



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**“Perfiles de acumulación de metabolitos secundarios
en *Castela tortuosa* Liemb en diferentes prácticas de
cultivo”**

T E S I S

Que para obtener el título de

B I Ó L O G A

P R E S E N T A

Zavala Hernández María Guadalupe

Director de Tesis: Dr. Cesar Mateo Flores Ortiz



Los Reyes Iztacala, Edo. de México, 2013



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.

AGRADECIMIENTOS

Al Proyecto MGU-Proyecto Plantas Útiles, Jardines Botánicos Reales de Kew (RBG Kew), Segunda Etapa.

Al Dr. Cesar M. Flores por todo su apoyo, por darme una segunda, tercera y no sé cuantas más oportunidades, porque a pesar de todo siguió alentándome para cumplir mis compromisos y metas.

A los revisores Dr. Rafael Lira, M. en C. Alberto Arriaga, Dra. Margarita Canales, Biol. Luis Barbo, por sus comentarios para mejorar el presente trabajo.

Al Banco de Semillas Especies Silvestres de Zonas áridas de la UBIPRO por las facilidades otorgadas, en especial al colector Héctor Cervantes Maya por todo su apoyo, tiempo, consejos e información, gracias vecino.

Al poblado de San Rafael Coxcatlán, Puebla, en especial a Martín por el apoyo brindado en campo y por tener siempre una sonrisa.

Al laboratorio de fisiología vegetal, a mis compañeros y a los profesores, en especial a las maestras Margarita y Martha, por todo el apoyo brindado.

DEDICATORIA

A mis padres José Zavala Fabián y Guadalupe Hernández Moncada, por todo el tiempo y esfuerzo invertidos en mi, por ser incondicionales a pesar de todo, por su amor, por su paciencia y por ser lo más valioso en mi vida.

A mis compañeros y maestros que me ayudaron con aquello que no entendía.

A mis familiares más cercanos, por nunca presionarme o juzgarme de alguna manera.

A todas mis amigas de la FES, por todo lo vivido y compartido, por aquello que sufrimos y disfrutamos; las prácticas, los exámenes, las clases, los maestros, Veracruz, los amores, etc. Gracias por todo, ustedes saben a quién me refiero.

A toda la banda micro por adoptarme en su Lab y estar ahí en todo momento, por nunca recibir malas caras de ustedes, gracias por todas las comidas, platicas y cafés.

A todas aquellas personas que formaron parte importante durante toda la carrera y que me apoyaron de una u otra forma. Por su paciencia, tiempo y esfuerzo, gracias.

Al Rollo por aguantar tantas desveladas juntos y no dejarme solita en las noches.

*Aprovecha el día de hoy
para hacer un balance de
tú vida:*

*reflexiona sobre tus errores
y recuerda nuevamente tus aciertos,
perdónate por los fracasos y
enorgullécete de las victorias.*

*Y comprende que los errores,
aciertos, fracasos y victorias
forman parte de tu historia,
la historia de tu vida.*

*Y, por ésta razón, se los debe
valorar por igual.*

*Sin ellos,
no serías quien eres hoy.*



ÍNDICE

RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	8
Descripción de <i>Castela tortuosa</i> Liebm	9
Usos.....	9
Taxonomía y distribución	10
Descripción botánica.....	11
Investigación farmacológica.....	13
Estudios de propagación y metabolitos secundarios.....	14
Área de estudio	16
OBJETIVOS.....	20
General.....	20
Particulares.....	20
METODOLOGÍA.....	21
Escarificación.....	21
Germinación.....	22
Condiciones de cultivo.....	22
Tratamientos.....	22
Registros Fisiológicos.....	23
Análisis de metabolitos secundarios.....	23
Análisis estadístico.....	24
RESULTADOS.....	26
Escarificación.....	26
Germinación.....	26
Registros fisiológicos	28
Análisis de metabolitos secundarios.....	31
DISCUSIÓN.....	35
CONCLUSIONES.....	40
REFERENCIAS.....	41
APÉNDICE	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Detalle de <i>C. tortuosa</i>	12
Figura 2. Ubicación geográfica del poblado de San Rafael	17
Figura 3. Diagrama que resume la metodología.....	25
Figura 4. Porcentajes de germinación de los lotes de semillas	27
Figura 5. Promedios de parámetros fisiológicos.....	30
Figura 6. Cromatograma de los flavonoides encontrados	31
Figura 7. Promedios de concentración de los flavonoides	33

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Nombres comunes de <i>C. tortuosa</i>	11
Cuadro 2. Compuestos químicos aislados de <i>C. tortuosa</i>	14
Cuadro 3. Datos de los lotes de semillas de <i>C. tortuosa</i>	26
Cuadro 4. Promedios mensuales de parámetros del invernadero.....	28
Cuadro 5. Resumen del Análisis de Varianza de Parámetros fisiológicos	29
Cuadro 6. Resumen del Análisis de Varianza de Flavonoides	32

RESUMEN

Castela tortuosa es un arbusto ampliamente utilizado por los pobladores de la Región de Tehuacán-Cuicatlán, en Puebla. Se emplea principalmente para tratar y aliviar disenterías amebianas y diabetes. Conocido localmente como chaparro amargo o venenillo, se obtiene de manera silvestre, lo que expone a esta especie a cierto peligro por una explotación indebida, presentando además una baja germinación de manera natural. Los principios activos que le confieren a esta planta sus propiedades medicinales, dependen de factores como la edad del organismo, la época del año, el tipo de suelo, la humedad, la temperatura, el fotoperiodo, entre otros. En el presente trabajo se buscó determinar los perfiles de acumulación de metabolitos secundarios en *C. tortuosa* en diferentes prácticas de cultivo. Para ello, semillas provenientes de dos lotes, uno con siete años de almacenamiento y el otro con semillas recién colectadas, fueron escarificadas con ácido sulfúrico concentrado para permitir la imbibición de la testa. Lo anterior permitió obtener porcentajes de germinación de 53.41% y de 40.31% para los lotes antes mencionados. Posteriormente, se aplicaron dos tratamientos hídricos, riego al 60% y 100% de capacidad de campo, los cuales mostraron no tener efecto en los parámetros fisiológicos registrados de fotosíntesis, concentración interna de CO₂ y conductancia estomática. Adicionalmente, se realizaron mediciones en HPLC de la concentración y tipo de flavonoides que presenta esta especie, a partir de muestras foliares de *C. tortuosa*; determinando la presencia de tres flavonoides: fisetina y fisetinidol A y B. Dichos flavonoides registraron un incremento en su concentración en función de los procesos de desarrollo vegetativo y las etapas fenológicas de la especie.

INTRODUCCIÓN

México es un país diverso en flora debido a su posición geográfica y sus diferentes climas. Con más de 20,000 especies de plantas vasculares (Rzedowski, 2006), aproximadamente el 15% tiene atributos medicinales. Sin embargo, se estima que la validación química, farmacológica y biomédica de los principios activos que contienen estas plantas, se ha llevado a cabo sólo en el 5% de estas especies (Ocegueda *et al.*, 2005).

Por fortuna, y pese a lo anterior, se han desarrollado proyectos, en los cuales, se ha analizado la condición actual de los recursos naturales, así como el proceso de cultivo, manipulación y domesticación de plantas, encaminado a proporcionar herramientas de manejo para su uso y preservación. Uno de estos proyectos es el que se lleva a cabo dentro de la Reserva de la Biosfera de Tehuacán-Cuicatlán (Lira, 2001).

El Valle de Tehuacán-Cuicatlán en Puebla, es considerado como uno de los centros más importantes de riqueza biológica en el mundo por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN). Cuenta con aproximadamente 2,700 especies de plantas con flores (Dávila *et al.*, 1993). En esta zona prospera entre el 10 y 11.4% de la flora mexicana, con 365 especies endémicas que representan 13.9% del total (Canales *et al.*, 2006). Aunado a lo anterior, también posee una importante diversidad cultural, ya que existen en ella seis grupos étnicos (Nahuas, Popolocas, Mazatecos, Chinantecos-Cuicatecos, Ixcatecos, y Mixtecos) de los 52 que aún existen en el país (Dávila *et al.*, 2002).

Debido a su riqueza vegetal, el poblado de San Rafael, en el municipio de Coxcatlán, es una de las zonas más estudiadas dentro del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. En este lugar se han realizado trabajos sobre la flora útil (Rosas, 2003), la composición, manejo y uso de los vegetales en huertos domésticos (Blanckaert *et al.*, 2004), además de estudios fitoquímicos en relación con el uso tradicional de las plantas medicinales (Canales *et al.*, 2005).

De un total de 374 especies vegetales reportadas para San Rafael (Rosas, 2003), Canales *et al.*, (2006) encontraron 46 especies medicinales, pertenecientes a 28 familias y 46 géneros de plantas vasculares, de las cuales 47.8% son silvestres, 28.2% cultivadas en huertos y 23.9% adquiridas en mercados, todas ellas usadas en el tratamiento de diferentes enfermedades. La mayoría de ésta flora medicinal es silvestre y comúnmente solo es recolectada cuando se requiere, por lo cual, aquellas especies que se encuentran en zonas muy alejadas de la población, se conservan en seco como el palo dulce (especie no identificada, ya que solo se obtuvo su corteza), ítamoreal (*Turnera diffusa* Willd.), huáchala (*Juliana adstringens* (Schldl.) Schldl.) y venenillo (*Castela tortuosa* Liemb). La alta proporción de plantas silvestres empleadas por la gente de San Rafael, es una muestra de la gran dependencia que se tiene con el entorno vegetal natural para aliviar diversos malestares (Rosas, 2003).

Descripción de *Castela tortuosa* Liebm

Usos

C. tortuosa Liebm es una especie del Valle de Tehuacán-Cuicatlán de gran importancia, ya que se utiliza contra diversas enfermedades. Por ejemplo, la corteza se emplea en infusión contra el paludismo, disturbios intestinales, fiebre y eczema; siendo también astringente y con propiedades tónicas (Standley, 1923).

En San Rafael, *C. tortuosa* se emplea contra la diabetes mezclándola con palo dulce (especie no identificada), se hace una infusión poniendo a hervir el tallo con agua durante unos minutos y se toma como agua de tiempo (Rosas, 2003; Canales, 2005). En enfermedades de filiación cultural, se utiliza para calmar los berrinches de los niños dándoles a masticar el fruto. También se mastican las hojas para sacar la bilis en impresiones fuertes como sustos o enojos (Rosas, 2003).

Además, se ha reportado su uso contra enfermedades estomacales, disenterías amebianas, diarreas, contra fiebre, cólicos, como diurético, eupéptico y como descongestionante del hígado (Zárate, 1984; Sánchez, 1990; Martínez, 1992).

Taxonomía y distribución

C. tortuosa pertenece a la familia Simaroubaceae, del Orden Sapindales. Se le han asignado otros nombres: *C. erecta* Turpin, *C. galapageia* Hook. f., *C. texana* (Torr. & A. Gray) Rose. La presencia de sinonimias se debe principalmente a su distribución geográfica, además del reconocimiento de entidades regionales sólo como subespecies, y de las diferencias que se presentan en la pubescencia por la forma de pétalos y espinas, dándose de igual forma estas diferenciaciones dentro de la misma planta (Cronquist, 1945; Standley, 1923; Medina y Chiang, 2001).

Esta especie se distribuye desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de Sudamérica (Colombia y Venezuela). Habita el matorral xerófilo y el bosque tropical caducifolio, principalmente en suelo rocoso calizo y en elevaciones que van de 700 a 2100 msnm (Medina y Chiang, 2001).

De acuerdo con el estado de la República Mexicana donde se ubique, *C. tortuosa* tiene asignados diversos nombres comunes, estos se mencionan en el cuadro 1 (Martínez, 1992; Sánchez, 1990).

Descripción botánica

C. tortuosa se caracteriza por ser un arbusto dioico, que puede medir de 0.4 a 2.0m de alto (fig. 1-b), presenta una corteza muy amarga y generalmente de color grisáceo, sus ramas son alternas con una espina terminal recta. Las ramas jóvenes presentan espinas laterales hasta de 4.0mm de largo pardo-rojizas. Las hojas son pequeñas, con peciolo, alternas en individuos jóvenes, aglomeradas en las axilas de las espinas en individuos de mayor edad; haz ligeramente tomentoso-viloso, lustroso, la nervadura principal evidente, envés densamente tomentoso, blanquecino, generalmente amarillenta, margen entero. Presenta inflorescencias axilares, racimos sésiles con 2-3 flores de hasta 4.0mm de largo. Las flores son de color anaranjado rojizo, el fruto es una drupa de 7.0mm de largo y 6.0mm de ancho aproximadamente, tiene forma ovoide-aplanada, de color rojo llamativo y sólo presentan una semilla (fig. 1-a, 1-c) (Medina y Chiang, 2001). Las semillas presentan la testa reticulada y dura (fig. 1-d). Muestra dos periodos de fructificación, uno de febrero a junio y otro de septiembre a noviembre (Mendoza y Godinez, 2007).

Cuadro 1. Nombres comunes de *C. tortuosa* en la República Mexicana.

Localidad	Nombre Común
Tamaulipas	"bisbirinda"
Oaxaca	"palo amargoso"
Nuevo León	"corona de Cristo"
Durango	"palo copache"
Sonora, Coahuila, Chihuahua, Durango, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Puebla (Valle de Tehuacán), Veracruz	"chaparro amargo"
San Luis Potosí	"arbusto de chivos", "hierba del perro"
Nuevo León y el sur de Texas	"amargoso"
Puebla	"xinxontlé"
Puebla (Valle de Tehuacán)	"venenillo"

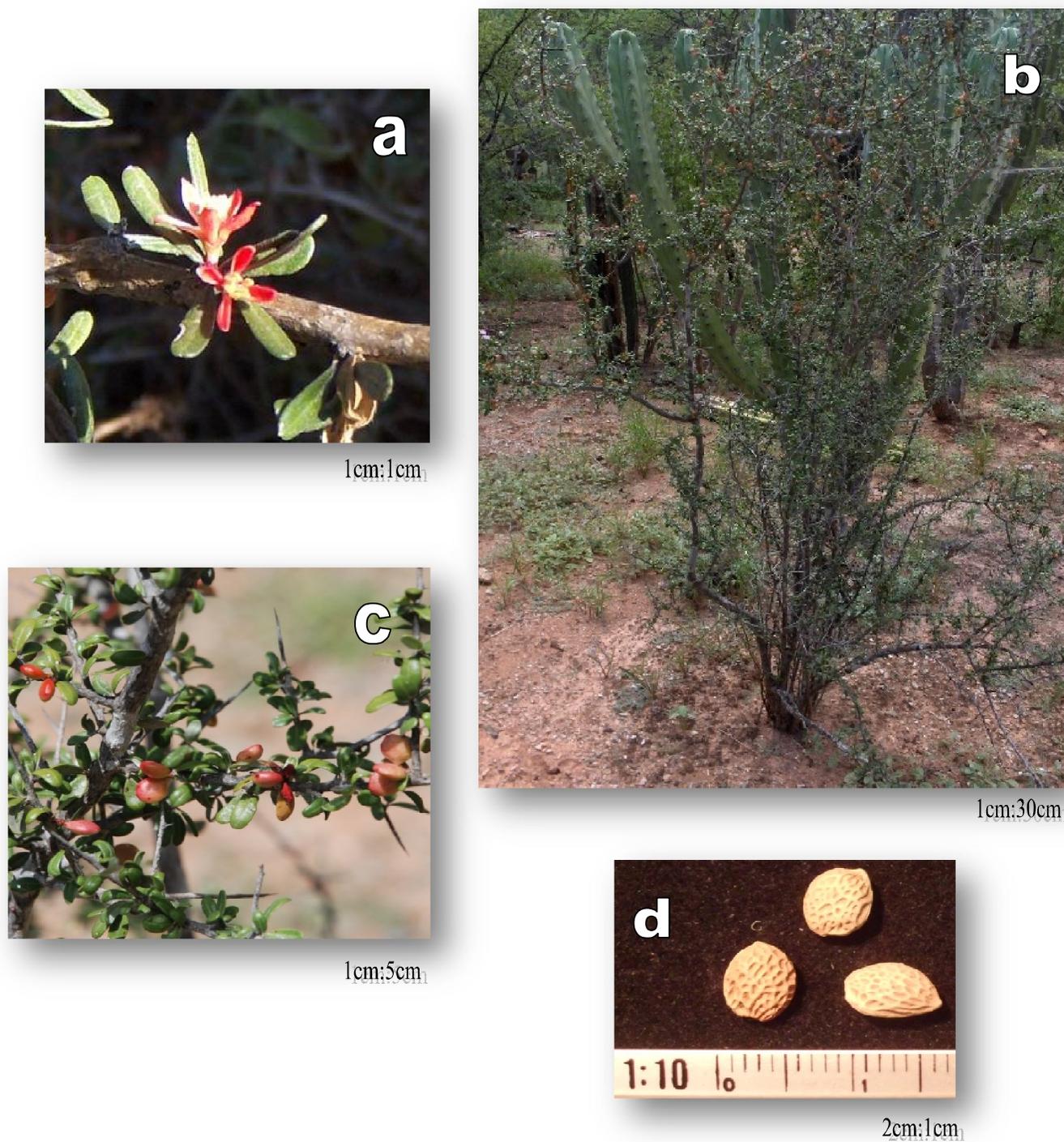


Figura 1. Detalle de *C. tortuosa*, especie del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, a) acercamiento de la flor, b) planta adulta, c) fruto y d) semilla limpia.

Investigación farmacológica

En *C. tortuosa* se ha determinado su actividad citotóxica *in Vitro* sobre el crecimiento de cultivos celulares de *Entamoeba histolytica*, *Bacillus subtilis* y *Trichomonas vaginalis*, utilizando extractos metanólicos, hexanólicos y clorofórmicos de partes aéreas y de raíz, así como de compuestos aislados: chaparrina, castelina, castelagenina, castelamarina y glaucarubolona (Calzado *et al.*, 2000). Estos extractos han mostrado una potencia relativa similar a la de los fármacos emetina y metronidazol, aunque con ausencia de efectos secundarios (Calzado *et al.*, 2002). A su vez, Reyes *et al.*, (2005), reportan propiedades antígenotóxicas y antimutagénicas del extracto acuoso de la raíz de *C. texana*, demostrando su capacidad antioxidante en cultivos celulares de hígado.

Química de la especie

La familia Simaroubaceae, a la cual pertenece *C. tortuosa*, se ha caracterizado por poseer principios amargos, los cuales son triterpenos degradados denominados quasinoídes (Calzado, 1995; Díaz de León, 2005). Dichos quasinoídes han demostrado poseer muy diversas y potentes actividades biológicas, entre ellas: actividad citotóxica, antileucémica, insecticida, anti-alimentaria de insectos particularmente en *Heliothis virescens* (gusano cogollero del tabaco), fitotóxica, alelopática, antiprotozoaria, antihelmíntica, antiviral, antiinflamatoria, protectora del desarrollo de tumores, y proapoptótica (Kubo *et al.*, 1992; Díaz de León, 2005). En el cuadro 2 se incluyen los compuestos químicos aislados de *C. tortuosa* de diversas partes de la planta.

Cuadro 2. Compuestos químicos aislados de *C. tortuosa*.

Compuestos aislados	Parte de la planta de la que se aisló el compuesto	Referencia	
Quasinoides	Chaparrina	Raíz	Geissman y Ellestad, 1962; Kubo <i>et al.</i> , 1992
	Glaucarubulona	Corteza	Davidson <i>et al.</i> , 1965; Kubo <i>et al.</i> , 1993
	Glaucarubol		Stocklin y Geissman, 1970
	Glaucarubol-15-isovalerato		
	Amarólido	Raíz	Stocklin, <i>et al.</i> , 1970
	Chaparrinona	Partes aéreas	Mitchell <i>et al.</i> , 1971
	Chaparrólido		
	Castelanólido		
	Chaparramarina	Corteza	Kubo <i>et al.</i> , 1992
	Castelósido A	Corteza	Chaudhuri y Kubo, 1992
	Castelósido B		
	Castelósido C	Corteza	Kubo y Chaudhuri, 1993
	Castelalina	Corteza	Kubo <i>et al.</i> , 1993
	11-O-trans-p-cumaroil-amarólido		Dou <i>et al.</i> , 1996
Holacantona			
Flavonoides	Prosopina	Corteza	Kubo <i>et al.</i> , 1993
	Fisetinidol		
Ester	Galato de metilo	Corteza	Kubo <i>et al.</i> , 1993
Alcaloides	Alantoína	Corteza	Kubo y Chaudhuri, 1993

Estudios de propagación y metabolitos secundarios.

Dentro de los estudios llevados a cabo en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, se reportan los experimentos realizados por Mendoza (2006) con semillas de *C. tortuosa*, en los que se determinó una baja germinación en semillas recién colectadas (menor a 10%), y en tratamientos con ácido giberélico o con un almacenamiento de hasta un año, también se obtuvieron porcentajes bajos. A su vez, se probó la supervivencia de las plántulas en campo, ubicándolas debajo de *C. tortuosa* a manera de planta nodriza y en sitios sin ninguna cubierta vegetal, determinando que las plántulas sólo permanecen vivas alrededor de quince días en ambos tratamientos. Estos resultados fueron

asociados a factores limitantes como el agua, principalmente la pluvial y el tipo de suelo (Mendoza y Godínez, 2007).

En internet (Gardening, 2013), la información que se puede encontrar referente al cultivo de *C. tortuosa*, incluye las siguientes recomendaciones: un terreno suelto y profundo, muy bien drenado, con riego esporádico durante 4-5 semanas con 1-2 secos de agua, dejando el terreno seco por un par de días antes de repetir el riego, regar sin exceso, pero volviendo a dejar húmeda la zona de siembra. Se aconseja regar sólo ejemplares jóvenes, los ejemplares adultos se conforman con las lluvias. Menciona también que tolera sin problemas las temperaturas mínimas. Estos datos se revisaron pero no se tomaron en cuenta por presentar inconsistencias en la información, ya que reporta que esta especie alcanza hasta los 8 metros de altura, cuestión que difiere con *C. tortuosa*, ya que los individuos más altos registran sólo hasta 2m.

No se tienen registros del cultivo de *C. tortuosa* en México, a pesar de que existe una línea de investigación de ésta planta en Sonora, dónde se busca propagar esta especie, entre otras, de manera comercial *in vitro* o en invernadero, con el fin de pasar la técnica a comunidades marginadas que las utilizan frecuentemente (Fupen 2006).

Estudios previos relativos a la elucidación de metabolitos en *C. tortuosa*; se basan principalmente en aquellos componentes que le proporcionan su característico sabor amargo, sus propiedades amebicidas o contra otros protozoarios (Calzado *et al.*, 2000); por sus propiedades antígenotóxicas y antimutagénicas (Reyes *et al.*, 2005), o por el interés que surge de la poca depredación hacia esta planta, derivando esto último en la obtención de compuestos para su posible uso como agentes insecticidas (Kubo *et al.*, 1992). Todos estos estudios se han realizado mediante extractos acuosos o mediante el aislamiento de algún compuesto específico, utilizando toda la planta o partes específicas y siempre con material vegetal silvestre.

Meléndez (2006), encontró a través de perfiles cromatográficos de extractos hexánicos, clorofórmicos y metanólicos de *C. tortuosa* en dos zonas de estudio, una

con suelo deteriorado y otra con suelo conservado, que los compuestos analizados (no identificados), presentaban diferentes tiempos de retención, significando compuestos distintos, demostrando la existencia de variaciones en la composición química de la planta de acuerdo con la zona en la que crece.

Moreno (2009) reporta la presencia del flavonol fisetina, en plantas de *C. tortuosa* crecidas en invernadero, bajo dos tratamientos de riego (óptimo y estrés) e intensidad luminosa de sombra 70% y sin sombra. Las mayores concentraciones del compuesto se encontraron en el tratamiento de estrés sin sombra. A su vez, compara la concentración de éste flavonoide con plantas silvestres de dos poblados de Coxcatlán, Puebla (San Rafael y San Martín), no encontrando diferencias significativas entre las localidades pero si entre éstas y las plantas crecidas en invernadero. La concentración de las plantas silvestres fue mayor, no obstante muy variable, a pesar de que los individuos muestreados se encontraban cercanos, pudiendo estar determinada, mayoritariamente, por los factores ambientales drásticos y la edad de la planta.

Área de estudio

En San Rafael se lleva a cabo parte del proyecto de plantas útiles por medio de los Jardines botánicos Reales de KEW, con el fin de conservar germoplasma vegetal de zonas áridas y semiáridas.

San Rafael se sitúa en el municipio de Coxcatlán Puebla, al sudeste de la reserva de la biosfera de Tehuacán-Cuicatlán en la parte centro-sur de México (Fig. 2). Su abanico aluvial forma parte de la sierra Mazateca, situada en la porción sudeste del Valle de Tehuacán: 18°12' y 18°14' N; 97°07' y 97°09' O, en un intervalo altitudinal de 800 a 1400msnm. El clima es de tipo $Bs_1(h)w''(w)eg$ de acuerdo con la clasificación de Köppen, modificada por García (1973), el cual corresponde a un tipo seco o árido con lluvias en verano y con un rango de temperatura de 14 a 26°C. A su vez, cuenta con un rango de precipitación anual de 300 a 1100mm (INEGI, 2009).

De acuerdo con Rzedowski (2006), la vegetación dominante en la región puede ser descrita como matorral xerófilo con especies como *Bursera morelensis*, *B. áptera*, *Pachycereus weberi*, *Opuntia puberula*, *Ceiba parviflora*, y *Acacia cochliacantha*.

Los suelos en la región están pobremente desarrollados, y pueden ser divididos en dos tipos principales: Regosoles calcáricos y eútricos; y Xerosoles háplicos.

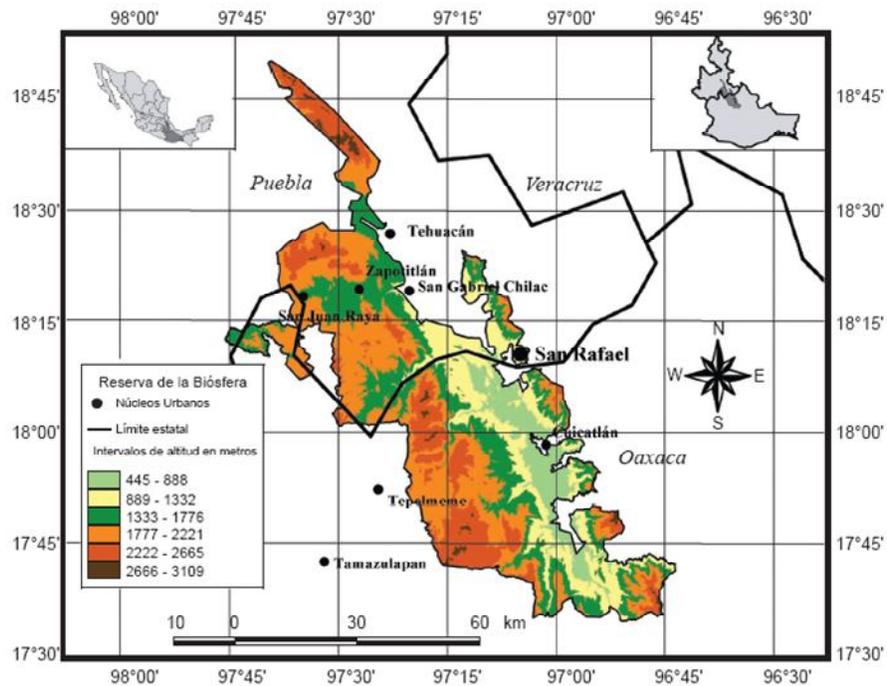


Figura 2. Ubicación geográfica del poblado de San Rafael, con referencia a la Reserva de la Biósfera Valle de Tehuacán-Cuicatlán.

JUSTIFICACIÓN

De acuerdo con estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS), las plantas son utilizadas por 80% de la población mundial para satisfacer o complementar sus necesidades médicas. Se estima que anualmente en todo el mundo se facturan 60,000 millones de dólares por concepto de comercialización de medicinas de patente elaboradas con plantas medicinales. La OMS reconoce que no existe un marco jurídico internacional que regule el acceso a las plantas mismas y su uso racional, ni la seguridad, eficacia y calidad de sus principios activos (Ocegueda *et al.*, 2005).

En México 250 plantas tienen un alto índice de comercialización, principalmente por su uso medicinal y más del 85% de estas especies que se comercializan, provienen de recolección silvestre sin contar con programas de manejo y sin ningún control o seguimiento de las dependencias gubernamentales responsables, exponiéndolas al peligro de extinción (Betancourt y Gutiérrez, 1999). Un ejemplo de este tipo ocurre con *C. tortuosa*. En la comunidad de San Rafael, esta planta es colectada de manera silvestre, además se ha registrado un aumento en su demanda dentro la zona y en otras partes del país, indicando la urgencia de establecer prácticas de cultivo sustentables (Rosas, 2003; Betancourt y Gutiérrez, 1999).

Se sabe que la calidad y productividad en los cultivos de plantas medicinales, están determinadas por diversos factores, entre ellos, los genéticos, ontogénicos y ambientales. Los compuestos que le atribuyen a las plantas sus propiedades medicinales se denominan principios activos, los cuales son compuestos químicos de algunas plantas que las hacen útiles como medicamentos, y pueden encontrarse en todo el individuo o sólo en algunas de sus estructuras. Su concentración y calidad dependen de diversos factores como la edad del organismo, el clima, la época del año, el tipo de suelo y la humedad, entre otros. Se sabe, por ejemplo, que las plantas muy jóvenes o muy viejas tienen menor concentración de principios activos; que los suelos ácidos favorecen a las plantas productoras de alcaloides y que la humedad del suelo

tiene un efecto directo sobre la concentración de estos compuestos (Ocegueda *et al.*, 2005).

Tomando en cuenta lo anterior, se justifica el trabajo orientado a contribuir al conocimiento sobre la germinación y establecimiento de *C. tortuosa*, especie empleada en la medicina tradicional mexicana y de importante uso en la región de San Rafael, así como, determinar parámetros de control en la acumulación de los metabolitos secundarios, principalmente compuestos fenólicos, mediante el establecimiento de condiciones óptimas de su cultivo en invernadero.

OBJETIVOS

General

- Determinar los perfiles de acumulación de metabolitos secundarios en *Castela tortuosa* Liemb planta medicinal de San Rafael, Coxcatlán Puebla, en diferentes prácticas de cultivo.

Particulares

- Determinar las condiciones óptimas de germinación de las semillas de *C. tortuosa*.
- Determinar las condiciones para la propagación de *C. tortuosa* en invernadero.
- Analizar los parámetros fisiológicos de las plántulas bajo dos niveles de riego.
- Analizar el contenido de flavonoides mediante extractos metanólicos en cromatografía líquida de alta resolución.
- Determinar el papel de las condiciones de cultivo en la acumulación de flavonoides en *C. tortuosa*.

METODOLOGÍA

Material biológico

Se utilizaron semillas de *C. tortuosa* provenientes de dos lotes con diferente año de colecta y ambos colectados en la Reserva de Tehuacán-Cuicatlán. Las semillas fueron procesadas y almacenadas de acuerdo con las recomendaciones del Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI por sus siglas en inglés), con relación al manejo de bancos de germoplasma. Los procedimientos de manejo de las semillas fueron realizados por personal del Banco de Semillas de Especies Silvestres de Zonas Áridas, ubicado en la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO), de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FESI) (Ellis *et al.*, 1985).

Escarificación

Previo a la escarificación se realizó una desinfección con hipoclorito de sodio al 2% durante 20 minutos, después de ese tiempo, las semillas se lavaron con agua corriente y se eliminó la humedad con papel secante (Mendoza, 2006).

Se realizaron dos tipos de escarificación. Para la primera se tomo en cuenta lo reportado por Mendoza (2006), sustituyendo tijeras por papel lija para desgastar el eje vertical y perforar por completo la testa, disminuyendo la posibilidad de dañar al embrión en comparación con el uso de tijeras.

Para la escarificación química, se dejaron las semillas sumergidas en ácido sulfúrico concentrado durante 20 minutos con agitación constante. Pasado ese tiempo, se eliminaron los residuos del ácido con agua corriente, eliminando la humedad con papel secante. De lo anterior se definió el tratamiento óptimo de escarificación.

Germinación

Posterior a la escarificación, se sembraron las semillas de dos formas. La primera consistió en colocar las semillas escarificadas en agar bacteriológico al 1% en cuarto de incubación con las siguientes condiciones: temperatura promedio de 30°C, máxima de 33.1°C y mínima de 27.4°C; humedad máxima de 82%, mínima de 32% y un fotoperiodo de 12/12 horas. Se consideraron germinadas aquellas semillas cuyas radículas sobrepasaban los 0.5cm de largo (Patil y Gaikwad, 2011).

La otra porción de las semillas se sembraron en almácigos de 72 pozos (3.5 x 5.7cm) con sustrato 1:1 de agrolita y tierra negra esterilizada por 24 horas a 200°C. Los almácigos se trasladaron al invernadero en una nave con malla de 70% sombra y se les aplicó fertirrigación con solución Hoagland (Taiz y Zeiger, 2006), esto último para optimizar su establecimiento sólo durante la germinación. Se consideró germinada la semilla a partir de la emergencia de los cotiledones del sustrato.

Condiciones de cultivo

Las plántulas a partir de la aparición de hojas verdaderas, se trasplantaron a macetas de 8 pulgadas, con una mezcla 1:1 de agrolita y tierra negra estéril como sustrato. Las macetas fueron colocadas en el invernadero de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO), sobre camas elevadas en una nave con malla para proporcionar sombra constante al 70% (Moreno, 2009).

Tratamientos

El tratamiento que se evalúa en este trabajo es el riego, para lo cual, se definieron dos condiciones, el riego al 60% y al 100% de la capacidad de campo del sustrato (1:1 agrolita y tierra). Los grupos experimentales se formaron aleatoriamente con 22 individuos por tratamiento (Moreno, 2009).

Registros Fisiológicos

Una vez establecidas las plántulas en las condiciones de invernadero y bajo los tratamientos de riego, se llevaron a cabo registros de intercambio gaseoso: tasa de fijación de CO₂, conductancia estomática, concentración interna de CO₂, y tasa de transpiración. Para las mediciones se utilizó un analizador Infrarrojo de gases portátil (IRGA), marca Li-COR modelo Li-6400, el cual presenta un sistema de intercambio de gas abierto. Para los registros se estableció la temperatura del bloque de la cámara a 25°C y un flujo fotónico de 900 μmol m⁻² s⁻¹. Los registros de parámetros fisiológicos se realizaron seleccionando al azar a tres individuos de cada grupo experimental a intervalos de 30 días (Moreno, 2009).

Análisis de metabolitos secundarios

Para el análisis de flavonoides se colectaron entre 20 y 50mg de hoja dependiendo de la disponibilidad del material vegetal, se muestrearon tres individuos seleccionados al azar de cada grupo experimental en el mismo intervalo de tiempo que los registros de los parámetros fisiológicos (30 días). A partir de las muestras se obtuvo un extracto metanólico mediante maceración del tejido, la cantidad de metanol agregada correspondió al peso de las hojas por dos (mg (2) = ml), cada aplicación extra de metanol se anoto (número de diluciones). Posteriormente, el extracto fue centrifugado a 3,000rpm durante 3 minutos. Se recuperó el sobrenadante, del cual se emplearon 30 μl para analizarlo en Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Lo anterior, se llevó a cabo en un equipo HP series 1100 (Hewlett-Packard, Wilmington, DE, USA), equipado con un detector de arreglo de diodos (DAD) 1100, operado con ChemStation A0903 (1417). Las separaciones se realizaron en una columna Allsphere (4.6mm x 250mm, 5 μm) y el detector ajustado a 260nm. La fase móvil fue agua: ácido acético: metanol (60:5:35) empleando un gradiente de presión definido por un flujo. La rampa de incremento fue con 1ml de flujo hasta el minuto 5 y un incremento gradual hasta 1.5ml al minuto 20. Los flavonoides fueron identificados a partir de la inspección del espectro obtenido en el detector de arreglo de diodos (Harborne, 1998).

Los compuestos encontrados fueron analizados con lo reportado para la especie y los valores máximos de absorbancia fueron comparados con aquellos reportados por Hatano *et al.*, 1997 y Kubo y Chaudhuri, 1993. Por otro lado, la cuantificación de los flavonoides se realizó a partir de la absorbancia de los compuestos separados y aplicando el coeficiente de extinción promedio de flavonoides.

Análisis estadístico

Para determinar la significancia de los resultados se aplicó un análisis estadístico de varianza (ANOVA) de un factor. Para establecer las diferencias entre las medias de poblaciones se aplicó una prueba LSD. Las medias de los grupos experimentales se consideraron provenientes de dos poblaciones diferentes cuando la significancia fue menor de 0.05 (Durán *et al.*, 2004). Los análisis se realizaron por medio del programa Microsoft Office Excel 2007®.

Todo el proceso metodológico se resume en la figura 3, se sintetiza la información sobre escarificación y germinación, el diseño experimental, el análisis de metabolitos secundarios y el análisis estadístico.

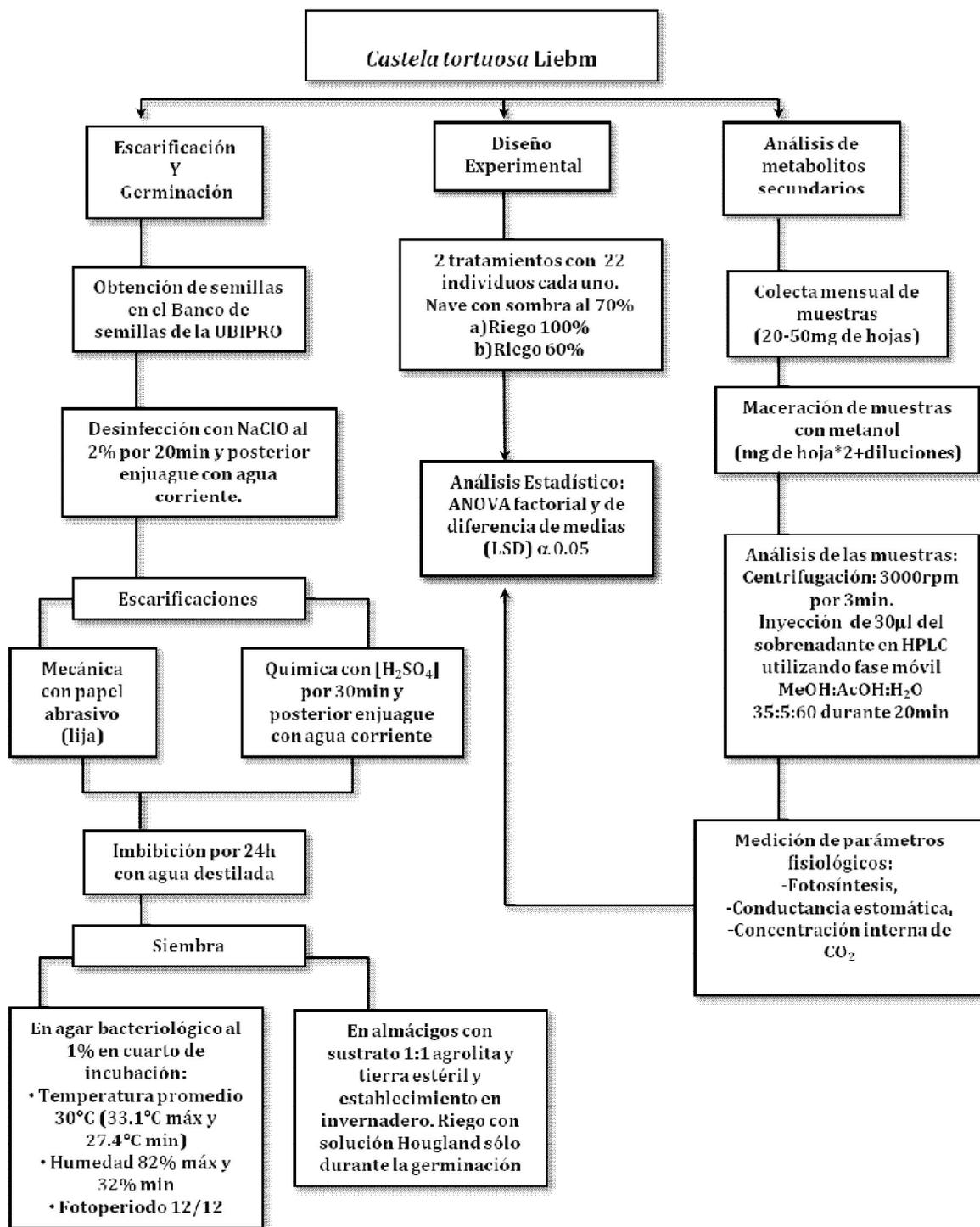


Figura 3. Diagrama que resume la metodología.

RESULTADOS

Material biológico

Para el ingreso de las semillas de *C. tortuosa* al Banco de la FESI, ambos lotes pasaron por un proceso de limpieza y de selección, en el cual se eligieron aquellas semillas libres de plagas y con embrión presente. Posteriormente, se deshidrataron y sólo en el caso del lote del 2001, las semillas ya se encontraban bajo refrigeración a -20°C para su conservación (cuadro 3). Todo lo anterior llevado a cabo por el personal del Banco de Semillas.

Cuadro 3. Datos de los lotes de semillas de *C. tortuosa*. Condiciones en las que se encontraban en el Banco antes de ser utilizadas.

No. Colecta	Año de ingreso al banco	No. Semillas	Condiciones en banco
José Ismael Calzada 23013	Mayo de 2001	100	En almacenamiento a -20°C
Héctor Cervantes Maya 041	Abril de 2008	320	Bajo proceso de desecación

Escarificación

El método de escarificación determinado como el óptimo fue el químico con ácido sulfúrico concentrado, ya que ofrecía una mayor rapidez por el número de semillas a escarificar y disminuía el riesgo de daño al embrión. Por lo anterior, este método fue el que se aplicó al resto de las semillas.

Germinación

Las plántulas obtenidas de las semillas sembradas en agar bacteriológico, no resistieron el traslado al invernadero, lo que ocasiono la muerte de la mayoría. Por lo anterior, al resto de las semillas escarificadas se decidió colocarlas directamente a los almácigos en el invernadero con sombra al 70%, esperando que el establecimiento de las plántulas se realizara desde el inicio de la germinación. La información que se

presenta de germinación es al respecto de este último procedimiento, que incluye semillas de ambos lotes.

De un total de 88 semillas escarificadas, se obtuvo un porcentaje de germinación de 53.41% para el lote del 2001, y para el lote del 2008 se obtuvo un porcentaje de germinación de 40.31%, con un total de 320 semillas (fig. 4).

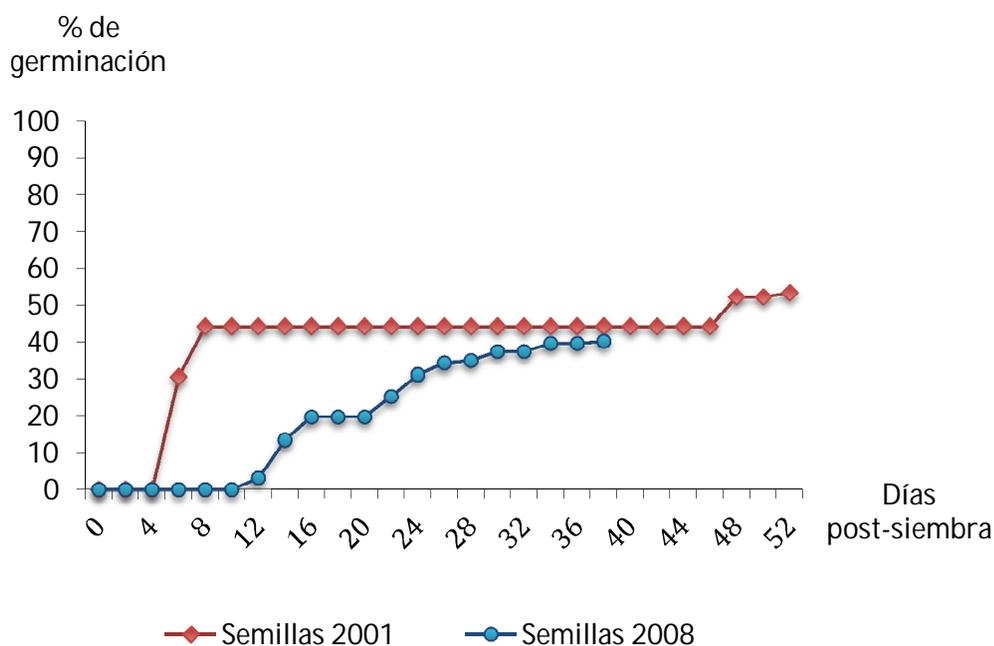


Figura 4. Porcentajes de germinación de los lotes de semillas 2001 (53.41% día 51) y 2008 (40.31% día 38).

A partir de que las plántulas obtenidas presentaron hojas verdaderas, se trasplantaron a macetas y fueron seleccionadas aleatoriamente en la evaluación de los tratamientos de riego y la acumulación de metabolitos.

Se observó la sobrevivencia de las plántulas para ambos lotes tomando en cuenta el total de plantas germinadas como el 100%. Se encontró que el lote del 2001 obtuvo 59.57% después de 72 días post-germinación y de 65.89% para el lote del 2008 al día 51 post-germinación.

Registros fisiológicos

Se obtuvieron los valores promedio del fotoperiodo, temperaturas máximas y mínimas y luminosidad en la nave de invernadero con 70% sombra (cuadro 4), esto con el fin de determinar las condiciones en las que permanecieron las plántulas dentro del invernadero. Con respecto a la temperatura nocturna, ésta varió de 10 a 15°C a lo largo de todos los meses.

Cuadro 4. Promedios mensuales de horas luz (fotoperiodo), temperatura (valor máximo y mínimo obtenido en el mes) y luminosidad en la nave de invernadero con sombra al 70% (Moreno, 2009), SD= sin datos.

	Fotoperiodo (horas luz)	Temperatura °C Día		Luminosidad ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)
		Máxima	Mínima	
Julio	14	30	20	250
Agosto	13.3	30	24	310
Septiembre	12.5	SD	SD	SD
Octubre	12.2	27	16	290
Noviembre	11.0	29	17	245
Diciembre	SD	SD	SD	SD
Enero	11.5	SD	SD	SD

La medición de los parámetros fisiológicos, permitió establecer que los tratamientos de riego a 60 y 100% de capacidad de campo aplicados a las plantas de *C. tortuosa*, no mostraron diferencias significativas. Por lo anterior, se decidió evaluar los registros fisiológicos a lo largo de los meses, encontrando marcadas diferencias. En el cuadro 5 se resume el análisis de varianza aplicado a los resultados, la información completa con respecto a las tablas de ANOVA y LSD de los valores significantes se muestra en el apéndice.

Cuadro 5. Resumen del Análisis de Varianza de los Parámetros fisiológicos bajo tratamientos de riego 60% y 100% CC, y de los meses de muestreo (ns = no significativo)

	Efecto	SC	GL	CM	F	p
Riego						
1	Tasa fijación CO ₂	5.3515	1	5.3515	2.0441	ns
2	Conductancia	0.0001	1	0.0001	0.2106	ns
3	Concentración interna CO ₂	406578.897	1	406578.897	0.5211	ns
Meses						
1	Tasa fijación CO ₂	71.6094	5	14.3219	18.8806	<0.0001
2	Conductancia	71.6094	5	14.3219	18.8806	<0.0001
3	Concentración interna CO ₂	14503903.69	5	2900780.74	7.0020	0.0002

El análisis aplicado a la tasa de fijación de CO₂ ($p < 0.0001$), indicó que septiembre es el mes que mostró mayor diferencia con respecto a los demás meses (fig. 5, a). Septiembre registro los promedios más altos con de $6.72 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ en riego al 60% y con $6.91 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ en riego al 100%. El mes con los menores promedios de fijación de CO₂ fue octubre, con $2.39 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ en riego al 60% y $2.55 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ en riego al 100%.

El análisis estadístico aplicado a los resultados de conductancia estomática ($p < 0.0001$), mostró que julio (el primer mes de muestreo), presentó la mayor diferencia significativa, con los promedios de $0.0408 \text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ para riego al 60% y $0.0467 \text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ para riego al 100%, siendo los máximos valores. En contraste, diciembre presentó los valores mínimos con $0.0033 \text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ en riego al 60% y $-0.0006 \text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ en riego al 100% (fig. 5, b).

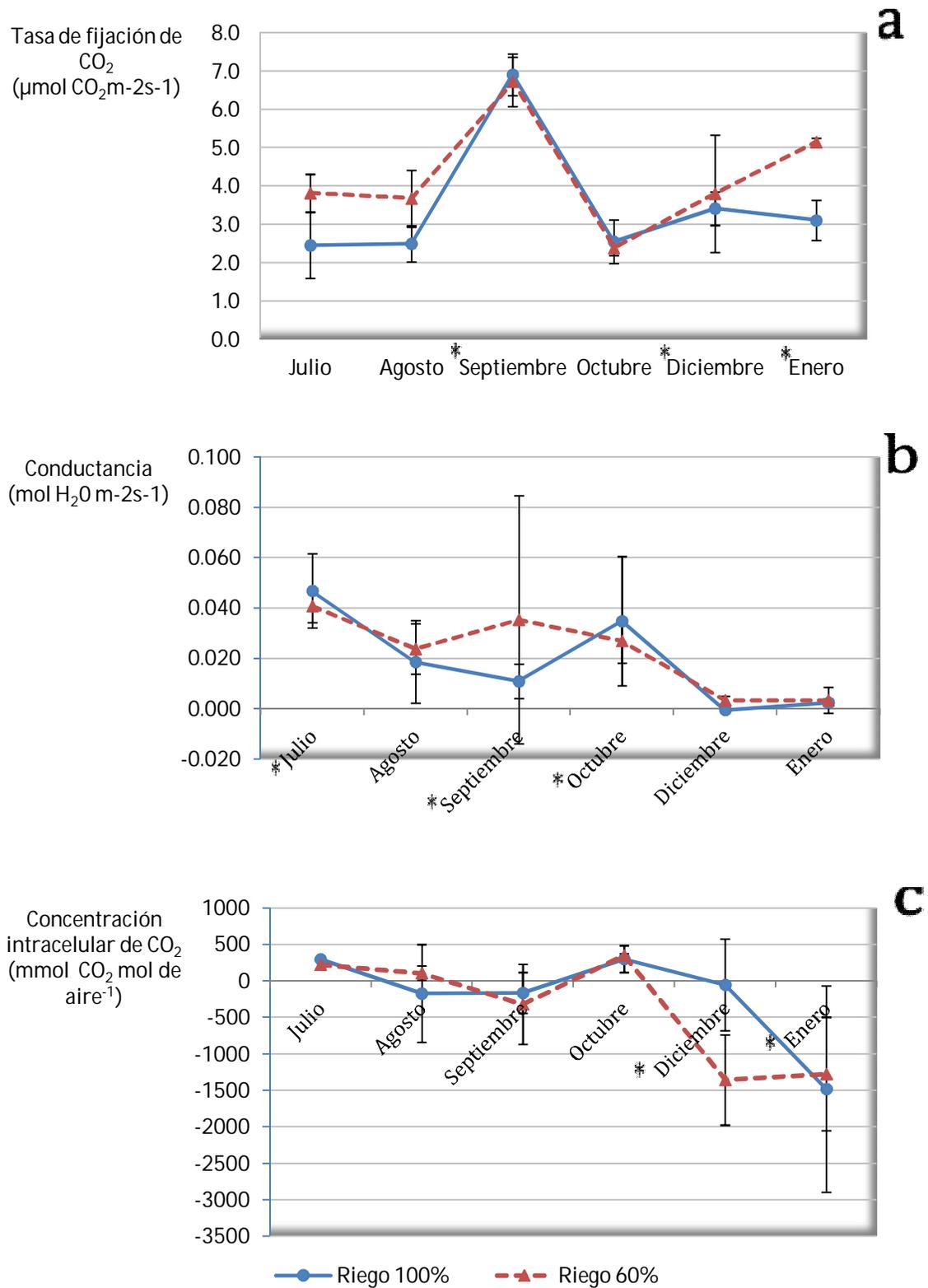


Figura 5. Promedios de tasa de fijación de CO_2 (a), conductancia estomática (b) y concentración interna de CO_2 (c), registrados de julio de 2008 a enero de 2009 en nave con sombra al 70%. El * indica diferencias estadísticas entre meses de muestreo.

Con relación a los resultados de concentración interna de CO₂, se presentaron en la mayoría de los meses valores negativos ($p \leq 0.0002$). El mes de octubre presentó las mayores concentraciones 348.33 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol de aire}^{-1}$ en riego al 60% y 298.77 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol de aire}^{-1}$ en riego al 100%. En comparación, el mes de enero fue el que registro los valores más negativos de todo el experimento y por ende el que mostro mayor diferencia estadística, con -1276.85 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol de aire}^{-1}$ en riego al 60% y con -1483.33 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol de aire}^{-1}$ para riego al 100% (fig. 5, c).

Análisis de metabolitos secundarios

El análisis del contenido de metabolitos en las muestras de *C. tortuosa*, permitió confirmar la presencia de compuestos polifenólicos del tipo flavonoides, que previamente se han reportado en esta especie. Fueron identificados de acuerdo con el tiempo de retención y sus absorbancias, estos corresponden al fisetinidol A y B, y la fisetina, ambos compuestos con importancia biológica relevante y con una concentración aceptable durante todo el análisis (fig. 6).

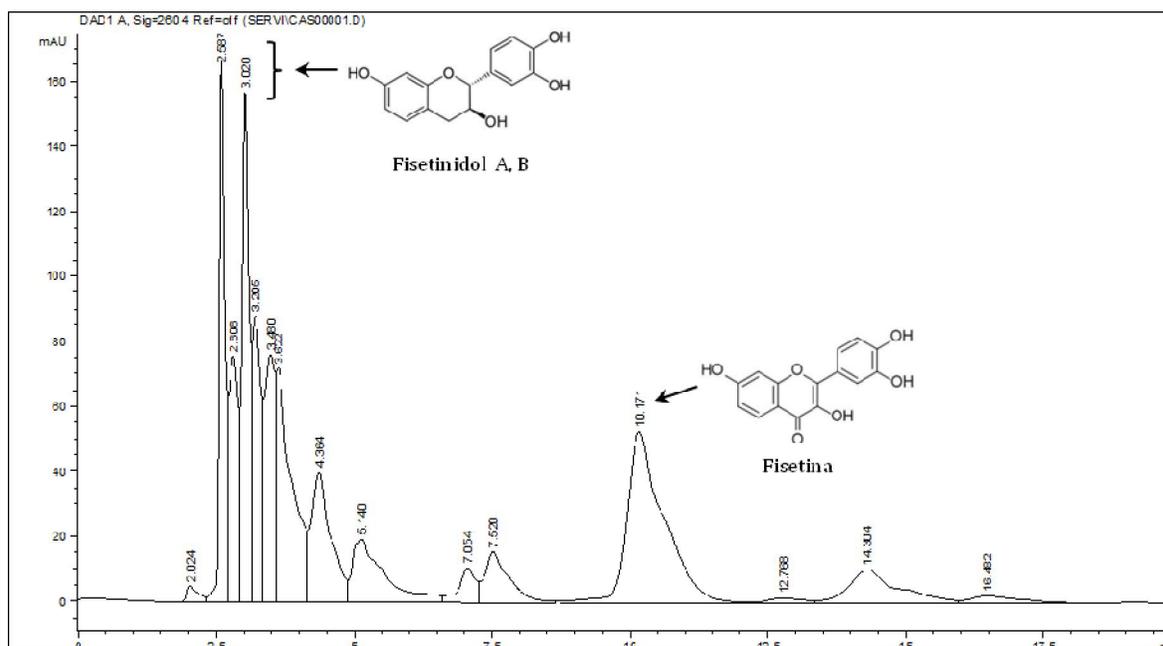


Figura 6. Cromatograma de los flavonoides encontrados: fisetinidol A: 2.6min (226, 238, 300, 326mAU), fisetinidol B: 3.0min (230, 246, 298, 326mAU) y fisetina: 10.1min (234, 256, 292, 356mAU). Se ejemplifica su estructura química.

La elucidación de la flavanona fisetinidol (A y B) y el cálculo de su concentración se realizaron de acuerdo con lo reportado por Kubo *et al.* (1993) y Hatano *et al.* (1997). Para calcular la concentración del fisetinidol (A y B) se utilizó el coeficiente de extinción $26,302\text{mol}^{-1}$ (Hatano *et al.*, 1997).

Con respecto a la concentración de los flavonoides A, B y fisetina, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de riego al 60% y riego al 100%, pero si entre los meses de muestreo, en el cuadro 6 se resume el análisis estadístico aplicado a los resultados.

Cuadro 6. Resumen del Análisis de Varianza de los Flavonoides encontrados bajo tratamientos de riego 60% y 100% CC y de los meses de muestreo (ns = no significante)

	Efecto	SC	GL	CM	F	p
	Riego					
1	Fisetinidol A	1501.2809	1	1501.2809	1.2399	ns
2	Fisetinidol B	402.7939	1	402.7939	2.1773	ns
3	Fisetina	3.9173	1	3.9173	0.1918	ns
	Meses					
1	Fisetinidol A	38931.637	6	6488.606	14.5628	<0.0001
2	Fisetinidol B	5422.7847	6	903.7975	10.6177	<0.0001
3	Fisetina	532.5592	6	88.7599	8.8545	<0.0001

El fisetinidol A, es el compuesto que presentó a lo largo de toda la fase experimental las mayores concentraciones (Fig. 7, a). Octubre registró los valores más altos con 110.70mg/g de tejido en riego al 60% y con 130.33mg/g de tejido en riego al 100% ($p < 0.0001$). Los valores más bajos, se registraron en noviembre con 43.78mg/g de tejido en riego al 60% y con 43.11mg/g de tejido en riego al 100%.

El fisetinidol B (fig. 7, b), también reportó en el mes de octubre las mayores concentraciones con 32.88mg/g de tejido en riego al 60% y con 39.46mg/g de tejido en riego al 100% ($p < 0.0001$). Los valores mínimos los registró el mes de noviembre con 9.77mg/g de tejido en riego al 60% y con 10.21mg/g de tejido para riego al 100%.

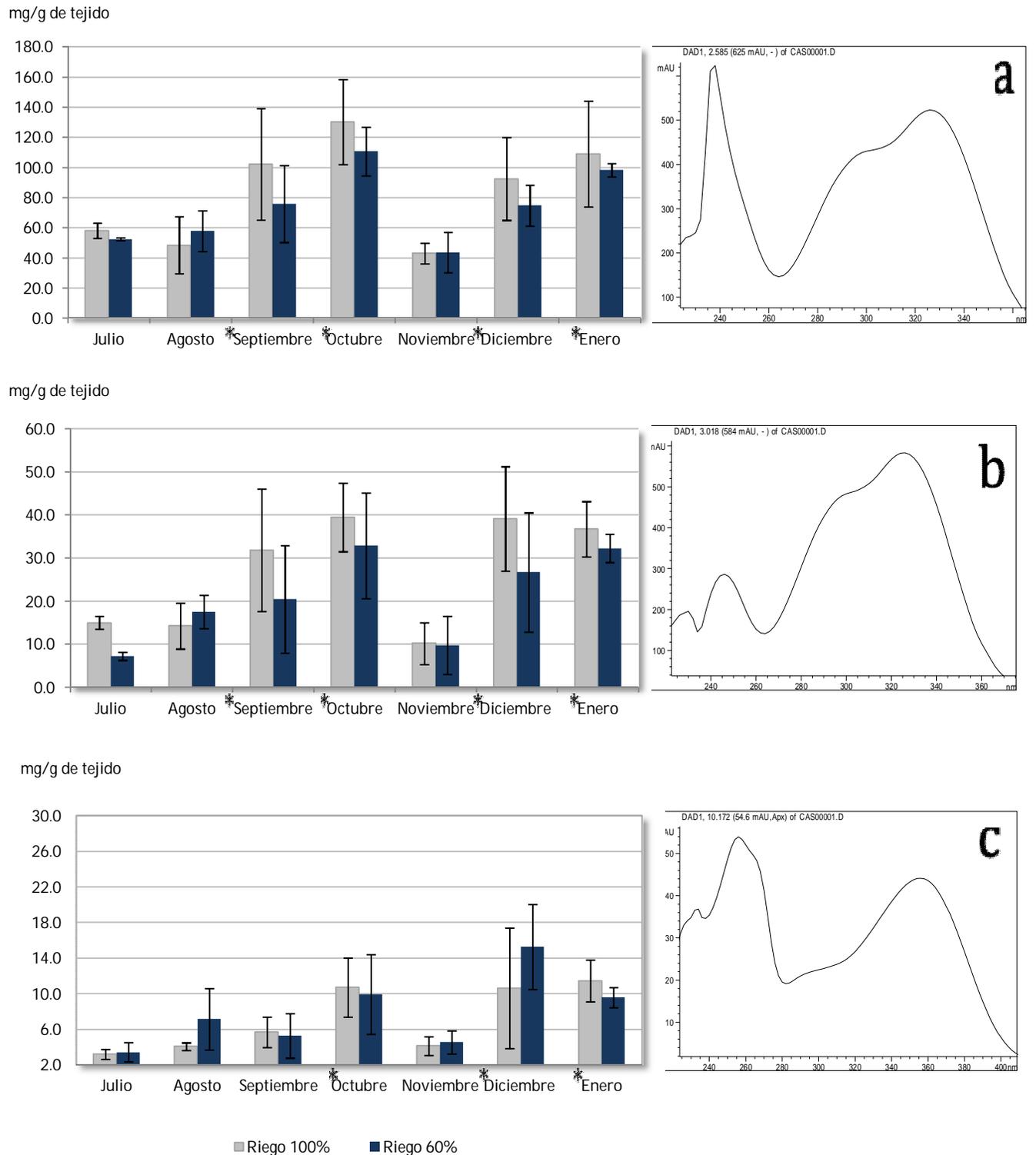


Figura 7. Promedios de concentración de la flavanona fisetinidol A (a), fisetinidol B (b) y el flavonol fisetina (c) y sus cromatogramas, bajo los tratamientos de riego 100% y 60%. El * indica diferencias significativas entre meses de muestreo.

El flavonol fisetina y su concentración (fig. 7, c) fueron identificadas de acuerdo con lo reportado por Rijke *et al.* (2006), con un coeficiente de extinción de $15,000\text{mol}^{-1}$. La fisetina es el flavonoide que registró las menores concentraciones a lo largo de la fase experimental. Los valores más altos de este compuesto, se encontraron en el mes de diciembre con 15.27mg/g de tejido en riego al 60% y con 10.63mg/g de tejido para riego al 100% ($p < 0.0001$). Los valores más bajos se registraron en el mes de julio con 3.435mg/g de tejido en riego al 60% y con 3.207mg/g de tejido en riego al 100%.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten reconocer las características que presenta *C. tortuosa* para su germinación y sobrevivencia, así como el efecto de las condiciones de cultivo sobre la acumulación de metabolitos secundarios.

El ensayo previo de escarificación, ayudó a determinar que el tratamiento más adecuado para la germinación de las semillas de *C. tortuosa*, se obtiene cuando las testas son tratadas con ácido sulfúrico concentrado. Dicho tratamiento es suficiente para permitir la imbibición de la testa y ofrece una escarificación más rápida en comparación con la mecánica, ya sea con agentes abrasivos (lija) o punzo cortantes (tijeras) (Mendoza, 2006), y protege de daño mecánico al embrión.

Con relación a los resultados de germinación, Mendoza (2006) reporta porcentajes de 70% para semillas recién colectadas y un 23% para el caso de semillas almacenadas por un año, datos que contrastan con lo encontrado en este estudio, ya que el lote de semillas con menor tiempo de almacenamiento disminuyó en mayor proporción la viabilidad (40.31% de germinación).

No obstante que la germinación obtenida fue baja, asincrónica y que mantuvo etapas de emergencia discontinuas, en ningún sentido se consideró despreciable. En tratamientos alternativos como hipoclorito de sodio, escarificación mecánica y aplicación de giberelinas, no se tienen registrados porcentajes mayores para esta especie (Mendoza, 2006). Pese a ello, *Simarouba glauca* especie de la misma familia de *C. tortuosa*, presentó un incremento en el porcentaje y disminución en el tiempo de germinación cuando las semillas fueron escarificadas mecánicamente y sumergidas en ácido giberélico (Patil y Gaikwad, 2011).

Los porcentajes obtenidos en *C. tortuosa* se asociaron principalmente en función de la dureza de la testa y por un probable comportamiento de latencia, que también han presentado otras especies de la misma familia (Patil y Gaikwad, 2011). En este

sentido, se ha demostrado que semillas con testa o endospermo duros, y sobre todo en cubiertas con un endocarpio grueso, duro e indehisciente, la demora de la germinación puede atribuirse a que estos tejidos oponen resistencia mecánica al crecimiento del embrión. Estas semillas también presentan latencia fisiológica, inhibidores en las cubiertas o ambas cosas, lo que afecta enormemente la fuerza que puede desarrollar el embrión (Camacho, 1994).

Cabe mencionar que el diseño experimental y los datos obtenidos a partir de este trabajo, no permiten establecer algún tipo de comportamiento ecofisiológico de las semillas. Sin embargo, es probable que las características de rigidez y resistencia de la testa, sean una estrategia de latencia en la semilla que limita la germinación hasta el momento de una escarificación gástrica efectiva. Pese a esta hipótesis, Mendoza y Godínez (2007) reportan que las semillas de *C. tortuosa* encontradas en excretas de zorros, coyotes, mapaches y cacomixtles, depredadores naturales de esta especie, no incrementan significativamente su germinabilidad, obteniendo porcentajes menores al 10%.

Adicionalmente, Mendoza (2006) reporta una sobrevivencia nula para plántulas de *C. tortuosa* establecidas en campo bajo sombra de arbustos de la misma especie, y establecidas a pleno sol. La sobrevivencia de las plántulas de este trabajo fue mayor, este aumento puede estar favorecido por factores como la sombra proporcionada (al 70%) y la adición de solución nutritiva durante los primeros días de establecimiento, por lo que la reproducción bajo condiciones de invernadero garantiza el crecimiento de esta especie y así también su conservación.

Por otro lado, con relación a los registros de los parámetros de productividad (tasa neta de asimilación, concentración interna de CO₂ y conductancia estomática), se observa que los tratamientos de riego al 60% y 100% de la capacidad de campo aplicados a las plantas de *C. tortuosa*, no mostraron diferencias significativas (figura 5 y cuadro 5). Este comportamiento puede ser explicado en función de las adaptaciones que presenta *C. tortuosa* para tolerar condiciones de falta de agua. Previamente se ha

documentado que esta especie tiene una amplia distribución en zonas áridas de México (Medina y Chiang, 2001).

Es probable que el riego al 60% no fuera lo suficientemente estresante para reducir los parámetros de fijación de CO₂, los cuales si mostraron cambios a través de los meses, encontrando las mayores tasas fotosintéticas en el mes de septiembre. Así mismo, los resultados obtenidos de mayor actividad de fotosíntesis concuerdan con el comportamiento fenológico reportado para la especie, en el cual se reconocen etapas de fructificación de febrero a junio y de septiembre a noviembre (Mendoza y Godínez, 2007) y concuerda con la disponibilidad de las especies en campo (Rosas, 2003), determinada principalmente por la época de lluvias (de abril a octubre en Coxcatlán), siendo el mes de septiembre el más productivo. Lo anterior, es tomado en cuenta pese a que las plantas de este estudio se encontraban en las primeras etapas de vida, lo que hace más difícil una diferenciación fisiológica.

En este mismo sentido, se ha reportado que *C. tortuosa* presenta un metabolismo C3 (Moreno, 2009), al igual que *Ailanthus altissima* especie de la misma familia. En este tipo de metabolismo la regulación estomática no es muy fina, el cierre de los estomas no es rápido ni eficaz frente a cambios de luminosidad o concentración de CO₂ (Taiz y Zeiger, 2006). Se puede observar que la concentración interna de CO₂ (fig. 5) obtiene los valores más negativos en los meses donde se presenta la ausencia de lluvias, disminuyendo la humedad ambiental, esto puede estar determinado por el cierre de estomas para evitar la pérdida de agua (Taiz y Zeiger, 2006).

Con respecto a la acumulación de los flavonoides (figura 7), se puede observar que en el mes de noviembre las concentraciones de fisetinidol A, B, y fisetina disminuyeron. Esto puede estar ocasionado por la finalización de la época de lluvias en el mes de octubre, además de una disminución en temperatura y horas-luz-día; encontrando un incremento posterior como respuesta a determinados factores como al aumento de la edad de la planta y la época del año (época de secas). Pese a ello, el aumento que se observa en la concentración de todos los compuestos en los meses de diciembre y

enero, no corresponde con la acumulación derivada del desarrollo de la planta, sino con un proceso de concentración del metabolito por la disminución en el contenido de humedad de las hojas, provocando deshidratación del tejido y elevación en la concentración específica de los flavonoides (Sisa *et al.*, 2010; Taiz y Zeiger, 2006).

Las variaciones en los contenidos de flavonoides encontrados en este trabajo se pueden entender en función de los efectos ambientales y genéticos que han sido asociados con la producción de metabolitos. Como ya se había mencionado, la calidad y productividad en los cultivos de plantas medicinales, están determinadas por diversos factores. De estos, los factores genéticos afectan directamente la producción de los principios activos a nivel de su metabolismo secundario debido a la expresión genética de la planta; los factores ontogénicos afectan la concentración y composición de los principios activos de acuerdo con la edad y el nivel de desarrollo, por ejemplo, se sabe que plantas muy jóvenes o muy viejas pueden tener menor concentración de principios activos, y que estos compuestos se localizan preferencialmente en determinadas partes u órganos. Además, los factores ambientales pueden influir directamente en la expresión de los genes de acuerdo con las condiciones climáticas, época del año, ataque de plagas, tipo de suelo, etc. (Tomás y Robins, 1997; Lambers *et al.*, 1998; Sharapin y Pinzón, 2000; Ocegueda *et al.*, 2005). Por lo anterior, la concentración y tipo de flavonoides encontrados en este estudio, puede estar directamente relacionada con la corta edad de las plantas muestreadas.

En el caso del fisetinidol A y B, se puede decir que son moléculas con una gran polaridad y que probablemente se encuentren glucosiladas, por eso su aparición durante los primeros minutos del análisis espectrográfico presentando altas concentraciones (Kubo *et al.*, 1993).

El fisetinidol A, como ya se había mencionado, es el flavonoide que registró la mayor concentración durante todo el experimento (figura 7, a). Este polifenol está caracterizado por tener propiedades protectoras contra los rayos UV y actividad antioxidante (Sisa *et al.*, 2010; Taiz y Zeiger, 2006), sin embargo, con los resultados

obtenidos no se puede establecer una relación clara entre la acumulación del metabolito y una condición de estrés hídrico o lumínico.

En contraste, las variaciones observadas de este compuesto concuerdan con el desarrollo vegetativo y las etapas fenológicas reportadas para la especie, ya que el fisetinidol registra la mayor concentración en el mes de octubre cuando cesan las lluvias y se presenta una disminución en temperatura y horas-luz-día. En el caso de plantas adultas, es en este mismo mes donde se tiene reportada la segunda etapa de floración y fructificación (Mendoza y Godinez, 2007). Así mismo, se observa una drástica disminución del compuesto en el mes de noviembre cuando se agudiza más la disminución de horas-luz-día marcando la época invernal. En el caso de plantas de mayor edad, se puede suponer que es en este mes donde se lleva a cabo el proceso de llenado del fruto, y por tanto la translocación de la planta se orienta hacia el esfuerzo reproductivo.

Por otra parte, el aumento en la concentración de la fisetina, pese a ser el compuesto que reportó las menores concentraciones, puede estar relacionado a la acción de este flavonol como respuesta a un factor ambiental estresante (hídrico) y como agente antioxidante. El tipo de flavonol de la fisetina presenta una mayor actividad de antioxidante por la conjugación completa de sus anillos. Este tipo de flavonoles están más relacionados con una tolerancia al estrés oxidativo inducido por el déficit de agua y el aumento de las concentraciones de antioxidantes y enzimas implicadas en el metabolismo oxidativo, las cuales juegan un papel crítico en la protección celular y la tolerancia a la desecación (Black y Pritchard, 2002), lo cual no ocurre con ninguno de los tipos de fisetinidol reportados en este trabajo.

Los tres flavonoides encontrados en este estudio son de suma importancia desde el punto de vista medicinal, ya que se tiene reportada su actividad protectora contra enfermedades asociadas con estrés oxidativo como el Alzheimer, arteriosclerosis, cáncer y el envejecimiento (Sisa *et al.*, 2010).

CONCLUSIONES

Para obtener porcentajes de germinación aceptables, las semillas de *C. tortuosa* requieren un rompimiento efectivo de la testa para permitir una mejor imbibición.

El mayor porcentaje de germinación lo obtuvo el lote de semillas con mayor tiempo de almacenamiento (6 años), por el contrario, el menor porcentaje de germinación lo obtuvo el lote de las semillas recién colectadas.

Se registró una sobrevivencia aceptable de *C. tortuosa*, debido principalmente a las condiciones en invernadero y a una adaptación desde el inicio de la germinación, en el lugar de su establecimiento.

Los parámetros fisiológicos de tasa de fijación CO₂, concentración interna de CO₂ y conductancia estomática, no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos de riego al 60% y 100% de capacidad de campo, pero sí entre los meses de muestreo.

En el presente trabajo se identificó la presencia de tres tipos de flavonoides, las flavanonas fisetinidol A y B, y el flavonol fisetina.

Los tratamientos de riego no mostraron tener efecto sobre la concentración de los flavonoides cuantificados en este proyecto.

Se concluye que la concentración de metabolitos en *C. tortuosa*, se asocia principalmente con los procesos de desarrollo vegetativo y las etapas fenológicas de la especie.

REFERENCIAS

-  Betancourt, A.S.Y. y Gutiérrez D., M.A. 1999. Proyecto Mercados Verdes Herbolarios. Informe técnico final. Fondo de América del Norte para la Cooperación Ambiental (FANCA), Ecología y Desarrollo de Tlaxcala y Puebla A.C. México, D.F. 250 pp.
-  Black, M. y H. W. Pritchard. 2002. Desiccation and survival in plants: drying without dying. Wallingford. 412 pp.
-  Blanckaert, I., R. L. Swennen, M. Paredes Flores, R. Rosas López y R. Lira Saade. 2004. Floristic composition, plant uses and management practices in homegardens of San Rafael Coxcatlán, Valle de Tehuacán-Cuicatlán, México. *Journal of Arid Environments* 57: 39-62.
-  Calzado, F., C., 1995. Actividad citotóxica de la chaparrina *in vitro* sobre *Entamoeba histolytica* y fibroblastos diploides humanos. Tesis de maestría. Facultad de ciencias biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. 42 pp.
-  Calzado, F., C., Verde, S. J., Morales, V. M. y Segura, L. J. J. 2000. Possible Inhibition of *Entamoeba invadens* Encystation by *Castela texana*. *Archives of Medical Research* 31:S196-S197.
-  Calzado, F., C., Hurtado-Ramírez, M. B., Flores-Villanueva, Z., Verde-Star, M. J., Segura-Luna, J. J. 2002. Preliminary morphological study of the effects produced by a methanolic extract of *Castela texana*. *Proceedings of the West Pharmacology Society* 45: 161.
-  Camacho, M. F., 1994. Dormición de semillas, causas y tratamientos. Editorial Trillas. México.
-  Canales, M., M. M. 2005. Base fitoquímica del uso tradicional de plantas para el tratamiento de enfermedades de posible origen bacteriano en San Rafal Coxcatlán, Puebla. Tesis Doctorado en Ciencias Biológicas. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. México. 144 pp.

- Canales, M., Hernández, T., Caballero, J., Romo de Vivar, A., Avila, G., Durán, A., Lira, R. 2005. Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael, Puebla, México. *Journal of Ethnopharmacology*. 97: 429-439.
- Canales, M., Hernández, J., Caballero, A., Romo de Vivar, A., Duran, A. y Lira, R. 2006. Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional de las plantas medicinales de San Rafael, Coxcatlán, Valle de Tehuacán- Cuicatlán, Puebla, México. *Acta Botánica* 75: 21-46.
- Chaudhuri, S. K. y Kubo, I. 1992. Two quassinoids glucosides from *Castela tortuosa*. *Phytochemistry* 31(11): 3961-3964.
- Cronquist, A. 1945. Additional notes on the Simaroubaceae. *Brittonia* 5: 469-470.
- Davidson T.A., Hollands T. R., De Mayo P.O., Nisbet M. 1965. Glaucarubolona from *Castela texana*. *Canadian Journal of Chemistry* 43: 2996.
- Dávila, P. J. L., Villaseñor, R., Medina, A., Ramírez, A., Salinas, J., Sánchez-Ken, Y., Tenorio, P. 1993. Listado Florístico de México. X. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Instituto de Biología, UNAM, México.
- Dávila, P., Arizmendi, M. del C., Valiente-Banuet, A., Villaseñor, J. L., Casas, A., Lira, R. 2002. *Biological diversity in the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Mexico*. *Biodiversity and Conservation* 11: 421-442.
- Díaz de León, C. C. 2005. Revisión sobre los nortriterpenos aislados de la familia Simaroubaceae, y sobre un arbusto medicinal mexicano "chaparro amargoso" (*Castela erecta* subsp. *texana*). Facultad de Química. UNAM. México.
- Dou, J., McChesney J., Sindelar R., Goins K., Walker L. 1996. A new quassinoid from *Castela texana*. *Journal of Natural Products* 59:13-76.
- Durán, D. A., Vargas, V. A., Cisneros, C. A. 2004. Bioestadística. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. México.
- Ellis, R.H.; Hong, T.D.; and E.H. Roberts. 1985. Handbook of seed technology for genebanks (IPGRI). Vol. I. Principles and methodology. Handbooks for Genebanks No.2 International Board for Plant Genetic Resources. IPGRI. Rome.

-  Fupen, O. 2006. Busca propagar plantas medicinales. Alternativas de solución a la sobreexplotación, en Expreso de Sonora. 12-01-2006.
-  García, E. 1973. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köeppen. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. 2ª. Edic. 246 pp.
-  Gardening, 2013. <http://es.gardening.eu/arc/plantas/Arboladuras/Castela-tortuosa-Liebm/13011/> Última revisión: febrero 2013.
-  Geissman T. A., Ellestad G.A. 1962. The structure of chaparrin and a note on glaucarubol, Tetrahedron Letters 23: 1083-1088.
-  Harborne, J. B. 1998. Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant análisis. 3a ed. Chapman and Hall. London.
-  Hatano, T., Yamashita, A., Hashimoto, T., Ito, H., Kubo, N., Yoshiyama, M., Shimura, S., Itoh, Y., Okuda, T., Yoshida, T. 1997. Flavan dimers with lipase inhibitory activity from *Cassia noname*. Phytochemistry, Vol. 46, No. 5, pp. 893-900.
-  INEGI. 2009. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos, Coxcatlán, Puebla. Clave geoestadística 21035. <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/datos-geograficos/21/21035.pdf>
-  Kubo, I., Murai, Y. y Chaudhuri, K. 1992. Structure of Chaparramarin, a quassinoid from *Castela tortuosa*. Phytochemistry 31(9): 3262-3264.
-  Kubo I. y Chaudhuri S. 1993. A Quassinoid glucoside from the bark of *Castela tortuosa*. Phytochemistry 32: 215-217.
-  Kubo, I., Murai, Y. y Chaudhuri, K. 1993. Castelalin, a quassinoid from *Castela tortuosa*. Phytochemistry 33(2): 61-463.
-  Lambers, H., Chapin, F. S., Pons, T. L. 1998. Plant physiological ecology. Springer USA: 427 pp.
-  Lira, R. 2001. Los recursos vegetales del Valle de Tehuacán-Cuicatlán desde una perspectiva etnobotánica. Informe técnico. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 9 pp.

-  Martínez, M. 1992. Las Plantas Medicinales de México. 5ª ed. Botas. México. p 100-103.
-  Medina, R. y Chiang F. 2001. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Simaroubaceae A. DC. Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México. 32: 1-5 pp.
-  Meléndez P., I. C. 2006. Evaluación y comparación de la actividad antimicrobiana de *Castela tortuosa* (Liebm) de dos zonas de Zapotitlán Salinas, Puebla. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. México. 211 pp.
-  Mendoza O., L. M. 2006. Características demográficas de *Castela tortuosa* Liebm en dos terrazas aluviales con distinto grado de deterioro en el Valle de Zapotitlán de las Salinas, Puebla. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. México. 42 pp.
-  Mendoza O., L. M. y Godínez A., H. 2007. El chaparro amargoso, ¿atrapado sin salida?. Ciencias Abril-Junio 86:34-36.
-  Mitchell R. E., Stocklin W., Stefanovic M., Geissman T.A. 1971. Chaparrolide and catelanolide, new bitter principles from *Castela nicholsoni*. Phytochemistry 10: 411-417.
-  Moreno R., A. 2009. Perfiles de acumulación de metabolitos secundarios en 3 especies medicinales de San Rafael, Coxcatlán, Puebla, bajo diferentes prácticas de cultivo. Tesis Maestría en Ciencias Biológicas. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. México.
-  Patil, M. S. y D. K., Gaikwad. 2011. Effect of plant growth regulators on seed germination of oil yielding plant *Simarouba glauca* DC. Plant Sciences Feed 1(5): 65-68.
-  Ocegueda, S., Moreno, E., y Koleff, P. 2005. Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. Biodiversitas Conabio. México. Núm. 62: 12.

-  Reyes, L. M., Villa, T. S., Arriaga, A. M., Alemán, L. L., Rodríguez, M. M., Arias, C. C., Fattel, F. S. y de la Garza, M. 2005. The amoebicidal aqueous extract from *Castela texana* possesses antigenotoxic and antimutagenic properties. *Toxicology in Vitro* 91-97.
-  Rijke, E., Pieter, O., Wilfried, M. A. N., Ariese, F., Gooijer, C., y Udo A. Th. Brinkman. 2006. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1112: 31-63.
-  Rojas A., M. y Vázquez Y., C. 2000. Cactus seed germination: a review. *Journal of Arid Environments* 44: 85-104.
-  Rosas, L. R. 2003. Estudio etnobotánico de San Rafael-Coxcatlán. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Tlalnepantla, México. 94 pp.
-  Rzedowski, J., 2006. Vegetación de México. 1a. Edición digital, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México. 504 pp.
-  Sánchez G., A. 1990. Factores ecológicos y culturales en la distribución de las plantas medicinales del genero *Castela spp.* y *Argemone ssp.* Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, México.
-  Sharapin, N y Pinzón, S. R. 2000. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Quebecor-impreades. Colombia.
-  Sisa, M., Bonnet, S. L., Ferreira, D. y J. H. V. Westhuizen. 2010. Photochemistry of Flavonoids. *Molecules* 15: 5196-5245.
-  Standley, P. C. 1923. Simaroubaceae. *Contr. U.S. Natl. Herb.* 23(3): 539-540.
-  Stocklin W. y Geissman T.A. 1970. Glaucarubol and glaucarubol-15isovalerate from *Castela nicholsoni*. *Phytochemistry* 9: 1887-1889.
-  Stocklin W., Stefanovic M., Geissman T.A. 1970. Amarolide, isolation from *Castela nicholsoni* Hook and revision of its structure. *Tetrahedron letters* 27: 2399-2402.
-  Taiz, L. y E. Zeiger. 2006. *Plant Physiology: secondary metabolites and plant defense*. 4a Ed. Sinauer Associates.
-  Tomas, B. y R. J. Robins. 1997. *Phytochemistry of fruit and vegetables*. Oxford University Press, USA.

-  Turgut, D., N. y R. S. Vazquez. 2005. Effect of water stress on plant growth and thymol and carvacrol concentrations in Mexican oregano grown under controlled conditions. *Journal of Applied Horticulture*, 7(1): 20-21.
-  Zárate A., M. A., 1984. Germinación de dos especies medicinales Cuachalate (*Amphipterygium adstringens*) y chaparro amargoso (*Castela tortuosa*). Tesis Ing. Agrónomo Fitotecnista, UACH, México, 59 pp.

APÉNDICE

a) Análisis Estadísticos de Parámetros fisiológicos

1. Tasa de fijación de CO₂

Cuadro de ANOVA de los datos de la Tasa de fijación de CO₂ durante los meses de muestreo.

Efecto	SC	GL	CM	F	p
Entre grupos	71.6094	5	14.3219	18.8806	<0.0001
Dentro de los grupos	22.7565	30	0.7585		
Total	94.3659	35			

Cuadro de Prueba LSD de los datos de la Tasa de fijación de CO₂ durante los meses de muestreo (números en negritas=diferencias significativas) LSD= 1.0268

Meses	Octubre	Agosto	Julio	Diciembre	Enero	Septiembre
	<i>2.470</i>	<i>3.087</i>	<i>3.138</i>	<i>3.612</i>	<i>4.128</i>	<i>6.818</i>
Octubre		0.6170	0.6680	1.1417	1.6583	4.3483
Agosto	0.6170		0.0520	0.5250	1.0417	3.7317
Julio	0.6680	0.0520		0.4733	0.9900	3.6800
Diciembre	1.1417	0.5250	0.4733		0.5167	3.2067
Enero	1.6583	1.0417	0.9900	0.5167		2.6900
Septiembre	4.3483	3.7317	3.6800	3.2067	2.6900	

2. Conductancia

Cuadro de ANOVA de los datos de Conductancia durante los meses de muestreo.

Efecto	SC	GL	CM	F	P
Entre grupos	71.6094	5	14.3219	18.8806	<0.0001
Dentro de los grupos	22.7565	30	0.7585		
Total	94.3659	35			

Cuadro de Prueba LSD de los datos de Conductancia durante los meses de muestreo (números en negritas=diferencias significativas) LSD= 0.0207

Meses	Diciembre	Enero	Agosto	Septiembre	Octubre	Julio
	<i>0.001</i>	<i>0.003</i>	<i>0.021</i>	<i>0.023</i>	<i>0.031</i>	<i>0.044</i>
Diciembre		0.0014	0.0197	0.0216	0.0294	0.0424
Enero	0.0014		0.0183	0.0202	0.0280	0.0409
Agosto	0.0197	0.0183		0.0020	0.0098	0.0227
Septiembre	0.0216	0.0202	0.0020		0.0078	0.0207
Octubre	0.0294	0.0280	0.0098	0.0078		0.0129
Julio	0.0424	0.0409	0.0227	0.0207	0.0129	

3. Concentración interna de CO₂

Cuadro de ANOVA de los datos de Concentración interna de CO₂ durante los meses de muestreo.

Efecto	SC	GL	CM	F	P
Entre grupos	14503903.69	5	2900780.74	7.0020	0.0002
Dentro de los grupos	12428390.80	30	414279.69		
Total	26932294.49	35			

Cuadro de Prueba LSD de los datos de Concentración interna de CO₂ durante los meses de muestreo (números en negritas=diferencias significativas) LSD= 758.8255

Meses	Enero	Diciembre	Septiembre	Agosto	Julio	Octubre
	<i>1517.166</i>	<i>707.000</i>	<i>243.284</i>	<i>34.743</i>	<i>257.000</i>	<i>323.550</i>
Enero		810.166	1273.882	1482.4227	1774.166	1840.716
Diciembre	810.166		463.716	672.257	964.000	1030.550
Septiembre	1273.882	463.716		208.541	500.284	566.834
Agosto	1482.423	672.257	208.541		291.743	358.293
Julio	1774.166	964.000	500.284	291.743		66.550
Octubre	1840.716	1030.550	566.834	358.293	66.550	

b) Análisis Estadísticos de flavonoides

4. *Fisetinidol A*

Cuadro de ANOVA de los datos de la flavanona Fisetinidol (A) durante los meses de muestreo.

Efecto	SC	GL	CM	F	p
Entre grupos	38931.637	6	6488.606	14.5628	<0.0001
Dentro de los grupos	18267.932	41	445.559		
Total	57199.569	47			

Cuadro de Prueba LSD de los datos de la flavanona Fisetinidol (A) durante los meses de muestreo (números en negritas=diferencias significativas) LSD= 24.6297

	Noviembre	Agosto	Julio	Diciembre	Septiembre	Enero	Octubre
	<i>43.445</i>	<i>53.279</i>	<i>55.381</i>	<i>83.687</i>	<i>89.055</i>	<i>103.738</i>	<i>120.514</i>
Noviembre		9.835	11.936	40.242	45.611	60.294	77.069
Agosto	9.835		2.101	30.408	35.776	50.459	67.234
Julio	11.936	2.101		28.306	33.675	48.358	65.133
Diciembre	40.242	30.408	28.306		5.368	20.051	36.827
Septiembre	45.611	35.776	33.675	5.368		14.683	31.459
Enero	60.294	50.459	48.358	20.051	14.683		16.776
Octubre	77.069	67.234	65.133	36.827	31.459	16.776	

5. *Fisetinidol B*

Cuadro de ANOVA de los datos de la flavanona Fisetinidol (B) durante los meses de muestreo.

Efecto	SC	GL	CM	F	p
Entre grupos	5422.7847	6	903.7975	10.6177	<0.0001
Dentro de los grupos	3489.9857	41	85.1216		
Total	8912.7704	47			

Cuadro de Prueba LSD de los datos de la flavanona Fisetinidol (B) durante los meses de muestreo (números en negritas=diferencias significativas) LSD= 10.7653

	Noviembre	Julio	Agosto	Septiembre	Diciembre	Enero	Octubre
	<i>9.989</i>	<i>11.123</i>	<i>15.880</i>	<i>26.150</i>	<i>32.913</i>	<i>34.498</i>	<i>36.172</i>
Noviembre		1.134	5.891	16.161	22.924	24.509	26.183
Julio	1.134		4.757	15.027	21.790	23.375	25.049
Agosto	5.891	4.757		10.270	17.033	18.618	20.292
Septiembre	16.161	15.027	10.270		6.763	8.348	10.022
Diciembre	22.924	21.790	17.033	6.763		1.585	3.259
Enero	24.509	23.375	18.618	8.348	1.585		1.674
Octubre	26.183	25.049	20.292	10.022	3.259	1.674	

6. Fisetina

Cuadro de ANOVA de los datos del flavonol Fisetina durante los meses de muestreo.

Efecto	SC	GL	CM	F	p
Entre grupos	532.5592	6	88.7599	8.8545	<0.0001
Dentro de los grupos	410.9960	41	10.0243		
Total	943.5552	47			

Cuadro de Prueba LSD de los datos del flavonol Fisetina durante los meses de muestreo (números en negritas=diferencias significativas) LSD= 3.7135

	Julio	Noviembre	Septiembre	Agosto	Octubre	Enero	Diciembre
	<i>3.321</i>	<i>4.342</i>	<i>5.489</i>	<i>5.624</i>	<i>10.324</i>	<i>10.520</i>	<i>12.953</i>
Julio		1.0210	2.1677	2.3029	7.0031	7.1992	9.6319
Noviembre	1.0210		1.1467	1.2819	5.9821	6.1782	8.6109
Septiembre	2.1677	1.1467		0.1352	4.8354	5.0315	7.4642
Agosto	2.3029	1.2819	0.1352		4.7002	4.8963	7.3290
Octubre	7.0031	5.9821	4.8354	4.7002		0.1961	2.6288
Enero	7.1992	6.1782	5.0315	4.8963	0.1961		2.4327
Diciembre	9.6319	8.6109	7.4642	7.3290	2.6288	2.4327	