



UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

Efecto de la estacionalidad sobre la fenología y
la producción de metabolitos secundarios de
Bonellia macrocarpa B.Ståhl & Källersjö
(Primulaceae)

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

ZABDI JOCABED HERNÁNDEZ CASTAÑEDA



Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Junio 2023



UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS
SECRETARÍA GENERAL
DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES
DEPARTAMENTO DE CERTIFICACIÓN ESCOLAR
AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Lugar: Tuxtla Gutiérrez, Chiapas;
Fecha: 05 de junio de 2023

C. Zabdi Jocabed Hernández Castañeda

Pasante del Programa Educativo de: Licenciatura en Biología

Realizado el análisis y revisión correspondiente a su trabajo recepcional denominado:
Efecto de la estacionalidad sobre la fenología y la producción de metabolitos secundarios
de *Bonellia macrocarpa* B.Ståhl & Källersjö (Primulaceae)

En la modalidad de: Tesis Profesional

Nos permitimos hacer de su conocimiento que esta Comisión Revisora considera que dicho documento reúne los requisitos y méritos necesarios para que proceda a la impresión correspondiente, y de esta manera se encuentre en condiciones de proceder con el trámite que le permita sustentar su Examen Profesional.

ATENTAMENTE

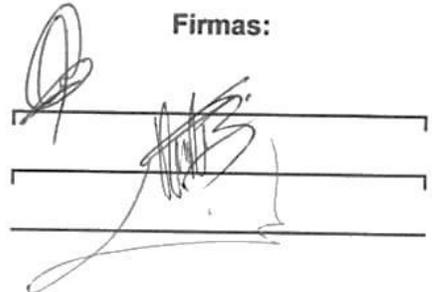
Revisores

Dra. Christian Anabí Riley Saldaña

M. en C. Manuel Martínez Meléndez

Dra. Alma Rosa González Esquinca

Firmas:



Ccp. Expediente

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

Efecto de la estacionalidad sobre la fenología y
la producción de metabolitos secundarios de
Bonellia macrocarpa B.Ståhl & Källersjö
(Primulaceae)

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

ZABDI JOCABED HERNÁNDEZ CASTAÑEDA

Directora

Dra. ALMA ROSA GONZÁLEZ ESQUINCA

Laboratorio de Fisiología y Química vegetal
Instituto de Ciencias Biológicas-UNICACH

Asesora

Dra. MARISOL CASTRO MORENO

Laboratorio de Fisiología y Química vegetal
Instituto de Ciencias Biológicas-UNICACH



Agradecimientos

A la **Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas** por los espacios y los recursos brindados para completar mi formación profesional.

Al **Instituto de Ciencias Biológicas** y a los profesores e investigadores que impartieron sus conocimientos en las aulas, en campo y en laboratorio.

Al **Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal**, porque me brindaron su apoyo y confianza para llevar a cabo este proyecto, y con especial admiración:

A la **Dra. Alma Rosa González Esquínca**, investigadora y profesora excepcional de la que recibí muchísimo apoyo, tanto académico como personal, alentándome siempre con una sonrisa. Muchas gracias por todas las observaciones, consejos y los espacios brindados para este proyecto. Me encantó aprender del metabolismo secundario en sus clases y en esta aventura me enamoré por completo de esto.

A la **Dra. Marisol Castro Moreno**, por sus cátedras y apoyo durante esta investigación. Gracias por su paciencia y su comprensión al resolver todas mis dudas y aclaraciones, y por ser un ejemplo de mujer en la ciencia.

Al Dr. Iván de la Cruz Chacón, que fue el primer contacto con el Laboratorio, y que a través de sus clases implantó la curiosidad de seguir aprendiendo acerca del metabolismo secundario y la química vegetal. Muchas gracias por el apoyo brindado a este proyecto.

Al **Instituto de Ciencia, Tecnología e Innovación del Estado de Chiapas** por brindarme su apoyo a través de la beca “Convocatoria Beca Tesis Licenciatura 2021”, que otorga el Gobierno del Estado de Chiapas.

Dedicatoria

A Dios

Que usaste muchos medios para enseñarme lo maravilloso de tu creación, sosteniéndome en tu mano en todo momento y mostrando tu misericordia a mi vida.

A mi familia

A mis padres, Mario Teófilo Hernández Gutiérrez y Hermila Castañeda Ramírez. Gracias por apoyarme incondicionalmente con sus consejos, su ejemplo y su cariño. Los honro con este trabajo.

A mis hermanos y mi cuñada, Pablo, Moisés y Cristina. Su compañía y su buen ánimo hicieron (y hacen) este camino más alegre y llevadero. Los quiero mucho.

A mis amigos

Con los que compartí experiencias muy chidas en la carrera: A Kique, Mari, Frida, Lalito, Cleo, Ada, Silvana, Bryan... A los que no estuvieron físicamente en un aula conmigo pero que siempre estuvieron al pendiente de mí: Antonio, Aby, Alejandra, Francisco, Rony, Éboli. Los llevo en el corazón chicos.

INDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	MARCO TEÓRICO	3
III.	ANTECEDENTES	28
IV.	OBJETIVOS	33
	4.1. <i>General</i>	34
	4.2. <i>Específicos</i>	34
V.	HIPÓTESIS	34
VI.	ZONA DE ESTUDIO.....	35
	6.1. <i>Clima e hidrografía</i>	35
	6.2. <i>Flora y fauna</i>	35
VII.	MÉTODO.....	37
	7.1. <i>Diseño</i>	37
	7.2. <i>Recolecta del material vegetal</i>	38
	7.3. <i>Caracterización de la fenología</i>	38
	7.4. <i>Variación de metabolitos secundarios</i>	39
	7.4.1. <i>Obtención de los extractos</i>	39
	7.4.2. <i>Análisis colorimétrico y cromatográfico</i>	40
	7.5.2.1. <i>Pruebas de identificación de metabolitos secundarios</i>	40
	7.5.2.2. <i>Análisis de los extractos por Cromatografía en Capa Fina (CCF)</i>	41
	7.5. <i>Análisis estadístico</i>	43
VIII.	RESULTADOS	44
	8.1. <i>Caracterización fenológica de Bonellia macrocarpa</i>	44
	8.1.1. <i>Fenología vegetativa</i>	44
	8.1.2. <i>Fenología reproductiva</i>	44
	8.2. <i>Rendimientos de extractos metanólicos</i>	47
	8.3. <i>Identificación de grupos de Metabolitos secundarios (MS) y variación estacional</i>	48
	8.3.1. <i>Fenoles</i>	48
	8.3.2. <i>Esteroides</i>	51
	8.3.3. <i>Flavonoides</i>	53
	8.3.4. <i>Saponinas</i>	54

8.3.5. Sapogeninas.....	57
8.3.6. Taninos.....	58
8.4. <i>Riqueza y diversidad de compuestos identificados por CCF.....</i>	<i>61</i>
IX. DISCUSIÓN.....	70
X. CONCLUSIÓN.....	78
XI. REFERENCIAS DOCUMENTALES	79

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de los terpenos correspondiente al número de unidades isopreno.....	15
Cuadro 2. Rendimiento mensual (g) de extractos metanólicos de <i>Bonellia macrocarpa</i>	47
Cuadro 3. Factor de retención (Rf) de los compuestos encontrados en los tejidos de <i>Bonellia macrocarpa</i>	61
Cuadro 4. Valores de <i>P</i> que indican diferencias estadísticamente significativas en la influencia del tejido y del mes de recolecta sobre los índices de riqueza y de diversidad en los compuestos de <i>B. macrocarpa</i>	67
Cuadro 6. Valores de similitud de Sorensen en los compuestos de hojas entre los meses de recolecta.	68
Cuadro 7. Valores de similitud de Sorensen en los compuestos de tallos entre los meses de recolecta.	68
Cuadro 8. Valores de similitud de Sorensen en los compuestos de raíces entre los meses de recolecta	69

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de las selvas secas en México (Trejo, 2010).....	3
Figura 2. Follaje de la cubierta vegetal de la SBC en la Depresión Central de Chiapas.....	6
Figura 3. <i>Bonellia macrocarpa</i> B. Ståhl & Källersjö.	11
Figura 4. Formación del Isopentil difosfato (IpPP) en células vegetales.	16
Figura 5. Formación del ácido shikímico a partir de fosfoenolpiruvato y eritrosa 4-fosfato.....	18
Figura 6. Formación de polifenoles complejos (ácidos cinámicos, ligninas, y lignanos)	21
Figura 7. Formación de cumarinas	22
Figura 8. Síntesis de chalconas	23
Figura 9. Biosíntesis del ácido 6-metilsalicílico	25
Figura 10. Estructura de Sakurasosaponina	30
Figura 11. Estructura de bonediol	31
Figura 12. Compuestos aislados de <i>B. macrocarpa</i>	33
Figura 13. Área geográfica del municipio de Emiliano Zapata, Chiapas y ubicación de la UMA "San Joaquín".....	36
Figura 14. Esquema general del diseño del estudio.....	37
Figura 15. Pruebas colorimétricas de identificación de grupos de metabolitos secundarios.....	42
Figura 16. Índice de actividad fenológica para la fase reproductiva (floración y fructificación) y fase vegetativa (hoja madura y brote foliar) de <i>Bonellia macrocarpa</i>	45
Figura 17. Fenología de <i>Bonellia macrocarpa</i>	46
Figura 18. Intensidad de fenoles en tallos (A) y hojas (B) de <i>Bonellia macrocarpa</i>	49
Figura 19. Intensidad de fenoles en (C) y frutos (D) de <i>Bonellia macrocarpa</i>	50

Figura 20. Intensidad de esteroides en hojas de <i>Bonellia macrocarpa</i> .	51
Figura 21. Intensidad de esteroides en tallos (A), raíces (B) y frutos (C) de <i>Bonellia macrocarpa</i> .	52
Figura 22. Intensidad flavonoides en tallos <i>Bonellia macrocarpa</i> .	53
Figura 23. Intensidad de flavonoides en raíces (A) y frutos (B) de <i>Bonellia macrocarpa</i> .	54
Figura 24. Intensidad de saponinas en raíces (A), tallos (B) y frutos (C) de <i>Bonellia macrocarpa</i> .	56
Figura 25. Intensidad de saponinas en hojas de <i>Bonellia macrocarpa</i> .	57
Figura 26. Intensidad de sapogeninas en hojas de <i>Bonellia macrocarpa</i> .	57
Figura 27. Intensidad de sapogeninas en tallos (A), raíces (B) y frutos (C) de <i>Bonellia macrocarpa</i> .	58
Figura 28. Intensidad de taninos en hojas de <i>Bonellia macrocarpa</i> .	59
Figura 29. Intensidad de taninos en tallos (A), frutos (B) y raíces (C) de <i>Bonellia macrocarpa</i> .	60
Figura 30. Abundancia de compuestos en hojas de <i>Bonellia macrocarpa</i> .	63
Figura 31. Abundancia de compuestos en distintos tejidos de <i>Bonellia macrocarpa</i> .	64
Figura 32. Variación estacional en la riqueza (índice de Margalef) de compuestos en raíces, tallos y hojas de <i>B. macrocarpa</i> .	65
Figura 33. Variación estacional en la diversidad (índice de Shannon) de compuestos en raíces, tallos y hojas de <i>B. macrocarpa</i> .	66
Figura 34. Variación estacional en la diversidad (índice de Simpson) de compuestos en raíces, tallos y hojas de <i>B. macrocarpa</i> .	67

RESUMEN

Se conoce que los factores ambientales y el desarrollo fenológico influyen en las respuestas metabólicas secundarias; en especial, las plantas que habitan la Selva Baja Caducifolia, poseen estrategias que las hacen soportar las condiciones climáticas de la región, que incluyen el tipo de fenología y la variación de metabolitos secundarios. Una de estas especies es *Bonellia macrocarpa*, especie que por tener una notable resistencia a la sequía, permite analizar la influencia de la estacionalidad, en las temporadas de lluvia y estiaje, sobre la fenología y la diversidad de metabolitos secundarios.

Este estudio consistió en tres actividades generales: 1) La descripción fenológica de la planta en campo, 2) la determinación de grupos de metabolitos secundarios de raíces, tallos, hojas y frutos; y 3) el análisis de los perfiles metabólicos a través de cromatografía en capa fina (CCF).

El análisis fenológico mostró que *Bonellia macrocarpa* es perenne, y que la fase reproductiva se desarrolla en la temporada de seca (floración) en tanto que en la temporada de lluvias la fructificación. Además, se reportan dos grupos de metabolitos secundarios que tuvieron una mayor influencia de las estaciones climáticas, respondiendo ambos a la falta de lluvias en la temporada de estiaje.

Finalmente, se registró una variación estacional en la diversidad de compuestos en los tejidos de *Bonellia macrocarpa*, específicamente en los meses de transición entre estaciones climáticas, observando un aumento de compuestos en las hojas, mientras que en los tallos y raíces una drástica disminución. Nuestros datos sugieren que la modulación de compuestos responde al cambio de estación en la Selva Baja Caducifolia.

Palabras clave: variación estacional, Siqueté, fenoles, terpenos.

I. INTRODUCCIÓN

Los metabolitos secundarios a menudo se denominan como compuestos que no tienen un papel fundamental en el mantenimiento de los procesos vitales en las plantas, pero son importantes en la interacción con su entorno en mecanismos de adaptación y defensa. Algunos de ellos juegan un rol importante en la interacción de las plantas con el ambiente en donde pueden servir como atrayentes para los polinizadores o dispersores de semillas, en defensa de enemigos naturales o como aleloquímicos contra competidores (Kumar, 2015). Sin embargo cambios en variables abióticas en los ecosistemas pueden generar condiciones de estrés ambiental en las plantas, lo cual es muy perjudicial para las mismas, tanto que en el medio natural estas variaciones impiden una producción homogénea de metabolitos secundarios (Chatterjee, 2002; Seigler, 1998). La variación estacional, los ritmos circadianos, la fenología, los factores climáticos, la disponibilidad de nutrientes en el suelo o los ataques de herbívoros y patógenos son algunos factores que más afectan en la biosíntesis de metabolitos secundarios (Harbone, 1993).

El género *Bonellia* engloba un grupo de plantas con flores que pertenece a la familia Primulaceae, incluyendo arbustos o árboles pequeños, generalmente muy ramificados; este género se distribuye en Mesoamérica, al noroeste de Sudamérica y las Grandes Antillas (Källersjö y Ståhl, 2004; Castillo-Campos *et al.*, 1998). La especie *Bonellia macrocarpa* se caracteriza por ser una planta siempre verde, tener flores en general anaranjadas, las cuales se utilizan para curar la tos, asma y trastornos bucales como llagas (Méndez-González *et al.*, 2012). Diversos estudios demuestran que plantas del género *Bonellia*, entre ellas *Bonellia macrocarpa*, tienen un potencial efecto citotóxico, antizoonótico y antifúngico debido a la presencia de dos grupos de metabolitos secundarios principales: fenoles y terpenos (Caamal-Fuentes *et al.*, 2011; Medina-López *et al.*, 2016; Sánchez-Medina *et al.*, 2010; Vera-Ku *et al.*, 2015).

Sin embargo, actualmente no se ha realizado algún trabajo ecofisiológico que relacione los metabolitos secundarios de estas plantas con la variación estacional,

siendo ya reconocido que los cambios en las variables abióticas en los ecosistemas influyen en la producción de metabolitos secundarios en plantas (Castro-Moreno, 2013; Chatterjee, 2002; Seigler, 1998). Además de poseer actividad biológica por la presencia de metabolitos secundarios, *Bonellia macrocarpa* es una planta que tiene una notable resistencia a condiciones climáticas adversas como la sequía, y puede ser una opción para reforestar y recuperar zonas con falta de agua y altas temperaturas.

Por estas condiciones es necesario ahondar en el estudio de *Bonellia macrocarpa*, ya que es una especie de interés biológico, medicinal y ecológico en los ecosistemas tropicales. Así esta investigación da a conocer la influencia de la estacionalidad en la producción de metabolitos secundarios. Además al comprender la variabilidad en la riqueza y abundancia órgano-específica y fenológica de los compuestos se podría obtener un mejor aprovechamiento de las propiedades medicinales y biológicas de los metabolitos secundarios encontrados en la planta.

En el presente trabajo se estudiaron los extractos orgánicos de hojas, tallos, raíces y frutos durante dos estaciones analizando la diversidad, riqueza y abundancia de los metabolitos secundarios y sus variaciones. Así mismo se estima el efecto de la fenología y la estacionalidad sobre la riqueza y abundancia de los metabolitos secundarios en la planta.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Selva Baja Caducifolia

La Selva Baja Caducifolia (Bosque Tropical Caducifolio, Selva Seca) es aquella comunidad dominada por árboles de baja estatura con una cubierta más o menos continua del dosel y en donde la mayor parte de la vegetación pierde las hojas en la época seca (Rzendowski, 1978; Trejo, 2010). Se desarrollan en regiones que se encuentran generalmente entre 20 y 10° de latitud a ambos lados del Ecuador y suelen prosperar sobre laderas de cerros en condiciones de clima cálido (Bezaury-Creel, 2010).

Las selvas secas de México son el bastión más norteño de la distribución tropical en el continente americano y probablemente, de acuerdo con lo que reportan diversas fuentes (Gentry, 1988; Sabogal, 1992), también son las más extensas en su tipo en Latinoamérica. Estas selvas tienen una amplia distribución, ya que se extienden desde el paralelo 29° de latitud Norte hasta la frontera con Guatemala, en el sur del país (Trejo, 2010). Preferentemente se establecen en la vertiente pacífica, con importantes entrantes en las cuencas de los ríos Lerma-Santiago y Balsas, aun cuando también están representadas en manchones discontinuos en la vertiente del Golfo y en la península de Yucatán (figura 1) (Bezaury-Creel, 2010).



Figura 1. Distribución de las selvas secas en México (Trejo, 2010).

Este tipo de vegetación presenta una distribución correlacionada con la presencia de las lluvias monzónicas y con los macizos montañosos de la vertiente del Pacífico en las sierras Madre Occidental, Madre del Sur y de Chiapas, ocupando esencialmente las provincias fisiográficas de los Acantilados de la Sierra Madre Occidental, porciones de la Planicie Costera desde Sinaloa hasta Chiapas y las cuencas del Balsas y la central de Chiapas (Búrquez *et al.*, 2009).

La amplitud en la distribución geográfica de las Selvas Bajas Caducifolias (SBC) en México, así como la heterogeneidad en las condiciones físicas en las que se establece, dificulta el reconocimiento de las variantes fisonómicas de estas comunidades (Trejo, 1996; Bezaury-Creel, 2010), sin embargo algunas características para reconocer a este tipo de vegetación son:

- ✓ **Clima:** De acuerdo con la clasificación de Koeppen (1948), el tipo de clima más común correspondiente a esta formación vegetal es el Aw, aunque también hay algunos sitios con clima BS y Cw (Rzedowzki, 1994).
- ✓ **Temperatura:** la SBC se encuentra, en general, en zonas de 18 a 28°C de temperatura media anual, lo cual significa que estas comunidades pueden existir en un ámbito muy amplio, aunque la mayor parte de esta selva se concentra en áreas con temperaturas de 22 a 26°C (57%) (Trejo, 1996).
- ✓ **Precipitación:** La precipitación anual fluctúa entre 400 y 1 200 mm. En regiones como Baja California, el centro de Sonora, Tehuacán o en la cuenca del río Balsas, estas selvas prosperan en las condiciones más secas, en contraste con algunas regiones como las costas de Guerrero y Michoacán, donde la lluvia alcanza casi 1200 mm (Trejo, 2010).
- ✓ **Suelo:** los suelos en los que se establecen las SBC son variables, en general son someros y en ocasiones pedregosos. El mayor porcentaje se asienta en suelos de tipo regosol y litosol, cuyo origen también es variable ya que surgen en litologías desde ígneas a sedimentarias (Trejo, 1996).
- ✓ **Vegetación:** aun con la complejidad estructural en el límite norte de distribución de la SBC, la composición florística es aún muy diversa y está claramente relacionada con la variedad de hábitats que, a su vez, está determinada por cambios topográficos, edáficos y climáticos. Los elementos

predominantes en la flora son de origen neotropical, con abundancia de especies de la familia Leguminosae, Euphorbiaceae, Cactaceae, Burseraceae, Compositae, Malpihiaceae y Anacardiaceae (Trejo, 2010).

En Chiapas se puede encontrar esta composición vegetal en dos regiones fisiográficas del estado: Llanura Costera del Pacífico y la Depresión Central de Chiapas. Esta última se extiende desde el cañón del río La Venta y el Cañón del Sumidero, en el oeste de la Depresión Central de Chiapas, hasta las poblaciones de Tzimol, Pujilic, Amatenango de la Frontera y la parte baja de Motozintla, a lo largo de 280 kilómetros atravesando el Estado de Chiapas en dirección NO-SE (Pérez-Farrera y Espinoza, 2010).

Esta zona, por su tipo de vegetación y la historia de su uso de suelo ha sido una de las más transformadas de Chiapas. La selva seca fue, originalmente, el principal tipo de vegetación; sin embargo en la actualidad y debido a los cambios en el uso del suelo registrado en el área se encuentran grandes extensiones de sabana compuestas por *Acacia farnesiana* y *Mimosa tenuiflora* y áreas de cultivo de maíz y frijol. Solamente algunas áreas permanecen sin alteraciones en donde puede encontrarse este ecosistema en buen estado de conservación; ésta se encuentra dominada en el estrato arbóreo por algunas especies como *Conclospermum vitifolium*, *Ceiba pentandra*, *Bursera excelsa*, *Bursera simaruba* y *Bucida macrostachya*; y en el estrato arbustivo y herbáceo pueden encontrarse algunos géneros como *Justicia*, *Begonia*, *Dorstenia* y *Bonellia*; y especies como *Byrsonima crasifolia* y *Chamaedora glaucifolia* (Ib ídem).

2.1.1. Fenología

La fenología es el estudio de eventos biológicos recurrentes y su relación con factores climáticos. Se distinguen dos tipos de registros fenológicos, la fenología vegetativa, que describe el crecimiento y desarrollo de una planta, con la cual se identifica la foliación (brotes de hojas nuevas) y defoliación (senescencia), mientras que la fenología reproductiva implica las fenofases de reproducción de una planta (floración, fructificación, dispersión y germinación de semillas) (White *et al.*, 1997)

La característica más sobresaliente de esta formación vegetal la constituye la pérdida de sus hojas durante un periodo de 5 a 8 meses; así los dos aspectos estacionales del bosque son diferentes: el triste, gris y desolado aspecto de la época seca contrasta de manera extraordinaria con la espesura verde tierna del periodo lluvioso (figura 2). La pérdida de las hojas afecta la gran mayoría, o a menudo la totalidad, de los componentes de la comunidad y aunque la caída del follaje no es necesariamente simultánea para las diferentes especies, son muchos los meses durante los cuales se mantiene la fisonomía correspondiente al letargo estacional, que se ve interrumpida solamente, a veces, por el verdor de alguna cactácea u otro de los escasos elementos siempre verdes. Hacia mediados o fines de la época de sequía, cuando la temperatura alcanza sus valores máximos anuales, muchas especies leñosas se cubren de flores, ya que numerosas plantas de esta comunidad nunca poseen hojas y flores al mismo tiempo (Rzedowski, 1994).



Figura 2. Follaje de la cubierta vegetal de la SBC en la Depresión Central de Chiapas. Temporada de lluvia (*izquierda*). Temporada de estiaje (*derecha*) (López-Argueta, 2019).

a

fenología foliar que tienen las plantas en ecosistemas tropicales está relacionada con la variedad existente de especies y con su ecofisiología, que está adaptada a un régimen de humedad y su relativa sincronía de desarrollo. Es por ello que las especies de la SBC pueden ser sensibles a la temperatura elevada y a los efectos directos del CO₂ elevado, ya que las temperaturas más altas conducen a un agotamiento más rápido del agua y por ende a una caída más temprana de las hojas, provocando un periodo largo de defoliación. Por lo tanto la sequía de la estación

seca restringe algunas fenofases como la aparición de nuevos órganos foliares (Reich, 1995; Reich y Borchet, 1984). Por otra parte para la aparición de brotes foliares, en especies caducifolias y semi-siempreverdes principalmente, entran en juego tres factores desencadenantes: a) desprendimiento de hojas viejas durante la estación seca media, b) aumento de la duración del día y/o temperatura durante la estación seca tardía, y c) primera lluvia significativa de la estación lluviosa (Sing y Kushwaha, 2005).

Respecto a la fenología reproductiva en los ecosistemas tropicales, para la floración se distinguen cuatro clases basadas en la frecuencia, definida como el número de ciclos “on/off” por año (un ciclo consiste de un episodio de floración seguido de un intervalo sin floración). Las cuatro clases básicas son: continua (floración con breves interrupciones esporádicas), subanual (floración por más de un ciclo al año), anual (solo un ciclo importante por año) y supraanual (un ciclo durante más de un año). De acuerdo a la amplitud o duración del patrón de floración anual, se utiliza una división de tres tiempos: floración breve (<1 mes), floración intermedia (1-5 meses) y floración extendida (>5 meses). Así mismo, se ha utilizado un segundo criterio de clasificación, basado en la regularidad del episodio de floración y no floración (Newstrom *et al.*, 1994).

En las especies de la SBC se han identificado dos estrategias principales en su floración (Sing y Kushwaha, 2006): especies en las que se desarrollan brotes de flores en respuesta al aumento de la disponibilidad de agua durante la temporada de lluvias, y especies que florecen en la estación seca, ya sea al principio (justo después del final de la temporada de lluvias), o al final (varias semanas antes del inicio de las lluvias).

Para este último grupo de especies, los cambios en el fotoperiodo aparentemente desencadenan eventos reproductivos en las plantas. Según Sing y Kushwaha (2005), cuanto más seco es un bosque tropical estacional, mayor es el número de especies que florecen durante la estación seca. A su vez, la maduración de la fruta se concentra casi exclusivamente en el período seco del año, que es la estación en la que se favorece la dispersión de las semillas por el viento, con la excepción de las frutas carnosas, que tienden a madurar en la estación lluviosa,

cuando las condiciones ambientales favorecen la maduración y los dispersores de semillas son abundantes. Independientemente del momento de la dispersión de las semillas, la mayoría de las semillas permanecen latentes hasta el comienzo de la temporada de lluvias, cuando germinan, un rasgo evolutivamente seleccionado que puede aumentar la probabilidad de un establecimiento exitoso de las plántulas (Luna-Nieves *et al.*, 2017).

2.2. Familia Primulaceae Batsch ex Borkh.

2.2.1. Generalidades

La familia Primulaceae pertenece al orden Ericales y consta de aproximadamente 53 géneros con aproximadamente 2 790 especies, incluyendo a las antiguas familias Myrsinaceae y Theophrastaceae. Esta familia es cosmopolita, pero puede encontrarse con mayor frecuencia en zonas del hemisferio norte, con un total de seis especies con 16 géneros representadas para México (Xu y Chang, 2017).

Las primuláceas son plantas herbáceas anuales o perennes, raramente sufrutescentes; hojas exestipuladas, alternas, opuestas o verticiladas, algunas veces dispuestas en una roseta basal, simples y enteras, en ocasiones dentadas o lobadas; flores axilares solitarias o agregadas en racimos, panículas, espigas o umbelas; flores bisexuales, actinomorfas o rara vez zigomorfas, habitualmente 5-meras, rara vez 4 a 7-meras, con frecuencia heterostilas; cáliz sinsépalo, usualmente persistente, 4 a 5-lobado; corola simpétala, tubo muy breve a alargado, lóbulos 4 ó 5, enteros a emarginados, estambres 5, antipétalos, implantados en el tubo corolino, anteras bitecas, introrsas, dehiscentes longitudinalmente o algunas veces por poros terminales, alternando en ocasiones con 5 estaminodios; ovario súpero o rara vez semiínfero, unilocular, habitualmente de 5 carpelos, sincárpico, con pocos a numerosos óvulos con placentación libre central, estilo regularmente 1, estigma capitado; fruto capsular de dehiscencia valvar o circuncísil; semillas más o menos numerosas, angulares, con endospermo (Ocampo-Acosta, 2000).

2.2.2. Género *Bonellia* Colla.

El género *Bonellia* consta de 22 especies distribuidas en Mesoamérica, en el norte y oeste de Sudamérica, y en las Grandes Antillas. Dentro de este género existen dos grupos morfológicamente y geográficamente distintos y que pueden reconocerse. Uno de ellos comprende las especies de Sudamérica *B. mucronata* (en el norte de Perú), *B. sprucei* (Ecuador), *B. frutencens* (norte de Colombia-Venezuela), *B. loeflingii* (norte de Venezuela), y en Mesoamérica *B. nervosa* y *B. macrocarpa*. Todas las especies en este grupo tienen paredes bastante grandes y gruesas y frutos opacos, hojas comparativamente flexibles (deciduas en *B. nervosa*), y brotes jóvenes blanquecinos. El segundo grupo consiste de especies provenientes de Cuba, La Española y Puerto Rico (*B. brevifolia*, *B. lippoldi*, *B. pauciflora*, *B. stenophylla*, *B. umbellata*) con hojas muy pequeñas con una espina, frutos pequeños de paredes delgadas y flores diminutas. Las especies restantes de Mesoamérica son más difíciles de definir como un grupo natural, aunque algunas especies parecen estar estrechamente relacionadas (Källersjö y Ståhl, 2004)

Este género se caracteriza por tener brotes jóvenes pubescentes dispuestos en una sola fila o glabros, hojas alternas (pseudoverticiladas en *B. paludicola*), generalmente con un mucrón bien definido; posee una corola naranja, a veces blanco o blanquecina. Tiene semillas aplastadas y están incompletamente cubiertas por tejido placentario; la esclerénquima foliar abaxial es adyacente a la epidermis inferior (*ib ídem*).

2.3. *Bonellia macrocarpa* B. Ståhl & Källersjö

2.3.1. Taxonomía y sinonimias

El Jardín Botánico de Missouri (2016) señala:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Equisetopsida

Orden: Ericales

Familia: Primulaceae

Género: *Bonellia*

Especie: *Bonellia macrocarpa* B. Ståhl
& Källersjö

En la base de datos de www.tropicos.org del Jardín Botánico de Missouri (2020) se contabilizaron 26 sinonimias, entre ellas: *Jacquinia macrocarpa* Cav. subsp. *macrocarpa* y *Jacquinia mexicana* hort. ex Regel

2.3.2. Descripción botánica de la especie

De acuerdo con Castillo-Campos *et al.* (1998), *Bonellia macrocarpa* es un arbusto o árbol hasta de 9 m de alto, el tallo de 15 cm de diámetro, las ramas jóvenes densamente pubescentes. Hojas alternas, opuestas o subverticiladas, subsésiles o cortamente pecioladas, de 1.1-9.6 cm de largo, 0.5-2.7 cm de ancho, coriáceas, rígidas, oblongas, ovado-lanceoladas u ovadas, punteadas por ambos lados, el margen entero, grueso, revoluto, la base gradualmente angosta, el ápice con una espina rígida de 1.5-4 mm de longitud, penninervadas, el haz con el nervio central acanalado, la venación ascendente ligeramente visible, con poros dispersos, el pecíolo de 1-4 mm de longitud, las escamas principalmente agrupadas en los nudos de las ramas jóvenes, dispersas en los tallos de las ramas terminales, lanceoladas hacia el ápice, engrosadas en la base, pardas, de 0.5-2.5 mm de largo.

Inflorescencias terminales, ocasionalmente axilares, racemosas, erectas, con 4-14 flores, los pedúnculos de 1-5 cm de largo, glabros a ligeramente pubescentes, los pedicelos bracteados, de 0.6-1.8 cm de largo, glabros a ligeramente pubescentes, el ápice ligeramente engrosado, las brácteas por debajo de la mitad del pedicelo, de 0.5-1.2 mm de largo, pubescentes dorsalmente, la base parda, el resto blanquecino, el ápice agudo, el margen entero a ciliado-dentado, glabro; flores de 8-10 mm de largo, anaranjadas a rojas, brillantes, aromáticas; sépalos de 2.8-4 mm de largo, 3-4 mm de ancho, coriáceos, glabros, el margen densamente serrulado, la corola campanulada, de 6.7-9.8 mm de largo, el tubo de 3.5-5.8 mm de largo, glabro, los lóbulos en la mitad superior del tubo de la corola, de 2.5-4 mm de largo, 2.3-3.7 mm de ancho, ovado-elípticos, redondeados, el ápice crenulado; estambres 5, de 2.5-4.5

mm de largo, 0.7-1.0 mm de ancho, antipétalos, subrectangulares, las anteras de 2-2.3 mm de largo, 1-1.5 mm de ancho, biloculares, extrorsas, los estaminodios antisépalos, de 1.5-2.5 mm de largo, de 1.3-2.7 mm de ancho; ovario de 1.3-2.5 mm de largo, 1 mm de ancho, unilocular, el estilo de 1.5-2 mm de largo, recto, glabro, el estigma pulvinado, glabro, amarillo, anaranjado hasta negro. Fruto abayado, de 1.3-2.3 cm de largo, 1-2 cm de ancho, amarillo, anaranjado hasta pardo, brillante, corrugado, ligeramente cónico, jaspeado, el exocarpo duro; semillas de 4.5-7 mm de largo, 3.2-4.5 mm de ancho, inmersas en una pulpa mucilaginosa, corrugadas, pardo-rojizas a negras, brillantes, reniformes, planas, arqueadas ventralmente.



Figura 3. *Bonellia macrocrapa* B. Ståhl & Källersjö. A) Arbusto, B) ramas (Neptalí Ramírez Marcial), C) flores (Sue Carnahan), D) frutos (Maxim Shevchenko).

2.3.3. Distribución

Se distribuye en el suroeste de México, Centroamérica, Guatemala, Honduras y Panamá. Habita en su mayoría en regiones húmedas, como son duna costera, manglar, selva baja inundable, selva baja caducifolia y vegetación acuática como cenotes y lagunas. *B. macrocarpa* se subdivide en tres subespecies: *macrocarpa pungens* y *panamensis*. La subespecie *macrocarpa* se localiza en el sur de México, la segunda subespecie se distribuye a lo largo de la costa del Pacífico desde Sonora hasta Colima, y por último, la subespecie *panamensis* se encuentra solo en Panamá (Méndez-González *et al.*, 2012 Källersjö y Ståhl, 2004; Castillo-Campos *et al.*, 1998).

2.4. Generalidades del metabolismo secundario

Todas las células vegetales realizan procesos metabólicos comunes que conducen a la formación de compuestos como azúcares simples, aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos y polímeros derivados de ellos (polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, entre otros), esenciales para la vida celular y, en general, para la planta. El conjunto de estos procesos constituye el metabolismo primario, y los compuestos indicados se denominan metabolitos primarios. Además de los procesos metabólicos primarios, en las plantas se pueden desarrollar otros procesos que conducen a la formación de compuestos de ciertos grupos taxonómicos. Estas rutas constituyen el metabolismo secundario, y sus productos se denominan metabolitos secundarios (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

Hasta hace algún tiempo, los metabolitos secundarios de las plantas se solían considerar sustancias de desecho para el vegetal, carentes de una función fisiológica definida. En la actualidad, se sabe que, si bien la mayoría de los denominados compuestos secundarios no tienen, a diferencia de los metabolitos primarios, una importancia directa para la célula productora, sí pueden tener significación para el organismo productor como un todo. Muchos metabolitos secundarios están implicados en relaciones ecológicas, es decir, de la planta productora con los otros organismos de su medio natural. Ejemplos de ello son los pigmentos de las flores que atraen a los insectos polinizadores, y los compuestos que inhiben el crecimiento

de otros organismos vegetales (sustancias alelopáticas), o que protegen a la planta productora de infecciones (fitoalexinas) o de los depredadores (disuasorios nutritivos o alimentarios). En general, puede afirmarse que los metabolitos secundarios constituyen el mundo de señales químicas a través del cual las plantas se relacionan con su entorno (*ib ídem*).

De acuerdo a Anaya-Lang (2003) los metabolitos secundarios se caracterizan a grandes rasgos por lo siguiente:

1. Tienen una gran heterogeneidad en su estructura química.
2. Algunos tienen una distribución restringida.
3. Su formación es por medio de enzimas codificadas por material genético.
4. El control estricto de su biosíntesis es por medio de la regulación de la cantidad de enzimas involucradas y de la actividad de estas.
5. La compartimentación de enzimas, precursores, intermediarios y productos involucrados en su biosíntesis, almacenamiento y desintegración.
6. La expresión del metabolismo secundario como un aspecto de especialización celular, o bien, de la formación de nuevas células especializadas que se integran en los programas de diferenciación y desarrollo del organismo productor.
7. La importancia relativa para la célula sintetizadora como tal, y la mayor importancia para el organismo como un todo.
8. La falta de continuidad filogenética en muchos de ellos.

El amplio rango de características químicas en los metabolitos secundarios deriva de un grupo de precursores sorprendentemente reducido. Los precursores principales son:

- ✓ El ácido shikímico, precursor de muchos compuestos aromáticos, incluyendo los aminoácidos aromáticos, los ácidos cinámicos y ciertos polifenoles.
- ✓ Los aminoácidos, que dan origen a los alcaloides, y los antibióticos peptídicos incluyendo las penicilinas y las cefalosporinas.

- ✓ El acetato, precursor de los poliacetileno, las prostaglandinas, antibióticos macrocíclicos, polifenoles e isoprenoides (terpenos, esteroides y carotenoides), a través de dos caminos biosintéticos totalmente separados.

Los compuestos que forman parte del metabolismo secundario se clasifican en diferentes tipos: fenoles, terpenoides, compuestos nitrogenados o alcaloides. Dos grupos de compuestos secundarios ampliamente distribuidos en las plantas son los fenoles y los terpenos. Solo una tercera parte de especies conocidas contienen metabolitos basados en el nitrógeno, como alcaloides o glucosionolatos (Harborne y Dey, 1997; Harborne, 1993).

2.4.1. Terpenos

Los terpenos o isoprenoides constituyen uno de los grandes grupos de compuestos secundarios ampliamente extendidos en el reino vegetal. Entre ellos se encuentran metabolitos claramente secundarios, con una distribución taxonómica restringida (como los componentes de esencias, bálsamos y resinas), junto con otros compuestos de amplia distribución considerados fisiológicamente primarios. Entre los isoprenoides considerados primarios figuran las fitohormonas giberelinas y el ácido abscísico; la cadena isoprenoide de algunas citoquininas, de la plastoquinona y de la ubiquinona; el fitol de la clorofila; los carotenoides; los fitoesteroles esenciales para la integridad de las biomembranas y los dolicoles. En las plantas, igual que en los mamíferos, los isoprenoides se sintetizan a partir del compuesto Isopentenil difosfato (IpPP) y se clasifican según el número de unidades de isopreno de que se componen (cuadro 1). (Azcón-Bieto y Talón, 2008; Anaya-Lang, 2003)

Cuadro 1. Clasificación de los terpenos correspondiente al número de unidades isopreno

Núm. de unidades de isopreno	Grupo de compuestos	Ejemplos
1	Hemiterpenos	Isopreno, isopentanol, alcohol isoamílico
2	Monoterpenos	Constituyentes de aceites esenciales (geraniol, mentol, timol) iridoides (loganina, secologanina)
3	Sesquiterpenos	Constituyentes de aceites esenciales (farnesol, bisabolol) y lactonas sesquiterpénicas (matricina, ácido absísico, hormonas juveniles, sirenina)
4	Diterpenos	Constituyentes de las resinas (ácido abiético, fitol, vitamina A, crocetina)
5	Sesterterpenos	Constituyente de extractos de lípidos insaponificables
6	Triterpenos	Escualeno, esteroides, triterpenos pentacíclicos
8	Tetraterpenos	Carotenos, xantofilas
>8	Politerpenos	Solanesol, espadicol, hule

Muchos terpenos derivan de compuestos clave (prenil pirofosfatos) como el geranil, farnesil y geranilgeranil pirofosfato, entre otros. El esqueleto básico de los terpenoides puede ser modificado por la introducción de una gran variedad de grupos químicos, por isomerización, sustitución de dobles enlaces, grupos metílicos, etc. Además, compuestos derivados de otras vías biogénicas pueden contener grupos isoprénicos. Por ejemplo, las vitaminas K, ubiquinonas, clorofilas, plastiquinonas y tocoferilquinonas tienen cadenas laterales isoprenoides con más de 10 unidades, también las acetogeninas, alcaloides y cumarinas. Los terpenos se encuentran ampliamente distribuidos en microorganismos, plantas y animales. Su gran importancia como agentes de comunicación química entre organismos, dentro y entre especies, probablemente resulta de su volatilidad combinada con la diversidad estructural tan extraordinaria que poseen. Actualmente, se conocen varios miles de estos compuestos. (Anaya-Lang, 2003).

2.4.1.1. Biosíntesis de terpenos

La biosíntesis de los terpenos en las células vegetales está compartimentada, es decir, la formación de IpPP y los pasos posteriores discurren de modo diferente, ya que la biosíntesis de terpenos puede llevarse a cabo en el citoplasma o en los cloroplastos (figura 4). En los primeros pasos de la biosíntesis citoplasmática de los isoprenoides, en una reacción catalizada por la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa (HMGR), se condensan tres moléculas de acetil CoA (CH₃-COCoA) y originan el ácido mevalónico (AMV). Este compuesto de seis carbonos experimenta una descarboxilación y dos fosforilaciones consecutivas para transformarse en el IpPP. En cambio, en los plastos, el IpPP se forma de manera diferente por la condensación de los compuestos piruvato y gliceraldehído- 3-P, dando origen a 1-desoxi-D-xilulosa 5-P, que tras experimentar diferentes modificaciones y mediante la formación del intermediario 2-metil-D-eritritol 4-P, se convertirá en el IpPP. El IpPP originado por ambas rutas puede transformarse en su isómero dimetilalil difosfato (DMAPP) por desplazamiento del doble enlace de la posición 3-4 a la 2-3, siendo estos dos compuestos el origen de todos los terpenos naturales (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

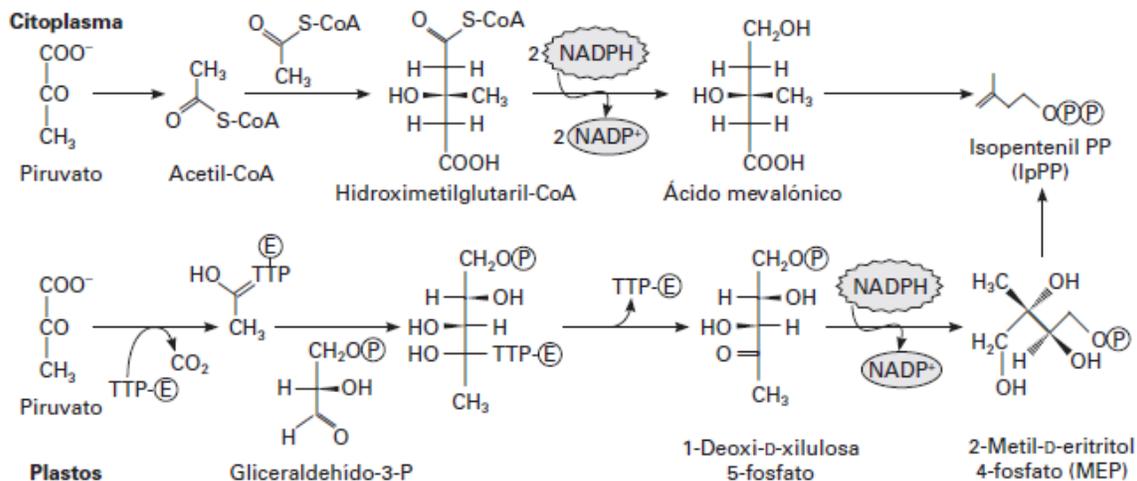


Figura 4. Formación del Isopentenil difosfato (IpPP) en células vegetales (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

El IpPP y su isómero, el dimetilalil difosfato, son los precursores activados de cinco carbonos en la biosíntesis de terpenos que se combinan para formar moléculas mayores. En primer lugar, esto siguiendo el modelo cabeza-cola [1'-5], el IpPP y DMAPP reaccionan para formar geranil difosfato (GPP), que es el precursor de diez carbonos de casi todos los monoterpenos. Esta reacción es catalizada por la enzima geranil difosfato sintasa, que está localizada en los plastos. El GPP puede unirse a otra molécula de IPP y formar el farnesil difosfato (FPP), compuesto de 15 carbonos. La enzima que sintetiza esta reacción es la farnesil difosfato sintasa, que se encuentra localizada en el retículo endoplasmático. El FPP es el compuesto que da lugar a todos los sesquiterpenos, y también a los triterpenos, mediante una reacción de dimerización, por unión cabeza-cabeza [1'-1] de dos moléculas de sesquiterpeno. La adición de otra molécula de IPP genera un compuesto de 20 carbonos, el geranilgeranil difosfato (GGPP), reacción catalizada por el geranil geranil difosfato sintasa. Este compuesto es el precursor directo de los diterpenos y, por la dimerización de estos últimos, de los tetraterpenos. Finalmente, FPP y GGPP pueden dimerizar para formar triterpenos (C₃₀) y tetraterpenos (C₄₀), respectivamente a través la acción de las preniltransferasas (Azcón-Bieto y Talón, 2008; Taíz y Zeiger, 2006).

2.4.2. Fenoles

Los fenoles son compuestos químicos caracterizado por tener al menos un anillo aromático (C₆) con uno o más grupos hidroxilos. Muchos de estos compuestos aparecen como derivados de reacciones de adición o condensación. La mayoría de los miles de fenoles que se conocen hasta la fecha son de origen vegetal, ya que este compuesto se encuentra en todos los tejidos vegetales. El compuesto básico es el fenol, pero la mayor parte de estos compuestos lo constituyen los polifenoles. Entre los polifenoles vegetales, de los que actualmente se conocen más de 8000, figuran las quinonas fenólicas, las cumarinas, los lignanos, los estilbenos y los flavonoides. Estos últimos forman el grupo más numeroso. Además de las estructuras monoméricas y diméricas, existen importantes grupos de polímeros fenólicos, como las ligninas y los taninos. También se encuentran unidades fenólicas

entre los compuestos nitrogenados, de los que un buen ejemplo es el aminoácido tirosina (Azcón-Bieto y Talón, 2008; Harborne, 1997).

2.4.2.1. Rutas de biosíntesis de compuestos fenólicos en plantas

2.4.2.1.1. Ruta del ácido shikímico

Esta ruta es la más importante para originar compuestos fenólicos, e inicia con el acoplamiento del fosfoenolpiruvato (PEP) y la D-eritrosa-4-fosfato, para obtener el ácido 3-deoxi-D-arabino-heptusolónico-7-fosfato (DAHP) (figura 5). La eliminación de ácido fosfórico del DAHP se lleva a cabo por una oxidación que genera un enol, gracias a la presencia del NAD⁺, y se forma un intermediario que sufre un re-arreglo para convertirse en el ácido 3-dehidroquinico, que en presencia del NADH y de la misma enzima que oxidó el DAHP, en este caso, reducirá el ácido 3-dehidroquinico a ácido quinico. El ácido shikímico es formado por deshidratación del ácido 3-dehidroquinico, formándose primero el ácido 3-dehidroshikímico, que sufre una reducción en presencia de NADPH (Dewick, 2002).

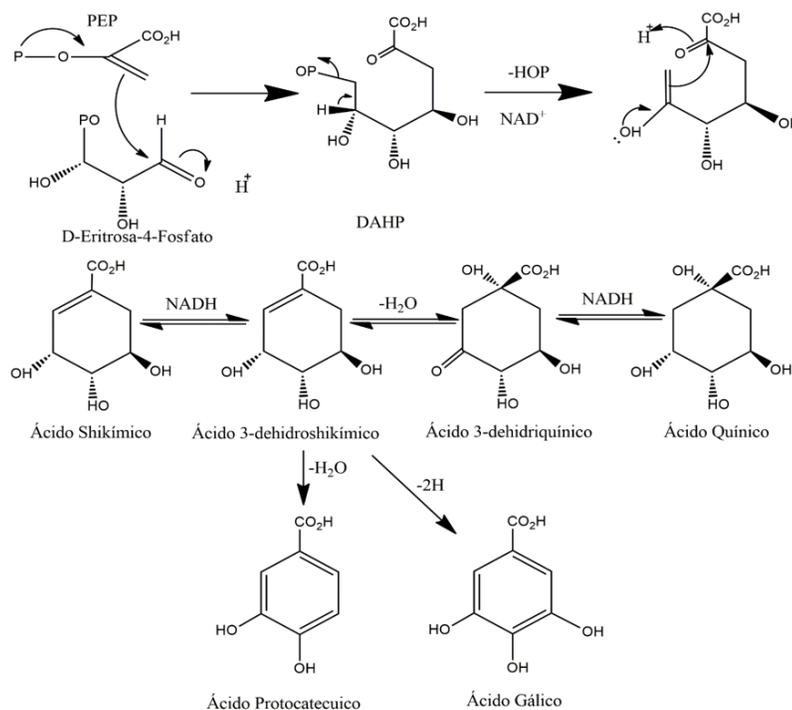


Figura 5. Formación del ácido shikímico a partir de fosfoenolpiruvato y eritrosa 4-fosfato. (Dewick, 2002).

Algunos ácidos fenólicos como el ácido protocatequínico y el gálico se forman a partir de la deshidratación del ácido 3-dehidroshikímico, para posteriormente pasar por un proceso de enolización (en el caso del ácido protocatecuico) y una reducción con posterior tautomería cetoenólica (para el ácido gálico). Cabe destacar que el ácido gálico es el precursor de la formación de taninos hidrolizables y el ácido protocatecuico es un agente antimicrobiano presente en muchas plantas. Por otra parte, el ácido shikímico es fosforilado en presencia de ATP, formando el ácido shikímico 3-fosfato, que se une a una molécula de fosfoenolpiruvato en medio ácido, reacción catalizada por la enzima 3-enolpiruvilshikimico-3-fosfato sintasa. El producto obtenido sufre una eliminación del grupo fosfato como ácido fosfórico, resultando así el ácido 3-enolpiruvilshikimico-3-fosfato (EPSP). El ácido corísmico se forma por una eliminación, probablemente concertada, del ácido fosfórico del EPSP, dando lugar a la formación de metabolitos secundarios de gran diversidad bioquímica a partir del ácido corísmico (*Ib idem*).

Además, a partir de la molécula anterior se forman algunos precursores de aminoácidos como la fenilalanina, uno de ellos es el ácido prefénico que es sintetizado a través de una transposición de Claisen del grupo enolpiruvato, catalizada por la enzima enolpiruvato transferasa. El ácido prefénico sufre una descarboxilación, la eliminación de un grupo hidroxilo y una sustitución del oxígeno cetónico por un grupo amino, para dar como resultado la L-fenilalanina (L-Phe). A través de la fenilalanina se pueden formar algunos polifenoles complejos como los lignanos y las ligninas. La fenilalanina es desaminada por acción de la fenilalanina-amino liasa (PAL) formando ácido cinámico, que al ser oxidado en presencia de NADPH, genera ácido 4-cumárico. Este compuesto sufre una serie de reacciones catalizadas por la enzima adenosil metionina oxidándolo a ácido cafeico, para luego metilarlo en la posición meta produciendo ácido felúrico; en seguida se vuelve a oxidar y a metilar, dando como resultado el ácido sináptico. Los tres ácidos pueden ser reducidos a alcohol cumarílico, coniférico y sinapílico respectivamente, catalizadas por el NADPH y la coenzima A, siendo estos alcoholes los bloques de construcción de los polifenoles complejos (Dewick, 2002) (figura 6).

En esta ruta biosintética también ocurre la producción de cumarinas a partir del ácido cinámico (figura 7). Este compuesto se oxida en presencia de NADPH a ácido 2 y 4-cumárico y sufre una isomerización de configuración E a Z, catalizada por la enzima ácida 2-cumárico isomerasa, pues dicha configuración es más estable. La formación de la cumarina se realiza gracias a una ciclación intramolecular, conocida como lactonización (Dewick, 2002), en donde los pares libres del oxígeno hidroxílico atacan al carbonilo deficiente en electrones del grupo ácido, ciclando la molécula y liberando agua. Si la ruta es con el ácido 4-cumárico el primer paso ya no es la isomerización, sino una hidroxilación en posición 2, para generar el ácido 2,4-dihidroxicinámico, que luego si sufre la isomerización de configuración E a Z y la lactonización para generar la umbeliferona, que es hidroxilada nuevamente en posición 6 para formar la esculetina. La esculetina es eterificada en la posición 6 para dar escopoletina, y ésta por O-glicosidación originar la escopolina (*ib ídem*). Las cumarinas son compuestos que son utilizados como venenos, y aceleran la fermentación de la levadura (Martin, 2017), además, en la naturaleza puede ser derivatizadas en cientos de compuestos (Herbert, 1989).

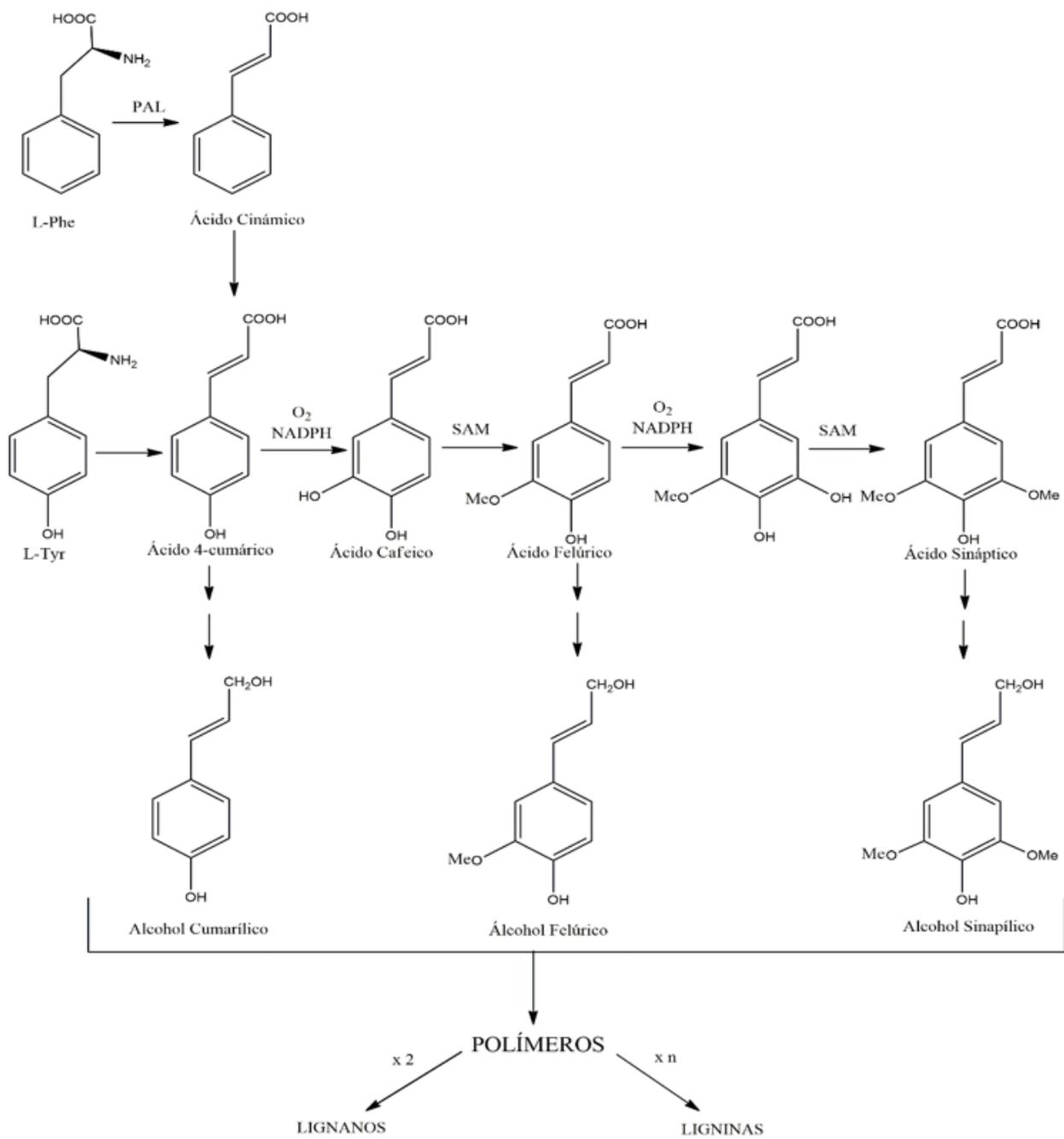


Figura 6. Formación de polifenoles complejos (ácidos cinámicos, ligninas, y lignanos) (Dewick, 2002).

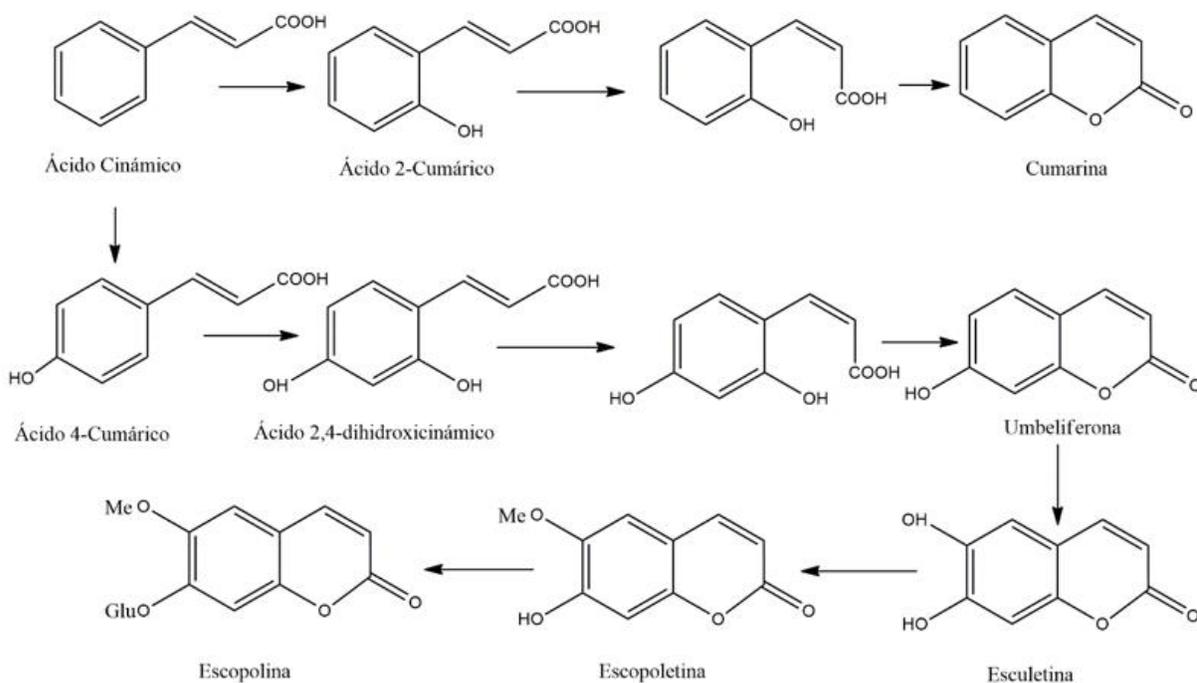


Figura 7. Formación de cumarinas (Dewick, 2002).

Por último, en esta ruta metabólica se producen las chalconas (figura 8). Estas se originan en las plantas por un acoplamiento del 4-hidroxicinamoil-CoA con 3 moléculas de malonil-CoA, que da forma a un intermediario que puede ser, o no, reducido en presencia de una reductasa y NADPH. Estos intermediarios sufren una reacción tipo Claisen, catalizada por chalconas sintasa, formando las chalconas (Herbert, 1989). Además de las chalconas, también pueden biosintetizarse estilbenos y flavanonas. Los primeros se forman por una reacción tipo aldólica del intermediario formado al acoplar las 3 moléculas de malonil-CoA con 4-hidroxicinamoil-CoA, catalizada por la estilbeno sintasa; mientras que las flavanonas se sintetizan a partir de las chalconas, mediante reacciones que involucran ataques nucleofílicos de los hidroxilos al sistema α y β insaturado de las chalconas (Dewick, 2002).

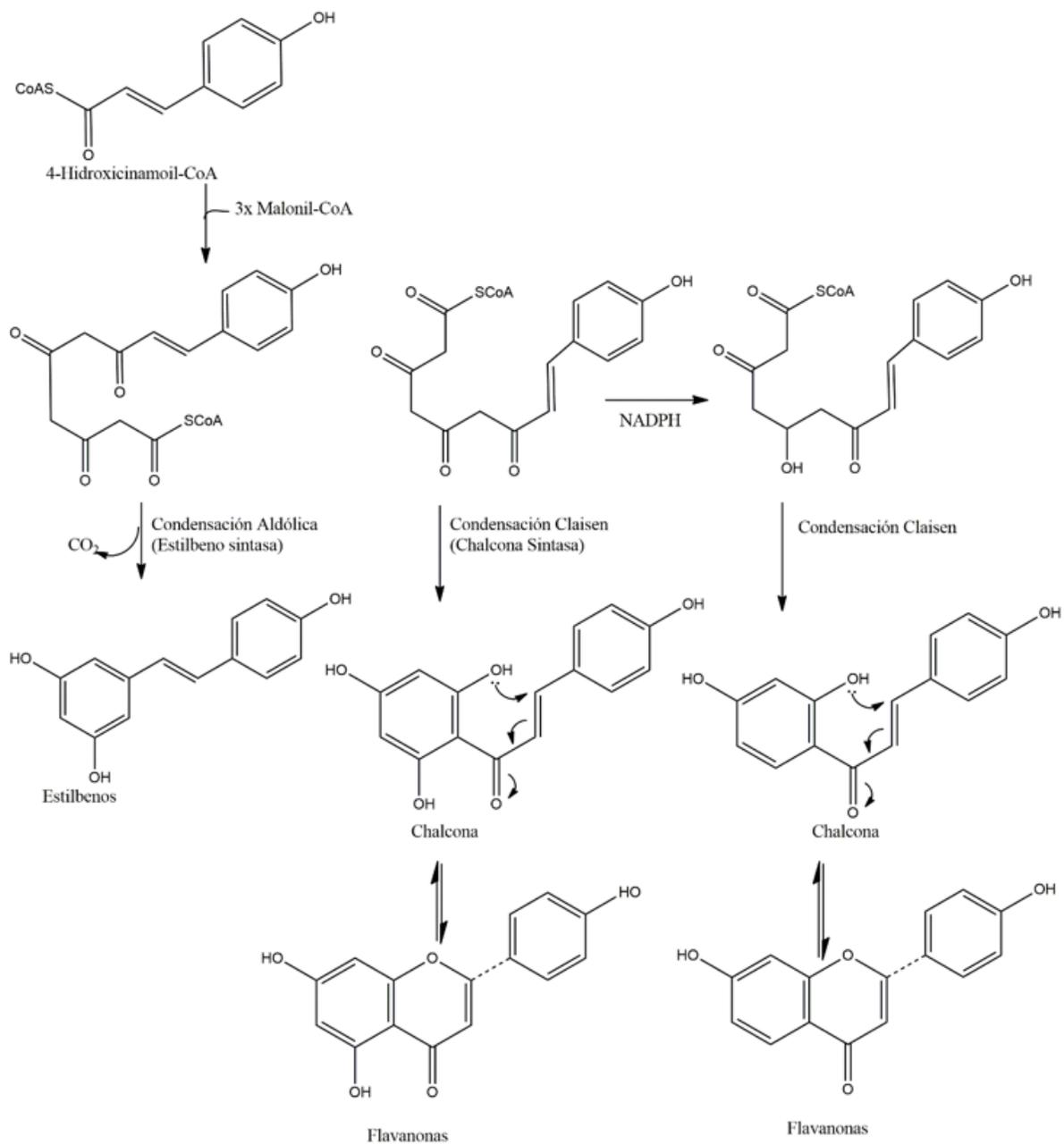


Figura 8. Síntesis de chalconas (Dewick, 2002).

2.4.2.1.2. Ruta del acetato/malonato

Para la síntesis de fenoles simples en esta ruta metabólica el primer paso es la unión de una molécula de acetil-CoA y tres de malonil-CoA para originar un β -policetoéster, que puede seguir dos vías. En la ruta A la ionización del α -metileno permite la adición (reacción aldólica) al carbonilo presente una distancia de seis carbonos a lo largo de la cadena, produciendo un alcohol terciario. La deshidratación se produce como en la mayoría de las reacciones químicas aldólicas, dando el alqueno, y seguido de una enolización para alcanzar la estabilidad conferida por el anillo aromático. El enlace tioéster (a la coenzima A o ACP) se hidroliza para producir ácido orsellínico. Si, en cambio, la biosíntesis sigue la ruta B, el policétido se pliega de tal manera que permite una reacción de Claisen, que, aunque de manera mecánica análoga a la reacción aldólica, se termina con la expulsión del grupo saliente tiol, y la liberación directa de la enzima. La enolización de la ciclohexatriona produce la floracetofenona (Dewick, 2002; Herbert, 1989).

En esta ruta metabólica también puede sintetizarse el ácido 6-metil salicílico (figura 9). Este difiere del ácido orsellínico por la ausencia de un grupo fenol en la posición 4. También se deriva de acetil-CoA y tres moléculas de malonil-CoA, y la función oxígeno se elimina durante la biosíntesis. El ácido orsellínico no está desoxigenado en sí mismo al ácido 6-metilsalicílico. La enzima ácido 6-metilsalicílico sintasa requiere NADPH como cofactor, y elimina la función de oxígeno mediante la reducción de una cetona a un alcohol, seguido de un paso de deshidratación. Hay evidencia de que la reducción/deshidratación ocurre realmente en un intermedio de seis carbonos a medida que la cadena crece, antes de la extensión final de la cadena. La evidencia importante para la reducción que ocurre en la etapa C_6 proviene de la formación de lactona de ácido triacético si se omite NADPH de la incubación enzimática (Holm *et al.*, 2014).

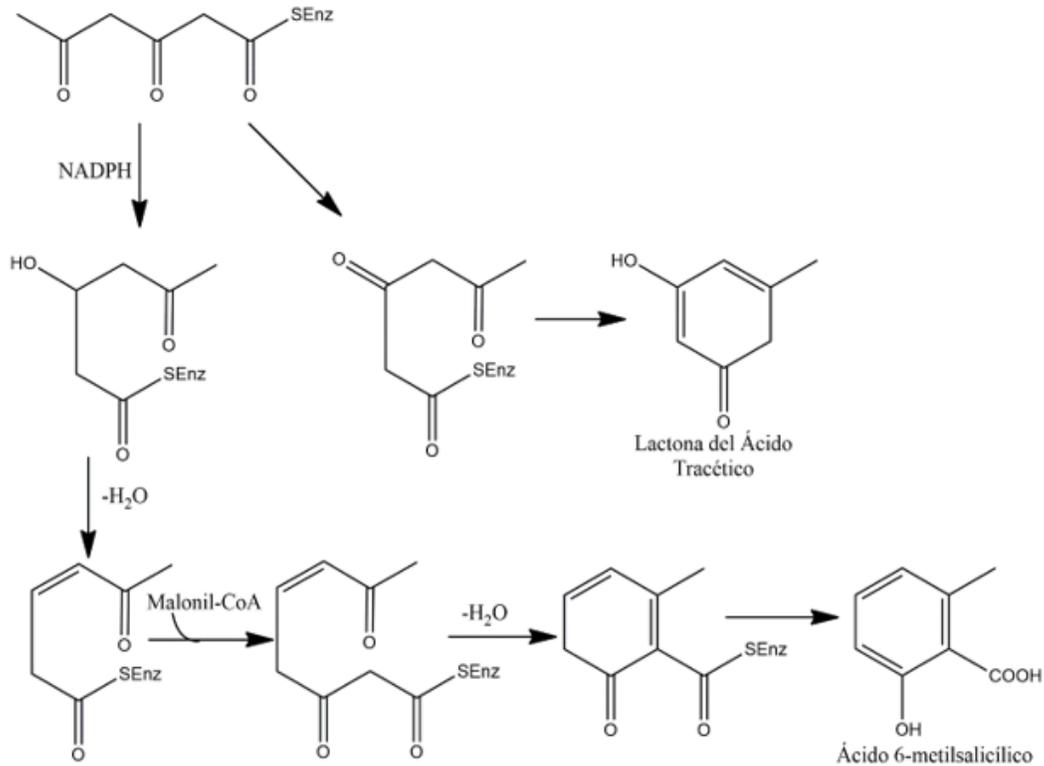


Figura 9. Biosíntesis del ácido 6-metilsalicílico (Dewick, 2002).

2.4.2.2. Factores extrínsecos en la variabilidad de metabolitos secundarios de las plantas

2.4.2.2.1. La intensidad de la luz

Diversos taxa están adaptados a una enorme variación en la intensidad de la luz incidente, pero otros están adaptados a condiciones de alta o baja intensidad de luz. Es probable que las plantas adaptadas a crecer en la sombra reduzcan su actividad fotosintética y limiten algunos recursos destinados al metabolismo secundario. Sin embargo, una alta intensidad de luz puede estar asociada con el estrés hídrico, y bajo estas condiciones, los procesos metabólicos pueden ser limitados (Anaya-Lang, 2003).

Diversos estudios sugieren que existe una relación entre los cambios de luz incidente y la producción de fenoles aleloquímicos (incluyendo los taninos condensados), diterpenos y resinas diterpénicas; estos cambios pueden presentar tanto en individuos como dentro de un solo individuo y son determinantes, como

fuerza de variación para los herbívoros. Al parecer las plantas que viven en ambientes sombreados producen menos metabolitos secundarios que sus congéneres expuestas a mayores intensidades de luz. Esta es una respuesta fenotípica. Sin embargo es importante enfatizar que cuando se comparan diversas especies (genotípicas) en un bioma de la selva, ocurre lo contrario. Aquellas especies que se especializan en colonizar claros que se abren en la selva, tienden a tener una menor cantidad de fenoles que las especies en las etapas más avanzadas en la sucesión. Se presume que estas especies colonizadoras tienen un metabolismo adaptado a un mayor y más consistente provisión de nutrimentos y recursos fotosintéticos, lo que conduce hacia un mayor desarrollo vegetativo y reproductivo (Waterman y Mole, 1989).

2.4.2.2.2. Sequía

La sequía afecta el crecimiento que depende de manera directa de la presión de turgencia de la planta, lo que sugiere que los productos químicos secundarios ricos en carbono deberían acumularse en las plantas estresadas por la sequía, siendo esta la respuesta metabólica más común. Algunos compuestos acumulados son aminoácidos (especialmente prolina), poliaminas, azúcares, ciclitoles, betaína, colina e iones inorgánicos. La producción de todos estos compuestos puede ser fisiológicamente necesaria para mantener el balance osmótico; muchos de ellos pueden considerarse como fuentes de nutrimentos y al parecer incrementan la palatabilidad. Además la sequía provoca un incremento de diversos tipos de metabolitos secundarios: glucósidos cianogénicos, glucosinalatos, terpenoides, alcaloides y taninos condensados. Sin embargo el efecto del estrés hídrico sobre la concentración de metabolitos secundarios es dependiente de grado de la severidad de este fenómeno. Los efectos durante los periodos cortos producen un aumento en la producción, mientras que los periodos largos provocan un efecto contrario (Niinements, 2016; Anaya-Lang, 2003).

2.4.2.2.3. Estacionalidad

La variación climática afecta la capacidad de llevar a cabo la fotosíntesis (temperatura, duración del día, nubosidad) y la disponibilidad de nutrientes (lluvia y temperatura del suelo). Como los procesos de crecimiento vegetal se realizan en consonancia con la estacionalidad es difícil separar la influencia de los procesos normales de desarrollo, del efecto de la variación climática sobre la biosíntesis del metabolismo secundario. Un análisis de los niveles de fenoles y taninos en las plantas boreales durante dos etapas de crecimiento, confirmaron que la síntesis se realizaba de acuerdo con la variabilidad climática: en la estación más caliente se presentó mayor biosíntesis, presumiblemente por el aumento de la actividad fotosintética (Anaya-Lang, 2003; Jonasson *et al.*, 1986).

III. ANTECEDENTES

La familia Primulaceae está compuesta por 53 géneros de plantas, entre las cuales se encuentran el género *Bonellia*. Anteriormente este género se le conocía con el nombre de *Jacquinia* y estaba considerado dentro de la familia Teophrastaceae, sin embargo fue dividido en dos géneros distintos y ambos fueron ubicados en la familia Primulaceae. *Bonellia* se distingue por sus flores en su mayoría anaranjadas, en ocasiones blancas o blanquecinas con hojas alternas y semillas aplanadas, y comprende 22 especies. La especie *Bonellia macrocarpa* es conocida como siqueté, naranjillo, lengua de gallo, limoncillo o pico de gallo. Se encuentra generalmente en forma de arbusto pequeño, pero puede llegar a medir hasta seis metros de altura. Se distribuye desde México hasta Honduras encontrándose en algunos tipos de vegetación como selva baja caducifolia, selva mediana subperennifolia, selva alta perennifolia y vegetación de dunas costeras (Xu y Chang, 2017; The plant list, 2013; Källersjö y Ståhl, 2004; Castillo-Campos *et al.*, 1998).

Se han realizado algunos estudios sobre el efecto de la estacionalidad en la producción de metabolitos secundarios. Rubio-Gouvea *et al* (2012) investigaron la influencia de las variables medioambientales en ácidos cafeoilquínicos, flavonoides y lactonas sesquiterpénicas de las hojas de *Eremanthus mattogrossensis* (Asteraceae). El estudio se llevó a cabo de junio del 2000 a febrero del 2002, donde se recolectó el material vegetal y se analizaron los extractos orgánicos mediante una cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Se identificaron diez compuestos principales en las hojas de esta planta y no se encontraron diferencias en la producción de estos metabolitos entre los ejemplares. Sin embargo el análisis estadístico indicó una correlación entre la cantidad de metabolitos de *E. mattogrossensis* y la estacionalidad, señalando que los factores ambientales promueven respuestas metabólicas importantes. Se encontró una fuerte correlación entre las mayores concentraciones de ácidos cafeoilquínicos y flavonoides y la estación lluviosa, que se puede explicar por el hecho de que en esta temporada la

temperatura y la radiación solar son más intensas y en consecuencia pueden causar un aumento en la concentración de compuestos fenólicos.

Alves-Ribeiro *et al.*, (2019) analizaron las variaciones en la composición fenólica de la corteza del tallo y duramen de *Secondatia floribunda* bajo la influencia de la estacionalidad y en diferentes fases fenológicas. Para ello se realizaron colectas trimestrales a lo largo de dos años (2015 y 2016), tanto en la época de lluvias como la seca, y se registraron las diferentes fases vegetativas y reproductivas de la especie. Los extractos metanólicos fueron analizados por cromatografía líquida de alta eficiencia con detector Diodo Array (HPLC-DAD). En este estudio se identificaron ocho compuestos fenólicos y además se demostró que estos presentaron cambios cualitativos y cuantitativos durante las estaciones y etapas fenológicas, con predominio de flavonoides. La temporada de lluvias durante los dos años favoreció la producción de mayores cantidades de compuestos fenólicos durante las fases reproductivas, especialmente durante la floración. Con base en estas variaciones, se observó una relación entre la estacionalidad y el contenido químico en las diferentes partes de la planta durante su ciclo fenológico, y también a través de un estudio de Análisis de Componentes Principales (PCA) se confirmó la correlación entre los compuestos fenólicos y la estacionalidad, especialmente para la corteza del tallo.

En *Bonellia macrocarpa* no se ha realizado ningún estudio que relacione el metabolismo secundario con la estacionalidad, sin embargo se han llevado a cabo diversos estudios acerca de las propiedades antifúngicas, citotóxicas y anti-zoonóticas reportadas en plantas del género. Sánchez-Medina y colaboradores (2010) llevaron a cabo un estudio en donde se descubrió la actividad citotóxica y antimicrobiana de los extractos etanólicos crudos de las raíces *Bonellia flammea* sobre dos líneas celulares cancerosas (HeLa y RAW 264.7) y cuatro especies de bacterias (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*), identificando y aislando a un metabolito secundario del grupo de las saponinas llamado Sakurasosaponina (figura 10) como el principal agente citotóxico en la planta.

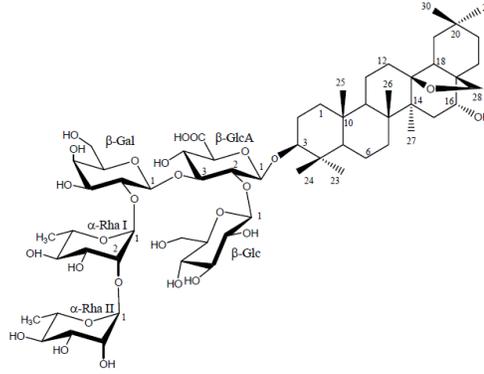


Figura 10. Estructura de Sakurasosaponina (Sánchez-Medina et al., 2010)

Por otra parte, Vera-Ku *et al.* (2015) analizaron los efectos antifúngicos, citotóxicos y antiparasitarios de nueve especies de plantas de la medicina tradicional maya, entre ellas *Bonellia albiflora*. Se probó que los extractos metanólicos de las raíces de la planta tienen una significativa actividad antagonista sobre hongos como *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cereviceae* y *Candida albicans*, y también sobre protozoarios parásitos como *Leshmania mexicana*.

Medina-López y colaboradores (2016) realizaron un trabajo en el cual demostraron que la mezcla de dos fracciones orgánicas (a partir de acetato de etilo y butanol) obtenidas de *Baccharis glutinosa* y *Bonellia macrocarpa* potencializan sus efectos antifúngicos frente a dos especies de hongos: *Aspergillus flavus* y *Fusarium verticillioides*. En el estudio se sugiere que las fracciones actúan sobre ciertas enzimas, como la chitinasa y B-1,3-glucanasa, que se encuentran involucradas en la construcción de las células de las hifas.

También se pueden encontrar estudios con *Bonellia macrocarpa*. Caamal-Fuentes (2012) llevó a cabo una tesis doctoral que lleva por título: “Evaluación citotóxica de metabolitos aislados de plantas usadas en la medicina tradicional maya para el tratamiento de síntomas sugerentes a cáncer”. En este estudio se seleccionaron 21 especies de plantas conocidas en el tratamiento de los síntomas del cáncer y se evaluó la citotoxicidad de sus extractos orgánicos, así mismo se realizó el aislamiento, purificación, elucidación y evaluación de la actividad citotóxica y antiproliferativa de los metabolitos de los extractos más activos. De forma inicial se obtuvieron 41 extractos metanólicos y se sometieron a un bioensayo estandarizado

de citotoxicidad MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio) para siete líneas celulares cancerosas (cáncer de pulmón, nasofaríngeo, orofaríngeo, cáncer cervicouterino (HeLa y SiHa), cáncer de mama y de próstata) y una línea celular normal.

De este ensayo dos especies presentan una alta actividad citotóxica, una de ellas es *Bonellia macrocarpa*; cuyo extracto metanólico inicial se sometió a un fraccionamiento líquido-líquido con tres disolventes orgánicos (Hexano, CH₂Cl₂, AcOEt) y un extracto acuoso. En las fracciones hexánicas de la planta se aisló y se identificó un metabolito secundario del grupo de los catecoles llamado bonediol (figura 11), que es el responsable de la alta actividad citotóxica en la planta. Es en este trabajo en donde se aisló este compuesto por primera vez y se registró como uno de los más importantes encontrados en el género, además se lograron sugerir algunos factores climáticos relacionados con la producción de bonediol, ya que el autor señala que no se detectó bonediol en las fracciones hexánicas que corresponden a las colectas de la temporada de sequía y que tienen un efecto citotóxico menor que las fracciones obtenidas en las colectas de la temporada de lluvias.

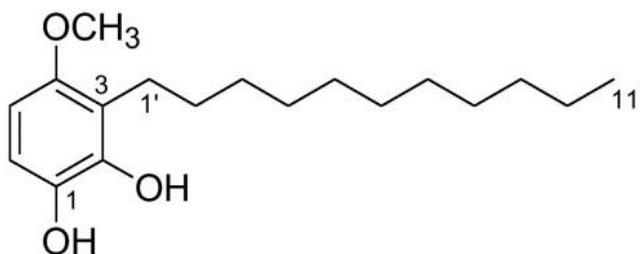


Figura 11. Estructura de bonediol (Caamal-Fuentes, 2012)

Un segundo trabajo corresponde a una tesis de maestría realizada por Vila-Luna (2016) y lleva por título: “Evaluación citotóxica y antiproliferativa y elucidación estructural de metabolitos secundarios aislados de la fracción hexánica de la raíz de *Bonellia macrocarpa*”. En este estudio se aislaron 14 metabolitos secundarios de la fracción hexánica de la raíz de la planta, sin embargo solamente cinco compuestos (3 β , 16 α -dihidroxi-protoprimulagenina A; 3-metoxi-2-metil-5-pentil fenol; 3,5-dihidroxi-

1-metil-2,2-dimetil-benzociclobutano; 3-metoxi-5-(5',5'-dimetilhexil) fenol; 1,3,5,6-tetrametoxi-8-metil-naftaleno) fueron seleccionados para su identificación con técnicas espectroscópicas y espectrométricas (figura 12).

Posteriormente se evaluó el efecto citotóxico y antiproliferativo de cada uno de los compuestos frente a cuatro líneas celulares cancerígenas (adenocarcinoma de cérvix, carcinoma de células escamosas de cérvix, adenocarcinoma de mama, adenocarcinoma de próstata) y una línea celular normal. Como resultado tres de los cinco compuestos (3 β , 16 α -dihidroxi-protoprimulagenina A; 3-metoxi-2-metil-5-pentil fenol; 3-metoxi-5-(5',5'-dimetilhexil) fenol) presentaron una actividad citotóxica considerable sobre las líneas cancerígenas analizadas. Además, se observó que dos de los compuestos aislados (3-metoxi-2-metil-5-pentil fenol; 3-metoxi-5-(5',5'-dimetilhexil) fenol) tienen una estructura molecular semejante al bonediol, por lo que probablemente, debido a sus características similares, estos compuestos nuevos tengan una actividad citotóxica considerable. De este trabajo de investigación puede retomarse la contribución con cinco compuestos nuevos en *Bonellia macrocarpa*, tres de ellos sin antecedentes previos en literatura. Además reafirma la presencia del bonediol en las raíces de la planta y su potencial biológico como uno de los metabolitos secundarios principales en el siqueté.

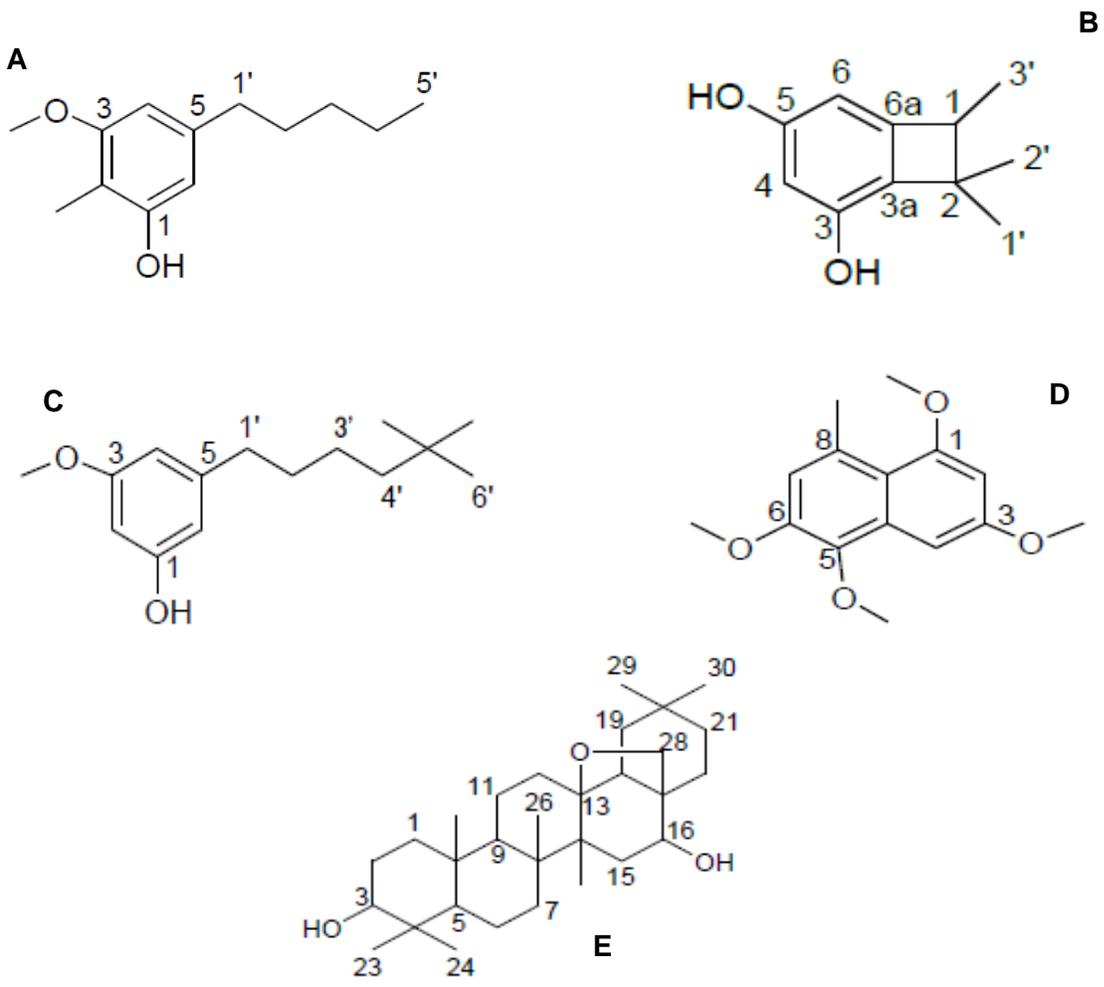


Figura 12. Compuestos aislados de *B. macrocarpa*. A) 3-metoxi-2-metil-5-pentil fenol; B) 3,5-dihidroxi-1-metil-2,2-dimetil-benzociclobutano; C) 3-metoxi-5-(5',5'-dimetilhexil) fenol; D) 1,3,5,6-tetrametoxi-8-metil-naftaleno; E) 3β, 16α-dihidroxi-protoprimulagenina A (Vila-Luna, 2016).

IV. OBJETIVOS

4.1. General

Analizar la diversidad de metabolitos secundarios de *Bonellia macrocarpa* y sus variaciones durante dos estaciones climáticas en la Selva Baja Caducifolia.

4.2. Específicos

- Describir las etapas fenológicas en árboles adultos de *Bonellia macrocarpa*.

Durante una estación seca y húmeda:

- Determinar la riqueza y abundancia órgano-específica y fenológica de los metabolitos secundarios.
- Evaluar el efecto de la estacionalidad en la variación de metabolitos secundarios en la planta.

V. HIPÓTESIS

Se conoce que los factores ambientales y el desarrollo fenológico influyen en las respuestas metabólicas secundarias, por ello se espera una variación de la riqueza y abundancia de los metabolitos secundarios en plantas de *Bonellia macrocarpa* a lo largo de dos estaciones climáticas de la Selva Baja Caducifolia.

VI. ZONA DE ESTUDIO

La unidad de Manejo para el Aprovechamiento Sustentable de la vida Silvestre (UMA) “San Joaquín” está ubicada en el rancho del mismo nombre en el municipio de Emiliano Zapata, Chiapas, México. El lugar se encuentra en la carretera Tuxtla Gutiérrez-La Angostura en el Km 29+000 (figura 13)

La recolecta se realizó en un sendero de 600 metros ubicado en un fragmento de Selva Baja Caducifolia semi-conservada a una altitud de 604 metros sobre el nivel del mar (**Inicio del sendero:** 16° 43' 15.95" N 92°51'43.93" W; **Final del sendero:** 16°34'1.90" N 92°51'54.10" W)

6.1. Clima e hidrografía

El clima es cálido subhúmedo con lluvias en verano, con una temperatura media anual de 26.2°C y una precipitación media anual de 900 a 1,500 mm. El territorio es irrigado fundamentalmente por el río Grijalva y sus afluentes: Nandachare, Alfaro y El Pochote (INAFED, 2010; CEIEG, 2019).

6.2. Flora y fauna

La vegetación corresponde a especies de la Selva Baja Caducifolia, siendo las más representativas Siqueté (*Bonellia macrocarpa*), nopal de cruz (*Acanthocereus tetragonus*) y cactáceas del género *Cephalocereus*. En cuanto a la fauna algunas especies que destacan son la víbora de cascabel (*Crotalus sp.*), cantil (*Agkistrodon bilineatus*), iguana (*Iguana iguana*) y la chachalaca (*Ortalis poliocephala*) (INAFED, 2010).

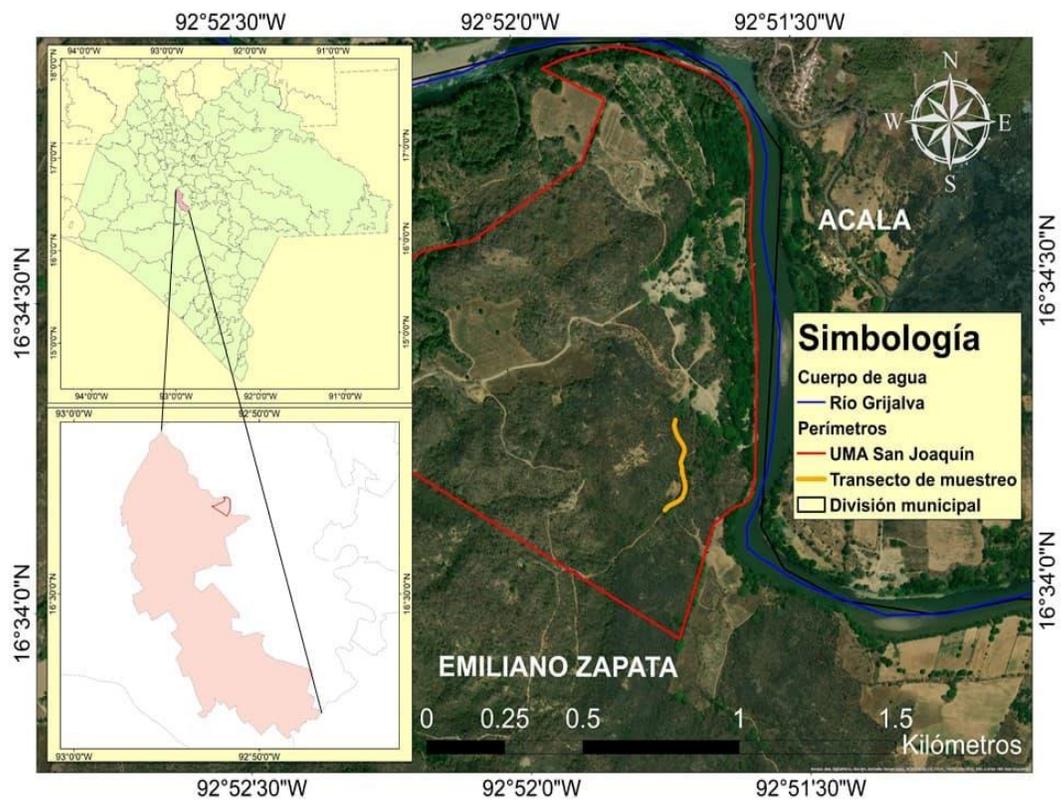


Figura 13. Área geográfica del municipio de Emiliano Zapata, Chiapas y ubicación de la UMA "San Joaquín" (Sánchez-Pablo, 2019).

VII. MÉTODO

7.1. Diseño

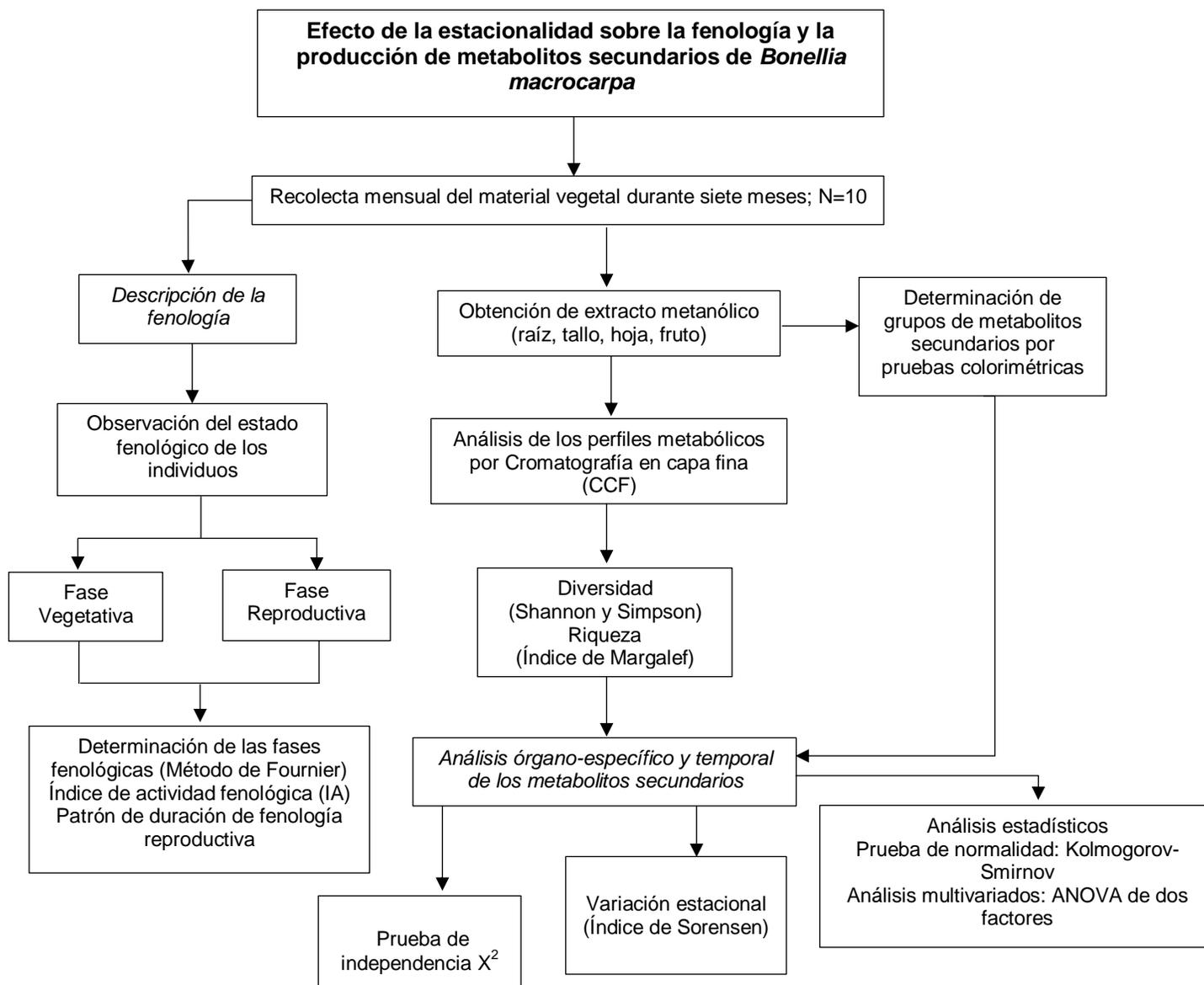


Figura 14. Esquema general del diseño del estudio

7.2. Recolecta del material vegetal

Se recolectaron las raíces, tallos, hojas y frutos de 10 individuos de *Bonellia macrocarpa* durante un periodo comprendido a partir julio del 2019 a febrero de 2020 en la UMA “San Joaquín”, en el municipio de Emiliano Zapata. También se recolectaron ejemplares de herbario para su procesamiento en el herbario “Eizi Matuda” ubicado en la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas para su registro.

Las estructuras vegetales fueron trasladadas al laboratorio de Fisiología y Química Vegetal del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas para dejarlas secar a luz y temperatura ambiente. Una vez secas se sometieron a un proceso de molienda utilizando una licuadora para obtener un polvo de textura fina que fue pesado y guardado en bolsas de papel estraza etiquetadas.

7.3. Caracterización de la fenología

Se realizaron observaciones mensuales de la fenología vegetativa y reproductiva durante un periodo comprendido de julio de 2019 a febrero de 2020. La fase vegetativa comprende tres fases: a) brotes foliares (correspondiente a la aparición de yemas foliares a hojas bien desarrolladas), b) hojas maduras (hojas bien desarrolladas) y c) senescencia/caducidad (ausencia de brotes foliares y hojas bien desarrolladas).

En la fase reproductiva se abarcaron dos fases de la floración: a) botón floral y b) flores abiertas, y dos de fructificación: a) desarrollo de frutos (que comprende desde la aparición del fruto hasta su máximo desarrollo) y b) permanencia de los frutos (frutos completamente desarrollados y aparentemente maduros). Las fases fenológicas se registraron mediante la escala de método modificado por Fournier (1974), con las siguientes categorías que indican el porcentaje de la copa que presenta la fase:

[0] Ausencia de la fase observada (0%)

[1] Una cuarta parte de la copa del árbol presenta la fenofase observada (25%)

[2] Mitad de la copa del árbol presenta la fenofase observada (50%)

[3] Tres cuartas partes de la copa del árbol presenta la fenofase observada (75%)

[4] El total de la copa del árbol presenta la fenofase observada (100%)

A partir de las escalas de fenología se determinó el índice de actividad fenológica (IA) por mes a partir de la siguiente fórmula:

$$IA = \frac{\sum \text{categorías fenológicas}}{(\text{total de categorías})(\text{número de individuos})} \times 100$$

También se determinó el tipo funcional de la fenología vegetativa de acuerdo a las categorías utilizadas por Rivera *et al.*, (2002) y Kushwaha y Singh (2015):

- Brevicaducifolio: cuatro meses de caída de hojas
- Caducifolio: más de cuatro meses caducos
- Semi-verde: menos de dos meses caducos.

El patrón de duración de la fenología reproductiva (floración y fructificación) se categorizó de acuerdo a las clases de amplitud y regularidad establecidas para la floración por Newstrom *et al.*, (1994):

- Floración y fructificación breve: < 1 mes
- Floración o fructificación intermedia: 1-5 meses
- Floración o fructificación extendida: > 5 meses

7.4. Variación de metabolitos secundarios

7.4.1. Obtención de los extractos

Se obtuvieron los extractos orgánicos de cada estructura vegetal de 10 ejemplares al macerar 2 g de material vegetal seco combinado de dos individuos diferentes (1 g por ejemplar) en 25 mL de metanol (MeOH) realizando tres repeticiones de ocho horas con el disolvente. Se eliminó el disolvente a presión reducida usando un rotaevaporador para obtener un extracto metanólico. Los extractos obtenidos se dejaron secar a temperatura ambiente en frascos limpios y pesados previamente.

7.4.2. Análisis colorimétrico y cromatográfico

7.5.2.1. Pruebas de identificación de metabolitos secundarios

Para la obtención de los perfiles de metabolitos secundarios se calculó el rendimiento de las del extracto metanólico de cada órgano vegetal. Después se realizaron las pruebas de identificación de grupos de metabolitos secundarios. Para ello se preparó una solución madre de cada muestra utilizando todo el extracto obtenido, esto se diluyó en cuatro veces la cantidad del extracto en mL del disolvente. Posteriormente se distribuyeron 20 µL las soluciones en 10 tubos de ensayo y se dejó evaporar el disolvente a temperatura ambiente. Así pues se realizaron las siguientes reacciones de identificación de grupos de metabolitos secundarios.

Alcaloides. Prueba con el reactivo de Dragendorff.

A un tubo de ensayo con 5 mg de extracto seco se le agregó 1 mL de HCl al 10% y dos gotas del reactivo de Dragendorff. Un precipitado marrón o anaranjado marrón indicó la presencia de este tipo de metabolito.

Fenoles. Prueba de Cloruro férrico.

A un tubo de ensayo con 5 mg de extracto seco se le añadió 1 mL de etanol absoluto, posteriormente se agregó tres gotas de FeCl₃ al 3% en etanol. La aparición de una coloración verdosa o azul verdosa indicó una reacción positiva.

Flavonoides. Prueba de Shinoda.

A un tubo de ensayo con 5 mg de extracto seco se le agregó 1 mL de etanol absoluto, posteriormente se le adicionaron dos pequeños trozos de magnesio y dos gotas de HCl concentrado. La presencia de una coloración naranja fue positiva para flavonas, roja-flavona, rojo azulado-flavonol y violeta xantinas.

Saponinas. Prueba de la espuma.

A un tubo de ensayo con 5 mg de extracto seco se le agregó 1 mL de agua destilada, posteriormente se tapó y se agitó durante 30 segundos. La aparición de espuma que permanece durante 2 minutos indicó una reacción positiva.

Taninos. Prueba de taninos hidrolizables y condensados.

A un tubo de ensayo con 5 mg de extracto seco se le añadió dos gotas de solución acuosa de FeCl₃ al 2%. La prueba es positiva para taninos hidrolizables si hay la presencia de color azul y si el color es verde es positiva para taninos condensados.

Terpenos-Esteroides. Prueba de Liebermann-Buchard.

A un tubo de ensayo con 5 mg de extracto seco se le agregó 1 mL de cloroformo más 1 mL de reactivo de Liebermann-Buchard. Si la prueba presenta una coloración azul o azul verde indico positiva para esteroides y rojo, rosa o violeta para terpenos.

Sapogeninas. Prueba de Rosenthaler.

A un tubo de ensayo con 5 mg de extracto seco se le añadió una o dos gotas de vainillina al 1% en etanol y una o dos gotas de HCl concentrado o una o dos gotas de H₂SO₄ concentrado. Las sapogeninas de triterpenos pentacíclicos dan un color violeta y los esteroides no reaccionan o dan un color verdoso cuando en el tubo de ensayo se añaden una o dos gotas del compuesto.

Cabe destacar que la intensidad de las reacciones colorimétricas se midió en una escala de porcentaje del 0% al 100% dividida en cuatro fases, donde el 0% indica que no hay reacción, 25% una intensidad baja, 50% una intensidad intermedia, 75% una intensidad alta y el 100% una intensidad muy alta. Las frecuencias con las que se presentaron en cada uno de los tejidos se registraron en histogramas, donde se visualiza el mes de recolecta y el metabolito secundario analizado.

7.5.2.2. Análisis de los extractos por Cromatografía en Capa Fina (CCF)

Los perfiles de los extractos fueron obtenidos en CCF (5 x 9 cm) utilizando como fase estacionaria placas de sílica gel GF50 (partículas de 5 µm) con indicador de fluorescencia, y como fase móvil una mezcla de cloroformo: metanol en proporción 6:4, se aplicó 4 µL de los extractos disueltos a 0.01 mg.µL⁻¹. La visualización se realizó con luz UV a 254 y 365 nm y se reveló con una solución de sulfato cérico. Se calculó la distancia recorrida o factor de retención (Rf) con respecto a la distancia recorrida por la fase móvil. El área que ocupó cada uno de los compuestos en la cromatografía fue calculada mediante el software de dominio público ImageJ, esta área se consideró como la abundancia de los compuestos en cada muestra correspondiente.

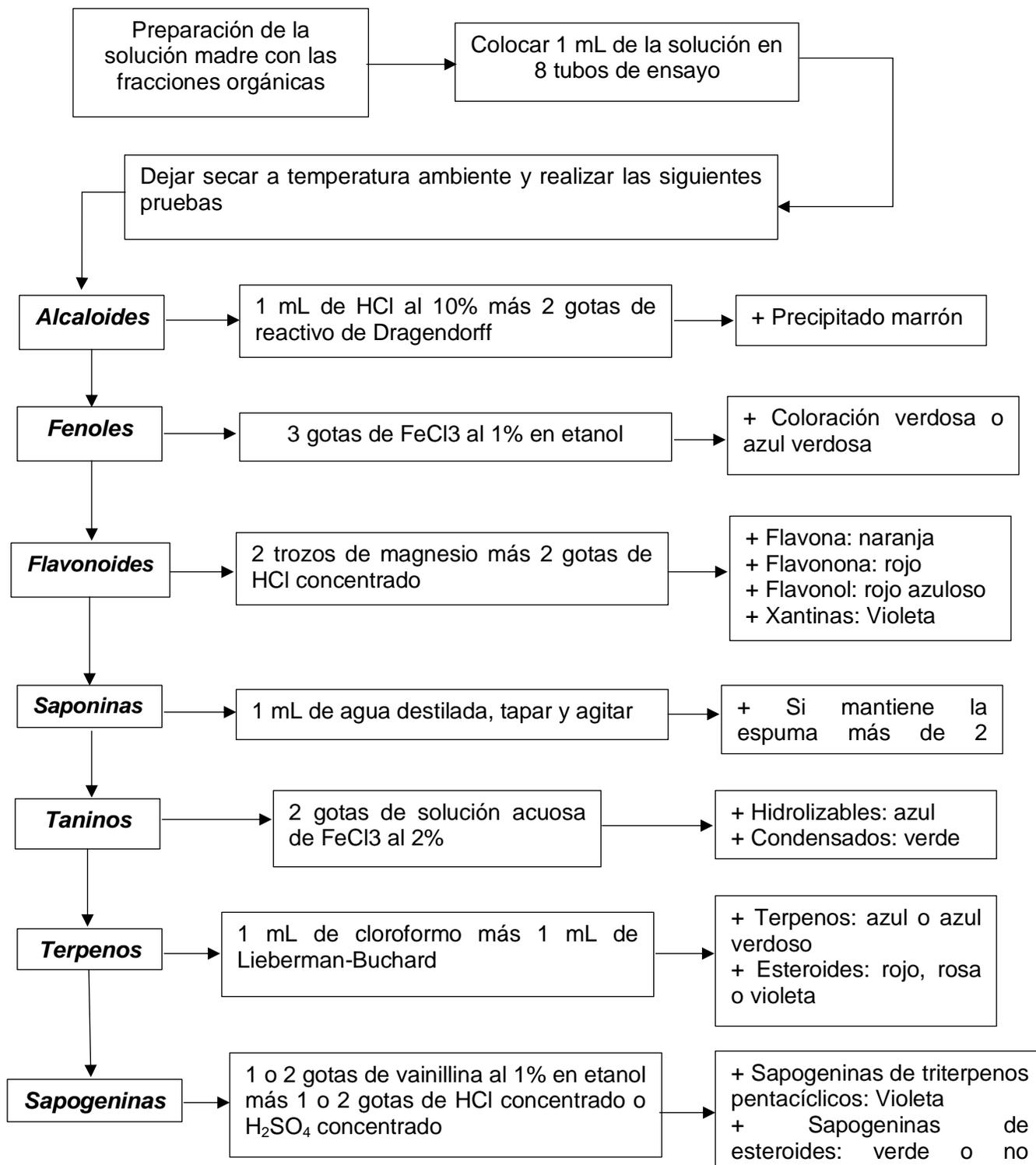


Figura 15. Pruebas colorimétricas de identificación de grupos de metabolitos secundarios

7.5. Análisis estadístico

Se calculó el rendimiento de los extractos metanólicos de cada uno de los tejidos analizados, así como su variación estacional entre las temporadas climáticas. Para ello se aplicó una prueba ANOVA y mediante una prueba Post-Hock de Tukey se determinó los meses en donde se encontraron diferencias significativas. Esto se analizó en el programa R-Studio versión 1.1.463 (versión de prueba).

Para determinar si existieron diferencias significativas en la producción de metabolitos por cada temporada de recolecta se realizó una prueba de Chi cuadrada de Pearson (χ^2). El análisis se llevó a cabo en el programa estadístico gratuito PAST versión 3.24.

Obtenidos los cromatogramas se calcularon los índices de Shannon, Simpson y Margaleff para señalar la diversidad y la riqueza fitoquímica de los compuestos. Se realizaron modificaciones a las fórmulas de estos índices, de modo que se consideró a los compuestos como especies y el número compuestos como el número de individuos. Además se estimó la variación estacional entre las temporadas de recolecta mediante una prueba de Kruskal-Wallis. Todo esto fue analizado con el programa R-Studio. Para observar la similitud de los metabolitos secundarios entre los meses de recolecta se calculó el índice de Sorensen cuantitativo. Finalmente, con los datos de riqueza y diversidad de compuestos ya obtenidos se realizó un análisis multivariado (ANOVA de dos factores) para observar la influencia de los factores medioambientales en los índices estimados.

VIII. RESULTADOS

8.1. Caracterización fenológica de *Bonellia macrocarpa*

Se monitorearon seis etapas fenológicas, dos vegetativas y cuatro reproductivas, encontrándose un patrón fenológico foliar constante sin senescencia y un periodo reproductivo de corta duración, con una fructificación breve que se presenta en la temporada de lluvias y el comienzo de la floración en la temporada de estiaje.

8.1.1. Fenología vegetativa

Los brotes foliares tuvieron poca presencia en la planta con duración corta en agosto y febrero, sin embargo se contabilizaron algunos ejemplares con brotes en este último mes, algunos de ellos con casi el 75% de la copa ocupada por esta fenofase presentando un índice de actividad fenológica por debajo del 15% (figura 16). Las hojas completamente desarrolladas se registraron durante las dos temporadas climáticas, todas con una ocupación del 100% de la copa del árbol y sin alguna señal de senescencia o decaimiento de las hojas, siendo esta fenofase la más constante y larga (figura 17 A). Con respecto al tipo de fenología vegetativa funcional, la fenofase vegetativa no corresponde a ningún tipo funcional, ya que no se registró ningún mes con caducidad de las hojas manteniéndose *siempre verde* en ambas estaciones climáticas.

8.1.2. Fenología reproductiva

El patrón de duración de las fenofases reproductivas es intermedio, ya que presentó cuatro meses de duración. El comienzo de la floración se presentó durante la temporada de estiaje, especialmente en enero y febrero (figura 17 B-C). Se registraron pocos ejemplares con botones florales en febrero teniendo una ocupación baja de la copa, mientras que la aparición de las flores abiertas estuvo más presente en este periodo con plantas que registraron una ocupación del 50% de la copa. El índice de actividad fenológica se mantuvo por debajo del 5% en ambas fenofases, siendo ligeramente mayor en las flores maduras (figura 16).

La fructificación tuvo una permanencia de cuatro meses (agosto-enero) estando más presente durante la temporada de lluvias y disminuyendo al cambio de temporada climática. Los frutos inmaduros fueron más abundantes durante agosto y septiembre con una ocupación de la copa de entre 50% y 75%, en este último mes el índice de actividad fenológica alcanzó el 62.5% siendo el más alto para todos los tejidos. Por otra parte, se registró más presencia de frutos maduros en noviembre con varios ejemplares que registraron una total presencia en la planta (figura 30 D-E). En esta fenofase también se reportó un índice de actividad fenológica de más del 50%. Para enero la frecuencia de plantas con frutos maduros disminuyó considerablemente hasta desaparecer por completo en febrero (figura 16).

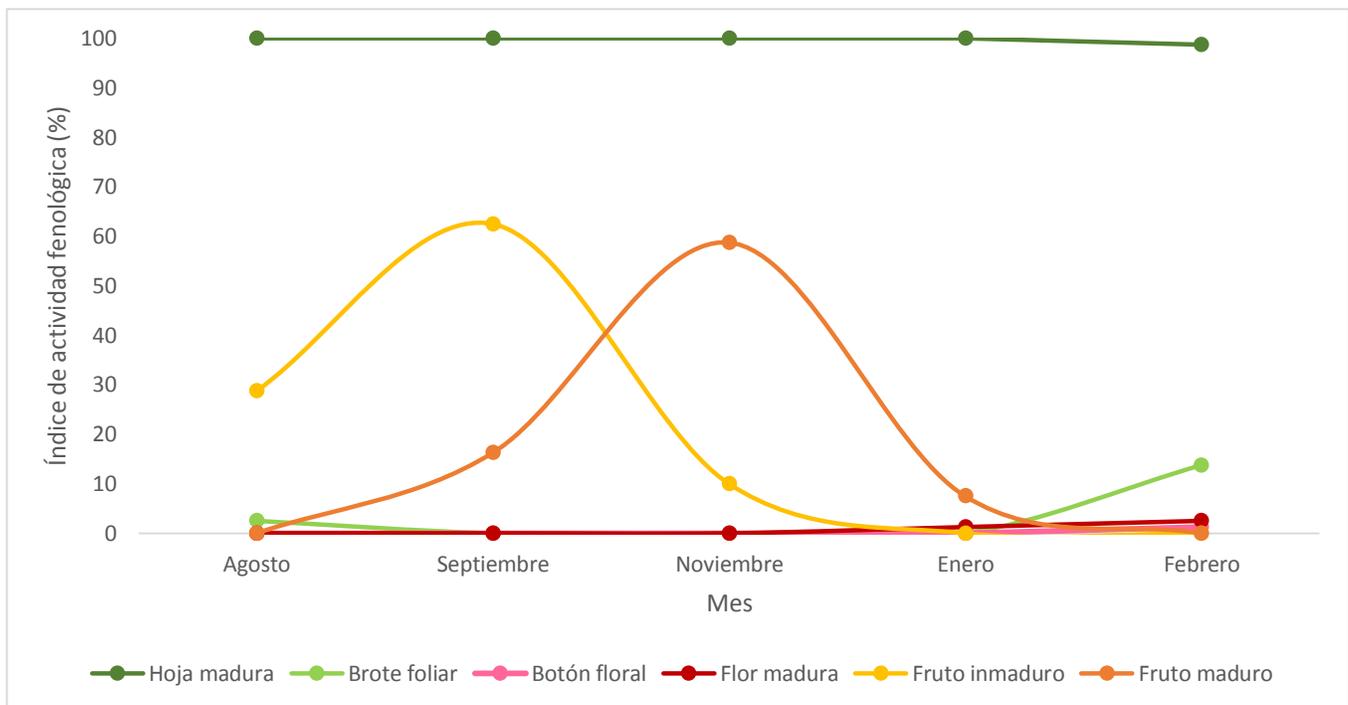


Figura 16. Índice de actividad fenológica para la fase reproductiva (floración y fructificación) y fase vegetativa (hoja madura y brote foliar) de *Bonellia macrocarpa*. Los valores fueron obtenidos de acuerdo a las escalas del método de Fournier (1974).



Figura 17. Fenología de *Bonellia macrocarpa*. A) Fase vegetativa; B-E) Fase reproductiva desde la floración hasta la aparición y maduración de los frutos. Imágenes: Sánchez-Pablo, R. C. (2019-2020)

8.2. Rendimientos de extractos metanólicos.

Los extractos metanólicos de tallos fueron los únicos que presentaron diferencias entre los tiempos de recolecta ($P < 0.05$) (cuadro 2). Al hacer un análisis de comparaciones múltiples las diferencias se detectaron en los meses de la temporada de estiaje, específicamente en noviembre, enero y febrero.

Cuadro 2. Rendimiento mensual (g) de extractos metanólicos de *Bonellia macrocarpa*.

	Mes	Raíz	Tallo	Hoja	Fruto
<i>Lluvia</i>	Jul	0.34±0.43	0.13±0.02	0.31±0.28	0.47±0.05
	Ago	0.14±0.02	0.11±0.04	0.19±0.09	0.34±0.09
	Sep	0.16±0.03	0.11±0.02	0.23±0.13	0.22±0.09
<i>Sequía</i>	Nov	0.13±0.12	0.09±0.01	0.11±0.02	0.44±0.00
	Dic	0.11±0.07	0.13±0.02	0.16±0.03	0.40±0.08
	Ene	0.13±0.04	0.14±0.01	0.20±0.03	0.36±0.23
	Feb	0.22±0.07	0.16±0.03	0.23±0.07	
	P	0.06	0.04	0.08	0.17

Análisis estadístico: Kruskal Wallis

En hojas el mayor rendimiento se encontró en julio (0.31) casi tres veces más que en noviembre cuando fue menor (0.11). Además, se registró una mayor cantidad de extracto en la temporada de lluvias (julio, agosto y septiembre) con respecto a los meses de sequía (noviembre, diciembre, enero y febrero). En los tallos, la mayor producción de extracto se registró en febrero (0.16) en contraste con noviembre (0.9). Las diferencias entre estos meses no son tan marcadas como en las hojas sin embargo, en promedio hubo un ligero aumento a partir de la temporada seca (noviembre-febrero).

Los extractos metanólicos de raíces fueron muy abundantes en la temporada de lluvias, específicamente en julio (0.34) cuando se presentó el rendimiento más alto. Para la temporada de estiaje en diciembre (0.11) se obtuvo la menor cantidad de extracto con solo la tercera parte del rendimiento más alto. Cabe destacar que,

durante la temporada seca, en febrero, hay un aumento considerable en los extractos de este tejido (0.22). Finalmente, en los frutos se obtuvieron los mayores rendimientos de todos los tejidos, aumentando considerablemente en julio (0.47); en septiembre (0.22) se produjo casi la mitad del rendimiento más alto, correspondiendo ambos meses a la temporada de lluvias. No obstante, es en la temporada de secas en donde se obtuvo una mayor cantidad de extractos en general. Es preciso señalar que en febrero no se obtuvo este tejido.

8.3. Identificación de grupos de Metabolitos secundarios (MS) y variación estacional

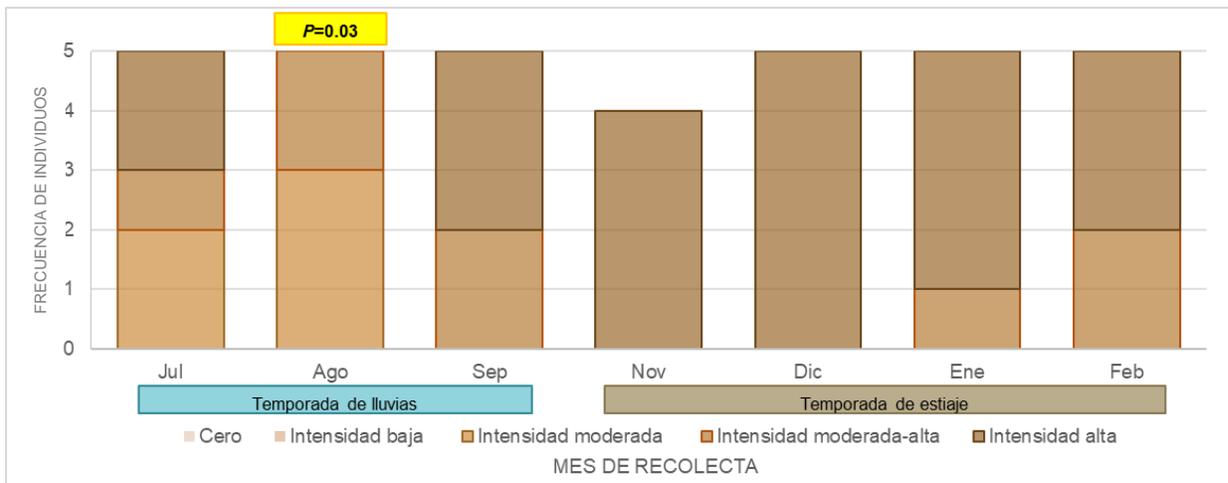
Se identificaron los grupos de metabolitos secundarios presentes en los extractos de *B. macrocarpa* mediante siete pruebas de coloración y precipitación, y se detectaron seis grupos: fenoles, esteroides, flavonoides, saponinas, sapogeninas y taninos de tipo condensado, y se observaron variaciones en el porcentaje de intensidad entre estructuras botánicas y entre meses de colecta. Cabe destacar que en ningún órgano se encontró la presencia de alcaloides.

8.3.1. Fenoles

Este grupo de metabolitos secundarios destacó en la planta con intensidades altas en tallos (figura 18). Este tejido fue el más sobresaliente en todos los meses de colecta siendo durante la temporada de estiaje (noviembre-febrero) cuando se presentó una intensidad más alta, destacando noviembre y diciembre, sin embargo se presentan diferencias en la temporada de recolecta (figura 18 A) específicamente en agosto ($P < 0.05$) cuando se encuentra una frecuencia notable con intensidades moderadas. En las hojas, en diciembre también se observaron intensidades altas de este grupo de metabolitos secundarios, manteniéndose en intensidades moderadas en los meses secos, pero se presentaron diferencias significativas en el periodo de lluvias, específicamente en julio y agosto cuando se registraron intensidades bajas ($P < 0.05$) (figura 18 B). En las raíces, agosto, enero y febrero son los meses cuando se reportaron intensidades moderadas-altas y altas, destacando enero con mayores frecuencias, al contrario de noviembre con una alta frecuencia de intensidad baja.

También se encontraron diferencias entre temporadas climáticas ($P < 0.05$), con énfasis en la estación seca (figura 19 C). En los frutos se mantuvo una intensidad muy similar en ambas estaciones, destacándose septiembre con una alta intensidad en este tejido. Sin embargo, a pesar de encontrar diferencias significativas en el periodo de recolecta ($P = 0.05$), no es posible identificar los meses en donde se presentan estas discrepancias.

A



B

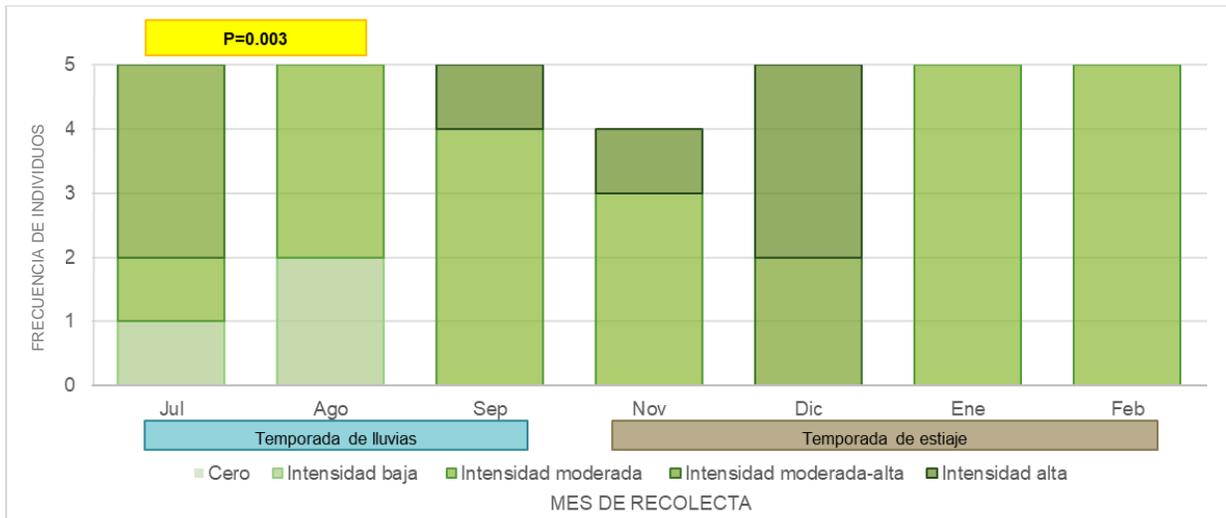
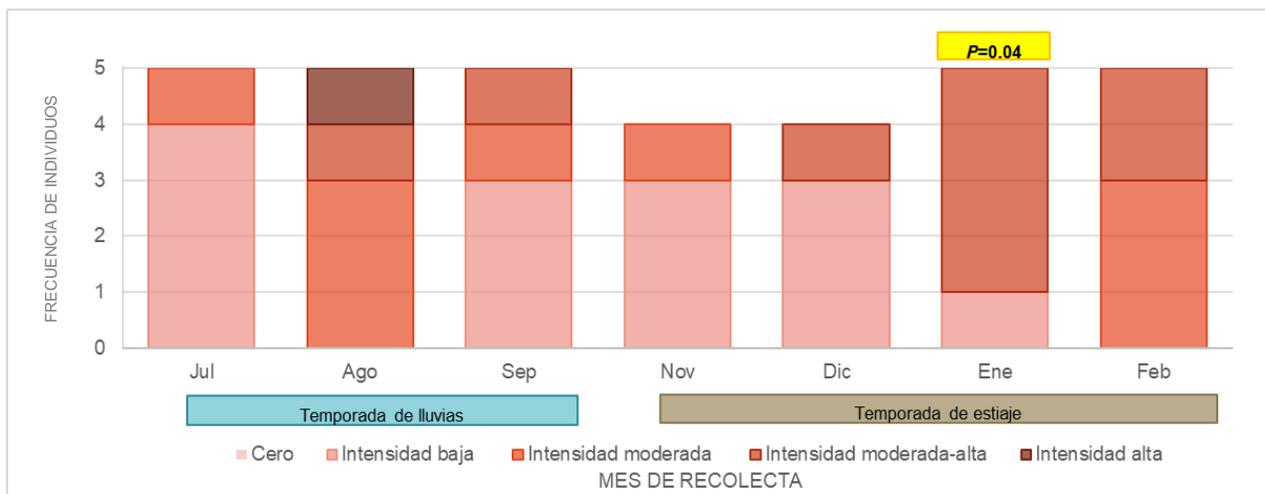


Figura 18. Intensidad de fenoles en tallos (A) y hojas (B) de *Bonellia macrocarpa*. Se indica la frecuencia de los extractos provenientes de cinco individuos diferentes. Así mismo se señalan los meses donde se encontraron diferencias estadísticamente significativas (valor de $P < 0.05$)

C



D

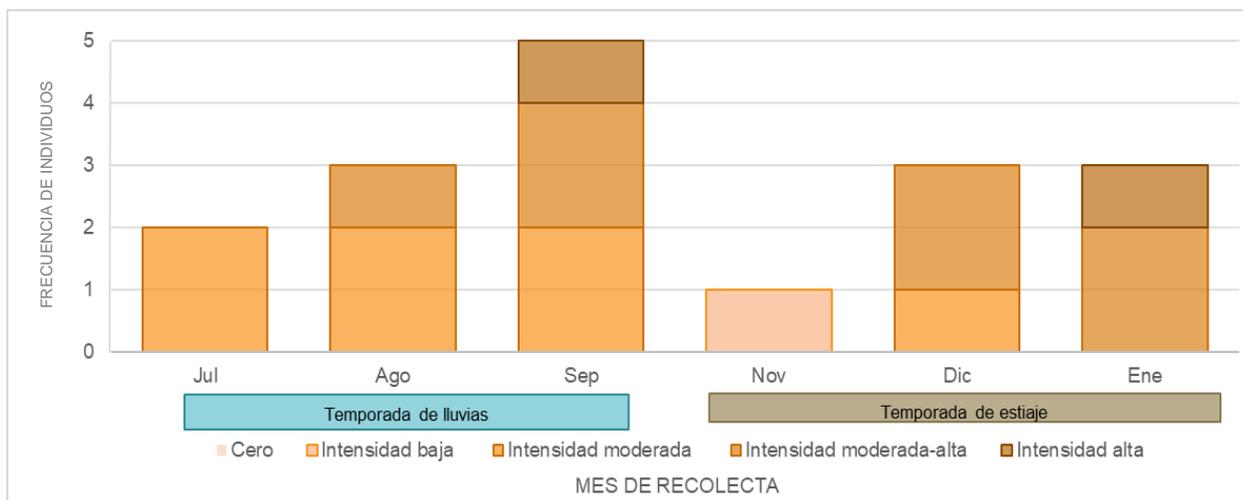


Figura 19. Intensidad de fenoles en (C) y frutos (D) de *Bonellia macrocarpa*. Se indica la frecuencia de los extractos provenientes de cinco individuos diferentes. Así mismo se señalan los meses donde se encontraron diferencias estadísticamente significativas (valor de $P < 0.05$)

8.3.2. Esteroides

La intensidad de esteroides en cada tejido fue bastante baja en la planta en comparación con otros grupos de metabolitos secundarios (Figura 20, Figura 21). En las hojas y los tallos se reportaron intensidades moderadas y moderadas-altas en la temporada seca; en el primer tejido los meses más notables fueron noviembre, enero y febrero, que contaron con las mayores frecuencias de intensidades moderadas, mientras que en los tallos es en enero y febrero cuando se presentaron resultados representativos, estando ausente este metabolito en casi toda la temporada de recolecta. En este mismo tejido se reportó diferencias significativas entre las temporadas climáticas con énfasis en la estación seca ($P < 0.01$) (Figura 21 A). En las raíces toda la temporada de recolecta se observó una intensidad baja, sin embargo en septiembre y noviembre se registran las mayores frecuencias de esta intensidad, contrastando ligeramente en diciembre. Pero de manera general la presencia de este metabolito es similar en las dos estaciones climáticas. Finalmente en los frutos la producción de esteroides es ligeramente mayor durante la temporada de lluvias (julio-septiembre), siendo en septiembre cuando se presentó la mayor variación en las frecuencias en este tejido con intensidades bajas y moderadas.

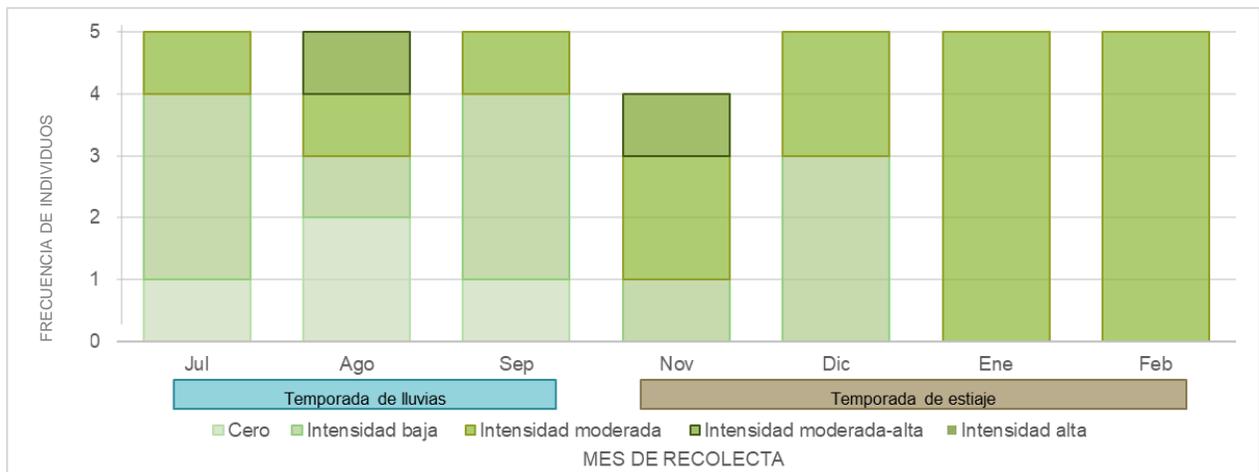


Figura 20. Intensidad de esteroides en hojas de *Bonellia macrocarpa*. Se indica la frecuencia de los extractos provenientes de cinco individuos diferentes.

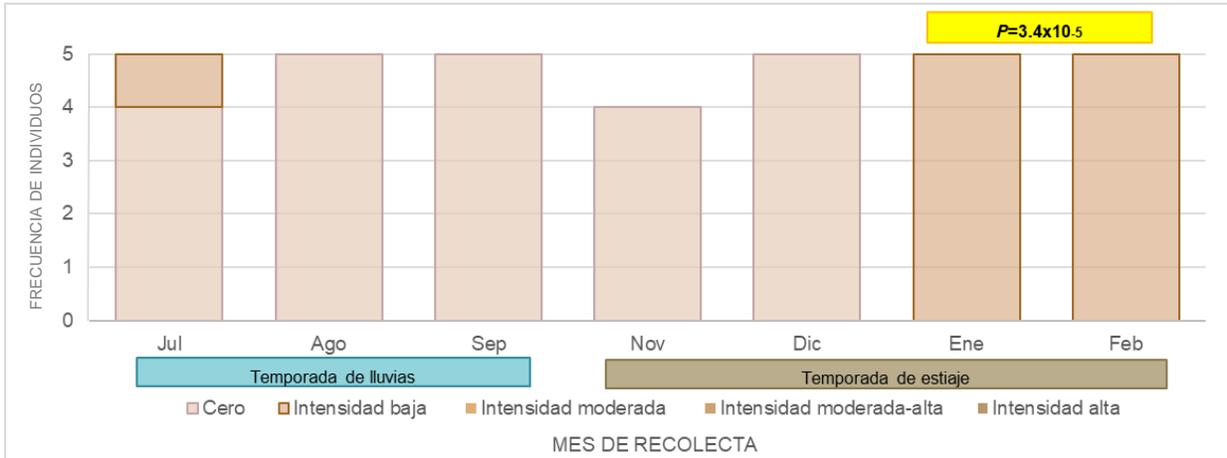
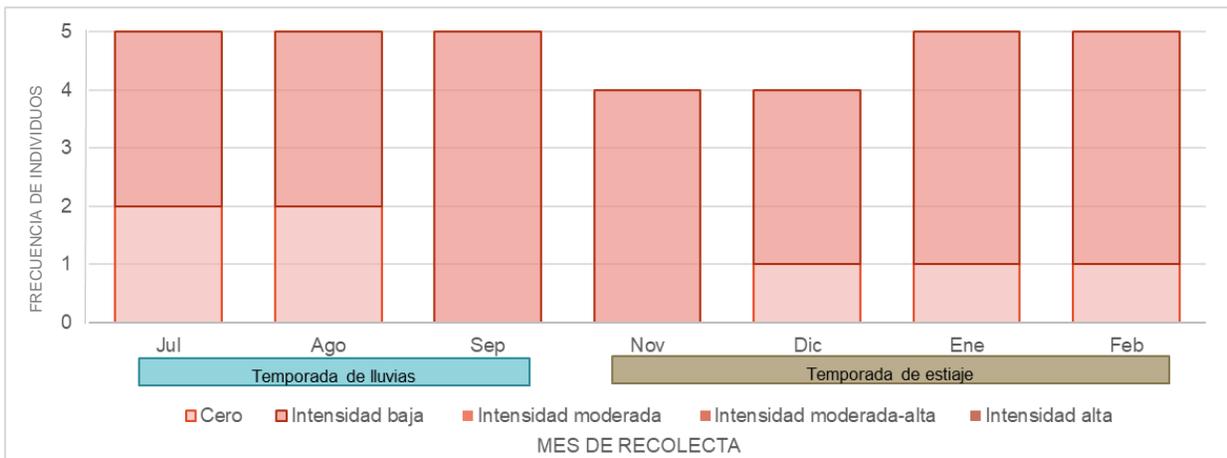
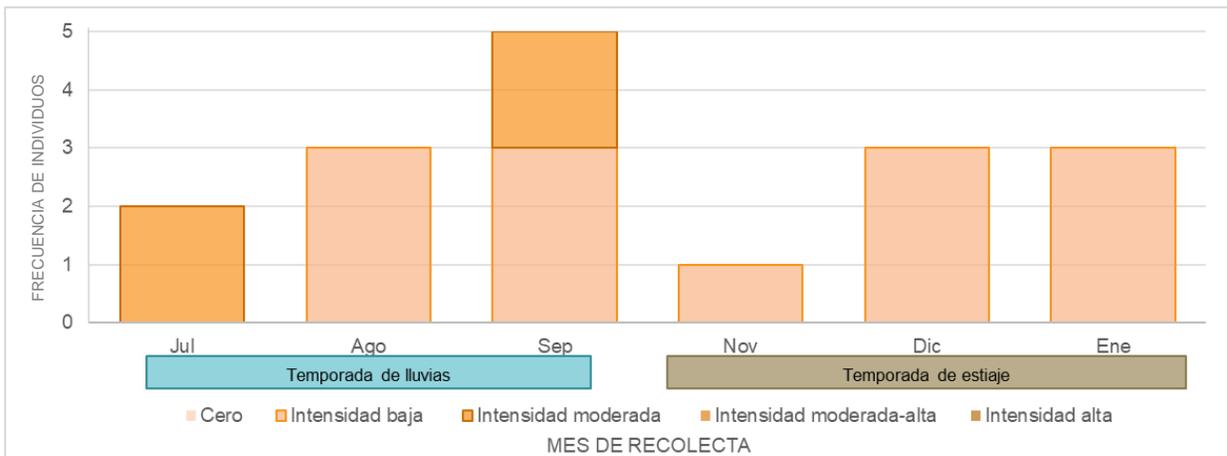
A**B****C**

Figura 21. Intensidad de esteroides en tallos (A), raíces (B) y frutos (C) de *Bonellia macrocarpa*. Se indica la frecuencia de los extractos provenientes de cinco individuos diferentes. Así mismo se señalan los meses donde se encontraron diferencias estadísticamente significativas (valor de $P < 0.05$).

8.3.3. Flavonoides

Los flavonoides estuvieron presentes en casi todos los tejidos de la planta con excepción de las hojas, ya que no hubo resultados positivos en la prueba de identificación. En los tallos, el mes donde se registró una frecuencia elevada de intensidades moderadas fue diciembre, pero durante toda la temporada de recolecta la producción de este metabolito fue bastante similar con una abundancia en intensidades bajas. Esto mismo se reportó en las raíces, con una intensidad moderada en diciembre e intensidades bajas en el resto de la recolecta. Sin embargo, en este tejido se encontraron diferencias en la temporada de sequía ($P<0.05$) (Figura 23 A). Por otra parte en los frutos se obtuvo la intensidad más alta y las variaciones más significativas ($P<0.05$) en la temporada de lluvias, siendo agosto el mes más representativo con intensidades moderadas (Figura 23 B).

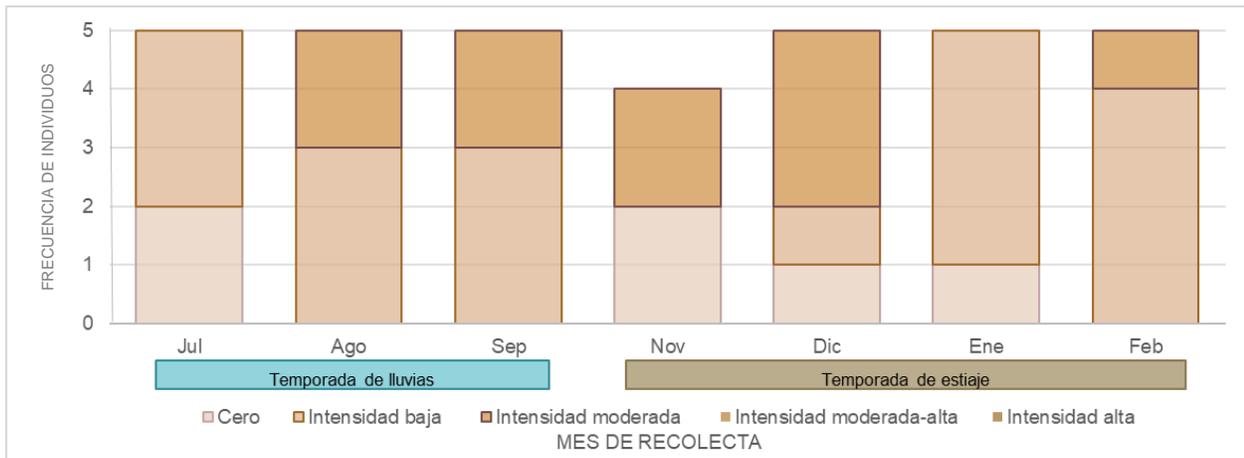


Figura 22. Intensidad flavonoides en tallos *Bonellia macrocarpa*. Se indica la frecuencia de los extractos provenientes de cinco individuos diferentes.

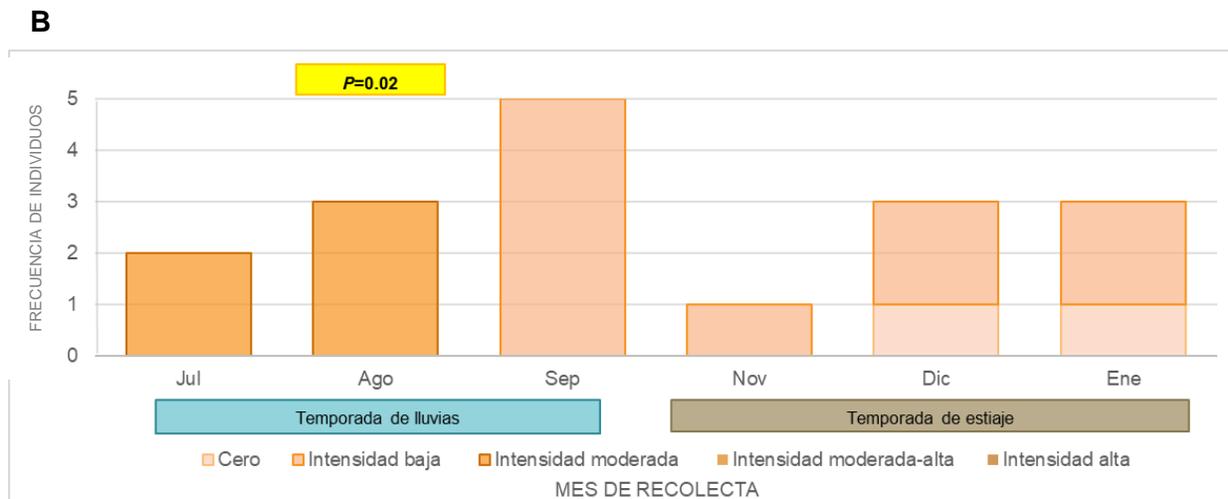
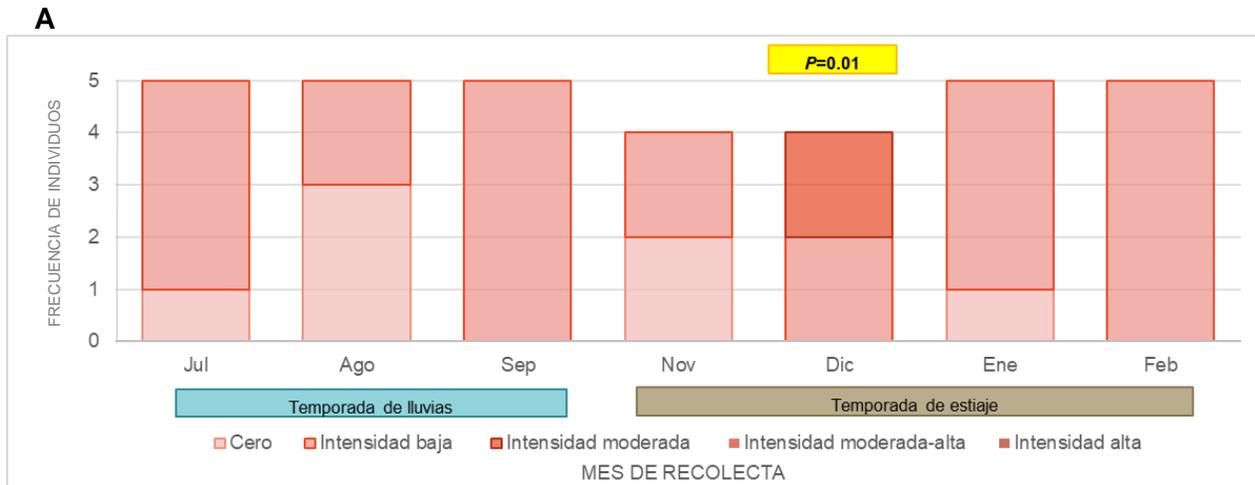


Figura 23. Intensidad de flavonoides en raíces (A) y frutos (B) de *Bonellia macrocarpa*. Se indica la frecuencia de los extractos provenientes de cinco individuos diferentes. Así mismo se señalan los meses donde se encontraron diferencias estadísticamente significativas (valor de $P < 0.05$).

8.3.4. Saponinas

El tejido que presentó mayor frecuencia en la intensidad moderada-alta y alta es la raíz, siendo la temporada de lluvias el periodo más representativo (figura 24 A), destacando septiembre y contrastando ligeramente en enero, aunque la frecuencia es similar. En los tallos, en agosto se alcanzó la mayor frecuencia de la intensidad moderada-alta, a diferencia de la producción de noviembre que solo mantuvo una intensidad baja (figura 24 B), cabe señalar que se encontró una diferencia significativa en entre los meses de recolecta ($P < 0.05$). Por otra parte, en los frutos,

en julio y agosto se registró la intensidad moderada-alta pero con una baja frecuencia, observándose que en la temporada seca solo se indicó frecuencia en intensidades bajas. Finalmente, en las hojas se presentó frecuencias para la intensidad moderada-alta y alta en julio, agosto y septiembre, sin embargo hay una variación considerable entre temporadas climáticas, siendo los meses de lluvias los que reportó esta discrepancia ($P < 0.05$) (Figura 25).

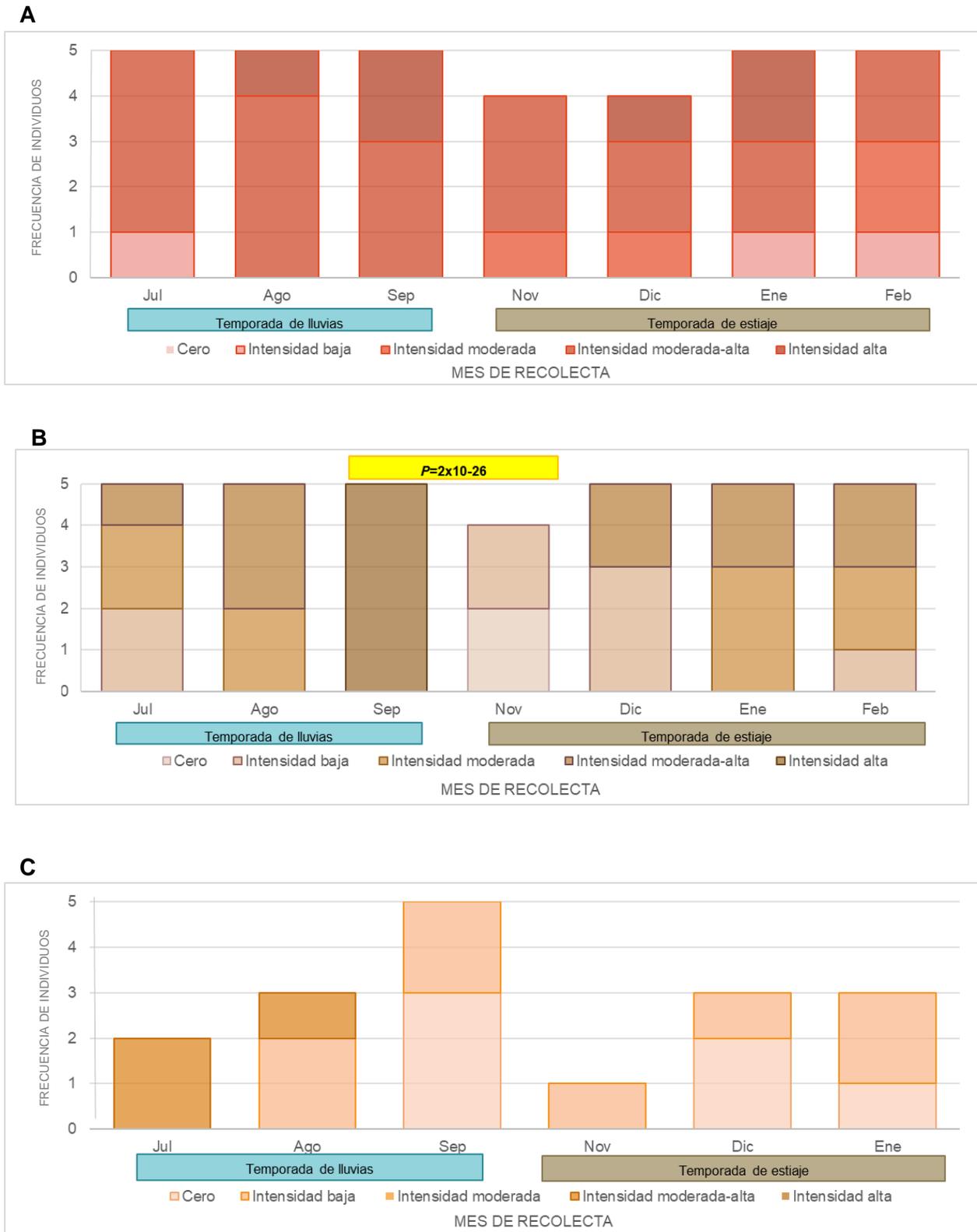


Figura 24. Intensidad de saponinas en raíces (A), tallos (B) y frutos (C) de *Bonellia macrocarpa*. Se indica la frecuencia de los extractos provenientes de cinco individuos diferentes. Así mismo se señalan los meses donde se encontraron diferencias estadísticamente significativas (valor de $P < 0.05$).

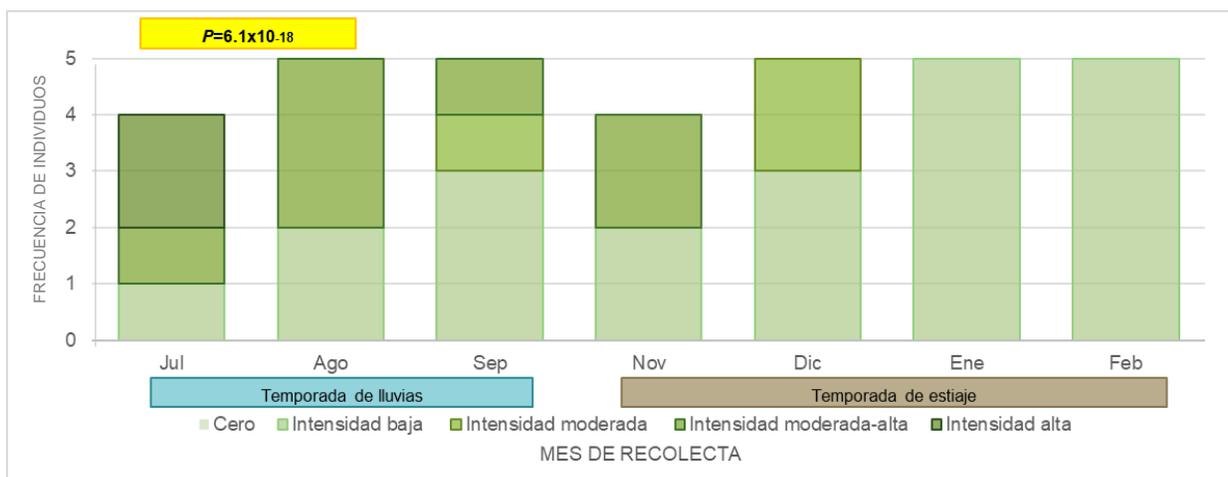


Figura 25. Intensidad de saponinas en hojas de *Bonellia macrocarpa*. Se indica la frecuencia de los extractos provenientes de cinco individuos diferentes. Así mismo se señalan los meses donde se encontraron diferencias estadísticamente significativas (valor de $P < 0.05$).

8.3.5. Sapogeninas

En este grupo de metabolitos secundarios casi toda la temporada de recolecta se alcanzó una intensidad alta para todos los tejidos, con excepción de julio y agosto cuando hubo notables diferencias en todos los tejidos (figura 26 y 27). En las hojas se reportó la intensidad moderada-alta con una frecuencia notable, en los tallos fue frecuente la intensidad moderada. Para las raíces se registró una intensidad moderada y moderada-alta, pero no con frecuencias elevadas. Y en los frutos solo se presentó una intensidad moderada en ese periodo, siendo está la intensidad menos sobresaliente en el resto de la recolecta de la temporada.

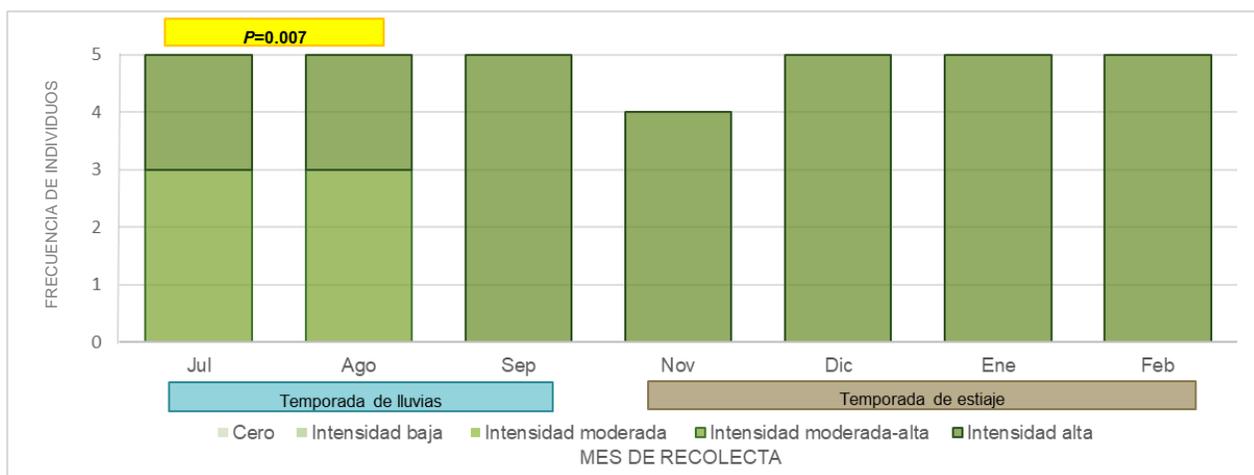


Figura 26. Intensidad de sapogeninas en hojas de *Bonellia macrocarpa*. Se indica la frecuencia de los extractos provenientes de cinco individuos diferentes. Así mismo se señalan los meses donde se encontraron diferencias estadísticamente significativas (valor de $P < 0.05$).

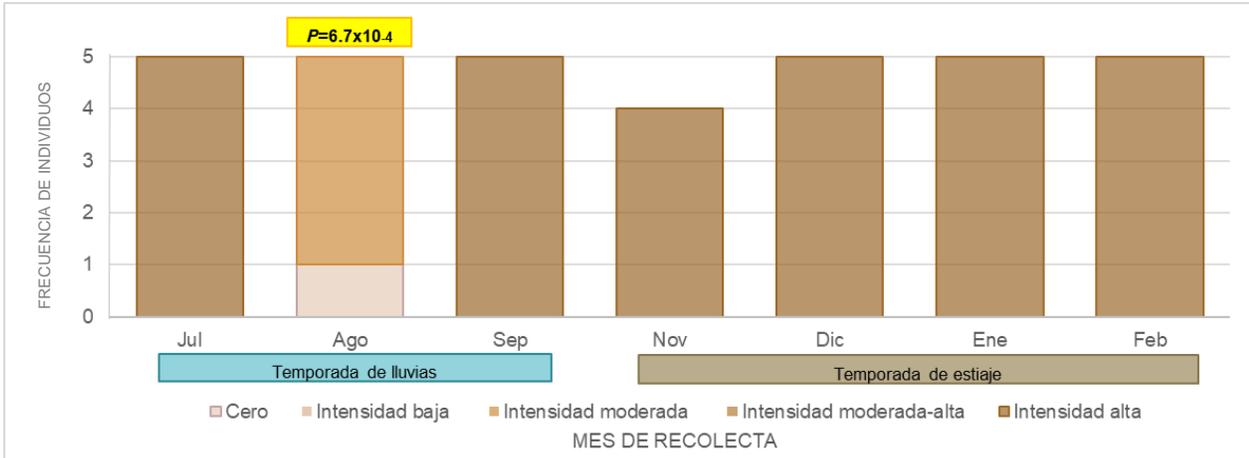
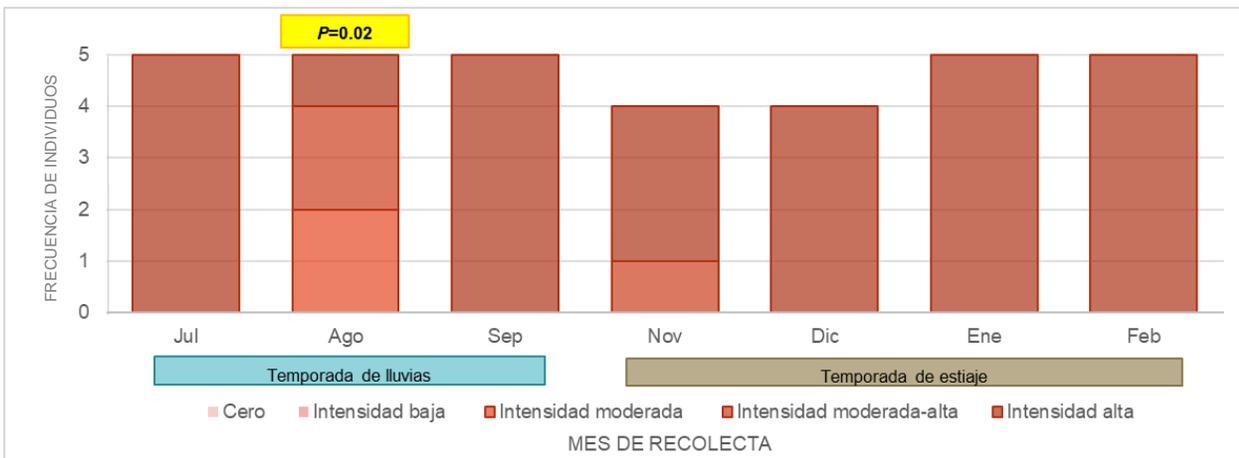
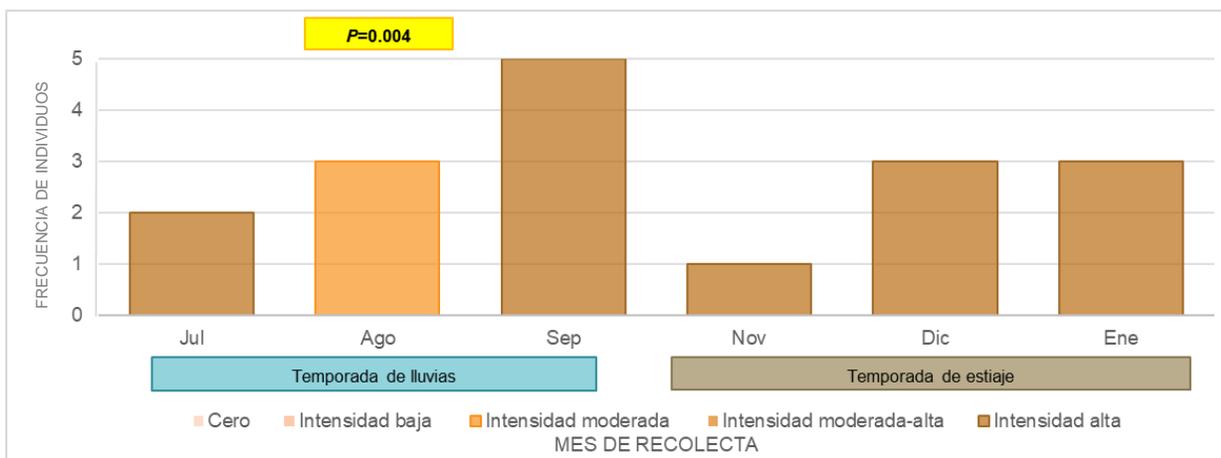
A**B****C**

Figura 27. Intensidad de sapogeninas en tallos (A), raíces (B) y frutos (C) de *Bonellia macrocarpa*. Se indica la frecuencia de los extractos provenientes de cinco individuos diferentes. Así mismo se señalan los meses donde se encontraron diferencias estadísticamente significativas (valor de $P < 0.05$).

8.3.6. Taninos

Los taninos de tipo condensado tuvieron una presencia importante en casi todos los tejidos de la planta. En las hojas, en ambas estaciones climáticas hubo una intensidad moderada, siendo agosto y enero los meses más representativos con frecuencias altas (Figura 28). De la misma forma en los tallos, es en agosto cuando se observó una mayor frecuencia de la intensidad moderada-alta y alta, contrastando con noviembre cuando se registraron intensidades bajas y moderadas. En los frutos se reportó una intensidad alta en la temporada de lluvias, destacándose las frecuencias de agosto y septiembre, aun así la presencia de este metabolito en el periodo seco fue similar, cuando se observaron intensidades y frecuencias parecidas en diciembre y enero. Además, en las raíces se registraron frecuencias para la intensidad alta en agosto y diciembre, siendo el mes de noviembre cuando se obtuvo la intensidad más baja. Cabe señalar que es en la temporada de sequía cuando se obtiene una variación significativa en la producción de este metabolito ($P < 0.05$) (Figura 29 C).

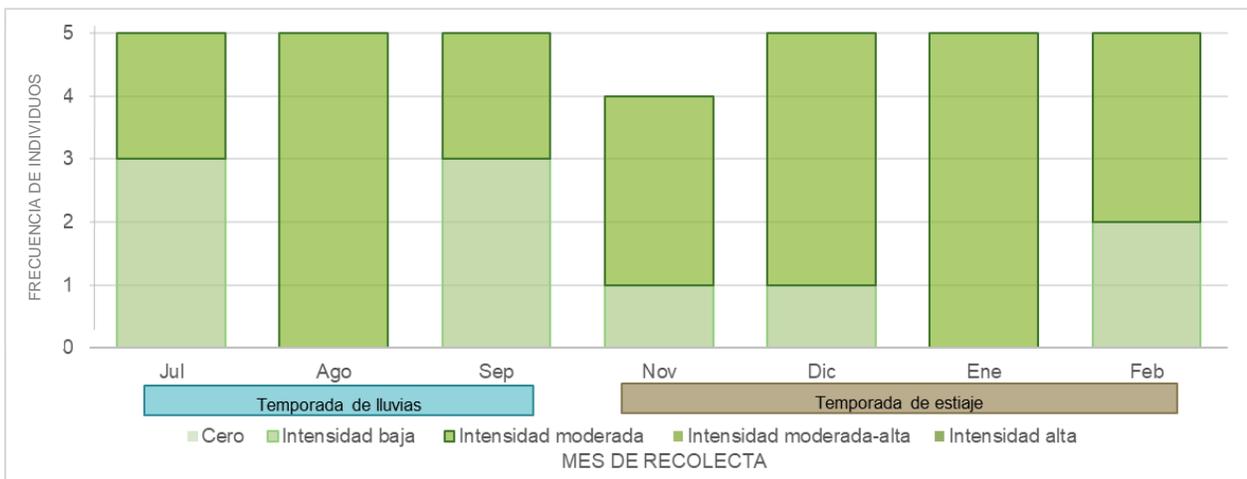


Figura 28. Intensidad de taninos en hojas de *Bonellia macrocarpa*. Se indica la frecuencia de los extractos provenientes de cinco individuos diferentes.

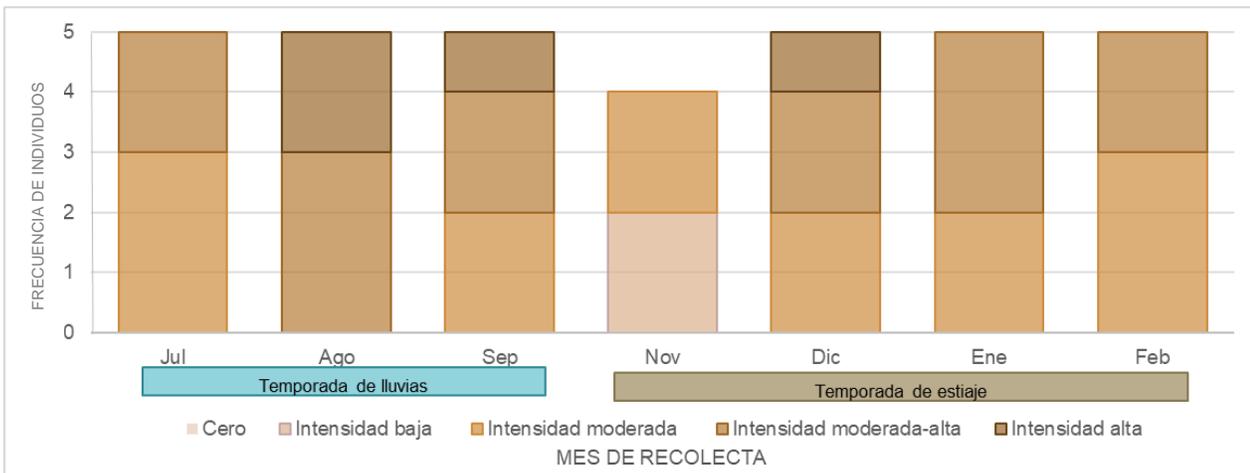
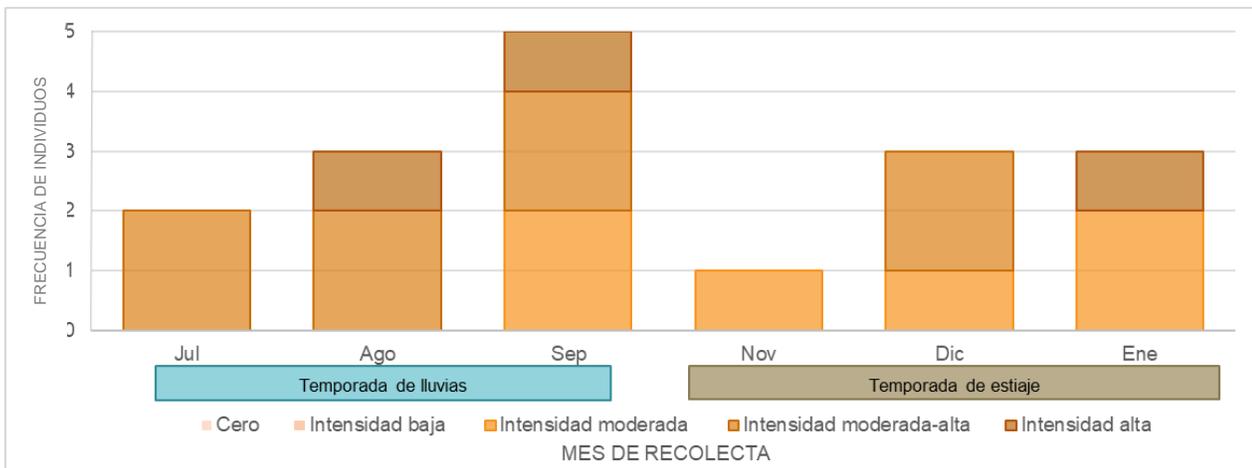
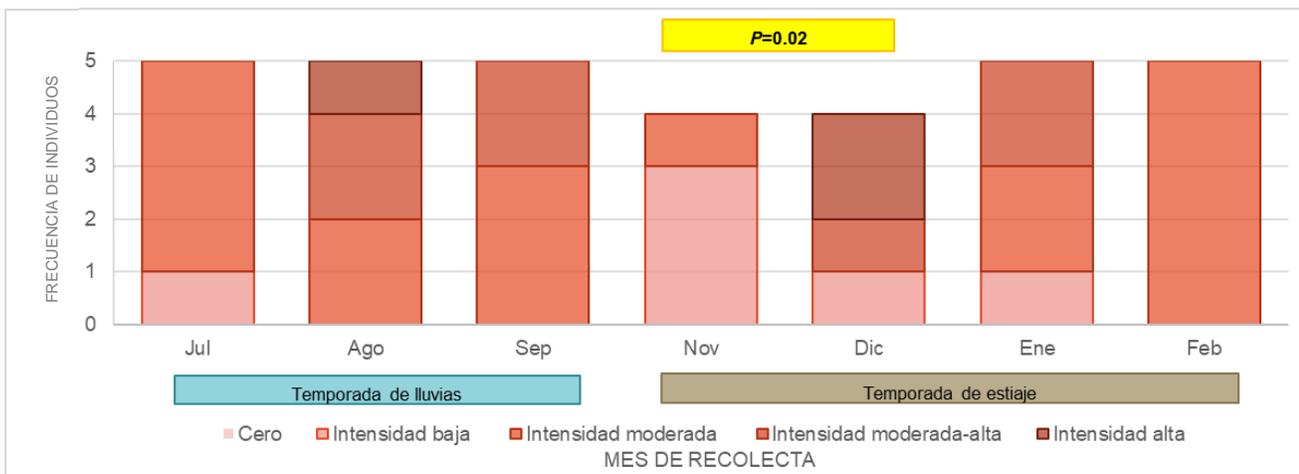
A**B****C**

Figura 29. Intensidad de taninos en tallos (A), frutos (B) y raíces (C) de *Bonellia macrocarpa*. Se indica la frecuencia de los extractos provenientes de cinco individuos diferentes. Así mismo se señalan los meses donde se encontraron diferencias estadísticamente significativas (valor de $P < 0.05$).

8.4. Riqueza y diversidad de compuestos identificados por CCF

El análisis en cromatografía en capa fina (CCF) indicó la presencia de 13 compuestos en todos los tejidos de la planta. Estos se pueden clasificar de acuerdo a los factores de retención cromatográfico (*Rf*) (cuadro 3). En las hojas se detectó el mayor número de compuestos de todos los tejidos. Así mismo se reportaron cinco compuestos que son exclusivos de un solo tejido en específico, siendo las hojas dónde se encontraron más compuestos exclusivos (*BM4*, *BM11*).

Cuadro 3. Factor de retención (*Rf*) de los compuestos encontrados en los tejidos de *Bonellia macrocarpa* (Sistema utilizado: CHCl₃: MeOH 6:4)

Compuesto	Rf	Julio	Agosto	Septiembre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Exclusivo
<i>BM1</i>	0.05±0.01	F	F	F	F	F	F		Fruto
<i>BM2</i>	0.07±0.002	R,T,H	R,T,H	H	H	R,T,H	T,H	T,H	
<i>BM3</i>	0.15±0.01	R	R	H	H				
<i>BM4</i>	0.19±0.00	H	H	H	H	H	H		Hoja
<i>BM5</i>	0.22±0.02	R,T,H	R,T,H,F	H,F	H,F	T,H,F	T,H,F	T	
<i>BM6</i>	0.27±0.00			T	T	T			Tallo
<i>BM7</i>	0.32±0.02	R,T,F	R,T,F	R,F	R,F	F	T,H,F	R,T,H	
<i>BM8</i>	0.37±0.00	T	T	F					
<i>BM9</i>	0.42±0.02	F	T,F		F	H,F	T,H,F	T,H	
<i>BM10</i>	0.55±0.1							R	Raíz
<i>BM11</i>	0.67±0.01	R		F	H	H	R,H		
<i>BM12</i>	0.72±0.02	H	H				R	H	
<i>BM13</i>	0.77±0.00		H	H	H	H	H	H	Hoja

R=Raíz; T=Tallo; H=Hoja; F=Fruto

Se encontraron diferencias significativas en la abundancia de los compuestos durante la temporada de recolecta. En las hojas se presentaron discrepancias en los compuestos *BM3* ($P=0.0007$ Kruskal Wallis) (figura 30 A) que estuvo ausente durante la temporada de estiaje, *BM7* ($P=0.02$ Kruskal Wallis) con mayor presencia en enero y febrero (figura 30 B). En el compuesto *BM11* se reportó una mayor abundancia en los meses secos, a excepción del mes de febrero ($P=0.01$ Kruskal

Wallis) (figura 30 C), finalmente el compuesto *BM12* tuvo una mayor presencia en la temporada de lluvias, sin embargo también se registró una abundancia considerable en febrero ($P=0.03$ Kruskal Wallis) (figura 30 D).

Por otra parte, en las raíces, los compuestos *BM3* ($P=0.001$ Kruskal Wallis), *BM5* ($P=0.02$ Kruskal Wallis) y *BM12* ($P=0.002$ Kruskal Wallis) presentaron diferencias significativas (figura 31 A, B y C). El primero se observó solo en julio y agosto, mientras que en el compuesto *BM5* se reportó una baja abundancia en la temporada de lluvias, teniendo un repunte considerable en enero. El compuesto *BM12* estuvo presente en enero y febrero. Finalmente, en los frutos, solamente el compuesto *BM1* ($P=0.02$ Kruskal Wallis) fue distinto al resto de los otros, presentando una abundancia baja en julio, a comparación del resto de la temporada de recolecta (figura 31 D).

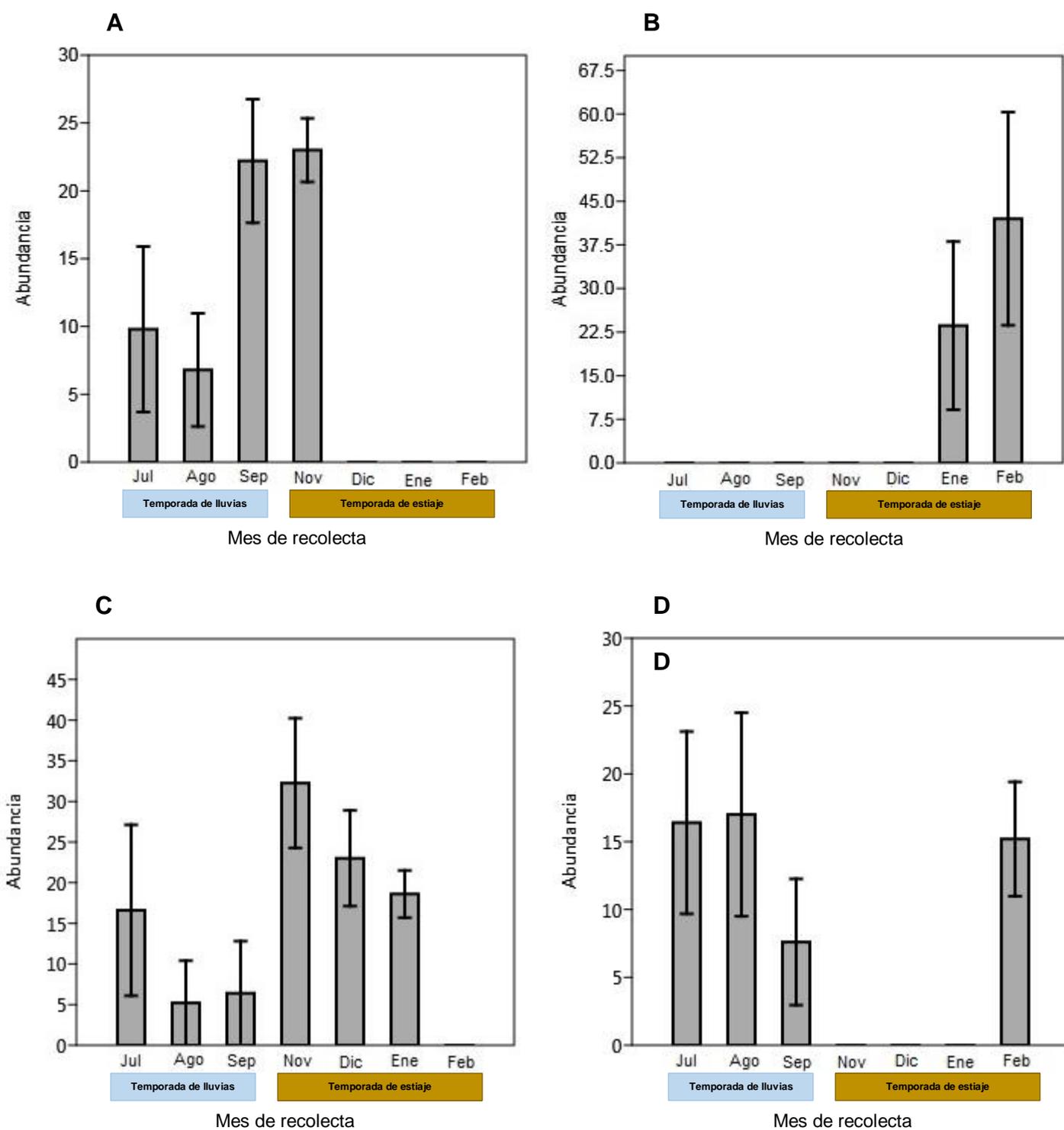


Figura 30. Abundancia de compuestos en hojas de *Bonellia macrocarpa*. A) Compuesto BM3; B) Compuesto BM7; C) Compuesto BM11; D) Compuesto BM12.

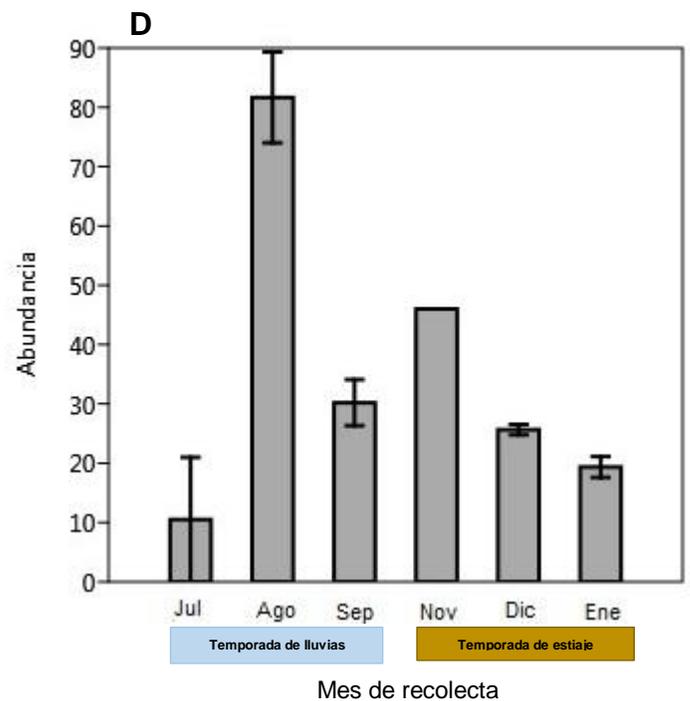
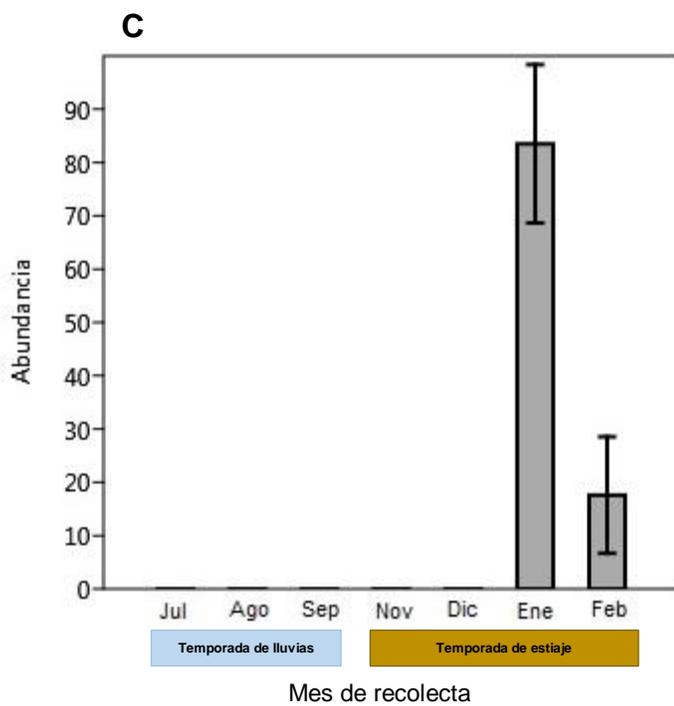
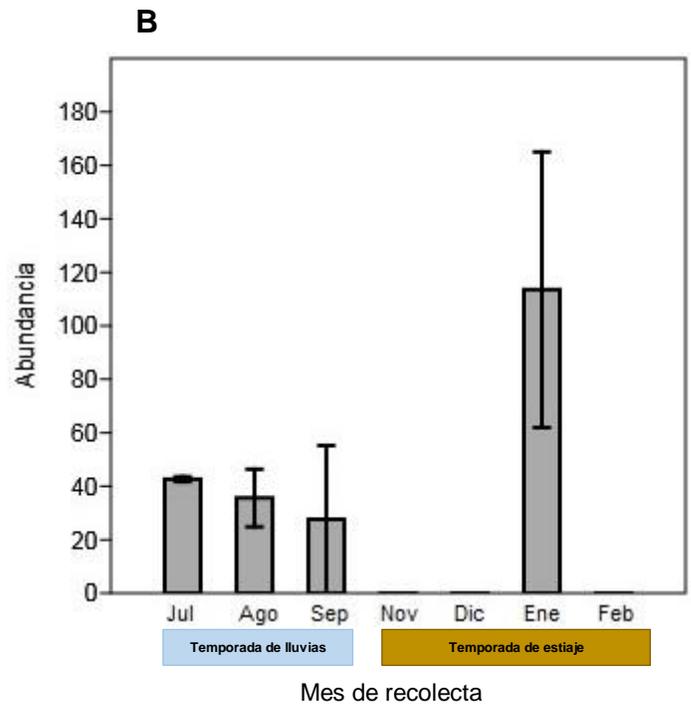
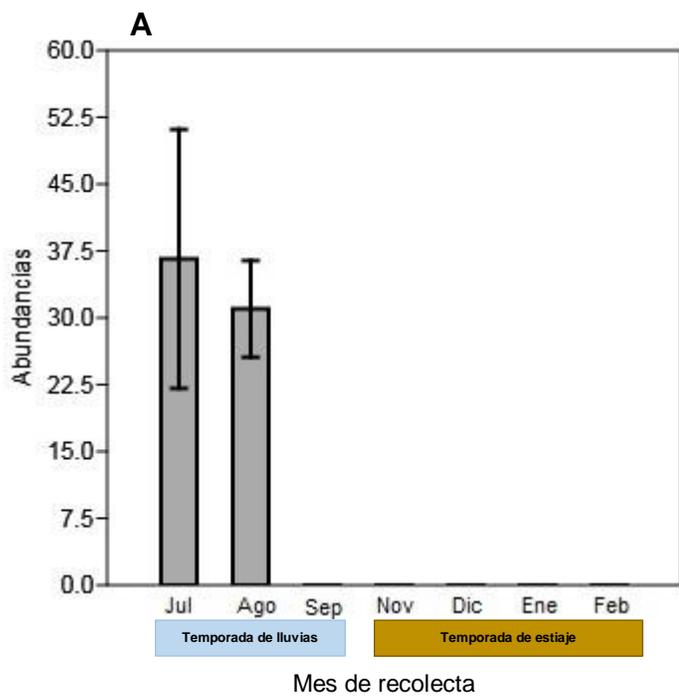


Figura 31. Abundancia de compuestos en distintos tejidos de *Bonellia macrocarpa*. A) Compuesto BM3 (raíz); B) Compuesto BM5 (raíz); C) Compuesto BM12 (raíz); D) Compuesto BM1 (fruto).

Se encontraron variaciones en la riqueza y la diversidad de compuestos de *B. macrocarpa* durante las dos estaciones climáticas analizadas. Para la riqueza se utilizó el índice de Margalef, que mide la distribución numérica de los compuestos. En las hojas la riqueza de compuestos fue más alta en septiembre (0.84 ± 0.14), noviembre (0.82 ± 0.09) y enero (0.77 ± 0.16), y disminuyó considerablemente en el último mes de recolecta, y es en la temporada de sequía cuando se presentó esta variación estacional. Por otra parte, en los tallos y en las raíces la riqueza es más alta en los primeros meses de la temporada de lluvias (julio y agosto), disminuye en el periodo de transición entre temporadas climáticas (septiembre-noviembre) y se restablece en la temporada de estiaje (figura 32).

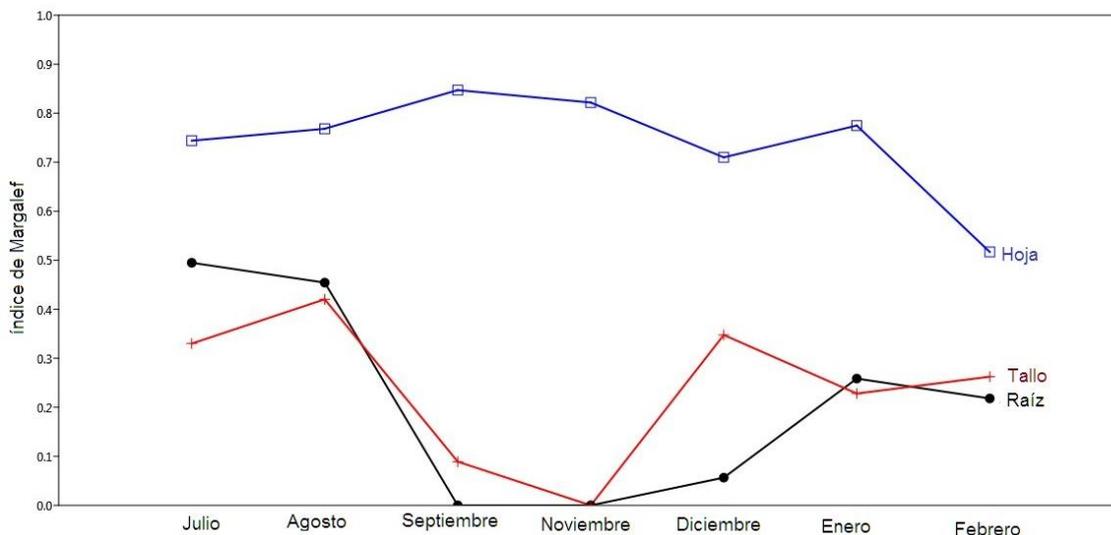


Figura 32. Variación estacional en la riqueza (índice de Margalef) de compuestos en raíces, tallos y hojas de *B. macrocarpa*.

Para la diversidad de especies se utilizó el índice de Shannon-Wiener y el índice de Simpson. En ambos índices se reportó una variación estacional similar al índice de riqueza de Margalef, sin embargo se destacan algunos puntos importantes para cada tejido analizado. En el índice de Shannon, las hojas fueron el tejido en que se presentó mayor diversidad, y fue en el periodo de transición entre temporadas climáticas (septiembre-noviembre) cuando se obtuvieron los valores más altos (1.56 ± 0.18 y 1.58 ± 0.13 respectivamente); durante la temporada de estiaje la diversidad descendió hasta tener el valor más bajo en febrero (1.12 ± 0.07). En los

tallos la diversidad de compuestos no fue constante durante los meses de recolecta, y en agosto (0.52 ± 0.45) y diciembre (0.43 ± 0.12) se reportaron los valores más altos para este tejido, contrastando con noviembre al no encontrarse un índice positivo. Esto mismo se repitió en las raíces, sin embargo el índice de diversidad de Shannon fue más alto en julio (1.05 ± 0.14) y agosto (0.99 ± 0.25) (figura 33).

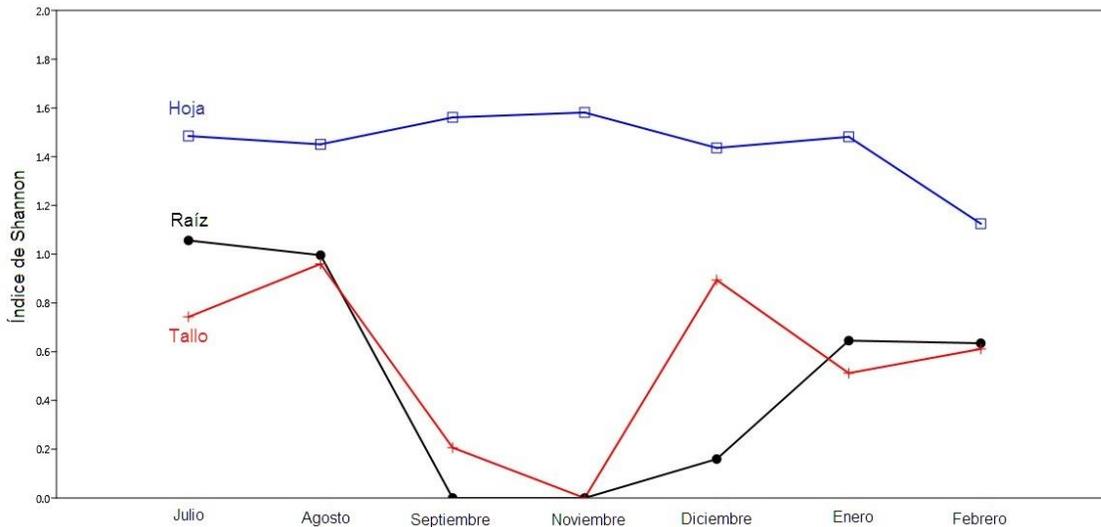


Figura 33. Variación estacional en la diversidad (índice de Shannon) de compuestos en raíces, tallos y hojas de *B. macrocarpa*.

En el índice de diversidad de Simpson, que considera a los compuestos que tienen mayor abundancia, se mantiene un patrón muy similar al índice de Shannon. En las hojas la diversidad fue más constante entre la temporada de lluvias y la de sequía, solo obteniendo un valor menor en febrero (0.64 ± 0.03). En los tallos y en las raíces la temporada de transición entre las dos estaciones climáticas (septiembre-noviembre) también se observó una disminución en la diversidad, sin embargo en los tallos hubo un repunte considerable en este índice en el mes de diciembre (0.69 ± 0.05), mientras que en las raíces la diversidad fue más alta en julio y agosto (0.59 ± 0.05 y 0.56 ± 0.01 respectivamente) (figura 34).

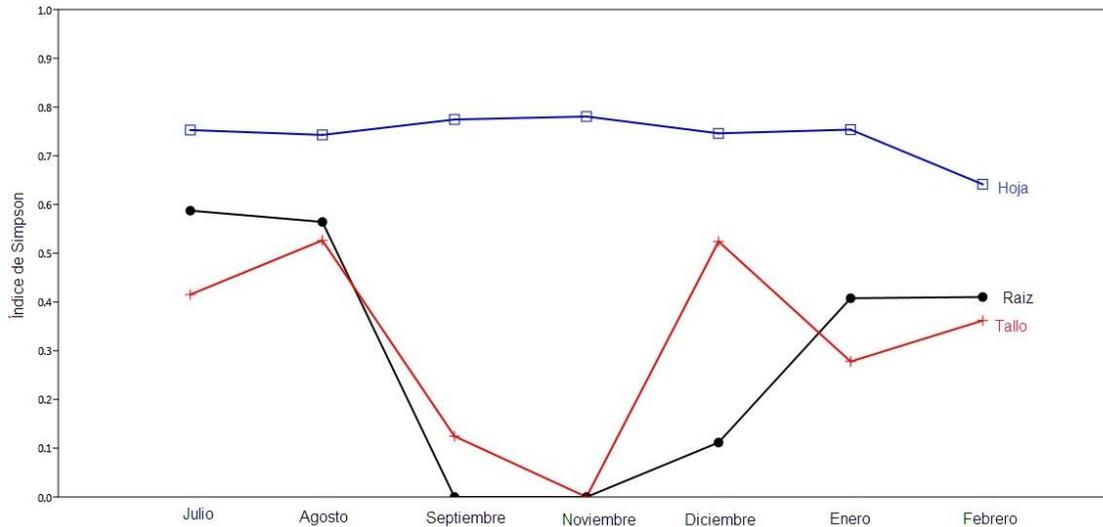


Figura 34. Variación estacional en la diversidad (índice de Simpson) de compuestos en raíces, tallos y hojas de *B. macrocarpa*.

Se realizó un ANOVA de dos factores para analizar la influencia del periodo de recolecta y del tejido sobre la riqueza y la diversidad de compuestos. Los resultados del análisis indicaron una fuerte dependencia de la diversidad y la riqueza al tejido (cuadro 4), ya que todos los valores de P obtenidos en esta prueba son menores a 0.01, sin embargo el mes de recolecta también influye considerablemente en la variación de la riqueza y la diversidad en la planta, aunque la dependencia de este factor no es tan marcada como con el tejido. Además, existe una interacción significativa entre los factores en los tres índices utilizados ($P < 0.05$), de los cuales en la temporada de recolecta se estableció al finalizar la temporada de lluvias y en la temporada de sequía; y en el tejido analizado se reportó en las raíces y en los tallos.

Cuadro 4. Valores de P que indican diferencias estadísticamente significativas en la influencia del tejido y del mes

Factor	Margalef	Shannon	Simpson
Tejido	7.6×10^{-20}	3.3×10^{-17}	1.4×10^{-14}
Mes de recolecta	7.2×10^{-4}	1.3×10^{-4}	3.6×10^{-5}
Interacción	0.002	0.001	0.001

de recolecta sobre los índices de riqueza y de diversidad en los compuestos de *B. macrocarpa*.

Análisis estadístico: ANOVA de dos factores

8.4.1. Índice de similitud

La diversidad entre los meses de recolecta se analizó mediante un análisis de similitud de Sorensen (cuadro 6, cuadro 7, cuadro 8). Los resultados obtenidos fueron parecidos entre sí, ya que en la temporada de lluvias, los meses con mayor similitud en la diversidad de compuestos fueron julio y agosto (0.88), esto se reportó en los tres tejidos. Para la temporada de estiaje se encontró una similitud muy alta entre septiembre-noviembre en las hojas (0.90) y los tallos (1), también fue similar el mes de enero con diciembre en las hojas (0.92) y enero-febrero en los tallos (1). El tejido que tuvo un menor índice de similitud en la temporada seca fue la raíz, y los meses más parecidos fueron septiembre y noviembre con febrero (0.66).

Cuadro 6. Valores de similitud de Sorensen en los compuestos de hojas entre los meses de recolecta.

Mes de Recolecta	Julio	Agosto	Septiembre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero
Julio							
Agosto	0.88						
Septiembre	0.66	0.8					
Noviembre	0.6	0.72	0.9				
Diciembre	0.6	0.72	0.72	0.83			
Enero	0.54	0.66	0.66	0.76	0.92		
Febrero	0.44	0.60	0.40	0.36	0.54	0.66	

Cuadro 7. Valores de similitud de Sorensen en los compuestos de tallos entre los meses de recolecta.

Mes de Recolecta	Julio	Agosto	Septiembre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero
Julio							
Agosto	0.88						
Septiembre	0	0					
Noviembre	0	0	1				
Diciembre	0.57	0.5	0.5	0.05			
Enero	0.75	0.88	0	0	0.57		
Febrero	0.75	0.88	0	0	0.57	1	

Cuadro 8. Valores de similitud de Sorensen en los compuestos de raíces entre los meses de recolecta.

Mes de Recolecta	Julio	Agosto	Septiembre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero
Julio							
Agosto	0.88						
Septiembre	0.33	0.4					
Noviembre	0.33	0.4	1				
Diciembre	0.33	0.4	0	0			
Enero	0	0	0	0	0		
Febrero	0.28	0.33	0.66	0.66	0	0	

IX. DISCUSIÓN

En *Bonellia macrocarpa* se reportó una fenofase vegetativa constante en ambas estaciones climáticas, la cual no presentó periodo de marchitamiento o caída de hojas aparente. Esta es una de las características más sobresalientes de esta planta, ya que no coincide con el patrón fenológico usual de las especies de la Selva Baja Caducifolia, que suelen tener una temporada de senescencia en los meses de estiaje. Debido a que la temperatura, la humedad relativa y la precipitación son los principales factores que definen a este ecosistema (Rzedowski, 2006), las propiedades estructurales y ecofisiológicas de su vegetación están estrechamente relacionadas con la duración y estacionalidad del periodo de sequía, que condiciona las adaptaciones asociadas a evitar, escapar o tolerar al estrés hídrico (Valdez-Hernández, 2008; Kushwaha *et al.*, 2015). El período de caída de hojas es una adaptación para evitar el estrés hídrico, y en plantas de senescencia corta (<2 meses o de 2 a 4 meses) esta estrategia puede ser posible debido a una tasa de uso de recursos más lenta y una mayor tolerancia al estrés hídrico (Bullock, 1995, Sing y Kushwaha, 2006).

Se registró la fenofase reproductiva del siqueté al final de la temporada de lluvias con el desarrollo del fruto y su maduración (septiembre-enero), y conforme se estableció la estación seca con la aparición de las primeras flores (enero- febrero). No se logró observar esta fenofase en su totalidad, sin embargo se puede sugerir que la aparición y maduración de la flor se lleve a cabo durante toda la temporada de sequía. En la fenología reproductiva la maduración de la fruta y las condiciones adecuadas para la reproducción están estrechamente sincronizadas en los Bosques Secos Tropicales debido a las marcadas diferencias de condiciones bióticas y abióticas entre las estaciones seca y lluviosa (Griz y Machado, 2001). Es posible que en las especies de plantas que se encuentran en este ecosistema la duración de la fenofase de fructificación dependa, al menos en cierta medida, del tiempo de floración y del período de senescencia durante el ciclo anual (Sing y Kushwaha, 2006). Ahora bien, En los trópicos secos, el estrés hídrico se ha citado con frecuencia como el desencadenante principal de la caída de las hojas, pero se sabe muy poco acerca de su efecto sobre la fenología reproductiva o la floración (Díaz y

Granadillo, 2005). Algunos estudios sugieren que el cambio en los patrones de precipitación, ya sea por fenómenos meteorológicos o por alteraciones en la climatología del lugar, pueden modificar la fenología reproductiva de las especies (Borchert *et al.*, 2002; Díaz y Granadillo, 2005). En este estudio no se detectó un cambio aparente en el patrón de la floración y fructificación de *Bonellia macrocarpa*, sin embargo no se cuenta con el registro de la fenología completa del ciclo anual de estudio en ese año y de años anteriores debido a la falta de muestreos durante el año 2020, por lo que se necesita continuar recabando información para poder comparar y observar el efecto del clima sobre la fenología de esta especie.

La influencia de la estacionalidad sobre el rendimiento en los extractos orgánicos no es homogénea en todos los tejidos de la planta, presentando variaciones entre ambas temporadas climáticas. Durante la estación lluviosa los tejidos donde se reportó la mayor cantidad de extracto fueron las hojas y las raíces, especialmente en el mes de julio cuando las precipitaciones fueron intensas. Esto contrasta rotundamente en los frutos y en los tallos, tejidos que reportan mayores rendimientos en la temporada de estiaje. En los frutos este aumento se encontró en el mes de noviembre, coincidiendo este mes con el mayor índice de actividad fenológica en la fenofase reproductiva, mientras que en los tallos el mayor rendimiento detectó en febrero, justo cuando la fructificación ya había terminado y la sequía ya estaba establecida en la zona. Sin embargo es en este último tejido donde se encontraron diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) entre los rendimientos en ambas estaciones climáticas, específicamente en la temporada de sequía. Esta variación en el contenido de extracto en los tallos está relacionada con la precipitación, ya que al ser bajo puede favorecer a mayores rendimientos. Algunos estudios han demostrado que el contenido químico y los rendimientos en los extractos obtenidos de los tallos puede verse influenciado por la estacionalidad, especialmente por la precipitación, dando lugar a una mayor producción de compuestos orgánicos durante la temporada seca (Oliveira *et al.*, 2017; Alves-Ribeiro *et al.*, 2019).

La producción de metabolitos secundarios en las plantas depende fuertemente de los factores medioambientales y de la estacionalidad de un ecosistema, estos cambios han sido estudiados y presentan variaciones en compuestos específicos durante las diferentes estaciones. Estas fluctuaciones en la producción de compuestos provocan cambios notables en el perfil químico de las plantas e imponen un impacto adicional en la actividad biológica de las mismas. La influencia de la estación sobre la composición química y el metabolismo secundario se puede atribuir a los cambios climáticos como la temperatura, la humedad del suelo, las precipitaciones, así como a las diferentes etapas del metabolismo primario de la planta (Prinsloo y Nogename, 2018). Cabe señalar que el agua varía considerablemente durante las estaciones, y más en un ecosistema tropical como la Selva Baja Caducifolia, por lo que la disponibilidad de este factor está estrechamente relacionada con los efectos de los metabolitos secundarios en las plantas. Por ejemplo, en *Lippia alba*, durante las épocas seca y lluviosa se presentaron patrones opuestos de concentración de metabolitos secundarios y se determinó que predominan los fenilpropanoides en invierno y los flavonoides en verano (Gomes *et al.* 2017). En *Loranthus micranthus*, las estaciones seca y lluviosa también afectaron a los constituyentes fitoquímicos. Los extractos obtenidos de la cosecha temprana de la temporada de lluvias y durante el pico de la temporada de lluvias mostraron una variación que era consistente con las estaciones. Las muestras de las estaciones lluviosas contenían cantidades más altas de alcaloides, esteroides, compuestos ácidos y carbohidratos con una actividad biológica que variaba con las estaciones (Osadebe *et al.* 2010).

Uno de los grupos de metabolitos secundarios que es susceptible a los efectos de la estacionalidad son los fenoles. Estos compuestos pueden tener múltiples respuestas a los factores ambientales, tanto cuantitativa como cualitativamente; sobre todo al estrés por sequía, y esto propicia a que algunos de estos se presenten en concentraciones variables a lo largo de un ciclo anual, mientras que otros no pueden sintetizarse (Bulbovas *et al.* 2005; Munné-Bosch y Cela, 2006). En *Secundatia floribunda* se registró un aumento considerable de compuestos fenólicos en la corteza de los tallos en la temporada de lluvias, sobre todo en el año donde

hubo mayores precipitaciones en la zona (Ribeiro *et al.*, 2019). Por otra parte, en plantas de interés comercial, como *Helianthus annuus*, se detectó que las concentraciones de ácido clorogénico e isoclorogénico (ésteres provenientes de compuestos fenólicos como el ácido cafeico y el ácido quínico) aumentaron considerablemente bajo estrés hídrico (Del Moral, 1972). En este estudio se detectó una variación estacional marcada en la temporada de estiaje (noviembre-febrero) en todos los tejidos de la planta, especialmente en los tallos y en las hojas. Esto coincide con algunos estudios que reportan el aumento de compuestos fenólicos durante las temporadas que tienen bajas precipitaciones, como las cumarinas. En *Mikaina laevigata* se detectó una mayor concentración de esta molécula en ejemplares sometidos a estrés hídrico y en ambientes sombreados, por lo que parece sugerir que este metabolito secundario está más relacionado con la respuesta a estos cambios (Almeida *et al.*, 2016).

Sin embargo este no es el único factor medioambiental que influye en la producción de fenoles, ya que también la temperatura juega en papel importante en la variación estacional de estos metabolitos secundarios. Según Padma y Picha (2008) y Albert *et al.* (2009) parece haber una relación entre la temperatura y los niveles de compuestos fenólicos en los tejidos de las plantas, en la que las temperaturas más bajas se asocian con niveles más altos de compuestos fenólicos. En la región durante la temporada de estiaje, se coincide con los descensos de temperatura en los meses de diciembre, enero y febrero, por lo que es probable que el cambio en la temperatura favorezca la producción de estos metabolitos secundarios. El aumento de los niveles de compuestos fenólicos en las hojas puede estar relacionado con una mayor actividad de la fenilalanina amonioliasa (PAL) a temperaturas más bajas, dado que PAL es una enzima importante en la biogénesis de varios compuestos fenólicos (Padma & Picha, 2008).

Las saponinas (o saponinas triterpénicas) son glucósidos de alto peso molecular que se componen de un resto de azúcar unido a triterpeno o aglicona esteroide. Estos metabolitos secundarios no son exclusivos de un órgano o tejido en particular, ya que pueden encontrarse desde las raíces hasta los frutos, por lo que

estas moléculas juegan un papel importante en mecanismos de defensa e interacción con factores medioambientales; y, por consiguiente, la producción de saponinas triterpénicas se ve claramente influenciada por estos últimos (Szakiel *et al.*, 2010; Nasrollahi *et al.*, 2014). Se ha estudiado el efecto del estrés hídrico y la fenología de las plantas sobre las sapogeninas. En *Glycyrrhiza glabra* el estrés por sequía intenso aumentó los niveles glucósidos triterpénicos como la glicirricina, compuesto conocido por tener un efecto antioxidante en las plantas eliminando el exceso de especies reactivas al oxígeno (ROS), disminuyendo así el estrés oxidativo (Okubo y Yoshiki, 2000; Nasrollahi *et al.*, 2014). Además, en *Quillaja brasiliensis* también se corroboró que existe una variación estacional en el contenido de saponinas triterpénicas entre estaciones climáticas (sequía y lluvia). Se realizó un estudio con hojas de 20 árboles adultos de esta especie y los resultados sugieren que los períodos de mayor precipitación, como la primavera, generalmente se asociaron con un contenido más bajo de saponinas como el QB-90, mientras que las estaciones moderadamente secas, como el invierno y el otoño, produjeron el mayor contenido de este compuesto (Costa *et al.*, 2013).

Para este estudio se observó que el contenido de sapogeninas en el sique té fue menor durante la temporada de lluvias, acentuándose en julio y agosto que es cuando las precipitaciones están establecidas completamente. A partir de septiembre la intensidad de metabolitos secundarios aumentó y se mantuvo hasta el establecimiento de la temporada de estiaje, esto en todos los órganos de la planta. Es posible que el cambio en la intensidad de sapogeninas en *B. macrocarpa* está estrechamente relacionado con la estacionalidad, ya que este metabolito responde al cambio entre temporadas climáticas. Además, la respuesta de las sapogeninas para la protección y defensa de la planta está mediada por la activación de genes biosintéticos a través de una cascada de señalización compleja que involucra a fitohormonas como el jasmonato o el ácido abscísico; sustancias vinculadas al estrés abiótico en plantas (Puente-Garza *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2020).

Como se mencionó anteriormente, la fenología tiene una importante influencia en la variación de saponinas triterpénicas. Se han realizado diversos estudios en plantas medicinales, por ejemplo, en *Polygala teunifolia* se analizó la distribución y

los cambios estacionales en el contenido de saponinas triterpénicas de tipo oleanano en todos los órganos vegetativos. Los niveles de estos compuestos mostraron variación dinámica durante la temporada de crecimiento siendo alta durante el período de prefloración, disminuyendo con la aparición de las flores y la formación de frutos, aumentando nuevamente después en el período reproductivo. Además, se encontró que el contenido de saponina disminuía al nivel más bajo de toda la temporada a medida que se acercaba el inicio del período de marchitamiento (Teng *et al.*, 2009).

Se obtuvieron resultados similares en *Achyranthus bidentata* al determinar los patrones de acumulación de estos compuestos en hojas, tallos y raíces. Durante el crecimiento de la planta hasta antes de la temporada reproductiva la producción de saponinas fue muy alta, disminuyendo drásticamente durante la floración y el desarrollo del fruto, siendo el órgano más afectado la raíz; mientras, en los frutos maduros se reportó un aumento de sapogeninas considerable. Estos resultados confirmaron que la disminución del contenido de saponinas triterpénicas de raíces y tallos está relacionada con la fase reproductiva de la planta (Li y Hu, 2009). En *B. macrocarpa* la disminución de sapogeninas que se registró específicamente en julio y agosto no fue influenciada por ninguna fase fenológica, ya que esta se presenta antes de actividad reproductiva y en la fenofase vegetativa, la cual se mantuvo sin cambios en todos los meses de estudio. Si bien es cierto que el incremento de estos metabolitos coincide con la temporada de fructificación, la concentración de sapogeninas se prolongó aun después de esta fenofase. Además, la variación de estos metabolitos secundarios no fue exclusivo para un solo tejido en la planta, sino que se presentó en todos los órganos y en un periodo en específico (especialmente en temporada de lluvias). Por este motivo es más notoria la influencia de la estacionalidad sobre este metabolito secundario que la fenología de la planta.

Otro de los efectos de la estacionalidad sobre el metabolismo secundario en las plantas es la variación cuantitativa de los compuestos en los órganos y tejidos. Una población de plantas puede exhibir cambios en las concentraciones, en el número y la uniformidad de compuestos (es decir, la riqueza y la quimiodiversidad),

así como la variación cualitativa entre individuos y grupos (b-quimiodiversidad) (Moore *et al.*, 2013). En *Bonellia macrocarpa* se reportaron cambios en la abundancia, riqueza y diversidad de compuestos, siendo las hojas y los tallos los órganos más sobresalientes. El número de compuestos encontrados en los tallos indica una menor riqueza con respecto a los otros tejidos, sin embargo no se encontraron diferencias significativas en las abundancias de estos. A su vez el tejido que tuvo más diferencias en las abundancias, y por ende hay una variación estacional más marcada, es la hoja, donde algunos compuestos aparecen solamente en la temporada de lluvias y otros son exclusivos de la temporada de estaje.

Esto puede explicar claramente el rol de los metabolitos secundarios en la defensa ante el estrés hídrico, especialmente en las hojas, ya que fue el órgano que presentó una variabilidad más amplia en las abundancias de compuestos. Algunos estudios han analizado la variación cuantitativa de compuestos a lo largo de temporadas climáticas, observándose un incremento de metabolitos secundarios en la temporada de sequía (Valares-Masa, 2011). Además, la variabilidad también puede ser inducida por los procesos ontogénicos de la planta. En *Empetrum hermaphroditum* y *Betula pendula* se observó una disminución en el contenido de metabolitos durante la senescencia de la hoja (Nillson *et al.*, 1998; Gallet *et al.*, 1999; Laitinen *et al.*, 2005), específicamente de compuestos fenólicos y terpénicos. En *Bonellia macrocarpa* no se reportó caída de hojas en la fenofase vegetativa, incrementando la riqueza y diversidad de compuestos en los meses de transición entre la temporada húmeda y seca.

En los tallos y las raíces fue en esta temporada cuando la diversidad y la riqueza disminuyó drásticamente, recuperándose conforme se estableció la temporada de sequía en el sitio. Además, se observó una fuerte dependencia de estos índices al tejido, sin embargo la interacción de este factor con los meses de recolecta reafirma la variación estacional que existe en los tallos y las raíces en el cambio de estación climática. En las plantas la estacionalidad afecta la composición química haciendo que algunos compuestos se presenten en concentraciones variables durante una temporada, mientras que otros no se sintetizan (Bulbovas *et al.* 2005; Munné-Bosch y Cela 2006). La diversidad de compuestos entre los meses de

recolecta también indicó una variación estacional en los metabolitos secundarios en la planta, ya que se encontró mayor similitud en los meses de transición entre temporadas climáticas y en la temporada de sequía (septiembre-febrero) en todos los tejidos.

X. CONCLUSIÓN

La fenología de *Bonellia macrocarpa* se ve influenciada en cierta parte por la estacionalidad de la Selva Baja Caducifolia. La fenofase vegetativa se reportó sin variaciones durante la temporada de estudio, y la fenofase reproductiva que parece ser modulada por las temporadas climáticas del sitio.

Se encontró una variación estacional en los rendimientos de los extractos metanólicos en todos los tejidos de la planta, siendo los tallos los que tuvieron una mayor variabilidad de por la ausencia de precipitación.

Los grupos de metabolitos secundarios que tuvieron una mayor influencia de las estaciones climáticas fueron los fenoles y las sapogeninas, respondiendo ambos grupos a la falta de precipitación de la temporada de estiaje de la Selva Baja Caducifolia. Estos metabolitos secundarios juegan un papel importante en la defensa de la planta ante el estrés hídrico.

Se detectó una variación estacional muy marcada en la abundancia, riqueza y diversidad de compuestos en los tejidos de *Bonellia macrocarpa*, especialmente en la temporada de transición entre estaciones climáticas. En las hojas se registró un aumento de compuestos en este periodo, mientras que en los tallos y raíces disminuyó abruptamente, por lo que la modulación de compuestos en la planta parece responder al cambio de estación en la Selva Baja Caducifolia.

XI. REFERENCIAS DOCUMENTALES

- Albert, A., Sareedenchai, V., Heller, W., Seidlitz, H. K., Zidorn, C. 2009. Temperature is the key to altitudinal variation of phenolics in *Arnica montana* L. cv. ARBO. *Oecologia*. 160: 1-8.
- Almeida, C. L., Xavier, R. M., Borghi, A. A., Dos Santos, V. F., Frankland Saway, A. C. H. 2016. Effect of seasonality and growth conditions on the content of coumarin, chlorogenic acid and dicaffeoylquinic acids in *Mikania laevigata* Schultz and *Mikania glomerata* Sprengel (Asteraceae) by UHPLC–MS/MS. *International Journal of Mass Spectrometry*. 418:162-172.
- Anaya-Lang, A. L. 2003. Ecología química. Plaza y Valdés, S. A de C. V. México.
- Azcón-Bieto, J. y Talón, M. 2013. Fundamentos de fisiología vegetal. Segunda edición. McGraw-Hill - Interamericana de España, S. L. España.
- Bezaury-Creel, J. 2010. Las Selvas Secas del Pacífico Mexicano en el contexto mundial. En: Ceballos, E., Martínez, L., García, A., Espinosa, E., Bezaury, E. y R. Dirzo. Diversidad, amenazas y áreas prioritarias para la conservación de las selvas secas del pacífico mexicano. CONABIO. México. pp 21-40.
- Borchert, R. 2000. Organismic and environmental controls of bud growth in tropical trees. En: Viemont, J. D., Crabbe, J., Dormancy in plants: from whole plant behavior to cellular control. Publicaciones CAB International. Inglaterra. pp. 87–107.
- Bulbovas, P., Rinaldi, M. C. S., Delitti, W. B. C., Domingos, M. 2005 Variação sazonal em antioxidantes em folhas de plantas jovens de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). *Brazilian Journal of Botany*. 28:687–696.
- Bullock, S. H. 1995. Plant reproduction in neotropical dry forests. En: Bullock S.H., Mooney, H. A., Medina, E. Seasonally dry tropical forests. Cambridge University Press. Inglaterra. pp. 277–303.
- Burquéz, A., Martínez-Yizar, A., Felger, R. S. 2009. Los ecosistemas terrestres de Sonora: un diverso capital natural. En: Molina-Freaner, F. y Van-Devender, T. Diversidad biológica del estado de Sonora. UNAM, México, pp. 129-156.
- Caamal-Fuentes, E. 2012. Evaluación citotóxica de metabolitos aislados de plantas usadas en la medicina tradicional maya para el tratamiento de síntomas

- sugerentes a cáncer. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México (CICY).
- Caamal-Fuentes, E., Torres-Tapia, L. W., Cedillo-Rivera, R., Moo-Puc, R., Peraza-Sánchez, S. R. 2011. Bonediol, a new alkyl catechol from *Bonellia macrocarpa*. *Phytochemistry letters*. 4: 345-347.
- Castillo-Campos, G., Medina, M. E. y Hernández, S. 1998. Theophrastaceae. Flora de Veracruz. 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. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Comité Estatal de Información Estadística y Geográfica (CEIEG). 2019. Mapas municipales de Chiapas. Actualización 2019. <http://www.ceieg.chiapas.gob.mx/productos/files/MAPASMUN/123.pdf>. Consultado el 9 de noviembre de 2019.
- Chatterjee, S. K. 2002. Cultivation of medicinal and aromatic plants in India, a Commercial Approach. *Acta Horticulturae*. 576: 191-202.
- De Costa, F., Alves Yendo, A. C., Fleck, J. D., Gosmann, G., Fett-Neto, A. G. 2013. Accumulation of a bioactive triterpene saponin fraction of *Quillaja brasiliensis* leaves is associated with abiotic and biotic stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*. 66: 56-62.
- Del Moral, R. 1972. On the variability of chlorogenic acid concentration. *Oecología*. 9: 289-300.
- Diaz, M., Granadillo, E. 2005. The significance of episodic rains for reproductive phenology and productivity in trees in semiarid regions of northwestern Venezuela. *Trees*. 19: 336–348.
- Dewick, P. M. 2002. Medicinal Natural Products. Segunda edición. John Wiley & Sons LDT. Inglaterra.
- Gallet, C., Nillsson, M. C., Zackrisson, O. 1999. Phenolic metabolites of ecological significance in *Empetrum hermaphroditum* leaves and associated humus. *Plant and Soil*. 210:1-9.

- Gentry, A.H. 1988. Changes in plant community diversity and floristic composition on environmental and geographical gradients. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 75: 1-34.
- Griz, L. M. S., Machado, I. C. S. 2001. Fruiting phenology and seed dispersal syndromes in caatinga, a tropical dry forest in the northeast of Brazil. *Journal of Tropical Ecology*.17: 303–321.
- Gomes, A. F., Almeida, M. P., Leite, M. F., Schwaiger, S., Stuppner, S., Halabalak, M., Amaral, J. G., David, J. M. 2017. Seasonal variation in the chemical composition of two chemotypes of *Lippia alba*. *Food chemistry*. 273:186-193.
- Harbone, J. B. 1993. Introduction to Ecological Biochemistry. Cuarta edición. Academia Press. Gran Bretaña.
- Harbone, J. B. y Dey, P. M. 1997. Plant Biochemistry. Academia Press. Gran Bretaña.
- Herbert, R. B. 1989. The biosynthesis of secondary metabolites. Springer Science & Business Media. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-009-5833-3_5. Consultado el 15 de abril de 2020.
- Holm, D. K., Petersen, L. M., Klitgaard, A., Knudsen, P. B., Jarczynska, Z. D., Nielsen, K. F., Mortensen, U. H. 2014. Molecular and chemical characterization of the biosynthesis of the 6-MSA-derived meroterpenoid yanuthone D in *Aspergillus niger*. *Chemistry & biology*. 21 (4): 519-529.
- Instituto para el Federalismo y el Desarrollo municipal (INAFED). 2010. Enciclopedia de los municipios y Delegaciones de México. <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM07chiapas/municipios/07002a.html>. Consultado el 9 de noviembre de 2019.
- Jardín Botánico de Missouri. 2020. *Bonellia macrocarpa*. Tropicos. Org. <http://legacy.tropicos.org/name/50250261>. Consultado el 15 de febrero de 2020.
- Jonasson, S., Bryantt, J. P., Chapin, F.S. y Andersson, M. 1986. Plant phenols and nutrients in relation to variations in climate and rodent grazing. *The American Naturalist*. 128 (3): 394-408.

- Källersjö, M., y Ståhl, B. 2004. Reinstatement of *Bonellia* (Theophrastaceae). *Novon*. 14: 115-118.
- Kumar, A. 2015. Impact of agroclimatic factors on plant secondary metabolites and their accumulation in medicinal plants: a commercial approach. En: Prasad Sati, V. Climate change and socio-ecological transformation. Today and Tomorrow's Printers and Publishers. India. pp. 237-241.
- Kushwaha, C. P., Tripathi, S. K. y Singh, K. P. 2015. Diversity of leaf deciduousness in important trees of dry tropical forest, India. *Biodiversity in Topical Ecosystems*. 177-189.
- Laitinen, M. L., Julkunen-Titto, R., Tahvanainen, J., Heinonen, J., Rousi, M. 2005. Variation in birch (*Betula pendula*) shoot secondary chemistry due to genotype, environment and ontogeny. *Journal of Chemical Ecology*. 31: 697-717.
- Li, Y., Liang, X., Zhou, X., Wu, Z., Yuan, L., Wang, Y., Li, Y. 2020. Selection of reference genes for qRT-PCR analysis in medicinal plant *Glycyrrhiza* under abiotic stresses and hormonal treatments. *Plants*. 9: 1-20.
- Li, J. y Hu, Z. 2009. Accumulation and dynamic trends of triterpenoid saponin in vegetative organs of *Achyranthus bidentata*. *Journal of integrative plant biology*. 51:122–129.
- Luna-Nieves, A. L., Meave, J. A., Cerdeira-Mollerato, L. P. y Ibarra-Manríquez, G. 2017. Reproductive phenology of useful Seasonally Dry Tropical Forest trees: Guiding patterns for seed collection and plant propagation in nurseries. *Forest Ecology and Management*. 393: 52-62.
- Martin, D. A. 2017. Los compuestos fenólicos: un acercamiento a su biosíntesis, síntesis y actividad biológica. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*. 9 (1): 81-104.
- Martínez-López, M. y Villanueva-Almanza, L. 2012. Flora del valle de Tehuacán-Cuicatlán. Fascículo 101. Universidad Nacional Autónoma de México. México. D. F.
- Medina-López, C. F., Plascencia-Jatomea, M., Cinco-Moroyoquí, F. J., Yépez-Gómez, M. S., Cortez-Rocha, M. O. y Rosas-Burgos, E. C. 2016. Potentiation of antifungal effect of a mixture of two antifungal fractions obtained from

- Baccharis glutinosa and Jacquinia macrocarpa plants. *Journal of Environmental Science and Health*. 51 (11): 760-768.
- Moore, B. D., Andrew, R. L., Külheim, C., Foley, W. J. 2013. Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. *New Phytologist*. 201(3): 733-750.
- Munné-Bosch, S., Cela, J. 2006. Effects of water deficit on photosystem II photochemistry and photoprotection during acclimation of lyreleaf sage (*Salvia lyrata* L.) plants to high light. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 85 (3):191–197
- Nasrollahi, V., Mirzaie-asl, A., Piri, K., Nazeri, S., Mehrabi., R. 2014. The effect of drought stress on the expression of key genes involved in the biosynthesis of triterpenoid saponins in liquorice (*Glycyrrhiza glabra*). *Phytochemistry*. 103: 32–37.
- Newstrom, L. E., Frankie, G. W. y Baker, H. G. 1994. A New classification for plant phenology base don flowering patterns in lowland Tropical Rain Forest trees at La Selva, Costa Rica. *Biotropica*. 26 (2): 141-159.
- Niinements, U. 2016. Uncovering the hidden facets of drought stress: secondary metabolites make the difference. *Tree Physiology*. 36: 129–132.
- Nilsson, M. C., Gallet, C., Wallstedt, A. 1998. Temporal variability of phenolics and batatasin-III in *Empetrum hermaphroditum* leaves over and eight-year period: interpretations of ecological function. *Oikos*. 81:6-16.
- Oliveira, L. G., Ribeiro, D. A., Saraiva, M. E., Gonçalves de Macêdo, D., Ferreira Macedo, J. G., Gonçalves Pinheiro, P., Martins da Costa, J. G., De Almeida Souza M. M., Alencar de Menezes, I. R. 2016. Chemical variability of essential oils of *Copaifera langsdorffii* Desf. indifferent phenological phases on a savannah in the Northeast, Ceará, Brazil. *Industrial Crops and Products*. 97:455-464.
- Osadebe, P. O., Omeje, E. O., Uzor, P. F., Davi, E. A., Obiorah, D.C. 2010. Seasonal variation for the antidiabetic activity of *Loranthus micranthus* methanol extract. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 3:196–199

- Ocampo-Acosta, G. 2000. Flora del bajío y de regiones adyacentes. Fascículo 89. Instituto de Ecología (INECOL). México.
- Padda, M. S., Picha, D. H. 2008. Effect of low temperature storage on phenolic composition and antioxidant activity of sweet potatoes. *Postharvest Biology and Technology*. 47: 176-180.
- Pérez-Farrera, M. A. y Espinoza, E. 2010. Depresión Central de Chiapas-Comalapa, Chiapas. En: Ceballos, E., Martínez, L., García, A., Espinosa, E., Bezaury, E. y R. Dirzo. Diversidad, amenazas y áreas prioritarias para la conservación de las selvas secas del pacífico mexicano. CONABIO. México. pp 21-40.
- Prinsloo, G. y Nogename, N. 2018. The effects of season and water availability on chemical composition, secondary metabolites and biological activity in plants. *Phytochemistry Reviews*. 17 (4): 889-902.
- Puente-Garza, C. A., Meza-Miranda, C., Ochoa-Martínez, D., García-Lara, S. 2017. Effect of in vitro drought stress on phenolic acids, flavonols, saponins, and antioxidant activity in *Agave salmiana*. *Plant physiology and biochemistry*. 115: 400-407.
- Reich, P. B. 1994. Phenology of tropical forests: patterns, causes and consequences. *Canadian Journal of Botany*. 73: 164-174.
- Reich, P. B. y Borchert, R. 1984. Water Stress and Tree Phenology in a Tropical Dry Forest in the Lowlands of Costa Rica. *Journal of Ecology*. 72 (1): 61-74.
- Ribeiro, D. A., Gonçalves de Macêdo, D., Boligon, A. A., Alencar Menezes, I. R., Almeida Souza, M. M., Martins da Costa, J. G. 2019. Influence of seasonality on the phenolic composition of *Secundatia floribunda* A.DC (Apocynaceae) during its phenological cycle. *Acta Physiologiae Plantarum*. 41 (185): 1-16.
- Rivera, G., Elliot, S., Caldas, L. S., Nicolossi, G., Coradín, V. T. R. y Bortech, R. 2002. Increasing day-length induces spring flushing of tropical dry forest trees in absence of rain. *Trees*. 16: 445-456.
- Rzedowski, J. 1994. Vegetación de México. Editorial Limusa. México. pp 189-203.
- Rzedowski, J. 2006. Vegetación de México (Primera edición digital). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (Conabio). México.

- Sabogal, C. 1992. Regeneration of tropical dry forest in Central America, with examples from Nicaragua. *Journal of Vegetation Science*. 3:407-416.
- Sánchez-Medina, A., Peña-Rodríguez, L. M., May-Pat, F., Karagianis, G., Waterman, P.G., Mallet, A.I. y Habtemariam, S. 2010. Identification of Sakurasosaponin as a Cytotoxic Principle from *Jacquinia flammea*. *Natural Product Communications*. 5 (3): 365-368.
- Seigler, D. S. 1998. Plant Secondary Metabolism. Chapman and Hall. Kluwer Academic Publishers USA. Boston MA. USA.
- Sing, K. P. y Kushwaha, C. P. 2005. Emerging paradigms of tree phenology in dry tropics. *Current Science*. 89 (6): 964-975.
- Sing, K. P. y Kushwaha, C. P. 2006. Diversity of flowering and fruiting phenology of trees in a Tropical Deciduous Forest in India. *Annals of Botany*. 97: 265–276.
- Szakiel, A., Paczkowski, C., Henry, M. 2011. Influence of environmental abiotic factors on the content of saponins in plants. *Phytochemistry Reviews*. 10 (4):471-491
- Taiz, L. y Zeiger, E. 2006. Fisiología vegetal. Volumen 1. Publicaciones de la Universitat Jaume I, D.L. España.
- Teng, H. M., Fang, M. F., Cai, X., Hu, Z.H. 2009. Localization and dynamic change of saponin in vegetative organs of *Polygala tenuifolia*. *Journal of integrative plant biology*. 51: 529-536.
- The plant list. *Bonellia macrocarpa*. 2013. Versión 1.1. <http://www.theplantlist.org/>. Consultado el 26 de septiembre de 2019.
- Trejo-Vázquez, I. 1999. El Clima de la Selva Baja Caducifolia en México. *Investigaciones geográficas*. 39: 40-52.
- Trejo, I. 2010. Las Selvas Secas del Pacífico Mexicano. En: Ceballos, E., Martínez, L., García, A., Espinosa, E., Bezaury, E. y R. Dirzo. Diversidad, amenazas y áreas prioritarias para la conservación de las selvas secas del pacífico mexicano. CONABIO. México. pp 21-40.
- Valares-Masa, C. 2011. Variación del metabolismo secundario en plantas debida al genotipo y al ambiente. Tesis de doctorado. Departamento de Biología

Vegetal, Ecología y Ciencias de la Tierra. Universidad de Extremadura. Badajoz. España.

- Valdez-Hernández, M., Andrade, J. L., Jackson, P., Rebolledo-Vieyra, P. 2010. Phenology of five tree species of a tropical dry forest in Yucatan, Mexico: effects of environmental and physiological factors. *Plant Soil*. 329:155–171.
- Vera-Ku, M., Mena-Reynoso, M., Alpuche-Aguilar, D., Gamboa-León, R., Rosado-Vallado, M. E. 2015. Leishmanicidal, cytotoxic and antifungal activity of medicinal plants used against cutaneous diseases in mayan traditional medicine. *International Journal of Indigenous Medicinal Plants*. 48 (1): 1793-1802.
- Vila Luna, S. E. 2016. Evaluación citotóxica y antiproliferativa y elucidación estructural de metabolitos aislados de la fracción hexánica de la raíz de *Bonellia macrocarpa*. Tesis de Maestría. CICY. México.
- Waterman, P. G. y Mole, S. 1989. Extrinsic factors influencing production of secondary metabolites in plants. En: Bernays, E. A. Insect-plant interactions. Volúmen 1. CRC Press. Estados Unidos. pp 107-134.
- White, M. A., Thorton, P. E. y S. W. Running. 1997. A continental phenology model for monitoring vegetation response to interannual climate variability. *Global Biogeochem Cycles*. 11: 217-234.
- Xu, Z. y Chang, L. 2015. Identification and Control of Common Weeds. Volúmen 3. Zhejiang University Press, Hangzhou and Springer Nature Singapore. Hangzhou. China.