



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRICOLAS

CAMPUS CAMPECHE

POSTGRADO EN BIOPROSPECCIÓN Y SUSTENTABILIDAD
AGRÍCOLA EN EL TRÓPICO

**ESTUDIO DE LOS PATRONES DE ACUMULACIÓN
DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN
Haematoxylum campechianum L.**

MANUEL ALEJANDRO CHABLE VEGA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

SIHOCHAC, CHAMPOTÓN, CAMPECHE

2022

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En acción al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios Colegio de Postgraduados, el que suscribe: **Manuel Alejandro Chable Vega** alumno de esta institución, estoy de acuerdo con ser partícipe de las regalías económicas y o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realice en esta institución, bajo la dirección del doctor **Fulgencio Alatorre Cobos**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **Estudio de los patrones de acumulación de metabolitos secundarios en *Haematoxylum campechianum* L.** y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se pueden derivar serán registrados a nombre del Colegio de postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la institución, Profesor consejero o director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta institución



Biól. Manuel Alejandro Chable Vega

Vo. Bo. Dr. Fulgencio Alatorre Cobos

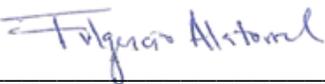
Sihochac, Champotón; Campeche a 24 febrero del 2022

La presente tesis titulada: **Estudio de los patrones de acumulación de metabolitos secundarios en *Haematoxylum campechianum* L.** realizada por el alumno: **Manuel Alejandro Chable Vega** bajo la dirección del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

BIOPROSPECCIÓN Y SUSTENTABILIDAD AGRÍCOLA EN EL TRÓPICO

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:  _____

DR. FULGENCIO ALATORRE COBOS

ASESOR:  _____

DRA. ITZEL LÓPEZ ROSAS

ASESOR:  _____

DRA. ARELY ANAYANSI VARGAS DÍAZ

ASESOR:  _____

DR. JOSÉ ANTONIO GUERRERO ANALCO

Sihochac, Champotón; Campeche a 24 de febrero de 2022

RESUMEN

El Palo de tinte (*Haematoxylum campechianum* L.) es un árbol emblemático en el Sureste de México por su contexto histórico y cultural. Se caracteriza por su gran cantidad de metabolitos secundarios, de interés en la medicina tradicional y farmacéutica. A pesar de la identificación de estos compuestos, su función biológica ligada a procesos de desarrollo o respuesta a estrés ambiental se desconoce. En este trabajo se estudiaron los patrones de acumulación y distribución de metabolitos en raíz y tronco. Además, se cuantificaron los niveles de hematoxilina, un homoisoflavonoide y el metabolito secundario más abundante en *H. campechianum*, en diferentes órganos, tejidos y en tronco a lo largo del ciclo de vida del árbol. Los análisis histoquímicos mostraron que el sistema radical presenta aerénquima y acumulación de metabolitos secundarios de manera tejido-específica; los flavonoides se presentaron desde la etapa temprana y en etapas más avanzadas de desarrollo, taninos condensados se acumularon en tejidos como xilema secundario y periciclo. Los análisis de autofluorescencia y microscopía confocal mostraron también la acumulación diferencial de metabolitos entre el duramen y el parénquima medular. Las cuantificaciones por cromatografía líquida de alta resolución indican que la hematoxilina se encuentra en diferentes órganos y tejidos, y por lo tanto no es exclusiva del duramen. Este metabolito fue hallado incluso en callo organogénico cultivado in vitro. Respecto a árboles de diferentes edades se halló que la acumulación de hematoxilina en tronco es edad-dependiente. Este trabajo sugiere una función de los metabolitos hallados en el tronco durante el desarrollo y aquellos en raíz en la adaptación del Palo de tinte a la inundación temporal.

Palabras clave: *Haematoxylum campechianum*, raíz, duramen, estrés, estrés abiótico, desarrollo vegetal.

Abstract

Palo de tinte (*Haematoxylum campechianum* L.) is an emblematic tree in the history and culture of the Mexico Southeast. This species is characterized by a large number of secondary metabolites (SMs) currently used in medicine traditional and pharmaceutical industry. Although the identification of these components, there is an increasing interest on this worldwide, little is known about the biological roles of these compounds during development and adaptation to environment. Here first we characterized the presence and accumulation patterns of some classes of SMs in roots, pitch, heartwood, and sapwood. Hematoxylin, the most abundant homoisoflavonoid in heartwood reported so far, was quantified by high-performance liquid chromatography and the data obtained show that this metabolite is present in all the tissues and organs sampled, and its accumulation during trunk development is age-dependent. The fact that hematoxylin is also found in leaves and cotyledon-derived organogenic callus open the potential to produce this metabolite under in vitro conditions. Regarding trees of different ages, it was found that the accumulation of hematoxylin in the trunk is age-dependent. This work suggests the role of the metabolites found in the trunk during development and those in the root in the adaptation of Palo de tinte to temporary flooding.

Palo de tinte (*Haematoxylum campechianum* L.) is an emblematic tree in the history

Key words: *Haematoxylum campechianum*, , root, heartwood, abiotic stress, development.

Dedicatoria y agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo impartido.

Agradezco a mis padres.

Agradezco al Dr. Fulgencio Alatorre Cobos por su apoyo en todo momento para realizar este trabajo.

Agradezco a mi consejo particular Dra. Itzel López Rosas, Dra. Arely Anayansi Vargas Días, Dr. José Antonio Guerrero Analco y Dr. José Luis Villalpando por su apoyo en todo momento.

Agradezco a los amigos que conocí y los que me acompañaron durante el proceso.

Agradezco a Bibiana por su apoyo.

Agradezco a Dios.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II MARCO TEÓRICO.....	2
2.1 Breve contexto histórico, explotación y comercialización del Palo de tinte.....	2
2.2 Descripción botánica de <i>Haematoxylum campechianum</i> L.	3
2.3 Importancia biológica de <i>Haematoxylum campechianum</i> L.....	4
2.4 Morfología y distribución de las especies del género <i>Haematoxylum</i> en la Península de Yucatán.....	5
2.5 Estatus de conservación de <i>Haematoxylum campechianum</i> L. en la Península de Yucatán.....	8
2.6 Usos del Palo de tinte y su biopotencial	9
2.7 Fenilpropanoides como metabolitos ubicuos y con amplio rango de actividad biológica.....	11
2.8 La hematoxilina es un isoflavonoide tipo brasilina	14
2.9 Estudios preliminares sobre la biosíntesis de brasilina.....	17
2.10 La raíz y su relación con la acumulación de metabolitos secundarios en <i>Haematoxylum campechianum</i> L.....	18
2.11 Desarrollo de duramen y su relación con los metabolitos secundarios	20
2.12 Cromatografía líquida de alta eficacia y su uso en el estudio de metabolitos secundarios en el género <i>Haematoxylum</i>	24
III. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	27
IV. OBJETIVOS	28
4.1 Objetivo general	28
4.2 Objetivos particulares	28
V. HIPÓTESIS	28
6.1.1 Sitios de muestreo y material biológico colectado	29
6.2.1 Pretratamiento para ablandamiento de muestras duras (madera)	32

6.2.2 Secciones en parafina.....	32
6.2.4 Análisis histoquímico y microscopía confocal de secciones en parafina o resina...	34
6.3 Procesamiento de muestras colectadas para cuantificación de hematoxilina.....	35
6.3.1 Secado y molienda de muestras	35
6.3.2 Obtención de extractos totales para cuantificación de hematoxilina.....	36
6.4 Cuantificación de hematoxilina por HPLC	37
6.4.1 Condiciones cromatográficas.....	37
6.5. Germinación in vitro de semillas en <i>Haematoxylum campechianum</i> L.....	40
6.6 Experimento de inducción de callos a partir de cotiledones de <i>Haematoxylum campechianum</i> L.....	41
6.7 Pruebas estadísticas	41
VII. DISCUSIÓN Y RESULTADOS	42
7.1 Acumulación diferencial de metabolitos secundarios durante el desarrollo de <i>Haematoxylum campechianum</i> L.....	42
7.1.1 Flavonoides y taninos condensados son acumulados diferencialmente a lo largo del desarrollo de la raíz de <i>Haematoxylum campechianum</i>	42
7.1.2 Presencia de metabolitos con autofluorescencia en la madera en dos edades contrastantes de <i>Haematoxylum campechianum</i> L.....	49
7.2 Hematoxilina es un flavonoide ubicuo en órganos y tejidos a lo largo del ciclo de vida de <i>Haematoxylum campechianum</i>	53
7.2.1 Hematoxilina se acumula en diferentes órganos y tejidos de <i>Haematoxylum campechianum</i>	53
7.2.1 Hematoxilina se acumula gradualmente a lo largo del desarrollo del tronco del árbol	56
VII CONCLUSIONES	63
VIII RECOMENDACIONES	64
VII LITERATURA CITADA.....	65

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Comparación de caracteres morfológicos entre <i>Haematoxylum campechianum</i> y <i>Haematoxylum calakmulense</i> por Cruz y Sousa, 2014.....	6
Cuadro 2. Bioactividades descubiertas en los últimos 20 años pertenecientes al grupo de flavonoides.	13
Cuadro 3., Metabolitos y sus propiedades biológicas hallados en extractos de diferentes tejidos de especies de género <i>Haematoxylum</i> .	23
Cuadro 4. Plataformas HPLC y condiciones de análisis para el estudio de metabolitos secundarios en el género <i>Haematoxylum</i>	25
S/E= Sin especificar	26
Cuadro 5. Tejidos analizados en el género <i>Haematoxylum</i> y condiciones de extracción.	26
Cuadro 6. Morfometría de los árboles de <i>Haematoxylum campechianum</i> muestreados en el sitio 1 Municipio Champotón.	31
Cuadro 7. Proceso de deshidratación de la muestra	32
Cuadro 8. Proceso de infiltración de muestras con un gradiente xilol: parafina	33
Cuadro 9. Proceso de desparafinado y rehidratación	33
Cuadro 10. Proceso de lavado con EtOH (concentración y tiempo) para la tinción con safranina	34
Cuadro 11. Parámetros usados para análisis de autofluorescencia en el microscopio confocal	35
Cuadro 12. Concentraciones utilizadas por cada tratamiento para la inducción de callos por embriogénesis somática.	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol adulto, flor de <i>Haematoxylum campechianum</i> L. A la izquierda se ilustra un árbol con diámetro de copa 2 m y una altura de 19 m aproximadamente. A la derecha, se presenta a mayor detalle la flor, hoja y tronco leñoso.	4
Figura 2. Distribución de <i>Haematoxylum campechianun</i> y <i>Haematoxylum calakmulese</i> en el Estado de Campeche, México. El mapa elaborado con datos de Plasencia-Vázquez <i>et al.</i> , 2017 y propios. Modificado de Martínez-Heredia <i>et al.</i> , 2020. el contraste es notorio en cuanto al desarrollo de las especies reafirmando el conocimiento obtenido hasta ahora sobre la ecología de estas dos especies.	8
Figura 3. Árboles maderables con uso forestal dentro del estado de Campeche. Se indican los volúmenes de madera rolliza y madera aserrada registrados en 2005 – 2006 por el Comité Estatal para el Fomento y Protección Pecuaria del Estado de Campeche.	11
Figura 4. Subclases de flavonoides de acuerdo con su estructura química (Cassidy y Minihane, 2017)...	12
Figura 6. Estructura química de hematoxilina y brasilina.	17
Figura 7. Propuesta para la síntesis de brasilina (Huang, Y., 2007).....	18
Figura 8. Arboles adultos de <i>Haematoxylum campechianum</i> creciendo en tintales, que tienen como característica un drenaje deficiente.....	19
Figura 9. Anatomía del tronco de <i>Haematoxylum campechianum</i> . A) Esquema de la anatomía general de un tronco. B) Corte transversal del tronco adulto de Palo de tinte. Se observa parte de la anatomía general del tronco leñoso: corteza, cambium, albura y duramen. C) Corte transversal de un tronco de Palo de tinte de 7 años, donde se observa la zona central o médula y los anillos de crecimiento.	22
Figura 10. Ubicación geográfica del sitio de colecta en el Municipio de Champotón. En la figura se indican las coordenadas de los cuatro muestreos realizados en este sitio.	30
Figura 11. Caracterización de árboles de <i>H. campechianum</i> de individuos adultos muestreados (Chable-Vega <i>et al.</i> , 2019).	30
Figura 14. Flujo de trabajo general durante el procesamiento de muestras de Palo de tinte.	36
Figura 15. Diagrama del proceso para la obtención de extractos totales.	37
Figura 16. A: Perfil cromatográfico del estándar de hematoxilina y curva de calibración tipo usados. A) La curva de calibración se preparó con 6 puntos, siendo 0, 10, 30, 50, 70, 90 µg/ml de estándar de	

hematoxilina (Sigma–Aldrich H3136) con una $R^2= 0.99786$. B) Perfil cromatográfico resuelto a un tiempo de retención a 2.130 min. 38

Figura 17. Cromatogramas de la detección de hematoxilina en los diferentes tipos de tejidos y órganos analizados siguiendo el protocolo aquí descrito. 39

Figura 18. La acumulación de metabolitos secundarios en raíces de *Haematoxylum campechianum* es dependiente de la edad. Durante los primeros 3 días a partir de la germinación no es visible la acumulación de metabolitos secundarios, como lo muestran observaciones al estereoscopio (A: E1, E2 Y E3). Se observa en el día 4 después de la germinación (B: E4). Se sugiere la posible presencia de compuestos acordes a su rango de emisión de fluorescencia, principalmente en el xilema y haces vasculares se es visible su acumulación (B: E4-UV). Una tinción con 2-aminoetil-difenilborinato (DBPA) (0.1 %) reveló la naturaleza tipo flavonoide estos compuestos observados y su acumulación en la parte correspondiente a floema secundario/periciclo (E4+DBPA). 43

Figura 20. Raíces juveniles y adultas de *Haematoxylum campechianum* acumulan taninos condensados y flavonoides. A) Taninos condensados revelados en cortes transversales de raíces juveniles mediante una tinción con rojo de rutenio (RR) (0.05 %). B) Autofluorescencia de lignina en raíces juveniles (izquierda superior) y adultas (centro superior). La presencia de flavonoides (paneles inferiores) se reveló con 2-aminoetil-difenilborinato (DBPA) (0.1 %). C) Tejido de aerénquima en raíces juveniles. Izquierda, corte transversal mostrando la posición del aerénquima (asteriscos rojos); derecha, amplificación para ilustrar la anatomía de las células del aerénquima (asteriscos rojos). 46

Figura 21. Anatomía comparativa de la madera en árboles de *Haematoxylum campechianum*. Cortes histológicos transversales de troncos de *Haematoxylum campechianum* de árboles de dos años y siete años de edad teñidos con safranina (1%). 50

Figura 22. Presencia de moléculas autoflorescentes en contraste a dos edades en *Haematoxylum campechianum*. Tabla de emisión de fluorescencia de compuestos autofluorescentes que se encuentran en las plantas, seguido de cortes de tronco de *H. campechianum* de dos y siete años de edad, vistos bajo un microscopio confocal, donde se comparó xilema y xilema + médula. Se observaron la mayor presencia de metabolitos secundarios en el árbol de siete años, cabe resaltar que es importante reconocer que puede haber varios tipos de moléculas autofluorescentes presentes en la misma ubicación. 52

Figura 23. Cuantificación de hematoxilina en órganos y tejidos de *Haematoxylum campechianum*. La cuantificación se realizó mediante HPLC en extractos etanólicos. Los valores mostrados corresponden a

la media \pm desviación estándar. Las medias con letras diferentes indican diferencia significativa según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). 54

Figura 24. Acumulación de hematoxilina en hojas de dos especies de Fabaceae: *H. campechianum* (Palo de tinte o Tinto) y *Enterolobium cyclocarpum* (Pich). La muestra de tronco está incluida como un control de extracción. La cuantificación se realizó mediante HPLC en extractos etanólicos. Los valores mostrados corresponden a la media \pm desviación estándar. Las medias con letras diferentes indican diferencia significativa según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). 55

Figura 25. Contenido de hematoxilina en callos cultivados in vitro derivados de cotiledón de Palo de tinte. La cuantificación se realizó mediante HPLC en extractos etanólicos. Los valores mostrados corresponden a la media \pm desviación estándar. Las medias con letras diferentes indican diferencia significativa según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). 56

Figura 26. Caracterización morfológica de árboles de *Haematoxylum campechianum*. A) Diámetro del tronco a la altura del pecho (1.30 m, DAP). B Altura de los árboles. C: Diámetro de la copa de los árboles. Los valores mostrados corresponden a la media \pm desviación estándar. Las medias con letras diferentes indican diferencia significativa según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). 58

Figura 27. Cinética de acumulación de hematoxilina en árboles de cuatro edades diferentes y diferentes ecotipos. Cuantificación por HPLC del tronco de árboles de distintas edades y colores de duramen (morado y amarillo). Los valores mostrados corresponden a la media \pm desviación estándar. Las medias con letras diferentes indican diferencia significativa según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). ... 59

I. INTRODUCCIÓN

Los tintes o pigmentos de origen natural están presentes desde épocas ancestrales y han sido útiles en muchos aspectos de la vida cotidiana, por lo cual su utilidad sigue vigente. De igual manera existen tintes de origen sintético, como la mauveína, la cual fue sintetizada por William Henry Perkin en el año de 1856, lo que marcó un antes y un después, un hito en la ciencia. Los tintes de origen natural fueron descubiertos y utilizados desde tiempos prehistóricos por la humanidad y empleados por las primeras civilizaciones con conocimientos de como extraer y aprovechar sus propiedades. Dentro de los tintes naturales uno de los más destacables es la hematoxilina, la cual se extrae del árbol *Haematoxylum campechianum*, conocido comúnmente como Palo de tinte, con una distribución endémica en la región biogeográfica Provincia Biótica Península de Yucatán (Barrera, 1962). La extracción del pigmento se lleva a cabo al cortar la parte correspondiente al tronco, en la cual se encuentra en mayor concentración el compuesto de hematoxilina y posteriormente por medio de cocción con agua, se logra obtener este compuesto de interés. La hematoxilina es un compuesto que se encuentra en el extracto total, este se obtiene de procesar la madera, su mayor auge en comercio y explotación fue durante el siglo XVI, aplicada principalmente para la industria textil en Europa, y en la actualidad es ampliamente usada en técnicas histológicas. La tinción de hematoxilina-eosina (H&E) (Tiford, 2005; Cooksey, 2021) es usada comúnmente en técnicas histológicas principalmente en la histopatología, para el diagnóstico de enfermedades como el cáncer. Hay sustitutos disponibles de este colorante, pero sus modos de acción no son exactamente iguales, por lo tanto, los patrones de tinción no son del todo satisfactorios (Dapson y Horobin, 2009). En cambio, la hematoxilina natural, tiñe de forma intensa el núcleo de las células, en específico la cromatina del núcleo y las grandes agregaciones ribosomales del citoplasma, como las que se dan en el retículo endoplasmático rugoso. Así mismo la hematoxilina posee múltiples propiedades bioactivas en pro de la salud y la ciencia, es por ello que es de suma importancia realizar estudios innovadores relacionados con el análisis, la síntesis y el modo acción, ya que el aprovechamiento históricamente desmedido y el mal manejo en la actualidad ha tenido como resultado una reducción severa en su población.

II MARCO TEÓRICO

El Palo de tinte es el nombre más popular con el cual se identifican indiscriminadamente a la mayoría de los árboles del género *Haematoxylum* por su parecido morfológico, sin embargo, este género cuenta con cinco integrantes: *Haematoxylum dinteri* (Harms) Harms especie endémica de Namibia (África), *Haematoxylum brasiletto* H. Karst, *Haematoxylum sousanum* Cruz Durán y J. Jiménez Ramírez, *Haematoxylum calakmulense* Cruz Durán y M. Sousa, y *Haematoxylum campechianum* L. Los árboles del género *Haematoxylum* prosperan en climas tropicales en el centro y sur de América, aunque su distribución no es exclusiva a éstas, pues actualmente es posible hallar algunas especies fuera de su área de distribución natural como en el trabajo realizado por Sobeh *et al.*, 2020, donde se reporta su colecta en la provincia de Qaliubía, Egipto. Esto concuerda con los estudios realizados por Chable-Vega *et al.*, 2019 reportando plasticidad ecológica para *H. campechianum*. Con lo que respecta a *H. campechianum*, esta especie tiene una distribución endémica en la unidad biogeográfica denominada Provincia Biótica Península de Yucatán, comprendida por los estados de Campeche, Quintana Roo, Yucatán y parte de los países de Guatemala y Belice (Durán y Sousa S., 2014) aunque no es exclusiva de esta región. En especial esta especie es representativa del estado de Campeche, ya que tiene un alto valor económico, histórico y cultural, con una relación tan estrecha que en la actualidad se puede considerar como parte del patrimonio natural.

2.1 Breve contexto histórico, explotación y comercialización del Palo de tinte

El registro más antiguo que se tiene sobre la explotación del Palo de tinte en la Península de Yucatán data de la segunda mitad del siglo XVI, se le atribuye el descubrimiento de este tinte natural a Marcos Ayala Trujeque, conquistador y encomendero español que experimentó con la flora de la aquella entonces provincia de Valladolid (Villegas y Torras, 2014; Villegas, 2020). Mucho antes del auge de la industria henequera, el Palo de tinte representó una de las mayores riquezas de México entre la segunda mitad del siglo XVI y el siglo XVIII. El alto valor comercial de esta

especie llegó a ser tal que fue uno de los motivos de los constantes ataques tanto de piratas y corsarios principalmente de nacionalidad inglesa y francesa a la Península de Yucatán. Se estiman que los piratas extraían anualmente 300 000 quintales de tinte de palo de tinte en la región (1 quintal = 100 kg) (Villegas, 2020). Durante todo el periodo Colonial, el Palo de tinte fue una mercancía tan valiosa que su explotación interesó tanto a españoles como extranjeros, y en consecuencia se realizó su explotación masiva en la costa del sur del actual estado de Campeche, esto tuvo como consecuencia la disminución de su población, provocando alteraciones en el equilibrio y dinámica ecológica de las diferentes especies de flora y fauna que conviven en estas áreas que fueron afectadas (Ruíz y Gómez, 1987; Rebollar *et al.*, 1993). Actualmente *H. campechianum* es considerado un árbol emblemático del estado de Campeche por el trasfondo histórico y cultural, en el pasado y la actualidad del estado de Campeche.

2.2 Descripción botánica de *Haematoxylum campechianum* L.

Dentro de la nomenclatura científica del nombre *Haematoxylum campechianum* L. el epíteto “campechianum” hace alusión al estado de Campeche, mientras que "*Haematoxylum*" significa "madera de sangre". Descrito por primera vez por Carl Von Linneo, *H. campechianum* es un árbol perenne, que pertenece a la familia Fabaceae y al género monofilético *Haematoxylum*. La especie tiene tendencia a desarrollarse en elevaciones de 50 m sobre el nivel del mar. (Haston *et al.*, 2005). Tiene nudos con espinas, un tronco irregularmente estriado que alcanza un promedio de entre 15 m de altura y 60 cm de diámetro nominal. El tronco tiene muchos vástagos ramificándose cerca de la base. La copa esparcida y redonda está formada de numerosas ramas elevadas y entrecruzadas. Las hojas son paripinnadas, de 3 a 10 cm de largo, con cuatro a ocho foliolos cuneado-obovado, de 1 a 3 cm de largo, aguda en la base, emarginada en el ápice, estrechamente veteado y glabra. Las flores se desarrollan en racimos de 5-20 cm de largo en las axilas de las hojas presentes o caídas, con cáliz de 4-5 mm de largo, profundamente lobulado; pétalos 5-7 mm de largo, de color amarillo brillante, ovario superior poco acechado y glabro, con estilo filiforme. El fruto es una

vaina lanceolada, extremadamente aplanada, de 3-5 cm de largo (Figura 1) (Niembro,2002; Orwa *et al.*, 2009).

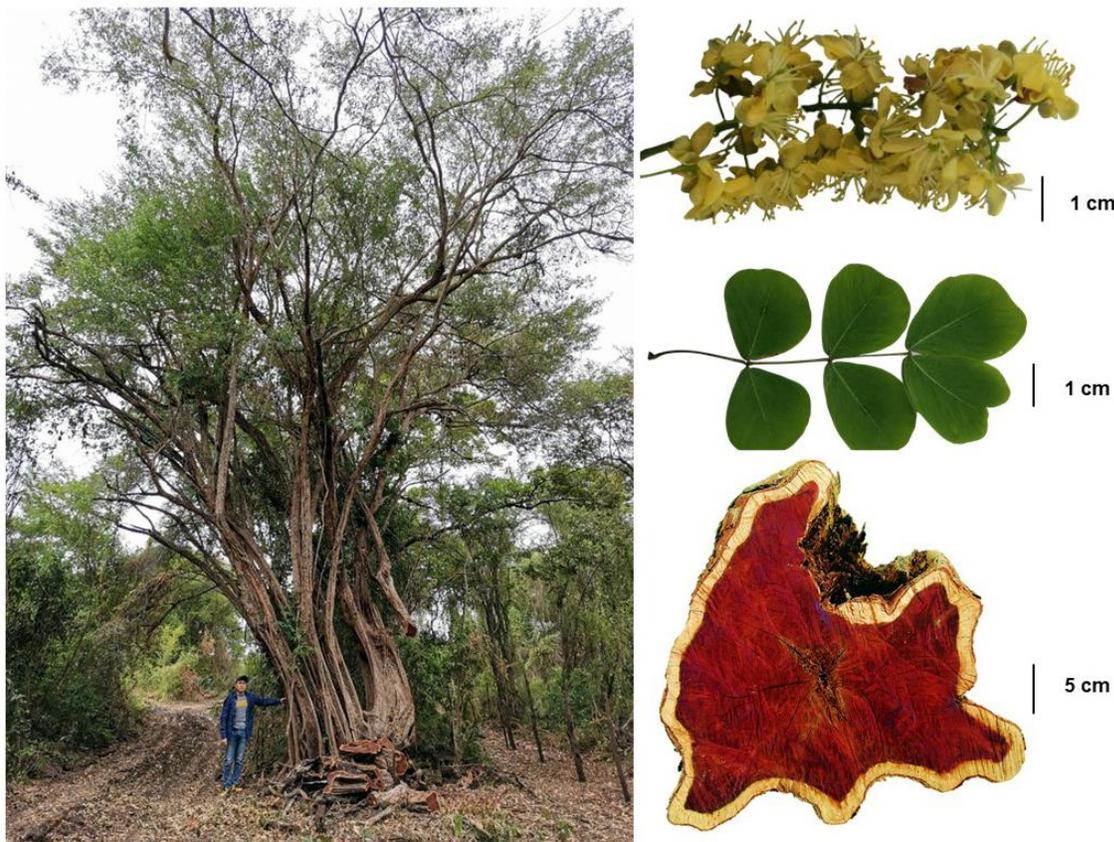


Figura 1. Árbol adulto, flor de *Haematoxylum campechianum* L. A la izquierda se ilustra un árbol con diámetro de copa 2 m y una altura de 19 m aproximadamente. A la derecha, se presenta a mayor detalle la flor, hoja y tronco leñoso.

2.3 Importancia biológica de *Haematoxylum campechianum* L.

Las selvas bajas caducifolias cubren la mayor parte de la superficie del estado de Yucatán y en menor proporción los estados de Campeche y Quintana Roo, dentro de esta formación vegetal, las selvas bajas inundables ocupan grandes fragmentos en muchas partes de la porción sur de la Península, y fragmentos más dispersos en algunos lugares ubicados más al norte (Herbario CICY, 2016). Estas áreas se

caracterizan por ser depresiones del terreno que se inundan de forma temporal o permanentemente en las cuales se desarrollan determinadas especies de árboles, que comúnmente se han denominado como "bajos inundables" (Barrera *et al.*, 1976; Duch, 1989). *H. campechianum* se desarrolla con mayor afinidad y de forma natural a los ya descritos bajos inundables, que se caracterizan por ser suelos arcillosos profundos con drenaje deficiente, conocidos peninsularmente como ak'alches (del lenguaje maya, akal: pantano, estanque o aguada y che: árbol o vegetación) (Niembro, 2002; Dzul *et al.*, 2020) siendo estos hábitats críticos que albergan gran cantidad de fauna debido a su composición ecológica, esto porque se encuentran en asociación con fuentes de agua que pueden ser permanentes o estacionales. La mayoría de las especies de animales de la región de la Península de Yucatán dependen de estas reservas de agua para su supervivencia, sobre todo durante la época de secas (Reyna-Hurtado *et al.*, 2010). Además, la selva baja inundable resalta como un hábitat muy importante para las bromeliáceas de la región de la Península de Yucatán (Pinzón-Esquivel, 2011). Dentro de los ecosistemas de la Península de Yucatán se describe como tintal a la agrupación con alta densidad poblacional de Palo de tinte (Pennington y Sarukhán, 1998). Los tintales se pueden encontrar asociados a diferentes formaciones vegetales a parte de los bajos inundables debido a su plasticidad ecológica: selva alta subperennifolia, la selva mediana subcaducifolia y subperennifolia, manglares, matorrales o incluso creciendo a la orilla de ríos u otros cuerpos de agua, en la vegetación secundaria o en acahuales (Plascencia-Vázquez 2017; Chable-Vega *et al.*, 2019) lo que ratifica su importancia ecológica para el desarrollo de flora y fauna dentro del tintal.

2.4 Morfología y distribución de las especies del género *Haematoxylum* en la Península de Yucatán

En el estado de Campeche se encuentran en mayor densidad poblacional dos especies del género *Haematoxylum*, *H. campechianum* y *H. calakmulese*, siendo esta última la quinta especie recientemente descubierta para este género. El reconocimiento de *H. calakmulense* ocurrió en el año 2014 a partir de diferencias morfológicas (cuadro 1) y

muestras provenientes de herbarios y del extremo meridional y húmedo de la Península de Yucatán (Cruz y Sousa, 2014). Dentro de la Península, ambas especies son conocidas por los mismos nombres comunes entre la población dependiendo de su localidad (Cruz y Sousa, 2014).

Cuadro 1. Comparación de caracteres morfológicos entre *Haematoxylum campechianum* y *Haematoxylum calakmulense* por Cruz y Sousa, 2014

Caracteres	<i>H. campechianum</i>	<i>H. calakmulense</i>
Árbol, arbusto	3 - 11(15), 2 - 4(7)	3 - 8 - (10), 2 - 6
Hojas (largo, cm)	(3.5) - 4 - 10.5	2 - 5 - (6)
Raquis, pecíolo y pubescencia	Glabros y ocasionalmente pelos uncinados solo en la parte adaxial	Con pelos uncinados blancos
Folíolos (número de pares)	(2a) 3 a 4 (a 5)	(3 a) 4 a 5 (a 6)
Dimensiones (cm)	1 - 3(3.5) 3 0.7 - 2.7(3)	0.7 - 1.2 (-1.5) X 0.4 - 0.7
Folíolo, ápice	Emarginado a obtuso	Obtuso a emarginado
Base	Cuneada	Atenuada
Envés	Glabro	Piloso en la base
Venación	Secundaria y terciaria evidentes	Secundaria poco evidente
Inflorescencia (Largo, cm)	(3) - 3.5 - 10(12)	1.5 - 4(4.5)
Raquis (pubescencia)	Glabro	Piloso
Pedicelo y cáliz (pubescencia)	Glabros, en ocasiones ligeramente pilosos	Pilosos
Pétalos (dimensiones, mm)	6 x 2	4 - 5 3 0.15 - 2
Pistilo (largo, mm)	ca. 7	ca. 6
Legumbre (dimensiones, cm)	3 - 4.5(5) 3 0.8 - 1.2	(2.5) - 2.8-3.5(4) 3 0.7 - 1

En la Península de Yucatán *H. campechianum* se desarrolla en tierras bajas inundables, en tintales arriba descritos, en selva alta subperennifolia, selva mediana subcaducifolia y subperennifolia, manglares, matorrales o incluso creciendo a la orilla de ríos u otros cuerpos de agua, en la vegetación secundaria o en acahuales. Este amplio rango de crecimiento demuestra su plasticidad ecológica como especie (Chable-Vega *et al.*, 2019) es decir su capacidad para modificar sus propiedades y comportamiento en respuesta a los cambios producidos por el medio ambiente. Por su parte, *H. calakmulense* se ha descrito asociado a la vegetación de selva baja sabanoide, subcaducifolia inundable y subperennifolia, y selva mediana subperennifolia y subcaducifolia alterada, en suelo arcilloso y negro húmedo (Cruz y Sousa, 2014). *H. calakmulense* se distribuye en el interior del estado de Campeche según los datos de ejemplares de herbario (Cruz y Sousa, 2014) mientras que en la Península de Yucatán se ubica en sitios del centro y sur. *H. calakmulense* es un taxón menos abundante en comparación a *H. campechianum*, debido a que no tiene la capacidad de formar tintales y se encuentran como árboles aislados y su distribución más restringida (Chable-Vega *et al.*, 2019). Por el poco conocimiento de esta especie relativamente nueva y muy similar con *H. campechianum* se requiere realizar más trabajos sobre el desarrollo del ciclo de vida de estas especies, morfología fisiología y estudios de carácter molecular sobre esta especie para corroborar que en efecto se trata de una nueva especie. Considerando la distribución de ambas especies con base a los registros históricos de colecta botánica (Plasencia-Vázquez *et al.*, 2017), en la figura 2 se representa en un mapa con una capa de altura del relieve expresado en metros sobre el nivel del mar del estado de Campeche (Martínez-Heredia *et al.*, 2020), donde se confirma las respectivas distribuciones en relación al medio ambiente previamente descrito para cada especie (Chable-Vega *et al.*, 2019)

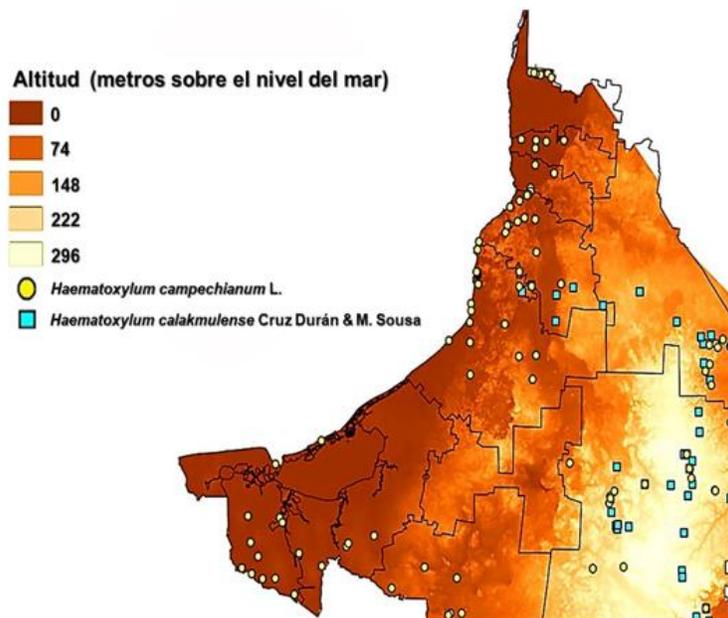


Figura 2. Distribución de *Haematoxylum campechianum* y *Haematoxylum calakmulense* en el Estado de Campeche, México. El mapa elaborado con datos de Plasencia-Vázquez *et al.*, 2017 y propios. Modificado de Martínez-Heredia *et al.*, 2020. el contraste es notorio en cuanto al desarrollo de las especies reafirmando el conocimiento obtenido hasta ahora sobre la ecología de estas dos especies.

2.5 Estatus de conservación de *Haematoxylum campechianum* L. en la Península de Yucatán

La grave situación actual a la que se enfrentan las selvas en la Península de Yucatán, y en especial el estado de Campeche, tiene su origen en el siglo XVI con la tala excesiva y exportación de maderas preciosas a Europa (Pinet, 1998). En el estado de Campeche, las selvas han sido consideradas como un fuerte recurso forestal maderable durante varias décadas. Particularmente, la sobreexplotación selectiva se ha enfocado en especies de maderas preciosas como *Cedrela odorata* (cedro) y *Swietenia machrophylla* (caoba) y de otras especies útiles como *Brosimum alicastrum* (ramón), *H. campechianum* (Palo de tinte) y *Manilkara zapota* (chicozapote) (SEMARNAT, 2010). Estas actividades extractivas han provocado alteraciones en el equilibrio ecológico de las diferentes especies que conviven en las áreas afectadas

(Ruíz y Gómez, 1987; Rebollar *et al.*, 1993). Las principales amenazas a que se enfrenta *H. campechianum* están relacionadas con las actividades antropogénicas que se desarrollan en sus hábitats (Roy y Turner II, 2006; Vester *et al.*, 2007) así como por la explotación comercial. Dados los disímiles usos que puede tener *H. campechianum* no aparece como especies amenazadas dentro de la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 (modificada por última vez el 14 de noviembre del 2019) aunque el Herbario Centro de Investigación Científico de Yucatán (CICY, 2016) lo coloca en la categoría de riesgo de atención menor.

2.6 Usos del Palo de tinte y su biopotencial

Durante la época prehispánica, los mayas utilizaron el Palo de tinte para sus rituales; principalmente para pintar su cuerpo y rostro de negro, así como para pintar los hilos con que trenzaban sus cabellos y teñir sus mantas y ropa de color negro (De la Garza *et al.*, 1983; Contreras, 2010). Lo que hace posible esta propiedad tintórea es la presencia de un compuesto denominado hematoxilina ($C_{16}H_{14}O_6$) (Figura 6) que es el que permite que el Palo de tinte tenga estos usos, lo cual impulsó su aprovechamiento y explotación indiscretas hacia la segunda mitad del siglo XVI (Contreras, 2010). A partir de esta época, al Palo de tinte se le dieron nuevos usos, que se fueron descubriendo por las propiedades ya mencionadas, de los usos más relevantes se encuentra el añejar el vino malo, para escribir mezclado junto con carbón y sal de hierro (Bicchieri *et al.*, 2008). Durante el siglo XIX se le comenzó a utilizar para luchar contra la disentería, por sus propiedades tónicas y astringentes (Larousse, 1867). Además, se le atribuyen propiedades medicinales como: antiinflamatorias, antioxidantes y antisépticas (Duke, 2008) y como anticancerígeno (Peng *et al.*, 2014). Incluso se le ha utilizado para conformar el negro de los tintes en dibujos (Pagès *et al.*, 2004) y hasta para teñir el cabello (Bechtold, 2009). También se usa en cercos como estacas o árboles vivos dada su durabilidad y resistencia a la inundación. El Palo de tinte también representa una fuente importante para elaborar carbón o leña para cocinar. En el año 2007 en el estado de Campeche se llevó a cabo el Programa Estratégico de Desarrollo Forestal Sustentable del estado de Campeche, dentro de las

acciones de este programa se realizó un documento donde se enlistan los volúmenes producidos de madera industrial que extrae y comercializa en el estado de Campeche entre el 2005 y el 2006, ubicando al Palo de tinte como una especie comercializada (Figura 3). En la actualidad, la industria forestal del Palo de tinte tiene un auge incipiente; en el estado de Campeche en el municipio de Palizada se desarrolla la sociedad de Ecocharco y la empresa Planalto, que se dedican al cultivo de Palo de tinte y extracción de hematoxilina para su comercialización. Afortunadamente en la última década, el uso de los compuestos del Palo de tinte se ha diversificado tecnológica e industrialmente (Cooksey, 2021). En la actualidad se continúa utilizando el Palo de tinte como colorante textil y es uno de los tintes de origen natural que se usan principalmente para una amplia gama de aplicaciones en técnicas de histología y microscopía para tinción celular (Rodríguez *et al.*, 2013). Se han aprovechado las propiedades electroquímicas de la hematoxilina en el diseño de biosensores, por su capacidad de unión al ADN; también la hemateína que es hematoxilina oxidada, esto por medios físicos y químicos, se emplea en la detección de virus del papiloma humano, enfermedades metabólicas causadas por mutaciones en el ADN (fenilcetonuria) organismos genéticamente modificados (OGMs) y patógenos como *Staphylococcus* (Nasirizadeh *et al.*, 2011; Agahei *et al.*, 2017; Aghili *et al.*, 2017; Nodoushan *et al.*, 2019). Muchos de los compuestos reportados en las especies del género *Haematoxylum*, no han sido completamente caracterizados y se desconoce un uso inmediato en la industria o medicina.

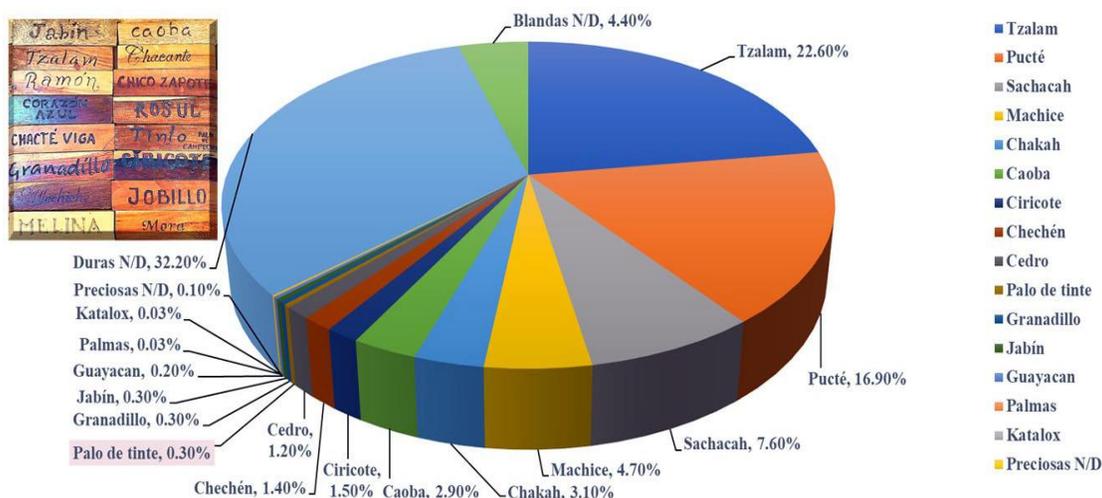


Figura 3. Árboles maderables con uso forestal dentro del estado de Campeche. Se indican los volúmenes de madera rolliza y madera aserrada registrados en 2005 – 2006 por el Comité Estatal para el Fomento y Protección Pecuaria del Estado de Campeche.

2.7 Fenilpropanoides como metabolitos ubicuos y con amplio rango de actividad biológica

Uno de los compuestos de mayor interés en *H. campechianum* es la hematoxilina, un metabolito que deriva de la ruta de los fenilpropanoides. Los fenilpropanoides son un grupo diverso de compuestos derivados del esqueleto carbónico de la fenilalanina los cuales participan en mecanismos de defensa, soporte estructural y la supervivencia de las plantas (Vogt, 2010). La vía fenilpropanoide sirve como una rica fuente de metabolitos en las plantas, que es necesaria para la biosíntesis de la lignina y sirve como punto de partida para la producción de otros compuestos importantes, como los flavonoides, cumarinas y lignanos (Fraser *et al.*, 2011). La ruta de biosíntesis de los fenilpropanoide genera una enorme variedad de metabolitos secundarios basados en los pocos intermedios de la vía del shikimato que consta de varios pasos (al menos 7) donde los intermedios provienen de la glucólisis (fosfoenolpiruvato) y la vía de la pentosa fosfato (eritrosa 4-fosfato) se convierte en corismato (Hasanuzzaman *et al.*, 2014). Los fenilpropanoides son indicadores de respuesta al estrés en plantas, como pueden ser la variación de luz o minerales, también son mediadores clave de la resistencia de las plantas a las plagas (La Camera *et al.*, 2004) también promueven la colonización de nuevos hábitats y proporcionan los recursos bioquímicos para tener

una reproducción exitosa (Bais *et al.*, 2003; Dudareva *et al.*, 2004). Los flavonoides son metabolitos secundarios, identificados en amplias clases de polifenoles, que son de bajo peso molecular, derivan de la ruta de los fenilpropanoides, siendo un amplio subgrupo de metabólicos secundarios, desempeñan una variedad de importantes actividades biológicas en plantas, animales y bacterias (Cuadro 2). Se han reportado más de 6 500 flavonoides en la naturaleza (Corradini *et al.*, 2011) que se encuentran principalmente en las plantas, generalmente ubicados en las vacuolas celulares. En cuanto a su estructura química, los flavonoides están compuestos por dos anillos de fenilo acoplados por un anillo heterocíclico 3-carbonatado (C6-C3-C6) y en total tienen un esqueleto de 15-C. Según los cambios en el anillo del carbono central, se pueden clasificar en las siguientes subclases: flavonoles, flavanonas, isoflavonoides, flavonas, flavanonas y antocianidinas (Cassidy, Minihane, 2017) (Figura 4).

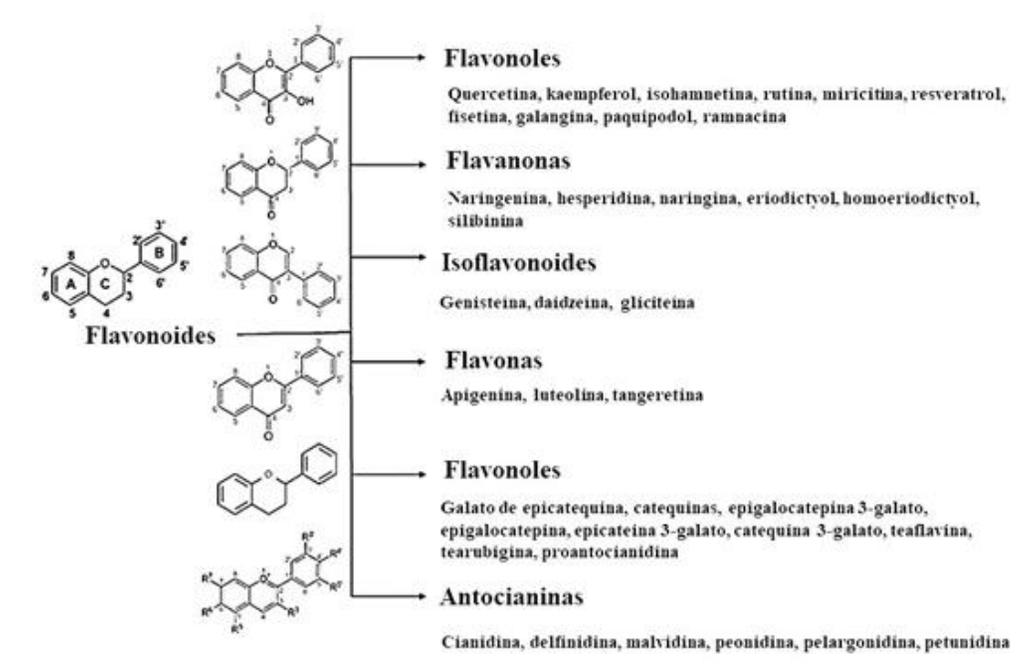


Figura 4. Subclases de flavonoides de acuerdo con su estructura química (Cassidy y Minihane, 2017).

Cuadro 2. Bioactividades descubiertas en los últimos 20 años pertenecientes al grupo de flavonoides.

Bioactividad farmacéutica	Referencias
Antioxidante	Ganesan, K. <i>et al.</i> , 2017; Islam, T. <i>et al.</i> , 2019
Antidiabético	Ganesan, K. <i>et al.</i> , 2017
Antiobesidad	Ganesan, K. <i>et al.</i> , 2018
Antihiperlipidémico	Ganesan, K. <i>et al.</i> , 2018
Antiinflamatorio	Ganesan, K. <i>et al.</i> , 2017
Antiosteoporótico	Hegarty, V.M. <i>et al.</i> , 2000
Antialérgico	Bojić, M. <i>et al.</i> , 2019
Antitrombótico	Bojić, M. <i>et al.</i> , 2019
Hepatoprotector	Ganesan, K. <i>et al.</i> , 2017
Neuroprotector	Abdulwanis Mohamed Z. <i>et al.</i> , 2019
Renoprotector	Kumar, G. <i>et al.</i> , 2008
Quimiopreventiva y anticancerosa	Ganesan, K. <i>et al.</i> , 2017
Antiviral, antifúngica y antibacteriana	Pandian, M.R. <i>et al.</i> , 2006. Mickymaray, S. <i>et al.</i> , 2020. Banu, G.S. <i>et al.</i> , 2009; Sukalingam, K. <i>et al.</i> , 2017
Anti-cancerosa	Abd El Maksoud, A.I., <i>et al.</i> , 2019; Ke, Y. <i>et al.</i> , 2019
Extinción de radicales libres	Kumar, G. <i>et al.</i> , 2005; Kumar, G. <i>et al.</i> , 2004
Hidrolasa, lipasa, α -glucosidasa, aldosa reductasa, cicloxigenasa, xantina oxidasa, hialuronidasa, fosfatasa alcalina, arilsulfatasa, lipoxigenasa, Ca + 2-ATPasa, cAMP fosfodiesterasa y varias quinasas	Kumar, G. <i>et al.</i> , 2008; Kumar, G. <i>et al.</i> , 2007

En cuanto a sus funciones en el reino vegetal, los flavonoides actúan contra diversos estreses bióticos y abióticos y exhiben un espectro diversas funciones biológicas desempeñando un papel importante en la interacción entre la planta y su medio ambiente (Pourcel *et al.*, 2007). Funcionan como un filtro UV único (Takahashi y Ohnishi, 2004) como moléculas de señal, alelopáticos compuestos, fitoalexinas, agentes desintoxicantes, compuestos defensivos contra fitopatógenos e insectos, influyen en el transporte de la hormona vegetal auxina (Buer *et al.*, 2010) tienen roles

contra la resistencia a las heladas, la resistencia a la sequía y puede desempeñar un papel funcional en la aclimatación al calor de la planta y tolerancia a la congelación.

Se ha reportado que los fenilpropanoides se sintetizan en sitios y momentos específicos dentro de la planta y son responsables del color, aroma de flores, frutos para atraer polinizadores, en consecuencia, dispersión de frutos, ayuda en semillas, germinación de esporas, crecimiento y desarrollo de plántulas (LeRoy *et al.*, 2016).

2.8 La hematoxilina es un isoflavonoide tipo brasilina

Los homoisoflavonoides o isoflavonoides (3-bencilidenecroman-4-onas) son una subclase de flavonoides ya que derivan de estos, químicamente tienen la estructura general de un esqueleto de 16 carbonos, que consta de dos anillos de fenilo (A y B) y un anillo heterocíclico (C). Son un grupo importante de metabolitos secundarios vegetales que se sintetizan a través de la vía central fenilpropanoide y las vías de las ramificaciones de isoflavonoides que son específicas de las leguminosas. Dentro de la ruta fenilpropanoide las enzimas participantes son: PAL (L-fenilalanina amoniaco liasa), C4H (cinamato 4-hidroxisasa), 4CL (4-cumarato CoA-ligasa), CHS (chalcona sintasa), CHR (chalcona reductasa), CHI (chalcona isomerasa), IFS (isoflavona sintasa), 2-HIS-2-hidroxisavanona sintasa, 2-HID 2-hidroxiisoflavanona deshidratasa, IOMT (isoflavona-O-metiltransferasa), I2'H isoflavona 2'-hidroxilasa, IFR (isoflavona reductasa), VR (vestitona reductasa) y DMID (7,2'-dihidroxi, 4'-metoxiisoflavanol deshidratasa) (Wang, X., 2011) (Figura 5-A).

En cuanto a los grupos botánicos que sintetizan homoisoflavonoides se encuentran las familias Fabaceae y Asparagaceae. Los homoisoflavonoides se dividen en cinco subclases dependiendo de su estructura química siendo estas: tipo de sappanina (I), tipo de scillasilina (II), tipo de brasilina (III), tipo de caesalpina (IV) y tipo de protosappanina (V) (Figura 5 -B), siendo la subclase brasilina la de interés. Se tiene identificados aproximadamente 240 homoisoflavonoides extraídos de raíces, cortezas, duramen, bulbos, hojas y semillas de las plantas de las familias mencionadas anteriormente, que a menudo se han utilizado en la medicina tradicional (Lin *et al.*, 2014).

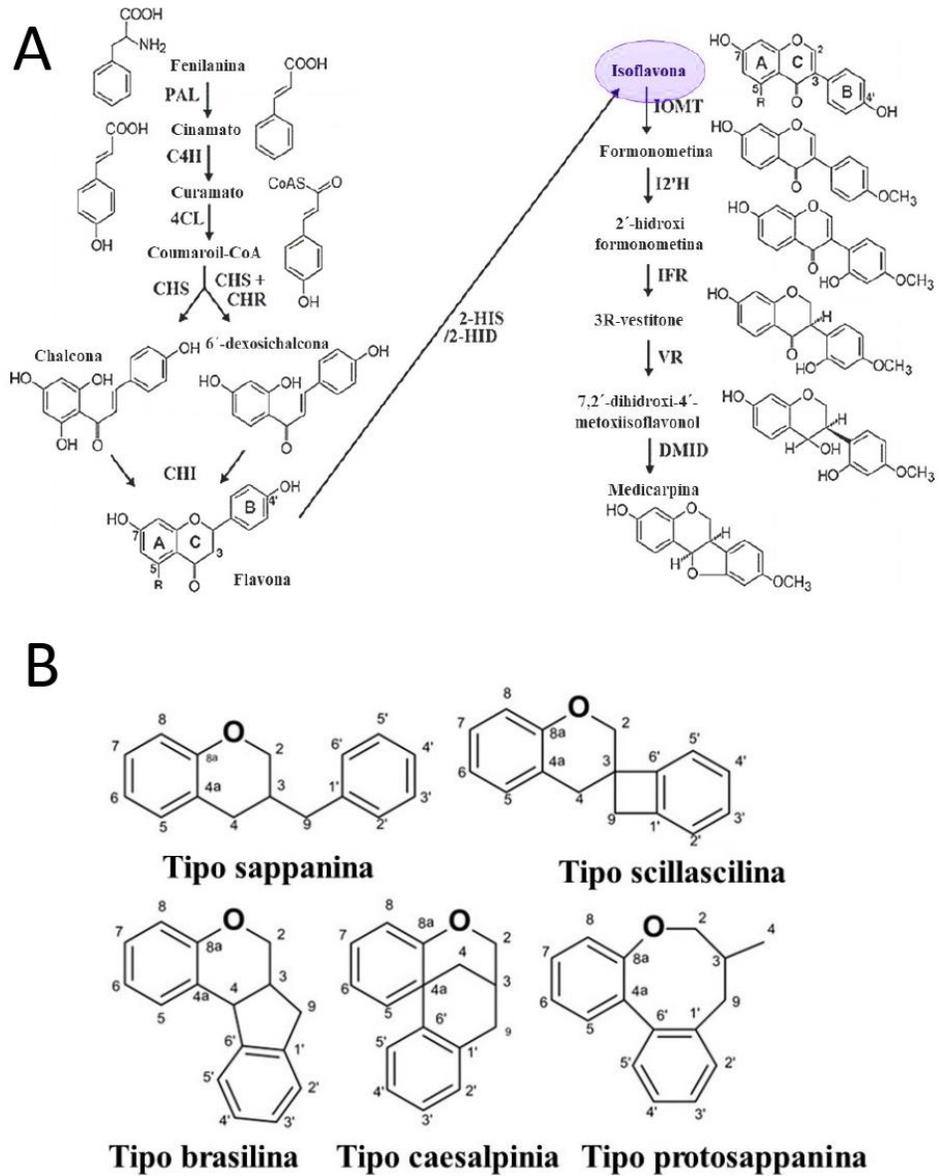


Figura 5. Isoflavonoides y homoisoflavonoides. A) Relación de la ruta de biosíntesis de los isoflavonoides con los fenilpropanoides. B) Subclases de homoisoflavoides de acuerdo con su estructura química). Modificado de Wang, X., 2011 y Lin *et al.*, 2014.

La hematoxilina ($C_{16}H_{14}O_6$) fue descrita por primera vez en 1812 por Chevreul, quien la aisló como cristales incoloros. Pertenece al grupo de homoisoflavonoides y se agrupa en la subclase tipo brasilina. Este compuesto es extraído principalmente de *Haematoxylum campechianum*. Se ha reportado que el compuesto se encuentra en mayor cantidad en la parte del tronco conocida como duramen y se extrae usando agua caliente o vapor de agua para obtener solución de color naranja o rojiza; la re-extracción puede realizarse con éter para dejarla secar y se recristalice en agua. Alternativamente, el extracto acuoso puede precipitarse con urea (Lyiola y Avwioro, 2011). Este metabolito es de los más empleados en métodos histológicos donde ayuda a teñir diferentes componentes celulares, y por lo tanto tiene un alto valor económico (Titford, 2005). Para su empleo en técnicas histológicas la hematoxilina pasa por un proceso descrito como oxidación que puede ser de manera natural o química. La oxidación da como producto la hemateína ($C_{16}H_{12}O_6$) conocida también como hemateína de alumbre o hemalumbre. La conversión de la hematoxilina a hemateína de manera natural se realiza mediante la exposición de la solución al oxígeno atmosférico y de manera acelerada con el uso de oxidantes (Llewellyn, 2009; Kiernan *et al.*, 2010).

La hematoxilina tiene un uso expandido en protocolos de tinción para descripciones microscópicas de múltiples enfermedades, aunque tiene también propiedades antibacterianas, entre otros usos potenciales. En la actualidad la hematoxilina, junto con la eosina, sigue siendo el protocolo más popular en histología y representa una opción dado que no representa un riesgo para la salud dado su origen natural. La brasilina ($C_{16}H_{14}O_5$) es otro homoisoflavonoide, obtenido del árbol *Haematoxylum brasiletto* comúnmente conocido como Palo de Brasil. También se ha reportado que es posible obtener brasilina en árboles del género *Caesalpinia sappan* y *Caesalpinia echinata*. Al igual que la hematoxilina, la brasilina puede convertirse en brasileína de forma natural o química, y se propone que dicho proceso pudiera ocurrir de manera similar a la descrita para hematoxilina previamente dada la alta similitud en su estructura química (Figura 6).

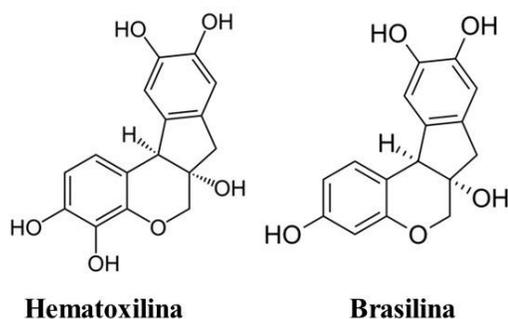


Figura 6. Estructura química de hematoxilina y brasilina.

2.9 Estudios preliminares sobre la biosíntesis de brasilina

Estudios dedicados a determinar el origen biosintético de los homoisoflavonoides comenzaron en la década de 1970, los compuestos brasilina, hematoxilina, brasileina y brasilida A3 han sido aislados en *Caesalpinia sappan* y *Haematoxylum campechianum* (Wang *et al.*, 2013) sin embargo, se presume que están presente en todo el género *Haematoxylum*.

Se tienen propuestas sobre la biosíntesis de brasilina por diversos autores, coinciden en que la brasilina puede provenir del homoisoflavonoide sapanona A, la cual es producida por una condensación de la cromanona y el arilaldehído, la hidratación de la sapanona A da lugar a la sapanona B y posteriormente se propone ocurre una oxidación y una reducción con una ciclización electrofílica subsecuente formar la fusión del sistema de anillo indano para formar finalmente brasilina (Figura 7) (Huang, Y., 2007; Castelli *et al.*, 2017; Jung *et al.*, 2015).

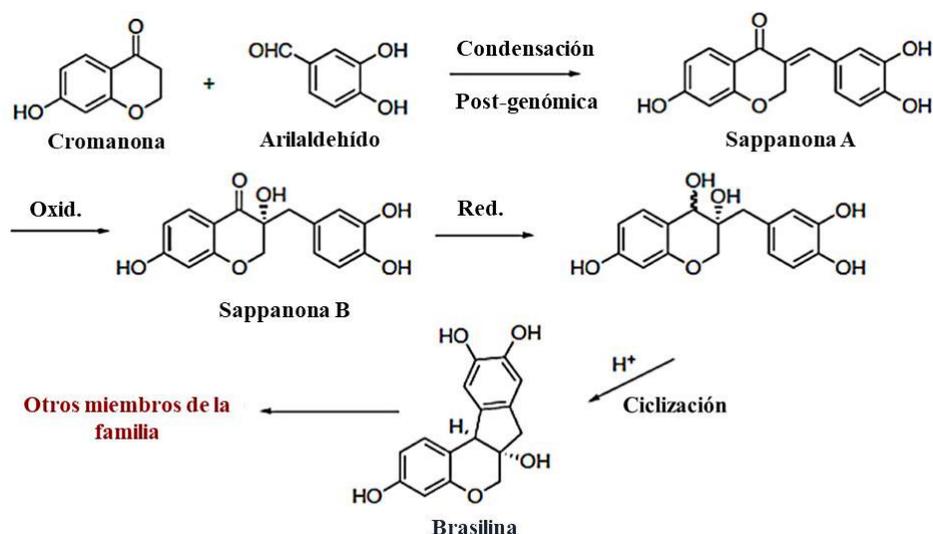


Figura 7. Propuesta para la síntesis de brasilina (Huang, Y., 2007).

2.10 La raíz y su relación con la acumulación de metabolitos secundarios en *Haematoxylum campechianum* L.

La raíz en arboles leñosos es el órgano responsable del anclaje de la planta al sustrato, al igual tiene la función de absorción de agua y minerales, también almacena y conduce sustancias necesarias para su desarrollo. Históricamente, las raíces han sido económicamente valiosas como fuente de alimento, más que un órgano de anclaje las raíces son una fuente relativamente infrutilizada y poco explorada de metabolitos secundarios, incluidos productos farmacéuticos, agroquímicos, sabores y fragancias, además las raíces representan un inmenso potencial bioquímico. Dentro de las zonas inundadas el acceso de agua a una planta está determinado por su sistema de raíces, propiedades, estructura y distribución., en el caso de *H. campechianum* crece en zonas con drenaje deficiente (Figura 8). Dentro de las zonas bajas inundables el suelo puede ocasionar estrés en las plantas, como consecuencia de hipoxia o anoxia en las raíces, la tolerancia a la anoxia es importante para las especies que se desarrollan en este medio ambiente (Kozlowski, 2002; Gibbs y Greenway, 2003; Atwell *et al.*, 2015). Esta falta o bajos niveles de oxígeno pueden ser superados con adaptaciones especiales, como la reducción de la tasa metabólica, el desarrollo de neumatóforos y de raíces adventicias desarrolladas a partir de lenticelas en el tallo (Tomlinson, 1986; Lugo *et al.*, 1990). Por ejemplo, *Macrobium* es un género de plantas de la familia Fabaceae en la

subfamilia de las Caesalpinioideae, *Macrolobium acaciifolium* (Benth.) que crece en zonas inundadas. Otra adaptación por parte de las plantas es el desarrollo de aerénquima que se crea mediante la muerte celular programada y la consiguiente lisis de las células corticales, se produce en las raíces y es esencial para la supervivencia de las plantas durante las inundaciones (Yamauchi y Nakazono, 2022) la difusión interna de oxígeno a través del espacio de gas agrandado (aerénquima) permite un suministro eficiente de oxígeno desde las partes aéreas hasta las raíces sumergidas (Colmer y Voeselek, 2009). Estudios por (Schöngart *et al.*, 2005) describen patrones de crecimiento de la madera y hacen una breve descripción de lo que pasa en la raíz y su influencia en el crecimiento del tronco. Por lo que la evidencia sugiere que las raíces de *H. campechianum* podrían sufrir cambios fisiológicos y metabólicos similares que facilitan la adaptación de la especie a la inundación. Uno de estos cambios puede ser la acumulación de metabolitos secundarios.



Figura 8. Arboles adultos de *Haematoxylum campechianum* creciendo en tintales, que tienen como característica un drenaje deficiente.

2.11 Desarrollo de duramen y su relación con los metabolitos secundarios

En términos de longevidad, tamaño y dominio ecológico, los árboles se encuentran entre las formas de vida más exitosas que han evolucionado. Las últimas características son en gran parte consecuencia de una capacidad única para formar tejidos altamente especializados, donde, al igual que otros organismos, los árboles están expuestos a una amplia variedad de patógenos potenciales a lo largo de su vida que es a menudo muy larga. La mayoría de las especies de árboles muestran diferenciación de duramen y la albura (Figura 9-A) (Lehnebach *et al.*, 2017). La formación del duramen es un proceso que se inicia en la base del tallo y se forma gradualmente hacia arriba desde el centro hacia el exterior (Taylor *et al.*, 2002). La madera de muchas especies de árboles se puede separar en las capas externas de albura y el núcleo interno de duramen.

Un rasgo característico del duramen es la acumulación de metabolitos secundarios, en el contexto de los productos forestales se conoce como 'extractivos'. Aunque la albura se conoce generalmente como tejido vivo, mientras que el duramen se considera comúnmente un tejido muerto, las células vivas de la albura de la mayoría de los árboles representan solo una fracción relativamente pequeña (5–25%) (Spicer, 2014). Las células de la albura se originan en el meristemo del cambium vascular a través de divisiones celulares periclinales hacia el centro del tallo (Spicer y Groover, 2010). La actividad cambial perenne en los árboles es la base de la formación masiva de madera y la expansión del diámetro del tallo con el tiempo. La albura permanece funcional durante varios años, que varía según la especie, después de lo cual puede convertirse en duramen. El espacio físico que define la etapa de desarrollo intermedia entre albura y duramen se conoce como la zona de transición (Spicer, 2005).

Para defenderse con éxito, los árboles combinan defensas constitutivas con defensas inducibles a corto y largo plazo. La función última de estas defensas es proteger el floema rico en nutrientes y energía, el cambium vascular y la corriente de transpiración en la albura y la acumulación de metabolitos secundarios en el duramen (Morris *et al.*, 2020). Los metabolitos secundarios se definen normalmente a excepción de la lignina y

la suberina, como productos secundarios de bajo peso molecular de plantas y hongos derivados de metabolitos primarios, y no se consideran activos en los procesos de crecimiento (Scharf *et al.*, 2014; Pusztahelyi *et al.*, 2015). Los árboles poseen una gran diversidad de metabolitos secundarios, donde diferentes clases químicas están constitutivamente presentes o sintetizadas de novo, dependiendo de la amenaza y el tipo de tejido de la xilema secundaria, por ejemplo, si se trata de albura (defensa activa) o duramen (defensa constitutiva). El xilema se compone de cuatro tipos de células principales: traqueidas, vasos, fibras (las dos últimas solo se encuentran en las angiospermas) y parénquima. El parénquima y las fibras vivas son los únicos componentes vivos del xilema funcional (albura). Las funciones clave del xilema son la conducción de agua (es decir, vasos y traqueidas) almacenamiento de carbohidratos no estructurales y agua (parénquima y fibras vivas) y soporte mecánico (traqueidas y fibras). El simplasto está formado por plasma continuo a través de conexiones célula a célula a través de plasmodesmo dentro de hoyos principalmente simples y se entrelaza entre tejidos conductores y fibras que forman dos tipos, parénquima radial y axial, juntos el parénquima radial y axial forman una red tridimensional en direcciones radial y axial y proporcionan un vínculo funcional entre el floema y el sistema de transporte de agua. Dado que la gran mayoría del xilema está compuesto por células muertas, las defensas inducibles se basan en el parénquima vivo y la red para la señalización, síntesis y transporte de metabolitos secundarios (Morris, *et. al.*, 2020).

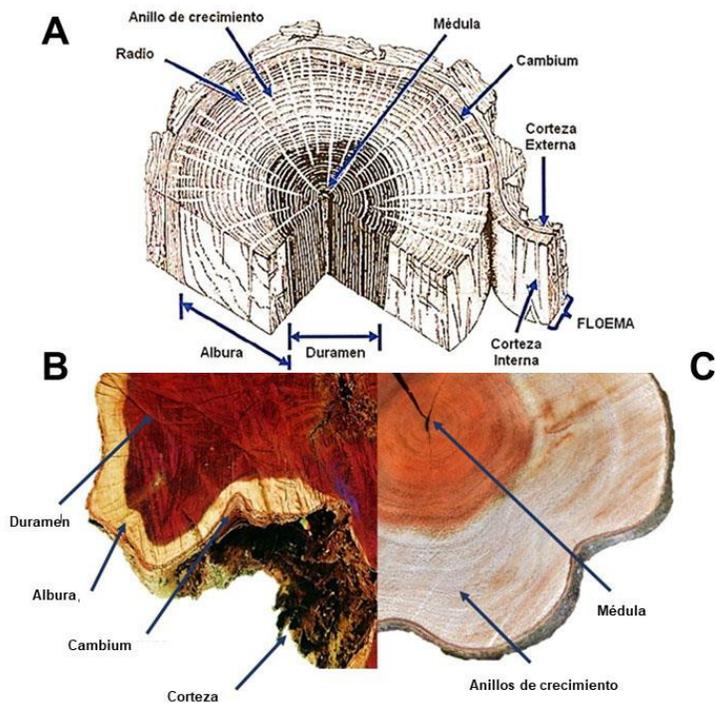


Figura 9. Anatomía del tronco de *Haematoxylum campechianum*. A) Esquema de la anatomía general de un tronco. B) Corte transversal del tronco adulto de Palo de tinte. Se observa parte de la anatomía general del tronco leñoso: corteza, cambium, albura y duramen. C) Corte transversal de un tronco de Palo de tinte de 7 años, donde se observa la zona central o médula y los anillos de crecimiento.

Varios autores han estudiado metabolitos secundarios en el género *Haematoxylum*, principalmente en *H. brasiletto*, seguido de *H. campechianum*, principalmente aquellos extraídos del duramen (Cuadro 3). Además de hematoxilina, se han identificado otros metabolitos secundarios en el género *Haematoxylum* donde su potencial bioactividad ha sido evaluada y reportada. De lo más reciente se reportan galotaninos y flavonoides presentes en la flor de *H. campechianum* que ha mostrado tener actividad antiinflamatoria, antipirética, antioxidante y analgésica (Sobeh *et al.*, 2020). Compuestos derivados de la hematoxilina como epihematoxilol B y hematoxilol B tienen alta actividad contra tirosinas cinasas, enzimas involucradas en proliferación, diferenciación y apoptosis celular; este hallazgo cobra relevancia considerando que el 70 % de los

oncogenes que participan en el desarrollo de cánceres codifican para tirosinas cinasas (Lin *et al.*, 2014).

Cuadro 3., Metabolitos y sus propiedades biológicas hallados en extractos de diferentes tejidos de especies de género *Haematoxylum*.

Especie/tejido/Metabolito	Propiedades	Referencias
<i>H. campechianum</i>. Duramen		
<i>Epihematoxilol</i> , 10-O-metilhematoxilol, 10-O-metilepihematoxilol, hematoxilol, hematoxilina.	Anti-tirosinas cinasas	Lin <i>et al.</i> , 2014
Sappanchalcona, 3-desoxisappanchalcona, hematoxilol A, 4-O-metilhematoxilol y hematoxina	Actividad espasmolítica	Escobar-Ramos <i>et al.</i> , 2014
<i>H. campechianum</i>. Flores		
Ácido gálico, Ácido digálico, Metilgallato, Trigalloil Glucosa, 1,2,3,6-tetra-O-galloilglucosa, Metildigallato, 2, 6-bis-O-Digalloil-3-O-galloyl –glucosa, Hexa-galloil-glucosa, Metiltrigallato, Pentóxido de kaempferol, Pentóxido de isorhamnetin, Ramnosido de Kaempferol, Rhamnoside de isorhamnetin, Isorhamnetin galloyl-pentoside, Quercetina galloyl-pentosido	Antioxidante, analgésica, antipirética, antiinflamatoria periféricas y centrales.	Sobeh <i>et al.</i> , 2020.
<i>H. brasiletto</i>. Duramen		
Brasilina	Antioxidante y antimicrobiano, antiproliferativa contra varias líneas celulares de cáncer humano, y desinflamatoria.	Bello-Martínez J. <i>et al.</i> , 2017; Xu, H.-X. <i>et al.</i> , 2004.
<i>H. brasiletto</i>. Corteza		
Hematoxilina, brasilina, ácido cafeico, galato de metilo, ácido gálico, floroglucinol, ácido hidroxicinámico, y metoxipsoraleno	Antibacteriana y antifúngicas con gran efectividad contra <i>Candida albicans</i>	Rivero-Cruz, J. F., 2008.
Polifenoles	Inhibidor de algunos factores de virulencia de <i>V. cholerae</i> .	García <i>et al.</i> , 2005.

2.12 Cromatografía líquida de alta eficacia y su uso en el estudio de metabolitos secundarios en el género *Haematoxylum*

La química analítica se utiliza para determinar la composición cualitativa y cuantitativa del material en estudio, un método analítico preciso que cubre con ambas formas de determinar es la cromatografía líquida de alta eficacia o HPLC, por sus siglas en inglés (High Performance Liquid Chromatography). Esta se deriva de la cromatografía de columna clásica (Kazakevich y Lobrutto, 2007) ampliamente utilizado tanto para análisis cuantitativos como cualitativos. El análisis cualitativo nos da la información sobre la naturaleza de la muestra al conocer la presencia o ausencia de ciertos componentes mientras que el análisis cuantitativo proporciona información numérica sobre la cantidad relativa de uno o más de este componente y es una buena herramienta que se integra en el desarrollo y validación de metodologías analíticas. El HPLC tiene además la capacidad de separación de los componentes de la mezcla mediante la distribución continua del componente entre dos fases, es decir separar, identificar y cuantificar los compuestos que están presentes en cualquier muestra que pueda disolverse en un líquido. La solución de la muestra se inyecta en una columna de material poroso (fase estacionaria) para la separación de los componentes de la mezcla mediante la distribución continua del componente, la fase móvil que puede ser líquido, gas o fluido supercrítico que se usa como portador de la mezcla y que se hace pasar a través de la columna cromatográfica donde se bombea a través de la columna. El principio de separación seguida es la adsorción de soluto en fase estacionaria basado en su afinidad hacia la fase estacionaria.

A pesar de que la hematoxilina es un compuesto de alto valor económico con un alto potencial biotecnológico y al alza en cuanto al mercado, los estudios de cuantificación de hematoxilina por medio del HPLC, no son muchos. Entre los trabajos más recientes, se encuentran los de Escobar-Ramos *et al.*, 2017; 2022 y Sobeh *et al.*, 2020 que han trabajado con extractos del género *Haematoxylum*. A continuación, se resumen las plataformas del HPLC, condiciones de análisis para la cuantificación (Cuadro 4) y las condiciones de extracción empleadas en los órganos y tejidos (cuadro 5) reportado para el género *Haematoxylum*.

Cuadro 4. Plataformas HPLC y condiciones de análisis para el estudio de metabolitos secundarios en el género *Haematoxylum*

Instrumento para su análisis y detector	Columna	Fase móvil o gas acarreador	Referencias
<i>H. campechianum. Flores</i>			
HPLC, sistema (ThermoQuest) detector de matriz de diodos UV 6000LP	C18	S/E	Sobeh <i>et al.</i> , 2020.
<i>H. campechianum. Duramen</i>			
HPLC, con un detector de matriz de fotodiodos (900) conjunto 996 UV	Supelcosil LC-F 25 cm x 4,6 mm, 5 µm		Escobar-Ramos <i>et al.</i> , 2022
HPLC, con un detector de matriz de fotodiodos (900) conjunto 996 UV	Supelcosil LC-F 25 cm x 4,6 mm, 5 µm	S/E	Escobar-Ramos <i>et al.</i> , 2017
HPLC, detección de matriz de diodos	S/E	S/E	Karapanagiotis, I. <i>et al.</i> , 2015
HPLC PU-1580, detector de matriz de diodos MD 1510 Jasco	Supelco Discovery C18 (25 cm x 4.66 mm, diámetro de partícula 5 µm)	S/E	De Luca, E. <i>et al.</i> , 2018
<i>H. brasiletto. Duramen</i>			
HPLC, detección de matriz de diodos	S/E	metanol y ácido acético al 1%	Bello Martínez, 2017
HPLC, detección de matriz de diodos	S/E	metanol y ácido acético al 1%	Xu, <i>et al.</i> , 2004

HPLC, detección de matriz de diodos	S/E	S/E	Karapanagiotis, <i>et al.</i> 2015
H. brasiletto. Corteza			
HPLC, detección de matriz de diodos	S/E	S/E	Rivero-Cruz, 2008
HPLC, detección de matriz de diodos	S/E	S/E	García <i>et al.</i> , 2005

S/E= Sin especificar

Cuadro 5. Tejidos analizados en el género *Haematoxylum* y condiciones de extracción.

Tejido/órgano	Peso	Temperatura	Tiempo	Solvente	Referencias
H. campechianum					
Flores	400 g	Ambiente	S/E	Solución metanólica y ácido clorhídrico	Sobeh <i>et al.</i> , 2020.
Duramen	200 g	ambiente	S/E	Metanol	Escobar-Ramos <i>et al.</i> , 2022
Duramen	S/E	S/E	S/E	6 mL de metanol y 200 µL de ácido clorhídrico al 37 %	Karapanagiotis, <i>et al.</i> , 2015
Duramen	7.5 kg	Ambiente	3 veces por 24 h.	Metanol	Escobar-Ramos <i>et al.</i> , 2017
Duramen	S/E	S/E	2 h. al día con 3 repeticiones	Etanol al 95%	De Luca, <i>et al.</i> , 2018
Duramen	S/E	S/E	S/E	Solución metanólica con ácido clorhídrico	Cooksey, 2010
H. brasiletto					
Duramen	1 kg	Ambiente	Duramen	Etanol al 95%	Bello Martínez, 2017
Duramen	100 g	100 C°	3 h.	Etanol al 95%, se repitió tres	Xu, <i>et al.</i> , 2004

				veces	
Duramen	1 kg	Ambiente	3 días	10 mL de metanol y 200 μ L de ácido clorhídrico al 40%	García <i>et al.</i> , 2005
Duramen	300 g	Ambiente	3 días	Metanol y agua	Nirmal, <i>et al.</i> , 2015
Corteza	1 kg	Ambiente	24 h.	Solución metanólica con ácido clorhídrico	Rivero-Cruz, 2008

S/E= Sin especificar

III. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

H. campechianum es una especie endémica y emblemática de la Península de Yucatán, con un gran valor histórico y cultural. En la actualidad *H. campechianum* tiene un valor comercial alto dada a la presencia de un metabolito denominado hematoxilina reportado presente principalmente en el tronco del árbol. Este compuesto es ampliamente usado en medicina en histopatología y dadas sus propiedades fisicoquímicas se ha empleado en dispositivos electrónicos para la cuantificación de biomoléculas (ADN, virus). Junto con este compuesto, un grupo amplio de metabolitos han sido reportados, los cuales tienen actividad biológica con aplicación potencial en la salud humana e industria. En la Península, los estudios más recientes sobre *H. campechianum* son sobre sus aplicaciones en la restauración ecológica (Zamora, 2010), su resistencia a los ambientes degradados (Pérez, 2014), distribución, densidad y estructura dasométrica (Chable-Vega *et al.*, 2019) y fenología (Zamora-Cornelio, *et al.*, 2010; Euan-Tun, *et al.*, 2021). Existe poco conocimiento sobre las rutas metabólicas de biosíntesis y degradación de los metabolitos reportados en el género *Haematoxylum*, y su función biológica dentro del árbol en procesos de desarrollo o respuesta a estreses bióticos o abióticos. En este trabajo caracterizamos cualitativamente la riqueza de metabolitos secundarios presentes en la raíz y tronco del Palo de tinte cuya presencia pudiera estar relacionado a su tolerancia a la inundación y

resistencia a condiciones de degradación por agentes ambientales (bacterias, hongos, insectos, entre otros). En una segunda fase del trabajo cuantificamos la acumulación de hematoxilina en órganos, tejidos y a lo largo del desarrollo del ciclo de vida del árbol. El conocimiento de la dinámica de la hematoxilina en *H. campechianum* pudiera ser una herramienta importante para identificar en cuál etapa de crecimiento es óptimo el aprovechamiento de este recurso forestal. Finalmente exploramos la obtención de hematoxilina en material vegetal cultivado in vitro, lo que abre la posibilidad para la producción de este metabolito bajo condiciones controladas.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar los patrones y niveles de distribución y acumulación de metabolitos secundarios en órganos y tejidos durante el desarrollo del árbol *Haematoxylum campechianum* L.

4.2 Objetivos particulares

- Explorar la riqueza cualitativa de metabolitos secundarios en raíces y troncos de *H. campechianum* mediante histoquímica y autofluorescencia.
- Cuantificar el contenido de hematoxilina en diferentes órganos y tejidos de árboles adultos y lo largo del desarrollo del tronco de árboles de *H. campechianum* mediante HPLC.
- Cuantificar el contenido de hematoxilina en tejidos de *H. campechianum* crecidos in vitro.

V. HIPÓTESIS

De los tejidos y órganos que integran al árbol *Haematoxylum campechianum* la raíz y el tronco muestran la mayor diversidad de metabolitos secundarios, con patrones de acumulación y distribución que son tejido-específico y edad-dependiente.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Sitios de muestreo

Para este estudio se realizaron colectas en dos sitios de muestreo: en las cercanías al Colegio de Postgraduados Campus Campeche y en el municipio de Palizada, Campeche. A continuación, se describen ambos sitios y los materiales colectados.

6.1.1 Sitios de muestreo y material biológico colectado

Sitio 1 Municipio de Champotón: Se colectaron muestras de juveniles y árboles adultos silvestres de *H. campechianum* perteneciente a una propiedad de terreno ejidal con las coordenadas latitud N 19°20'38.64303" y longitud: W 90°40'29.54707", ubicado al costado de la carretera federal 188: Haltuchén – Sihochac perteneciente al municipio Champotón, Campeche (Figura 10). El sitio es semi-conservado con vegetación secundaria o acahual, en aprovechamiento y está sujeto a criterio de los propietarios ejidales. A simple vista el sitio presentaba vegetación con distintos grados de madurez, sin trabajos previos de caracterización florística en el sitio y lugares aledaños.

Los individuos adultos muestreados en este sitio cumplen con la altura y el diámetro a la altura del pecho (DAP) según la caracterización realizada por Chable-Vega *et al.*, 2019 (Figura 11). En el cuadro 6 se presentan los datos morfométricos de los árboles muestreados. La identificación taxonómica en campo de los ejemplares muestreados se corroboró siguiendo la descripción reportada por Cruz y Sousa, 2014. Las muestras se herborizaron y se pretende depositar en el herbario-UCAM del Centro de Investigaciones Históricas y Sociales de la Universidad Autónoma de Campeche, registrado en la Asociación Internacional de Taxonomía (Index Herbariorum), esto para la obtención de los váuchers correspondientes.

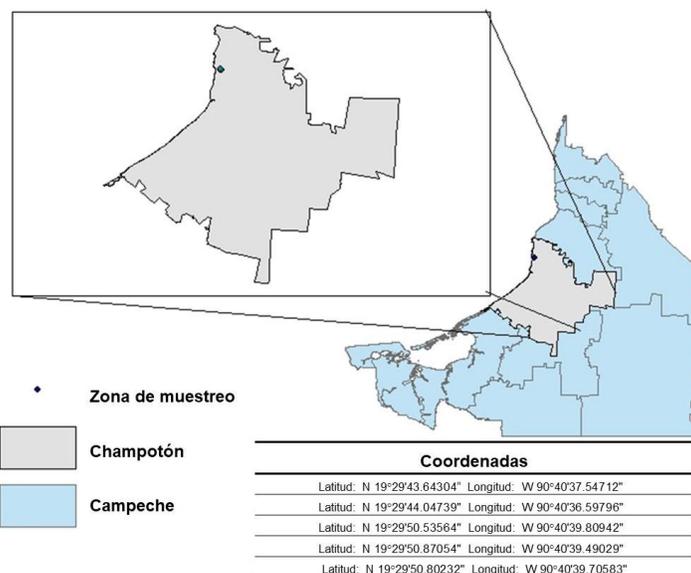


Figura 10. Ubicación geográfica del sitio de colecta en el Municipio de Champotón. En la figura se indican las coordenadas de los cuatro muestreos realizados en este sitio.

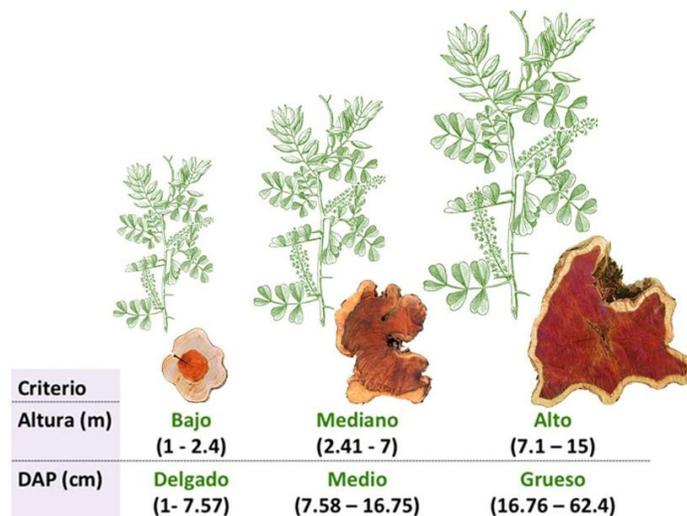


Figura 11. Caracterización de árboles de *H. campechianum* de individuos adultos muestreados (Chable-Vega *et al.*, 2019).

En este sitio se colectaron las siguientes muestras de cinco individuos adultos como se describe a continuación: raíces adultas, duramen (muestra compuesta), tallo de ramas

adultas (diámetro de 30- 100 cm), tallo de ramas jóvenes (diámetro de 1-30 cm), hojas adultas (paripinnadas, con 4-8 foliolos), flores y frutos

Cuadro 6. Morfometría de los árboles de *Haematoxylum campechianum* muestreados en el sitio 1 Municipio Champotón.

Altura del árbol (m)	Ø Copa de árbol (cm)	DAP tronco (cm)	Números de ramas	Ø Rama joven (cm)	Ø Rama adulta (cm)	Ø Raíz (cm)
10.9 ± 3.08	91.26 ± 55.93	10.28 ± 4.64	3 ± 1.41	20.76 ± 3.39	51.96 ± 14.44	19.2 ± 6.96

DAP. Diámetro a la altura del pecho. Los valores mostrados corresponden a la media ± DE. Ø= diámetro.

Sitio 2 Municipio de Palizada: Este sitio está constituido por plantaciones comerciales de Palo de tinte propiedad de la empresa PlanAlto, localizado en el municipio de Palizada, Campeche (N 18°03'43.9992"-W 92°00'57.4992"). Aquí se colectaron solamente muestras de tronco de individuos de diferentes edades de desarrollo. Se colectaron muestras de tronco de árboles de 2, 3, 5 y 7 años. Para cada edad, se muestrearon tres árboles. A cada individuo se le estimó la altura y el diámetro de la copa con ayuda de un medidor láser de distancia y el diámetro a la altura del pecho (DAP) a 1.30 m de altura con una cinta diamétrica marca Lufkin. En el caso de los árboles con más de una rama a la altura del pecho se les midió el DAP de cada rama, se realizó la sumatoria con el DAP y se calculó el valor promedio.

6.2 Análisis de metabolitos en Palo de tinte por histoquímica y microscopía

Para los análisis por histoquímica y microscopía, se obtuvieron cortes histológicos a mano (raíz) o las muestras (raíz y madera) fueron incluidas en parafina o resina y seccionadas con micrótopo. Para micrótopo, las muestras fueron procesadas como a continuación se describe.

6.2.1 Pretratamiento para ablandamiento de muestras duras (madera)

Las muestras duras como madera sometieron a un protocolo de ablandamiento (Quintilhan *et al.*, 2021; Requena-Rojas *et al.*, 2019) previo a su análisis por histología. Secciones de madera se sumergieron en una solución Copenague (glicerol, etanol y agua, en proporción 1:3:1) por 4 semanas. Durante los primeros 15 días las muestras se les aplicó vacío para facilitar la infiltración. Después de este tratamiento, las muestras fueron transferidas a agua destilada y colocadas en autoclave por 15 min (121 °C, 15 PSI). Las muestras tratadas fueron mantenidas en agua hasta su análisis histológico.

6.2.2 Secciones en parafina

Las muestras de raíz y madera fueron deshidratadas usando una gradiente de alcohol, como se ilustra en el cuadro 7. Al término las muestras fueron sometidas a una cinética de infiltración gradual de parafina, (cuadro 8). Por último, se colocaron las muestras en los cassettes de inclusión y parafina. Los bloques se dejaron a 4 °C por 12 h como mínimo antes de seccionar. Se prepararon secciones del tronco transversales y longitudinales (10-14 μ M) usando un micrótopo rotatorio automatizado (Leica RM2255).

Cuadro. 7. Proceso de deshidratación de la muestra

Etanol	Tiempo
30 %	24 horas
50 %	24 horas
70 %	24 horas
85 %	24 horas
96 %	24 horas
100 %	24 horas

Cuadro. 8. Proceso de infiltración de muestras con un gradiente xilol: parafina

Xilol	Parafina	Tiempo
70 %	30 %	24 horas
50 %	50 %	24 horas
30 %	70 %	24 horas
15 %	85 %	24 horas
0 %	100 %	24 horas

El proceso de desparafinado se realizó haciendo lavados en xilol por determinados tiempos, seguido se hizo el proceso de rehidratación con enjuagues en determinadas concentraciones y tiempos como se muestra en el cuadro 9. Para los cortes histológicos se empleó un microtomo rotatorio automatizado Leica RM2255 (8-10uM).

Cuadro 9. Proceso de desparafinado y rehidratación

Desparafinado	
Xilol	Tiempo
100%	1 minuto
100%	13 minutos

Rehidratación	
EtOH	Tiempo
100%	5 minutos
90%	5 minutos
70%	5 minutos

H ₂ O	Tiempo
100%	5 minutos
100%	1 minuto

6.2.4 Análisis histoquímico y microscopía confocal de secciones en parafina o resina

Las secciones obtenidas fueron teñidas con 150 µl de safranina al 1% por una hora. Seguido se realizó un enjuague con EtOH con la concentración y los tiempos que se usaron, esto ilustrado en el cuadro 10.

Cuadro 10. Proceso de lavado con EtOH (concentración y tiempo) para la tinción con safranina

EtOH	Tiempo
50%	3-8 segundos
70%	3-8 segundos (dos veces)

DPBA (2-aminoetil difenilborinato) (Sigma Aldrich, 1mg) una sonda fluorescente para detección de flavonoides. La tinción con DPBA (0.1% en metanol) se realizó durante 5 min en oscuridad y temperatura ambiente. Al terminar la incubación se realizó un lavado con agua destilada y analizaron inmediatamente. Los cortes transversales teñidos con safranina fueron visualizados en un microscopio estereoscopio marca Leica M165 FC. Las secciones teñidas con DPBA bajo un microscópico confocal: ZEISS LSM 700. Existen numerosos tipos de fluorocromos y cada uno de ellos tiene su espectro de absorción y de emisión específico que depende de la composición y estructura de la molécula fluorescente, para los perfiles de autofluorescencia por microscopía confocal de las secciones de madera y raíz fueron aplicadas diferentes longitudes de excitación y absorción, que se muestran en el cuadro 11.

Cuadro 11. Parámetros usados para análisis de autofluorescencia en el microscopio confocal

Longitud de onda de excitación (nm)	Potencia láser	Filtro	Longitud de onda de emisión (nm)
405	7%	LP 490	428 - 480
488	13%	LP 490	525 →
555	28%	LP 490	608 →
639	8%	LP 490	608 →

6.3 Procesamiento de muestras colectadas para cuantificación de hematoxilina

6.3.1 Secado y molienda de muestras

Las muestras colectadas se procesaron de acuerdo al protocolo de cuantificación de hematoxilina en el duramen de *H. campechianum* descrito por Escobar-Ramos *et al.*, 2017, con las adecuaciones pertinentes para el tamaño de muestra. Para su preparación de las muestras, se secaron en la estufa de aire forzado (SHEL LAB) a 60 °C hasta obtener el peso constante. Una cinética de pérdida de agua se muestra en la figura 13. Una menor variación entre el peso inicial y final fue observada en aquellos tejidos con menor contenido de agua (raíz, tronco y ramas).

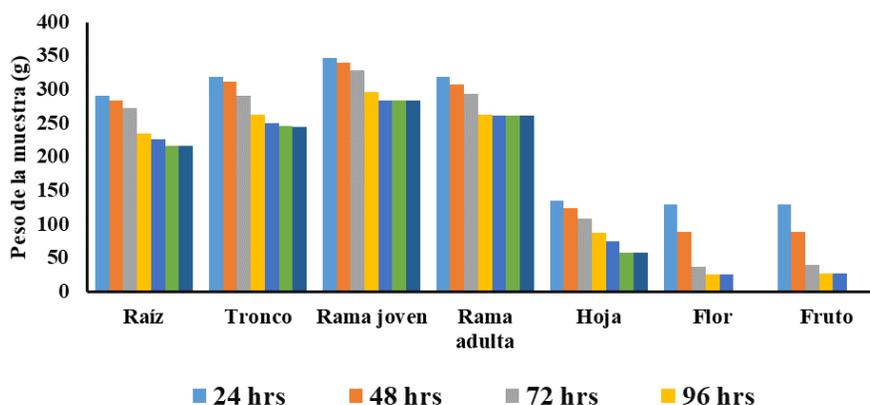


Figura 13. Cinética de pérdida de agua en muestras colectadas en el sitio 1 Municipio Champotón.

Posterior al secado, las muestras se trituraron y molieron con un molino eléctrico pulverizador con potencia de 25,000 rpm (Marca: Gustark, Modelo: mkz-Molin2000pla). El material molido se pasó a través de un tamiz con 1mm de apertura, esto hasta obtener una muestra fina y homogénea. El procesamiento general de las muestras se ilustra en la figura 14.

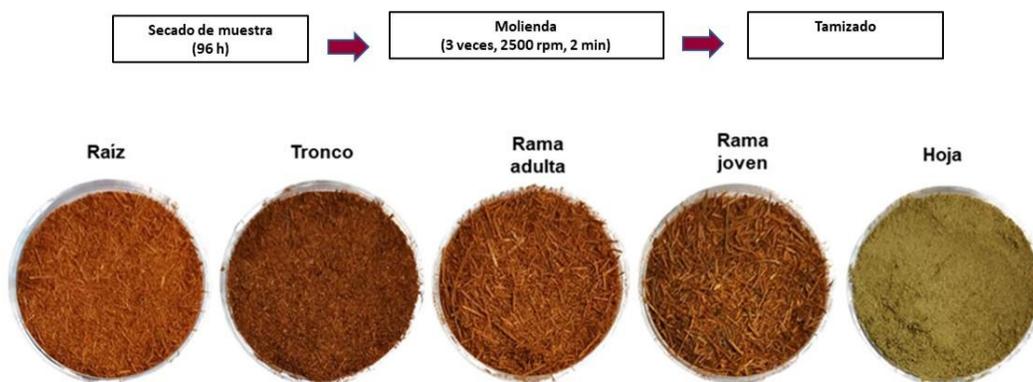


Figura 14. Flujo de trabajo general durante el procesamiento de muestras de Palo de tinte.

6.3.2 Obtención de extractos totales para cuantificación de hematoxilina

Para la obtención de los extractos totales se consideraron las pruebas previas realizadas en este laboratorio y los trabajos previamente reportados donde se ha cuantificado hematoxilina (Cuadro 4 y 5). Considerado el tipo y tamaño de muestras en esta investigación se optó por implementar la siguiente metodología: cinco gramos de muestra, etanol absoluto 99,9 %, marca: JT Baker (60 ml de volumen final). El proceso de extracción se llevó a cabo por 48 horas, el cual se dividió en dos tiempos de 24 horas, donde se agregaron 30 ml y al pasar 24 horas se realizó una reextracción agregando 30 ml de solvente, esto a temperatura ambiente. Para cada muestra, cuatro réplicas biológicas fueron analizadas. En la figura 15 se ilustra el proceso general de trabajo para esta fase. Al término de la fase de extracción, el sobrenadante fue decantado, transferido a tubos tipo Falcón y centrifugado a 5000 rpm por cinco min. Los extractos fueron entonces guardados a 4 °C hasta su análisis, en un lapso no mayor a 48 h.

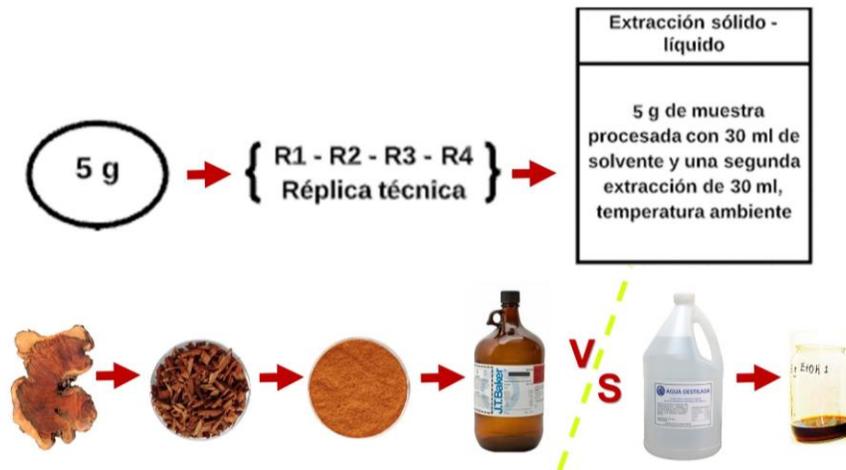


Figura 15. Diagrama del proceso para la obtención de extractos totales.

6.4 Cuantificación de hematoxilina por HPLC

6.4.1 Condiciones cromatográficas

Para las condiciones cromatográficas se usó como base el protocolo desarrollado por (Marshall *et al.*, 1974) con algunas modificaciones realizada por el grupo de Dres. José Luis Villalpando, Itzel López Rosas y Fulgencio Alatorre, del Colegio de Postgraduados Campus Campeche.

El sistema HPLC usado (Thermo Scientific, modelo UltiMate 3000) cuenta con un detector de arreglo de diodos, con el software de sistema de datos cromatográficos Chromeleon 7 y una columna de selectividad Hypersil gold 3 μM (150 x 4.6 mm). La hematoxilina se detectó a 292 nm acorde con lo reportado por (Marshall *et al.*, 1974), se empleó como fase móvil una mezcla metanol (MetOH) y agua destilada filtrada estéril (H_2O) en proporción 50%/50%, con 0.1% de ácido fórmico (CH_2O_2), con un tiempo de proceso de 5 minutos.

Se preparó una solución madre a partir del estándar de hematoxilina (Sigma–Aldrich H3136). Para ello se utilizaron 30 mg del estándar diluido en 30 ml de agua destilada,

filtrada (40 μm) y estéril. Con esta solución se realizó una curva de calibración de 6 puntos: 0, 10, 30, 50, 70, 90 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 16).

De los extractos a analizar, se tomaron 100 μl de extracto que fueron aforados a 10 ml de fase móvil, homogenizados en vórtex y filtrados. De la dilución preparada se tomaron 5 μl para inyectar de forma manual al HPLC. Todas las muestras fueron analizadas por cuádruple. Los cromatogramas tipo para las muestras analizadas se ilustran en la figura 17.

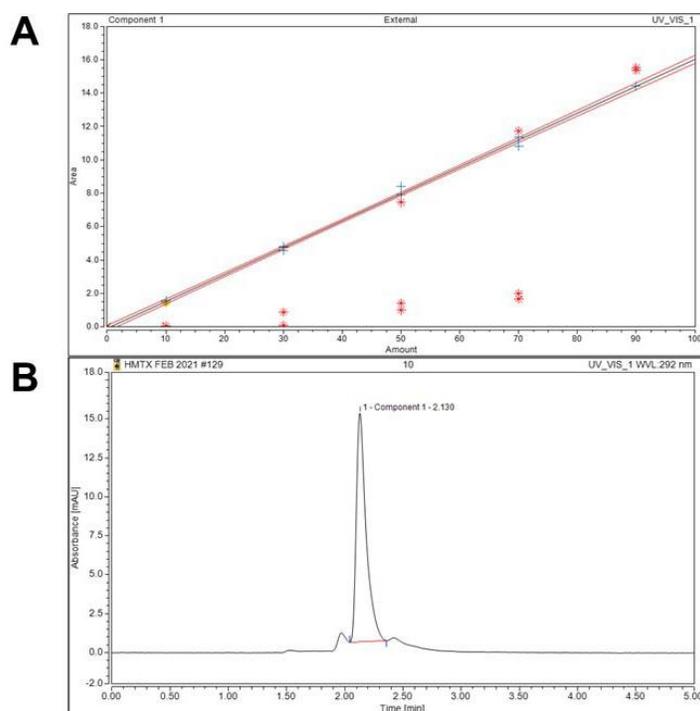


Figura 16. A: Perfil cromatográfico del estándar de hematoxilina y curva de calibración tipo usados. A) La curva de calibración se preparó con 6 puntos, siendo 0, 10, 30, 50, 70, 90 $\mu\text{g/ml}$ de estándar de hematoxilina (Sigma–Aldrich H3136) con una $R^2 = 0.99786$. B) Perfil cromatográfico resuelto a un tiempo de retención a 2.130 min.

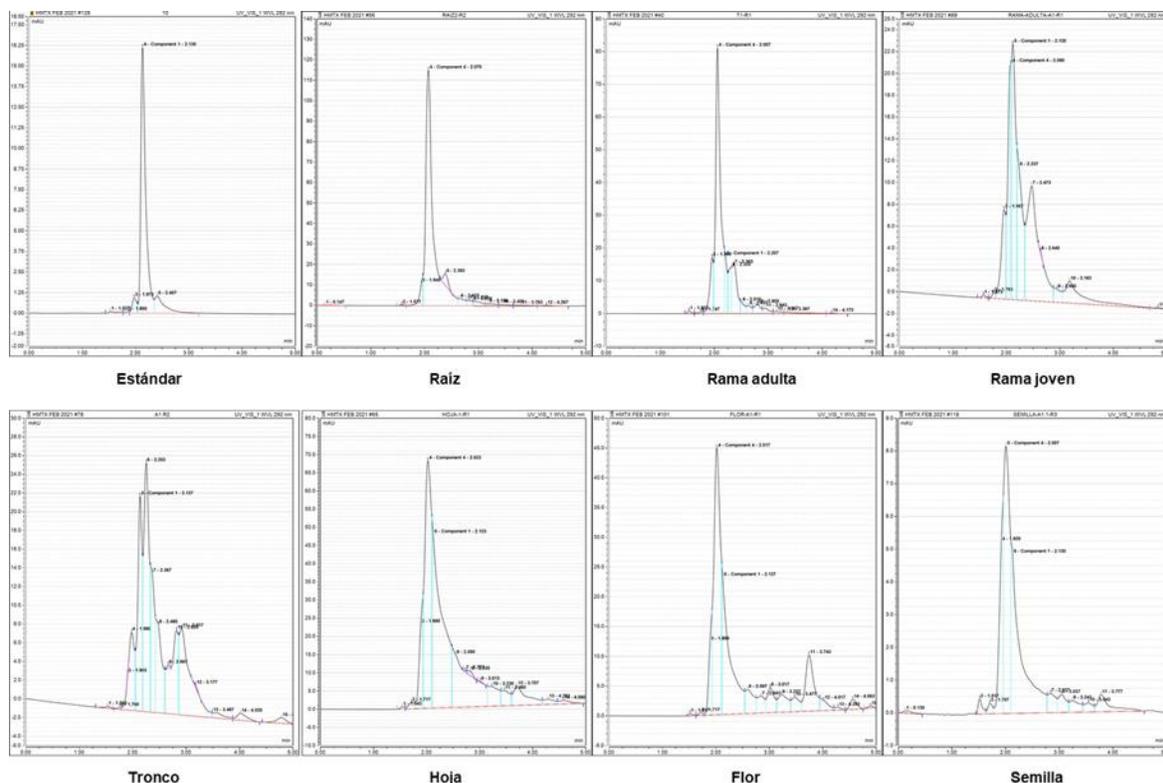


Figura 17. Cromatogramas de la detección de hematoxilina en los diferentes tipos de tejidos y órganos analizados siguiendo el protocolo aquí descrito.

Para estimar la concentración de hematoxilina en los tejidos y órganos cuantificados, que se presentan en mg de hematoxilina/ mg de muestra seca, se obtuvo aplicando la ecuación de regresión lineal simple: $y= ax+b$, obtenida la curva de calibración realizada, esto con la finalidad de obtener el valor de la ecuación de la recta que nos permite hacer estimaciones con el valor de la altura del valor promedio de los mAU (unidad de miliabsorbancia, o 0,001 unidades de absorbancia (AU) que se utiliza para medir la absorbancia).

El resultado obtenido de la concentración es $\mu\text{g}/ \text{ml}$, seguido se multiplicó por su factor de dilución (100) para convertir las unidades de medida de $\mu\text{g}/ \text{ml}$ a mg/ml (multiplicado por 1000). Por último, para calcular la masa (peso seco) por volumen del extracto de Palo de tinto (60 ml) se utilizó la formula: $\text{masa}= \text{volumen} / \text{densidad}$. Donde la unidad de medida para expresar el rendimiento es mg g^{-1} de peso seco

6.5. Germinación in vitro de semillas en *Haematoxylum campechianum* L.

Para la obtención de raíces jóvenes o cotiledones, semillas de Palo de tinte (Sitio 1 Municipio Champotón) fueron germinadas in vitro como se describe a continuación:

Se realizó una pre-desinfección de las semillas siguiendo los siguientes pasos:

- 1- Se lavaron las semillas con agua destilada y jabón comercial por diez minutos.
- 2- Se lavaron con etanol al 70% por 30 segundos.
- 3- Se lavaron con agua clorada al 1% v/v por un minuto.
- 4- Se lavaron con etanol al 70% por 30 segundos.
- 5- Se lavaron con agua destilada tres veces por un minuto.

El siguiente paso fue realizado en la campana de flujo laminar en condiciones estériles:

- 1- Se lavaron con etanol al 100% por ocho minutos en agitación con un tubo cónico en condiciones estériles.
- 2- Se decantó el etanol y se agregó cloro comercial al 20% v/v y se agitaron durante ocho minutos en un tubo cónico estéril.
- 3- Se decantó el cloro y se enjuagó con agua destilada estéril durante ocho minutos en un tubo cónico estéril, este proceso se repitió tres veces.

A continuación, se preparó 500 ml de un medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) basal (2.215 g) adicionado con 15 g de sacarosa, 0.265 g de 2 N – morfolino (MES) y 3.5 g de agar, donde fueron colocadas envases de vidrio estériles. El cultivo fue incubado a temperatura ambiente, en el laboratorio por 1 semana. Las muestras de raíz fueron colectadas a diferentes tiempos después de la germinación, y los cotiledones al término del experimento.

6.6 Experimento de inducción de callos a partir de cotiledones de *Haematoxylum campechianum* L.

Se emplearon secciones de hojas cotiledonales de plántulas germinadas como arriba se describe. Se tomaron secciones de 0.5 cm² y se cultivaron en medio MS basal, durante un mes evaluando los siguientes tratamientos para la inducción de callo:

Cuadro 12. Concentraciones utilizadas por cada tratamiento para la inducción de callos por embriogénesis somática.

Tratamiento	2, 4-D	BAP	Carbón activado
1	2 mg/L	0.5 mg/L	0.25 g/L
2	3 mg/L	0.5 mg/L	0.25 g/L
3	3 mg/L	1 mg/L	0.25 g/L

Después de un mes de incubación los callos obtenidos fueron colectados y desecados en el liofilizador modelo: 7753022, marca LABCONCO durante 48 horas y procesados como se describió previamente para la cuantificación de hematoxilina.

6.7 Pruebas estadísticas

Todos los datos cuantitativos fueron analizados como experimentos completamente al azar. Se realizó en el programa estadístico SAS v. 9.2 un análisis de varianza y una prueba de medias de Tukey ($\alpha=0.05$).

VII. DISCUSIÓN Y RESULTADOS

7.1 Acumulación diferencial de metabolitos secundarios durante el desarrollo de *Haematoxylum campechianum* L.

7.1.1 Flavonoides y taninos condensados son acumulados diferencialmente a lo largo del desarrollo de la raíz de *Haematoxylum campechianum*.

Las plantas contienen abundantes moléculas autofluorescentes que pueden usarse para estudios, fisiológicos, metabólicos y moleculares. Estas moléculas pueden ser compuestos estructurales de la célula o metabolitos secundarios producidos como respuesta a algún estímulo externo o proceso de desarrollo. A continuación, se muestran los resultados de análisis mediante microscopia de luz y microscopia confocal de la raíz y troncos de plantas de Palo de tinte categorizados como juveniles y adultos. Se reporta la presencia o ausencia de metabolitos secundarios concorde a los patrones de autofluorescencia o tinciones histoquímicas realizadas.

Las plántulas germinadas in vitro a partir de semillas de *H. campechianum*, se seleccionaron en cuatro estadios (E) de desarrollo de la raíz durante los primeros 6 días después de la germinación, los cuales fueron nombrados: E1, E2, E3 y E4. En el caso de la raíz, se observó un oscurecimiento de la raíz la cual es más evidente en E4 (Figura 18A). La naturaleza de esta coloración fue analizada entonces por métodos histoquímicos y autofluorescencia de los tejidos. El análisis confocal de las secciones transversales de raíz, bajo mostró que bajo el rango de luz UV (488 nm) existe un patrón de autofluorescencia en xilema y haces vasculares, excepto en la epidermis de la raíz (Figura 18B, centro). Dada que se conoce que dentro de ese rango de luz UV los alcaloides, antocianinas, felulatos, flavonas, flavonoides, hidrocarbonos, lignina, quinonas, riboflavina y taninos pueden mostrar autofluorescencia (Donaldson, 2020) usamos el colorante específico para flavonoides 2-aminoetil-difenilborinato (DBPA) al 0.1 % para detectar in situ este grupo de compuestos. Los resultados mostraron que, en raíz, los flavonoides se acumulan preferentemente en células epidérmicas (Figura 18B, derecha); la acumulación de estos metabolitos explicaría el fenotipo de raíz

oscura en las etapas tempranas de desarrollo del sistema radical. En plantas se conoce que varios tipos de moléculas autofluorescentes pueden estar presentes en el mismo tejido (Mottiar *et al.*, 2020); en el caso de la raíz de Palo de tinte la autofluorescencia observada puede interpretarse como una ecolocalización de varios compuestos. Dada la edad de la raíz analizada la lignina pudiera descartarse pues en la etapa E4 no existe aún crecimiento secundario.

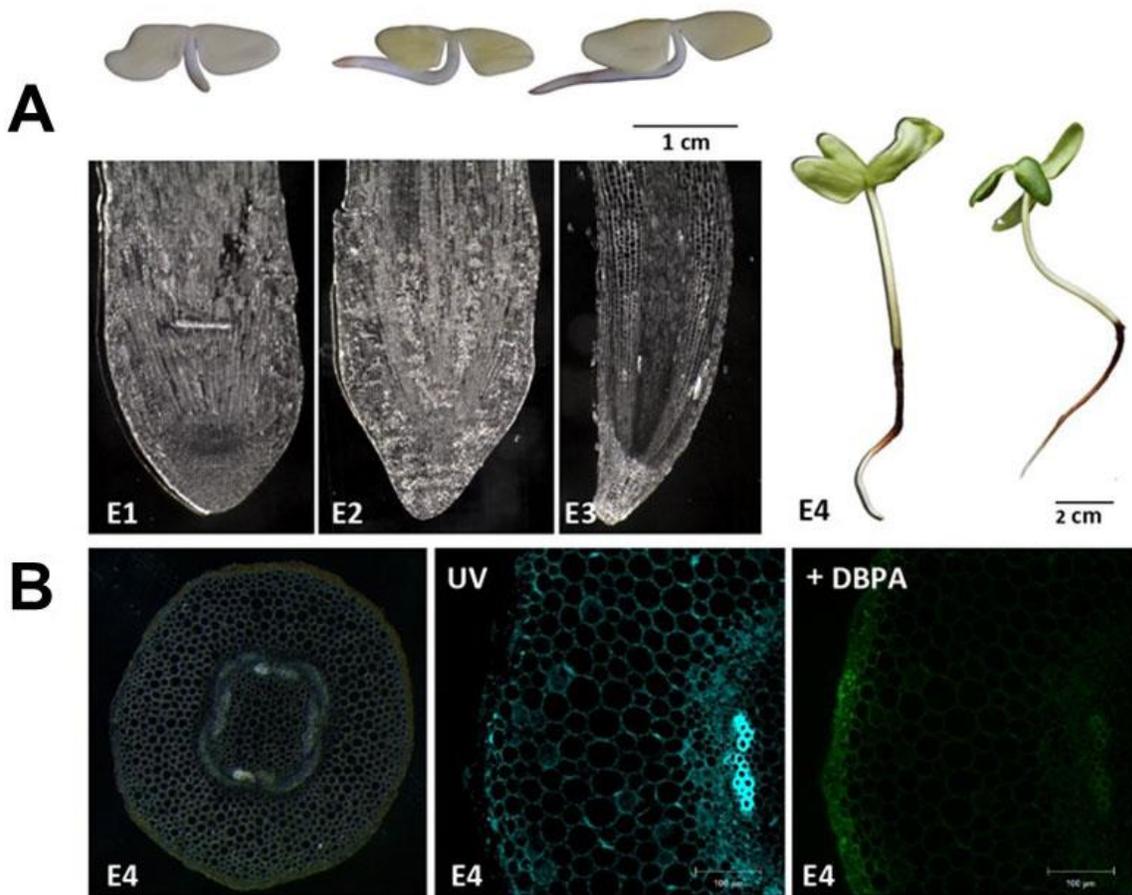


Figura 18. La acumulación de metabolitos secundarios en raíces de *Haematoxylum campechianum* es dependiente de la edad. Durante los primeros 3 días a partir de la germinación no es visible la acumulación de metabolitos secundarios, como lo muestran observaciones al estereoscopio (A: E1, E2 Y E3). Se observa en el día 4 después de la germinación (B: E4). Se sugiere la posible presencia de compuestos acordes a su rango de emisión de fluorescencia, principalmente en el

xilema y haces vasculares se es visible su acumulación (B: E4-UV). Una tinción con 2-aminoetil-difenilborinato (DBPA) (0.1 %) reveló la naturaleza tipo flavonoide estos compuestos observados y su acumulación en la parte correspondiente a floema secundario/periciclo (E4+DBPA).

La acumulación de metabolitos en raíz se monitoreó también en etapas más avanzadas de desarrollo usando para ello árboles juveniles y adultos (Figura 19A, B). Cortes transversales en fresco mostraron una acumulación casi todos los tejidos de la raíz, pero de forma preferente en las capas mas externas como el peridermis. Interesantemente fue posible observar un patrón de acumulación de metabolitos en xilema secundario (Figura 19 A, B, derecha) tanto en raíces juveniles y adultas, sin embargo, fue imposible reconocer algún tipo de células especializadas que relacionadas con esta acumulación. En la figura 20 panel (A) se muestra un corte transversal de raíz juvenil teñido con rojo de rutenio, donde se observa una mayor acumulación taninos condensados en células de floema secundario/periciclo. En el panel (B) de izquierda a derecha se observa un corte de raíz juvenil bajo luz UV donde el tejido lignificado corresponde a xilema secundario y filas celulares de la peridermis. Dado que bajo el rango de luz UV pueden autofluorecer lignina y flavonoides, nosotros discriminamos la naturaleza de los metabolitos observados en peridermis con la sonda DBPA confirmando que en la epidermis se continúan acumulando estos metabolitos como se observó desde los primeros estadios. En el panel (C) se observa un corte raíz en resina donde se observa (marcado en rojo) aerénquima, que es un tejido vegetal parenquimático con grandes espacios intercelulares llenos de aire ya que desarrolla en ambientes anoxicos, estructuralmente es un tejido muy eficiente, ya que permite la flotación de determinados órganos y mantiene la firmeza de la planta con una cantidad mínima de células además de ser un tejido de conducción que facilita el transporte de gases como el oxígeno.

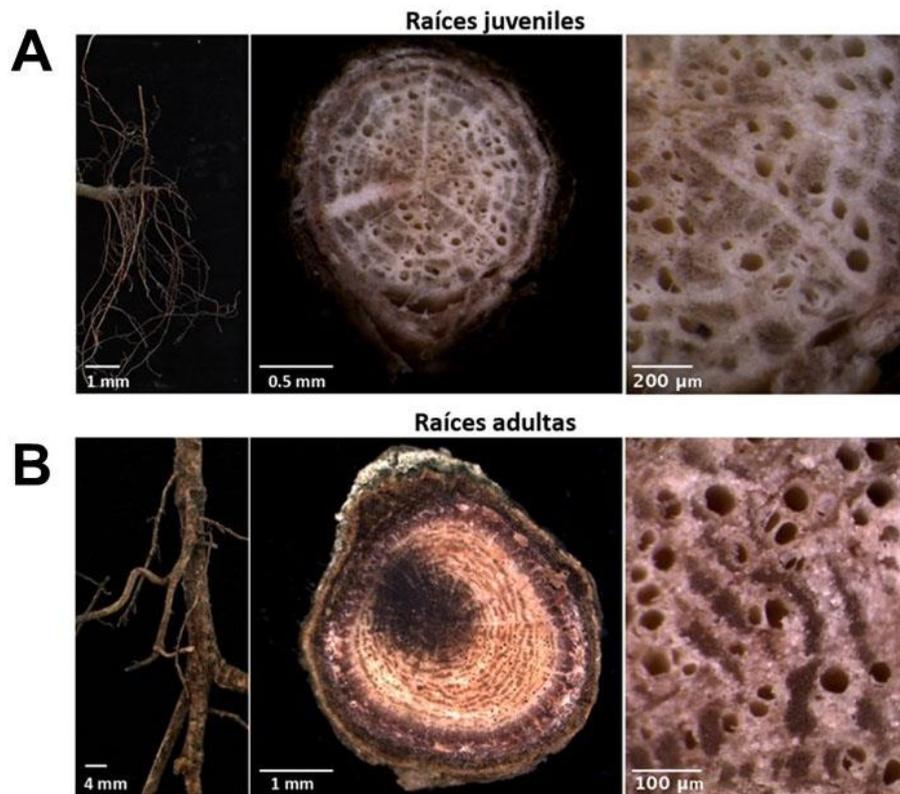


Figura 19. Raíces juveniles y adultas de *Haematoxylum campechianum* mantienen una alta acumulación de metabolitos secundarios. Raíces juveniles (A) y raíces adultas (B) colectadas en tintales en estado de inundación. Cortes transversales de raíz y observaciones a la zona de xilema muestran zonas con un color más intenso donde se sugiere se tiene acumulación de metabolitos secundarios en este tejido en raíces juveniles y adultas.

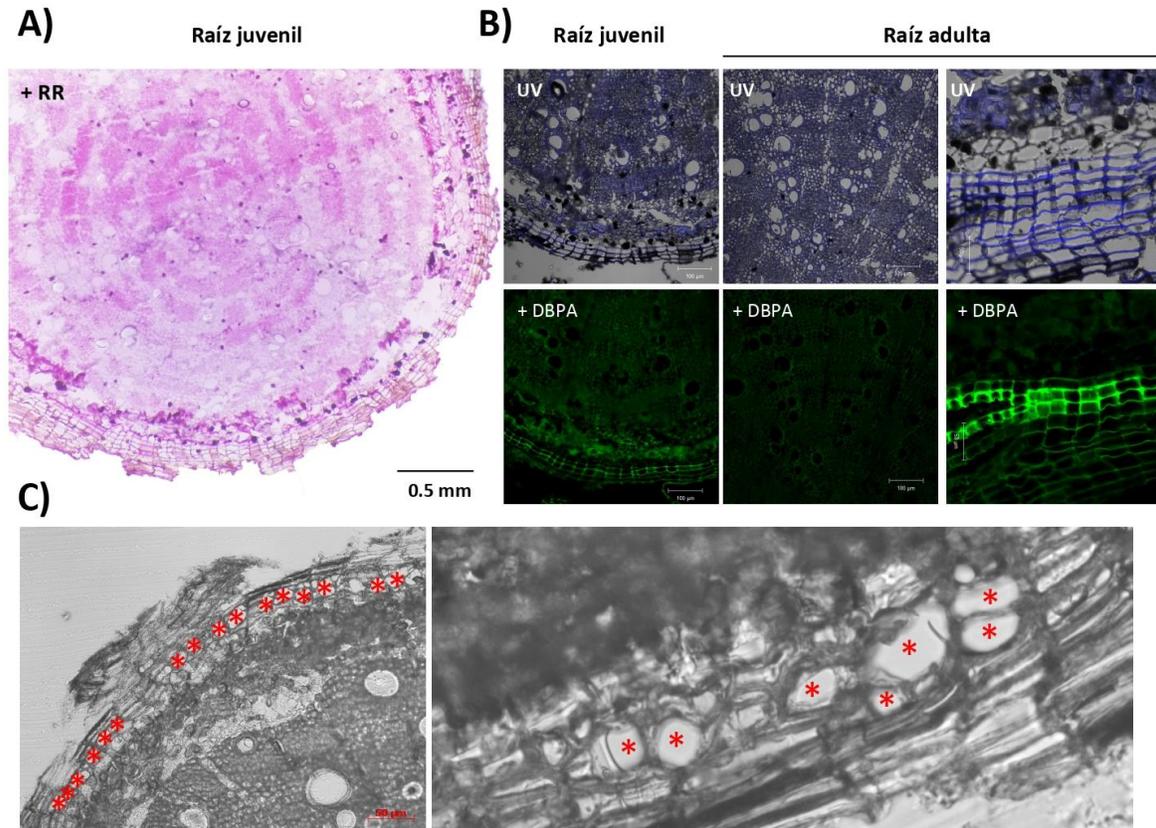


Figura 20. Raíces juveniles y adultas de *Haematoxylum campechianum* acumulan taninos condensados y flavonoides. A) Taninos condensados revelados en cortes transversales de raíces juveniles mediante una tinción con rojo de rutenio (RR) (0.05 %). B) Autofluorescencia de lignina en raíces juveniles (izquierda superior) y adultas (centro superior). La presencia de flavonoides (paneles inferiores) se reveló con 2-aminoetil-difenilborinato (DBPA) (0.1 %). C) Tejido de aerénquima en raíces juveniles. Izquierda, corte transversal mostrando la posición del aerénquima (asteriscos rojos); derecha, ampliación para ilustrar la anatomía de las células del aerénquima (asteriscos rojos).

Los flavonoides, sintetizados a través de las vías del ácido shikímico/fenilpropanoide, son metabolitos que incluyen chalconas, flavonas, isoflavonas, flavonoles, flavanonas e isoflavonoides que pueden ser liberados por las raíces de las plantas en la rizosfera como resultado de la renovación de raíces, daño de raíces y descomposición de raíces

(liberación pasiva) o a través de la exudación de raíces (liberación activa) (Shaw *et al.* 2006). En *H. campechianum* se pudiera hipotetizar que la acumulación de flavonoides y taninos condensados en raíz pudiera ser un mecanismo de defensa que esta especie ha desarrollado al crecer en ambientes estresantes como suelos anegados.

En cuanto a autoflorescencia de raíces tempranas en *H. campechianun* emite un color azul, la literatura reporta que en ese espectro de luz se encuentran principalmente compuestos como alcaloides, antocianinas, felulatos, flavonas, flavonoides, hidrocarburos, lignina, quinonas, riboflavina y taninos (Donaldson, 2020). En general, la síntesis de flavonoides se comprende bien y se han identificado la mayoría de las enzimas, esto en especies modelo y no modelo (Dixon y Steele, 1999; Winkel-Shirley, 2001; Du *et al.*, 2010). Se conoce que la síntesis y acumulación de flavonoides suele ser muy específica para ciertos tipos de células, un claro ejemplo es a lo largo de una raíz, los flavonoides a menudo se acumulan en la punta de la raíz y en las células de la cubierta de la raíz, como se muestra en la figura 19, 20 y 21. Es importante recalcar que los productos finales de los flavonoides específicos también se localizan en tipos de células específicos, donde podrían tener funciones en la regulación del desarrollo (Mathesius *et al.*, 1998a; Mathesius, 2001).

Se realizó en raíces iniciales una prueba histoquímica dirigida para identificar compuesto de tipo flavonoide con 2-aminoetil-difenilborinato (DBPA) (0.1 %), donde se confirma la naturaleza de compuestos flavonoides en la parte anatómica correspondiente a rizodermis, se aplicó otra prueba histoquímica con rojo de rutenio, donde se confirmó la presencia de taninos condensados en raíz juvenil.

Cruz *et al.*, 2015 evaluó extractos etanólico de raíz en mangle (*Rhizophora mangle* L.) una especie que también crece en zonas inundadas, reportando que los metabolitos secundarios más comunes fueron los taninos. Al igual se reportan que en las hojas de mangle se encuentran proantocianidinas (taninos condensados) y otros flavonoides, que pueden comprender más del 20% del peso seco total (Robertson, 1988; Benner *et al.*, 1990). Estos son conocidos por disuadir la alimentación de insectos y otros herbívoros (McKee y Feller 1995; Feller *et al.*, 1999). Asha *et al.*, 2012 determinó el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides en el extracto de raíz de *Rhizophora*

apiculata y *Acanthus ilicifolius*, ambas especies que se desarrollan en zonas pantanosas, y se reporta que son fuentes ricas en compuestos fenólicos y flavonoides y sugiere en que el extracto de raíz de mangle tiene un efecto beneficioso en la mejora del estrés oxidativo en el cerebro de las ratas, lo que puede atribuirse a la presencia de compuestos flavonoides y polifenólicos en el extracto etanólico de raíz.

Como bien se sabe *H. campechianum* es una especie que se desarrolla mejor en zonas bajas inundables, hecho que influye desde el momento en el que emerge una plántula de la semilla. En las especies vegetales no adaptadas a inundación se produce una reducción en la disponibilidad de oxígeno (O₂) que es esencial para una producción eficiente de ATP a través de la fosforilación oxidativa al servir como aceptor de electrones terminal dentro de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Dado que el flujo de O₂ hacia los suelos inundados es más de cinco órdenes de magnitud menor que el flujo hacia los suelos secos, la mayoría de las especies de plantas no pueden sobrevivir en condiciones de inundaciones prolongadas (Armstrong y Drew, 2002; Nishiuchi *et al.*, 2012). Las inundaciones provocan la privación de oxígeno en el sistema radicular de las plantas. Dado que el oxígeno es esencial para la respiración mitocondrial, este proceso no puede mantenerse en condiciones anóxicas y debe ser reemplazado por otras vías (Kreuzwieser *et al.*, 2004). Las plantas tolerantes a las inundaciones utilizan varias estrategias para hacer frente al estrés. El desarrollo de aerénquima se ha considerado un mecanismo crítico para la capacidad de una planta para hacer frente a la anaerobiosis (Xiao *et al.*, 2009). Este sistema de transporte de gas permite que las plantas transporten O₂ atmosférico a los órganos subterráneos para mantener la respiración aeróbica y oxidar varios compuestos reductores en la rizósfera (Kolb y Joly, 2009, Pezeshki, 2001). Un árbol tropical que ha recibido una amplia investigación fisiológica en relación con su tolerancia a inundaciones es *Nyssa sylvatica* (Hook *et al.*, 1971; Keeley, 1978; 1979; Keeley; Franz, 1979) se concluyó que la tolerancia a inundaciones de esta especie depende de la capacidad de acelerar la respiración anaeróbica y de oxidar la rizosfera. Estas conclusiones fueron corroboradas por (Keeley, 1979) y (Keeley y Franz, 1979). Se sugiere por (Wang *et al.*, 2012) que poner a especies vegetales que toleran las inundaciones estimula la formación de aerénquima, se reporto que en ciprés calvo

(*Taxodium distichum* L. Rich.) y sebo chino (*Sapium sebiferum* L. Roxb.) exhiben una serie de mecanismos de adaptación en respuesta a las inundaciones, incluida la formación y estímulo en el crecimiento de aerénquima en las raíces (laterales y adventicias) tallos y hojas. Este tejido facilita el transporte de O₂ en los órganos que se encuentran en ambientes acuáticos o suelos con drenaje deficiente. La formación de aerénquima y el aumento de la porosidad mejoraron la difusión de O₂ en las raíces y en consecuencia aumento su liberación en la rizosfera.

En este trabajo logramos identificar también el tejido de aerénquima en raíces de *H. campechianum* creciendo en zonas anegadas y dadas las funciones de este tejido en condiciones de hipoxia o anoxia, sugerimos que el Palo de tinte pueden sobrevivir a la inundación usando mecanismos que incluyen cambios en la anatomía de su raíz, y como defensa ante patógenos que puedan acelerar su descomposición acumula metabolitos secundarios como flavonoides y taninos condensados.

7.1.2 Presencia de metabolitos con autofluorescencia en la madera en dos edades contrastantes de *Haematoxylum campechianum* L.

Para explorar la diversidad de metabolitos presentes en el tejido del tronco de *H. campechianum*, se analizaron cortes histológicos de tronco de árboles de 2 y 7 años de edad aprovechando la propiedad de autofluorescencia de la muestra. El grado de desarrollo del tronco fue determinado en secciones teñidas con safranina al 1%. La figura 21 muestra la anatomía del xilema y parénquima medular a diferentes magnificaciones. En árboles de 7 años de edad se distingue fácilmente la presencia de xilema secundario y anillos de crecimiento altamente lignificados, y vasos agrupados mucho más desarrollados en comparación con la edad 2 (Figura 21, derecho).

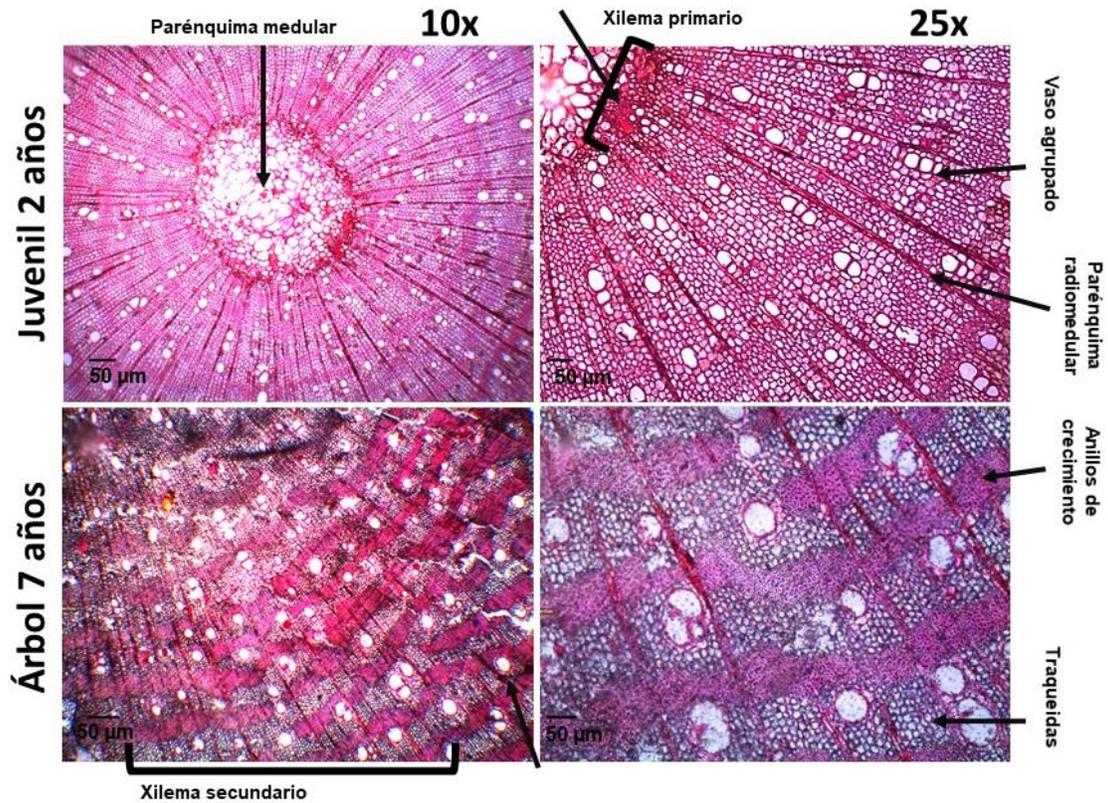


Figura 21. Anatomía comparativa de la madera en árboles de *Haematoxylum campechianum*. Cortes histológicos transversales de troncos de *Haematoxylum campechianum* de árboles de dos años y siete años de edad teñidos con safranina (1%).

Las plantas contienen abundantes moléculas autofluorescentes que se pueden utilizar para estudios bioquímicos, fisiológicos o de imagen. Aquí lo siguiente fue observar la autofluorescencia de los cortes pertenecientes a los troncos de las dos edades evaluadas, para registrar el patrón de autofluorescencia a diferentes rangos de longitud de onda del espectro de luz visible. Los cortes histológicos se excitaron usando líneas láser distribuidos en el rango de luz visible mediante microscopía confocal. La autofluorescencia recogida abarco prácticamente desde el rango de luz azul hasta el infrarrojo cercano. Los tejidos analizados corresponden a médula + xilema y xilema.

A longitud de onda de 405 nm, se observó autofluorescencia en ambas edades, principalmente en xilema y una baja señal para el tejido de médula. Una mayor intensidad fue registrada en muestras de 7 años en comparación con aquella de 2 años (Figura 21). Por el análisis de lignificación previo (Figura 20) y el patrón de autofluorescencia entre ambas edades y dentro de la misma muestra (xilema versus parénquima medular) se puede afirmar que la señal observada a esta longitud de onda corresponde a lignina. A 488, 555 y 639 nm, un alta autofluorescencia fue obtenida para muestras de 7 años y muy baja o casi nula para aquellas de 2 años. En muestras de 7 años, las intensidades entre xilema y médula fueron muy similares. A 488 nm se ha reportado autofluorescencia de compuestos fenólicos, incluidos la lignina, pero también flavonoides, flavonas, taninos y antocianinas. Por arriba de 555nm y antes de 639 nm sobresalen quinonas, kaemferol y antocianinas. A 639 nm aún están presentes quinonas, pero con la presencia de clorofila por ser muestras de madera analizadas (Donaldson, 2020).

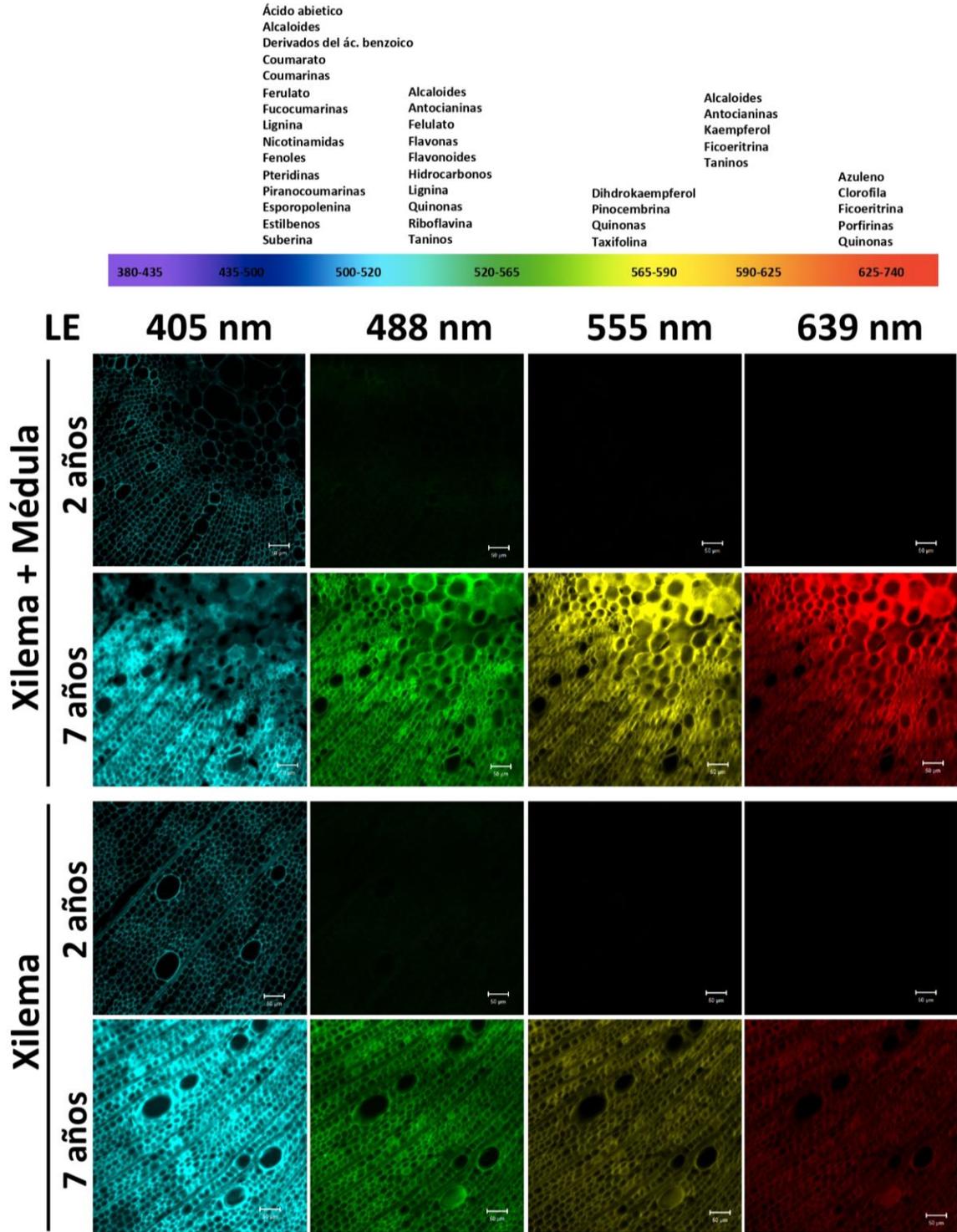


Figura 22. Presencia de moléculas autoflorescentes en contraste a dos edades en *Haematoxylum campechianum*. Tabla de emisión de fluorescencia de compuestos autofluorescentes que se encuentran en las plantas, seguido de cortes de tronco de *H.*

campechianum de dos y siete años de edad, vistos bajo un microscopio confocal, donde se comparó xilema y xilema + médula. Se observaron la mayor presencia de metabolitos secundarios en el árbol de siete años, cabe resaltar que es importante reconocer que puede haber varios tipos de moléculas autofluorescentes presentes en la misma ubicación.

7.2 Hematoxilina es un flavonoide ubicuo en órganos y tejidos a lo largo del ciclo de vida de *Haematoxylum campechianum*

7.2.1 Hematoxilina se acumula en diferentes órganos y tejidos de *Haematoxylum campechianum*

Al conocer que *H. campechianum* es una especie rica en metabolitos, especialmente en flavonoides, en esta parte del trabajo nos enfocamos en la cuantificación de hematoxilina, un homoisoflavonoide de importancia comercial. Aquí se hizo un barrido de la presencia y cuantificación de los niveles de hematoxilina en diferentes órganos de los árboles adultos: raíz, tronco, ramas, hojas, flores y frutos. La cuantificación por HPLC mostró que la hematoxilina está presente en todas las muestras analizadas, a diferentes concentraciones. La raíz, tronco y hoja tienen las concentraciones más altas de hematoxilina, mientras que la semilla la más baja. Este es primer reporte del metabolito en hoja, la cual tiene hasta 10 veces más hematoxilina que la semilla (Figura 23).

Para corroborar la presencia de hematoxilina en hojas, se realizó una cuantificación comparativa entre hojas de *H. campechianum* y hojas de *Enterolobium cyclocarpum* (Pich) ambas especies de la familia Fabaceae. Como control de la extracción incluimos muestras de tronco. Esta segunda cuantificación reveló niveles más bajos de hematoxilina en hoja de Palo de tinte, pero aún así 14 veces más elevados que lo hallado en Pich (Figura 24). Los datos muestran que el metabolito hematoxilina está presente en diversas especies y géneros de la familia Fabaceae, a diferentes niveles. Esto es consistente con el hecho que hematoxilina ha sido reportada previamente en *H. brasiletto* (Bello Martínez *et al.*, 2021).

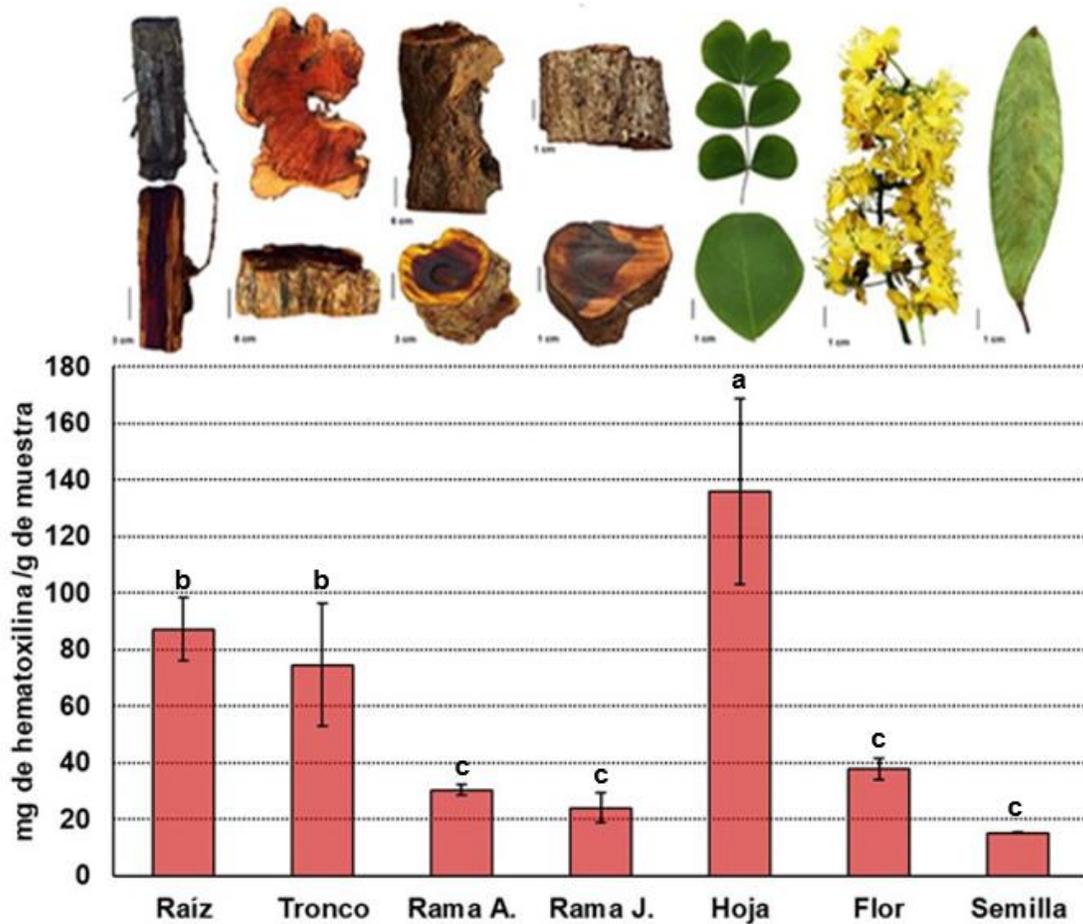


Figura 23. Cuantificación de hematoxilina en órganos y tejidos de *Haematoxylum campechianum*. La cuantificación se realizó mediante HPLC en extractos etanólicos. Los valores mostrados corresponden a la media \pm desviación estándar. Las medias con letras diferentes indican diferencia significativa según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

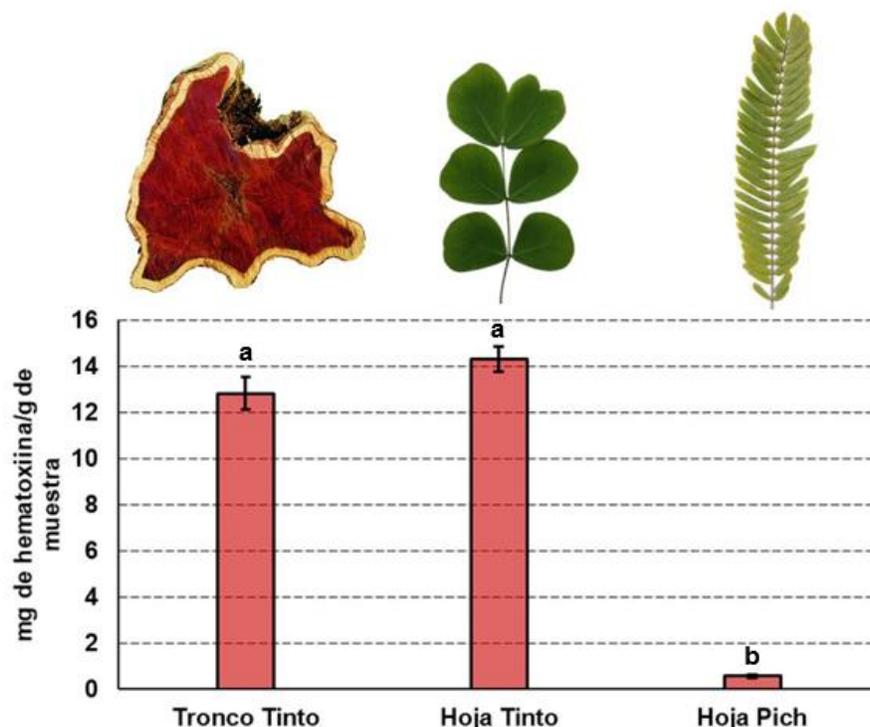


Figura 24. Acumulación de hematoxilina en hojas de dos especies de Fabaceae: *H. campechianum* (Palo de tinte o Tinto) y *Enterolobium cyclocarpum* (Pich). La muestra de tronco está incluida como un control de extracción. La cuantificación se realizó mediante HPLC en extractos etanólicos. Los valores mostrados corresponden a la media \pm desviación estándar. Las medias con letras diferentes indican diferencia significativa según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Para evaluar la posibilidad de obtener hematoxilina en tejidos cultivados in vitro derivados de hojas cotiledonales de Palo de tinte, se estableció un cultivo de callos organogénicos en medio 1XMS más la hormonas 2,4-D y BAP, a dos diferentes dosis. La mayor cantidad de callos inducidos fueron obtenidos en el tratamiento de 2,4-D (2 mg L^{-1}) y BAP (0.5 mg L^{-1}) comparado al de 2,4-D (3 mg L^{-1}) y BAP (1 mg L^{-1}) (Figura 25A). Todos los callos obtenidos fueron colectados y liofilizados, y el extracto etanólico sometido a cuantificación de hematoxilina por HPLC. La figura 25 B muestra que es

posible obtener hematoxilina en callos cultivados in vitro a niveles similares al tejido de origen, cotiledón, sin embargo, a niveles bajos (10-12 mg/g de muestra).

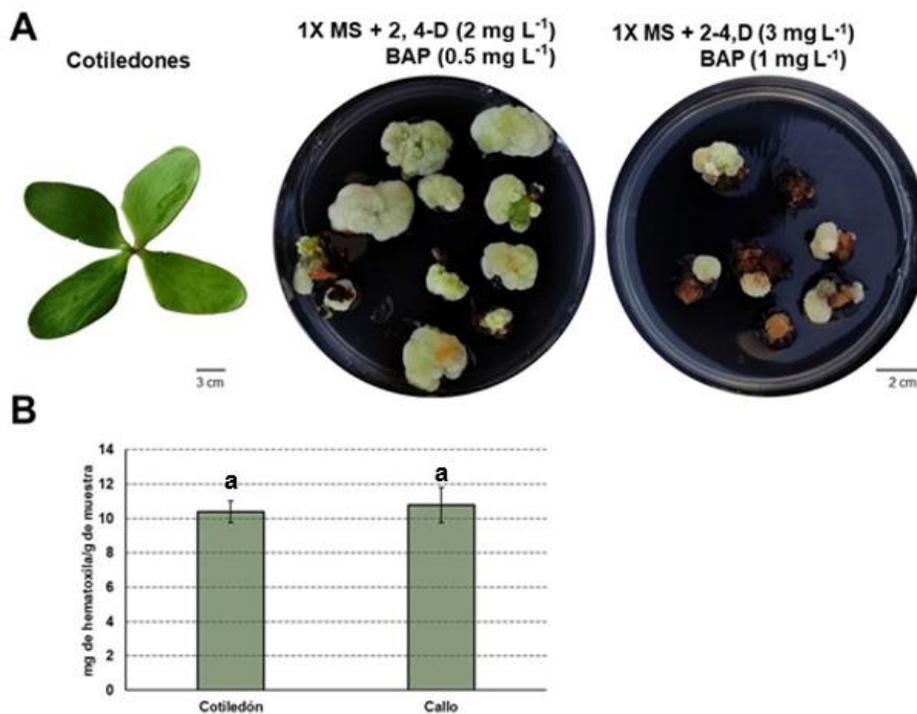


Figura 25. Contenido de hematoxilina en callos cultivados in vitro derivados de cotiledón de Palo de tinte. La cuantificación se realizó mediante HPLC en extractos etanólicos. Los valores mostrados corresponden a la media \pm desviación estándar. Las medias con letras diferentes indican diferencia significativa según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

7.2.1 Hematoxilina se acumula gradualmente a lo largo del desarrollo del tronco del árbol

Dado que unos de los tejidos más usados en la industria como fuente de hematoxilina es el tronco, decidimos evaluar si este metabolito se acumula gradualmente a lo largo del desarrollo del árbol. Aprovechando el acceso a plantaciones comerciales de diferentes edades se caracterizaron individuos y se colectaron muestras de tronco. La figura 26 muestra la morfometría de árboles de cuatro diferentes edades: dos, tres,

cinco y siete años. Las variables evaluadas muestran un crecimiento ascendente típico del desarrollo vegetal. Entre tres y cinco años de edad, se halló el mayor incremento en el diámetro del tronco, la altura y diámetro de la copa (Figura 26).

En estos árboles se colectaron muestras de tronco y se procedió a cuantificar hematoxilina. Los valores hallados muestran un comportamiento ascendente en los contenidos, de la edad tres a la siete, a excepción del primer año muestreado (Figura 27). Una posible explicación a este hecho es que para las muestras de dos años se procesó el tronco total (corteza y xilema) mientras que, en los demás años, dado el grado de desarrollo de la madera (Figura 27A) fue posible tomar muestras de solo el xilema secundario o duramen. Por último, se determinó la relación entre las variaciones en el color del duramen del tronco de *H. campechianum* y su contenido de hematoxilina. Los datos muestras valores para árboles adultos (más de 10 años de edad) donde se aprecia que en árboles de tinte morado los niveles de hematoxilina son hasta ocho veces más altos comparados con aquellos denominados amarillos (Figura 27B).

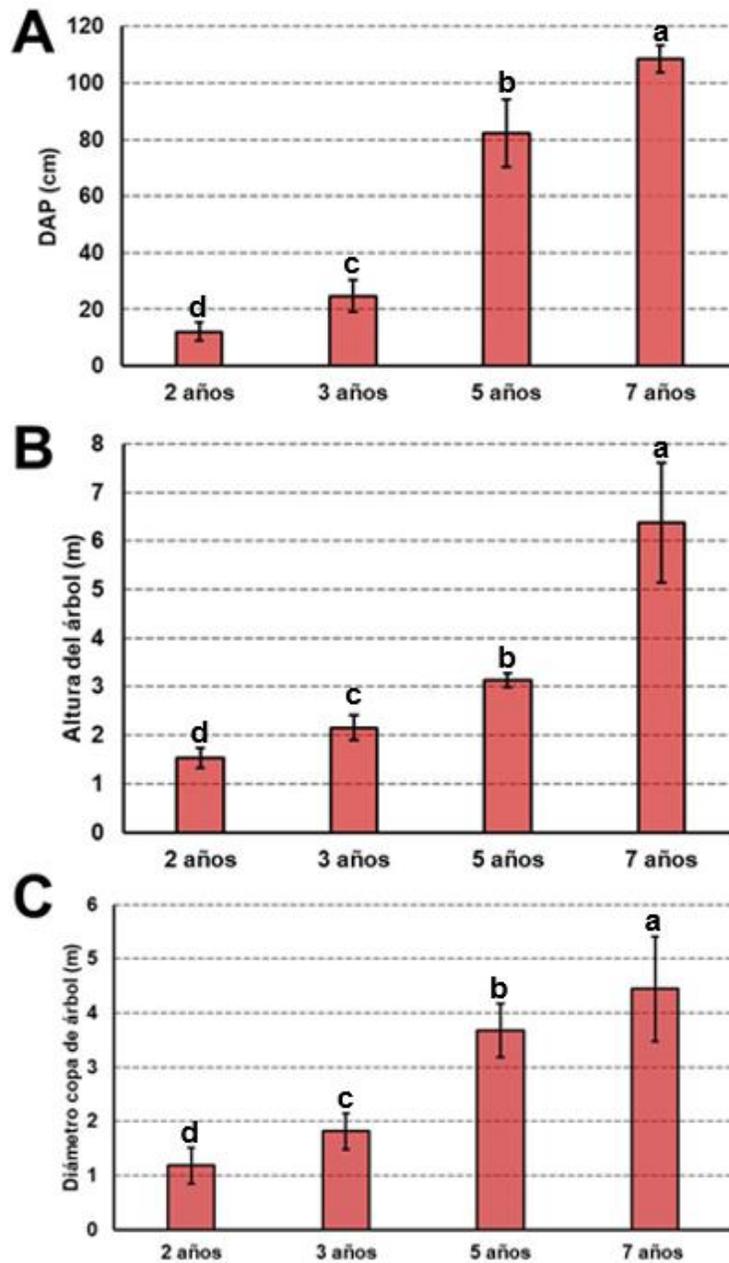


Figura 26. Caracterización morfológica de árboles de *Haematoxylum campechianum*. A) Diámetro del tronco a la altura del pecho (1.30 m, DAP). B) Altura de los árboles. C) Diámetro de la copa de los árboles. Los valores mostrados corresponden a la media \pm desviación estándar. Las medias con letras diferentes indican diferencia significativa según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

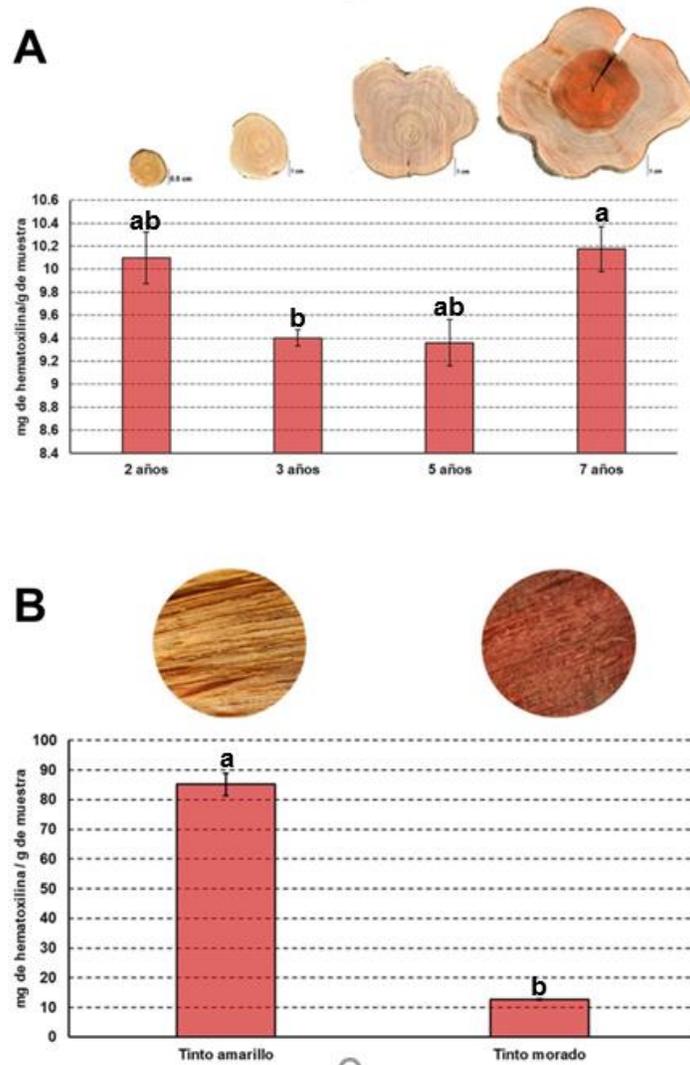


Figura 27. Cinética de acumulación de hematoxilina en árboles de cuatro edades diferentes y diferentes ecotipos. Cuantificación por HPLC del tronco de árboles de distintas edades y colores de duramen (morado y amarillo). Los valores mostrados corresponden a la media \pm desviación estándar. Las medias con letras diferentes indican diferencia significativa según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Existen trabajos previos que reportan compuestos extraídos de *H. campechianum* de diferentes órganos y tejidos tales como flor, hoja, tronco, corteza y duramen, pero no hematoxilina en todos ellos. En ramas de *H. campechianum* (El-Sayed *et al.*, 1994) se encontraron 18 ácidos fenólicos y flavonoides. Otro trabajo previo (Kandil *et al.*, 1996)

en hojas de *H. campechianum* se reporta el aislamiento y la identificación de dos nuevos galotaninos, además de los conocidos galotaninos y los fenólicos simples, además de flavonoides ya conocidos. De la corteza de *H. campechianum* se aislaron e identificaron compuestos de naturaleza: un nuevo compuesto fenólico, dos flavonoides y tres compuestos fenólicos conocidos (Kandil *et al.*, 1999). Escobar-Ramos *et al.*, 2017 aisló del duramen cinco compuestos que no habían sido reportados: dos chalconas conocidas, tres homoisoflavonoides conocidos y hematoxilina. Recientemente Sobeh *et al.*, 2020 reportaron 15 metabolitos secundarios en flores de *H. campechianum*, divididos en nueve compuestos fenólicos y seis flavonoides. Por último, Escobar-Ramos *et al.*, 2022 indica que en duramen de *H. campechianum* existe sappanchalcona y 4-hidroxihematoxilol. Estos estudios caracterizan químicamente compuestos con bioactividades benéficas para la salud lo que le da un valor agregado a esta especie, si embargo en cuanto a la hematoxilina solo se menciona su presencia en duramen.

En nuestro trabajo hallamos hematoxilina en órganos y tejido de *H. campechianum* no explorados para este metabolito hasta ahora. La cuantificación en diferentes órganos y edades revela que el metabolito hematoxilina es ubicuo y se incrementa a lo largo del ciclo de vida de la planta. La biosíntesis de metabolitos secundarios comienza a partir de la vía del ácido shikímico u fenilpropanoide, y posteriormente se diversifica, dependiendo en gran medida del tipo de célula, la etapa de desarrollo y las señales ambientales (Patra *et al.*, 2013); por lo tanto, están ampliamente distribuidos en diferentes células vegetales, tejidos y órganos. Así, diferentes células, tejidos y órganos de plantas pueden poseer diferentes bioactividades en diferentes etapas de desarrollo (Bartwal *et al.*, 2013). Además, la biosíntesis de metabolitos secundarios en plantas durante su crecimiento y desarrollo generalmente pueden ser inducidos o inhibidos por diferentes condiciones ambientales, donde su presencia o ausencia influyen en la supervivencia de la planta (Kurepin *et al.*, 2017).

Algunos metabolitos secundarios comunes identificados en el duramen incluyen flavonoides, estilbenos y otros compuestos fenólicos. La acumulación de estos compuestos proviene de la biosíntesis de fenilpropanoides, activa durante el desarrollo

del duramen en varias especies de árboles. Los compuestos fenólicos pueden contribuir a las propiedades duramen, como el color, la resistencia a la descomposición y la durabilidad (Hassan *et al.*, 2012). Previamente se han descrito modelos de formación de duramen, (Celedon *et al.*, 2018) caracterizo dos modelos: tipo-I (Tipo-Robinia) y tipo-II (Tipo-Juglans) (Magel *et al.*, 1994; Dellus *et al.*, 1997; Bergström, 2003; Mayer *et al.*, 2006; Kampe y Magel, 2013). En el modelo Tipo-I, la formación de duramen se caracteriza por un aumento localizado en el metabolismo secundario y la formación de novo de metabolitos de duramen en el parénquima de rayos de la zona de transición entre albura y duramen. En este modelo, no se produce una producción significativa de metabolitos secundarios de duramen en albura o duramen (Magel *et al.*, 1994; Bergström *et al.*, 2000; Bergström, 2003). En el modelo Tipo-II de formación de duramen, se produce un aumento gradual en la acumulación de precursores de metabolitos secundarios de duramen en las células de los rayos a medida que envejece la albura. En este escenario, los metabolitos secundarios de duramen se originan predominantemente a partir de precursores acumulados que se forman inicialmente en la albura y posteriormente se convierten en la zona de transición mediante reacciones que pueden implicar hidrólisis y oxidación (Dellus *et al.*, 1997; Magel *et al.*, 2001; Magel *et al.*, 2006).

El conocimiento de la biosíntesis de metabolitos secundarios en duramen y su regulación durante el desarrollo del tronco tiene también aplicaciones inmediatas y prácticas en la producción de bioproductos de alto valor (muebles, pisos). Por ejemplo, el duramen de árboles jóvenes de cedro rojo occidental (*Thuja plicata* Donn ex D. Don) y teca (*Tectona grandis* Lf) parece tener un duramen de menor resistencia a la descomposición y menor durabilidad de los productos derivados de la madera en comparación con los productos derivados del duramen de árboles maduros en condiciones silvestres (Moya y Berrocal, 2010; Russell y Daniels, 2010). Aunque nuestros datos sobre la acumulación de metabolitos en el duramen y médula muestran acumulaciones tejido y edad dependiente se requiere más investigación para determinar el modelo de desarrollo de formación de duramen y la cinética de biosíntesis de metabolitos en este órgano de esta especie.

En este trabajo también determinamos si callos derivados de tejido cotiledonal contienen hematoxilina. La aplicación del cultivo in vitro para producir metabolitos secundarios, por parte de las plantas requiere tejidos altamente especializados, regulación y coordinación en el tiempo y desarrollo por parte de la planta (Loyola-Vargas Y Ochoa-Alejo, 2016). Hay numerosos reportes de la producción de metabolitos secundarios con este enfoque. Por ejemplo, Lema-Rumińska *et al.*, 2019 analizaron líneas de *Echinacea purpurea* L. Moench, micropropagadas vía embriogénesis somática indirecta para la selección de genotipos con alta capacidad de producir metabolitos secundarios. Ellos fueron exitosos en obtener tres nuevas líneas de *E. purpurea* con alto contenido en ácido cicórico (compuesto orgánico de tipo fenilpropanoide). En el caso de Palo de tinte, el hecho que la hematoxilina esté presente en hojas y que es relativamente fácil establecer un cultivo in vitro de *H. campechianum* abre la posibilidad de producir este metabolito, u otros de interés médico o industrial, de manera controlada.

VII CONCLUSIONES

- Existe una acumulación diferencial de metabolitos secundarios en el sistema radical de *H. campechianum*.
- En la epidermis de la raíz de *H. campechianum* se acumulan flavonoides desde etapas muy tempranas en su desarrollo. En etapas más avanzadas del ciclo de vida de la planta, se presentan: flavonoides y taninos condensados y se pueden acumular en otros tejidos como xilema secundario y periciclo.
- La presencia de aerénquima y una alta acumulación de metabolitos secundarios en la raíz parecen ser dos mecanismos del éxito ante la inundación y ataque por patógenos que emplea esta especie tropical para sobrevivir a condiciones de inundación temporal en la selva tropical, lo que explica su plasticidad ecológica.
- Apoyados en la propiedad de autofluorescencia de los metabolitos secundarios, nuestros resultados sugieren que existe una plétora de estos compuestos en el tronco del árbol, muchos de ellos también acumulados en tejidos específicos.
- La hematoxilina es un compuesto presente en una variedad amplia de órganos y tejidos de *H. campechianum* y no solo se encuentra restringido al duramen del tronco. Por primera vez se reporta la presencia de este compuesto en hojas.
- La acumulación de hematoxilina en el tronco es edad-dependiente.
- Ensayos preliminares de callogénesis in vitro sugieren que es factible la producción bajo condiciones controladas de hematoxilina. Sin embargo, todavía es necesario optimizar los rendimientos usando diferentes explantes y condiciones del cultivo in vitro.

VIII RECOMENDACIONES

- Continuar con la optimización del protocolo de germinación de semillas ya que *H. campechianum* es una especie de interés y actualmente existen y se siguen estableciendo plantaciones que tiene interés en comercial, ya que tiene diversos usos tanto etnobotánicos, farmacéuticos y en el sector productor además de la extracción de hematoxilina.
- Continuar con la optimización del protocolo para cultivo in vitro e inducción de embriogénesis somática ya que en este estudio se demostró que el producto de embriogénesis somática contiene hematoxilina lo que abre la posibilidad para establecer biofábricas con la finalidad de producir hematoxilina y otros compuestos de interés farmacéutico producidos por el género *Haematoxylum* como se ha reportado.
- Es recomendable realizar más estudios sobre el desarrollo del sistema radical en *H. campechianum* ya que es parte fundamental del éxito de su plasticidad ecológica. Realizar experimentos cuantitativos y cualitativos sobre la acumulación de compuestos de interés en diferentes etapas de desarrollo de la raíz para complementar el trabajo ya realizado.
- Con el designio de complementar los estudios realizados sobre la cinética de acumulación de hematoxilina en el tronco de *H. campechianum* se recomienda continuar con estos; ya que se cuenta con el control de edades de los cultivos por el sector productor, lo que permitiría caracterizar cuantitativa y cualitativamente otros compuestos de interés y en que etapa sería optimo su aprovechamiento.
- Considerar continuar con estudios cuantitativos y cualitativos en diferentes órganos y tejidos en *H. campechianum*, para caracterizar la presencia y cantidad de compuesto de interés, especialmente en hoja, además de que establece los cimientos para dilucidar la biosíntesis de hematoxilina. Considerar ampliar más el estudio sobre la diferenciación en el color del duramen, ya que es posible la existencia de morfotipos en *H. campechianum*.

VII LITERATURA CITADA

Abd El Maksoud, A. I., Taher, R. F., Gaara, A. H., Abdelrazik, E., Keshk, O. S., Elawdan, K. A., Morsy, S. E., Salah. A. & Khalil, H. (2019). Selective regulation of B-Raf dependent K-Ras/mitogen-activated protein by natural occurring multi-kinase inhibitors in cancer cells. *Frontiers in oncology*, 9, 1220.

Aghaei, F., Seifati S.M., Nasirizadeh, N. (2017). Development of a DNA biosensor for the detection of phenylketonuria based on a screen-printed gold electrode and hematoxylin. *Analytical Methods*, 9(6), 966-973.

Aghili, Z., Nasirizadeh, N., Divsalar, A., Shoeibi, S., & Yaghmaei, P. (2017). A nanobiosensor composed of exfoliated graphene oxide and gold nano-urchins, for detection of GMO products. *Biosensors and Bioelectronics*, 95, 72-80.

Aldrich, P. R., Hamrick, J. L., Chavarriaga, P., & Kochert, G. (1998). Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globulifera*. *Molecular ecology*, 7(8), 933-944.

Allaye Kelly, B., Hardy, O., & Bouvet, J. M. (2004). Temporal and spatial genetic structure in *Vitellaria paradoxa* (shea tree) in an agroforestry system in southern Mali. *Molecular ecology*, 13(5), 1231-1240.

Alvares, C. A., Stape, J. L., Sentelhas, P. C., Gonçalves, J. D. M., & Sparovek, G. (2013). Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*, 22(6), 711-728.

Angyalossy, V., Amano, E., & Alves, E. S. (2005). Madeiras utilizadas na fabricação de arcos para instrumentos de corda: aspectos anatómicos. *Acta Botanica Brasilica*, 19(4), 819-834.

Apolinário, F. E., & Martius, C. (2004). Ecological role of termites (Insecta, Isoptera) in tree trunks in central Amazonian rain forests. *Forest Ecology and Management*, 194(1-3), 23-28.

Aranda, I., Pardo, F., Gil, L., & Pardos, J. A. (2004). Anatomical basis of the change in leaf mass per area and nitrogen investment with relative irradiance within the canopy of eight temperate tree species. *Acta Oecologica*, 25(3), 187-195.

Armstrong, W., & Drew, M. C. (2002). Root growth and metabolism under oxygen deficiency. In *Plant roots*, 1139-1187, CRC Press.

Asha, K. K., Mathew, S., & Lakshmanan, P. T. (2012). Flavonoids and phenolic compounds in two mangrove species and their antioxidant property. *Indian journal of geomarine sciences*, 41(3), 259-264.

Atwell, B. J., Greenway, H., & Colmer, T. D. (2015). Efficient use of energy in anoxia-tolerant plants with focus on germinating rice seedlings. *New Phytologist*, 206(1), 36-56.

Ávila-Calderón, L. E. A., & Rutiaga-Quiñones, J. G. (2014). Chemical components of the wood and bark of *Haematoxylum brasiletto* Karsten (Leguminosae). *Madera y bosques*, 20(2), 153-158.

Bais, H. P., Vepachedu, R., Gilroy, S., Callaway, R. M., & Vivanco, J. M. (2003). Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions. *Science*, 301(5638), 1377-1380.

Bamber, R. K. (1976). Heartwood, its function and formation. *Wood science and technology*, 10(1), 1-8.

Banu, G. S., & Kumar, G. (2009). Preliminary screening of endophytic fungi from medicinal plants in India for antimicrobial and antitumor activity. *International journal of pharmaceutical sciences and nanotechnology*, 2(2), 566-571.

Barrera, A. (1962). La Península de Yucatán como provincia biótica. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*. 23, 71-150.

Barrera, M. A., A. Barrera y R. M. López. (1976). *Nomenclatura Etnobotánica Maya*. Colección Científica, Instituto Nacional de Antropología e Historia. México, D.F., 536.

Bartwal, A., Mall, R., Lohani, P., Guru, S. K., & Arora, S. (2013). Role of secondary metabolites and brassinosteroids in plant defense against environmental stresses. *Journal of plant growth regulation*, 32(1), 216-232.

Bechtold, T. (2009). Natural colorants in hair dyeing. *Handbook of Natural Colorants*. Chichester: Wiley, 339-50.

Bello Martínez, J., Vidal Gutiérrez, M., Rosas Acevedo, J. L., Avila Caballero, L. P., Navarro Tito, N., Torres Guzmán, F., & Robles Zepeda, R. E. (2021). Biological activities of organic fractions from *Ficus obtusifolia* AND *Haematoxylum brasiletto*. *Pharmacology online*, 1, 306-312.

Bello-Martínez, J., Jiménez-Estrada, M., Rosas-Acevedo, J. L., Avila-Caballero, L. P., Vidal-Gutierrez, M., Patiño-Morales, C., Ortiz-Sánchez, E. & Robles-Zepeda, R. E. (2017). Antiproliferative activity of *Haematoxylum brasiletto* H. Karst. *Pharmacognosy magazine*, 13(Suppl 2), S289-S293.

Benner, R., Hatcher, P. G., & Hedges, J. I. (1990). Early diagenesis of mangrove leaves in a tropical estuary: Bulk chemical characterization using solid-state ¹³C NMR and elemental analyses. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 54(7), 2003-2013.

Bergström, B. (2003). Chemical and structural changes during heartwood formation in *Pinus sylvestris*. *Forestry*, 76(1), 45-53.

Bergström, B., Gustafsson, G., Gref, R., & Ericsson, A. (1999). Seasonal changes of pinosylvin distribution in the sapwood/heartwood boundary of *Pinus sylvestris*. *Trees*, 14(2), 65-71.

Beritognolo, I., Magel, E., Abdel-Latif, A., Charpentier, J. P., Jay-Allemand, C., & Breton, C. (2002). Expression of genes encoding chalcone synthase, flavanone 3-hydroxylase and dihydroflavonol 4-reductase correlates with flavanol accumulation during heartwood formation in *Juglans nigra*. *Tree Physiology*, 22(5), 291-300.

Bicchieri, M., Monti, M., Piantanida, G., & Sodo, A. (2008). All that is iron-ink is not always iron-gall!. *Journal of Raman Spectroscopy*, 39(8), 1074-1078.

- Björklund, L. (1999). Identifying heartwood-rich stands or stems of *Pinus sylvestris* by using inventory data. *Silva Fennica*, 33, 119-129.
- Boizard, S. D., & Mitchell, S. J. (2011). Resistance of red mangrove (*Rhizophora mangle* L.) seedlings to deflection and extraction. *Trees*, 25(3), 371-381.
- Bojić, M., Maleš, Ž., Antolić, A., Babić, I., & Tomičić, M. (2019). Antithrombotic activity of flavonoids and polyphenols rich plant species. *Acta Pharmaceutica*, 69(4), 483-495.
- Borges, C. V., Minatel, I. O., Gomez-Gomez, H. A., & Lima, G. P. P. (2017). Medicinal plants: Influence of environmental factors on the content of secondary metabolites. In *Medicinal Plants and Environmental Challenges*, 259-277, Springer, Cham.
- Bouriaud, O., Bréda, N., Dupouey, J. L., & Granier, A. (2005). Is ring width a reliable proxy for stem-biomass increment? A case study in European beech. *Canadian Journal of Forest Research*, 35(12), 2920-2933.
- Broun, P., Liu, Y., Queen, E., Schwarz, Y., Abenes, M. L., & Leibman, M. (2006). Importance of transcription factors in the regulation of plant secondary metabolism and their relevance to the control of terpenoid accumulation. *Phytochemistry Reviews*, 5(1), 27-38.
- Buer, C. S., Imin, N., & Djordjevic, M. A. (2010). Flavonoids: new roles for old molecules. *Journal of integrative plant biology*, 52(1), 98-111.
- Burtin, P., Jay-Allemand, C., Charpentier, J. P., & Janin, G. (1998). Natural wood colouring process in *Juglans* sp. (*J. nigra*, *J. regia* and hybrid *J. nigra* 23x *J. regia*) depends on native phenolic compounds accumulated in the transition zone between sapwood and heartwood. *Trees*, 12(5), 258-264.
- Campagne, G., Garba, A., Barkiré, H., Tassié, J. M., Véra, C., Brémond, P., & Sellin, B. (1994). Ultrasound validation of indirect indicators of morbidity due to *Schistosoma haematobium* in Niger. *Am J Trop Med Hyg*, 51, S286-S287.
- Carlquist, S. (2013). Comparative wood anatomy: systematic, ecological, and evolutionary aspects of dicotyledon wood. Springer Science & Business Media, 315-340.

- Cassidy, A., & Minihane, A. M. (2017). The role of metabolism (and the microbiome) in defining the clinical efficacy of dietary flavonoids. *The American journal of clinical nutrition*, 105(1), 10-22.
- Castellan, A., Ruggiero, R., Frollini, E., Ramos, L. A., & Chirat, C. (2007). Studies on fluorescence of cellulose. *Holzforschung*, 61(5), 504-508.
- Castelli, M. V., & López, S. N. (2017). Homoisoflavonoids: Occurrence, biosynthesis, and biological activity. In *Studies in Natural Products Chemistry*, 54, 315-354. Elsevier.
- Celedon, J. M., & Bohlmann, J. (2018). An extended model of heartwood secondary metabolism informed by functional genomics. *Tree physiology*, 38(3), 311-319.
- Cesco, S., Mimmo, T., Tonon, G., Tomasi, N., Pinton, R., Terzano, R., Neumann, G., Weisskopf L., Renella, G., Landi, L. & Nannipieri, P. (2012). Plant-borne flavonoids released into the rhizosphere: impact on soil bio-activities related to plant nutrition. A review. *Biology and Fertility of Soils*, 48(2), 123-149.
- Chablé-Vega, M. A., Plasencia-Vázquez, A. H., García-González, A., Ferrer-Sánchez, Y., Riverón-Giró, F. B., & Zamora-Crescencio, P. (2019). Distribution, density and dasometric structure of *Haematoxylum campechianum* and *Haematoxylum calakmulense* in Campeche, Mexico. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 6(16), 65-77.
- Chen, R., Jiang, W. Z., Li, Q. L., Li, X. L., Chen, X. L., Yang, Y. S., & Wu, H. (2016). Comparison of seven colchicine-induced tetraploid clones with their original diploid clones in purple coneflower (*Echinacea purpurea* L.). *Euphytica*, 207(2), 387-399.
- Choo, Y. Y., Tran, P. T., Min, B. S., Kim, O., Nguyen, H. D., Kwon, S. H., & Lee, J. H. (2017). Sappanone A inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis in BMMs and prevents inflammation-mediated bone loss. *International immunopharmacology*, 52, 230-237.
- Climent, M. A., de Vera, G., López, J. F., Viqueira, E., & Andrade, C. (2002). A test method for measuring chloride diffusion coefficients through nonsaturated concrete:

Part I. The instantaneous plane source diffusion case. *Cement and concrete Research*, 32(7), 1113-1123.

Colmer, T. D., & Voesenek, L. A. C. J. (2009). Flooding tolerance: suites of plant traits in variable environments. *Functional Plant Biology*, 36(8), 665-681.

Contreras, A. D. C. (2010). La biodiversidad perdida: el caso de los colorantes. *Biodiversidad y Desarrollo Humano en Yucatán*. CICY. PPD-FMAM. CONABIO. SEDUMA. Mérida, México. 368-372.

Cooksey, C. J. (2021). Hematoxylin in the 21st century. *Biotechnic & Histochemistry*, 96(3), 242-249.

Corradini, E., Foglia, P., Giansanti, P., Gubbiotti, R., Samperi, R., & Lagana, A. (2011). Flavonoids: chemical properties and analytical methodologies of identification and quantitation in foods and plants. *Natural product research*, 25(5), 469-495.

Corredoira, E., Merkle, S. A., Martínez, M. T., Toribio, M., Canhoto, J. M., Correia, S. I., & Vieitez, A. M. (2019). Non-zygotic embryogenesis in hardwood species. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 38(1), 29-97.

Crews, T. E. (1999). The presence of nitrogen fixing legumes in terrestrial communities: Evolutionary vs ecological considerations. In *New Perspectives on Nitrogen Cycling in the Temperate and Tropical Americas*, 233-246. Springer, Dordrecht.

Cruz, R. y M. Sousa. (2014). *Haematoxylum calakmulense* (Leguminosae, Caesalpinoideae), una Nueva Especie Mesoamericana. *Novon*. 23: 31-36.

Cruz, S. M., Marroquín, N., Alvarez, L. E., Chang, D. E., & Cáceres, A. (2015). Evaluation of Mangrove (*Rhizophora mangle* L.) products as coloring, antimicrobial and antioxidant agents. *International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients*, 2(1), 12-12.

Daniels, C. R., & Russell, J. H. (2007). Analysis of western redcedar (*Thuja plicata* Donn) heartwood components by HPLC as a possible screening tool for trees with enhanced natural durability. *Journal of chromatographic science*, 45(5), 281-285.

- Dapson, R. & Horobin, R. (2009). Dyes from a twenty-first century perspective. *Biotechnic & Histochemistry*, 84(4), 135–137.
- De la Garza, M. A. L., Izquierdo y M. del C. León. 1983. Relación histórico-geográfica de la provincia de Yucatán (Mérida, Valladolid y Tabasco). Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., México. 74.
- De Luca, E., Redaelli, M., Zaffino, C. & Bruni, S. (2018). A SERS and HPLC study of traditional dyes from native Chinese plants. *Vibrational Spectroscopy*, 95, 62-67.
- Dehon, L., Macheix, J. J. & Durand, M. (2002). Involvement of peroxidases in the formation of the brown coloration of heartwood in *Juglans nigra*. *Journal of experimental botany*, 53(367), 303-311.
- Dellus, V., Mila, I., Scalbert, A., Menard, C., Michon, V. & du Penhoat, C. L. H. (1997). Douglas-fir polyphenols and heartwood formation. *Phytochemistry*, 45(8), 1573-1578.
- Deng, Y., Men, C., Qiao, S., Wang, W., Gu, J., Liu, L., Zhang, Z., Zhang, H., Wang Z. & Yang, J. (2020). Tolerance to low phosphorus in rice varieties is conferred by regulation of root growth. *The Crop Journal*, 8(4), 534-547.
- Dixon, R. A., & Steele, C. L. (1999). Flavonoids and isoflavonoids—a gold mine for metabolic engineering. *Trends in plant science*, 4(10), 394-400.
- Donaldson, L. (2013). Softwood and hardwood lignin fluorescence spectra of wood cell walls in different mounting media. *IAWA journal*, 34(1), 3-19.
- Donaldson, L. (2020). Autofluorescence in plants. *Molecules*, 25(10), 2393.
- Donaldson, L., & Williams, N. (2018). Imaging and spectroscopy of natural fluorophores in pine needles. *Plants*, 7(1), 10.
- Du, H., Huang, Y., & Tang, Y. (2010). Genetic and metabolic engineering of isoflavonoid biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(5), 1293-1312.
- Duch, G. 1989. Los bajos inundables (ak'alches) de la Península de Yucatán: las expectativas de una evaluación ambiental referida a su aprovechamiento. Universidad Autónoma de Chapingo. Chapingo, México. 50.

Dudareva, N., Pichersky, E. & Gershenzon, J. (2004). Biochemistry of plant volatiles. *Plant physiology*, 135(4), 1893-1902.

Duke, J. A. (2008). *Duke's handbook of medicinal plants of Latin America*. CRC Press. Boca Raton, USA. 343.

Durán, R. C., & Sousa, M. (2014). *Haematoxylum calakmulense* (Leguminosae, Caesalpinioideae), una nueva especie Mesoamericana. *Novon: A Journal for Botanical Nomenclature*, 23(1), 31-36.

Duroux, L., Delmotte, F. M., Lancelin, J. M., Kéravis, G. & Jay-Allemand, C. (1998). Insight into naphthoquinone metabolism: β -glucosidase-catalysed hydrolysis of hydrojuglone β -D-glucopyranoside. *Biochemical Journal*, 333(2), 275-283.

Dzul F.J. T., Hernández-Stefaoni JL. (2020). Los Ak'alches, arboles creciendo en un hábitat inundado en la Península de Yucatán. *Desde el Herbario CICY*. 12:181, 175–181.

El-Sayed, N. H., Michael, H. N., Kandil, F. E., Ishak, M. S., & Mabry, T. J. (1994). Flavonoids and other phenolics of *Haematoxylon campechianum*. *Biochemical Systematics and Ecology (United Kingdom)*. 22, 763-764.

Escobar-Ramos, A., Gómez-Rivera, A., Lobato-García, C. E., Zamilpa, A., Ble-González, E. A., González-Cortazar, M., Gallegos-García, A. J. & Herrera-Ruiz, M. (2022). Anxiolytic effect of the heartwood of *Haematoxylum campechianum* L. and sapanchalcone in an in vivo model in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 284, 114764.

Escobar-Ramos, A., Lobato-García, C. E., Zamilpa, A., Gómez-Rivera, A., Tortoriello, J. & González-Cortazar, M. (2017). Homoisoflavonoids and chalcones isolated from *Haematoxylum campechianum* L., with spasmolytic activity. *Molecules*, 22(9), 1405.

Esteban, L. G., Guindeo, A., Peraza, C. & De Palacios, P. (2003). *La madera y su anatomía*. Madri: AMVE Ediciones. 327.

Euan-Tun, J. L., González-Durán, E. A., Ramírez-Benítez, J. E., Zamora-Crescencio, P., Vargas-Contreras, J. A., Rodríguez-Robles, U., Enríquez-Hernández, J. K., Caamal-

- Velázquez, J. H. & Aragón-Gastélum, J. L. (2021). Storage time effect on the germination of *Haematoxylum campechianum* in Campeche, Mexico. *Madera y Bosques*, 27(3).
- Fang, X., Yang, C., Wei, Y., Ma, Q., Yang, L. & Chen, X. (2011). Genomics grand for diversified plant secondary metabolites. *Plant Diversity and Resources*, 33(1), 53-64.
- Feller, I. C., Whigham, D. F., O'Neill, J. P. & McKee, K. L. (1999). Effects of nutrient enrichment on within-stand cycling in a mangrove forest. *Ecology*, 80(7), 2193-2205.
- Fraser, C. M. & Chapple, C. (2011). The phenylpropanoid pathway in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 9.
- Ganesan, K. & Xu, B. (2017). A critical review on polyphenols and health benefits of black soybeans. *Nutrients*, 9(5), 455.
- García, S., Alarcón, G., Gómez, M. & Heredia, N. (2005). *Haematoxylum brasiletto* extracts inhibit growth, enterotoxin production, and adhesion of *Vibrio cholerae*. *Food Biotechnology*, 19(1), 15-26.
- García-Plazaola, J. I., Fernández-Marín, B., Duke, S. O., Hernández, A., López-Arbeloa, F. & Becerril, J. M. (2015). Autofluorescence: biological functions and technical applications. *Plant Science*, 236, 136-145.
- Ghosh, D., & Xu, J. (2014). Abiotic stress responses in plant roots: a proteomics perspective. *Frontiers in plant science*, 5, 6.
- Gibbs, J. & Greenway, H. (2003). Mechanisms of anoxia tolerance in plants. I. Growth, survival and anaerobic catabolism. *Functional Plant Biology*, 30(1), 1-47.
- Gjerdrum, P. (2004). Sawlog quality of Nordic softwood: Measurable properties and quantitative models for heartwood, spiral grain and log geometry.
- Hacke, U. G. & Sperry, J. S. (2001). Functional and ecological xylem anatomy. *Perspectives in plant ecology, evolution and systematics*, 4(2), 97-115.
- Harris, P. J. & Hartley, R. D. (1976). Detection of bound ferulic acid in cell walls of the Gramineae by ultraviolet fluorescence microscopy. *Nature*, 259(5543), 508-510.

- Hasanuzzaman, M., Nahar, K. & Fujita, M. (2014). Role of tocopherol (vitamin E) in plants: abiotic stress tolerance and beyond. In *Emerging technologies and management of crop stress tolerance*, 267-289. Academic Press.
- Hassan, S., & Mathesius, U. (2012). The role of flavonoids in root–rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant–microbe interactions. *Journal of experimental botany*, 63(9), 3429-3444.
- Haston, E. M., Lewis, G. P., & Hawkins, J. A. (2005). A phylogenetic reappraisal of the Peltophorum group (Caesalpinieae: Leguminosae) based on the chloroplast trnL-F, rbcL and rps16 sequence data. *American Journal of Botany*, 92(8), 1359-1371.
- Hegarty, V. M., May, H. M., & Khaw, K. T. (2000). Tea drinking and bone mineral density in older women. *The American journal of clinical nutrition*, 71(4), 1003-1007.
- Herbario, C. I. C. Y. (2016). *Flora de la Península de Yucatán*. Unidad de Recursos Naturales, Centro de Investigación Científica de Yucatán, AC Mérida, México.
- Hook, D. D., Brown, C. L., & Kormanik, P. P. (1971). Inductive flood tolerance in swamp tupelo (*Nyssa sylvatica* var. *biflora* (Walt.) Sarg.). *Journal of Experimental Botany*, 22(1), 78-89.
- Huang, S., Ou, W., Li, W., Xiao, H., Pang, Y., Zhou, Y. & Wang, L. (2020). A total synthesis of (+)-brazilin. *Tetrahedron Letters*, 61(26), 152052.
- Huang, Y. (2007). *Synthesis of brazilin and the core of an ornate scyphostatin analog*. University of California, Santa Barbara. 5-7.
- Iida, Y., Kohyama, T. S., Kubo, T., Kassim, A. R., Poorter, L., Sterck, F. & Potts, M. D. (2011). Tree architecture and life-history strategies across 200 co-occurring tropical tree species. *Functional Ecology*, 25(6), 1260-1268.
- Imai, T., Tanabe, K., Kato, T., & Fukushima, K. (2005). Localization of ferruginol, a diterpene phenol, in *Cryptomeria japonica* heartwood by time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Planta*, 221(4), 549-556.

Islam, T., Ganesan, K., & Xu, B. B. (2019). New insight into mycochemical profiles and antioxidant potential of edible and medicinal mushrooms: A review. *International journal of medicinal mushrooms*, 21(3), 237-251.

Iyiola, S., & Avwioro, G. (2011). A New Haematoxyline Stain for The Demonstration of Nuclear and Extra Nuclear Substances. (1), 20-23

Ji, X., Dong, B., Shiran, B., Talbot, M. J., Edlington, J. E., Hughes, T. & Dolferus, R. (2011). Control of abscisic acid catabolism and abscisic acid homeostasis is important for reproductive stage stress tolerance in cereals. *Plant physiology*, 156(2), 647-662.

Jia, Y., Liu, H., Wang, H., Zou, D., Qu, Z., Wang, J. & Zhao, H. (2022). Effects of root characteristics on panicle formation in japonica rice under low temperature water stress at the reproductive stage. *Field Crops Research*, 277, 108395.

Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P. F. & Donoghue, M. J. (2009). *Sistemática Vegetal-: Um Enfoque Filogenético*. Artmed Editora.

Jung, Y., & Kim, I. (2015). Total synthesis of brazilin. *The Journal of organic chemistry*, 80(3), 2001-2005.

Junk WJ, Bailey PB, Sparks RE (1989) The flood pulse concept in river-floodplain systems. En Dodge DP (Ed.) *Proc. Int. Large River Symp, Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci.* 106. pp. 110-127.

Kampe, A. & Magel, E. (2013). New insights into heartwood and heartwood formation. In *Cellular aspects of wood formation*, 71-95. Springer, Berlin, Heidelberg.

Kandil, F. E., El-Sayed, N. H., Micheal, H. N., Ishak, M. S., & Mabry, T. J. (1996). Gallotannins and flavonoids from *Haematoxylon campechianum*. *Phytochemistry*, 42(4), 1243-1245.

Kandil, F. E., Michael, H. N., Ishak, M. S., & Mabry, T. J. (1999). Phenolics and flavonoids from *haematoxylon campechianum*. *Phytochemistry*, 51(1), 133-134.

- Karapanagiotis, I., & Karadag, R. (2015). Dyes in post-byzantine and ottoman textiles: a comparative HPLC study. *Mediterranean Archaeology and Archaeometry*, 15(1), 177-189.
- Kazakevich, Y. V., & Lobrutto, R. (2007). *HPLC for pharmaceutical scientists*. John Wiley & Sons.
- Ke, F., Zhang, M., Qin, N., Zhao, G., Chu, J. & Wan, X. (2019). Synergistic antioxidant activity and anticancer effect of green tea catechin stabilized on nanoscale cyclodextrin-based metal–organic frameworks. *Journal of Materials Science*, 54(14), 10420-10429.
- Keeley, J. E. (1978). Malic acid accumulation in roots in response to flooding: evidence contrary to its role as an alternative to ethanol. *Journal of Experimental Botany*, 29(6), 1345-1349.
- Keeley, J. E. (1979). Population differentiation along a flood frequency gradient: physiological adaptations to flooding in *Nyssa sylvatica*. *Ecological Monographs*, 49(1), 89-108.
- Keeley, J. E., & Franz, E. H. (1979). Alcoholic fermentation in swamp and upland populations of *Nyssa sylvatica*: temporal changes in adaptive strategy. *The American Naturalist*, 113(4), 587-592.
- Kiernan, J. A., & Horobin, R. W. (2010). A special issue devoted to hematoxylin, hematein, and hemalum. *Biotechnic & Histochemistry*, 85(1), 5-6.
- King, D. A., Davies, S. J., Tan, S. & Nur Supardi, M. N. (2009). Trees approach gravitational limits to height in tall lowland forests of Malaysia. *Functional Ecology*, 23(2), 284-291.
- Kolb, R. M. & Joly, C. A. (2009). Flooding tolerance of *Tabebuia cassinoides*: metabolic, morphological and growth responses. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 204(7), 528-535.
- Kozłowski, T. T. (2002). Physiological-ecological impacts of flooding on riparian forest ecosystems. *Wetlands*, 22(3), 550-561.

Kreuzwieser, J., Papadopoulou, E. & Rennenberg, H. (2004). Interaction of flooding with carbon metabolism of forest trees. *Plant Biology*, 6(03), 299-306.

Kumar, G., & Murugesan, A. G. (2007). Influence of *Helicteres isora* bark extracts on plasma and tissue glycoprotein components in streptozotocin diabetic rats. *J. Clin. Diag. Res*, 4, 330-338.

Kumar, G., Banu, G. S. & Murugesan, A. G. (2008). Effect of *Helicteres isora* bark extracts on heart antioxidant status and lipid per oxidation in streptozotocin diabetic rats. *Journal of applied biomedicine*, 6(2).

Kumar, G., Pepe, D. & Steer, R. A. (2004). Adolescent psychiatric inpatients' self-reported reasons for cutting themselves. *The Journal of nervous and mental disease*, 192(12), 830-836.

Kurepin, L. V., Ivanov, A. G., Zaman, M., Pharis, R. P., Hurry, V. & Hüner, N. P. (2017). Interaction of glycine betaine and plant hormones: protection of the photosynthetic apparatus during abiotic stress. In *Photosynthesis: Structures, mechanisms, and applications*.185-202. Springer, Cham.

La Camera, S., Gouzerh, G., Dhondt, S., Hoffmann, L., Fritig, B., Legrand, M., & Heitz, T. (2004). Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways. *Immunological reviews*, 198(1), 267-284.

Larousse, P. (1867). *Grand dictionnaire universel du XIXe siècle*. Tome III. Librairie Classique Larousse et Boyer. Paris. Francia, 230.

Le Roy, J., Huss, B., Creach, A., Hawkins, S., & Neutelings, G. (2016). Glycosylation is a major regulator of phenylpropanoid availability and biological activity in plants. *Frontiers in plant science*, 7, 735.

Legume Phylogeny Working Group, Bruneau, A., Doyle, J. J., Herendeen, P., Hughes, C., Kenicer, G. & van Wyk, B. E. (2013). Legume phylogeny and classification in the 21st century: progress, prospects and lessons for other species-rich clades. *Taxon*, 62(2), 217-248.

- Lehnebach, R., Morel, H., Bossu, J., Le Moguédec, G., Amusant, N., Beauchêne, J., & Nicolini, E. (2017). Heartwood/sapwood profile and the tradeoff between trunk and crown increment in a natural forest: the case study of a tropical tree (*Dicorynia guianensis* Amsh., Fabaceae). *Trees*, 31(1), 199-214.
- Lema-Rumińska, J., Kulus, D., Tymoszuik, A., Varejão, J. M., & Bahcevandziev, K. (2019). Profile of secondary metabolites and genetic stability analysis in new lines of *Echinacea purpurea* (L.) Moench micropropagated via somatic embryogenesis. *Industrial Crops and Products*, 142, 111851.
- Lim, K. J., Paasela, T., Harju, A., Venäläinen, M., Paulin, L., Auvinen, P. & Teeri, T. H. (2016). Developmental changes in Scots pine transcriptome during heartwood formation. *Plant Physiology*, 172(3), 1403-1417.
- Lim, K. J., Paasela, T., Harju, A., Venäläinen, M., Paulin, L., Auvinen, P., ... & Teeri, T. H. (2016). Developmental changes in Scots pine transcriptome during heartwood formation. *Plant Physiology*, 172(3), 1403-1417.
- Lin, L. G., Liu, Q. Y., & Ye, Y. (2014). Naturally occurring homoisoflavonoids and their pharmacological activities. *Planta medica*, 80(13), 1053-1066
- Liu, L., Zhang, H., Ju, C., Xiong, Y., Bian, J., Zhao, B. & Yang, J. (2014). Changes in grain yield and root morphology and physiology of mid-season rice in the Yangtze River Basin of China during the last 60 years. *Journal of Agricultural Science*, 6(7), 1.
- Llewellyn, B. D. (2009). Nuclear staining with alum hematoxylin. *Biotechnic & Histochemistry*, 84(4), 159-177.
- Loyola-Vargas, V. M. & Ochoa-Alejo, N. (2016). Somatic embryogenesis. An overview. *Somatic embryogenesis: fundamental aspects and applications*, 1-8.
- Lugo, A. E., Brown, S. A. N. D. R. A. & Brinson, M. M. (1990). Concepts in wetland ecology. *Ecosystems of the world*, 15, 53-85.
- Ma, Z., Li, S., Zhang, M., Jiang, S. & Xiao, Y. (2010). Light intensity affects growth, photosynthetic capability, and total flavonoid accumulation of *Anoectochilus* plants. *HortScience*, 45(6), 863-867.

- Magel, E. & Hübner, B. (1997). Distribution of phenylalanine ammonia lyase and chalcone synthase within trunks of *Robinia pseudoacacia* L. *Botanica Acta*, 110(4), 314-322.
- Magel, E., Abdel-Latif, A., & Hampp, R. (2001). Non-structural carbohydrates and catalytic activities of sucrose metabolizing enzymes in trunks of two *Juglans* species and their role in heartwood formation. *Holzforschung*, 55(2), 135-145.
- Magel, E., Jay-Allemand, C. & Ziegler, H. (1994). Formation of heartwood substances in the stemwood of *Robinia pseudoacacia* L. II. Distribution of nonstructural carbohydrates and wood extractives across the trunk. *Trees*, 8(4), 165-171.
- Mathesius, U. (2001). Flavonoids induced in cells undergoing nodule organogenesis in white clover are regulators of auxin breakdown by peroxidase. *Journal of Experimental Botany*, 52(suppl_1), 419-426.
- Mathesius, U., Bayliss, C., Weinman, J. J., Schlaman, H. R., Spaink, H. P., Rolfe, B. G. & Djordjevic, M. A. (1998). Flavonoids synthesized in cortical cells during nodule initiation are early developmental markers in white clover. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11(12), 1223-1232.
- Mayer, I., Koch, G., & Puls, J. (2006). Topochemical investigations of wood extractives and their influence on colour changes in American black cherry (*Prunus serotina* Borkh.). *Holzforschung*, 60(6), 589-594.
- McKee K, Feller I (1995) Interactions among nutrients, chemical and structural defense, and herbivory in mangroves at Rookery Bay, Florida. Final report. Office of Ocean and Coastal Resource Management, National Oceanic and Atmospheric Administration, Silver Spring, Maryland, USA.
- Mickymaray, S., Alfaiz, F. A., & Paramasivam, A. (2020). Efficacy and mechanisms of flavonoids against the emerging opportunistic nontuberculous *Mycobacteria*. *Antibiotics*, 9(8), 450.
- Morris, H., Hietala, A. M., Jansen, S., Ribera, J., Rosner, S., Salmeia, K. A., & Schwarze, F. W. (2020). Using the CODIT model to explain secondary metabolites of

xylem in defence systems of temperate trees against decay fungi. *Annals of botany*, 125(5), 701-720.

Mottiar, Y., Gierlinger, N., Jeremic, D., Master, E. R., & Mansfield, S. D. (2020). Atypical lignification in eastern leatherwood (*Dirca palustris*). *New Phytologist*, 226(3), 704-713.

Moya, R., & Berrocal, A. (2010). Wood colour variation in sapwood and heartwood of young trees of *Tectona grandis* and its relationship with plantation characteristics, site, and decay resistance. *Annals of Forest Science*, 67(1), 109.

Nakaba, S., Begum, S., Yamagishi, Y., Jin, H. O., Kubo, T., & Funada, R. (2012). Differences in the timing of cell death, differentiation and function among three different types of ray parenchyma cells in the hardwood *Populus sieboldii* × *P. grandidentata*. *Trees*, 26(3), 743-750.

Nakaba, S., Sano, Y., Kubo, T., & Funada, R. (2006). The positional distribution of cell death of ray parenchyma in a conifer, *Abies sachalinensis*. *Plant Cell Reports*, 25(11), 1143-1148.

Nasirizadeh, N., Zare, H. R., Pournaghi-Azar, M. H. & Hejazi, M. S. (2011). Introduction of hematoxylin as an electroactive label for DNA biosensors and its employment in detection of target DNA sequence and single-base mismatch in human papilloma virus corresponding to oligonucleotide. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(5), 2638-2644.

Niembro, A. (2002). *Haematoxylum campechianum* L. En: Vozzo, J. A. (ed.). Tropical tree seed manual. Part 2 Species Descriptions. USDA Forest Service. Washington, DC., USA. 497-499.

Nirmal, N. P., Rajput, M. S., Prasad, R. G. & Ahmad, M. (2015). Brazilin from *Caesalpinia sappan* heartwood and its pharmacological activities: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 8(6), 421-430.

Nishiuchi, S., Yamauchi, T., Takahashi, H., Kotula, L., & Nakazono, M. (2012). Mechanisms for coping with submergence and waterlogging in rice. *Rice*, 5(1), 1-14.

Nodoushan, S. M., Nasirizadeh, N., Amani, J., Halabian, R., & Fooladi, A. A. I. (2019). An electrochemical aptasensor for staphylococcal enterotoxin B detection based on

reduced graphene oxide and gold nano-urchins. *Biosensors and Bioelectronics*, 127, 221-228.

Orwa, C., Mutua, A., Kindt, R., Jamnadass, R. & Anthony S. (2009). *Agroforestry data base: a tree reference and selection guide version 4.0*.

Osunkoya, O. O., Omar-Ali, K., Amit, N., Dayan, J., Daud, D. S. & Sheng, T. K. (2007). Comparative height–crown allometry and mechanical design in 22 tree species of Kuala Belalong rainforest, Brunei, Borneo. *American Journal of Botany*, 94(12), 1951-1962.

Pagès-Camagna, S., Duval, A. & Guicharnaud, H. (2004). Study of Gustave Moreau's black drawings: identification of the graphic materials by Raman microspectrometry and PIXE. *Journal of Raman Spectroscopy*, 35(8-9), 628-632.

Pandian, M. R., Banu, G. S. & Kumar, G. (2006). A study of the antimicrobial activity of *Alangium salviifolium*. *Indian journal of pharmacology*, 38(3), 203.

Patra, B., Schluttenhofer, C., Wu, Y., Pattanaik, S. & Yuan, L. (2013). Transcriptional regulation of secondary metabolite biosynthesis in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(11), 1236-1247.

Peng, T., Wu, J. R., Tong, L. J., Li, M. Y., Chen, F., Leng, Y. X., ... & Ding, J. (2014). Identification of DW532 as a novel anti-tumor agent targeting both kinases and tubulin. *Acta Pharmacologica Sinica*, 35(7), 916-928.

Pennington, T. D. & Sarukhán, J. (1998). *Árboles tropicales de México*. Universidad Nacional Autónoma de México.

Pérez, I. (2014). Tolerancia y capacidad de fitorremediación de árboles nativos tropicales a suelo contaminado con petróleo. Tesis de Doctorado. El Colegio de la Frontera Sur. Villahermosa, Tabasco, México. 76 p.

Pezeshki, S. R. (2001). Wetland plant responses to soil flooding. *Environmental and Experimental Botany*, 46(3), 299-312.

Phelps, J. E. & McGinnes, E. A. (1983). Growth-quality evaluation of black walnut wood. Part III-An anatomical study of color characteristics of black walnut veneer. *Wood and Fiber Science*, 15(3), 212-218.

Phelps, J. E. & McGinnes, E. A. (1983). Growth-quality evaluation of black walnut wood. Part III-An anatomical study of color characteristics of black walnut veneer. *Wood and Fiber Science*, 15(3), 212-218.

Pinet, A. P. (1998). La Península de Yucatán en el Archivo General de la Nación. Centro de Investigaciones Humanísticas de Mesoamérica y el Estado de Chiapas. 432 p.

Pinzón Esquivel, J. P. (2011). Las Bromeliáceas de la selva baja inundable de la Península de Yucatán. Desde el Herbario CICY. 3: 14–15.

Pourcel, L., Routaboul, J. M., Cheynier, V., Lepiniec, L. & Debeaujon, I. (2007). Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends in plant science*, 12(1), 29-36.

Pusztahelyi, T., Holb, I. J. & Pócsi, I. (2015). Secondary metabolites in fungus-plant interactions. *Frontiers in plant science*, 6, 573.

Quintilhan, M. T., Santini Jr, L., Rodriguez, D. R. O., Guillemot, J., Cesilio, G. H. M., Chambi-Legoas, R., Yann, N. & Tomazello-Filho, M. (2021). Growth-ring boundaries of tropical tree species: Aiding delimitation by long histological sections and wood density profiles. *Dendrochronologia*, 69, 125878.

Rebollar, S., Olvera, C. D. L. P. P., & Quintanar, A. (1993). Anatomía de la madera de cinco especies de Quintana Roo, México. *Botanical Sciences*, (53), 113-124.

Requena-Rojas, E. J., & Taquire Arroyo, A. (2019). Anatomía del leño y caracterización de los anillos de crecimiento en individuos de *Polylepis tarapacana* en el Altiplano-Tacna-Perú. *Quebracho*, 27, 66-75.

Reyna-Hurtado, R., O'Farril, G., Sima, D., Andrade, M., Padilla, A. & Sosa, L. (2010). Las aguadas de Calakmul, reservorios de fauna Silvestre y de la riqueza natural de México. *Biodiversitas*, 93, 1-6.

- Rivero-Cruz, J. F. (2008). Antimicrobial compounds isolated from *Haematoxylon brasiletto*. *Journal of ethnopharmacology*, 119(1), 99-103.
- Robertson, A. I. (1988). Decomposition of mangrove leaf litter in tropical Australia. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 116(3), 235-247.
- Rodríguez, V. & Fortoul T. I. (2013). Técnica histológica y sus aplicaciones. En: *Histología y biología celular*. 2ª ed. McGraw-Hill. D.F. 16.
- Roy Chowdhury, R., & Turner, B. L. (2006). Reconciling agency and structure in empirical analysis: smallholder land use in the southern Yucatan, Mexico. *Annals of the Association of American Geographers*, 96(2), 302-322.
- Ruiz Altamirano, M., Gomez Dominguez, A., Lund, H. G., Caballero-Deloya, M. & Villarreal-Canton, R. (1987). Diagnóstico de los sistemas de inventario forestal utilizados en la region tropico humeda de Mexico. In *Land and resource evaluation for national planning in the Tropics. An International Conference and Workshop*, Chetumal, Mexico, January 25-31, 1987. (Proceedings). Department of Agriculture.
- Russell, J. H., & Daniels, B. (2010). Variation in western redcedar heartwood extractives. In *A Tale of Two Cedars: International Symposium on Western Redcedar and Yellow-Cedar*. CA Harrington (Ed.). General Technical Report PNW-GTR-828. USDA Forest Service, Pacific Northwest Research Station, Portland, Oregon. 83-86.
- Sanches, M. C., Mielke, M. S., Souza, C. S. D. D., Vieira, A. J. D., Lopes, M. M. M., & Silva Júnior, M. B. D. (2009). Morfologia foliar de indivíduos jovens e adultos de *Caesalpinia echinata* Lam. numa floresta semidecídua do Sul da Bahia. *Revista Árvore*, 33, 885-893.
- Scharf, D. H., Heinekamp, T., & Brakhage, A. A. (2014). Human and plant fungal pathogens: the role of secondary metabolites. *PLoS pathogens*, 10(1), e1003859.
- Schöngart, J., Piedade, M. T. F., Wittmann, F., Junk, W. J., & Worbes, M. (2005). Wood growth patterns of *Macaranga acaciifolia* (Benth.) Benth. (Fabaceae) in Amazonian black-water and white-water floodplain forests. *Oecologia*, 145(3), 454-461.

SEMARNAT. 2010a. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Diario Oficial de la Federación (DOF).

SEMARNAT. 2010b. Árboles Patrimoniales del Estado de Campeche. Gobierno del Estado de Campeche. Secretaría de Medio Ambiente y Aprovechamiento Sustentable. 56.

Sharma, A. (2018). Gene expression analysis in medicinal plants under abiotic stress conditions. In *Plant Metabolites and Regulation Under Environmental Stress*. 407-414. Academic Press.

Shaw, L. J., Morris, P. & Hooker, J. E. (2006). Perception and modification of plant flavonoid signals by rhizosphere microorganisms. *Environmental Microbiology*, 8(11), 1867-1880.

Shi, X., Tao, G., Ji, L., & Tian, G. (2020). Sappanone A protects against myocardial ischemia reperfusion injury by modulation of Nrf2. *Drug design, development and therapy*, 14, 61-71.

Shinozaki, K., Yoda, K., Hozumi, K. & Kira, T. (1964). A quantitative analysis of plant form-the pipe model theory: I. Basic analyses. *Japanese Journal of ecology*, 14(3), 97-105.

Sillett, S. C., Van Pelt, R., Koch, G. W., Ambrose, A. R., Carroll, A. L., Antoine, M. E. & Mifsud, B. M. (2010). Increasing wood production through old age in tall trees. *Forest Ecology and Management*, 259(5), 976-994.

Sobeh, M., Mahmoud, M. F., Rezaq, S., Abdelfattah, M. A., Mostafa, I., Alsemeh, A. E., El-Shazly, A.M.; Yasri & Wink, M. (2020). *Haematoxylum campechianum* extract ameliorates neuropathic pain via inhibition of NF- κ B/TNF- α /NOX/iNOS signalling pathway in a rat model of chronic constriction injury. *Biomolecules*, 10(3), 386.

Spicer, R. & Groover, A. (2010). Evolution of development of vascular cambia and secondary growth. *New Phytologist*, 186(3), 577-592.

Spicer, R. (2005). Senescence in secondary xylem: heartwood formation as an active developmental program. In *Vascular transport in plants*. 457-475. Academic Press.

Spicer, R. (2014). Symplasmic networks in secondary vascular tissues: parenchyma distribution and activity supporting long-distance transport. *Journal of experimental botany*, 65(7), 1829-1848.

Sukalingam, K., Ganesan, K., & Xu, B. (2017). *Trianthema portulacastrum* L. (giant pigweed): phytochemistry and pharmacological properties. *Phytochemistry Reviews*, 16(3), 461-478.

Tahmasebi, A., Ebrahimie, E., Pakniyat, H., Ebrahimi, M. & Mohammadi-Dehcheshmeh, M. (2019). Insights from the *Echinacea purpurea* (L.) Moench transcriptome: Global reprogramming of gene expression patterns towards activation of secondary metabolism pathways. *Industrial Crops and Products*, 132, 365-376.

Takahashi, A. & Ohnishi, T. (2004). The significance of the study about the biological effects of solar ultraviolet radiation using the exposed facility on the international space station. *Biological Sciences in Space*, 18(4), 255-260.

Taylor, J. P., Wilson, B., Mills, M. S. & Burns, R. G. (2002). Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(3), 387-401.

Titford, M. (2005). The long history of hematoxylin. *Biotechnic & histochemistry*, 80(2), 73-78.

Tomlinson, P. B. (1986). *The Botany of Mangroves* Cambridge University Press London, RU. 419.

Turner, N. C. (2019). Imposing and maintaining soil water deficits in drought studies in pots. *Plant and Soil*, 439(1), 45-55.

Usha, K., & Singh, B. (2013). Potential applications of remote sensing in horticulture—A review. *Scientia horticultrae*, 153, 71-83.

Vester, H. F., Lawrence, D., Eastman, J. R., Turner, B. L., Calme, S., Dickson, R., Pozo, C. & Sangermano, F. (2007). Land change in the southern Yucatan and Calakmul Biosphere Reserve: effects on habitat and biodiversity. *Ecological Applications*, 17(4), 989-1003.

- Villegas, P. (2020). El inicio de la explotación del palo de tinte en Yucatán a cargo de Marcos de Ayala Trujeque, Siglo XVI. *Temas Americanistas*, 44, 318-333.
- Villegas, P., & Torras, R. (2014). La extracción y exportación del palo de tinte a manos de colonos extranjeros: El caso de la B. Anizan y Cía. *Secuencia*, (90), 79-93.
- Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular plant*, 3(1), 2-20.
- Wang, G. B. & Cao, F. L. (2012). Formation and function of aerenchyma in baldcypress (*Taxodium distichum* (L.) Rich.) and Chinese tallow tree (*Sapium sebiferum* (L.) Roxb.) under flooding. *South African Journal of Botany*, 81, 71-78.
- Wang, M., Chen, Z., Yang, L., & Ding, L. (2021). Sappanone A Protects Against Inflammation, Oxidative Stress and Apoptosis in Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury by Alleviating Endoplasmic Reticulum Stress. *Inflammation*, 44(3), 934-945.
- Wang, X. J., Ren, J. L., Zhang, A. H., Sun, H., Yan, G. L., Han, Y., & Liu, L. (2019). Novel applications of mass spectrometry-based metabolomics in herbal medicines and its active ingredients: current evidence. *Mass Spectrometry Reviews*, 38(4-5), 380-402.
- Wang, X., Zhang, H., Yang, X., Zhao, J. & Pan, C. (2013). Enantioselective total synthesis of (+)-brazilin, (-)-brazilein and (+)-brazilide A. *Chemical Communications*, 49(47), 5405-5407.
- Wang, Y. H. & Irving, H. R. (2011). Developing a model of plant hormone interactions. *Plant signaling & behavior*, 6(4), 494-500.
- Wani, S. H., Kumar, V., Shriram, V. & Sah, S. K. (2016). Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *The Crop Journal*, 4(3), 162-176.
- Whitlow TH, Harris R (1979) Flood tolerance in plants: a state-of-the-art review. U.S. Army Eng. Waterways Exp. Stn. TR E- 79-2. Vicksburg, MS, EEUU. 161 pp.
- Winkel-Shirley, B. (2001). Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant physiology*, 126(2), 485-493.

- Wu, C., Cui, K., Wang, W., Li, Q., Fahad, S., Hu, Q., Huang, J., Nie, L., Mohapatra, P. K. & Peng, S. (2017). Heat-induced cytokinin transportation and degradation are associated with reduced panicle cytokinin expression and fewer spikelets per panicle in rice. *Frontiers in Plant Science*, 8, 371.
- Xiao, Y., Jie, Z., Wang, M., Lin, G., & Wang, W. (2009). Leaf and stem anatomical responses to periodical waterlogging in simulated tidal floods in mangrove *Avicennia marina* seedlings. *Aquatic Botany*, 91(3), 231-237.
- Xu, H. X. & Lee, S. F. (2004). The antibacterial principle of *Caesalpinia sappan*. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 18(8), 647-651.
- Yamauchi, T. & Nakazono, M. (2022). Mechanisms of lysigenous aerenchyma formation under abiotic stress. *Trends in Plant Science*, 27(1), 13-15.
- Yang, J. C., Zhang, H., & ZHANG, J. H. (2012). Root morphology and physiology in relation to the yield formation of rice. *Journal of Integrative Agriculture*, 11(6), 920-926.
- Young, A. G. & Merriam, H. G. (1994). Effects of forest fragmentation on the spatial genetic structure of *Acer saccharum* Marsh. (sugar maple) populations. *Heredity*, 72(2), 201-208.
- Zamora, L. F. (2010). Evaluación espacio-temporal del crecimiento de plántulas con potencial para la restauración de humedales (Doctoral dissertation, Tesis de maestría. El Colegio de la Frontera Sur. Villahermosa, Tabasco, México).
- Zamora-Cornelio, L. F., Ochoa-Gaona, S., Vargas Simón, G., Castellanos Albores, J. & HJ de Jong, B. (2010). Germinación de semillas y clave para la identificación de plántulas de seis especies arbóreas nativas de humedales del sureste de México. *Revista de Biología Tropical*, 58(2), 717-732.
- Zani, L. B., Macieira, B. P. B., Corte, V. B., Milanez, C. R. D. & Cuzzuol, G. R. F. (2017). The vessel elements and hemicelluloses as the most plastic structural components of the brazilwood ontogeny (*Caesalpinia echinata* Lam.) medium morphotype. *Brazilian Journal of Botany*, 40(3), 793-800.

Zanuncio, J. C., Lemes, P. G., Antunes, L. R., Maia, J. L. S., Mendes, J. E. P., Tanganelli, K. M., Salvador, J. F. & Serrão, J. E. (2016). The impact of the Forest Stewardship Council (FSC) pesticide policy on the management of leaf-cutting ants and termites in certified forests in Brazil. *Annals of Forest Science*, 73(2), 205-214.

Zumaya-Mendoza, S. & Terrazas, T. (2016). Variación de la longitud de los elementos de vaso y las fibras en los cámbiumes sucesivos de *Iresine latifolia* (Amaranthaceae). *Revista mexicana de biodiversidad*, 87(4), 1315-1320.