

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y
ARTES DE CHIAPAS**

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

T E S I S

Variación microclimática de metabolitos secundarios de *Epiphyllum oxypetalum* (DC.) Haw. (Cactaceae) en temporada de lluvia y de estiaje

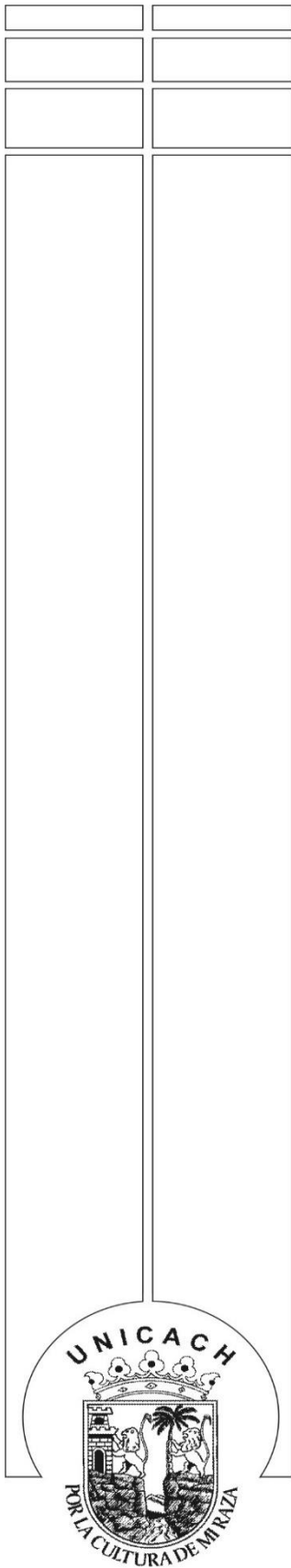
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

José Carlos Franco Jiménez

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Marzo de 2021



UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y

ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

T E S I S

Variación microclimática de
metabolitos secundarios de
Epiphyllum oxypetalum (DC.) Haw.
(Cactaceae) en temporada de lluvia y
de estiaje

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

José Carlos Franco Jiménez

Director(a)

DRA. ALMA ROSA GONZÁLEZ ESQUINCA

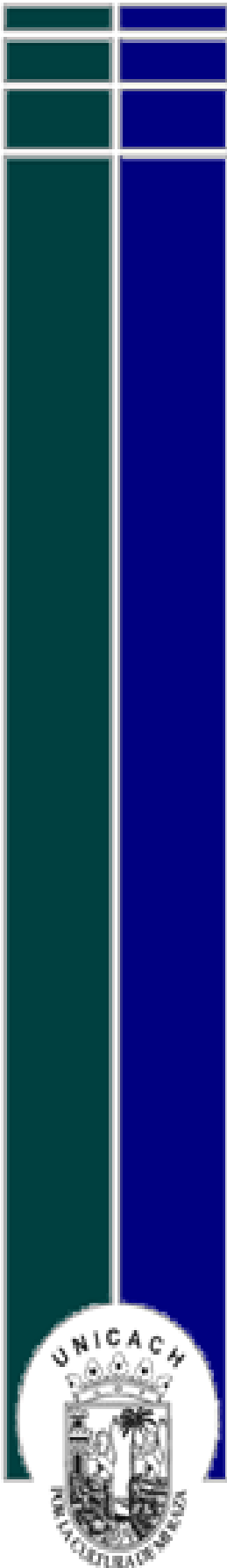
LABORATORIO DE FISIOLOGÍA Y QUÍMICA VEGETAL

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Asesor (s)

DRA. MARISOL CASTRO MORENO

LABORATORIO DE FISIOLOGÍA Y QUÍMICA VEGETAL



AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Alma Rosa González Esquinca por aceptar y dirigir este proyecto de tesis y haber confiado en mí durante todo este proceso.

A la Dra. Marisol Castro Moreno por aceptar ser mi asesora y esclarecer todas mis dudas.

A los demás integrantes del Laboratorio de Química y Fisiología Vegetal del Instituto de Ciencias Biológicas por aceptarme en su espacio, por la confianza y ayuda que me otorgaron para poder desarrollar el proyecto.

A las encargadas de los laboratorios por brindarme la facilidad de acceso al material y reactivos, sin los cuales no se hubiera podido desarrollar el tema de tesis.

DEDICATORIA

A mis padres, María de Lourdes Jiménez Vásquez y Carlos Roberto Franco Gómez, por apoyarme en cada momento de mi vida y dejarme estudiar lo que más me gusta.

A mis hermanas, abuelas, tíos y amigos por su apoyo y creer en mí siempre, por motivarme a alcanzar todas mis metas.

ÍNDICE

RESUMEN	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. Metabolitos secundarios.....	3
2.2. Metabolitos secundarios de las cactáceas.....	7
2.2.1. Alcaloides.....	7
2.2.2. Compuestos fenólicos.....	8
2.2.3. Terpenos.....	8
2.3. Clima y microclima.....	9
2.4. Ecología de los metabolitos secundarios.....	9
2.5 Familia Cactaceae.....	12
2.6 <i>Epiphyllum oxypetalum</i> (DC.) Haw.....	13
2.6.1 Posición taxonómica.....	13
2.6.2 Descripción morfológica.....	13
2.6.3 Distribución.....	14
2.6.4 Usos.....	15
2.6.5. Categorías de protección de acuerdo con la NOM-059-SEMARNAT-2010 y las listas de CITES.....	15
III. ANTECEDENTES.....	16
IV. OBJETIVOS.....	17
4.1 General.....	17
4.2 Particulares.....	17
V. ZONA DE ESTUDIO.....	18
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
6.1 Diagrama del método.....	19
6.2 Métodos.....	20
6.2.1 Obtención de plantas.....	20
6.2.2 Selección de hábitat y ubicación de plantas.....	20
6.2.3 Caracterización microclimática.....	20
6.2.4 Recolecta del material vegetal.....	20
6.2.5 Preparación del material vegetal para su extracción.....	21
6.2.6 Obtención de extractos.....	21
6.2.7 Remoción de clorofilas.....	21

6.2.8. Análisis de la riqueza y abundancia del perfil de metabolitos más característicos	21
6.2.9 Tabla de concentraciones y presencia relativa	25
6.2.10 Análisis estadístico	25
VII. RESULTADOS	26
7.1 Rendimiento de extractos	26
7.2 Condiciones microclimáticas	26
7.3 Determinación y cuantificación de metabolitos secundarios	27
7.3.1 Alcaloides	28
7.3.2 Fenoles totales	28
7.3.3 Flavonoides totales.....	30
7.3.4 Ácidos fenólicos totales	31
7.3.5 Proantocianidinas totales.....	33
7.3.6 Antocianinas totales.....	35
7.4 Análisis multivariado y de correlación	36
VIII. DISCUSIÓN	41
IX. CONCLUSIONES	46
X. PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES	47
XI. REFERENCIAS DOCUMENTALES	48
XII. ANEXOS	56
11.1 Diagramas de flujo	56
11.2 Curvas de calibración	64
11.3 Placas de cromatografía de capa fina (CCF)	66

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura química de los alcaloides a) nicotina y b) nicotiana (Alcántar, 2005).....	4
Figura 2. Aminoácidos no proteicos y sus aminoácidos proteicos análogos (Taiz y Zeiger, 2010).....	5
Figura 3. Estructura química del glucósido cianogénico amigdalina (Alcántar, 2005).....	5
Figura 4. Estructuras químicas de compuestos fenólicos (Alcántar, 2005).	6
Figura 5. Estructuras químicas de algunos terpenos involucrados en la defensa (Alcántar, 2005).	7
Figura 6. <i>Epiphyllum oxypetalum</i> , (dato en la figura)	14
Figura 7. Delimitación de la zona de estudio ubicada en el municipio de Berriozábal, Chiapas (color verde).	18
Figura 8. Diagrama general del método	19
Figura 9. Comportamiento de las variables microclimáticas.	27
Figura 10. Metabolitos secundarios totales con relación al tiempo.	28
Figura 11. Placa de sílica gel revelada con reactivo de Dragendorff correspondiente al mes de agosto, plantas de la mañana (PM), plantas de la tarde (PT).....	28
Figura 12. Concentración mensual de fenoles.	29
Figura 13. Concentración mensual de fenoles con relación al horario.....	30
Figura 14. Concentraciones mensuales de flavonoides.	30
Figura 15. Concentración mensual de flavonoides con relación al horario.	31
Figura 16. Concentración mensual de ácidos fenólicos.....	32
Figura 17. Concentración mensual de ácidos fenólicos con relación al horario.33	33
Figura 18. Concentración mensual de proantocianidinas.	34
Figura 19. Concentración mensual de proantocianidinas con relación al horario.35	35
Figura 20. Concentración mensual de antocianinas.....	35
Figura 21. Concentración mensual de antocianinas con relación al horario. ...	36
Figura 22. Escalamiento multidimensional (MDS) para los metabolitos secundarios analizados.....	38
Figura 23. Correlación entre los metabolitos secundarios y factores microclimáticos.	39

Figura 24. Correlación canónica entre los metabolitos secundarios y las variables ambientales de precipitación, radiación promedio, temperatura mínima y máxima.	40
Figura 25. Cambio en el aspecto externo e interno del área de estudio en seis meses.	45
Figura 26. Extracción metanólica	56
Figura 27. Remoción de clorofilas.	57
Figura 28. Determinación y cuantificación de alcaloides.	58
Figura 29. Determinación y cuantificación de fenoles.....	59
Figura 30. Determinación y cuantificación de flavonoides.	60
Figura 31. Determinación y cuantificación de ácidos fenólicos.	61
Figura 32. Determinación y cuantificación de proantocianidinas.	62
Figura 33. Determinación y cuantificación de antocianinas.	63
Figura 34. Curva de calibración para fenoles.	64
Figura 35. Curva de calibración para flavonoides.....	64
Figura 36. Curva de calibración para ácidos fenólicos..	65
Figura 37. Curva de calibración para proantocianidinas.....	65
Figura 38. Placa de silica gel revelada con reactivo de Dragendorff correspondiente al mes de septiembre.	66
Figura 39. Placa de silica gel revelada con reactivo de Dragendorff correspondiente al mes de octubre.	66
Figura 40. Placa de silica gel revelada con reactivo de Dragendorff correspondiente al mes de noviembre.	66
Figura 41. Placa de silica gel revelada con reactivo de Dragendorff correspondiente al mes de diciembre.....	67
Figura 42. Placa de silica gel revelada con reactivo de Dragendorff correspondiente al mes de enero.	67

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Clasificación de <i>Epiphyllum oxypetalum</i>	13
Cuadro 2. Cantidad de extracto obtenido.	26
Cuadro 3. Presencia relativa de metabolitos secundarios.	27

RESUMEN

La familia Cactaceae (cactáceas) es nativa del Continente Americano, a excepción de un género, y comprende alrededor de 125 géneros con 1 900 especies. En México se encuentran cerca de 63 géneros con 913 taxones, 669 especies y 244 subespecies. *Epiphyllum oxypetalum* (DC.) Haw. es un cactus que se encuentra creciendo en humus y como epífita en las selvas altas, medianas y bajas de los Estados de Veracruz, Oaxaca y Chiapas. No existe información que compruebe la presencia de variaciones en la diversidad de metabolitos secundarios (MS) en función de las condiciones ambientales en *E. oxypetalum*. Por ello, se planteó conocer si existe variación en la riqueza y abundancia de metabolitos secundarios producidos y si existe una relación con las condiciones ambientales durante dos temporadas, de lluvias y de estiaje.

Durante el trabajo se caracterizó el microclima del área de estudio, se colocaron y aclimataron los ejemplares de *E. oxypetalum*. Se obtuvieron extractos metanólicos de los filocladios y mediante métodos de análisis fitoquímicos se indicó la presencia de fenoles, flavonoides, ácidos fenólicos, proantocianidinas y antocianinas.

Los resultados obtenidos señalaron que durante los seis meses de trabajo (tres correspondientes a la temporada de lluvias y tres a la de estiaje) hubo presencia de fenoles, flavonoides, ácidos fenólicos, proantocianidinas y antocianinas. No existió en ninguno de los MS analizados una tendencia a disminuir o incrementar la concentración a lo largo de los seis meses. Los metabolitos con más presencia durante todo el estudio fueron los ácidos fenólicos y los de menor concentración las proantocianidinas. Durante la estación seca los fenoles simples, ácidos fenólicos y proantocianidinas estuvieron relativamente en mayor cantidad, mientras que, durante la época de lluvias, fueron los flavonoides y antocianinas. En cuanto a la correlación de las variables ambientales con las concentraciones de metabolitos secundarios, fue evidentemente mayor durante el mes de agosto. Los flavonoides y antocianinas fueron los MS que exhibieron una correlación ligera con las variables ambientales, los flavonoides con la precipitación, radiación, temperatura y las antocianinas con la temperatura. Estos resultados permitieron señalar que *E. oxypetalum* parece no presentar una variación en la riqueza de MS

pero si una variación en la abundancia, además de una relación con las variables de su medio.

Palabras claves: Cactaceae, metabolitos, microclima.

I. INTRODUCCIÓN

Los metabolitos secundarios (MS) de las plantas son compuestos químicos de bajo peso molecular derivados del metabolismo primario, que tienen importancia ecológica porque participan en los procesos de adaptación de los vegetales a su ambiente (Sepúlveda, Porta y Rocha, 2004).

Las plantas mantienen una biosíntesis activa de MS constitutivos, que además pueden variar e inducir otros MS cuando son expuestas a condiciones adversas tales como: **a)** el consumo por herbívoros (artrópodos y vertebrados), **b)** el ataque por microorganismos: virus, bacterias y hongos, **c)** la competencia por el espacio de suelo, luz y los nutrientes entre las diferentes especies de plantas, **d)** la exposición a la luz solar, estrés abiótico (Sepúlveda, Porta y Rocha, 2004), **e)** el genotipo de la planta (especie y variedad) y **f)** la velocidad de crecimiento y la madurez (Romero, Palma y López, 2000).

Las cactáceas, al igual que todas las plantas superiores, presentan un complicado proceso metabólico que da origen a la formación de muy diversos compuestos orgánicos, entre ellos, los metabolitos secundarios (Bravo y Sánchez, 1978). La familia Cactaceae está distribuida en todo el continente Americano a excepción de un género, *Rhipsalis*; desde el sudoeste de Canadá hasta el sur de la Patagonia en Argentina y Chile (Kishen *et al.*, 2015). Esta familia comprende en México cerca de 63 géneros con 913 taxones (669 especies y 244 subespecies), de las cuales, 25 géneros y 518 especies son endémicas (Guzmán, Arias y Dávila, 2003).

El género *Epiphyllum* Haw. (Cactoideae, Hylocereeae) incluye cerca de 19 especies de cactus epifitos que se pueden encontrar principalmente en Centro América y México, pero algunas pocas especies se extienden hasta el Caribe y Sudamérica. *Epiphyllum oxypetalum* (DC.) Haw., conocido como “dama de la noche” (Bravo y Sánchez, 1978), tiene una amplia distribución desde México, cruzando por todo Centroamérica hasta llegar a Brasil (Anderson, 2001). En México es posible encontrarla en los estados de Chiapas, Oaxaca y Veracruz (Meza, 2011). Su hábitat oscila de sitios expuestos en la parte superior de los hospederos

en comunidades húmedas hasta sitios forestales micrófilos más secos (Granados *et al.*, 2003).

La luz, el calor, la humedad y el movimiento del aire varían en gran medida desde un lugar del paisaje al otro e influyen en la transferencia de energía térmica y crean una amplia variedad de climas localizados. Estos microclimas definen las condiciones en las que viven realmente los organismos (Smith y Smith, 2007). Condiciones con factores físicos que pueden afectar el desarrollo de la especie y la producción de metabolitos secundarios, tanto en calidad como en cantidad (Anaya, 2003).

Las cactáceas han sido utilizadas para rituales religiosos y como medicina desde épocas prehispánicas, hecho que despertó un interés en el taxón para su estudio a nivel químico (Batis y Rojas, 2002). En 1888 se aislaron metabolitos secundarios del cactus peyote (*Lophophora williamsii*) y desde entonces comenzó una serie de trabajos sobre la diversidad de estos compuestos orgánicos en esta familia de plantas (Bruhn, 1971).

Los estudios de la composición química en los filocladios de *E. oxypetalum* demuestran la presencia de saponinas, compuestos fenólicos, esteroides, glicósidos, terpenoides y resinas, mientras que los azúcares reductores, los alcaloides, los flavonoides, los esteroides y los compuestos ácidos parecen estar ausentes (Upendra y Khandelwal, 2012).

Debido a la amplia distribución de *E. oxypetalum* y su presencia en lugares con diversas condiciones microclimáticas, es de esperarse que la diversidad y riqueza de saponinas, compuestos fenólicos, esteroides, glicósidos, taninos y terpenoides, esté también sujeta a cambios.

No existe información que documente la presencia de variaciones en la diversidad de metabolitos secundarios en función de las condiciones ambientales en *E. oxypetalum*. Por ello, en este trabajo se plantea conocer si existe variación en la riqueza y abundancia de metabolitos secundarios producidos por *E. oxypetalum* en condiciones ambientales variables durante un semestre y así aportar datos sobre estos compuestos, su interacción con el ambiente y con ello contribuir con información científica que fortalezca las teorías de la razón de ser de los metabolitos secundarios en las plantas.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Metabolitos secundarios

Todas las células vegetales realizan procesos metabólicos comunes esenciales para la vida celular y para la planta en general. Estos procesos constituyen, en su conjunto, el metabolismo primario. Además de estos procesos metabólicos primarios, se pueden desarrollar rutas biosintéticas que conducen a la formación de compuestos conocidos como metabolitos secundarios (MS) (Valares, 2011).

Se le denominan metabolitos secundarios de las plantas a los compuestos químicos de bajo peso molecular que cumplen funciones no esenciales en ellas, pero les confiere unas claras ventajas selectivas (Sepúlveda, Porta y Rocha, 2004; Valares, 2011).

Los precursores de la biosíntesis de MS se derivan de rutas del metabolismo primario, tales como la glucólisis, el ciclo de Krebs o la vía del shikimato. Una biosíntesis constitutiva y específica de MS puede existir para cada tipo de órgano, tejido o tipo celular. Existen también, MS que se biosintetizan en todos los órganos y tejidos de la planta, pero que se almacenan en órganos o tejidos diferentes a los de su biosíntesis, a través de su redistribución por el xilema y/o el floema, o por el espacio apoplástico (Edwards y Gatehouse, 1999). La biosíntesis de MS depende de la etapa de desarrollo de la planta y sus niveles constitutivos sólo se incrementan como parte de la respuesta al estrés abiótico o biótico (Sepúlveda, Porta y Rocha, 2004).

Los MS tienen gran importancia ecológica, como en el establecimiento de la simbiosis con otros organismos, en la atracción de insectos polinizadores, dispersores de las semillas y frutos, pero también, una biosíntesis activa de MS se induce cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas tales como: a) el consumo por herbívoros (artrópodos y vertebrados), b) el ataque por microorganismos: virus, bacterias y hongos, c) la competencia por el espacio de suelo, la luz y los nutrientes entre las diferentes especies de plantas y d) la exposición a la luz solar (Sepúlveda, Porta y Rocha, 2004), así como las diferentes condiciones ambientales (Chaves y Escudero, 1999).

En la actualidad, se estima que se han aislado e identificado 200 000 MS de plantas. Aunque este número parece grande, en realidad es pequeño con relación a las aproximadamente 391 000 especies de plantas descritas, de las cuales casi

369 000 (94%) son plantas vasculares (Willis, 2017). Los metabolitos secundarios pueden clasificarse en función de su estructura química (por ejemplo, si tienen anillos o contienen azúcares), su composición (si contienen nitrógeno o no), su solubilidad en varios solventes o la vía por la cual se biosintetizan (por ejemplo, la ruta de los fenilpropanoides, que produce taninos) (Tiwari y Rana, 2015). De acuerdo a la clasificación de Wink (2006), que se basa por la presencia o ausencia de nitrógeno, los MS que contienen dicho elemento incluyen a los alcaloides, aminoácidos no proteicos, aminas, glucósidos cianogénicos, lectinas, glucosinolatos y péptidos. Los MS no nitrogenados se dividen en terpenos y fenoles, estos metabolitos están mayormente presentes en las plantas (Harborne, 1997).

- Los alcaloides forman el grupo de sustancias vegetales secundarias más representativo, numeroso y diverso. Estos metabolitos presentan unos caracteres comunes que los diferencian de los demás compuestos secundarios: son moléculas orgánicas más o menos complejas; de carácter básico, por la presencia en ellas de uno o más átomos de nitrógeno formando parte de un heterociclo (Figura 1); se biosintetizan a partir de aminoácidos o de sus derivados inmediatos (Azcón y Talón, 2008); muchos de ellos son insolubles o poco solubles en agua, y reaccionan con los ácidos para formar sales (Anaya, 2003). Su presencia en las plantas está limitada a determinados grupos taxonómicos. La importancia de los alcaloides para la planta que los produce radica en que constituyen reservorios de nitrógeno para ella; al mismo tiempo, pueden actuar como sustancias alelopáticas o como disuasorios alimentarios, con lo que contribuyen a la defensa del vegetal frente a la competencia con otras especies vegetales o el ataque de determinados patógenos o depredadores (Azcón y Talón, 2008).

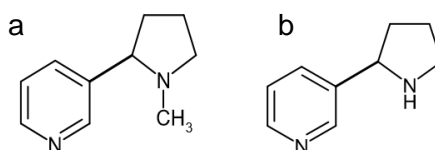


Figura 1. Estructura química de los alcaloides a) nicotina y b) nictotiana (Alcántar, 2005).

- Los aminoácidos no proteicos son aminoácidos que no están incorporados a las proteínas, en su lugar estos aminoácidos están presentes de forma libre y actúan como sustancia de defensa en las plantas. Algunos aminoácidos no proteicos son similares a aminoácidos comunes de proteínas, la canavanina por ejemplo, es un análogo de arginina y el ácido carboxílico 2-azetidina tiene una estructura parecida con la prolina (Figura 2) (Taiz y Zeiger, 2010).

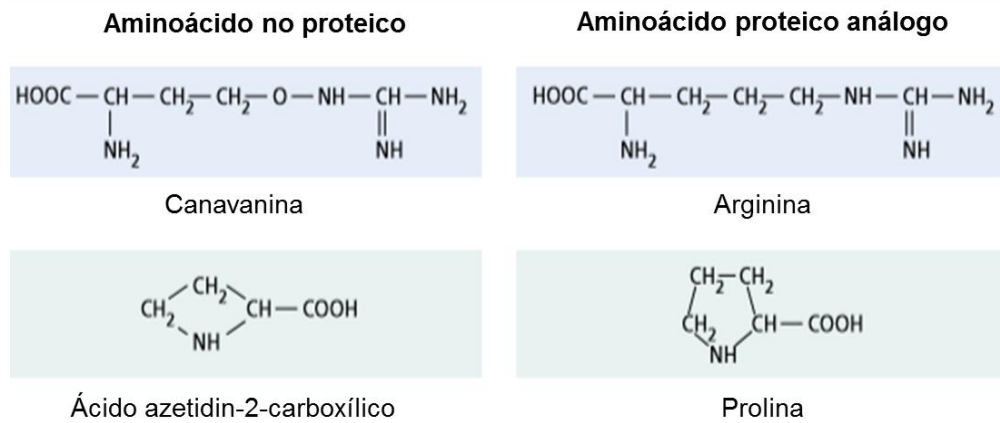


Figura 2. Aminoácidos no proteicos y sus aminoácidos proteicos análogos (Taiz y Zeiger, 2010)

- Los glucósidos cianogénicos son un grupo conocido de metabolitos secundarios. Estos compuestos pueden contener uno o dos azúcares y una aglicona tipo α -hidroxinitrilo. Esto último es el caso de la amigdalina (Figura 3). Tal como ocurre en otras biosíntesis de compuestos como los glucosinolatos, inicialmente se forma una aldoxima a partir de un aminoácido que, a continuación, es transformada en un nitrilo, seguido de un hidroxinitrilo. Finalmente, se obtiene el glucósido cianogénico mediante diferentes etapas, muchas de ellas aún desconocidas (János, 2000). Estos metabolitos secundarios tienen como función en las plantas, la defensa de una variedad de patógenos (Mazid y Mohammad, 2011) y herbívoros (Ilza y Pinotti, 2000).

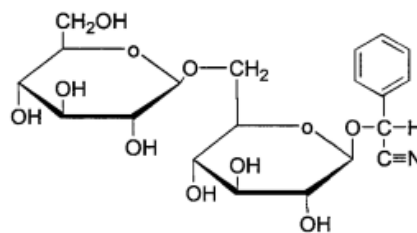


Figura 3. Estructura química del glucósido cianogénico amigdalina (Alcántar, 2005).

- Las lectinas son glicoproteínas sin actividad enzimática que intervienen en la defensa de las plantas (Azcón y Talón, 2008), cuya función es interferir en la absorción de nutrientes por parte de herbívoros (Taiz y Leigner, 2010).
- Los compuestos fenólicos en las plantas se encuentran en frutas, verduras, tés, cacao y otras plantas que poseen ciertos beneficios para la salud (Park *et al.*, 2001). Se caracterizan por tener al menos un anillo aromático que contiene uno o más grupos hidroxilos (Figura 4). Muchos de estos compuestos aparecen como compuestos derivados de reacciones de condensación y adición, dando así lugar a una gran variedad de compuestos químicos en las plantas (Harborne, 1980; Strack, 1997), que va desde moléculas simples, como los ácidos fenólicos, hasta compuestos altamente polimerizados, como los taninos. La forma más común de encontrarlo en la naturaleza es en forma de glucósidos, siendo solubles en agua y solventes orgánicos (Bravo, 1998).

La importancia de los fenoles radica en que constituyen un soporte mecánico a la planta, contribuyen en la coloración de las flores y frutos, protegen contra patógenos y herbívoros, además tienen una gran efectividad protegiendo los tejidos frente a la radiación UV (Strack, 1997).

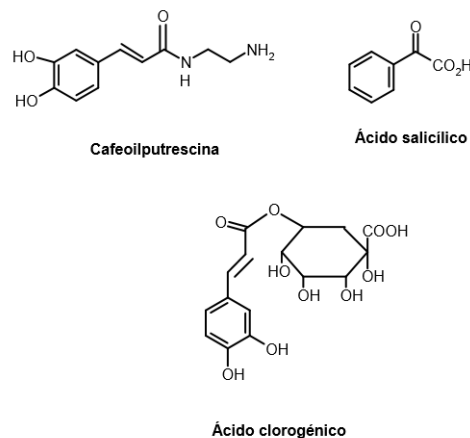


Figura 4. Estructuras químicas de compuestos fenólicos (Alcántar, 2005).

- Los terpenos están constituidos por dos o más unidades de isopreno (5 átomos de carbono) unidas. La nomenclatura de los terpenos refleja el número de unidades de isopreno (Bramley, 1997). Estos compuestos participan en diferentes funciones de las plantas, como la hormonal, en la fotosíntesis como pigmentos, y en el balance electrónico, así también como componentes en las membranas (McGarvey y Croteau, 1995). Además, algunos terpenos actúan

como defensa en las plantas (Figura 5), atrayentes de polinizadores y dispersores de semillas (Harborne, 1991).

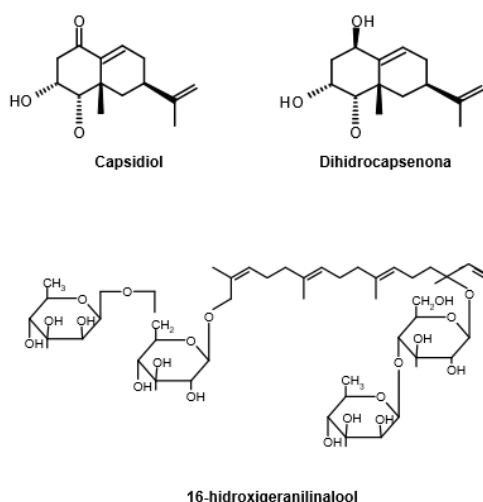


Figura 5. Estructuras químicas de algunos terpenos involucrados en la defensa (Alcántar, 2005).

La variedad estructural dentro de un mismo grupo de MS está dada por modificaciones a una estructura básica, originadas por reacciones bioquímicas, tales como la hidroxilación, metilación, epoxidación, malonilación, esterificación y la glucosilación (Wink, 1999). Esta variabilidad ocasiona perfiles metabólicos diferentes entre especies, y dentro de los miembros de una población, así como con los diferentes órganos de la planta, la cual es parte de la estrategia de adaptación de las plantas a su ambiente (Sepúlveda, Porta y Rocha, 2004).

2.2. Metabolitos secundarios de las cactáceas

Las cactáceas son un grupo de vegetales que presenta un gran número de metabolitos debido a sus complicados procesos metabólicos (Bravo y Sánchez, 1978). Esta familia de plantas se caracteriza por producir metabolitos secundarios como los alcaloides y las betalainas (Anderson, 2001) además de compuestos como flavonoides y saponinas (Bravo y Sánchez, 1978).

2.2.1. Alcaloides

Los alcaloides son bastante frecuentes en la familia de las cactáceas; de unas 150 especies estudiadas cerca de 100 han dado positivas a las pruebas para alcaloides (Rodríguez-Garza, 2010).

Los huicholes, yaquis, apaches, tarahumaras y otros pueblos originarios de México y Estados Unidos, han usado el peyote (*Lophophora williamsii*) del cual se han aislado cuarenta y siete alcaloides, entre ellos la mezcalina que produce

alucinaciones. La mezcalina y otros alcaloides se han encontrado en otras cactáceas, como los géneros *Opuntia*, *Trichocereus*, *Ariocarpus* (Domínguez y Domínguez, 1976), *Aztekium*, *Pachycereus*, *Mammillaria*, *Pelecypora*, *Epithelantha*, *Carnegiea*, *Coryphantha*, *Echinocactus*, *Obregonia*, *Stenocereus*, *Turbinicarpus* (Batis y Rojas, 2002) y algunas especies de *Epiphyllum* (Roca, 1932; Padrón, Moreno y Medina, 2008).

Si bien, la mezcalina es uno de los alcaloides más reconocidos de las cactáceas, también se pueden encontrar: hordenina, N,N-dimetil-4-hidroxi-3-metoxifenetilamina, N-metil-3,4-dimetoxifenetilamina, N-metiltiramina, N-metil-4-hidroxifenetilamina, N-metil-4-metoxifenetilamina, retusina (3,3,4,7-tetramtoxi-5-hidroxiflavona), anhalidina, N,N-3,4-dimetoxi PHA, peyotina, 3-metoxitiramina, backbergina, heliamina, macromerina, metanefrina, normacromerina, arizonina, dopamina, dehidromescalina, tiramina, carnegina, gigantina (5-hidroxicarnegina), salsolidina (norcarnegina), sineferina, O-metilpeyotina, y lophophorina (Batis y Rojas, 2002).

2.2.2. Compuestos fenólicos

Este grupo incluye flavonoides, isoflavonoides, benzalcumarinas y los rotenoides (Bravo y Sánchez, 1978). De algunas cactáceas se han aislado la quercetina, androsina, neolloydosina, kampferol, opuntioigenina, taninos y pigmentos fenólicos. (Domínguez y Domínguez, 1976). Así como compuestos fenólicos en especies de los géneros *Ariocarpus*, *Echinocereus*, *Ferrocactus*, *Echinocereus*, *Cephalocereus* (Domínguez et al., 1969), *Opuntia*, *Epiphyllum*, *Rhipsalis*, *Mammillaria* y *Rebutia* (Bravo y Sánchez, 1978).

2.2.3. Terpenos

No se han encontrado mono, sesqui y diterpenoides en las cactáceas, pero si triterpenoides, como alcoholes y ácidos triterpénicos, también unidos a carbohidratos formando saponinas. El β -sitosterol es ubicuo en las cactáceas, algunas de las cuales también tienen estigmasterol y estigmastenol. (Domínguez y Domínguez, 1976).

Algunos de los triterpenos mencionados por Bravo y Sánchez (1978) encontrados en cactáceas son los siguientes: ácidos como el betulínico, cochálico, machaérico, roachaherínico, mirtilogénico, oleanólico, queretaroico, treleasogénico, y también betulina, chichipegenina, eritrodiol, estelatogenina,

dumortierigenina, gumosogenina, longispinogenina, lupeol, maniladiol y turberogenina.

2.3. Clima y microclima

El clima es el patrón promedio del tiempo atmosférico (combinación de temperatura, humedad, precipitaciones, viento, nubosidad y otras condiciones atmosféricas) a largo plazo (Smith y Smith, 2007).

El clima es un factor clave en la formación del paisaje (Jromov, 1983). Tiene efectos directos en los procesos biológicos, hidrológicos, edáficos y geomorfológicos, por tanto, lo climático enfrenta diversos niveles de análisis y requiere utilizar diferentes escalas (Hidore y Oliver, 1993). La diversidad de escalas del clima se clasifica en tres categorías:

- **Macroclima:** entran en juego los mecanismos globales como la interacción de las zonas climáticas y los modelos de circulación atmosférica. El macroclima es la situación del tiempo meteorológico en un periodo de muchos años y para una región dada en función de su situación geográfica (Jromov, 1983).
- **Mesoclima:** resulta del efecto de las influencias meteorológicas sobre un área relativamente extensa a una escala intermedia entre el macroclima y el microclima y cubre algunos kilómetros cuadrados (Hidore y Oliver, 1993).
- **Microclima:** engloba un conjunto de particularidades locales del clima que varían esencialmente a distancias relativamente cortas (Jromov, 1983).

La mayoría de los organismos viven en condiciones locales que no corresponden con el perfil del clima general de la región más extensa que los rodea. La luz, el calor, la humedad y el movimiento del aire varían en gran medida desde un lugar del paisaje al otro e influyen en la transferencia de energía térmica creando una amplia variedad de climas localizados. Estos microclimas definen las condiciones en las que viven los organismos (Smith y Smith, 2007).

2.4. Ecología de los metabolitos secundarios

Como ya se ha comentado, los metabolitos secundarios son compuestos que intervienen en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente, y pueden desempeñar una amplia variedad de funciones (Valares, 2011), como las de protección, atracción y defensa (Wink, 2006).

El tipo y el contenido de los metabolitos secundarios está influenciado por el genotipo de la planta (especie y variedad), las características ambientales, la

velocidad de crecimiento y la madurez (Romero, Palma y López, 2000). Numerosos factores físicos, químicos y biológicos, externos o internos, pueden afectar la producción de metabolitos secundarios, tanto en calidad como en cantidad (Anaya, 2003). Los factores más importantes son:

- **Radiación**

Se ha demostrado que la radiación UV está relacionada con la acumulación de MS. En el género *Grindelia*, la radiación UV induce la acumulación de resinas diterpénicas y provoca cambios en el espectro de absorbancia de estos terpenos (Zavala y Ravetta, 2002).

En general, la síntesis de fenoles varía y esta inducida por factores ecológicos como la radiación UV, estrés hídrico (Chaves y Escudero, 1999) u ozono (Sandermann *et al.*, 1998). En este sentido además de influir en la biosíntesis también puede potenciar su actividad (Chaves y Escudero, 1999).

- **Edad, estado fenológico y órgano de la planta**

Algunos fenoles y terpenos pueden variar en algunas especies de la familia Cistaceae de acuerdo a su edad. Individuos menores de un año, segregan menos compuestos que los mayores. De igual manera es comprobable que algunos órganos contienen mayor cantidad y variedad de compuestos que otros, en este caso el tallo presenta una mayor variabilidad de fenoles y terpenos (Valares, 2011).

De igual manera, algunos alcaloides como la liriodenina varían su ubicación de biosíntesis y concentración en diferentes etapas del desarrollo temprano en *Annona diversifolia*. La liriodenina está ausente en las semillas recién recolectadas, apareciendo cuando la semilla se desarrolla durante 5–20 días, cuando la síntesis de este compuesto comienza en el endospermo (De la Cruz-Chacón y González-Esquinca, 2012).

- **Temperatura**

La biosíntesis de algunos diterpenos se estimula a bajas temperaturas, el estrés hídrico modifica la síntesis de los mismos a altas temperaturas, disminuyendo la cantidad de estos compuestos en las hojas y encontrándose la mayor cantidad en invierno (Alías, 2006).

- **Estrés hídrico**

Las plantas pierden agua por transpiración a través de los estomas y de las cutículas (Blum, 2009). Esta permeabilidad, no asociada al beneficio de fijación de CO₂ puede ser reducida a través de la acumulación de metabolitos secundarios

como resinas y ceras (Ehleringer y Cook, 1990). Este rol en la economía del agua de algunos metabolitos secundarios carbonados hidrofóbicos como los terpenos, podría extenderse aún más allá del nivel de la cutícula y el intercambio de gases en la planta (Vilela, González y Ravetta, 2011). Además, Castro-Moreno (2013) demostró que la producción y acumulación del alcaloide liriodenina en *Annona lutescens* responde a los cambios hídricos estacionales, esto apoya a la hipótesis de que este MS juega un papel importante para la supervivencia de la especie durante los cambios de estación.

- **Factores genéticos**

El tipo y el contenido de saponinas y alcaloides en *Epiphyllum phyllanthus* está influenciado por el genotipo de la planta (especie y variedad) (Padrón, Moreno y Medina, 2008).

- **Interacciones bióticas intra e interespecíficas**

Como protección ante herbívoros, hay que destacar que algunos flavonoides (apigenina, 3-O-MetilKampferol y 3,4-di-O-metilKampferol) inhiben la actividad Ca^{2+} -ATPasa y consecuentemente el transporte de Ca^{2+} a través de las membranas del retículo sarcoplásmico acoplado a ella. Así, la masticación por herbívoros conllevaría la incapacidad de relajación del músculo esquelético facial del animal que lo llegara a ingerir. Pero además esta falta de relajación o tensión muscular sería inmediata, pudiendo provocar un rechazo del herbívoro al seguir comiendo (Sosa, 2003).

Por otra parte, pueden actuar como agentes alelopáticos, inhibiendo la germinación y desarrollo de plántulas herbáceas competidoras por el mismo espacio, en general suelos pobres en nutrientes, lo que ofrece claras ventajas al facilitar la colonización para la especie alelopática (Chaves y Escudero, 1997).

También pueden estar involucrados estos compuestos en la resistencia a los virus, por ejemplo, las metoxiflavonas y metoxiflavonoles confieren a la planta del tabaco esta capacidad frente al virus del mosaico (Franch, Janda y Ahlquist, 1987), y además pueden actuar como señal molecular para la nodulación en la simbiosis leguminosa- *Rhizobium* (Harborne, 1997).

- **Contaminantes**

Algunos metabolitos secundarios como los compuestos fenólicos, ayudan a las plantas a vivir en suelos ricos en metales pesados, como por ejemplo el aluminio (Barceló y Poschenrieder, 2002).

Cualquier factor ambiental puede ser limitante o determinante en la biosíntesis de uno o varios MS de una planta. Esto es lógico, ya que los organismos, como parte integral de un ecosistema, se ven sometidos a las acciones del conjunto de factores, bióticos y abióticos, y a su vez, ejercen sobre su entorno una acción determinada. Esto constituye una ley en Ecología, la de las interacciones del organismo con su medio (Anaya, 2003).

2.5 Familia Cactaceae

La familia Cactaceae (cactáceas) es nativa del Continente Americano, a excepción del género *Rhipsalis* que se encuentra creciendo también en África e India; comprende alrededor de 125 géneros con 1 900 especies (Mabberley, 1997; Smith *et al.*, 2004). En México se encuentran cerca de 63 géneros con 913 taxones (669 especies y 244 subespecies), de los cuales, 25 géneros y 518 especies son endémicos (Guzmán, Arias y Dávila, 2003). Chiapas ocupa el lugar 16 con respecto a la riqueza de especies en México (Hernández *et al.*, 1993). En la familia Cactaceae se han registrado 57 especies (incluyendo siete subespecies) distribuidas en 20 géneros, incluidas en dos subfamilias: Opuntioideae y Cactoideae, esta última con 80 % de las especies presentes en el estado de Chiapas (Ishiki, Arias y Terrazas, 2013).

La subfamilia Opuntioideae está formada por la especie *Pereskiaopsis kellermanii*, además de varias especies de los géneros *Opuntia* y *Nopalea*, que suman 19 % del total de las especies para la subfamilia (ídem).

La subfamilia Cactoideae tiene su mayor representatividad en las regiones semiáridas y subtropicales donde las condiciones ambientales son más cálidas y las heladas escasas, como la Depresión Central y al Noroeste de la Sierra Madre de Chiapas, entre los 750 a 1 250 msnm cuya precipitación es inferior a los 1 200 mm anuales. Esta subfamilia está representada por cuatro tribus en el estado de Chiapas. La tribu Pachycereeae reconocida por sus tallos arborescentes. La tribu Cereeae, representada por varias especies de biznagas que habitan en selvas bajas caducifolias sobre suelos arenosos de colores rojizos. La tribu Cacteeae, en donde se incluye a las cactáceas esféricas. México es el centro de diversificación de la tribu con más de 150 especies. Cabe señalar que las afinidades fitogeográficas del estado, respecto a la tribu Cacteeae son más cercanas a Centroamérica. La tribu Hylocereeae tiene su mayor diversidad en las selvas altas

perennifolias, así como en las selvas altas y medianas subperennifolias de las regiones tropicales y subtropicales. Comprende en su mayoría especies trepadoras y epífitas, con flores vistosas, grandes y coloridas, adaptadas a determinados polinizadores, como mariposas nocturnas, murciélagos y colibríes (Ishiki, Arias y Terrazas, 2013).

2.6 *Epiphyllum oxypetalum* (DC.) Haw

2.6.1 Posición taxonómica

De acuerdo con la base de datos “Trópicos (Tropics)”, del Missouri Botanical Garden (2018), el cactus “dama de noche” tiene la clasificación taxonómica que se muestra en el cuadro siguiente.

Cuadro 1. Clasificación de *Epiphyllum oxypetalum* de acuerdo con el sistema Angiosperm Phylogeny Group (APG IV, 2016).

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Equisetopsida C. Agardh
Subclase	Magnoliidae Novák ex Takht.
Superorden	Caryophyllanae Takht.
Orden	Caryophyllales Juss. ex Bercht. & J. Presl
Familia	Cactaceae Juss.
Género	<i>Epiphyllum</i> Haw.
Especie	<u><i>E. oxypetalum</i> (DC.) Haw</u>

2.6.2 Descripción morfológica

Son plantas grandes, de tres metros de largo o más. Tallos y base de los filocladios delgados y redondeados, rígidos, suberectos, planos y delgados, largos, de 10 a 12 cm de ancho, largamente acuminados, profundamente crenados y ondulados con la nervadura central muy gruesa y marcada. Flores nocturnas, con olor agradable, de 30 cm de largo; pericarpelo de 2.5 cm de longitud y de cuatro a 12 mm de diámetro, estriado longitudinalmente por la gran longitud de los podarios, verde claro, provisto de algunas escamas triangulares acuminadas, pequeñas, de uno a tres milímetros de largo, verdes, con axilas desnudas; tubo receptacular curvo, como de 20 cm de largo por un centímetro de ancho, cuyos podarios, alargados le dan un espacio estriado, crema verdoso con tinte rosa; bractéolas triangulares, acuminadas las de abajo verdes, de tres milímetros de largo, las

cercanas al perianto con la base verde y el ápice color rosa, de tres centímetros de largo; segmentos exteriores del perianto, lineares, como de nueve centímetros de largo, ámbar y rosa; segmentos interiores del perianto blancos, lanceolados, acuminados, comúnmente terminados en un pelo, u orbiculares y apenas lacerados, de nueve centímetros de largo y 2.5 cm de ancho; filamentos blancos; anteras crema; estilo blanco, de 23 cm de largo; lóbulos del estigma color blanco crema. Fruto grande, ovoide, de 12 cm de largo y ocho centímetros de ancho, color purpúreo rojizo, con podarios alargados longitudinalmente a manera de costillas, las cuales llevan escamas pequeñas como de 1 mm de largo (Figura 6) (Bravo y Sánchez, 1978).



Figura 6. *Epiphyllum oxypetalum*, fotografía tomada por José Carlos Franco Jiménez.

2.6.3 Distribución

El género *Epiphyllum* Haw. (Cactoideae, Hylocereeae) incluye cerca de 19 especies que se pueden encontrar principalmente en Centro América y México, pero algunas pocas especies se extienden hasta el Caribe y Sudamérica (Anderson, 2001).

Epiphyllum oxypetalum (DC.) Haw. se distribuye en México, Guatemala, Venezuela y Brasil. En México se encuentra creciendo en humus y como epífita en

las selvas altas, medianas (Bravo y Sánchez, 1978) y bajas (Castillo, Dávila y Zavaleta, 2007; Ramos, 2016) de los Estados de Veracruz, Oaxaca y Chiapas.

En Veracruz, se registró en Balsapote y Los Tuxtlas; en Oaxaca, en río del Corte (Juchitán) y en Chiapas, en El Aguajito (Ocozocuautila), así como en "El Suspiro" (Berriozabal), en donde Bravo, Greenwood y Matuda también la han recolectado (Bravo y Sánchez, 1978).

2.6.4 Usos

E. oxypetalum (DC.) Haw tiene un uso artesanal, ornamental y recreativo (Meza, 2011).

En la medicina homeopática, *E. oxypetalum* (DC) Haw. se recomienda para las infecciones del tracto urinario, afecciones cardíacas, dolor de la angina y espasmódico, además de dolores menstruales y para detener las hemorragias. El jugo de la planta en infecciones de la vejiga, dificultad para respirar y problemas de retención de agua. Aplicado externamente, para el reumatismo, también suponen que es un afrodisíaco (Yén, 2008). Además, los filocladios de *E. oxypetalum* (DC) Haw. tienen actividad antibacteriana (Upendra y Khandelwal, 2012).

2.6.5. Categorías de protección de acuerdo con la NOM-059-SEMARNAT-2010 y las listas de CITES

De acuerdo con la NOM-059-SEMARNAT-2010 *E. oxypetalum* (DC) Haw. no se encuentra bajo ningún régimen de protección (Meza, 2011). La Lista Roja de Especies de la IUCN la considera como de menor preocupación (LC) (Hammel, 2017), y para el CITES, está dentro del apéndice II (Meza, 2011).

III. ANTECEDENTES

El género *Epiphyllum* ha sido escasamente estudiado, reportándose sólo dos especies con estudios fitoquímicos y evaluaciones nutricionales, sin embargo, con otros géneros de la misma subfamilia existen más trabajos de caracterización química.

Estudios con el género *Epiphyllum*

Padrón, Moreno y Medina (2008) evaluaron la composición química e hicieron un análisis estructural y de factores anti nutricionales de filocladios de *Epiphyllum phyllanthus* (L.) Haw. var. *Hookeri*, reportando la presencia moderada de saponinas, alcaloides y la ausencia de taninos y cianógenos.

Erdelská y Stintzing (2011) realizaron estudios químicos y evaluaron la morfología de flores y frutos de híbridos de *Epiphyllum* durante su desarrollo, reportando la presencia de diferentes betalaínas en los pétalos y frutos.

Upendra y Khandelwal (2012) en su trabajo de evaluación de los valores nutricionales y potenciales bioterapéuticos de *Epiphyllum oxypetalum*, reportan la presencia de saponinas, compuestos fenólicos, esteroides, glicósidos, terpenoides y resinas. Sin embargo, no hubo presencia de azúcares reductores, alcaloides, flavonoides, esteroides y compuestos ácidos.

IV. OBJETIVOS

4.1 General:

Caracterizar la diversidad de metabolitos secundarios en los filocladios de *Epiphyllum oxypetalum* (DC.) Haw, durante un periodo de seis meses.

4.2 Particulares:

- Determinar la riqueza y abundancia de metabolitos secundarios en la temporada de lluvia y estiaje.
- Determinar la riqueza y abundancia de los metabolitos secundarios durante las primeras horas de la mañana y de la tarde.
- Determinar si existen relaciones entre las condiciones microclimáticas y la presencia de metabolitos secundarios.

V. ZONA DE ESTUDIO

El área de estudio se localizó en el municipio de Berriozábal, en las coordenadas geográficas 16° 46' 49.9" N y 93° 12' 42.1" O, a 686 metros sobre el nivel del mar, ocupando un área aproximada de 889.949 m² y un perímetro de 125 metros (Figura 7) (INAFED, 2010; INEGI, 2018).

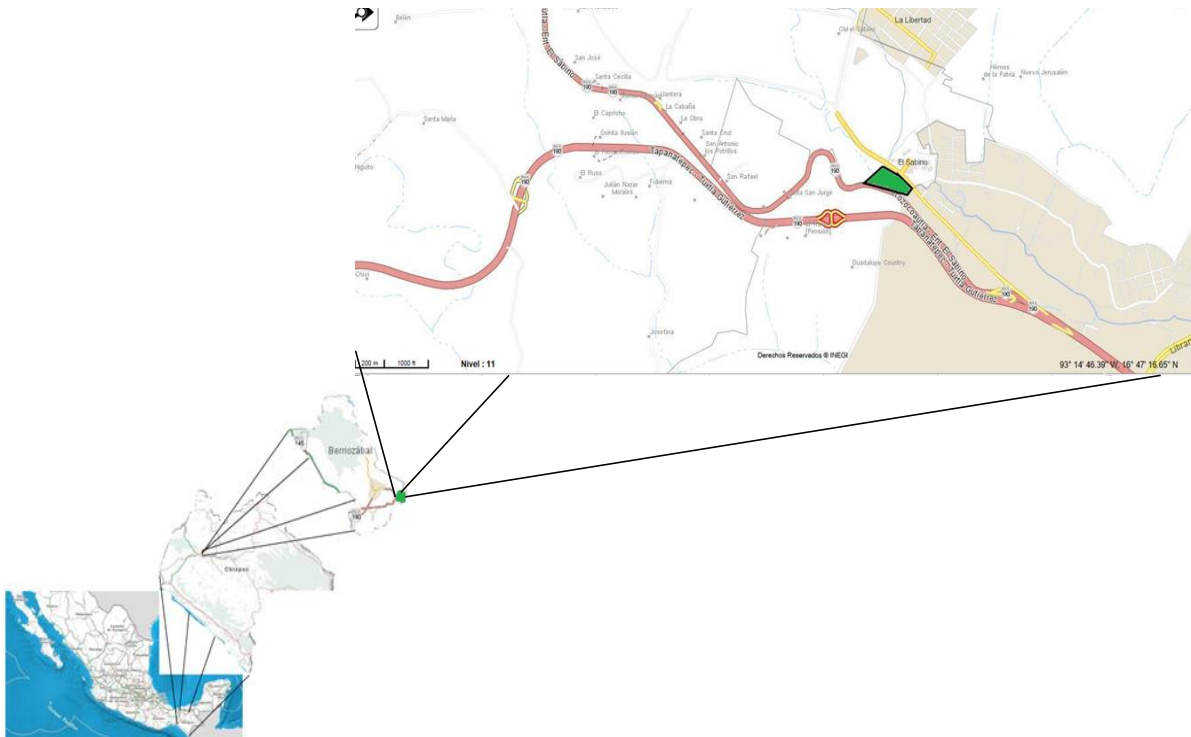


Figura 7. Delimitación de la zona de estudio, señalada en verde, ubicada en el municipio de Berriozábal, Chiapas.

Fisiográficamente se localiza en la llanura central y el suelo que presenta es de tipo vertisol. El clima es cálido subhúmedo con lluvias en verano y de acuerdo con datos del INEGI (2018) el área cuenta con una precipitación media anual de 1 000 mm y la temperatura media anual es de 24° C. La vegetación original es de selva baja caducifolia (Miranda, 2015; INAFED, 2010).

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Diagrama del método

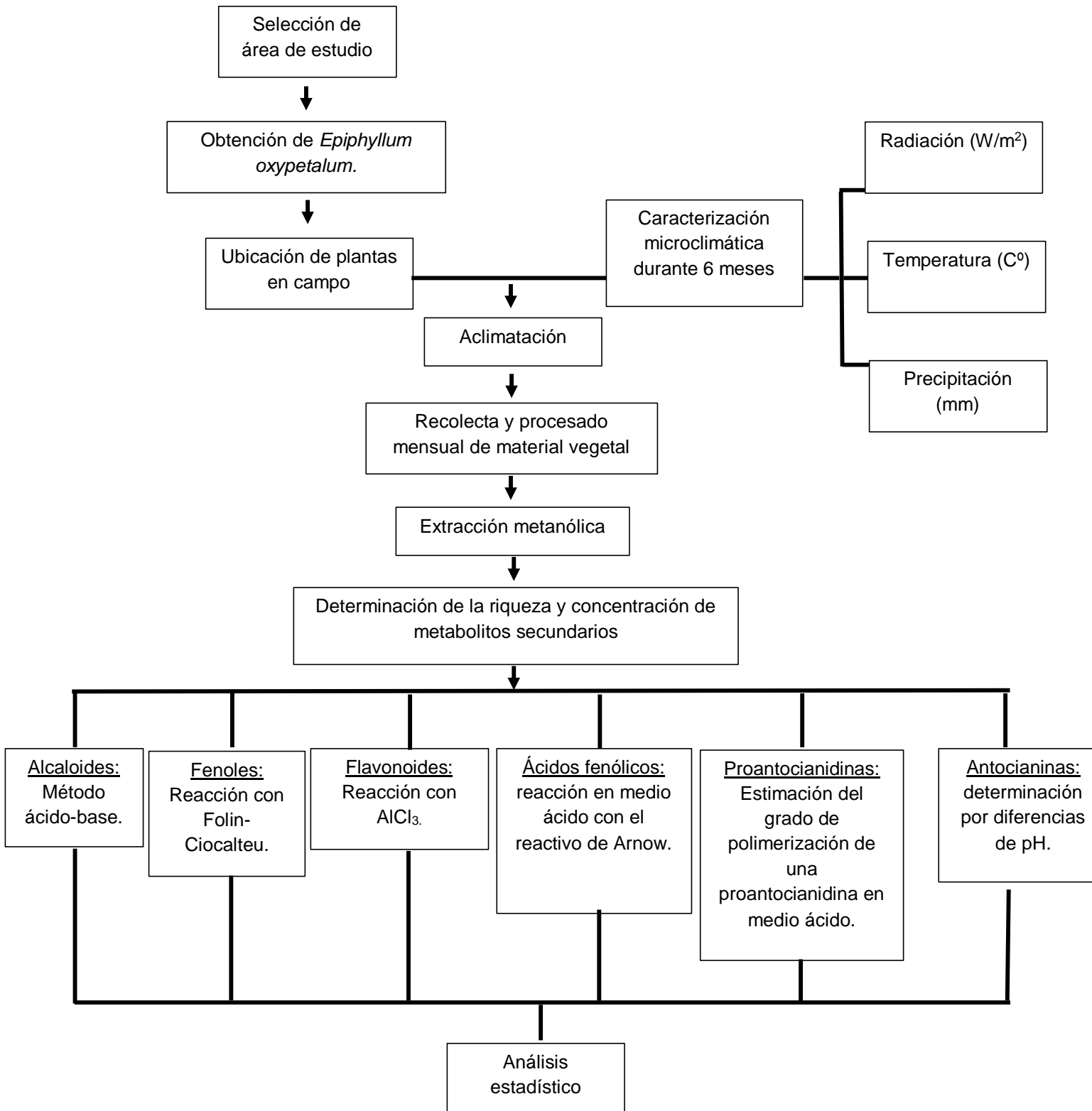


Figura 8. Diagrama general de la investigación

6.2 Métodos

6.2.1 Obtención de plantas

Se obtuvieron 90 plantas cultivadas en vivero.

6.2.2 Selección de hábitat y ubicación de plantas

Los ejemplares de *E. oxypetalum* fueron trasladados al área de estudio, donde se colocaron sobre las bases de las ramas principales aprovechando o provocando huecos para un fácil montaje de los ejemplares (Granados *et al.*, 2003), posteriormente se sujetaron los ejemplares con alambres y se marcaron los hospederos con etiquetas de aluminio rotuladas con la técnica de repujado. Las plantas se aclimataron durante un mes antes de la primera recolecta.

6.2.3 Caracterización microclimática

Se monitoreo de forma continua los parámetros medioambientales de luz, temperatura y precipitación, registrando datos cada hora de forma diaria durante un periodo de seis meses. Para la recolección de información climática, se usó una microestación meteorológica marca HOBO modelo H-21USB, ubicada en el centro del área de estudio, obteniéndose promedios mensuales diurnos y nocturnos.

Los instrumentos para la medición de los parámetros ambientales fueron los siguientes:

- **Medición de la radiación**

La luz del medio se midió con un piránometro de silicio marca HOBO, modelo S-LIB-M003.

- **Medición de la temperatura**

La temperatura del aire se midió con un sensor inteligente de temperatura marca HOBO, modelo S-TMB-M0xx.

- **Medición de la precipitación**

La precipitación se midió con un pluviómetro marca HOBO, modelo SRGC-M002 y SRGD-M002.

6.2.4 Recolecta del material vegetal

Se tomaron 16 muestras cada mes, los ejemplares fueron seleccionados al azar Los filocladios fueron recolectados a las 7:00 y 19:00 horas. Las muestras vegetales se trasladaron al Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal del Instituto de Ciencias Biológicas de la UNICACH para su procesamiento y análisis.

6.2.5 Preparación del material vegetal para su extracción

El material vegetal fue cortado en pequeños trozos, se secó a temperatura ambiente y a la sombra para después pulverizarse en una licuadora.

6.2.6 Obtención de extractos

Se pesó seis gramos de filocladio triturado finamente, se colocó en papel filtro y se enrolló. Se procedió a hacer una extracción tipo Soxhlet con MeOH (120 mL) durante ocho horas, tres veces. El extracto metanólico crudo se evaporó a 60°C en un rotaevaporador al vacío (Castro-Moreno, 2005).

6.2.7 Remoción de clorofilas

Al extracto metanólico evaporado, se le adicionó 10 mL de agua, realizando una extracción líquido-líquido en un embudo de separación utilizando Et₂O (3 x 10 mL) para eliminar las clorofilas. A la fase acuosa y libre de clorofilas, se le cuantificaron alcaloides, fenoles, flavonoides (Oropeza, 2012), ácidos fenólicos, proantocianidinas y antocianinas.

6.2.8. Análisis de la riqueza y abundancia del perfil de metabolitos más característicos

- **Determinación de alcaloides totales**

Se usó el método ácido-base descrito por González-Esquinca (2001), modificado por Chong-Rodríguez (2016). Partiendo de los extractos metanólicos y libres de clorofila, se pesó 20 mg y se agregó CHCl₃ hasta disolver la muestra, en seguida se colocó en un embudo de separación y se agregó HCl a 1 N (3 x 5 mL). La fase acuosa y ácida se alcalinizó hasta un pH 9 con Na₂CO₃, en seguida se colocó de nuevo en el embudo de separación y se le agregó CHCl₃ (3 x 5 mL), se recuperó la fase clorofórmica y se analizó con cromatografía en capa fina, se usó como fase móvil CHCl₃: MeOH 9:1 y como revelador Reactivo de Dragendorff.

- **Determinación de fenoles totales**

Preparación de reactivos: método con modificaciones en los volúmenes utilizados. EtOH acuoso al 70% (v/v): se mezclaron 292 mL de EtOH con 123 mL de agua. Na₂CO₃ al 0.5% (p/v): se pesaron 125 mg de Na₂CO₃, se disolvieron agua y se aforó a 50 mL. Reactivo de Folin-Ciocalteu 0.1 N: se midieron 2.5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu 2 N, se disolvieron en agua en ausencia de luz y se aforó a 50 mL (Oropeza, 2012).

Preparación de la curva patrón de ácido gálico: método con modificaciones en los volúmenes utilizados. Para la curva de calibración se utilizó ácido gálico como estándar y a partir de ella se obtuvo el contenido de fenoles totales expresados como mg equivalentes de ácido gálico (GAE/1 g ms). La disolución madre se preparó de la siguiente forma: ácido gálico 100 ppm: se pesó 5 mg de ácido gálico, se disolvió en EtOH al 70% hasta un volumen de 50 mL. Los estándares de ácido gálico fueron de 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70 ppm. La absorbancia de los estándares se leyó a 620 nm. El estándar de 60 ppm se utilizó para el blanco del estándar y se le adicionó agua en lugar del reactivo de Folin-Ciocalteu (Oropeza, 2012).

Cuantificación: se colocaron 40 μ L del extracto libre de clorofilas a una concentración del 5% en EtOH al 70% en una microplaca y se le adicionó 40 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu 0.1 N. La mezcla se dejó en reposo por tres minutos a temperatura ambiente en el lector de microplacas y se agitó por 15 segundos a baja velocidad, en seguida se le adicionó 40 μ L de Na_2CO_3 al 0.5%. Se dejó reposar 30 minutos a 40°C y se agitó por un minuto a velocidad media. La absorbancia de la muestra se leyó a 620 nm. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado (Julián-Loaeza *et al.*, 2011; modificado por Oropeza, 2012).

- **Determinación de flavonoides totales**

Preparación de reactivos: método con modificaciones en los volúmenes. NaNO_2 al 1.5% (p/v): se pesaron 225 mg de NaNO_2 , se disolvieron en agua y se aforó a un volumen de 15 mL. AlCl_3 al 3% (p/v): se pesaron 450 mg de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, se disolvieron en agua y se aforó a un volumen de 15 mL. NaOH 1 N: se pesaron 600 mg de NaOH, se disolvieron en agua y se aforó a un volumen de 15 mL (Julián-Loaeza *et al.*, 2011).

Preparación de la curva patrón de catequina: método con modificaciones en los volúmenes. Para la curva de calibración se utilizó catequina como estándar, a partir de ella se obtuvo el contenido de flavonoides totales expresados como mg equivalentes de catequina (CE/1 g ms). La disolución madre se preparó de la siguiente forma: catequina 1 000 ppm: se pesaron 10 mg de (+)-catequina, se disolvieron en MeOH y se aforó a un volumen de 10 mL en ausencia de luz. Los estándares de catequina utilizados fueron de 10, 20, 30, 40, 50 y 60 ppm. La absorbancia de los estándares se leyó a 415 nm. El estándar de 60 ppm se utilizó

para el blanco y se le adicionó agua en lugar del reactivo de AlCl_3 (Julián-Loaeza *et al.*, 2011).

Cuantificación: método con modificaciones en los volúmenes. a 150 μL del extracto libre de clorofilas a una concentración del 5 % con MeOH al 99.9 % y contenido en un tubo ámbar se le agregó 150 μL de NaNO_2 al 1.5 %. La mezcla se agitó por cinco minutos a temperatura ambiente. A esta mezcla se le agregaron 150 μL de AlCl_3 al 3 % y se agitó por un minuto a temperatura ambiente y a velocidad media. Pasado este tiempo se adicionó 150 μL de NaOH 1 N que se incorporarán mediante succión (tres veces) con la micropipeta. Se agitó por un minuto a temperatura ambiente y velocidad media, pasado este tiempo se tomó 200 μL y se colocó en una microplaca. La absorbancia de la muestra se leyó a 415 nm. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado (Julián-Loaeza *et al.*, 2011).

- **Determinación de ácidos fenólicos totales**

Preparación de reactivos: método con modificaciones en los volúmenes utilizados. HCl 0.5 M: se colocó 10.5 mL de HCl al 36.5 % y se aforó a un volumen de 250 mL con agua destilada. Reactivo de Arnow: se pesaron 10 g de NaNO_2 y 10 g de Na_2Mo_4 , ambos se disolvieron en 100 mL de agua destilada. NaOH 1 M: se pesaron 9.9 g de NaOH y se disolvieron en 250 mL de agua destilada (Lillo *et al.*, 2016).

Preparación de la curva de calibración de ácido cafeico: método con modificaciones en los volúmenes utilizados. se realizó una curva de calibración con ácido cafeico (grado analítico, Sigma Aldrich) de 0 a 1 000 mg/L. El contenido de ácidos fenólicos se expresó en mg EAC g^{-1} de MS (mg equivalentes de ácido cafeico por gramo de materia seca). La disolución madre se preparó de la siguiente forma: ácido cafeico 1 000 ppm: se pesaron 15 mg de ácido cafeico, se disolvieron en MeOH y se aforó a un volumen de 15 mL en la oscuridad. Los estándares de ácido cafeico utilizados fueron de 200, 400, 600, 800 y 1000 ppm. Los estándares se midieron a una longitud de onda de 490 nm (Lillo *et al.*, 2016).

Cuantificación: el método se basó en la reacción de los ácidos hidroxycinámicos en medio ácido con el reactivo de Arnow, que presenta una coloración amarilla que cambia a naranja en medio alcalino. Para ello, se colocó 50 μL del extracto libre de clorofilas a una concentración del 5 % con MeOH al 99.9 %, en un tubo ámbar y se le agregó 1 mL de HCl 0,5 M, 1 mL de reactivo de Arnow, 1 mL de NaOH 1 M y se aforó a 5 mL con agua destilada, después de 30 minutos en

ausencia de luz, se tomaron 200 μL y se colocaron en una microplaca, las muestras y las disoluciones de la curva de calibración se midieron a una longitud de onda de 490 nm. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. (Matkowski, Tasarz y Szypuła, 2008, modificado por Lillo *et al.*, 2016)

- **Determinación de proantocianidinas totales**

Preparación de reactivos: método con modificaciones en los volúmenes utilizados. Vainillina al 4% (p/v): se pesó 5 g de vainillina y se disolvió en 125 mL MeOH (Lillo *et al.*, 2016)

Preparación de la curva de calibración de catequina: método con modificaciones en los volúmenes utilizados. Se realizó una curva de calibración con (+)-catequina de 0 a 1 000 mg/L. El contenido se expresó en mg ECT g⁻¹ de MS (mg equivalentes de catequina por gramo de materia seca). La disolución madre se preparó de la siguiente forma: catequina 1 000 ppm (mg/L): se pesaron 30 mg de catequina, se disolvieron en MeOH y se aforó a un volumen de 30 mL en ausencia de luz. Los estándares de catequina utilizados fueron 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 ppm. Los estándares se midieron a una longitud de onda de 490 nm. (Lillo *et al.*, 2016)

Cuantificación: el análisis estima el grado de polimerización de una proantocianidina en medio ácido. Por ello se colocó 20 μL del extracto libre de clorofilas a una concentración de 5 % con MeOH al 99.9 % en un tubo ámbar, se agregaron 180 μL de metanol y se agitó, se agregó 1.2 mL de vainillina (grado analítico, Merck) al 4 % p/v y 600 μL de HCl concentrado, protegido de la luz por 30 minutos, pasado este tiempo, se colocaron 200 μL en una microplaca y se midió a una longitud de onda de 490 nm. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado (Price, Van Scoyoc, y Butler, 1978; modificado por Lillo *et al.*, 2016).

- **Determinación de antocianinas totales**

Preparación de reactivos: método con modificación en los volúmenes utilizados. Buffer pH 1: se pesó 1.86 g de KCl y se agregó 980 mL de agua destilada, se midió el pH y se ajustó a 1.0 (± 0.5) con HCl, se transfirió a un matraz y se aforó a 1 000 mL. Buffer pH 4.5: se pesó 54.43 g de $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ y se añadió 960 mL de agua destilada, se midió el pH y se ajustó a 4.5 con HCl, se transfirió a un matraz y se aforó a 1 000 mL (Martínez-Cruz *et al.*, 2011).

Cuantificación: método con modificaciones en los volúmenes y longitud de onda de lectura. Se determinó el contenido de antocianinas por medio de

diferencias de pH. Este es un método espectrofotométrico que se basa en la transformación estructural de las antocianinas que ocurre por el cambio de pH (pH 1 coloreadas y pH 4.5 incoloras). Se tomaron cuatro alícuotas de 20 µL de una misma muestra de extracto libre de clorofila a una concentración del 5 % en MeOH al 99.9 %, a dos de ellas se adicionó 180 µL de buffer pH 1 y a los dos restantes se adicionó 180 µL de buffer pH 4.5. Se midió la absorbancia a dos longitudes de onda, a 490 nm y 750 nm. (Martínez-Cruz *et al.*, 2011)

La concentración se calculó utilizando la siguiente fórmula:

Ecuación 1

$$\text{Antocianinas totales (mg/L)} = ((A \times PM \times 1000) / (\epsilon \times l)) \times FD$$

Donde A = (Abs 520 nm – Abs 700 nm) pH 1 – (Abs 520 nm – Abs 700 nm) pH 4,5; PM = Peso molecular de cianidina-3-glucósido: 449,2 g/mol; FD = factor de dilución; l = longitud de paso de celda en cm; ϵ = 26900 L cm⁻¹ mg⁻¹, coeficiente de extinción molar para cianidina-3-glucósido; 1 000 = factor de conversión de g a mg. La concentración de antocianinas en el extracto se expresa en mg EC3G g⁻¹ de MS (mg equivalentes de cianidina-3-glucósido por gramo de materia seca).

6.2.9 Tabla de concentraciones y presencia relativa

Se construyó una tabla con los promedios de las concentraciones obtenidas por mes en las plantas de la mañana (PM) y las plantas de la tarde (PT). Para la parte de presencia relativa, la tabla se construyó a partir de los datos de concentración de los meses (unificando PM y PT), los datos se agruparon en meses de lluvias (agosto, septiembre y octubre) y meses de estiaje (noviembre, diciembre y enero). Se obtuvo el porcentaje que representa a cada estación y se asignó un número de intensidad por cuartiles simbolizado por cruces (+). Cada cruz representa un 25%, siendo “+” baja presencia, “++” presencia moderada, “+++” presencia alta, “++++” presencia muy alta.

6.2.10 Análisis estadístico

Las evaluaciones se realizaron mensualmente, durante 6 meses. Los datos se analizaron con las pruebas estadísticas de Wilcoxon para comparar los datos entre horarios (mañana y tarde); prueba de Kruskal-Wallis para hacer la comparación de los datos entre los meses; prueba de U de Mann-Whitney para conocer diferencias entre meses; prueba MDS; Prueba de Correlación; Prueba CCA y PERMANOVA. El programa estadístico utilizado fue Past versión 4.0, programa de licencia libre.

VII. RESULTADOS

7.1 Rendimiento de extractos

Se obtuvieron 96 extractos metanólicos (16 extractos por mes). Las plantas recolectadas durante la tarde presentan un mayor rendimiento que las plantas recolectadas por la mañana, sin embargo, esta diferencia no es significativa. Las plantas de la mañana y de la tarde en enero obtuvieron el menor rendimiento, en septiembre el mayor (Cuadro 2).

Cuadro 2. Cantidad de extracto obtenido.

Mes	Rendimiento promedio de extractos sin clorofila (mg)	
	Plantas de la mañana	Plantas de la tarde
Agosto	92.2	133.2
Septiembre	121.9	135.1
Octubre	84.5	161
Noviembre	99.4	126.6
Diciembre	80.4	104.1
Enero	<u>60</u>	<u>101.7</u>

7.2 Condiciones microclimáticas

Se midieron tres variables microclimáticas durante seis meses, precipitación (mm), radiación (w/m^2) y temperatura ($^{\circ}C$). La precipitación muestra una tendencia a disminuir con el avanzar de los meses, en agosto se presentó una mayor precipitación (80.47 mm). Diciembre y enero fueron los meses con la menor precipitación (0 mm) dada la ausencia de lluvias. En cuanto a la radiación, se puede observar una disminución de agosto-octubre, sin embargo, después se presenta un aumento en octubre-enero. El valor más alto se presentó en agosto (28.14277126 w/m^2), mientras que en octubre hubo menor radiación (13.97440534 w/m^2). A su vez agosto fue el mes más cálido (23.7 $^{\circ}C$), y diciembre el de menor temperatura (20 $^{\circ}C$) (Figura 9).

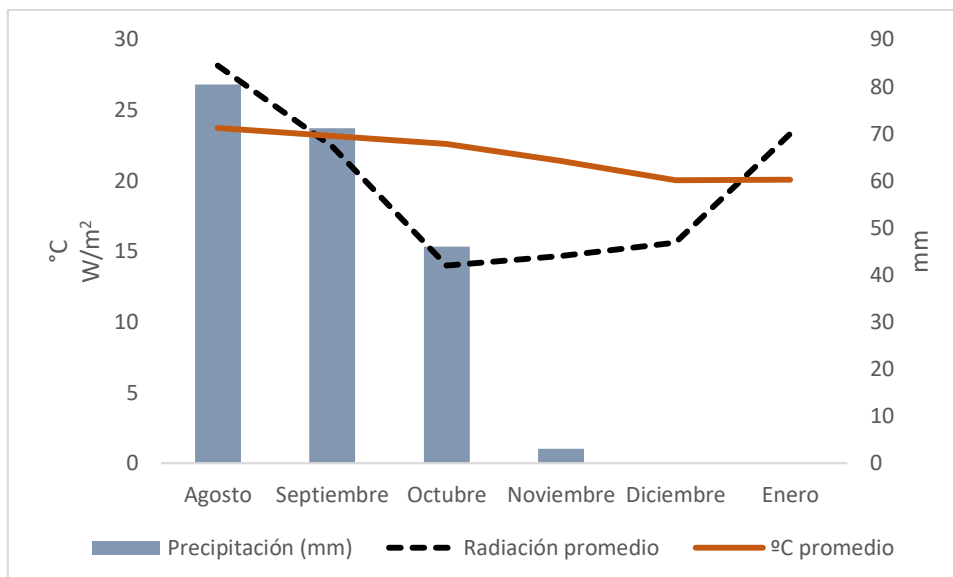


Figura 9. Comportamiento de las variables microclimáticas.

7.3 Determinación y cuantificación de metabolitos secundarios

En todos los meses hubo presencia de fenoles, flavonoides, ácidos fenólicos, proantocianidinas y antocianinas. No existe en ninguno de los tipos de MS analizados una tendencia a disminuir o incrementar su concentración a lo largo de los seis meses. Los metabolitos con más presencia fueron los ácidos fenólicos y los que se encontraron en menor concentración fueron las proantocianidinas (Cuadro 3). Durante los seis meses no se encontraron alcaloides.

Cuadro 3. Presencia relativa de metabolitos secundarios.

Metabolito secundario	Promedio total PM (mg/g)	Promedio total PT (mg/g)	Presencia relativa en lluvias	Presencia relativa en estiaje
Alcaloides	0	0	-	-
Fenoles	16.7	17.8	+	++
Flavonoides	1028	1236	++	+
Ácidos fenólicos	5089	5550	+	++
Proantocianidinas	14.4	14.1066	+	++
Antocianinas	34.3	26.9	++	+

Aun cuando no hay evidencias estadísticas significativas, se pueden observar que los fenoles tuvieron su mayor concentración en enero (43.2 mg/g) y la menor en agosto (28.6 mg/g). Los flavonoides estuvieron con mayor presencia en agosto (4867 mg/g) y con menor en octubre (1611 mg/g). La mayor proporción de ácidos fenólicos estuvo en enero (11568 mg/g) y la menor se encontró en octubre (9711 mg/g). A su vez, las proantocianidinas tuvieron mayor presencia en agosto (30.4 mg/g) y la menor en octubre (25.8 mg/g). Por último, las antocianinas

están en mayor abundancia en octubre (88.8 mg/g) y en menor en diciembre (36.8 mg/ g) (Figura 10).

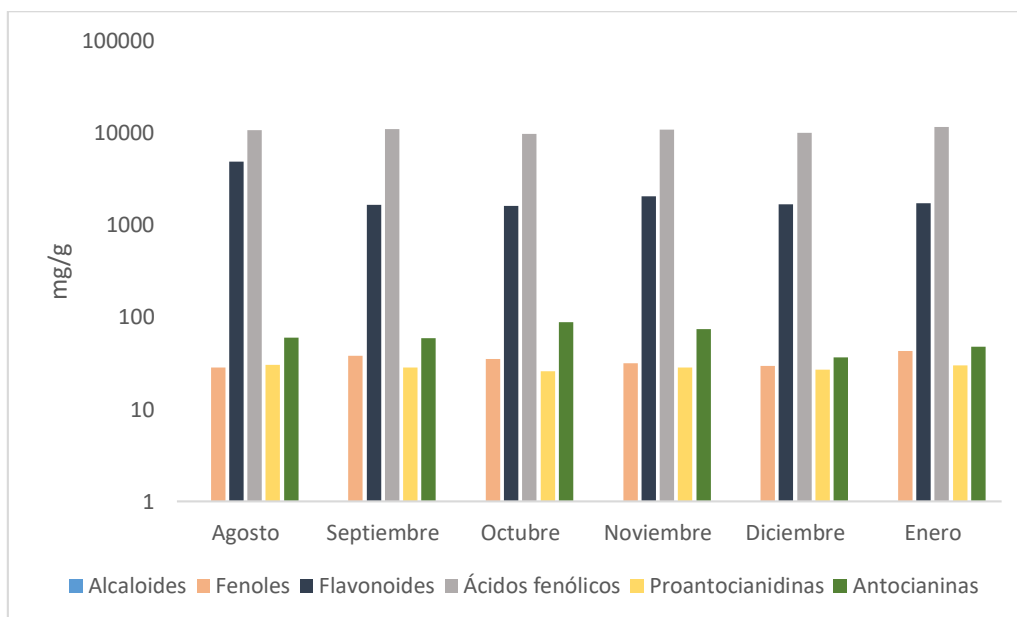


Figura 10. Metabolitos secundarios totales con relación al tiempo.

7.3.1 Alcaloides

Las placas cromatográficas en capa fina (CCF) con el reactivo de Dragendorff como agente cromogénico indicaron que no hay presencia de alcaloides en ninguno de los meses analizados. La presencia de alcaloides tiñe la muestra de un color marrón-rojizo. (Figura 11, Anexo 13-17).

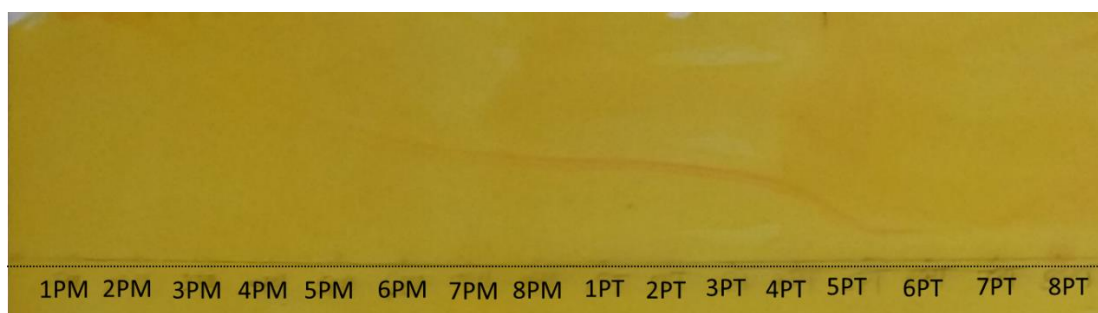


Figura 11. Placa de sílica gel revelada con reactivo de Dragendorff correspondiente al mes de agosto, plantas de la mañana (PM), plantas de la tarde (PT).

7.3.2 Fenoles totales

La comparación de las concentraciones de fenoles mensuales (unificando PM y PT por mes) indicó que existen diferencias significativas entre enero y el resto de los meses del año (Figura 12).

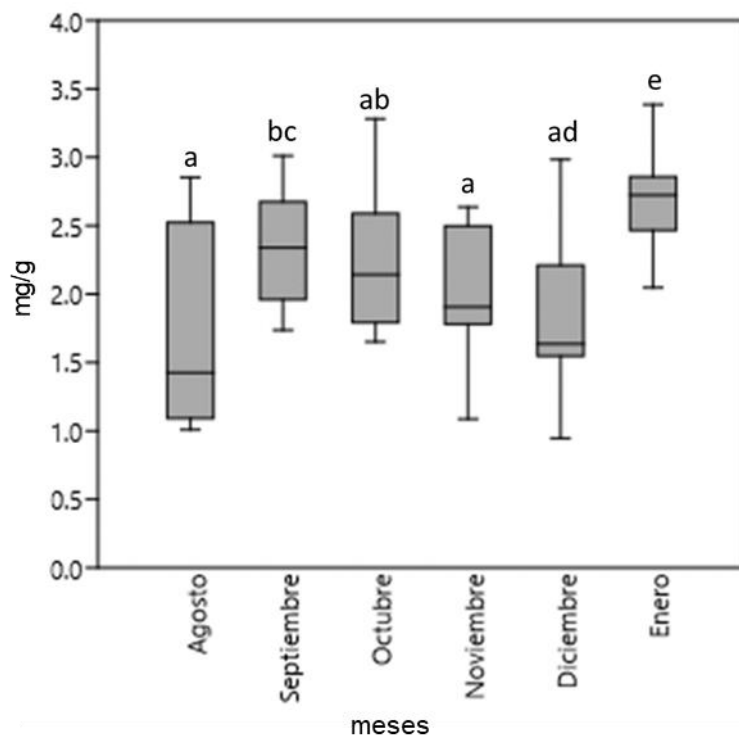


Figura 12. Concentración mensual de fenoles. Las letras en las barras simbolizan la diferencia o similitud estadística entre los meses. $n=96$, $p= 1.64 \times 10^{-05}$.

Los extractos de las plantas recolectadas en la mañana (PM) presentaron menor concentración de fenoles en agosto (1.2 mg/g) y mayor en enero (2.8 mg/g). Por otro lado, en las plantas de la tarde (PT), la menor concentración de fenoles fue en diciembre (1.9 mg/g) y la mayor nuevamente en enero (2.6 mg/g) (Figura 13).

Las plantas de la mañana (PM) en comparación con las plantas de la tarde (PT) en un periodo de seis meses, presentaron una menor proporción de fenoles solo en agosto y septiembre, en los restantes meses siempre fue mayor. Además, en agosto fue el único mes donde se presentó una diferencia significativa entre PM y PT (agosto: $p= 0.011719$; septiembre: $p= 0.16143$; octubre: $p= 0.20758$; noviembre: $p= 0.12349$; diciembre: $p= 0.88864$ y enero: $p= 0.40081$) (Figura 13).

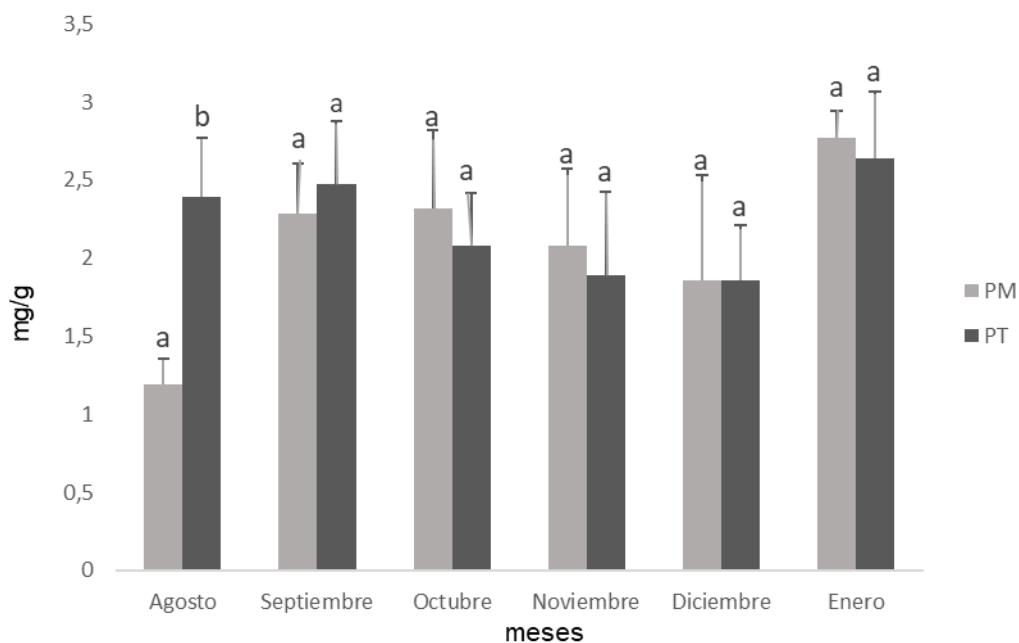


Figura 13. Concentración mensual de fenoles con relación al horario. Las letras en las barras simbolizan la diferencia o similitud estadística entre plantas de la mañana (PM) y plantas de la tarde (PT) de cada mes, n=16.

7.3.3 Flavonoides totales

La comparación de las concentraciones de flavonoides mensuales (unificando PM y PT por mes) indicó que fue agosto el mes que mostró diferencia significativa con respecto a los demás (Figura 14).

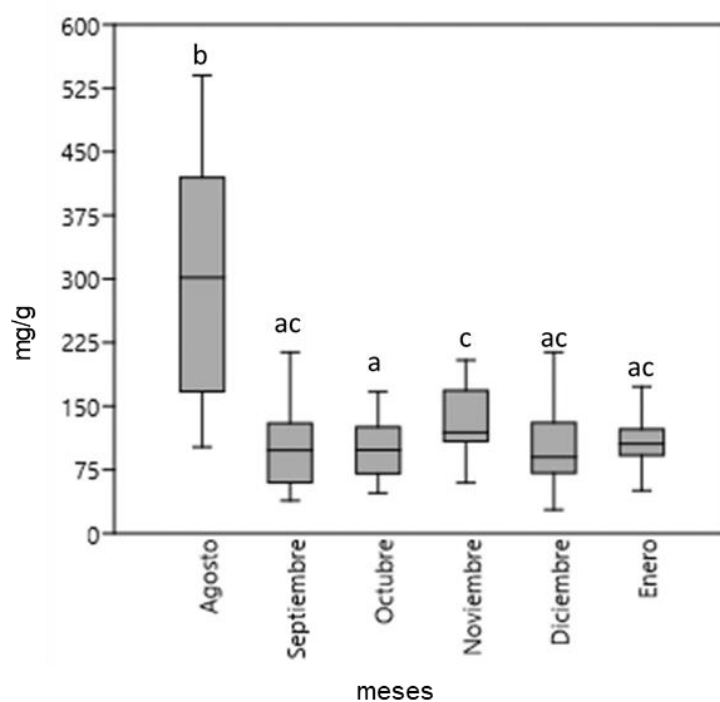


Figura 14. Concentraciones mensuales de flavonoides. n=96, p= 5.10x10⁻⁰⁶

Los flavonoides totales en las plantas de la mañana (PM), estuvieron en menor concentración en octubre (92.4 mg/g) y la mayor en agosto (243.1 mg/g). En contraste, las plantas de la tarde (PT), presentan menor concentración de flavonoides en septiembre (98.7 mg/g) y mayor en agosto (365.2mg/g) (Figura 15).

En el periodo de seis meses, las plantas de la mañana (PM) tuvieron menores concentraciones de flavonoides que las plantas de la tarde (PT) en octubre, diciembre y enero. La comparación entre las PM y PT en cada mes, nos indica que no existen diferencias significativas entre ellas (agosto: $p= 0.12349$; septiembre: $p= 1$; octubre: $p= 0.26262$; noviembre: $p= 0.48384$; diciembre: $p= 0.16143$ y enero: $p= 0.068704$) (Figura 15).

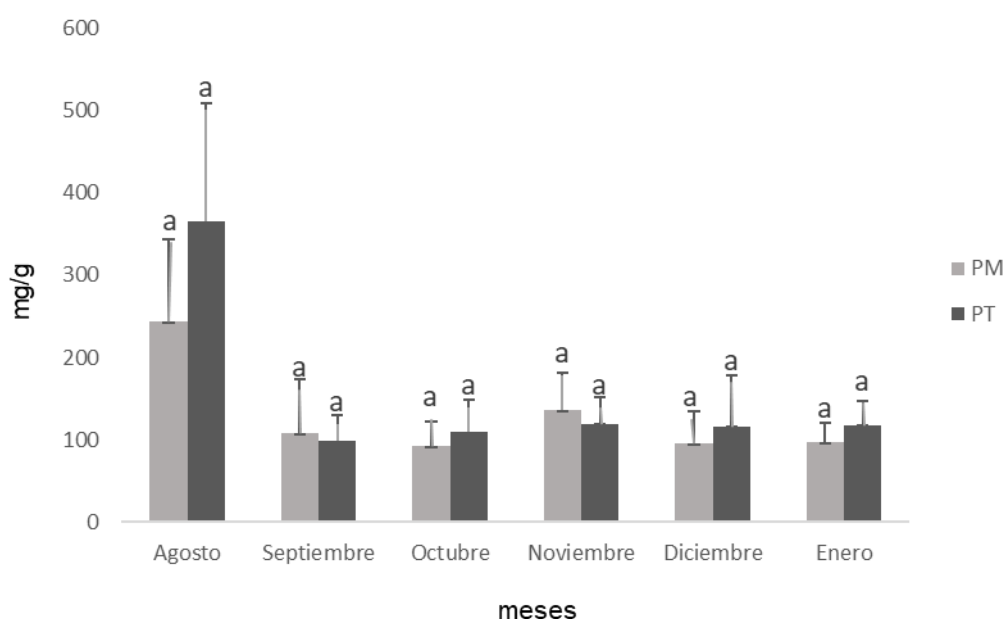


Figura 15. Concentración mensual de flavonoides con relación al horario.

7.3.4 Ácidos fenólicos totales

La comparación de ácidos fenólicos durante el estudio (unificando PM y PT por mes), indica que no existieron diferencias entre los meses (Figura 16).

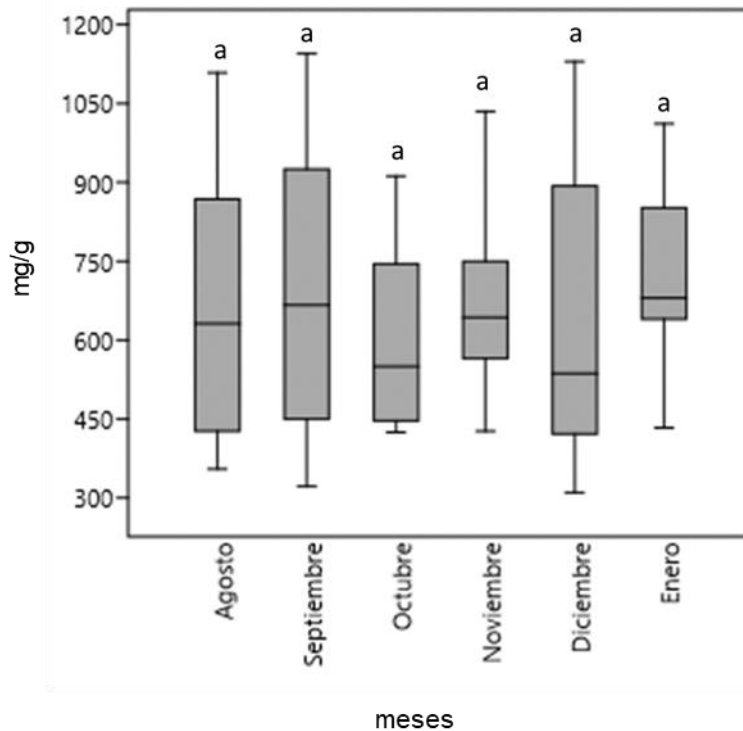


Figura 16. Concentración mensual de ácidos fenólicos. n=96, p= 0.4717.

Los ácidos fenólicos totales en las plantas de la mañana (PM), presentaron menor concentración en agosto y octubre (ambos con un valor de 537.3 mg/g). La mayor concentración para las PM estuvo en noviembre (751.9 mg/g). A diferencia, las plantas de la tarde (PT) presentaron menor concentración en noviembre (605.2 mg/g) y la mayor en agosto (797.1 mg/g) (Figura 17).

Las plantas de la mañana (PM) en comparación con las de la tarde (PT) en un periodo semestral, presentaron una concentración mayor solo en noviembre, en los otros meses la proporción fue menor y constante. Además, en agosto es el único mes en el que se presentó una diferencia significativa entre las PM y PT (agosto: p= 0.035692; septiembre: p= 1; octubre: p= 0.26262; noviembre: p= 0.20758; diciembre: p= 0.40081 y enero: p= 0,67442) (Figura 17).

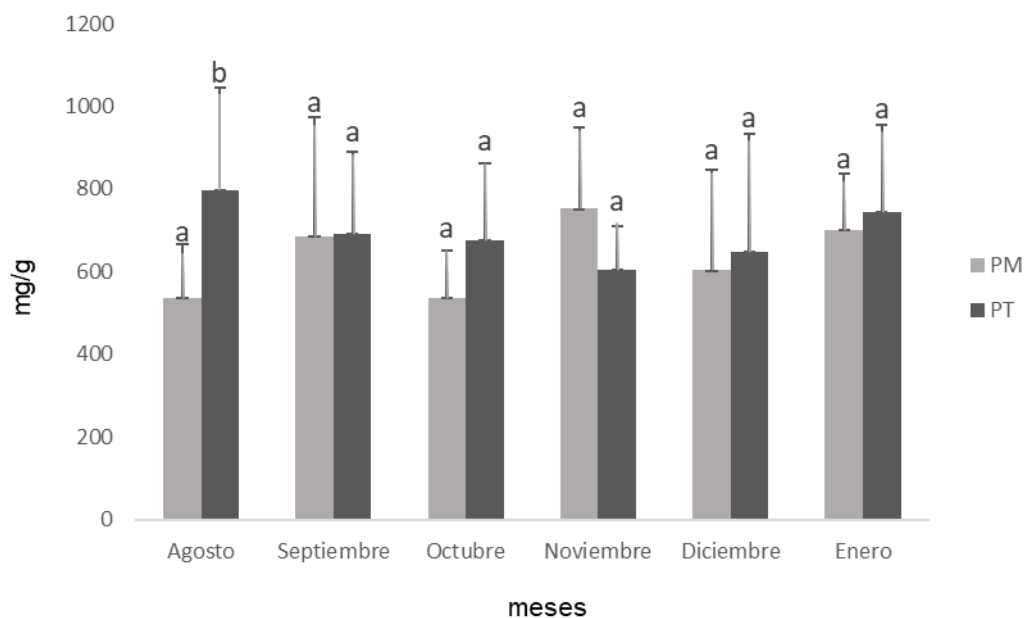


Figura 17. Concentración mensual de ácidos fenólicos con relación al horario.

7.3.5 Proantocianidinas totales

Las comparaciones mensuales (unificando PM y PT por mes) de proantocianidinas indica que existen diferencias, que en enero hubo más proantocianidinas que en octubre, noviembre y diciembre, y que en octubre hubo menos que en agosto y enero (Figura 18).

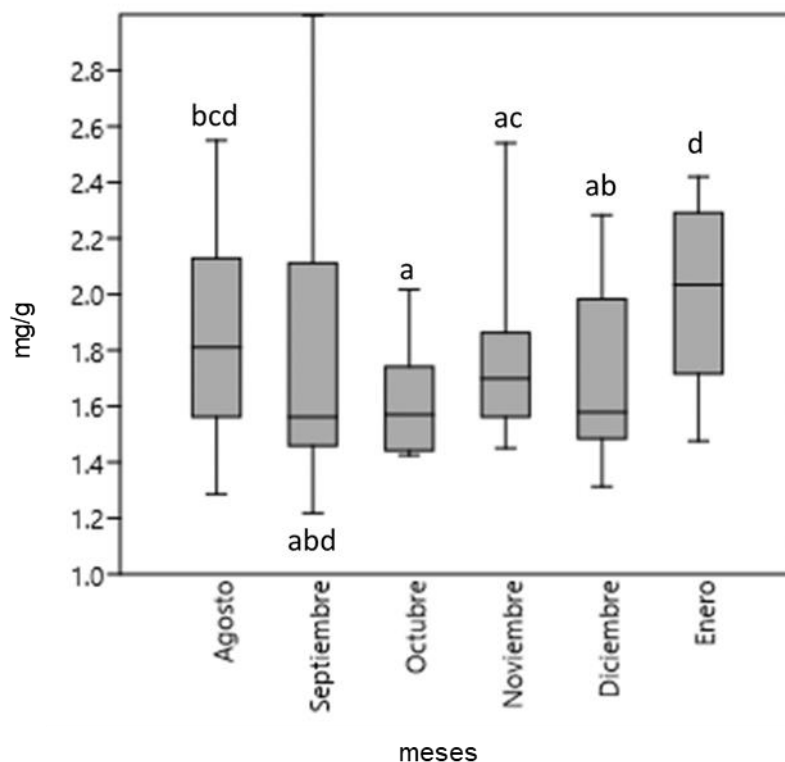


Figura 18. Concentración mensual de proantocianidinas. n=96, p=0.0197.

Hubo menor proporción de proantocianidinas totales en las plantas de la mañana (PM) en octubre (1.7 mg/g) y en mayor en noviembre (1.9 mg/g). De igual manera, las plantas de la tarde (PT) presentaron la menor concentración en octubre (1.5 mg/g) y la mayor en enero (2.0 mg/g) (Figura 19).

Las plantas de la mañana (PM) a diferencia de las plantas de la tarde (PT) durante un semestre, tuvieron menor concentración de proantocianidinas en agosto y enero. Además, la concentración es mayor de septiembre a diciembre. La comparación entre PT y PM de manera mensual indicó que no existen diferencias en las concentraciones por horario en ninguno de los meses (agosto: p= 0.5754; septiembre: p= 0.48384; octubre: p= 0.062979; noviembre: p= 0.18289; diciembre: p= 0.16143 y enero: p= 0.48384) (Figura 19).

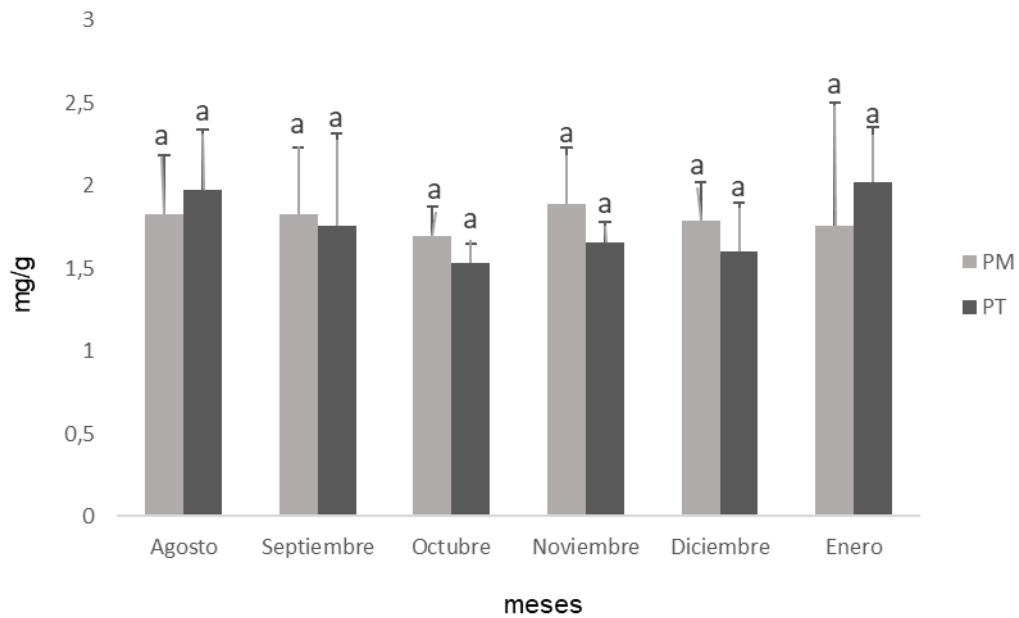


Figura 19. Concentración mensual de proantocianidinas con relación al horario.

7.3.6 Antocianinas totales

Las comparaciones de las concentraciones mensuales (unificando PM y PT por mes) de antocianinas entre los meses indicaron que, no existen diferencias (Figura 20).

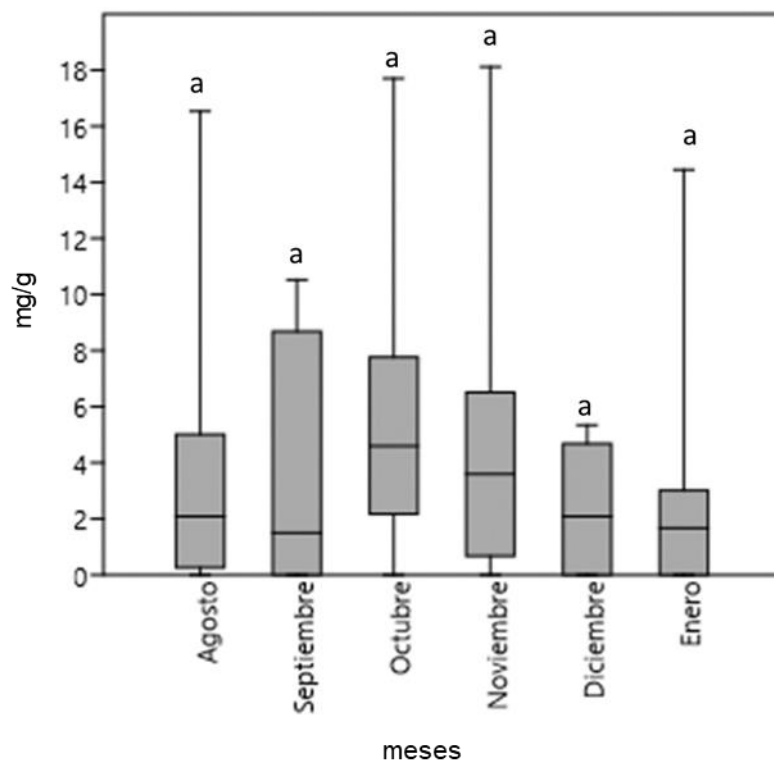


Figura 20. Concentración mensual de antocianinas. n=96, p= 0.2808.

Para las plantas de la mañana (PM), la menor concentración de antocianinas ocurrió en enero (2.5 mg/g) y la mayor en octubre (6.5 mg/g). Por otro lado, para las plantas de la tarde (PT), la menor concentración se presentó en diciembre (1.5 mg/g) y la mayor en noviembre (5.5 mg/g) (Figura 21).

En las plantas de la mañana (PM) en un periodo de seis meses, hubo menor concentración de antocianinas en enero en comparación con las plantas de la tarde (PT). Sin embargo, la concentración fue mayor de agosto-diciembre. En cuanto a la comparación entre PT y PM de manera mensual, no existen diferencias en las concentraciones por horario en ninguno de los meses (agosto: $p= 0.77943$; septiembre: $p= 0.75315$; octubre: $p= 0.4833$; noviembre: $p= 0.26262$; diciembre: $p= 0.092892$ y enero: $p= 0.86577$) (Figura 21).

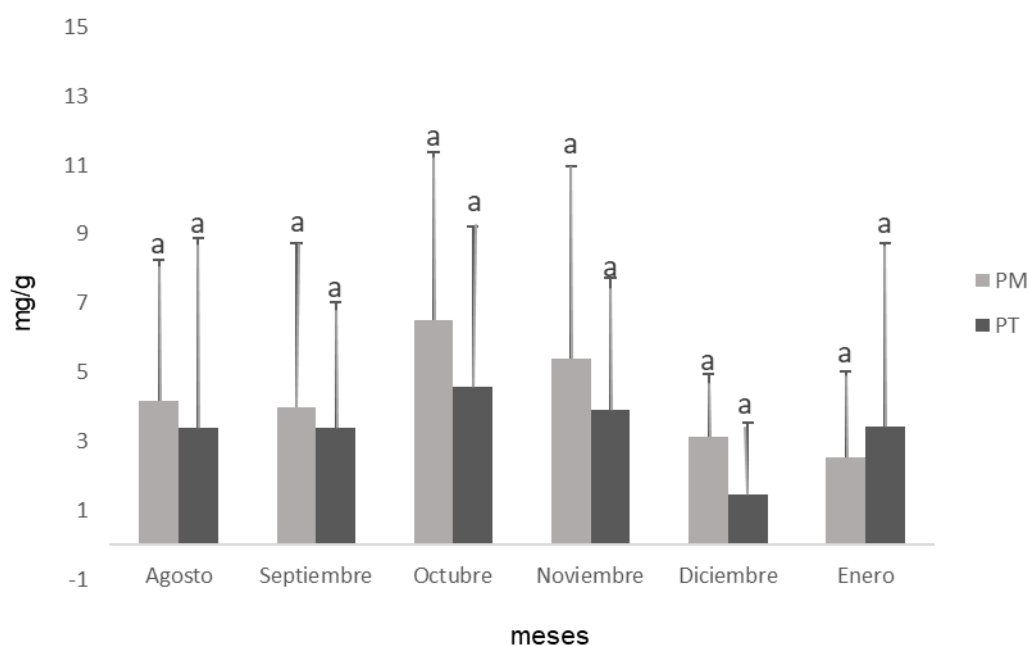


Figura 21. Concentración mensual de antocianinas con relación al horario.

7.4 Análisis multivariado y de correlación

La prueba de escalamiento multidimensional (MDS) y el análisis de permutaciones ($p=0.0001$) indicó que las concentraciones de MS presentes en agosto son diferentes a todos los demás meses (Figura 22).

La correlación de las variables ambientales con las concentraciones de metabolitos secundarios semestrales nos indica que los flavonoides y antocianinas dependieron de las variables ambientales. Las concentraciones de los flavonoides están poco relacionadas con la precipitación ($r= 0.2139$), radiación promedio ($r=$

0.33608) y la temperatura máxima ($r= 0.30978$). Por otro lado, las antocianinas están relacionadas débilmente solo con la temperatura mínima ($r= 0.2113$) (Figura 23).

La correlación canónica (CCA) muestra que las concentraciones de metabolitos secundarios en agosto son diferentes a la de los demás meses y se encuentran influenciadas por las variables microclimáticas de precipitación, radiación promedio, temperatura máxima y temperatura mínima (Figura 24).

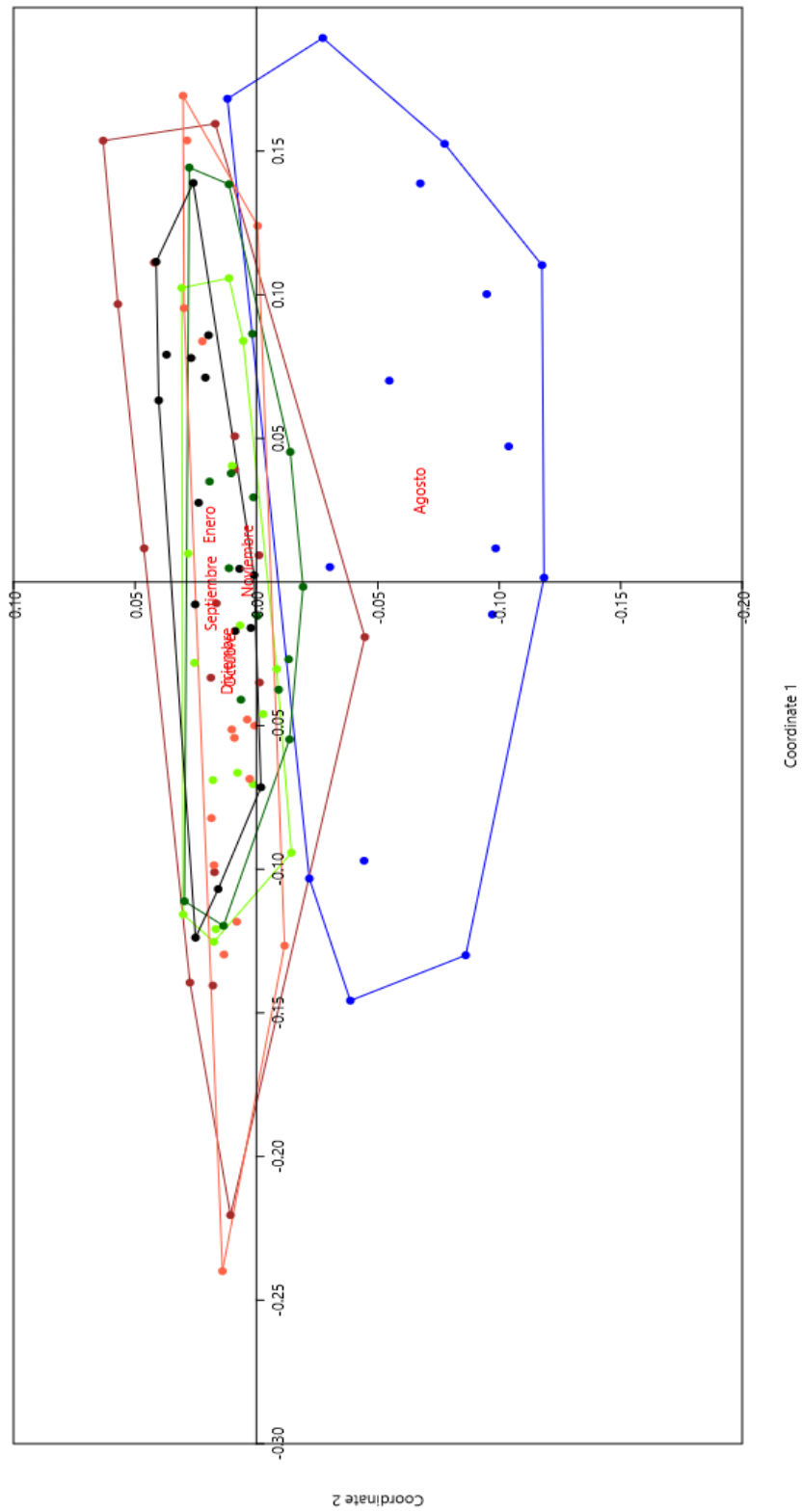


Figura 22. Escalamiento multidimensional (MDS) para los metabolitos secundarios analizados. Índice de similitud: Bray-Curtis. PERMANOVA, $p=0.0001$.

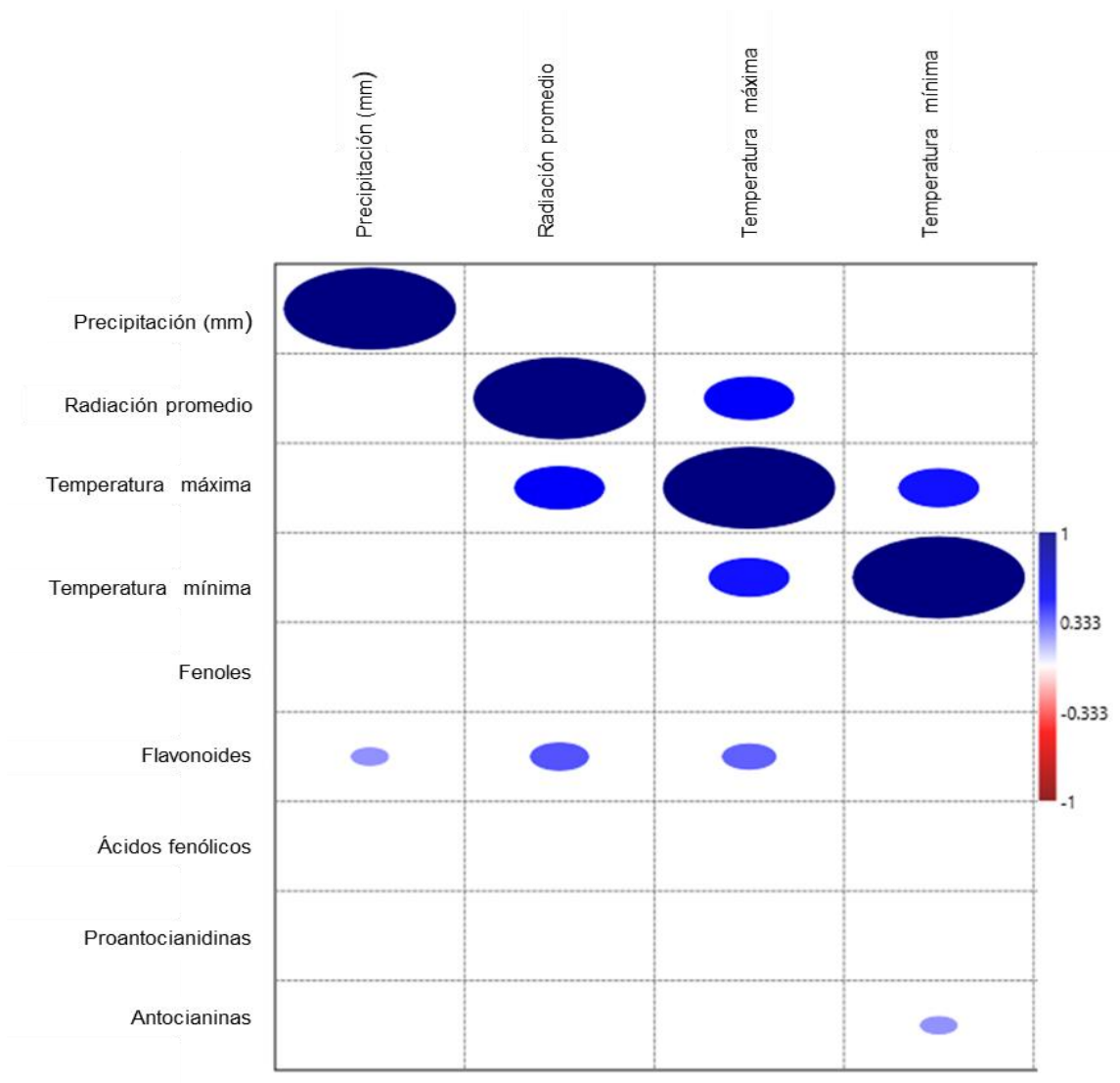


Figura 23 Correlación entre los metabolitos secundarios y factores microclimáticos. Flavonoides-Precipitación, $r= 0.2139$; flavonoides-Radiación promedio, $r= 0.33608$; flavonoides-Temperatura máxima, $r= 0.30978$ y antocianinas-temperatura mínima, $r= 0.2113$.

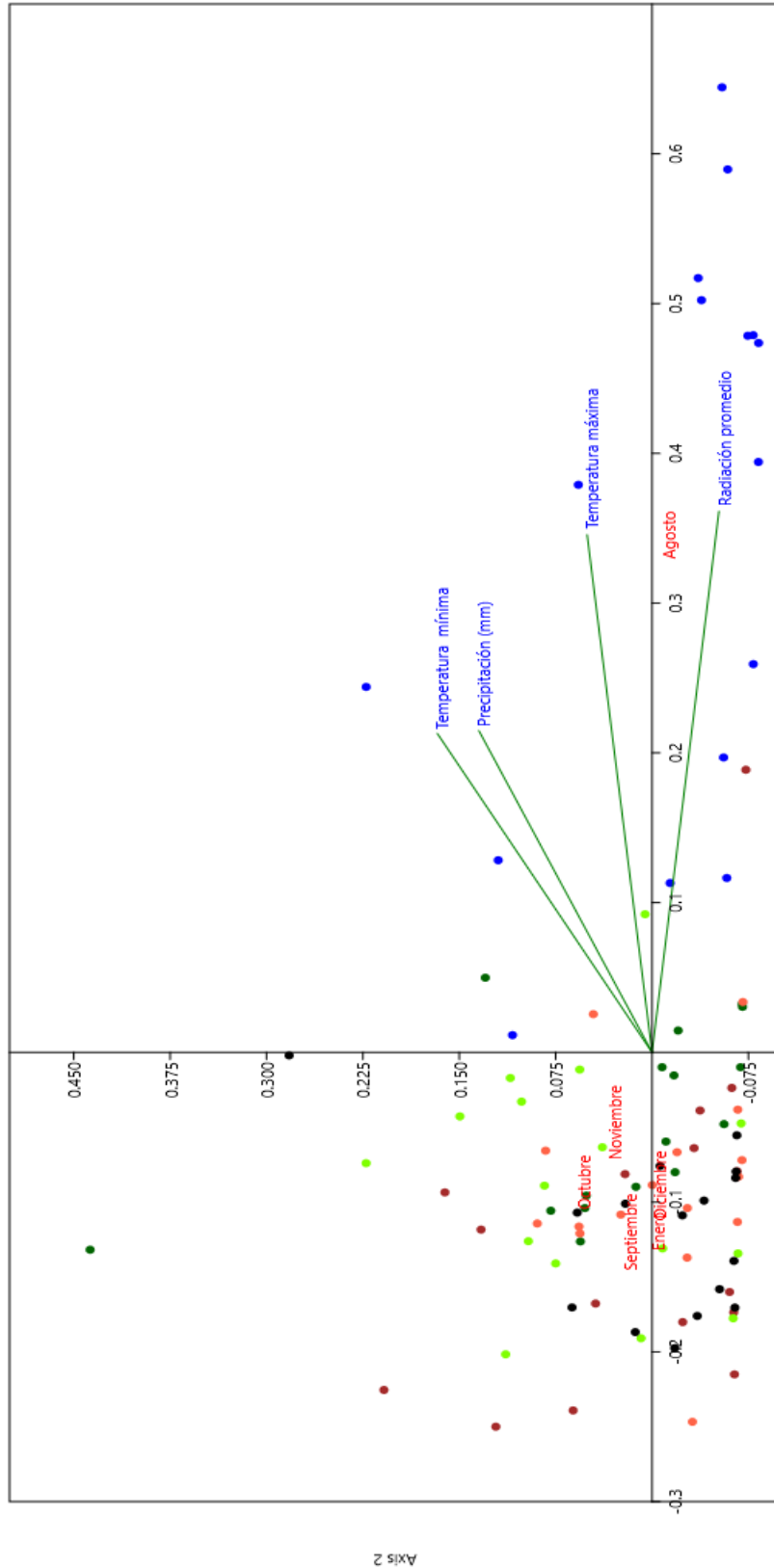


Figura 22. Correlación canónica entre los metabolitos secundarios y las variables ambientales de precipitación, radiación promedio, temperatura mínima y máxima.

VIII. DISCUSIÓN

Los datos climatológicos del área de estudio en el periodo agosto 2018 enero 2019, resultaron ser distintas a lo largo del año, siendo agosto cuando la precipitación, la temperatura y la radiación alcanzan sus mayores valores. En diciembre y enero no hay lluvia, en este periodo se presentaron las menores temperaturas y radiación alta. Estos datos permiten distinguir los meses de lluvias y los de estiaje, caracterizando agosto, septiembre y octubre como la estación húmeda y noviembre, diciembre y enero como la estación seca.

En las selvas tropicales secas, la estacionalidad de la lluvia produce cambios drásticos que incrementan la cobertura del dosel y por tanto la cantidad de luz y de temperatura. Bajo el dosel de una selva seca se tienen valores altos de radiación durante la estación seca y valores bajos durante la estación lluviosa (Nobel y De la Barrera, 2004). Los datos de radiación capturados por la microestación climatológica demostraron una radiación promedio alta en agosto (28.14 W/m^2) que disminuye considerablemente hacia octubre (13.97 W/m^2) y vuelve a aumentar en los meses siguientes que corresponden a la estación seca, en tanto que, también en este mes se presentó la mayor temperatura (23.7°C). Este aumento y disminución de la radiación corresponde al cambio de estación con su consecuente modificación de la cobertura en la zona de estudio (Figura 25, a-f). En diciembre se tuvo la temperatura más baja (20°C) (Figura 9)

Los cambios en la cantidad de metabolitos secundarios que una planta puede biosintetizar o acumular dependen del estímulo que perciba. Entre los factores abióticos se incluyen la luz, radiación ultravioleta, disponibilidad de agua, temperatura y composición del suelo (Wink, 2003). Las condiciones ambientales señaladas en este trabajo como estación húmeda y seca permitieron buscar si en una planta con metabolismo CAM, como *E. oxypetalum*, suceden variaciones referidas al metabolismo secundario, como las reportadas en *Annona lutescens* por Castro en el 2013 que señala incrementos del alcaloide liriodenina en condiciones de estrés hídrico, en plantas jóvenes con valores que se incrementan de $1.59 \mu\text{molg}^{-1}$ en temporada de lluvias hasta $775.53 \mu\text{molg}^{-1}$ en temporada seca, mientras que en plantas adultas el contenido se incrementa $0.682 \mu\text{molg}^{-1}$ hasta $377.56 \mu\text{molg}^{-1}$ respectivamente, o en *Tropaeolum tuberosum*, en que Santayana-Rivera (2018) reporta la disminución de compuestos fenólicos en plantas expuestas

a luz solar directa, con concentraciones que varían desde 10.63 mg AGE g ms⁻¹ (mg equivalentes de ácido gálico por gramo de materia seca) hasta 3.48 mg AGE.g ms⁻¹ en un plazo de 15 días de exposición; también en *Tithonia diversifolia* y *Gliricidia sepium*, Santacoloma y Granados (2010) reportan una variación en la biosíntesis de polifenoles totales (PFT) y taninos totales (TC) en diferentes condiciones lumínicas y pisos térmicos, para *T. diversifolia* los valores varían de 0.043% (PFT) y 0.310% (TC) a mayor altitud y menor temperatura hasta valores de 0.262% (PFT) y 0.491% (TC) a menor altitud y mayor temperatura. Para *G. sepium* encuentran valores de 0.050% (PFT) y 0.31% (TC) a mayor altitud y menor temperatura hasta 3.01% (PFT) y 0.49 (TC) a menor altitud y mayor temperatura, encontrando un incremento significativo para ambos tipos de metabolitos en las muestras provenientes de los pisos térmicos de mayor altitud.

Los trabajos reportados sobre *Epiphyllum oxypetalum*, no estudian la variación de metabolitos secundarios que pudiera ocurrir por efecto del clima o del tipo de fotosíntesis que tienen, únicamente señalan la presencia de saponinas, compuestos fenólicos, esteroides, glicósidos, terpenoides y resinas, así como la ausencia de alcaloides, flavonoides y compuestos ácidos (Upendra y Khandelwal, 2012). En esta investigación no se detectaron alcaloides en ninguno de los meses estudiados, pero sí diferentes compuestos fenólicos como proantocianidinas, antocianinas y a diferencia de lo mencionado por Upendra y Khandelwal (2012), se encontraron flavonoides y ácidos fenólicos. Sin embargo, en *Epiphyllum phyllanthus* var. *Hookeri*, especie cercana a *E. oxypetalum*, se reporta la presencia moderada de saponinas y alcaloides (Padrón, Moreno y Medina, 2008).

En este trabajo se buscó determinar el efecto del microclima, caracterizado como temporalidad de lluvias y sequía, así como determinar la riqueza y abundancia de los metabolitos secundarios de los filocladios en ciclos diurnos y nocturnos de *E. oxypetalum* planta epífita con fotosíntesis CAM. Debido a que la fijación de CO₂ y la producción de ácido málico se lleva a cabo en la noche y la biosíntesis de compuestos orgánicos a partir de la descarboxilación del malato ocurre durante las horas de luz (Andrade *et al.*, 2007), es de esperarse que los azúcares, metabolitos secundarios y otras moléculas se biosinteticen durante el día. Todos los metabolitos encontrados en este trabajo son fenoles, aunque de distintitos tipos (fenoles simples, ácidos fenólicos, flavonoides, proantocianidinas y antocianinas), lo que significa que en esta planta existe la expresión diferencial o la

diversificación de las rutas biosintéticas que dan origen a estos compuestos, la del shikimato y eritrosa 4- fosfato que produce fenoles simples (16.7 y 17.8 mg) y ácidos fenólicos (5088.7 y 5550.4 mg) y la del shikimato-policétidos, por la presencia de antocianinas (34.3 y 26.9 mg) y de flavonoides (1027.7 y 1235.6 mg) por la mañana y la tarde respectivamente durante las dos épocas de recolecta, siendo los ácidos fenólicos los mejores representados. Sin embargo, la presencia de metabolitos durante la mañana y durante la tarde, no permitieron establecer una relación con el tipo de fotosíntesis, por lo que tal vez se tendrían resultados diferentes si la recolecta de las plantas se llevara a cabo durante la noche, periodo que al parecer, por el tipo de fotosíntesis de estas plantas, la biosíntesis de metabolitos secundarios no se expresaría o al menos no con la misma intensidad que durante el día, de esto no hay reportes en la literatura científica.

Los efectos del fotoperiodo, aunque no en *E. oxypetalum*, también han sido estudiados como variables que pueden afectar el crecimiento, la producción y la acumulación de metabolitos secundarios como ha reportado Zhang y colaboradores (2002) en *Vitis vinífera* donde, después de irradiar continuamente con luz de 8000–8300 lux, la acumulación máxima de antocianinas alcanzada fue de 6.8 CV (valor de color) / g-FCW (peso celular fresco) en el día 10, que fue 4.8 veces mayor que la del control; también en *Podophyllum hexandrum*, Chattopadhyay y colaboradores (2002) reportan que la biosíntesis de podofilotoxina se favoreció cuando las células vegetales se cultivaron en oscuridad total, incrementando de 3.8 mg/L en periodos de luz/oscuridad (16/8 h) a 4.9 mg/L en total oscuridad. Algunos de los metabolitos secundarios, definidos químicamente como compuestos fenólicos varían su concentración de acuerdo a estos estímulos abióticos (Ashihara, Sano y Crozier, 2008).

En el caso de *E. oxypetalum* los fenoles y ácidos fenólicos (medidos a partir de una curva patrón de ácido gálico y ácido caféico respectivamente), se presentaron en cantidades relativamente mayores en la temporada seca. El estrés por el incremento de las temperaturas induce la producción de ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas, como ocurre en *Fragaria x ananassa Duch* (Wang y Zheng, 2001; Wahid, 2007); de igual manera, la radiación UV induce la producción de fenoles, flavonoides y antocianinas, tal es el caso en *Vitis vinífera* (Strack, 1997; Zhang *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2011). Los flavonoides y proantocianidinas se encuentran en *E. oxypetalum* cuando la temperatura y radiación son mayores. No

obstante, todo ello, no presentó una tendencia a disminuir o incrementar la concentración de lo MS a lo largo de los 6 meses. Los metabolitos mayormente producidos fueron los ácidos fenólicos y los de menor presencia, las proantocianidinas.

Sin embargo, cuando se considera la presencia relativa (totales acumulados del día y de la tarde de todos los ejemplares) con relación al impacto de la temporada de lluvias y de estiaje, se presenta un incremento de fenoles simples y ácidos fenólicos durante la época de estiaje, en que la radiación es muy alta y la temperatura va en incremento, a diferencia de lo reportado para compuestos fenólicos por Santayana-Rivera (2018) en *Tropaeolum tuberosum*, donde en el día 12 del tratamiento en sombra se indujo una mayor biosíntesis de compuestos fenólicos totales (14.9 mg) y antocianinas totales (3.7 mg). Los flavonoides y antocianinas están mayormente presentes en agosto cuando las lluvias son intensas y las plantas pueden florecer (Ramos, 2016); las proantocianidinas con excepción de agosto, se expresan mayormente en la época de secas.

Experimentos en diferentes especies vegetales como en rábanos (*Raphanus sativus*) y ciruela (*Prunus domestica*) que se desarrollan en medios con baja disponibilidad de agua, son las que presentan una mayor concentración de taninos condensados, lignina, fenoles totales y/o glicósidos de fenoles (Gershenzon, 1984).

Finalmente, la correlación de las variables ambientales con las concentraciones de metabolitos secundarios demuestra que los flavonoides y las antocianinas tienen una correlación ligera con las variables ambientales, flavonoides con la precipitación, radiación, temperatura y las antocianinas con la temperatura. De igual manera la correlación canónica exhibe una relación entre las concentraciones y las variables microclimáticas, en especial en el mes de agosto.

Todo ello indicaría bioquímicamente tres cosas: que la ruta de fenoles es constante durante el día, originando metabolitos secundarios constitutivos o permanentes que, sin embargo, a partir de precursores comunes que alimentan a esta ruta de metabolitos de estructura aromática, se privilegia una en particular; y que responden de forma diferente a las variables climáticas.



Figura 23. Cambio en el aspecto externo e interno del área de estudio en seis meses. a) agosto, b) septiembre, c) octubre, d) noviembre, e) diciembre y f) enero.

IX. CONCLUSIONES

- *Epiphyllum oxypetalum* no presentó alcaloides, pero sí fenoles simples, flavonoides, ácidos fenólicos, proantocianidinas además de antocianinas durante las primeras y últimas horas luz del día, asimismo no tuvieron una variación significativa respecto a la hora de recolecta durante los seis meses, excepto los fenoles y ácidos fenólicos, para ambos casos en el mes de agosto.
- Las condiciones ambientales se diferenciaron en dos estaciones, la estación húmeda (agosto, septiembre y octubre) y la seca (noviembre, diciembre y enero). Sin embargo, no se presentó una tendencia a incrementar o disminuir la concentración de los MS a lo largo de las dos estaciones.
- Durante la estación seca los fenoles simples, ácidos fenólicos y proantocianidinas estuvieron relativamente en mayor cantidad, mientras que, durante la época de lluvias, se incrementaron los flavonoides y antocianinas.
- Durante el mes de agosto fue más evidente la relación entre la concentración de metabolitos secundarios y las condiciones ambientales. Los flavonoides y antocianinas son los MS que exhiben una correlación ligera con las variables ambientales, flavonoides con la precipitación, radiación, temperatura y las antocianinas con la temperatura.

X. PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES

- Se propone realizar una ampliación del tiempo del experimento, abarcando de manera completa las dos estaciones del año, lluvia y estiaje.

XI. REFERENCIAS DOCUMENTALES

- Alcántar, F. C. 2005. Identificación y cuantificación de metabolitos secundarios en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) transformadas con sistemina y prosistemina de jitomate en respuesta a daño mecánico, herbivoría con *Manduca sexta* e infestación con mosquita blanca (*Bemisia tabaci*). Tesis de Maestría. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética de Plantas, Departamento de Biotecnología y Bioquímica.
- Alías, J. C. 2006. Influencia de los factores climáticos en la síntesis y actividad de compuestos fitotóxicos secretados por *Cistus ladanifer* L. Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura. Badajoz, España.
- Anaya, A. 2003. Ecología química. Ed. Plaza y Valdés. México, D. F.
- Anderson, E. 2001. The cactus family. Ed. Timber Press. Cambridge.
- Andrade, J. L., De La Barrera, E., Reyes-García, C., Ricalde, M.F., Vargas-Soto, G. y Cervera, J.C. 2007. El metabolismo ácido de las crasuláceas: diversidad, fisiología ambiental y productividad. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 81: 37-50.
- Angiosperm Phylogeny Group. 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 181; 1-20.
- Ashihara, H., Sano, H., Crozier, A. 2008. Caffeine and related purine alkaloids: biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. *Phytochemistry*. 4: 841–856.
- Azcón, J. y Talón, M. 2008. Fundamentos de Fisiología Vegetal. Ed. McGraw-Hill. Madrid, España.
- Barceló, J., y Poschenrieder, C. 2002. Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. *Environmental Experiment Botany*, 48: 75-92.
- Batis, A. y Rojas, M. 2002. El peyote y otros cactus alucinógenos de México. CONABIO. *Biodiversitas*. 40: 12-17.

- Blum, A. 2009. Effective use of water (EUW) and not water-use efficiency (WUE) is the target of crop yield improvement under drought stress. *Field Crops Research*. 112:119-123.
- Bramley, M. 1997. Isoprenoid metabolism. *Plant Biochemistry*. 417-437.
- Bravo, H. y Sánchez, H. 1978. Las cactáceas de México. Ed. Universidad Autónoma de México. México, D. F.
- Bravo L. 1998. Poliphenol: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Review*. 56: 317-333.
- Bruhn, J.G. 1971. Alcaloides en las cactáceas. *Cactáceas y suculentas mexicanas*. 3: 51-57.
- Castillo Campos, G., Dávila Aranda, P., Zavala Hurtado, J. A. 2007. La selva baja caducifolia en una corriente de lava volcánica en el centro de Veracruz: lista florística de la flora vascular. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 80: 77-104.
- Castro-Moreno, M. 2005. Efecto del estrés hídrico en la biosíntesis de alcaloides y acetogeninas en plántulas de *Annona lutescens* Saff. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.
- Castro-Moreno, M. 2013. Respuesta fisiológica y biosíntesis de liriodenina frente al estrés hídrico en *Annona lutescens* Saff. Tesis de Doctorado. Instituto de Biología-Ecología, Universidad Autónoma de México, Posgrado en Ciencias Biológicas. México. D.F.
- Chattopadhyay, S., Srivastava, A., Bhojwani, S. y Bisaria, V. 2002. Production of podophyllotoxin by plant cell cultures of *Podophyllum hexandrum* in bioreactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 93: 215-220.
- Chaves, N. y Escudero, J.C. 1997. Allelopathic effect of *Cistus ladanifer* on seed germination. *Functional Ecology*. 11: 432-440.
- Chaves, N. y Escudero, J.C. 1999. Variation of flavonoid synthesis induced by ecological factors. *Principles and Practices in Plant Ecology. Allelochemicals Interactions CRC Press*. 267-285.
- Chong-Rodríguez, E.A. 2016. Alcaloides con actividad antifúngica de *Sapranthus campechianus* (Kunth) Standl. (Annonaceae). Tesis de Licenciatura. Instituto de Ciencias Biológicas. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.

- De la Cruz-Chacón, I. y González-Esquinca, A. R. 2012. Liriodenine alkaloid in *Annona diversifolia* during early development. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letter*. 26:1, Pp 42-49.
- Domínguez, S. X. A., Rojas, P., Gutiérrez, M., Armenia, N. y Lara G. 1969. "Estudio químico preliminar de 31 cactáceas". *Revista de la Sociedad Química de México*. 13: 8-12.
- Domínguez S. Xorge. A. y Domínguez S., Jr. Xorge A. 1976. Aspectos químicos de las Cactáceas. *Cactáceas y suculentas mexicanas*. 21: 39-47.
- Edwards, R. y Gatehouse, J.A. 1999. Secondary metabolism. En: Lea, P.J. y Leegood, R.C. (Eds.). *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. John Wiley and Sons Ltd. Maryland, USA. Pp. 193-218.
- Ehleringer, J. R, y Cook, C. S. 1990. Characteristics of *Encelia* species differing in leaf reflectance and transpiration rate under common garden conditions. *Oecologia* 82: 484-489.
- Erdelská, O. y Stintzing, F. 2011. Phytochemical and morphological evaluation of flowers and fruits from *Epiphyllum* hybrids during development. *Biología* 66: 821-827.
- Franch, R., Janda. M. y Ahlquist. F. 1987. Bacterial gene inserted in an engineered RNA virus: Efficient Expression in Monocotyledonous Plant Cell. *Science*, 14: 1294-1297.
- Gershenzon, J. 1984. Changes in the production of plant secondary metabolites under water and nutrient stress. Plenum Press, New York. 286-289
- González-Esquinca, A. R. 2001. Contribución al estudio del género *Annona* (Annonaceae), análisis fitoquímico de tres especies del estado de Chiapas. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de México. México.
- Granados, D., López, G., Hernández, M. y Sánchez, A. 2003. Ecología de las plantas epífitas. Chiapingo. *Serie de Ciencias Forestales y del Ambiente*. 101-111.
- Guzmán, U., Arias, S. y Dávila, P. 2003. Catálogo de Cactáceas Mexicanas. Ed. UNAM-CONABIO, México.
- Hammel, B. 2017. *Epiphyllum oxypetalum* (amended version of 2013 assessment). The IUCN Red List of Threatened Species 2017: e.T152393A121472900. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T152393A121472900.en>. Downloaded on 09 January 2019.

- Harborne, J.B. 1980. Plants phenolics. *Plant physiology*. 329-395.
- Harborne, J.B. 1991. Recent advances in the ecological chemistry of plant terpenoids. *Ecological Chemistry and Biochemistry of plant Terpenoids*. 399-426.
- Harborne, J.B. 1997. Biochemical plants ecology. *Plant biochemistry*. 503-516.
- Hernández, H., Alvarado, V., y Ibarra, R. 1993. Base de datos de colecciones de cactáceas del Norte y Centroamérica. Anales del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México. *Serie Botánica*. 64: 87-94.
- Hidore, J. y Olivier, J.1993. Climatology. Ed. Mac Millan, New York.
- INEGI. 2018. Espacio y datos de México: Chiapas, Berriozábal. <http://www.beta.inegi.org.mx/app/mapa/espacioydatos/default.aspx?ag=07012>. Consultado en línea el 17 de octubre de 2020.
- INAFED. 2010. Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones de México, Tuxtla Gutiérrez.<http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM07chiapas/municipios/07101a.html> Consultado en línea el 17 de octubre de 2020.
- Ishiki-Ishihara, M., Arias, S. y Terrazas, T. 2013. Las cactáceas. En: La biodiversidad en Chiapas: Estudio de Estado. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) y Gobierno del Estado de Chiapas, México. Pp. 126-129
- Ilza F. y Pinotti M. 2000. Cyanogenic glycosides in plants. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 43: 487-492.
- János, V. 2000. Plant cyanogenic glycosides. *Toxicon*. 11-36.
- Jromov, S. 1983. Meteorología y Climatología para las facultades de Geografía. Vneshtorgizdat, Moscu.
- Julián-Loaeza, A. P., Santos-Sánchez, N. F., Valadez-Blanco, R., Sánchez-Guzmán, B. S., Salas-Coronado, R. 2011. Chemical composition, color, and antioxidant activity of three varieties of *Annona diversifolia* Safford fruits. *Industrial Crops and Products*. 34: 1262-1268.
- Kishen, J., Nadigar, S., Banu, R., Tripathi, M., y Upendra R. 2015. A review on the genus: *Epiphyllum*. *International Journal of Advanced Research in Engineering and Technology*. 6: 90-97.
- Lillo, A., Carvajal-Caiconte, F., Nuñez, D., Balboa, N. y Alvear Zamora, M. 2016. Cuantificación espectrofotométrica de compuestos fenólicos y actividad

- antioxidante en distintos berries nativos del Cono Sur de América. *Revista de Investigación Agropecuaria*. 42: 168-174.
- Mabberley, D.J. 1997. *The Plant-Book*. Ed. Cambridge, Cambridge University.
- Martínez-Cruz, N., Arévalo-Niño, K., Verde-Star, M., Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, A.; Núñez-González, M.; Morales-Rubio, M. 2011. Antocianinas y actividad anti radicales libres de *Rubusa denotrichus* Schltdl (zarzamora). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 42: 66–71.
- Matkowski, A., Tasarz, P. y Szypuła, E. 2008. Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from Lamiaceae, subfamily Lamioideae. *Journal of Medical Plants Research* 2: 321–330.
- Mazid, M., Khan, T. A., y Mohammad, F. 2011. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and Medicine*. 232-249.
- McGarvey y Croteau. 1995. Terpenoid metabolism. *Plant Cell*. 1015-1026.
- Meza, M. 2011. *Cactáceas mexicanas: usos y amenazas*. INE. México.
- Miranda, F. 2015. *La Vegetación de Chiapas*. Ed. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. México.
- Nobel, P. S. y De la Barrera, E. 2004. CO₂ uptake by the cultivated hemi epiphyte cactus, *Hylocerus undatus*. *Annals of Applied Biology*. 144: 1-8.
- Oropeza, M.P. 2012. *Alcaloides totales y actividad antioxidante de extractos metanólicos de hojas de Ipomoea murucoides (casahuate)*. Tesis de ingeniería. Universidad Tecnológica de la Mixteca. Huajuapán de León, Oaxaca, México.
- Padrón, C.A., Moreno, M.J. y Medina, C.A. 2008. Composición química, análisis estructural y factores antinutricionales de filocladios de *Epiphyllum phyllanthus* (L.) Haw. var. *hookeri* (Link & Otto) Kimn. (Cactaceae). *Interciencia*. 33: 443-448.
- Park, E. S., Moon, W. S., Song, M. J., Kim, M. N., Chung, K. H., y Yoon, J. S. 2001. “Antimicrobial Activity of Phenol and Benzoic Acid Derivatives.” *International biodeterioration and biodegradation* 47: 209-214.
- Price, M.L., Van Scoyoc, S., Butler, L.G. 1978. A critica evaluation of the vainillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *Journal of Agricultural. Food and Chemistry*. 26:1214–1218.
- Ramos Arreola, L. C. 2016. *Flora cactológica de las Selvas Bajas Caducifolias de la Depresión Central de Chiapas*. Tesis de Licenciatura. Instituto de Ciencias

- Biológicas. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.
- Roca, Juan. 1932. "Nota preliminar acerca del estudio químico del *Pachycereus margínalas*". *Anales del Instituto de Biología México*. 1: 204.
- Rodríguez-Garza, R.G. 2010. Tamizaje fitoquímico y actividad biológica de *Fouquieria splendens* (Engelmann), *Ariocarpus retusus* (Scheidweiler) y *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lemaire). Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Romero, C., Palma J. y López J. 2000. Influencia del pastoreo en la concentración de fenoles y taninos condensados en *Gliricidia sepium* en el trópico seco. *Livestock Research for Rural Development*. 12: 4.
- Sandermann, H., Ernst, J.R., Heller, D., y Langebartels, C. 1998. Ozone: an abiotic elicitor of plant defense reactions. *Trends in Plants Science*. 47-50.
- Santacoloma, L.E. y Granados, J.E. 2010. Evaluación del contenido de metabolitos secundarios en dos especies de plantas forrajeras encontradas en dos pisos térmicos de Colombia. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*. 31-35.
- Santayana-Rivera, M.L. 2018. Efecto del estrés abiótico post-cosecha en la síntesis de metabolitos secundarios y capacidad antioxidante de mashua morada (*Tropaeolum tuberosum*). Tesis de Posgrado. Universidad Nacional Agraria la Molina. Escuela de Posgrado, Maestría en Tecnología de Alimentos. Lima, Perú.
- Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2010. NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación.
- Sepúlveda, G., Porta, H. y Rocha, M. 2004. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 355-363.
- Smith, N. P., Mori, S. A., Henderson, A., Heald, S. V. y Stevenson, D. W. 2004. Flowering plants of the Neotropics. Ed. Princeton University. New Jersey, EE.UU.
- Smith, T. y Smith, R. 2007. Ecología. Ed. Pearson. España, Madrid.

- Sosa, T. 2003. Contribución al estudio de las funciones ecológicas que pueden desempeñar los compuestos derivados del metabolismo secundario en *Cistus ladanifer* L. Tesis de Doctorado. Universidad de Extremadura. Badajoz. España.
- Strack, D. 1997. Phenolic Metabolism. *Plant biochemistry*. 388-416.
- Taiz, L. y Zeiger, E. 2010. Plant Physiology. Ed. Sinauer Associates. USA.
- Tiwari, R. y Rana, S.C. 2015. Plant secondary metabolites: a Review. *International Journal of Engineering Research and General Science*. 661-670
- Upendra, R. S. y Khandelwal, P. 2012. Assessment of nutritial values, phytochemical constituents and biotherapeutic potentials of *Epiphyllum oxypetalum*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*. 421-425.
- Valares, C. 2011. Variación del metabolismo secundario en plantas debida al genotipo y al ambiente. Tesis de doctorado. Universidad de Extremadura. Departamento de Biología vegetal, Ecología y Ciencias de la tierra. Badajoz. España.
- Vilela, A. E., González-Paleo, L., y Ravetta, D. A. 2011. Metabolismo secundario de plantas leñosas de zonas áridas: mecanismos de producción, funciones y posibilidades de aprovechamiento. *Ecología austral*, 21: 317-327.
- Wahid, A. 2007. Physiological implications of metabolite biosynthesis for net assimilation and heat-stress tolerance of sugarcane (*Saccharum officinarum*) sprouts. *Journal of Plants Research*. 120: 219-228.
- Wang, S.Y. y Zheng, W. 2001. Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in strawberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 4977-4982
- Wang, L. Y., Wei, K., Jiang, Y., Cheng, W., Zhou, H., He, J. y Zhang, W. C. C. 2011. Seasonal climate effects on flavanols and purine alkaloids of tea (*Camellia sinensis* L.). *European Food Research and Technology*. 233: 1049–1055.
- Willis, K.J. 2017. State of the world's plants 2017. Rep. R. Bot. Gard., Kew, London.
- Wink, M. 1999. Introduction: Biochemistry role and biotechnology of secondary metabolites. Biochemistry of Plant Secondary Metabolism. *Annual Plant Reviews*. Sheffield Academic Press Ltd. London, UK. 1-17.
- Wink, M. 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 64: 3–19.

- Wink, M. 2006. Importance of Plant Secondary Metabolites for Protection Against Insect and Microbial Infections. En NATURALLY OCCURRING BIOACTIVE COMPOUNDS. *Elsevier*. Pp. 251-268.
- Yén, V. Q. 2008. Hao quynh, un hoang trong dem. (The queen of the night). *Tap Chí Nghiên Cứu Va Phát Triển Vietnamese*. 82-87.
- Zavala, J.A y Ravetta, D. A. 2002. The effect of solar UV-B radiation on terpenes and biomass production in *Grindelia chiloensis* (Asteraceae), a woody perennial of Patagonia, Argentina. *Plant Ecology*. 161:185-191.
- Zhang, W., Curtin, C., Kikuchi, M. y Franco, C. 2002. Integration of jasmonic acid and light irradiation for enhancement of anthocyanin biosynthesis in *Vitis vinifera* suspension cultures. *Plant Science* 162: 459-468.

XII. ANEXOS

11.1 Diagramas de flujo.

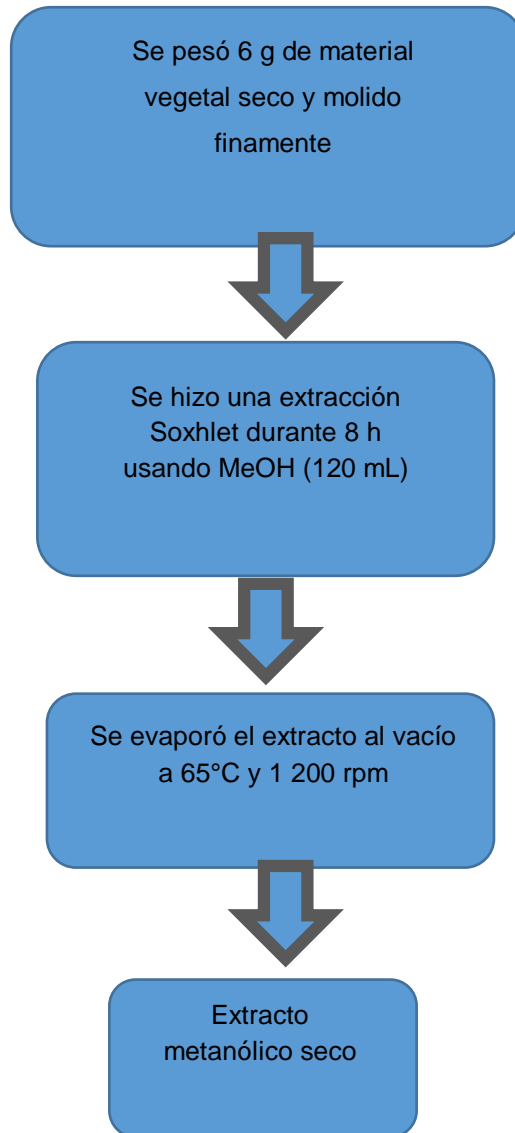


Figura 24. Extracción metanólica

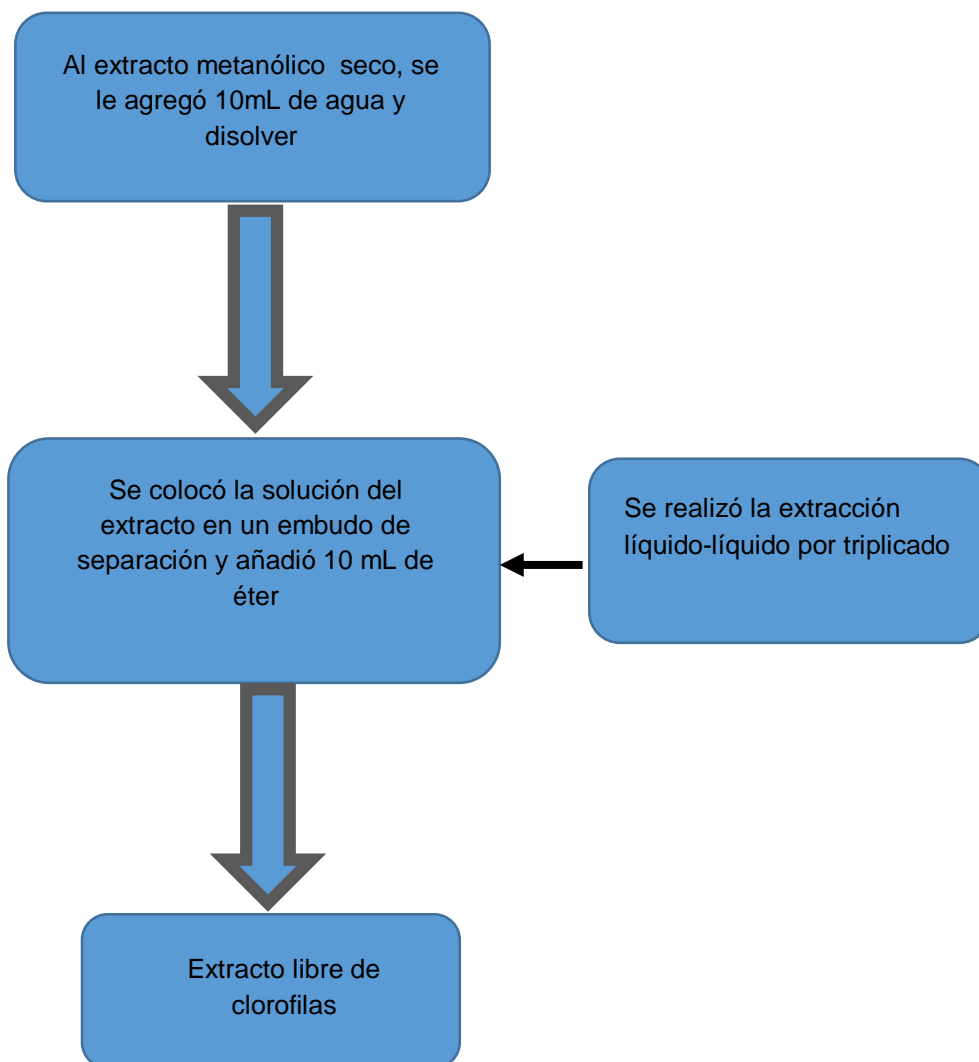


Figura 25. Remoción de clorofilas.

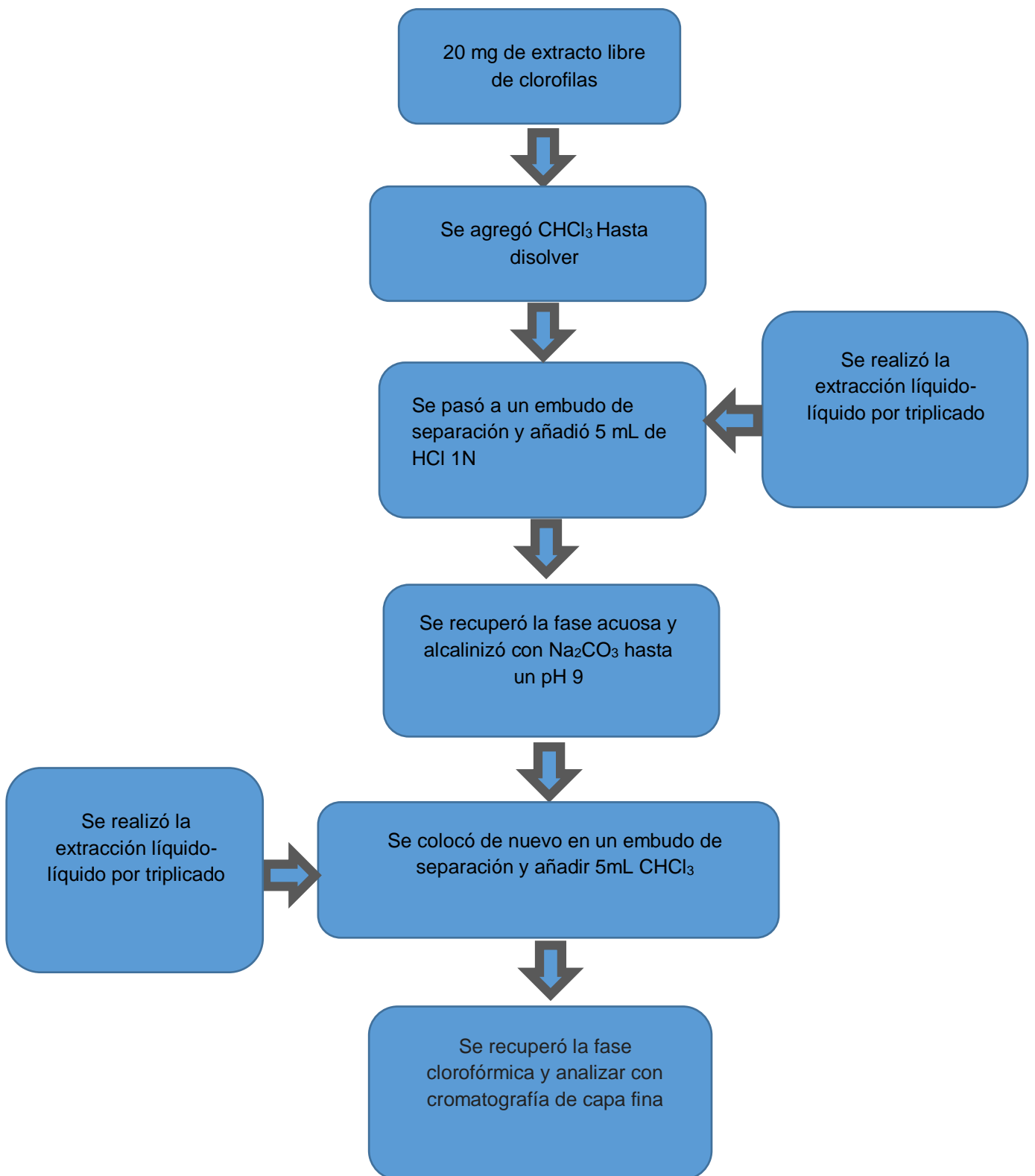


Figura 26. Determinación y cuantificación de alcaloides.

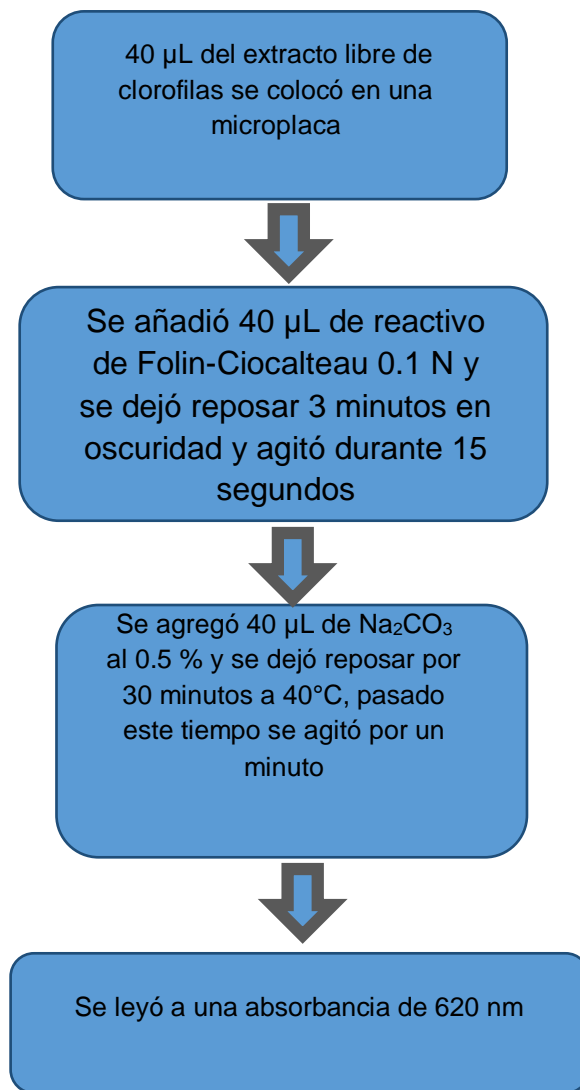


Figura 27. Determinación y cuantificación de fenoles.

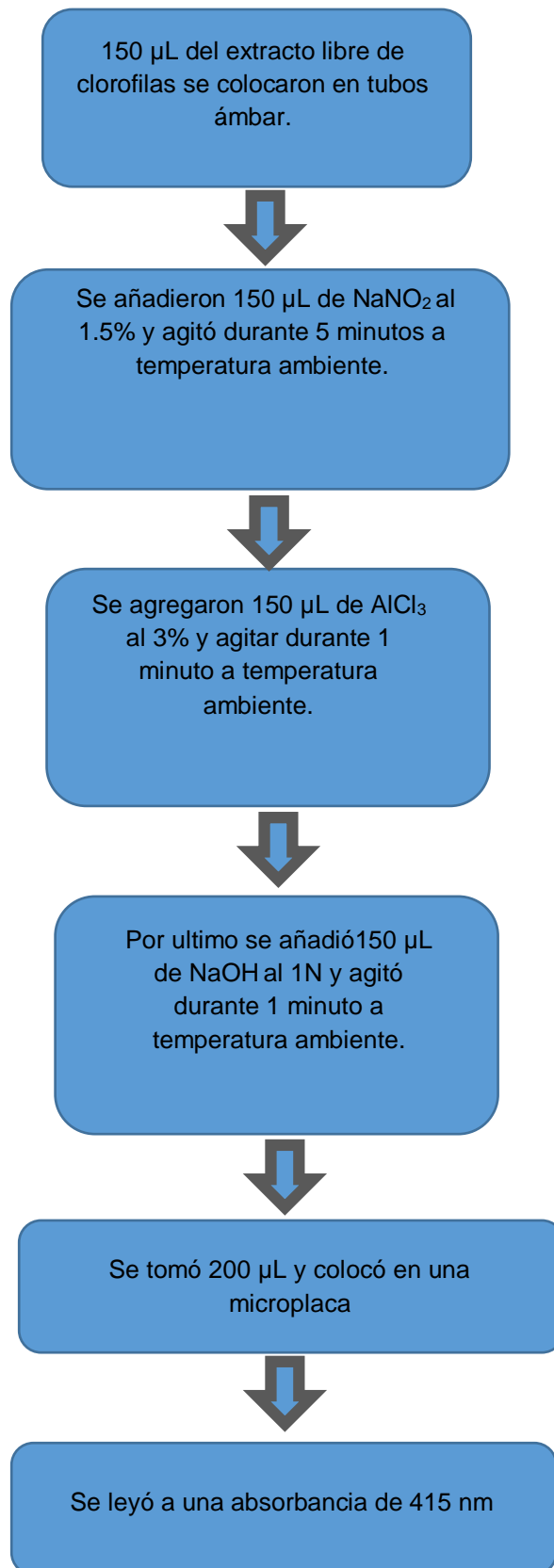


Figura 28. Determinación y cuantificación de flavonoides.

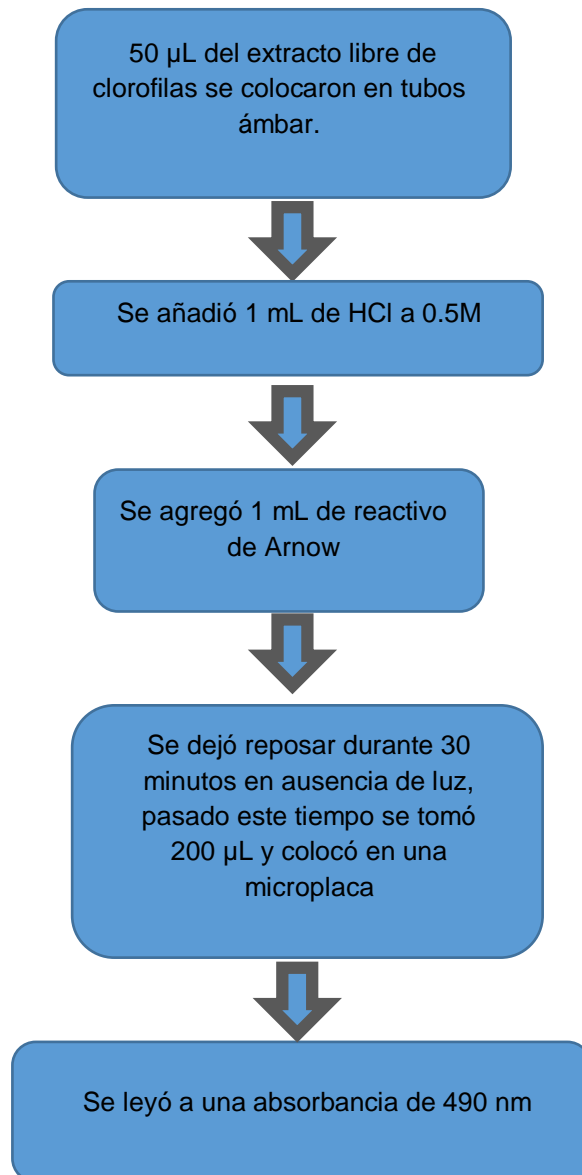


Figura 29. Determinación y cuantificación de ácidos fenólicos.

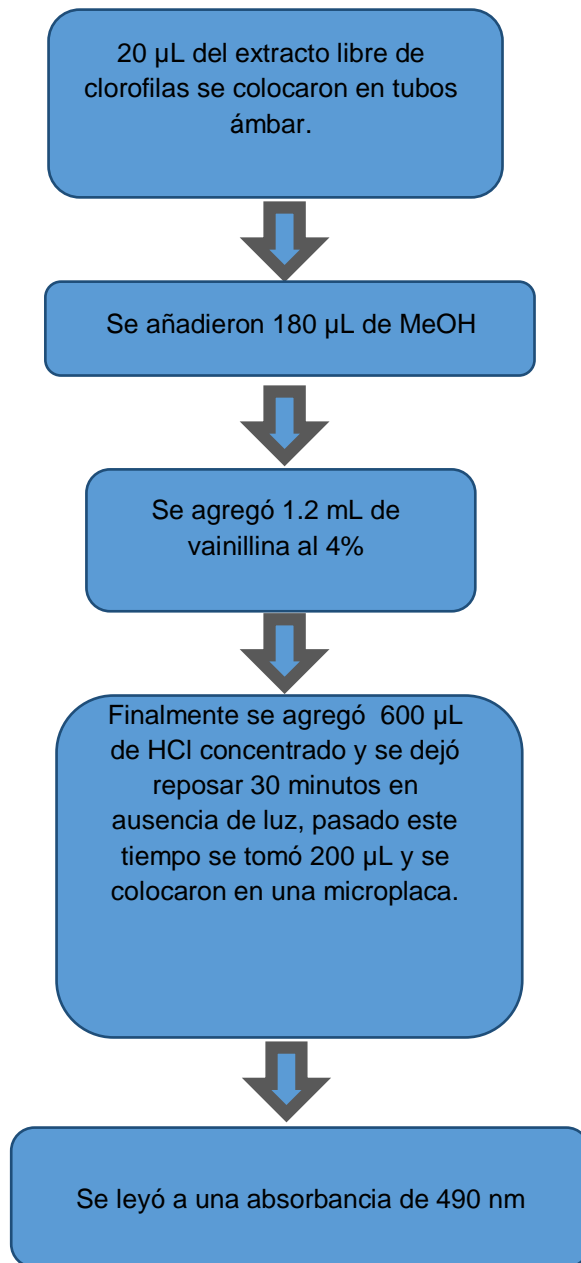


Figura 30. Determinación y cuantificación de proantocianidinas.

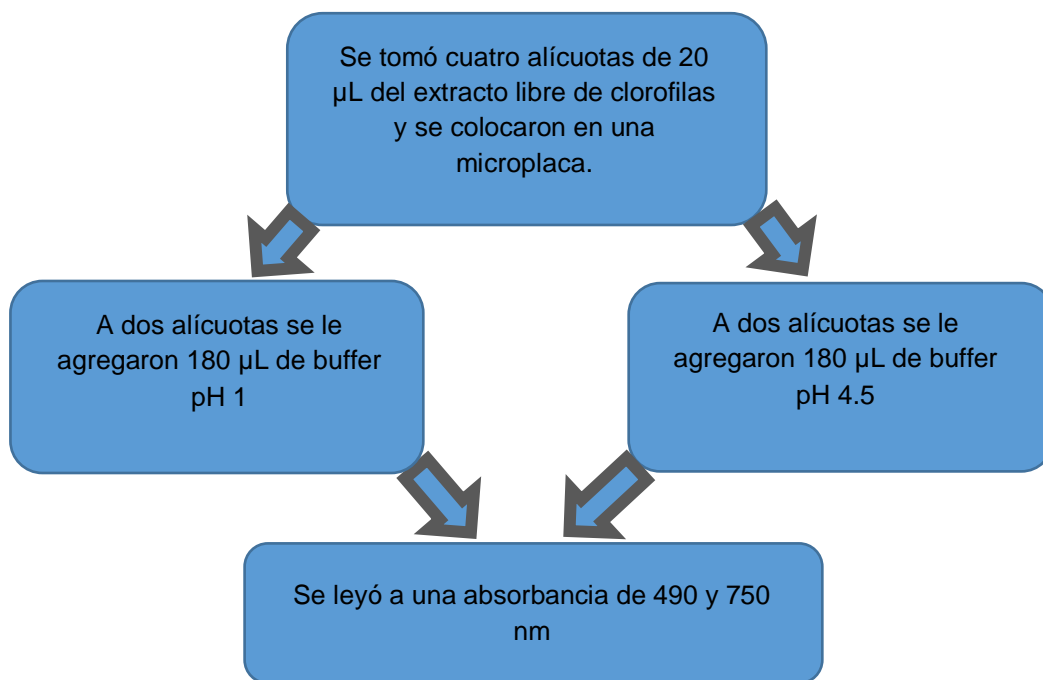


Figura 31. Determinación y cuantificación de antocianinas.

11.2 Curvas de calibración

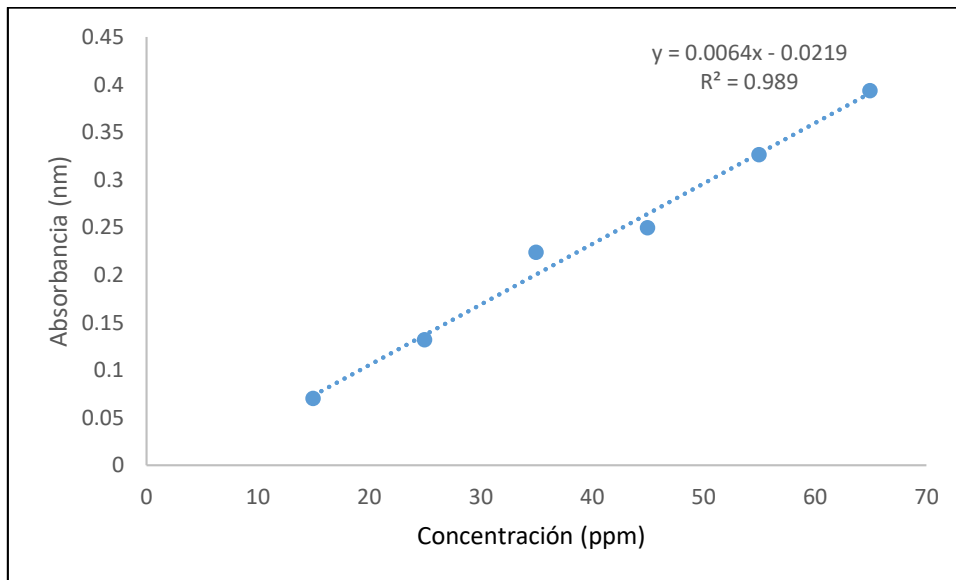


Figura 32. Curva de calibración para fenoles.

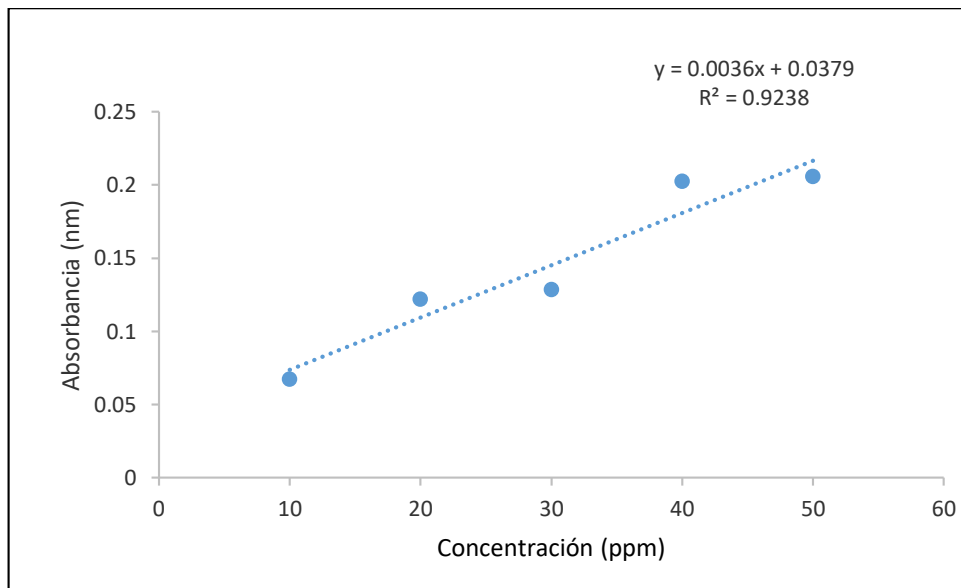


Figura 33. Curva de calibración para flavonoides.

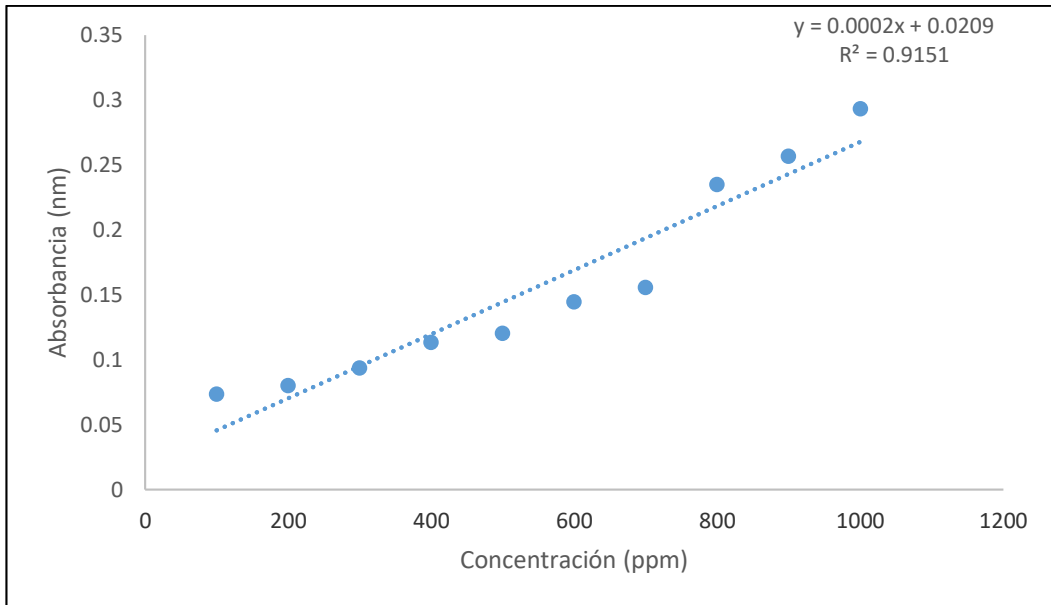


Figura 34. Curva de calibración para ácidos fenólicos.

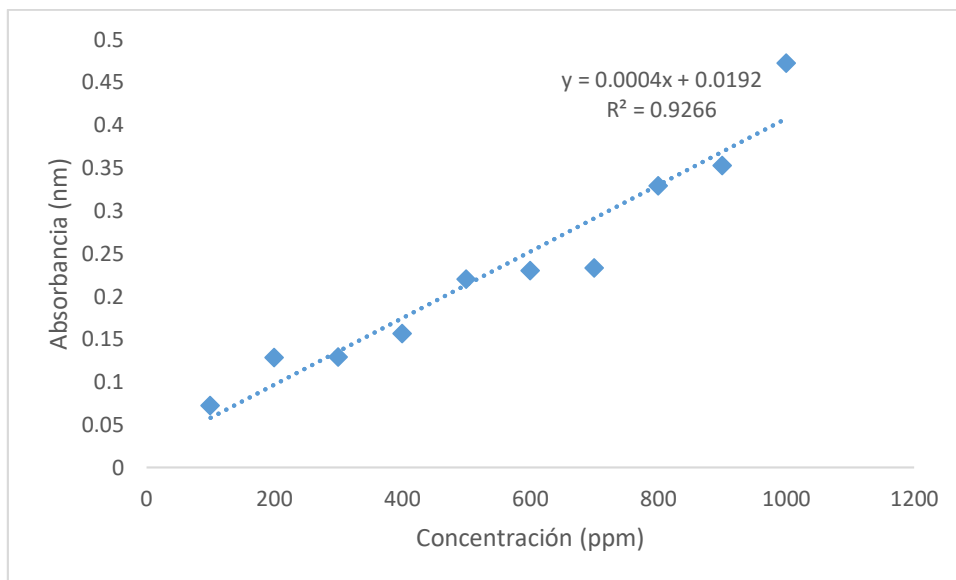


Figura 35. Curva de calibración para proantocianidinas.

11.3 Placas de cromatografía de capa fina (CCF)

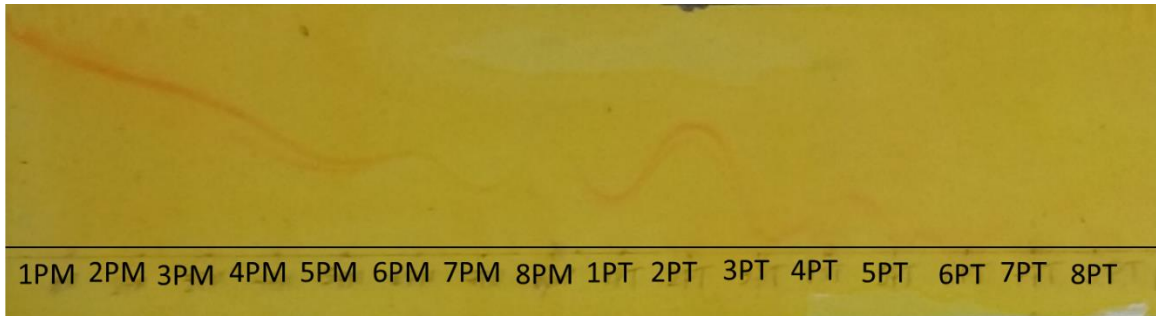


Figura 36. Placa de silica gel revelada con reactivo de Dragendorff correspondiente al mes de septiembre.

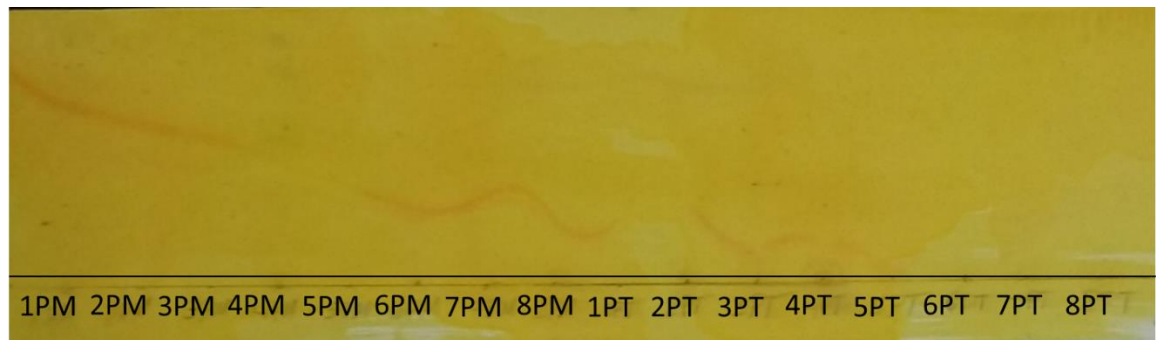


Figura 37. Placa de silica gel revelada con reactivo de Dragendorff correspondiente al mes de octubre.

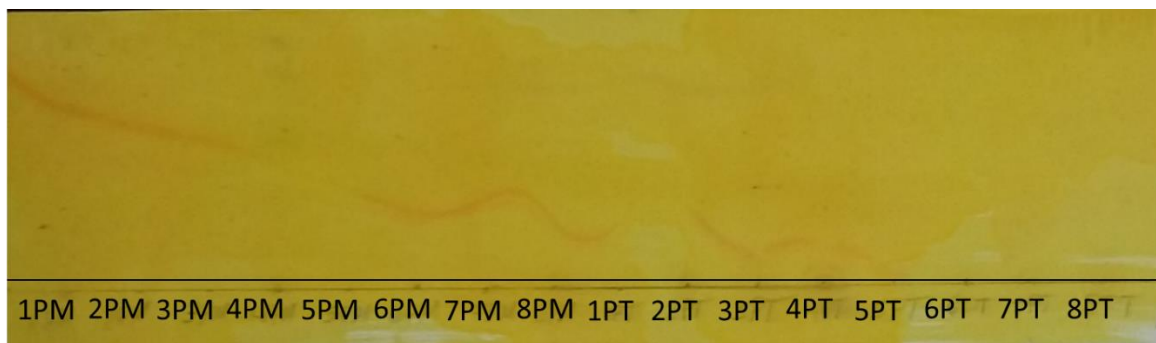


Figura 38. Placa de silica gel revelada con reactivo de Dragendorff correspondiente al mes de noviembre.

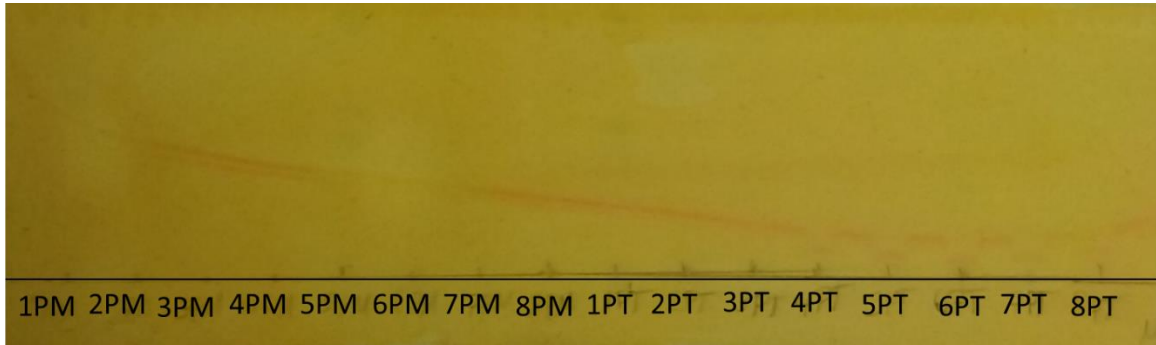


Figura 39. Placa de silica gel revelada con reactivo de Dragendorff correspondiente al mes de diciembre.

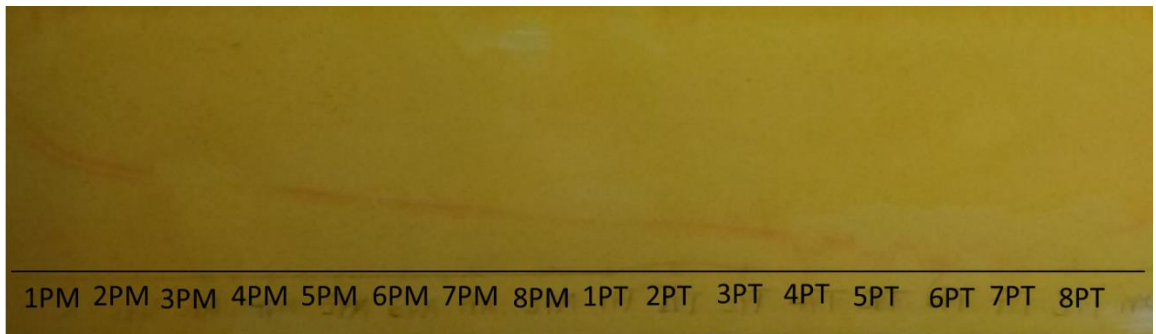


Figura 40. Placa de silica gel revelada con reactivo de Dragendorff correspondiente al mes de enero.