.

La masa foliar de las plántulas cultivadas (tabla 10) mostró que solamente había diferencias significativas entre los tratamientos de solución completa con respecto a los demás tratamientos (tabla 11), lo que puede asociarse a la ausencia de factores de estrés para las plántulas cultivadas en solución completa. No se determinó la masa foliar de las plántulas cultivadas en suelo porque no mostraron crecimiento foliar durante el experimento.

**Tabla 10. Estadística comparativa de masa foliar.**

LOCALIDAD	TRATAMIENTOS	PROMEDIO (mg)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	N
BM	SOL COMPLETA	3347.65	1624.10	34
	DEF. K	773.01	892.76	18
	DEF. Ca	467.95	556.64	20
	TOTAL	1904.07	1844.71	72
TECUA	SOL COMPLETA	4162.30	1651.69	49
	DEF. K	1230.97	938.83	18
	DEF. Ca	563.95	840.37	17
	TOTAL	2805.92	2132.58	84
TOTAL	SOL COMPLETA	3828.58	1679.55	83
	DEF. K	1001.99	932.29	36
	DEF. Ca	512.05	692.65	37
	TOTAL	2389.68	2048.79	156

**Tabla 11. Prueba de Tukey de comparaciones múltiples de la masa foliar por tratamiento.**

Tratamientos	Tratamientos	Diferencia promedio	Error estándar	Sig.	95% Intervalo de confianza	
					Lím. inferior	Lím. superior
Sol Comp	Def -K	2826.59*	269.49	.000	2188.77	3464.41
	Def -Ca	3316.52*	266.93	.000	2684.75	3948.30
Def. -K	Sol Comp	-2826.59*	269.49	.000	-3464.41	-2188.77
	Def -Ca	489.93	316.13	.271	-258.27	1238.14
Def. -Ca	Sol Comp	-3316.52*	266.93	.000	-3948.30	-2684.75
	Def -K	-489.93	316.13	.271	-1238.14	258.27

\*Las diferencias promedio es significativa a nivel de 0.05

El tamaño de las hojas cosechadas de las plántulas fue variable (3 – 20 cm) entre los tratamientos y sin importar el quimiotipo, a diferencia de lo observado en árboles maduros del Qtp1 y el Qtp2, Aranda, (2006), describe como característica distintiva el tamaño de la hoja entre individuos de los dos quimiotipos y siendo el principal criterio para reconocer los árboles en campo para este estudio.

## 7.9. Fitoquímica

Los tratamientos aplicados sobre las plántulas parecen no haber provocado ningún efecto sobre la composición química de la fracción hexanica, debido a que aparecen plántulas con quimiotipos 1 y 2 en los tratamientos de la localidad de Benigno Mendoza regados con deficiencia en potasio, deficiencia en calcio y las plántulas recién establecidas que fueron regadas solo con agua desionizada (tabla 12), además los extractos de las plántulas de Tecuanapa de todos los tratamientos no mostrarán evidencia de cambio en la composición química de la fracción hexanica.

**Tabla 12. Patrones cromatográficos de las plántulas en tratamiento nutricional.**

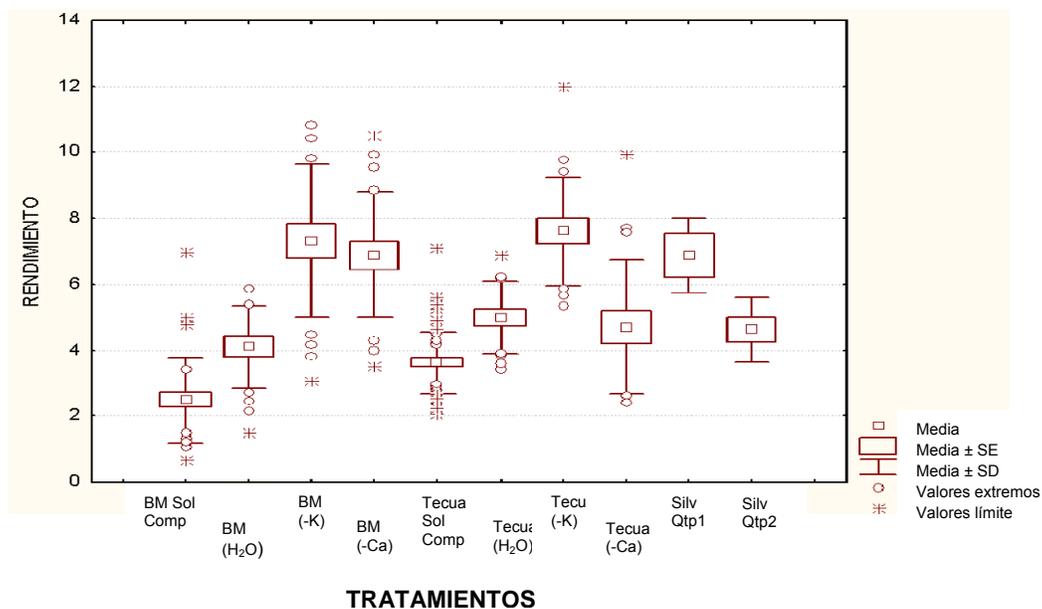
Localidad/Tratamiento	Individuos Qtp		Localidad/Tratamiento	Individuos Qtp			
	No	(%)		No	(%)		
BM (H <sub>2</sub> O/ -Ca)	Qtp 1	12	71	Tecua (H <sub>2</sub> O/ -Ca)	Qtp 1	0	0
	Qtp 2	4	23		Qtp 2	18	100
	Qtp¿?	1	6		Qtp¿?	0	0
BM (-K)	Qtp 1	12	57	Tecua (-K)	Qtp 1	0	0
	Qtp 2	6	29		Qtp 2	16	84
	Qtp¿?	3	14		Qtp¿?	3	16
BM (Sol Completa)	Qtp 1	0	0	Tecua (Sol Completa)	Qtp 1	0	0
	Qtp 2	33	100		Qtp 2	48	100
	Qtp¿?	0	0		Qtp¿?	0	0

Nota: Qtp¿? = Quimiotipo desconocido. Todas las plántulas mostraron un patrón cromatográfico similar a alguno de los árboles silvestres, excepto los patrones desconocidos, los cuales no necesariamente son parecidos al patrón localizado en Ixhuatlán del Sureste.

Sin embargo, las proporciones de los metabolitos sí muestran una variación significativa entre los tratamientos de las dos localidades, al punto de no poder distinguir en CCF la presencia de los compuestos y se encontró que hay diferencias significativas en el rendimiento de las dos localidades para el tratamiento de deficiencia en calcio ( $\alpha=0.05$ ,  $p=0.0009$ ). También se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento de deficiencia en potasio de las dos localidades contra los tratamientos de solución completa ( $\alpha=0.05$ ,  $p=0.00001$ ;  $p=0.00001$ ) y los tratamientos con H<sub>2</sub>O de las dos localidades ( $\alpha=0.05$ ,  $p=0.00001$ ;  $p=0.0001$ ;  $p=0.00001$ ;  $p=0.00001$ ), apoyado en la idea de que el Ca<sup>++</sup> está fuertemente asociado con la activación de la cadmodulina

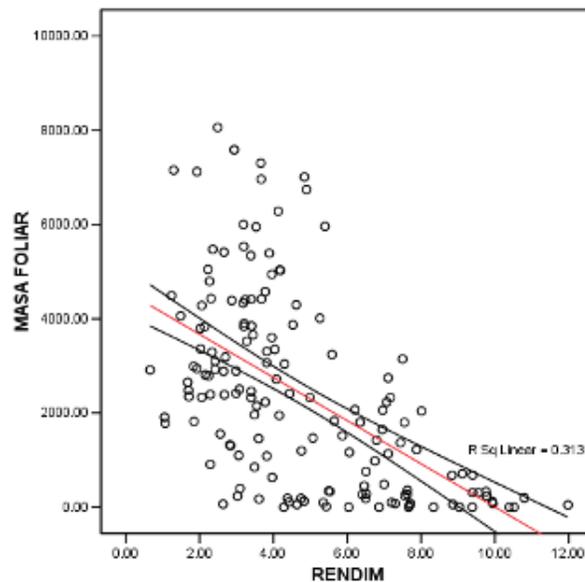
responsable de activar varias enzimas del metabolismo que están relacionadas con la síntesis de los compuestos analizados; mientras el  $K^+$  que es un importante activador de muchas enzimas esenciales en la fotosíntesis y la respiración, además de su importancia en el potencial osmótico de las células, son elementos que están fuertemente relacionados con las rutas metabólicas de producción de los metabolitos secundarios. La fracción hexánica de *C. brasiliense* no mostró una variación importante en el contenido de los metabolitos secundarios entre las dos localidades y los dos quimiotipos (Salisbury y Ross, 1992; Bruneton, 2001; Oksman e Inzé, 2004).

Los rendimientos de los tratamientos en comparación con los árboles silvestres (gráfico 11), mostró que hay diferencias significativas del tratamiento de deficiencia en potasio de las dos localidades contra los individuos silvestres del Qtp2. No se encontraron diferencias significativas entre los arboles silvestres del Qtp1 y el Qtp2 (gráfico 11).



**Gráfico 11. Rendimientos de la fracción hexánica de los extractos de las plántulas en tratamiento nutricional y de árboles silvestres.**

Se hizo una correlación entre la masa foliar de los tres tratamientos nutricionales y los rendimientos de sus extractos (gráfico 12). Se encontró que hay una correlación negativa ( $R = -0.559$   $p < 0.05$ ) entre la masa foliar y el rendimiento, indicando que a mayor contenido de masa foliar menor será el rendimiento de extracto (tabla 13). Esto podría sugerir que las plántulas con todos los nutrientes están movilizandolos mismos hacia el metabolismo primario para crecer más rápido y distribuyendo pocos recursos hacia el metabolismo secundario. Mientras las plántulas que se desarrollan con deficiencias en calcio y potasio están transfiriendo más recursos a la producción de metabolitos secundarios y menos recursos para el crecimiento.



**Gráfico 12. Correlación entre la masa foliar y el rendimiento de los extractos.**

**Tabla 13. Correlación entre la masa foliar y el rendimiento de los extractos.**

		Masa Foliar	Rendimiento
Masa Foliar	Correlación Pearson	1	-0.559**
	Sig. (2-colas)	.	0.000
	N	156	156
Rendimiento	Correlación Pearson	-0.559**	1
	Sig. (2-colas)	0.000	.
	N	156	156

\*\* La correlación es significativa al nivel de 0.01 (2 colas).

## 7.10. Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR<sup>5</sup>)

### Árboles Silvestres.

Se analizaron en CCF y CLAR la química de la fracción hexánica de 10 individuos, solamente 3 corresponden al Qtp1 y provienen de la localidad de Benigno Mendoza (BM), los otros 6 individuos corresponden al Qtp2 y provienen de las localidades de Benigno Mendoza, Tecuanapa (Tecua) y San Andrés Tuxtla (Tuxtlas) (tabla 14).

Los árboles Qtp1 de BM presentaron un pico con tiempo de retención igual al del ácido apetalico, lo cual sugiere que este quimiotipo también lo sintetiza en muy bajas concentraciones (0.4 – 0.5 mg/g de hoja), pero no ha sido aislado en estudios previos (Reyes-Chilpa *et al*, 2004). Alternativamente podría tratarse de una cumarina que también presenta un pico de absorción máximo en 285 nm (figura 16; patrones A, E, F).

Los árboles Qtp2 de BM presentan ácido apetalico, calanólido B y trazas de calanólido C (figura 16; patrón B).

El árbol progenitor de Tecua presenta ácido apetalico y calanólido B en pequeñas cantidades comparado con el Qtp2 de BM y calanólido C en altas concentraciones comparado con el Qtp2 de BM (figura 16; patrones G y H).

El árbol de los Tuxtlas presenta ácido apetalico y trazas de calanólido B (figura 16; patrón I).

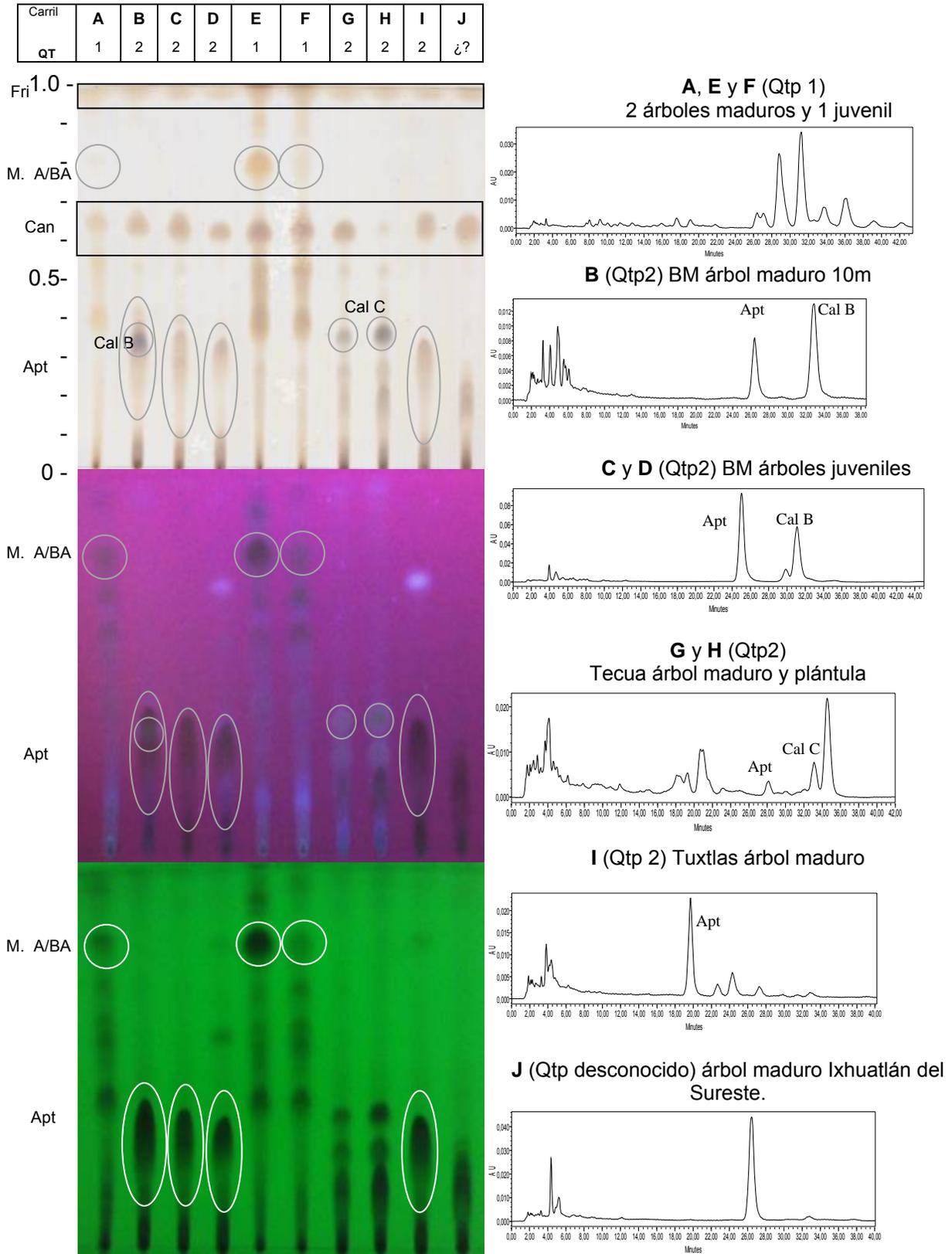
El árbol silvestre de la localidad de Ixhuatlan del Sureste, fue descartado porque se desconoce la química de esta población (figura 16; patrón H).

---

<sup>5</sup> Límites de cuantificación y de detección del equipo de CLAR.

Compuesto	Límite de Cuantificación (µg)	Límite de Detección (ng)
Ácido apetalico	0.25	25
Calanólido B	3.27	327
Calanólido C	0.93	93

**Figura 16. Patrones cromatográficos de los quimiotipos (QT) de árboles silvestres (A – J) analizadas por CCF y CLAR.** Apt: ácido apetalico, Cal B: calanólido B, Cal C: calanólido C, Fri: Friedelina, Can: Canofilol, M. A/BA: Mammea A/BA. Picos sin nombre: compuestos no identificados.



#### Plántulas cultivadas en solución completa.

Todas las plántulas analizadas son de BM (Qtp 2), y mostraron tener un menor rendimiento de ácido apetalico y de calanólido B que el árbol padre o progenitor, pero algunos individuos mostraron tener mayor rendimiento de calanolido C que el árbol progenitor (tabla 14).

#### Plántulas cultivadas en –Ca.

Las plántulas analizadas fueron de BM (Qtp 2), y de Tecua (Qtp 2). Los resultados muestran que la deficiencia en calcio no afecta la biosíntesis de ácido apetalico, calanólido B y calanólido C, pero si afecta los rendimientos de cada uno en comparación con los individuos silvestres y los cultivados en solución completa (tabla 14). Se analizó una plántula de BM (Qtp1) –Ca y se encontró que este tratamiento no modificó la biosíntesis, ni el rendimiento en comparación con los silvestres.

#### Plántulas cultivadas en –K.

Las plántulas analizadas son de BM (Qtp1) y se observó que el tratamiento no modificó la biosíntesis, ni el rendimiento en comparación con los árboles silvestres, ni con la plántula (Qtp1) cultivada en –Ca (tabla 14).

#### Plántulas cultivadas con H<sub>2</sub>O desionizada.

Las plántulas analizadas son de BM (Qtp 2), y de Tecua (Qtp 2), estas plántulas crecieron por los nutrientes que les proveía la semilla, y los resultados muestran que la deficiencia de todos los nutrientes no afectó la biosíntesis de ácido apetalico, calanólido B y calanólido C, aunque los rendimientos son menores a los del árbol progenitor (tabla 14).

**Tabla 14. Resultados de CLAR de Apt, Cal B y Cal C de las muestras analizadas.**

Loc.	Tratamiento	No reg	Qtp	Apt (mg/g)	Cal B (mg/g)	Cal C (mg/g)	Proporciones			
							CalB/Apt	CalC/Apt	CalC/Cal B	CalB+Cal C/Apt
BM	Silvestre	Padre	2	9.83	4.87	(ILD)	0.50	0.00	0.00	0.50
Tuxtias	Silvestre	-	2	4.62	(ILD)	(ILD)	0.00	0.00	0.00	0.00
BM	Silvestre	-	2	3.89	0.86	(ILD)	0.22	0.00	0.00	0.22
BM	Silvestre	-	2	0.70	0.55	(ILD)	0.80	0.00	0.00	0.80
Tecua	Silvestre	Padre	2	0.30	0.11	1.21	0.36	3.97	11.13	4.33
Tecua	Silvestre	-	2	(ILD)	(ILD)	0.31	0.00	0.00	0.00	0.00
BM	Silvestre	Padre	1	0.52	(ILD)	(ILD)	0.00	0.00	0.00	0.00
BM	Silvestre	-	1	0.47	(ILD)	(ILD)	0.00	0.00	0.00	0.00
BM	Silvestre	-	1	0.45	(ILD)	(ILD)	0.00	0.00	0.00	0.00
BM	Sol. Comp	10	2	7.86	1.55	(ILD)	0.20	0.00	0.00	0.20
BM	Sol. Comp	28	2	5.96	2.17	(ILD)	0.36	0.00	0.00	0.36
BM	Sol. Comp	11	2	3.32	3.21	(ILD)	0.97	0.00	0.00	0.97
BM	Sol. Comp	30	2	2.83	1.70	(ILD)	0.60	0.00	0.00	0.60
BM	Sol. Comp	2	2	2.67	2.52	(ILD)	0.94	0.00	0.00	0.94
BM	Sol. Comp	32	2	1.04	2.38	(ILD)	2.30	0.00	0.00	2.30
BM	Sol. Comp	29	2	0.98	3.60	(ILD)	3.69	0.00	0.00	3.69
BM	Sol. Comp	9	2	0.79	1.51	(ILD)	1.90	0.00	0.00	1.90
BM	Sol. Comp	8	2	0.66	0.82	(ILD)	1.25	0.00	0.00	1.25
BM	Sol. Comp	17	2	0.52	0.49	(ILD)	0.94	0.00	0.00	0.94
BM	Sol. Comp	20	2	0.27	(ILC)	(ILD)	-	0.00	-	-
BM	Sol. Comp	33	2	0.09	0.07	0.26	0.73	2.80	3.83	3.53
BM	Def. Ca	79	2	3.23	1.35	(ILD)	0.42	0.00	0.00	0.42
BM	Def. Ca	44	2	0.81	2.16	(ILD)	2.67	0.00	0.00	2.67
BM	Def. Ca	119	1	(ILD)	(ILD)	(ILD)	0.00	0.00	0.00	-
Tecua	Def. Ca	108	2	2.36	1.12	(ILD)	0.47	0.00	0.00	0.47
Tecua	Def. Ca	161	2	0.98	(ILD)	(ILD)	-	0.00	-	-
Tecua	Def. Ca	154	2	0.83	0.14	(ILD)	0.17	0.00	0.00	0.17
Tecua	Def. Ca	104	2	(ILD)	(ILD)	0.18	-	-	-	-
Tecua	Def. Ca	106	2	(ILD)	(ILD)	0.19	-	-	-	-
BM	Def. K	122	1	1.01	(ILD)	(ILD)	-	-	-	-
BM	Def. K	97	1	(ILD)	(ILD)	(ILD)	-	-	-	-
BM	Def. K	102	1	(ILD)	(ILD)	(ILD)	-	-	-	-
Tecua	H2O	133	2	18.72	8.99	(ILD)	0.48	0.00	0.00	0.48
Tecua	H2O	108	2	18.72	10.91	(ILD)	0.58	0.00	0.00	0.58
Tecua	H2O	146	2	11.17	5.43	(ILD)	0.49	0.00	0.00	0.49
Tecua	H2O	160	2	7.50	7.28	(ILD)	0.97	0.00	0.00	0.97
Tecua	H2O	154	2	2.78	4.20	(ILD)	1.51	0.00	0.00	1.51
Tecua	H2O	158	2	1.14	0.73	1.33	0.64	1.17	1.81	1.81
Tecua	H2O	129	2	0.65	0.58	0.12	0.89	0.19	0.21	1.08
Tecua	H2O	130	2	0.62	0.74	2.10	1.20	3.41	2.85	4.61
Tecua	H2O	138	2	0.45	0.19	0.28	0.41	0.61	1.48	1.02
Tecua	H2O	104	2	0.45	0.32	0.16	0.72	0.37	0.51	1.08
Tecua	H2O	106	2	(ILD)	0.69	0.23	-	-	0.33	-
Tecua	H2O	122	2	(ILD)	(ILD)	0.58	-	-	-	-
BM	H2O	44	2	0.79	0.86	(ILD)	1.08	0.00	0.00	1.08
BM	H2O	79	2	0.29	0.00	(ILD)	-	0.00	-	-
BM	H2O	119	1	(ILD)	(ILD)	(ILD)	-	-	-	-

Los patrones cromatográficos observados por CCF y la cuantificación estimada por CLAR (en mg/g hoja peso seco) mostraron que los árboles silvestres presentaban una gran variabilidad en su contenido de ácido apetalico (0 a 9.8) calanólido B (0 a 4.8) y calanólido C (0.31 a 1.21). Resultados similares se observaron con las plántulas control: ácido apetalico (0 a 7.8) calanólido B (0.07 a 3.6) y calanólido C (0 a 0.26). La deficiencia de  $\text{Ca}^{2+}$  ocasionó una fuerte disminución en el rendimiento de ácido apetalico (0 a 3.2), calanólido B (0 a 2.16) y calanólido C (0 a 0.19). Sin embargo, la prueba estadística de Kruskal-Wallis y de ANADEVa (tabla 15) con un  $\alpha=0.05$  muestra que solo hay diferencias significativas entre la cuantificación de calanólido B de las plántulas bajo los tratamientos y los silvestres, pero no para la cuantificación del ácido apetalico y de calanólido C.

Se acepta la hipótesis nula asumiendo el error de tipo II, algo cierto se acepta como falso, debido a que los resultados muestran una variabilidad muy grande que provoca que los intervalos de confianza sean grandes y no permitan observar las diferencias entre los tratamientos y los árboles silvestres que presentan promedios (rangos en Kruskal-Wallis) iguales a cero de los que son diferentes de cero.

**Tabla 15. Pruebas de Kruskal-Wallis y ANADEVa para CLAR.**

	Kruskal-Wallis		ANDeVa	
	KW-H(5.49)	p	F(5.43)	p
Cuantificación Apt	= 4.5724	= 0.4702	= 0.8107	= 0.5486
Cuantificación Cal B	= 16.1081	= 0.0065	= 1.3389	= 0.2668
Cuantificación Cal C	= 8.1688	= 0.1472	= 1.13	= 0.3591

Todas las plántulas de BM y Tecua cultivadas en  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada, son las mismas plántulas que las deficientes en calcio y es importante aclarar que las mismas plántulas entre los dos estados nutricionales no muestran una diferencia en la composición de

ácido apetalico, calanólido B y calanólido C, aunque la cuantificación de cada uno de los metabolitos son menores bajo deficiencia en calcio, que con agua desionizada.

Los patrones cromatográficos del quimiotipo 2 obtenidos por CCF y corroborados por CLAR de las localidades de Benigno Mendoza, Tecuanapa y San Andrés Tuxtla están presentes tanto en las plántulas de Benigno Mendoza, como en las plántulas de Tecuanapa<sup>6</sup>, lo que sugiere que existe un flujo de genes que los agrupa en una misma población generando un pool genético. Contrario a lo que se describe en la literatura respecto al quimiotipo 2 (Aranda, 2006; Souza *et al.*, 2007), abriendo la posibilidad de que las poblaciones de *C. brasiliense* del Qtp2 permanezcan comunicadas aún por los polinizadores y dispersores de frutos, lo que disminuye la endogamia, a pesar de la fragmentación de la selva tropical de los Tuxtlas, no así la población del Qtp1 muestra una distribución geográfica pobre (Aranda, 2006; Aguilar-Bañuelos, 2005) y una baja proporción de estas plántulas obtenidas para este estudio.

Los cocientes de proporcionalidad entre el ácido apetalico contra el calanólido B y el ácido apetalico contra el calanólido C en las plántulas y en los árboles silvestres son muy variables (desde cero, hasta valores similares a los del árbol progenitor), lo cual sugiere que la biosíntesis de los calanólidos B y C es independiente de la biosíntesis del ácido apetalico, encontrando 3 plántulas<sup>7</sup> con patrones cromatográficos que carecían de ácido apetalico, y no así poseían alguno de los dos calanólidos. Este fenómeno se encuentra reflejado en estudios previos (Huerta-Reyes *et al.*, 2004) donde mencionan que a partir de un preparado de 945.5 g (peso seco) de hojas de *C. brasiliense* se obtuvo un concentrado hexánico de 32 g de los cuales tras una serie de procesos de

---

<sup>6</sup> Vease los patrones cromatográficos de CCF y de CLAR en los Anexos II y III.

<sup>7</sup> Una plántula silvestre y dos plántulas cultivadas en agua desionizada de Tecuanapa.

purificación se obtuvieron 0.54 mg/g de ácido apetalico, 0.09 mg/g de (-) calanólido B y 0.03 mg/g de (+) calanólido C. Mientras que Aguilar-Bañuelos (2005) describe la obtención de 10.04 g de ácido apetalico (sustancia aceitosa de color ámbar) con trazas de isoapetalico de 41.42 g de extracto hexánico inicial, obtenido de 1000 g de hoja seca del quimiotipo 2 de *C. brasiliense* que equivale a una productividad de 10.04mg/g de hoja. Los dos trabajos muestran una fuerte diferencia entre la productividad de ácido apetalico, sugiriendo que está asociado a material vegetal proveniente de diferentes individuos, lo que da un mayor fundamento a los resultados de este trabajo.

Los tratamientos nutricionales elegidos no se cuantifico ácido apetalico, calanólido B o calanólido C que fueran superiores estadísticamente a los árboles silvestres del Qtp2.

En ningún caso se ha encontrado que los cromatogramas de CLAR presenten incongruencias con los cromatogramas de CCF elaborados previamente.

Los resultados sugieren que el factor nutricional no es la causa de la existencia de los dos quimiotipos, y es muy probable que la causa de la existencia de las dos poblaciones sea el factor genético. Esta afirmación esta basada no solamente en los resultados obtenidos de las plántulas cultivadas en el invernadero presentadas anteriormente, sino también por el descubrimiento en campo de dos ejemplares adultos de *C. brasiliense*, uno de ellos perteneciente al quimiotipo 1 (árbol progenitor de 30 metros de altura) y el otro al quimiotipo 2 (árbol de 10 metros de altura) a menos de 2 metros de distancia uno del otro y ubicados dentro del mismo fragmento de vegetación en la localidad de Benigno Mendoza, lo que explica la razón por la cual aparecieron plántulas de los dos quimiotipos en casi todos los tratamientos de la localidad de Benigno Mendoza, y porque se obtuvieron el doble de semillas que en la localidad de Tecuanapa.

En la literatura se mencionan que la cantidad y calidad de compuestos defensivos parecen estar genéticamente controlados por un pequeño número de locus, pero asume que puede haber algunos efectos modificadores del ambiente, tal es el caso de diferencias composicionales en la resina de las hojas de la leguminosa arborea tropical *Hymenaea courbaril* que no son debido a los efectos del fotoperíodo, a la temperatura o a la humedad (Denno y McClure, 1983). Experimentos bajo condiciones controladas y estudios de hibridación muestran que la composición de monoterpenoides de la planta *Satujera douglasii* es genéticamente controlado. Sin embargo la cantidad de monoterpenoides ha sido correlacionado con la intensidad de luz, la temperatura y la humedad. El crecimiento de poblaciones de helechos a sol abierto contiene altas concentraciones de compuestos cianogénicos y taninos, comparado con las poblaciones sombreadas. Además, la concentración de taninos en helechos esta influenciado por la disponibilidad de humedad en el ambiente (Denno y McClure, 1983). Factores abióticos como las concentraciones de gases, la temperatura<sup>8</sup>, la cantidad y calidad de la luz y la humedad del aire son variables que no pudieron ser controladas en este estudio. No obstante, todás las plántulas cultivadas y sin importar el tipo de tratamiento al que fueron sometidas estuvieron bajo la misma variación de condiciones. Los factores bióticos tampoco parece que sean la causa de la existencia de los quimiotipos 1 y 2, ya que la influencia de organismos simbioses, de parásitos y de herbívoros <sup>9</sup>, sobre las plántulas cultivadas fue muy pobre y débil, debido a que crecieron sobre un sustrato inerte (vermiculita), fueron regadas con soluciones nutritivas

---

<sup>8</sup> Las variaciones max-min de temperatura del invernadero están disponibles en el Anexo I.

<sup>9</sup> El factor biótico relacionado con parásitos del tipo de los virus, viroides, bacterias o protistas que sean intracelulares no pueden ser descartados, ya que son factores que no podían ser controlados en este estudio. Sin embargo ninguna de las plántulas que fueron cultivadas durante el estudio mostraron deficiencias o síntomas asociadas a este tipo de organismos.

elaboradas con sales grado reactivo en agua desionizada a pH 6.5, en invernadero y protegidas con una cubierta plástica para impedir el ingreso del polvo, esporas y animales nocivos provenientes del exterior.

Las plántulas obtenidas de las semillas colectadas en la localidad de Tecuanapa muestran un patrón cromatográfico muy peculiar en el que los componentes mayoritarios coinciden con el factor de retención, el color y las características de las dipiranocumarinas (calanolido A, B, C y sulatrolido) descritas en individuos del género *Calophyllum* (Huerta-Reyes *et al.*, 2004) y que fueron corroboradas por CLAR.

## CONCLUSIONES.

Con los resultados obtenidos y las observaciones de campo se concluye:

- Se confirma que las semillas de *C. brasiliense* son recalcitrantes.
- Las plántulas del Qtp 1 mostraron una menor tasa de sobrevivencia en comparación con las del Qtp 2 lo que explicaría de alguna manera la distribución tan aislada de esta población.
- Las plántulas obtenidas de Tecuanapa mostraron como componentes mayoritarios dipiranocumarinas (como el calanólido B y C) previamente descritas en individuos del género *Calophyllum*.
- La cuantificación de Ácido apetalico, Calanólido B y Calanólido C de las plántulas cultivadas en los diferentes tratamientos no mostraron ser superiores a la de los árboles silvestres.
- Se reveló la existencia de 3 fenotipos químicos en la población del quimiotipo 2 de las localidades de Benigno Mendoza, Tecuanapa y San Andrés Tuxtla a través de los patrones cromatográficos obtenidos por CCF y corroborados por CLAR, a saber: 1) ácido apetalico + calanólidos, 2) solo ácido apetalico, y 3) solo calanólidos.
- Se concluye que el factor nutricional no es la causa de la existencia de los quimiotipos 1 y 2 en poblaciones de *C. brasiliense*.
- Se sugiere que la existencia de las dos poblaciones (Qtp's) es consecuencia principalmente del factor genético, lo cual plantea la hipótesis de que los dos quimiotipos sean en realidad dos poblaciones de la misma especie en un proceso de divergencia evolutiva.

## LITERATURA CITADA.

1. Aguilar-Bañuelos. 2005. Efecto de los metabolitos secundarios de *Calophyllum brasiliense* en los hongos colonizadores de las hojas: Estudio *in vitro*. Tesis profesional. Facultad de Ciencias. UNAM. México D.F. 63 p.
2. Aranda. I. 2006. Contribución al conocimiento taxonómico del género *Calophyllum* (Guttiferae): Quimiotipos de *C. rekoii* Standl. y *C. brasiliense* Cambess. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias UNAM. México D.F. 56 p.
3. Braga, C; Serra, P; Viana, S; Oliveira, B; Cortes, F; Lombardi, A. 2007. Angiotensin-converting enzyme inhibition by Brazilian plants. *Fitoterapia*, 78 (5): 353-8
4. Boeger, M. y C, Wisniewski. 2002. Leaf structure and nutrient contents of six tree species from different successional stages at coastal plain from Parana State, Brazil. *Iheringia, Serie Botanica*, 57 (2): 243-262
5. Boeger, M. y C, Wisniewski. 2003. Comparação da morfologia foliar de espécies arbóreas de três estádios sucessionais distintos de floresta ombrófila densa (Floresta Atlântica) no Sul do Brasil. *Revista Brasil. Bot.*, 26 (1): 61-72
6. Botrel, G; Souza, M; Carvalho, D; Pinto, C; Moura, M; Estopa, A. 2006. Genetic characterization of *Calophyllum brasiliense* Camb. in two populations of riparian forest. *Revista Arvore*, 30 (5): 821-827
7. Bouyoucos, G. 1951. A recalibration of the hydrometer method for making mechanical analysis of solis. *Agronomy Journal*, 43: 435-438
8. Brenzan, A; Nakamura, V; Prado, B; Ueda-Nakamura, T; Young, M; Aparicio, D. 2007. Activity of crude extract and coumarin from *Calophyllum brasiliense* leaves against *Leishmania amazonensis*. *Parasitology research*, 101 (3): 715-22
9. Bruneton, J. 2001. Farmacognosia, Fitoquímica de Plantas Medicinales. 2 edición. ACRIBIA, S.A. Zaragoza España. 1099 pp.
10. Butler, Mark S. 2005. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. *Natural Products Rep.*, 22: 162 – 195.
11. Butterfield, P. y M, Espinoza. 1995. Screening trial of 14 tropical hardwoods with an emphasis on species native to Costa Rica: fourth year results. *New forests*, 9 (2): 135-145

12. Byard, R; Lewis, C y M, Florencia. 1996. Leaf litter decomposition and mulch performance from mixed and monospecific plantations of native tree species in Costa Rica. *Agriculture Ecosystems and Environment*, 58 (2-3): 145-155
13. Cabello-Hurtado, F; Durst, F; Jorrín, J y Werck-Reichhart, D. 1998. Coumarins in *Helianthus tuberosus*, characterization induced accumulation and biosynthesis. *Phytochemistry*, 38 (3): 918-925
14. Calvo-Alvarado, C; Arias, D y Richter D. 2007. Early growth performance of native and introduced fast growing tree species in wet to sub-humid climates of the Southern region of Costa Rica. *Forest Ecology and Management* 242 (2-3): 227-235
15. Cano, Z. 1987. Ecología de la relación entre *Wigandia Urens* y sus herbívoros. *Tesis profesional. Facultad de Ciencias. UNAM. México D.F.* 60 p.
16. Carter, L; Jones, C; Mauldin, K y De Camargo, R. 1983. Responses of coptotermes-formosanus to extracts from 5 brazilian plants. *Zeitschrift fuer Angewandte Entomologie* 95 (1): 5-14
17. Carvalho, R. de; Silva, A. da; Davide, C. 2006. Storage behaviour of forest seeds. *Revista Brasileira de Sementes*, 28 (2): 15-25
18. Casasola Diaz, C.R. 1988. Anatomy and physical wood properties of the species *Calophyllum brasiliense* Camb. St. Hil., *Vochysia hondurensis* Sprague and *Symphonia globulifera* L. Thesis Degree: Tesis (Ing. Agr.) Guatemala (Guatemala), 36 p.
19. Chang-Ri, H; Song X-P y Chen, G-Y. 2003. Advances in the studies on Chemicals components of *Calophyllum* and related Pharmacological activities. *Chinese Journal of Organic Chemistry*, 23 (2): 212 – 219.
20. Cheng, K., y Bray, R. 1951. Determination of calcium and magnesium in soil and plant material. *Soil Science*, 72: 229-258
21. Coccoidea new to Puerto Rico. 1978. *Cooperative Plant Pest Report vol. 3 (1/4): p.11*
22. Cottiglia, F; Dhanapal, B; Sticher, O. y Heilmann, J. 2004. New chromanone acids with antibacterial activity from *Calophyllum brasiliense*. *Journal of natural products*, 67 (4): 537-41
23. Crandall, B. 1949. An epidemic vascular wilt disease of Barillo (*Calophyllum brasiliense* var. *rekoj*), in El Salvador. *Plant Disease Reporter*, 33 (12): 463-465
24. Cronin G. y M. E. Hay. 1996a. Amphipod grazing induces chemical defenses in the brown alga *Dictyota menstrualis*. *Ecology* 77: 2287-2301.

25. Cronin, G. y M. E. Hay. 1996b. Seaweed-herbivore interactions depend on recent history of both the plant and animal. *Ecology* 77: 1531-1543.
26. Cronin, G. y M. E. Hay. 1996c. Within-plant variation in seaweed palatability and chemical defenses: Optimal defense theory versus the growth-differentiation balance hypothesis. *Oecologia* 105: 361-368.
27. Da Silva, K; Dos Santos, S; Mattos, P; Yunes, R; Delle-Monache, F. y Cechinel V. 2001. Chemical composition and analgesic activity of *Calophyllum brasiliense* leaves. *Therapie*, 56 (4): 431-434
28. De Carvalho L; A. Amaral y C. Davide. 2006. Classificação De Sementes Florestais Quanto Ao Comportamento No Armazenamento. *Revista Brasileira de Sementes*, 28 ( 2): 15-25
29. Denno, R. y M. McClure. 1983. Variable Plants and Herbivores in Natural and Managed Systems  
Academic Press. Nueva York.
30. De Sousa, R. 2008. Híbridos inorgânico-orgânicos de vermiculita e aminas alifáticas cíclicas e acíclicas - adsorção e calorimetria. Dissertação de mestrado. Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal da Paraíba
31. Emendörfer Fernanda, Fabiane Emendörfer, Fernanda Bellato, Vânia F. Noldin, Rivaldo Niero, Valdir Cechinel-Filho. 2005. Evaluation of the relaxant action of some Brazilian medicinal plants in isolated guinea-pig ileum and rat duodenum. *J Pharm Pharmaceut Sci*, 8 (1): 63-68
32. Fernández, Gladis y Myrna Johnson. 1986. Fisiología Vegetal Experimental. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). San José, Costa Rica. 397 p.
33. Fischer, E. y F. Dos Santos. 2001. Demography, phenology and sex of *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae) trees in the Atlantic forest. *Journal of Tropical Ecology*, 17 ( 6 ): 903-909
34. Gasparotto A. Jr, A. Mislaine, A. Brenzan, I. Piloto, D. Garcia, C. Nakamura, B. Prado, E. Rodrigues y A. Ferreira. 2005. Estudo Fitoquímico E Avaliação Da Atividade Moluscicida Do *Calophyllum brasiliense* Camb (Clusiaceae). *Quim. Nova*, 28, (4): 575-578
35. Gautier J., Cave., Kunesh G., y Polonsky J. 1972. On the biosíntesis of Neoflavonoids. *Experimentia*, 28 (7): 759-761

36. Guevara, S., J. Laborde y G. Sánchez-Ríos. 2006. Los Tuxtlas, el paisaje de la sierra. *Instituto de Ecología, A.C. México*. 288 pp.
37. Gomes da S. Junior, U; Flávia de Medeiros Aquino; Cybelle Costa. 2007. Hidrofobização de vermiculita a partir de gordura vegetal. II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica Paraíba . João Pessoa - 2007
38. González, E. y Quiros, G. 1993. Germination of seeds from twelve tree species of tropical rain forests. *Brenesia* 39(40): 119-124
39. Hanada R., C. Sales-Campos, L. Abreu y L. Penning. 2003. Fungos Emboloradores E Manchadores De Madeira Em Toras Estocadas Em Indústrias Madeireiras No Município De Manaus, Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica* 33(3): 483-488
40. Huerta-Reyes M. 2004. Evaluación de la Actividad Inhibitoria de Metabolitos Secundarios de Clusiaceae Mexicanas sobre el VIH-1. Tesis de doctorado en Ciencias Biomédicas UNAM. 208pp.
41. Huerta-Reyes M; Basualdo M; Lozada L; Jimenez-Estrada M; Soler C; Reyes-Chilpa R. 2004. HIV-1 inhibition by extracts of Clusiaceae species from Mexico. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 27 (6): 916-20
42. Huerta, M., M. Basualdo., A. Fimiko., M. Jiménez., C. Soler y R. Reyes. 2004. HIV-1 Inhibitory Compounds from *Calophyllum brasiliense* Leaves. *Biol. Pharm. Bull.* 27(9): 1471 – 1475.
43. Isaias, D; Niero, R; Noldin, V; Campos-Buzzi, F y Cechinel, V. 2004. Pharmacological and phytochemical investigations of different parts of *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae). *Pharmazie* 59 (11): 879-881
44. Ito, C; Murata, T; Itoigawa, M; Nakao, K y Furukawa, H. 2006. Apoptosis inducing activity of 4-substituted coumarins from *Calophyllum brasiliense* in human leukaemia hl-60 cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58 (7): 975-980
45. Jackson, M. 1958. Soil Chemical Analysis, 2nd Ed. Englewood Cliffs, N. J. Prentice, 183-185.
46. Jackson, M. 1970. Análisis Químico de Suelos. Ed. Omega. Barcelona, España. 662 p.
47. Junior G; Ferreira P; Nakamura V; Filho D; Jacomassi E; Young M y Cortez D. 2005. Estudo morfo-anatômico das folhas e caule da *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae), uma contribuição ao estudo farmacognóstico da droga vegetal. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 24 (3): 371-376

48. Kosuke, K., B. Shimizu, M. Mizutani, K. Watanabe y K. Sakata. 2006. Accumulation of coumarins in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 67: 379–386
49. Kashman, Y., K. Gustafson, R. Fuller, J. Cardelina II, J. McMohan, M. Currense, R. Buckheit Jr, S. Hughes, G. Cragg y M. Boyd. 1992. The Calanolides, a novel HIV-inhibitory class of coumarin derivatives from tropical rainforest tree, *Calophyllum lanigerum*. *J. Med. Chem.* 35, 2735 – 2743.
50. Kawaguici, C. B.; Kageyama, P. y. 2001. Genetic diversity of three groups of individuals (adults, young and seedlings) of *Calophyllum brasiliense* in a population of gallery forest. *Scientia Forestalis* (59): 131-143
51. Kimura, S., Ito C., Jyoko N., Segawa H., Kuroda J., Okada M., Adachi S., Nakahata T., Yuasa T., Cechinel V., Furukawa H. y Maekawa T. 2005. Inhibition of leukemic cell growth by a novel anti-cancer drug (GUT-70) from *Calophyllum brasiliense* that acts by induction of apoptosis. *International journal of cancer*, 113 (1): 158-165
52. King, R. 2003-A. Seed dispersal by bats and the population dynamics of a canopy tree, *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae), in an Amazonian river meander forest. *Dissertations Abstracts International* 6405B. 110 p.
53. King, R. 2003-B. Succession and Micro-elevation Effects on Seedling establishment of *Calophyllum brasiliense* Camb. (Clusiaceae) in an Amazonian River Meander forest. *Biotropica* 35(4): 462-471.
54. Kiran D., J. Swati, R. Sunil, R. Shubhada. 2007. Pattern of anti-HIV dipyrancoumarin expression in callus cultures of *Calophyllum inophyllum* Linn. *Journal of Biotechnology*, 130: 346–353
55. Kostova, Irene. 2006. Coumarins as Inhibitors of HIV Reverse Transcriptase. *Current HIV Research*, (4): 347-363
56. Kosuke K., B. Shimizu, M. Mizutani, K. Watanabe y K. Sakata. 2006. Accumulation of coumarins in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, 67: 379–386
57. Lines, K; Herrera, J. y Vásquez, W. 2006. Estudio de la germinación y la conservación de semillas de cedro maría (*Calophyllum brasiliense*). *Tecnología en Marcha*, 19-1.
58. MacDougall, A. y Kellman, M. 1992. The understorey light regime and patterns of tree seedlings in tropical riparian forest patches. *Journal of Biogeography*, 19 (6): 667-675
59. McKee C., C. Covington, R. Fuller, H. Bokesch, S. Young, J. Cardellina II, M. Kadushin, D. Soejarto, P. Stevens, G. Cragg, y M. Boyd. 1998. Pyranocoumarins

- from Tropical Species of the Genus *Calophyllum*: A Chemotaxonomic Study of Extracts in the National Cancer Institute Collection. *J. Nat. Prod*, 61: 1252-1256
60. Marques, M. y C. Joly. 2000-A. Population structure and dynamics of *Calophyllum brasiliense* Camb. in a swamp forest. *Revista Brasileira de Botanica*, 23 (1): 107-112
61. Marques, M. y C. Joly. 2000-B. Seed germination and growth of *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae), a typical species of flooded forests. *Acta Botanica Brasílica*, 14 (1): 113-120
62. Martínez-Sánchez, J. 2006. Pasture tree in tropical México: the effect of soil nutrients on seedling growth. *Rev. Biol. Trop.*, 54 (2): 363 – 370.
63. Massimo C., Giancarlo C., Francesco E., y G. Giannone. 2006. Chemistry and Biological Activity of Natural and Synthetic Prenyloxycoumarins. *Current Medicinal Chemistry*, 13: 199-222
64. Mesía-Vela S, R. Sánchez, E. Estrada-Muñiz, D. Alavez-Solano, C. Torres-Sosa, M. Jiménez-Estrada, R. Reyes-Chilpa y F. Kauffman. 2001. Natural products isolated from Mexican medicinal plants: Novel inhibitors of sulfotransferases, SULT1A1 and SULT2A1. *Phytomedicine*, 8 (6): 481 – 488
65. Mundo, S. 2007. Caracteres Morfoanatômicos De Folha E Caule De Espécies Brasileiras De Uso Medicinal: *Calophyllum brasiliense* Cambess. (Clusiaceae), *Cupania vernalis* Cambess. (Sapindaceae) e *Lafoensia pacari* A. ST.-HIL. (Lythraceae). CURITIBA. Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná. Brasil.
66. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. Publicada el Miércoles 6 de marzo de 2002
67. Oksman-Caldentey K. y D. Inze. 2004. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *TRENDS in Plant Science*, 9 (9): 433-444
68. Oliveira-Roque F, T. Siquiera y S. Trivinho-Strixino. 2005. Ocurrence of chironomid larvae living inside fallen-fruits in atlantic forest streams, Brazil. *Entomol. Vect.* 12 (2): 275-282
69. Orozco, A. y C. Vásquez. 1982. Plants and fruit bat interactions in a tropical rain forest area, Southeastern Mexico. *Brenesia* 19/20: 137–149.
70. Oyama, K y F. Espinosa. 1986. Herbívoros y plantas ¿Cómo interactúan? *Ciencias* 9: 38-46.

71. Petit Bryan y Florencia Montagnini. 2004. Growth equations and rotation ages of ten native tree species in mixed and pure plantations in the humid neotropics. *Forest Ecology and Management* 199: 243–257
72. Plattner R; Spencer F; Weisleder D y Kleiman R. 1974. Chromanone acids in *Calophyllum brasiliense* seed oil. *Phytochemistry*, 13 ( 11 ): 2597-2602
73. Piotto D.; Montagnini F.; Ugalde L. y Kanninen M. 2003. Performance of forest plantations in small and medium-sized farms in the Atlantic lowlands of Costa Rica. *Forest Ecology and Management*, 175/1-3: 195-204
74. Porta Casanellas, Jaime., Marta López Acevedo Reguerín. y Carlos Roquero de Labaru. 1999. Edafología para la Agricultura y el Medio Ambiente. Ediciones Mundi – Prensa. Madrid España. 849 p.
75. Pratt, P. 1965. Methods of soil analysis. *American Society of Agronomy, Part 2: 1027-1028*
76. Pretto B; Cechinel-Filho V; Noldin F; Sartori K; Isaias B y Cruz B. 2004. Antimicrobial activity of fractions and compounds from *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae/Guttiferae). *Zeitschrift fuer Naturforschung Section C Journal of Biosciences*, 59 (9-10): 657-662
77. Pringle G; Alvarez-Loayza P y Terborgh J. 2007. Seed characteristics and susceptibility to pathogen attack in tree seeds of the Peruvian Amazon. *Ecology*, 193 ( 2 ): 211-222
78. Puebla-Olivares, F. y K. Winker. 2004. Dieta y dispersión de semillas por dos especies de Tangara (Habia) en dos tipos de vegetación en los Tuxtlas, Veracruz, México. *Ornitología Neotropical*, 15.
79. Ramoa A. y De A Rodrigues P C. 1977. Effect of an infusion of *Calophyllum brasiliense* on glycemia in rats. *Revista Brasileira de Biologia*, 37 (1): 147-150
80. Ramos A., y Monteiro M. 1998. Contributions to the production of native forest species: nursery studies of twelve cerrado species. *Boletim do Herbario Ezechias Paulo Heringer*, (2): 77-87
81. Rajarao T., De Oliveira, G y A. De Andrade. 2003. Modelamento geológico da jazida de vermiculita com programa datamine e sua aplicação na exploração, queimada nova-PI. *Revista de Geologia*, 16 (1): 85-94
82. Resende A; Furtini E. y Curi, N. 2002. Phosphorus extractants for forest species of different successional groups. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 33 ( 11/12 ): 1873-1885

83. Reyes-Chilpa, R.; Abe, F.; Maki, J.; Estrada-Muniz, E. y Huerta-Reyes, M. 2002. Trypanocidal activity and chemistry of several Guttiferae species from Mexico. *Bulletin of Central Research Institute Fukuoka University. Series E: Interdisciplinary Sciences*, (1): 157-165.
84. Reyes-Chilpa R.; Alavez-Solano D. y Estrada-Muniz E. 2006. Inhibition of gastric H SUP +,K SUP +-ATPase activity by flavonoids, coumarins and xanthonnes isolated from Mexican medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 105 (1-2): 167-172
85. Reyes-Chilpa, R., E. Estrada., T. Ramirez., B. Amecraz., A. Aumelas., C. Jankowski y M. Vázquez. 2004. Cytotoxic effects of mammea type coumarins from *Calophyllum brasiliense*. *Life Sciences*, (75): 1635-1647.
86. Reyes-Chilpa, R.; Jimenez-Estrada, M. y Estrada-Muniz, E. 1997. Antifungal xanthonnes from *Calophyllum brasiliensis* heartwood. *Journal of Chemical Ecology*, 23 ( 7): 1901-1911
87. Ribeiro A; Oliveira N; Guimaraes R. Jr y Jordano P. 2005. Size-based fruit selection of *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae) by bats of the genus *Artibeus* (Phyllostomidae) in a Restinga area, southeastern Brazil. *Acta chiropterologica*, 7 (1): 179-182
88. Robarge, W., Edwards, P., y Johnson, B. 1983. Water and waster analysis for nitrate via of salicylic acid. *Comm. Soil. Science Plant Anals*, (14): 1207-1215
89. Ruiz-Marcial, C; Chilpa, R. R; Estrada, E; Reyes-Esparza, J y Rodriguez-Fragoso, L. 2007. Anti proliferative, cytotoxic and antitumour activity of coumarins isolated from *Calophyllum brasiliense*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 59 (5): 719-725
90. Salisbury, F. y C. Ross. 1992. Fisiología Vegetal. Editorial Iberoamericana. México. 759 p.
91. Sartori, N., D. Capenelle., P. de Sousa Jr. y D. Martins. 1999. Gastroprotective effect from *Calophyllum brasiliense* Camb. Bark on experimental gastric lesions in rats and mice. *Journal of Ethnopharmacology*, (67): 149-156.
92. Stevens, P. F. 1980. A revision of the old world species of *Calophyllum* (Guttiferae). *Journal. Arnold Arb.*, (61): 117-171
93. Souza, M. de; Carvalho, D. de; Vieira, F.; Nascimento, L. y Lima, D. 2007. Genetic and spatial structure of natural populations of *Calophyllum brasiliense* Camb. in gallery forest. *Cerne Lavras*, 13 (3): 239-247

94. Stewart, R.; Joly, A. y Smirnoff, N. 1992. Partitioning of inorganic nitrogen assimilation between the roots and shoots of cerrado and forest trees of contrasting plant communities of south east Brasil. *Oecologia*, 91 (4): 511-517
95. Stout H.; Krahn M. y Breck D. 1968. *Calophyllum* products. II. Brasiliensic and inophylloidic acids. *Tetrahedron Letters*, (29): 3285-90
96. Urquhart, R. 2004. Flood-tolerance and flood-escape mechanisms for seeds and seedlings of common swamp trees of Central America. *Tropical Ecology*, 45 (2): 197-208
97. Vazquez L; Perez M; Rodriguez Z. y Marco A. 2003. List of Cuban scolytids (Coleoptera) of Cuba and their host plants. *Fitosanidad* 7(1): 17-21
98. Vasquez, W.; Thomsen, K. y Joker, D. 2005. Desiccation and storage of seeds of *Astronium graveolens* and *Calophyllum brasiliense*, two native species of Costa Rica. Book Title: Comparative storage biology of tropical tree seeds Editorial Rome, International Plant Genetic Resources Institute, 285-294p.
99. Vieira, R.; Feistauer, D.; Silva, P. da. 2003. Adaptation of native tree species submitted to extreme frost stress under an agrosilvicultural system in the Florianopolis Region. *Revista Arvore*, 27 (5): 627-634
100. Vilela de Resende, A. Furtini, N. Curi, J. Muniz y M. De Faria. 2000. Acúmulo E Eficiência Nutricional De Macronutrientes Por Espécies Florestais De Diferentes Grupos Sucessionais Em Resposta À Fertilização Fosfatada. *Ciênc. agrotec., Lavras*, 24(1): 160-173
101. Vozzo, A. 2003. Tropical Tree Seed Manual. Washington, DC. USDA *Agriculture Handbook. US Forest Service*, 864p.
102. Wightman E; Shear T. y Goldfarb B. 2001. Nursery and field establishment techniques to improve seedling growth of three Costa Rican. *Forests*, 22 (1-2): 75-96
103. Yasunaka K., F. Abe, A. Nagayama, H. Okabe, L. Lozada-Pérez, E. López-Villafranco, E. Estrada, A. Aguilar y R. Reyes-Chilpa. 2005. Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthones. *Journal of Ethnopharmacology*, (97): 293–299
104. Yang, H., B. Jiang, K. Reynertson, M. Basile, y E. Kennelly. 2006. Comparative Analyses of Bioactive Mammee Coumarins from Seven Parts of *Mammee americana* by CLAR-PDA with LC-MS. *Journal Agric. Food Chem.* (54): 4114-4120

105. Zangerl, A. y M. Berenbaum. 1987. Furanocoumarins in wild parsnip: Effects of photosynthetically active radiation, ultraviolet light and nutrients. *Ecology*, 68 (3): 516 – 520.
106. Zentsch, W. y Diaz, Y. 1977. Investigations on the germination of *Calophyllum brasiliense*. *Beitrage fur die Forstwirtschaft*, 11 (2): 73-74

### **Páginas de Internet.**

1. Gobierno del Estado de Veracruz. <http://portal.veracruz.gob.mx>. Revisada el 21 de abril de 2009.
2. CONABIO.  
[http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info\\_especies/arboles/doctos/24-gutti1m.pdf](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/24-gutti1m.pdf). Revisado el 30 de agosto de 2005.
3. Mapa de suelos de la región de los Tuxtlas.  
<http://galileo.inegi.gob.mx/website/mexico/viewer.htm>. Revisado el 20 de octubre de 2009.

**Anexos**  
**Especímenes de herbario.**  
**Soluciones Hidropónicas**  
**Temperaturas del Invernadero.**

**Datos obtenidos de:**

**MEXU Herbario Nacional del Instituto de Biología UNAM.**

**ENCB Herbario del Instituto Politécnico Nacional.**

**FCME Herbario de la Facultad de Ciencias UNAM.**

**IMSSM Herbario del Instituto Mexicano del Seguro Social.**

Jalisco. Herbario del MEXU – UNAM.

1. Faldas del cerro Huehuenton, a 33 Km al Norte de Chamela. Altitud 500m s.n.m. Fecha de colecta 18-enero-1974. Altura del árbol 25 metros.
2. Carretera Chamela- Puerto Vallarta “El Tuito” 20 – 25 Km antes de Puerto Vallarta. Altitud 780 m s.n.m. frutos y semillas (presentes). Fecha de colecta 24-noviembre-1976. Tipo de vegetación: B.P.Q. altura del árbol 6 – 7 metros.
3. Kilometro 11 de la brecha hacia la mina de Zimapan a partir de la carretera a Puerto Vallarta “El tuito”. Altitud 1130 m s.n.m. Frutos esféricos de color café (presentes). Fecha de colecta 12-octubre-1986. Abundancia: escasa en una cañada. Altura del árbol. 20 metros.
4. Talpa de Allende , Camino a la mina de cuale, 7.6 Km al este de la carretera a Puerto Vallarta-Barra de Navidad. Altitud 900 m s.n.m. Frutos viejos y cafés (presentes), Latéx amarillo. Fecha de colecta 30-mayo-1985. Tipo de vegetación: B.P.Q., Bosque mesófilo. Altura del árbol 20 metros. Toma de muestra para estudio químico del Dr. Ricardo Reyes 20-octubre-1999.
5. Se localiza en el Km 43 El Tuito – Puerto Vallarta. Fecha de colecta 16-diciembre-1970. Altura del árbol 12 metros.
6. Cabo corrientes 5 Km al norte del steep Rocky Valle y a 2 Km del Tuito. Altitud 650 m s.n.m. Fecha de colecta 17-diciembre-1970. Tipo de vegetación: Oak Pine Forest, Picus, Couepia in the stream valley. Árbol abundante en la zona. Altura del árbol 10 – 12 metros y diámetro de 30 centímetros.

Jalisco. Herbario de la ENCB del IPN.

7. Casimiro Castillo, 16 – 17Km al suroeste de Autlan . Altitud 400 – 450 m s.n.m. Flores blancas presentes. Fecha de colecta 14-julio-1988. Tipo de vegetación: Bosque tropical subperennifolio. Población abundante. Altura del árbol 20-25 metros. Coordenadas 19° 36´43” Norte y 104° 25´16” Oeste.
8. El tuito, Km 17 brecha el Tuito – Mina de Zimapan. Altitud 1100 m s.n.m. Botones florales presentes. Fecha de colecta 2-agosto-1989. Tipo de vegetación: BPQ con algunos elementos de bosque tropical. Población escasa. Altura del árbol 8 – 10 metros.
9. Tomatlán, a 2 Km al oeste del Cabrel. Altitud 400 m s.n.m. Frutos presentes color verde. Fecha de colecta 21-noviembre-1987. Tipo de vegetación: Bosque tropical Subcaducifolio, a la orilla del arroyo. Población escasa. Altura del árbol 6 metros.
10. El Tuito. Altitud 1200 m s.n.m. Frutos presentes. Fecha de colecta 28-diciembre-1971.
11. Carretera Chamela – Puerto Vallarta, El tuito 20 – 25Km antes de Puerto Vallarta. Altitud 780 m s.n.m. Fecha de colecta 24-noviembre-1978. Tipo de

vegetación: Bosque de Pinus y Quercus. Altura del árbol 6 a 7 metros. Suelo profundo, pardo y ondulado.

Chiapas. Herbario del MEXU – UNAM.

12. Camino Santiago al puente Mojo (al Durazno) Fecha de colecta 10-diciembre-1959. Colectado por el Dr. Faustino Miranda.
13. Ocosingo, 0.5Km al sur del Nuevo San Francisco León (Restaurante el Paraíso). Altitud 177 m s.n.m. Frutos presentes de color verde. Fecha de colecta 10-mayo-2002. Tipo de vegetación: Restos de la Selva Alta perennifolia. Altura del árbol 15 metros. Coordenadas: 17° 1'25" Norte y 91° 9'19" Oeste.
14. La chamarra 80Km al Noroeste de Cintalapa. Fecha de colecta 10-agosto-1951. Colectado por el Dr. Faustino Miranda.
15. Ocosingo, 4Km al Sureste del poblado del ejido de Nuevo Francisco León. En Río la Florida, Zona Norte. Altitud 195 m s.n.m. Frutos presentes drupas verdes amargas o agridulces. Fecha de colecta 25-enero-1996. Tipo de vegetación: Acahual arboreo muy perturbado. Altura del árbol 26 metros.
16. Noreste de Pichucalco hacia el embarcadero. Frutos presentes. Fecha de colecta 22-agosto-1950. Colectado por el Dr. Faustino Miranda.
17. Ocosingo, a 10Km al Sureste del cruceo corozal camino a Boca Lacantum. Altitud 200 m s.n.m. Frutos presentes. Fecha de colecta 18-agosto-1984. Tipo de vegetación: Selva alta perennifolia. Altura del árbol 35 metros.
18. Ocosingo, Ixcán sobre el río Lacantum. Altitud 150 m s.n.m. frutos presentes color verde. Fecha de colecta 7-septiembre-1992. Tipo de vegetación: Selva alta perennifolia. Altura del árbol 15 metros.
19. Ángel Albino Corzo, Km 17 de Jaltenang, camino a la Finca Prusia, Ejido de Salvador Urbina. Altitud 2100 m s.n.m. Floración y fructificación presentes. Árbol maderable de buena calidad. Fecha de colecta 18-diciembre-1988. Tipo de vegetación: Bosque tropical subcaducifolio de Nectandra, Zanthoxylum, Cecropia, Quercus. Altura del árbol 12 metros y diámetro de 30 centímetros. Nombre común: Leche María, Barí.
20. Villa Corzo, ejido Monterrey. Altitud 760 m s.n.m. frutos presentes color café. Fecha de colecta 19-enero-2003. Coordenadas: 16° 03'4" Norte y 93° 20'10" Oeste.
21. Ocosingo, a 1Km al Norte de Nuevo México. Altitud 176 m s.n.m. Flores de color blanco con el centro amarillo. Fecha de colecta 09-julio-2002. Tipo de vegetación: Selva alta perennifolia. Altura del árbol 35 metros. Coordenadas: 17° 1'4" Norte y 91° 19'0" Oeste.
22. Km 59 carretera mal paso-huimanguillo C-49-A. Fecha de colecta 04-junio-1962. Tipo de vegetación: Selva de Guatteria anómala, Spondias Bombin, Terminalia amazonia. Altura del árbol 25 metros. Nombre común: Barí.
23. Ocosingo, a 2Km al Norte de la estación Chajul. Altitud 150 m s.n.m. Frutos presentes. Fecha de colecta 08-septiembre-1992. Tipo de vegetación: sabana. Altura del árbol 10 metros. Nombre común: Barí.

24. Ocosingo a 2.8Km al norte de la estación Chajul. Flores blancas. Fecha de colecta 29-junio-1999. Tipo de vegetación: selva baja perenne. Altura del árbol 30 metros. Suelo café arcilloso.
25. Motozintla, La Verbena. Altitud 1500 m s.n.m. Frutos presente color verde. Fecha de colecta 06-marzo-1986. Altura del árbol 15 metros. Toma de muestra para estudio químico del Dr. Ricardo Reyes 18-septiembre-2002.

Chiapas. Herbario de la ENCB del IPN.

26. Ocosingo, Adyacente a la laguna ocotal grande. Altitud 800 m s.n.m. Frutos presentes esféricos café oscuro y duro. Fecha de colecta 27-noviembre-1972. Tipo de vegetación: Montane rain forest. Altura del árbol 40 metros.
27. Ocosingo al sureste del ejido Nuevo Francisco León, Río la Florida Zona norte. Altitud 195 m s.n.m. Frutos presentes drupas verdes amargas o agridulces. Fecha de colecta 25-enero-1996. Tipo de vegetación: Acahual arbóreo muy perturbado. Altura del árbol 26 metros. Topografía plana e inundado.
28. 20Km al noroeste de raudales. Altitud 300 m s.n.m. Frutos presentes con textura dura y color café oscuro, hojas chicas. Fecha de colecta 7-abril-1966. Tipo de vegetación: Bosque tropical lluvioso. Altura del árbol 30 metros. Nombre común: Barí. Ladera de roca ígnea.
29. Villa de Corzo, 65 Km South of Mexican Highway 190 of. Road from Tuxtla Gutierrez a New Concordia. Altitude 850 m s.n.m. Fecha de colecta 6-abril-1981. Steep canyon with seasonal evergreen forest and slopes of Quercus. Altura del árbol 40 metros.
30. Tuxtla chico. Altitud 250 m s.n.m. Flores presentes color blanco. Frutos verdes y lisos. Fecha de colecta 13-10-1984. Tipo de vegetación: Bosque de terreno plano. Población escasa. Altura del árbol 25 metros. Flora mesoamericana.
31. Arriaga, 6Km al norte de Arriaga. Altitud 250 m s.n.m. Flores blancas presentes. Fecha de colecta 23-diciembre-1972. Tipo de vegetación: Slope with tropical deciduos forest. Altura del árbol 50 feet.
32. Cintalapa, 23Km al oeste de las cruces. Along road to La Mina Microwave station. Altitud 870 m s.n.m. Flores blancas presentes. Fecha de colecta 20-diciembre-1981. Tipo de vegetación: Ridge with Pinus and Quercus. Altura del árbol 40 metros.
33. San Isidro Km 18 al suroeste de raudales. Altitud 150 m s.n.m. Fecha de colecta 4-abril-1996. Tipo de vegetación: Bosque tropical. Altura del árbol 4 metros. Nombre común: Leche María.

Guerrero. Herbario del MEXU – UNAM.

34. Acapulco. Floración (presente). Fecha de colecta 15-noviembre-1955.
35. Chilpancingo. Rincón de la vía. Altitud 700 m s.n.m. Floración (presente) muchas flores blancas presentes. Fecha de colecta 30-noviembre-1963. Tipo de vegetación: Bosques de galería y Selva mediana caducifolia. Altura del árbol 16 metros y diámetro de 42 centímetros. Nombre común: Palo María. Coordenadas:

17° 17'15" Norte y 99° 28'55" Oeste. Suelo arcillo color beige estratos de origen volcánico tardío.

- 36.** Rincón de la vía (Sur de Chilpancingo). Altitud 700 m s.n.m. Floración abundante. Fecha de colecta 30-noviembre-1963. Tipo de vegetación: Bosque de Galería y Selva mediana subcaducifolia. Altura del árbol 16 metros y diámetro de 42 centímetros. Coordenadas: 17° 17'15" Norte y 99° 28'55" Oeste. Suelo arcillo color beige estratos de origen volcánico tardío.
- 37.** Ruta 95 Acapulco a México a 16 Km al norte de Acapulco. Altitud 200 m s.n.m. Frutos verdes e inmaduros. Fecha de colecta 22-enero-1982. Tipo de vegetación: Selva Riparia alterada. Árbol poco abundante. Altura del árbol 15 metros y diámetro de 1.5 metros.

Guerrero. Herbario de la ENCB del IPN.

- 38.** Rincón de la vía, se encuentra al sur de Chilpancingo. Altitud 780 m s.n.m. Flores blancas, presentes y aromáticas. Fecha de colecta 30-noviembre-1963. Altura del árbol 16 metros y diámetro de 68 centímetros. Copa redonda y ramas colgantes. Se encuentra sobre estratos de origen volcánico.
- 39.** Acapulco. Floración abundante. Frutos presentes café oscuro, esféricos, secos y duros. Fecha de colecta 15-noviembre-1956.
- 40.** Al norte de Acapulco, Ruta 95 Acapulco México. 16 Km. Altitud 200 m s.n.m. frutos presentes color verde. Fecha de colecta 22-enero-1982. Tipo de vegetación: Selva riparia alterada. Población poco frecuente. Altura del árbol 15 metros y diámetro de 1.5 metros.
- 41.** Chilpancingo – Acapulco Km 302. Altitud 1100 m s.n.m. Fecha de colecta 19-junio-1960.

Michoacán. Herbario del MEXU – UNAM.

- 42.** El Tenamaste a 4Km del municipio de Aquila río arriba. Altitud 250 m s. n.m. Frutos (presentes) verdes e inmaduros. Árbol maderable. Fecha de colecta 01-marzo-1980. Tipo de vegetación: Selva mediana mojotal primaria. Árbol común y abundante. Altura del árbol 11 metros. Clima cálido subhúmedo. Nombre común: Marial. Suelo pardo arenoso, arcillosos. Toma de muestra para estudio químico del Dr. Ricardo Reyes 20-octubre-1999.

Michoacán. Herbario de la ENCB del IPN.

- 43.** Aquila, La mina. Altitud 200 m s.n.m. Floración abundante. Árbol maderable. Fecha de colecta 4-diciembre-1979. Tipo de vegetación Selva mediana primaria, ripario y Suelo café pardo. Altura del árbol 20 – 30 metros. Clima cálido subhúmedo. Nombre común: Marial.

Oaxaca. Herbario del MEXU – UNAM.

44. San Carlos Yautepec. Distrito de Yautepec, San Miguel Chongo en el paso del río a la entrada de la población. Altitud 460 m s.n.m. Floración de botones verdes en racimos axilares abundantes. Fecha de colecta 25-octubre-1999. Tipo de vegetación: Bosque de Galería. Altura del árbol 5 metros. Hojas coriáceas con nervación muy fina, látex amarillo. Coordenadas 16° 0'11" Norte y 95° 57'54" Oeste.
45. Santa María Chimalapa, Distrito de Juchitan. San Antonio Nuevo Paraíso a 1.5 Km al oeste por el camino al Plan de la Ceiba en la desviación al cerro Camedor. Altitud 390 m s.n.m. Fecha de colecta 29-junio-1999. Tipo de vegetación: Selva alta perennifolia, selva de *Elaegia uxpanapensis* y *Calophyllum brasiliense*. Altura del árbol 30 metros. Coordenadas: 17° 08'40" Norte y 94° 21'28" Oeste.
46. San Carlos Yautepec, San Miguel Chongo 0.5 Km al Norte. Altitud 340 m s.n.m. Frutos presentes abortados. Fecha de colecta 04-marzo de 1999. Tipo de vegetación: Selva mediana subperennifolia y vegetación secundaria a la orilla del arroyo. Altura del árbol 15 metros. Nombre común: Leche amarilla. Hojas simples opuestas con glándulas en la base. Coordenadas: 16° 0'36" Norte y 95° 57'58" Oeste.
47. San Carlos Yautepec, San Miguel Chongo. Altitud 480 m s.n.m. Frutos presentes. Fecha de colecta: 13-mayo-1999. Tipo de vegetación: Riparia. Altura de la planta 12 metros. Nombre común: cedro cimarrón. Coordenadas: 16° 0'39" Norte y 95° 58'19" Oeste.
48. Santa María Chimalapa, San Antonio Nuevo Paraíso en línea recta al oeste del cerro Camedor. Altitud 300 m s.n.m. Fecha de colecta: 18-mayo-1998. Tipo de vegetación: Selva alta perennifolia. Altura del árbol 8 metros. Coordenadas: 17° 8'40" Norte y 94° 21'28" Oeste. Toma de muestra para estudio químico del Dr. Ricardo Reyes 20-octubre-1999.
49. Santa María Chimalapa, río verde 7 Km en línea recta al NE de Santa María. Altitud 360 – 430 m s.n.m. Frutos presentes color verde bandera. Fecha de colecta 24-noviembre-1985. Tipo de vegetación: Selva Alta Perennifolia. Árbol abundante en la zona. Altura del árbol 17 metros. Nombre común Barí y Cancuy (Zoque). Monopodico, corteza café oscura surcado-fisurado verticalmente. Crema color claro con abundante látex amarillo. Coordenadas: 16° 58'17" Norte y 94° 39'45" Oeste. Flora mesoamericana.
50. Distrito de Juquila, Río de Tepenistlahuaca. Altitud 450 m s.n.m. Fecha de colecta 02-diciembre-1921. Hojas muy largas. (¿*Calophyllum longiper*?)

Oaxaca. Herbario de la ENCB del IPN.

51. Distrito de Putla, 2Km al sureste de Puente grande. Altitud 810 m s.n.m. Floración escasa, mayoritariamente son botones. Madera utilizada para la construcción de viviendas. Fecha de colecta 8-julio-1988. Tipo de vegetación: Restos de selva mediana subcaducifolia. Población abundante. Altura del árbol 25 metros. Nombre común: Trigillo. Suelo arenoso.

- 52.** Localizado a 16Km al noreste de Lázaro Cardenas, camino a Santa María Chimalpa. Altitud 230 m s.n.m. Presenta algunos botones. Fecha de colecta 23-febrero-1982. Altura del árbol 15 metros.
- 53.** Santa María Chimalapa, Cafetales cerca de Santa María Chimalapa. Altitud 300 m s.n.m. Frutos verdes, mesocarpio amarillo, pericarpio rugoso. Semillas color amarillo y con olor a laurel. Árbol maderable. Fecha de colecta 29-septiembre-1984. Altura del árbol 18 metros y diámetro de 50 centímetros. Nombre común: Caucuy (Zoque), Leche María. Corteza de color rosado con látex amarillo pegajoso. Suelos profundos, pendientes ligeras o fuertes.
- 54.** Distrito de Juquila, localizado a 10Km al sureste de Piedra Larga camino a Puerto escondido a 3Km al noroeste de san Gabriel Mixtepec, camino a Sola de Vega. Altitud 710 m s.n.m. Frutos esféricos inmaduros presentes. Fecha de colecta 19-marzo-1983. Tipo de vegetación Bosque secundario de Pinus. Altura del árbol 4 a 5 metros.
- 55.** Alrededores de Santa María Chimalapa. Altitud 250 m s.n.m. Fecha de colecta 20-mayo de 1973. Tipo de vegetación: Selva tropical.

Veracruz. Herbario del MEXU – UNAM.

- 56.** Río Coscoapan Los Tuxtlas. Altitud nivel del mar. Floración (presente). Fecha de colecta 28-08-1967. Tipo de vegetación: Bosque ripario. Altura del árbol 4 metros y perenne.
- 57.** Coatzacoalcos cerca de Nanchital asociado con *Vochysia lioniurensis*. Fecha de colecta: julio-1962. Nombre común: Barí.
- 58.** Zapopan de cabañas. Fecha de colecta 24-diciembre-1954. Tipo de vegetación: Selva alta perennifolia.
- 59.** San Lorenzo Tenochtitlan, Finca la esperanza de Don Bartola. Fecha de colecta: 09-diciembre-1967. Tipo de vegetación: Selva Alta perennifolia con *Scheelea liebmanni*, *Enterolobium cyclocarpoystonea* y *Calophyllum brasiliense*. Altura del árbol 20 metros y diámetro de 1.30 metros. Nombre común: Barí. Suelos planos, profundos e inundables.
- 60.** San Andres Tuxtla, Estación de biología tropical “Los tuxtlas”. Altitud 200 m s.n.m. Fecha de colecta 03-abril-1984. Tipo de vegetación: Selva alta perennifolia. Nombre común: Ocú. Semillas sembradas para la obtención de la plántula. Fecha de siembra 07-11-83 y fecha de germinación 13-12-83 germinada al sol, hipógea. Coordenadas: 18° 34' y 18° 36' Norte; 95° 04' y 95° 09' Oeste.
- 61.** San Andres Tuxtla, estación biológica. Altitud 200 m s.n.m. Fecha de colecta 24-febrero-1984. Tipo de vegetación: Selva Alta perennifolia. Altura del árbol 24 metros. Nombre común: Ocú.
- 62.** San Andres Tuxtla, Laguna Escondida a 2Km al noroeste de la estación biológica de las Tuxtlas. Altitud 100 m s.n.m. Fecha de colecta 27-abril-1984. Tipo de vegetación: Vestigios de selva alta perennifolia. Altura del árbol 20 metros. Corteza lisa con lenticelas pardas ovaladas que dan la apariencia de figurado. Coordenadas: 18° 34' y 18° 36' Norte; 95° 04' y 95° 09' Oeste.

- 63.** Zapoapan de cabañas. Fecha de colecta 24-diciembre-1954. Tipo de vegetación: Selva alta perennifolia.
- 64.** Mapa 12.0 / 45.0. 3Km delante de Nigromante. Altitud 100 m s.n.m. Fecha de colecta 12-abril-1969. Tipo de vegetación: Primaria, selva alta perennifolia. Abundancia regular y perenne. Altura del árbol 30 metros.
- 65.** Cuenca del río Tonalá cercada los límites con Tabasco. Altitud 5 m s.n.m. Fecha de colecta 28-01-1971. Tipo de vegetación: primaria, popal acuático. Abundancia regular.
- 66.** Coatzacoalcos. Altitud 50 m s.n.m. Fecha de colecta 23-noviembre-1961. Tipo de vegetación: Calophyllumbrasiliense asociado con Licania y Aspidosperma. Altura del árbol 30 metro y diámetro de 2.9 metros. Nombre común: Barí.
- 67.** Río coscoapan, Los Tuxtlas. Altitud 0 m s.n.m. Frutos presentes y pequeños. Fecha de colecta 28-agosto-1967. Tipo de vegetación: ripario. Altura del árbol 4 metros.
- 68.** Catemaco. Pte de la palma 25 Km al Noreste de la carretera Catemaco-Montepío. Altitud 200 m s.n.m. Flores blancas y abundantes. Fecha de colecta: 25-julio-1984. Tipo de vegetación: Riparia. Altura del árbol 10 metros. Nombre común: Ocú.
- 69.** Hueyapan de Ocampo, Sierra de Santa Marta. Altitud 400 m s.n.m. Fecha de colecta 13-noviembre-1999.

Veracruz. Herbario del IMSS.

- 70.** Catemaco. Fecha de colecta 27-Febrero-1999. Colecto Dr. Ricardo Reyes Chilpa. (Registro IMSSM 14435).
- 71.** Río Chumiapan, Laguna de Sontecomapan. Municipio San Andrés Tuxtla. Flores blancas. Frutos color verde. Árbol maderable. Fecha de colecta 10-septiembre-1999. Colecto Dr. Ricardo Reyes Chilpa. Nombre común: Barí o Barillo. (Registro IMSSM 14425)
- 72.** Ejido de Benigno Mendoza. Parcela escolar. Sierra de Santa Martha. Árbol maderable. Fecha de colecta 9-septiembre-1999. Colecto Dr. Ricardo Reyes Chilpa. Nombre común: Barí o Barillo. Ejemplar con cumarinas (QTP 1) (Registro IMSSM 14439).

Veracruz. Herbario de la ENCB del IPN.

- 73.** San Andrés Tuxtla, "Estación tropical de los Tuxtlas". Altitud 160 m s.n.m. Floración, botones amarillos. Fecha de colecta 22-julio-1983. Tipo de vegetación: Selva alta perennifolia. Altura del árbol 20 metros. Corteza fisurada y látex amarillo.
- 74.** San Andrés Tuxtla, Estación tropical de los Tuxtlas. Altitud 200 m s.n.m. Frutos presentes drupa verdosa y esférica. Fecha de colecta 30-marzo-1984. Tipo de vegetación: selva alta perennifolia. Altura del árbol 12 metros. Coordenadas: 18° 34' y 18° 36' Norte; 95° 04' y 95° 09'

75. San Andres Tuxtla, Estación Tropical "Los Tuxtlas". Altitud 160 m s.n.m. Frutos presentes drupes esfericas verdosas. Fecha de colecta 29-octubre-1983. Tipo de vegetación: Selva alta perennifolia. Altura del árbol 15 metros.
76. Catemaco, la palma a 24 Km al norte de Catemaco. Frutos verdes ocuripario rugosos. Fecha de colecta 30-octubre-1984. Tipo de vegetación: Relictos de selva alta perennifolia. Altura del árbol 18 metros.
77. Hidalgotitlán, Lomitas al Sureste del poblado 6, lomerío con suelos profundos área quemada 6-7 años. Frutos presentes esféricos y lisos. Fecha de colecta 11-marzo-1982. Altura del árbol 18-20 metros y diámetro de 50 centímetros. Nombre común: Barí. Coordenadas: 17° 15'45" Norte y 94° 29'30" Oeste. Madera anaranjada, rosada. Látex amarillo pegajoso.
78. Veracruz, Ranchería Nevería. Altitud 50 m s.n.m. Fruto verde y rugoso. 22-octubre-1981. Tipo de vegetación: Selva baja caducifolia secundaria, zona inundable. Población regular. Altura del árbol 10 metros. Suelo negro arenoso y cálido. Coordenadas: 19 – 11° Norte y 96 – 18° Oeste.
79. Finca la esperanza de Don Bartola. Fecha de colecta 9-diciembre-1967. Tipo de vegetación: Selva alta perennifolia. Altura del árbol 20 metros y 3 metros de cobertura, hojas grandes. Nombre común: Barí. Suelos planos profundos inundables.

Nayarit. Herbario del MEXU – UNAM.

80. 4 millas al sur de las varas. Altitud 75 m s.n.m. Fecha de colecta 18-septiembre-1960. Tipo de vegetación: Tropical forest Roadside, clearing edge of forest. Large tree sterile.

Campeche. Herbario del MEXU – UNAM.

81. Calakmul, 2.45 Km al Sureste del ejido el sacrificio. Altitud 212 m s.n.m. Frutos presentes. Fecha de colecta 14-mayo-2002. Tipo de vegetación: Selva baja caducifolia. Altura del árbol 15 metros. Coordenadas: 17° 59'0" Norte y 89° 21'40" Oeste.
82. Calakmul, 2Km al noroeste de dos naciones camino a ley de fomento agropecuario. Altitud 200 m s.n.m. Flores blancas amarillentas presentes. Fecha de colecta 27-octubre-1997. Tipo de vegetación: Selva mediana subperennifolia inundable. Altura del árbol 15 metros. Coordenadas: 17° 59'01" Norte y 89° 21'41" Oeste.
83. Calakmul, 10Km al sureste de dos naciones camino al civalito. Altitud 160 m s.n.m. Frutos presentes. Fecha de colecta 02-abril-1998. Tipo de vegetación: Selva mediana subperennifolia. Altura del árbol 25 metros. Nombre común: Barí. Coordenadas: 17° 54'50" Norte y 89° 18'30" Oeste.

Campeche. Herbario de la ENCB del IPN.

- 84.** El tormento, Escarcega. Fecha de colecta 26-05-1963. Tipo de vegetación: Bosque tropical subdeciduo, con lluvia abundante. Altura del árbol 65 metros, hojas chicas. Nombre común: Barí. Suelo arcilloso.
- 85.** El tormento, Escarcega. Campo experimental forestal. Frutos presentes color rojizo y rugoso. Fecha de colecta 23-abril-1963. Nombre común: Barí.
- 86.** El tormento, Escarcega. Campo experimental forestal. Frutos presentes color rojizo y rugoso. Fecha de colecta 19-julio-1963. Nombre común: Barí.
- 87.** El tormento. Altitud 50 m s.n.m. Árbol maderable. Fecha de colecta 28-abril-1969. Tipo de vegetación: Selva alta subperennifolia. Altura del árbol 20 metros y diámetro de 53 centímetros. Nombre común: Barí. Presenta suelo somero y roca caliza, el terreno es ondulado.

Yucatán. Herbario del MEXU – UNAM.

- 88.** Ciudad de Mérida. Altitud 8 m s.n.m. Frutos presentes color verde. Fecha de colecta 28-septiembre-1983. Tipo de vegetación: secundaria y sobre la acera de la vialidad. Altura del árbol 4 metros. Coordenadas: 20 – 59° Norte y 89 – 37° Oeste.

Tabasco. Herbario de la ENCB del IPN.

- 89.** Balancan, 2Km al norte del camino 25 y a 5.2 Km. Altitud 10 m s.n.m. Frutos presentes color verde y liso. Fecha de colecta 4-diciembre-1975. Tipo de vegetación: Selva mediana subperennifolia primaria, suelo inundado. Altura del árbol 5 metros. Nombre común: Laurelillo. Madera liviana y látex amarillo.
- 90.** 100 metros del límite con México sobre la carretera 15-A. Fruto color verde y comestible. Fecha de colecta 8-diciembre-1975. Tipo de vegetación: Selva Alta perennifolia primaria. Árbol perenne y de hoja chica, población muy abundante. Altura del árbol 40 metros. Nombre común: Barí. Suelo arcilloso y roca calcárea.
- 91.** A 15Km de Penjamo sobre la carretera de la estación de bombeo de PEMEX Chacamax. Fecha de colecta 15-octubre de 1966. árbol perenne de 5 metros de cobertura.

Colima

- 92.** Hacienda San Antonio, Colima. Dr. Reko. 800 m s.n.m. 1917.

Quintana Roo.

- 93.** Municipio (Othon P. Blanco) (18° 30', 88° 17'W, 20 m s.n.m.). 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 de 15m. (MEXU 405632).

**Soluciones madre para hidroponia (Fernández y Johnson. 1986).**

<b>Solución Madre (Stock).</b>	<b>Compuesto.</b>	<b>Solubilidad en agua.</b>	<b>Concentración (Molaridad y µg/mL).</b>	<b>Gramos/Litro.</b>
A	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	1:1	1M	236.1
B	KNO <sub>3</sub>	1:4	1M	101.1
C	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1:3	1M	246.4
D	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1:3	1M	136
E	(Quelato de Fe) FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O Na <sub>2</sub> EDTA NaOH		5000µg/L	25 26 14
F	MnCl <sub>2</sub> H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	1:2		1.81 2.86 0.22 0.88 0.09
G	NaNO <sub>3</sub>		1M	85.01
H	MgCl <sub>2</sub>		1M	95.23
I	NaSO <sub>4</sub>		1M	142.06
J	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O		1M	138.01
K	CaCl <sub>2</sub>		1M	110.99
L	KCl		1M	74.55
Fungicida	Captan [1,2,3,6-tetrahydro- N(trichloromethylthio)ph thalimide]			2.0

**Proporciones de soluciones madre por Litro para preparar soluciones nutritivas.**

<b>Solución completa (Modificada de Hoagland)</b>	<b>Solución Deficiente en Potasio (-K)</b>	<b>Solución Deficiente en Calcio (-Ca)</b>
A (5mL)	A (5mL)	A (5mL)
B (5mL)	C (2mL)	B (5mL)
C (2mL)	E (1mL)	D (1mL)
D (1mL)	G (5mL)	E (1mL)
E (1mL)	J (1mL)	F (1mL)
F (1mL)	-	I (2mL)

**Temperaturas mínimas y máximas mensuales del Invernadero "Efraín Hernández X" de la Facultad de Ciencias de la UNAM, durante el período de trabajo.**

