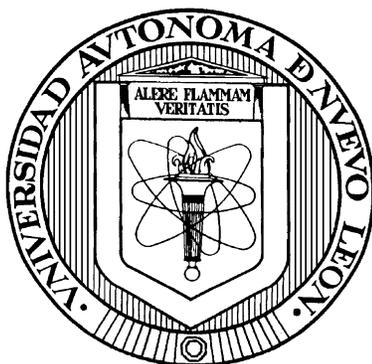


**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**EFFECTO DEL NITRÓGENO Y VARIABILIDAD INTRAESPECIE SOBRE  
SÍNTESIS DE PEROXISOMICINA A1 (PA1) EN *Karwinskia parvifolia*:  
RENDIMIENTO DE FRUTO, CONCENTRACIÓN Y CONTENIDO DE PA1 POR  
PLANTA**

**Por**

**RUBÉN LUJÁN RANGEL**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**J u l i o , 2 0 0 8**

**EFFECTO DEL NITRÓGENO Y VARIABILIDAD INTRAESPECIE  
SOBRE SÍNTESIS DE PEROXISOMICINA A1 (PA1) EN  
*Karwinskia parvifolia*: RENDIMIENTO DE FRUTO,  
CONCENTRACIÓN Y CONTENIDO DE PA1 POR PLANTA**

**Aprobación de la tesis:**

---

**Ph.D. EMILIO OLIVARES SÁENZ**  
Asesor principal

---

**Ph.D. RIGOBERTO E. VÁZQUEZ ALVARADO**  
Co-asesor

---

**Dr. med. LOURDES GARZA OCAÑAS**  
Co-asesor

---

**Dr. med. OSCAR TORRES ALANÍS**  
Co-asesor

---

**Dr. C. EDUARDO J. TAMEZ DE LA O**  
Co-asesor

---

**Ph.D. FRANCISCO ZAVALA GARCÍA**  
Subdirector de Estudios de Postgrado e Investigación

**EFFECTO DEL NITRÓGENO Y VARIABILIDAD INTRAESPECIE SOBRE SÍNTESIS DE PEROXISOMICINA A1 (PA1) EN *Karwinskia parvifolia*: RENDIMIENTO DE FRUTO, CONCENTRACIÓN Y CONTENIDO DE PA1 POR PLANTA**

**Por: RUBÉN LUJÁN RANGEL**

Este trabajo se llevó a cabo en la Universidad Autónoma de Nuevo León.

El cultivo, cosecha y manejo de post cosecha del fruto de *Karwinskia parvifolia*, así como la extracción y cuantificación de PA1 se llevó a cabo en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina.

Las pruebas de germinación y análisis de suelos se realizaron en la Facultad de Agronomía.

# **EFFECTO DEL NITRÓGENO Y VARIABILIDAD INTRAESPECIE SOBRE SÍNTESIS DE PEROXISOMICINA A1 (PA1) EN *Karwinskia parvifolia*: RENDIMIENTO DE FRUTO, CONCENTRACIÓN Y CONTENIDO DE PA1 POR PLANTA**

**Por: RUBÉN LUJÁN RANGEL**

## **Objetivo del estudio:**

El potencial uso farmacológico de peroxisomicina A1 (PA1) en contra de algunos tipos de tumores, implicaría la necesidad de asegurar el suministro de dicha sustancia con fines terapéuticos. En laboratorio se requieren 10 kilogramos de endocarpios secos de *Karwinskia parvifolia* para la obtención de un gramo de PA1. Considerando que el peso de endocarpio seco representa un 16 % del peso de fruto fresco, esto significaría la necesidad de una cosecha mínima de 60 kilogramos de fruto fresco para la extracción y purificación de un gramo de PA1. Se estima que las plantas silvestres producen un promedio de un kilogramo de fruto fresco por año, por lo tanto, para obtener un gramo de PA1 sería requerida una población de unas 60 plantas silvestres, lo cual implicaría un problema porque se ha observado alta variabilidad en la concentración de PA1 tanto por efecto ambiental como genético. Entonces, la domesticación e identificación de plantas de alto rendimiento, asociado a la optimización de prácticas agronómicas, sería una línea de investigación que podría incrementar la productividad de PA1.

**Contribución:** Se reporta la magnitud del efecto del nitrógeno, de la planta, y del ambiente, sobre las variables: rendimiento de fruto seco; concentración y contenido de PA1 por planta en *Karwinskia parvifolia*.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi esposa Laura, por su amor, su paciencia y generoso apoyo. A nuestros hijos Adriana Laura, Victoria Alejandra, Rubén, Daniela y Rodrigo, quienes han generado e impulsado este sentimiento de superación personal.

A mis padres Víctor y Ofelia, por darme la vida, su amor y sus palabras de aliento para seguir adelante. A mis hermanos Maricela (+), Silvia, Josefina, Víctor, Julio, Guadalupe y Sanjuana, de quienes he recibido su cariño y apoyo moral para continuar con mis estudios. A mi sobrina Maricela (+). En memoria.

A mis amigos de siempre: Arturo Sánchez Garza, Arturo Sánchez Concha, José Cruz Amaya Alemán, Simón Lazcano Serrato, y tantos amigos que recuerdo con afecto.

Especialmente al Dr. med. Oscar Torres Alanís, por su apoyo para el desarrollo de esta investigación.

A mis asesores:

Ph. D. Emilio Olivares Sáenz, por su aceptación a dirigir mi tesis y por la confianza durante el desarrollo de esta investigación.

Ph. D. Rigoberto E. Vázquez Alvarado por su interés y ánimo para que iniciara estudios de posgrado y por el apoyo brindado en esta tesis.

Dra. med. Lourdes Garza Ocañas, por su apoyo y su confianza para impulsar esta investigación.

Dr. C. Eduardo J. Tamez de la O, por su colaboración y apoyo en esta tesis.

Al M. C. Humberto Garza Ulloa y a la Q. C. B. Daniela Padilla Alonso, por su colaboración en el método analítico. A los químicos Arturo Longoria y Mónica González y a todo el personal de Farmacología por su apoyo para la realización de esta investigación.

A la Dirección de la Facultad de Medicina por la oportunidad que me brinda.

A la Subdirección de Estudios de Postgrado de la Facultad de Agronomía por el apoyo generoso para la continuación de mis estudios.

A los profesores:

Ph. D. Francisco Zavala García y Ph. D. Ciro G. S. Valdés Lozano, por su apoyo y atenciones.

A mis compañeros de generación, por sus comentarios de apoyo.

Al personal de la Sub'Dirección de Posgrado, por todas sus atenciones.

Al CONACYT por la beca recibida.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
<b>1. INTRODUCCION</b>	1
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	5
2.1 Propagación	9
2.2 Floración-fructificación	10
2.3 Cosecha	10
2.4 Síntesis de peroxisomicina A1 (PA1)	13
2.5 Nutrición vegetal	18
2.6 Producción de PA1	24
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	26
3.1 Material de campo	26
3.2 Método de campo	27
3.3 Datos basale	28
3.4 Fertilización	28
3.5 Descripción de medición de variables	29
3.6 Material de laboratorio	31
3.7 Método de laboratorio	32
3.8 Método estadístico	35

<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
3.8.1 Diseño experimental	36
3.8.2 Hipótesis estadísticas	37
3.8.3 Modelo matemático	38
3.8.4 Croquis de un diseño cruzado estándar 2x2, dos secuencias, dos período	39
3.9 Ejemplo de cromatograma de PA1	40
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>41</b>
4.1 Datos basales (cosecha de 2004)	41
4.2 Características generales del suelo: pH y conductividad eléctrica	41
4.3 Desarrollo del cultivo: aparición fenotípica	42
4.3.1 Floración, maduración del fruto y cosecha	44
4.4 Resultados generales de campo y de laboratorio	46
4.4.1 Rendimiento de fruto fresco y de fruto seco por planta	46
4.4.2 Concentración de PA1	47
4.4.3 Contenido de PA1	47
4.4.4 Peso de 100 frutos y de 100 endocarpios secos	47
4.5 Resultados por tratamiento	47
4.6 Rendimiento promedio por año de cosecha	49



<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
4.9.1 Correlaciones entre CONCPA1 y RFSP; mgPA1; PFS; PHS y correlaciones entre PFS y las demás variables	63
4.9.2 Correlaciones entre mgPA y RFSP; mgPA1; PFS; PHS	63
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>72</b>
<b>6. PERSPECTIVA</b>	<b>74</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>75</b>
<b>APÉNDICE</b>	<b>80</b>
<b>ANEXO</b>	<b>89</b>

## LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
I. Resultados promedio y desviación estándar (DE) por tratamiento en cosechas de los años 2005 y 2006 en <i>K. parvifolia</i> .	48
II. Resultados promedio y desviación estándar (DE), el cual incluye resultados de los dos tratamientos por año de cosecha.	49
III. Resultados promedio y desviación estándar (DE) de peso seco de 100 frutos (PFS), peso seco de 100 endocarpios (PHS), cociente de PHS/PFS, así como de concentración de PA1 en microgramos por gramo de peso seco ( $\mu\text{g PA1/g p. s.}$ ) por grupo de plantas (con dos repeticiones cada planta-2005 y 2006) de <i>K. parvifolia</i> .	62

## LISTA DE CUADROS DEL APÉNDICE

Cuadro		Página
A-I	Resultados promedio ( $n = 2$ ) y desviación estándar del rendimiento de fruto fresco por planta (RFFP); rendimiento de fruto seco por planta (RFSP); concentración en $\mu\text{g}$ de PA1 por gramo de peso seco ( $\mu\text{g PA1/g p.s.}$ ); contenido de PA1 por planta (mg); peso en g de 100 frutos secos (PFS); peso en g de 100 endocarpios secos (PHS). Los datos se tomaron de la cosecha de 16 plantas de <i>Karwinskia parvifolia</i> durante dos años consecutivos.	81
A-II	Análisis de varianza para rendimiento de fruto seco por planta (RFSP); concentración de PA1 por gramo de peso seco (CONCPA1); contenido de PA1 por planta (mgPA1); peso de 100 frutos secos (PFS) y peso de 100 endocarpios secos (PHS).	83
A-III	Prueba estadística para evaluar el efecto residual.	85
A-IV	Resultados sobre el análisis de correlación de Pearson ( $r$ ) entre las variables RFSP; PFS; PHS; CONCPA1; mgPA1. El tamaño de muestra fue de 32 para cada variable.	86

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
A-V	Temperatura promedio y precipitación pluvial durante los años 2005 y 2006.	87
A-VI	Resultados promedio $\pm$ (DE) por tratamiento; por año; para las variables: RFFP; RFSP; CONCPA1; mgPA1; PFS y PHS. En todas las variables se utilizó un tamaño de muestra de 8 plantas.	88

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura de las toxinas T-496, T-514, T-516 y T-544	07
2	Domesticación de <i>Karwinskia parvifolia</i> : (a) germinación en perlita agrícola; (b) crecimiento vegetativo, con una distancia entre surcos de 70 cm y entre plantas de 25 cm; (c) injerto de púa en <i>Karwinskia parvifolia</i> .	10
3	Producción promedio de fruto fresco en <i>K. humboldtiana</i> de dos años de edad.	11
4	Síntesis de toxinas: T-496, T-514 y T-544 durante un año de cosecha en plantas cultivadas de "tullidora" ( <i>Karwinskia humboldtiana</i> ).	15
5	Curva de calibración para PA1.	35
6	Tiempo de retención (min) de PA1 y otras sustancias y solventes.	40
7	En plantas de <i>K. parvifolia</i> que recibieron suplemento nitrogenado (plantas 08, 12, 13), se observa un verde intenso, mientras que las plantas que no recibieron suplemento nitrogenado (plantas 07, 10, 11), se observan amarillentas, cloróticas.	43

- 8 Diferentes etapas fenológicas en la especie *Karwinskia parvifolia* bajo condiciones de cultivo: 8a) Botón floral en planta 6; 8b) Floración en planta 11; 8c) Floración en planta 14; 8d) Crecimiento de fruto en planta 13; 8e) Corte ecuatorial de fruto verde, donde se observan 4 embriones; se observan estructuras secretorias (ES) en color amarillo en la testa (T) de la semilla (S) y en el endocarpio (E); 8f) Maduración de fruto en planta 2. En botón floral, órganos florales, pecíolos, bordes de las hojas y venas principales, así como en tallos, se observan estructuras secretorias. 45
- 9 Las plantas de *Karwinskia parvifolia* son perennifolias, de polinización entomófila y durante el período junio-julio se observó el reinicio de floración en forma simultánea con crecimiento y maduración de fruto. En la figura se observa una abeja polinizando una flor y frutos en diferente etapa de crecimiento y maduración. 46
- 10 Diagrama de dispersión de datos entre el rendimiento de fruto seco por planta en gramos (RFSP) de los años 2005 y 2006, en 16 plantas de *Karwinskia parvifolia*. 52

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
11	Diagrama de dispersión de datos entre las concentraciones de PA1 [ $\mu\text{g PA1} \cdot \text{g ps}$ ] de los años 2005 y 2006, en 16 plantas de <i>Karwinskia parvifolia</i> .	57
12	Diagrama de dispersión de datos entre los contenidos estimados en miligramos de PA1 por planta de los años 2005 y 2006, en 16 plantas de <i>Karwinskia parvifolia</i> .	59
13	Diagrama de dispersión de datos entre el peso seco en gramos de 100 endocarpios por planta de los años 2005 y 2006, en 16 plantas de <i>Karwinskia parvifolia</i> .	61
14	Semilla con testa (izquierda) y semilla desnuda (derecha) de <i>Karwinskia parvifolia</i> .  En la figura se observan estructuras secretorias (ES) que le dan una apariencia rugosa a la testa de semilla; embrión viable (EV) de una semilla sin testa. La distancia entre líneas blancas es de un milímetro (mm).	65
15	En corte ecuatorial se observan estructuras secretorias (ES) en mesocarpio (M) de frutos verdes de <i>K. humboldtiana</i> ; endocarpios con embriones abortados (EA) y solo un embrión viable (EV); y la testa (T) de una semilla.  La distancia entre líneas blancas es de 1 mm.	66

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
16	Se observan estructuras secretorias (ES) en mesocarpio de frutos maduros de <i>K. parvifolia</i> ; endocarpios con ES en café oscuro, con embriones abortados (EA), sin embriones viables. La distancia entre líneas es de 1 mm.	66
17	Estructuras secretorias (ES) en mesocarpio (M) de frutos maduros de <i>K. parvifolia</i> . La distancia entre líneas blancas es de 1 mm.	67
18	Registros de precipitación pluvial (mm) acumulada entre enero (1) y agosto (8) en 2005 y 2006.	69

<b>Abreviaturas</b>	<b>Significados</b>
$\alpha$	Alfa
&	And
S	Azufre
cm	Centímetros
Cu	Cobre
$r^2$	Coeficiente de correlación
$R^2$	Coeficiente de determinación
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
Fe	Fierro
C <sub>30</sub> H <sub>24</sub> O <sub>7</sub>	Fórmula molecular de la toxina T-496
C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>8</sub>	Fórmula molecular de la toxina T-514
C <sub>30</sub> H <sub>28</sub> O <sub>8</sub>	Fórmula molecular de la toxina T-516
C <sub>32</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub>	Fórmula molecular de la toxina T-544
P	Fósforo
<sup>o</sup> C	Grados celcius
g p.s.	Gramo de peso seco
g	Gramo/gramos
Ha	Hipótesis alternativa
H0	Hipótesis nula
kg	Kilogramo
Mn	Manganeso
$\mu$ g	Microgramos

$\mu\text{L}$	Microlitros
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mS	MiliSiemens
mAU	Miliunidades de absorbancia
nm	Nanómetro
N	Nitrógeno
Pb	Plomo
%	Por ciento
K	Potasio
pH	Potencial de hidrogeno
$\rho$	Probabilidad
rpm	Revoluciones por minuto
$n$	Tamaño de muestra
UE	Unidad experimental
U de N	Unidades de nitrógeno
U. A. N. L.	Universidad Autónoma de Nuevo León
v/v	Volumen por volumen
<i>et al</i>	Y colaboraciones
Zn	Zinc

## CAPÍTULO 1

### INTRODUCCION

Hasta ahora la exploración de especies vegetales con fines medicinales se ha basado principalmente en plantas que de acuerdo con la cultura popular tienen propiedades curativas y no obstante lo anterior, hay otro grupo de plantas que también ha sido utilizado desde tiempos remotos, pero éste lo ha sido por sus propiedades tóxicas y conocida la sentencia de que la dosis hace al veneno, se podría decir que a ciertas dosis, las plantas conocidas como medicinales también podrían causar toxicidad y por el contrario, las plantas conocidas como venenosas, a ciertas dosis podrían ser de utilidad medicinal. Tal es el caso de las plantas del género *Karwinskia*.

Las plantas de *Karwinskia* son perennifolias y producen severas intoxicaciones, parálisis y aun la muerte en animales y humanos que consumen sus partes vegetativas o frutos. En *Karwinskia humboldtiana* (“tullidora”, “coyotillo”, etc.), y otras especies del mismo género se han identificado sustancias venenosas, entre las cuales destaca la T-514, sustancia que también ha sido reportada en la literatura como peroxisomicina A1 (PA1), sobre la cual se han llevado a cabo diversos estudios toxicológicos y clínicos, dado su potencial farmacológico; puesto que PA1 ha mostrado citotoxicidad selectiva *in vitro*, con

mayor intensidad en células tumorales (Garza *et al.*, 1992; Piñeyro *et al.*, 1994; Rivas & Waksman, 2001; Gómez *et al.*, 2005).

Considerando el potencial farmacológico de PA1, las investigaciones toxicológicas y clínicas se diversificaron, generando con ello una demanda creciente de PA1 y así fue iniciado el proceso de introducción y domesticación de plantas del género *Karwinskia* por su posible utilidad contra algunos tipos de cáncer.

Como resultado de la introducción de especies de *Karwinskia*, en vivero se obtuvieron varios miles de plántulas a través de la siembra de endocarpios recolectados de plantas silvestres de *Karwinskia parvifolia* y *Karwinskia humboldtiana*. Estas plántulas con el tiempo crecieron e incrementaron su demanda de factores tales como: espacio, luz, agua y nutrimentos. Esta competencia por factores ambientales, además del ataque de enfermedades como la *podrición texana*, o por eliminación manual, produjo una disminución severa de la densidad de población. Actualmente se cuenta con una población de poco más de 100 plantas cultivadas en vivero.

Hay múltiples factores que pudieran estar involucrados en la síntesis de *antracenas* en *Karwinskia* y entre ellos, se han estudiado diversos ambientes de producción y su efecto sobre la síntesis de PA1, por ejemplo: efecto del período de cosecha, grado de madurez del fruto y efecto de especie sobre la síntesis de PA1, entre otros.

En lo general, las especies de *Karwinskia* sintetizan diferentes tipos y cantidades de toxinas como una cualidad genética, la cual puede ser modificable por el ambiente y bajo esa perspectiva, resulta interesante conocer los aspectos agronómicos de las especies bajo estudio.

Considerando los frutos de *K. parvifolia* como el sitio de mayor concentración de PA1, así como la variabilidad fenotípica de las plantas; se decidió explorar el campo de la nutrición vegetal y, dentro de ésta, por su importancia relativa respecto de los demás elementos en el rendimiento de las cosechas, fue evaluado el efecto del nitrógeno sobre la concentración de peroxisomicina A1 (PA1), tomando como unidad experimental cada una de las plantas de *Karwinskia parvifolia*.

Los objetivos de la investigación fueron:

- 1) Incrementar la productividad de peroxisomicina A1 (PA1) en *Karwinskia parvifolia* por medio de la aplicación de nitrógeno.
- 2) Identificar las plantas de *K. parvifolia* con mayor concentración de PA1.

Las hipótesis a demostrar fueron las siguientes:

- 1) si el nitrógeno tiene un efecto en la acumulación de materia seca en las plantas, entonces este efecto se traducirá en un incremento de:
  - a) número de embriones por endocarpio y/o mejor llenado del fruto;
  - b) rendimientos de fruto seco por planta;

- c) concentración y contenido de PA1

2) si la síntesis de PA1 es un componente genético; entonces habrá plantas que sintetizen mayores concentraciones de PA1.

## CAPÍTULO 2

### REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En los últimos años se han realizado diversos estudios acerca de algunas toxinas sintetizadas por *Karwinskia parvifolia* y *Karwinskia humboldtiana*, particularmente relacionados con peroxisomicina A1 (PA1) y el interés en esta sustancia se debe a que con ciertas dosis se podrían tratar algunos tipos de cáncer. La investigación de especies vegetales con fines medicinales se ha basado principalmente en plantas que, de acuerdo con la cultura popular, tienen propiedades curativas. Hay otro grupo de plantas que también ha sido utilizado por sus propiedades tóxicas y se podría decir que a ciertas dosis, las plantas conocidas como medicinales también podrían causar toxicidad y por el contrario, las plantas conocidas como venenosas, a ciertas dosis podrían ser de utilidad medicinal. En el reino vegetal aproximadamente la tercera parte del número total de especies producen sustancias venenosas, aunque no sean siempre peligrosas. Hay sustancias tóxicas para el hombre pero no para otros animales (Starý 1993).

Las plantas de *Karwinskia* son perennifolias y producen severas intoxicaciones, parálisis y aun la muerte en animales y humanos que consumen sus partes vegetativas o frutos. Martínez, (1933); menciona que “(...), las

semillas ocasionan parálisis o tullimiento y de aquí el nombre de tullidora; (y agrega que) “El principio activo no existe al parecer, en el pericarpio del fruto, (y que) la parálisis no se manifiesta sino después de dos o tres días, según la cantidad ingerida, (...)”.

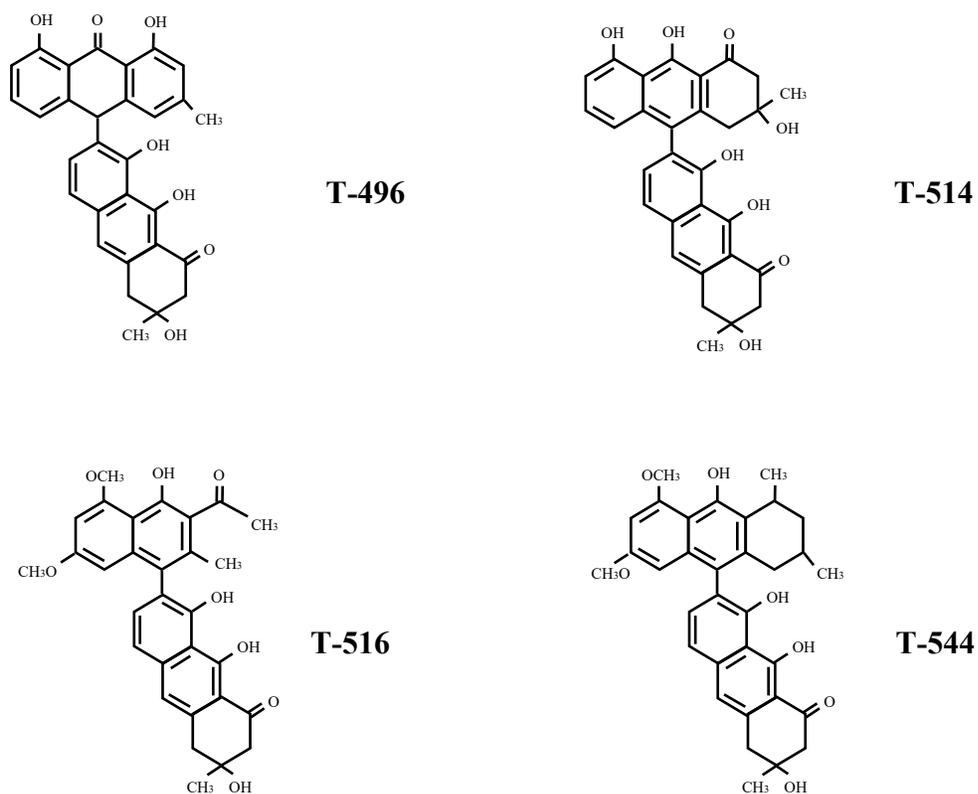
El principio neurotóxico en *Karwinskia humboldtiana* fue estudiado por Dreyer *et al.* (1975), quienes reportaron cuatro antracenonas diméricas sintetizadas por estas plantas, a las que denominaron en función de su peso molecular: T-496 ( $C_{30}H_{24}O_7$ ); T-514 ( $C_{30}H_{26}O_8$ ); T-516 ( $C_{30}H_{28}O_8$ ) y T-544 ( $C_{32}H_{32}O_8$ ), Figura 1; y en años recientes se han identificado otros compuestos de *Karwinskia parvifolia*, (Ramírez *et al.*, 2002; Rivas *et al.*, 2005).

En relación a la T-514, sustancia que también ha sido reportada en la literatura como peroxisomicina A1 (PA1), se han llevado a cabo diversos estudios toxicológicos y clínicos y ésta ha mostrado citotoxicidad selectiva *in vitro*, con mayor intensidad en células tumorales (Garza *et al.*, 1992; Piñeyro *et al.*, 1994; Rivas & Waksman, 2001; Gómez *et al.*, 2005).

Vines, (1984); menciona que las semillas son venenosas y cuando son ingeridas, producen parálisis en extremidades inferiores de humanos y animales domésticos y agrega que la decocción de hojas y raíces, que son menos venenosas, son utilizadas en México para disminuir las fiebres.

Natham (1987), estudió diversas partes del fruto y señala que “el principio activo se encuentra en la cutícula localizada dentro del endocarpo leñoso y fuera de la nuecesilla central; (y agrega) haber aislado dos sustancias a las que llamó

*tullidinol*, ya previamente aislado de los frutos de *K. humboldtiana* y a la *tullidona*, que no había sido aislada como producto natural, pero que había sido preparado en el laboratorio a partir de tullidinol, concluyendo que éste es causante de la parálisis que se manifiesta por la ingestión de frutos de *K. humboldtiana*, al producir una desmielinización progresiva de los axones del sistema nervioso periférico.



**Figura 1.** Estructura de las toxinas T-496, T-514, T-516 y T-544

En especies de *Karwinskia* se han identificado más de 10 antracenonas, entre ellas: peroxisomicinas; isoperoxisomicinas y tullidinoles; y se demostró que

el tullidinol o T-544 es el responsable de la neuropatía asociada con la ingesta del fruto de *K. humboldtiana*. En otros estudios químicos se han observado hasta cuatro tullidinoles en algunas especies de *Karwinskia*, (Rivas, 2001).

En *K. humboldtiana* las concentraciones de T-544 varían con las estaciones del año; al respecto, Luján (1999) observó que durante los meses invernales y principios de primavera se obtienen las más altas concentraciones de T-544.

Arellano-Cervantes *et al.* (1994), realizaron una investigación epidemiológica en el Hospital Infantil de Morelia sobre el caso de 12 pacientes con edades entre los dos y cinco años, “con parálisis o paresia flácidas” ocasionada por la ingesta de frutos de *Karwinskia* y mencionan que todos los pacientes iniciaron su padecimiento en invierno, excepto en un caso en que inició durante el otoño.

Considerando la citotoxicidad de PA1, las investigaciones toxicológicas y clínicas se diversificaron, generando con ello una demanda creciente de esta toxina y así fue iniciado el proceso de introducción y domesticación de plantas del género *Karwinskia* por su posible utilidad contra algunos tipos de cáncer, [a la fecha se han tratado un total aproximado de 20 pacientes en fase terminal por diferentes causas de cáncer, los cuales tuvieron una sobrevida de meses y hasta 9 años. En estos pacientes se consideran dosis de 1 mg/kg de peso, repetidas cada tres semanas hasta un total de 6 dosis y esta secuencia de administración sería repetida en función del comportamiento de la enfermedad y del estado

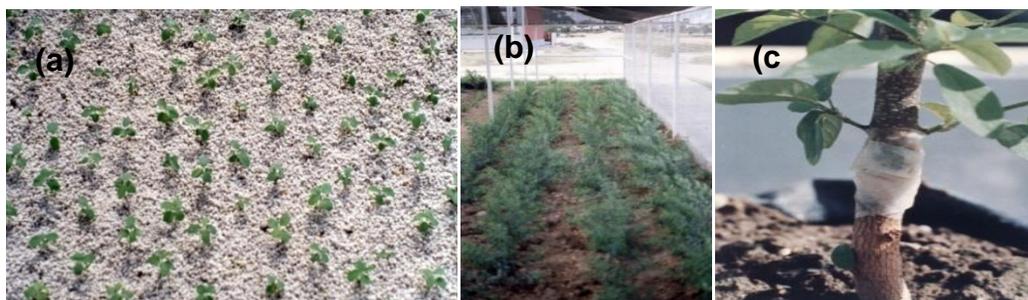
general del paciente, (Dr. Eduardo Tamez de la O, investigador clínico responsable de administración de PA1 y evaluación clínica, inf. personal)].

Para continuar con los trabajos de domesticación, se recolectaron frutos de plantas silvestres de *Karwinskia humboldtiana* del municipio de Llera, Tamaulipas; mientras que la recolección de fruto de plantas silvestres de *Karwinskia parvifolia* se llevó a cabo en el área comprendida entre los 26° y 27° de latitud norte y desde los 108° 20' de longitud oeste hasta el Golfo de California y dio inicio con la exploración de algunas comunidades rurales de los municipios de Ahome, El Fuerte y Choix, Sinaloa, mientras que en el estado de Sonora las exploraciones se realizaron por los municipios de Huatabampo, Etchojoa, Navojoa y Álamos (Luján *et al.*, 1994a; Luján *et al.*, 1994b).

## 2.1 Propagación

En junio de 1991 se establecieron las primeras cajas de propagación y Luján *et al.*, (1991) reportaron que una vez que las plantas desarrollaron un diámetro del tallo de un centímetro aproximadamente, se procedió a realizar pruebas de propagación vegetativa a través del injerto de púa. Como parte aérea se utilizaron materiales en producción de *K. parvifolia* procedentes del estado de Sinaloa y como sistema radical se utilizaron materiales de *K. humboldtiana* obtenidos de la siembra de 1991 en vivero. Los resultados obtenidos a la fecha indican que tanto la reproducción sexual como asexual del género *Karwinskia* son opciones viables de cultivo, (Figuras 2a, 2b, 2c; Luján *et al.*, 1991; 1992a;

1992b; 1992c; 1993a; 1993b; 1993c; 1993d; 1994a; 1994b; 1994c; 1995; Luján 1999; Luján *et al.*, 2005; 2006; 2007a; 2007b).



**Figura 2.** Domesticación de *Karwinskia parvifolia*: (a) germinación en perlita agrícola; (b) crecimiento vegetativo, con una distancia entre surcos de 70 cm y entre plantas de 25 cm; (c) injerto de púa en *Karwinskia parvifolia*.

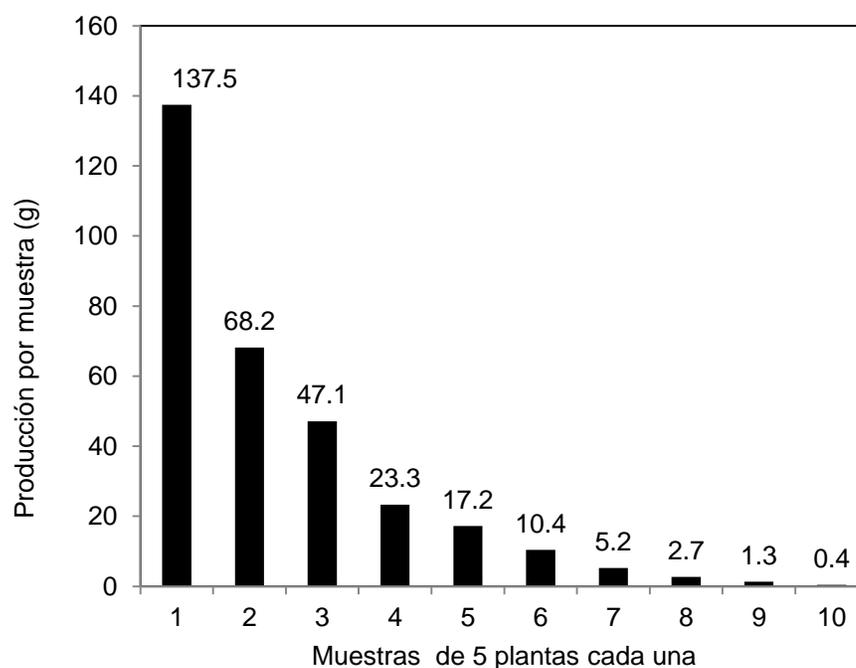
## 2.2 Floración-fructificación

Las plantas continuaron su crecimiento y Luján *et al.*, (1993a) seleccionaron un lote de 66 plantas de *K. humboldtiana* cultivadas en vivero, sobre las cuales se hicieron inspecciones oculares cada semana y 61 (92.4%) de ellas iniciaron su floración entre los 15 y 24 meses a partir de su siembra, y de estas 61 plantas, 51 (83.6%) lograron desarrollar y madurar sus frutos entre los 24 y 27 meses después de la siembra.

## 2.3 Cosecha

Para el 14 de septiembre de 1993 se cosecharon las 51 plantas y la producción total de fruto fresco fue de 1566.5 g, para un promedio por planta de

$30.7 \pm 42.7$  g. La producción por planta mínima y máxima fue de 0.2 (un fruto) y 185.6 g. El peso de un fruto fresco fluctuó entre 0.2 y 1.1 g. En esta primera cosecha se observó que las 5 plantas más sobresalientes produjeron un promedio de  $137.5 \pm 35.0$  g; mientras que en las 5 plantas menos productivas se cosechó un promedio de  $0.4 \pm 0.1$  g de fruto fresco, (Figura 3).



**Figura 3.** Producción promedio de fruto fresco en *K. humboldtiana* de dos años de edad

Se pudo observar que bajo condiciones permanentes de humedad y con temperaturas relativamente elevadas, la floración y fructificación persisten con diferente intensidad de producción a través del tiempo y que hay polimorfismo en frutos, incluso dentro de una misma planta. También se observó variabilidad

entre plantas tanto en el rendimiento como en el ciclo de producción por planta. Algunas plantas producen mayor cantidad de frutos durante el otoño y otras durante el invierno.

Por otro lado, en *K. parvifolia*, tanto de Choix (arbórea), como de Natoches (arbustiva), se ha observado que se obtienen cosechas por un período de tiempo que va del mes de agosto al mes de abril; mientras que durante los meses de mayo a julio, las cosechas han resultado prácticamente nulas. En esta última (Natoches), las mayores producciones de campo se han obtenido durante los meses de septiembre a noviembre; mientras que en *K. humboldtiana* se ha observado que los períodos de floración-fructificación-cosecha se amplían a prácticamente todo el año, aunque con diferente intensidad para cada proceso.

En frutales perennifolios se presenta un comportamiento similar en lo que respecta a floración-fructificación; esto debido a que las variaciones climatológicas y el ambiente en general, tienen influencia sobre la intensidad de estos procesos en la planta, ya sea acelerando el desarrollo del fruto durante la floración-fructificación de primavera-verano, o bien, retardándolo durante la temporada otoño-invierno (Klages, 1942; Billings, 1977; Calderón, 1989). Este mismo fenómeno afectaría la síntesis de PA1 en los frutos cosechados de plantas cultivadas en vivero.

## 2.4 Síntesis de peroxisomicina A1 (PA1)

Por lo que respecta a las toxinas, se observó variabilidad en la producción de PA1 y que algunas producen PA1 tanto en fruto verde, rojo y maduro, pero otras solo en verde y rojo, otras solo en verde y otras más en ninguna forma, de lo cual se dedujo que el grado de madurez del fruto influye sobre la concentración de PA1, (Luján, *et al.*, 1993d; Luján, 1999).

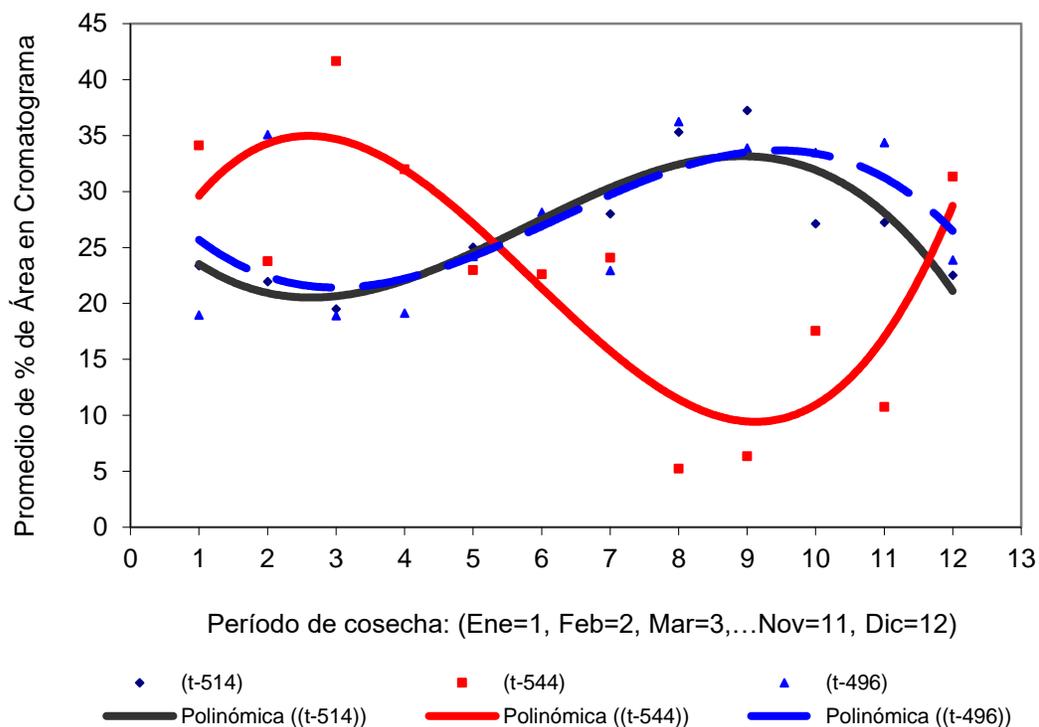
En otra investigación sobre partes vegetativas, Waksman *et al.*, (1993); realizaron un estudio químico de hojas, raíz y tallo en plantas de *K. parvifolia* y *K. humboldtiana* y resultó que ninguna raíz analizada presentó T-514; pero en hojas y tallos de ambas especies si fue identificada la T-514 en proporciones variables; mientras que Hanáčková *et al.*, (1997) analizaron muestras de hojas tomadas de plantas cultivadas de *K. humboldtiana* a los 8, 18, 24 y 36 meses y observaron concentraciones de PA1 que disminuyeron con la edad de las plantas.

Luján (1999) demostró la variabilidad de las concentraciones de PA1 en frutos de *K. humboldtiana* por efecto del período de cosecha y es posible que los tiempos de muestreo (que no fueron equidistantes) seguidos en la investigación de Hanáčková *et al.*, (1997), hayan interactuado con el efecto ambiental sobre las concentraciones de PA1 y que no sea solo el efecto de la edad de la planta, sino que éste efecto interactúa con el período en que es tomada la muestra, lo cual determina las variaciones en las concentraciones de PA1.

Hanáčková (1999) reportó mayores concentraciones de PA1 en testas+endocarpios que en exocarpios o embriones de *K. parvifolia*, lo cual coincidió con grandes cantidades de estructuras secretorias en la testa pero no en embriones, lo que explicaría las bajas concentraciones en comparación con las observadas en la testa. Hanáčková (1999) reportó 140 µg de PA1 por gramo de peso seco en muestras obtenidas de botones florales inmediatamente antes de la antesis; mientras que en frutos jóvenes de 0-5 días y de 40 días después de la polinización, reportó valores de 700 y 354 µg de PA1 por gramo de peso seco, respectivamente. En la testa y endocarpio reportó valores de 984 µg de PA1 por gramo de peso seco; mientras que para exocarpio y embriones reportó valores de 34.96 y 16.28 µg de PA1 por gramo de peso seco, respectivamente.

El fruto de *Karwinskia* es una drupa y en su endocarpio contiene hasta 4 embriones viables, de tal forma que altos porcentajes de germinación serían indicadores de mayor contenido de embriones y por lo tanto mayor contenido de testas y de PA1, (Luján *et al.*, 2007); puesto que dentro del fruto, las testas son el sitio de mayor contenido de toxinas (Natham, 1987; Hanáčková *et al.*, 1997; Hanáčková, 1999), entre las cuales se encuentra la T-514 (PA1).

Luján (1999) estudió el efecto de período de cosecha sobre la síntesis de antracenas en plantas cultivadas de *Karwinskia humboldtiana* y observó una correlación negativa entre T-544 y las sustancias T-496 y T-514 (PA1) (Figura 4).



**Figura 4.** Síntesis de toxinas: T-496, T-514 y T-544 durante un año de cosecha en plantas cultivadas de "tullidora" (*Karwinskia humboldtiana*).

Durante los meses de agosto y septiembre las plantas sintetizan T-544 en bajas cantidades, mientras que T-496 y T-514 (PA1) son sintetizadas en cantidades relativamente elevadas.

Por otro lado, se observó que durante los meses invernales, las plantas sintetizan los más altos niveles de T-544, mientras que los porcentajes de T-496 y T-514 (PA1) son sintetizados en menores cantidades. Ambos períodos de cosecha coinciden con la emisión de botón floral y floración de intensidad

variable, ya que durante los primeros tres meses del año la floración no es tan intensa como la que se presenta a partir del mes de mayo y hasta julio y agosto.

Lo anterior tiene importancia no solo clínica, sino también agronómica, pues es conocido que durante la temporada invernal prevalecen condiciones de sequía en el norte de México y es precisamente cuando se observan algunos daños en ganado caprino principalmente, lo cual sería explicado porque a falta de alimento, las cabras consumen estas plantas.

Otros resultados del cultivo de *K. humboldtiana* acerca del grado de madurez del fruto y su efecto sobre la concentración de PA1, mostraron mayor contenido de PA1 en frutos maduros rojinegros, que en aquellos que fueron cosechados con madurez fisiológica, pero de coloración verde. En esta misma especie se observó un mayor peso seco por hueso (PSPH) en frutos rojinegros cosechados durante los meses de febrero-abril; que en aquellos que fueron cosechados durante los meses de agosto-octubre. Aquí se observó una correlación negativa entre PSPH y la síntesis de PA1. También se observó que el tamaño del fruto influye sobre la síntesis de antracenas; en los frutos chicos se obtuvieron las mayores concentraciones de PA1, (Luján, 1999).

Starý (1993) menciona que las características genéticamente estables de cada especie en particular, e incluso de cada planta individual, son las que ejercen una mayor influencia sobre el metabolismo en sus productos. Estas características determinan la cantidad de sustancias venenosas que la planta es capaz de producir. Algunas tienen una concentración muy elevada de sustancias

venenosas, como alcaloides, mientras que la concentración de estas sustancias en otras plantas de la misma especie y población es muy pequeña.

Existe un ritmo diario para los procesos metabólicos y la concentración de metabolitos, incluidas las sustancias venenosas, varía en el transcurso del día. Por regla general, la concentración de alcaloides, glucósidos y aceites esenciales es menor por la noche, cuando el metabolismo es más lento. Entre las diez de la mañana y las cuatro de la tarde se produce un notable aumento de la concentración de alcaloides, glucósidos y aceites esenciales en hojas y flores. En los demás órganos, raíces, frutos y semillas, el efecto del ritmo diario es relativamente escaso (Starý 1993).

Los resultados de diversos investigadores relacionados con el análisis y cuantificación de toxinas a partir de *Karwinskia* [también ha sido reportado que PA1 posee actividad antimicrobiana (Salazar *et al.*, 2006)], coinciden que es en fruto donde se han observado las concentraciones más elevadas de PA1 (Natham, 1987; Guerrero *et al.*, 1987; Luján *et al.*, 1995, Hanáčková *et al.*, 1997; Hanáčková, 1999; Lišková *et al.*, 1999; Piñeyro & Waksman, 2000).

Luján *et al.*, (1995); reportaron que *K. parvifolia* (Natoches) y *K. humboldtiana*, ambas bajo condiciones de cultivo, no presentan diferencia significativa entre sí, en cuanto a la producción de T-514; a diferencia de lo que se ha reportado para plantas de crecimiento silvestre, donde *K. parvifolia* ha mostrado que sintetiza mayores cantidades de PA1, que en *K. humboldtiana*, y

que está ausente la toxina T-544 (abundante en *K. humboldtiana*), lo cual facilita el proceso de extracción y purificación de PA1 a partir de frutos de *K. parvifolia*.

## 2.5 Nutrición vegetal

Mengel *et al.*, (2001), mencionan que los efectos nutricionales dependen de la influencia de un nutrimento en particular sobre los procesos fisiológicos o bioquímicos de la planta. Así, la concentración de carbohidratos o azúcares en tejidos de almacenamiento, granos y semillas están directa o indirectamente relacionados al suplemento de nitrógeno o  $K^+$  a las plantas.

Mengel *et al.*, (2001), coinciden en que los principales factores que controlan la calidad de las cosechas son fijados genéticamente y como ejemplo mencionan que las proteínas de los tubérculos de papa difieren considerablemente entre cultivares de papa, mientras que los factores ambientales, incluyendo la nutrición, son apenas capaces de influir sobre la calidad de la proteína. Por otro lado, los factores externos pueden influir considerablemente las concentraciones de compuestos orgánicos en los órganos de las plantas de aplicabilidad sobre la calidad del producto.

De lo anterior se deduce que hay múltiples factores que pudieran estar involucrados en la síntesis de *antracenonas* en *Karwinskia* y se decidió explorar el campo de la nutrición vegetal y, dentro de ésta, por su importancia relativa respecto de los demás elementos en el rendimiento de las cosechas, fue evaluado el efecto del nitrógeno sobre la concentración de peroxisomicina A1

(PA1) en frutos maduros de *Karwinskia parvifolia*, que es el sitio de la planta donde se han detectado las mayores concentraciones de PA1.

El nitrógeno es utilizado por las plantas para sintetizar aminoácidos, que son componentes primarios de las proteínas. De igual manera, las plantas requieren nitrógeno para sintetizar otros compuestos vitales, como clorofila, ácidos nucleicos y enzimas (CPHA, 2004), y se considera que junto con el carbono, es uno de los elementos centrales de la vida (Loomis y Connor, 2002); y aunque no parece tener función específica electroquímica o catalítica, sí está implicado en la mayoría de las moléculas catalíticas. (Bidwell, 1993).

Algunos ejemplos de la importancia del nitrógeno en la calidad de las cosechas serían los siguientes: “(...) en trigo, el nitrógeno mejora la calidad y al ser enriquecidos los granos en gluten...se incrementa el contenido de proteína en grano”, (Guerrero, 2000); “(...)”, en las cebadas cerveceras la mayor proporción de nitrógeno disminuye la calidad. Ocurre al contrario con la cebada destinada a la alimentación del ganado en que la riqueza en proteínas es mayor cuando han sido mayores las aportaciones de nitrógeno en el abonado”, (Guerrero, 2000). En maíz, “el nitrógeno influye en el rendimiento y también en la calidad pues de él depende el contenido de proteínas del grano”, (Guerrero, 2000).

En suelos ricos en nitrógeno, la concentración de alcaloides es más alta que en los que son pobres en ese elemento. La composición de la comunidad

vegetal también tiene un efecto sobre la producción y concentración de principios activos, (Starý 1993).

Finck (1988), menciona que en especias y plantas medicinales el objetivo del abonado es “alcanzar una importante producción de droga con un alto contenido de sustancia activa; pero hasta ahora apenas se han abonado estas plantas. En la mayoría de los casos, sólo se indican valores de referencia empíricos, y muy generales”.

El mismo autor menciona que es posible mediante la utilización de los fertilizantes aprovechar totalmente el potencial productivo genéticamente determinado de los cultivos y que con la aplicación de fertilizantes se han logrado producciones en 5 a 10 veces más altas que las obtenidas a finales del siglo XIX, (Finck, 1988).

En otra investigación sobre fertilización en plantas con potencial farmacológico, Masarovičová *et al.*, (2000) reportaron que el suplemento de nitrógeno influyó significativamente sobre la concentración de PA1 en las hojas de *K. humboldtiana* y *K. parvifolia*.

En esta investigación, en cambio; se trabajó en *frutos maduros*, que es el sitio de la planta donde se han detectado las mayores concentraciones de PA1, y comparado con hojas, el fruto sería más estable en sus procesos metabólicos al efecto ambiental.

Considerando que en los frutos y otras partes de la planta tanto de origen silvestre como cultivado de las especies de *Karwinskia* se ha observado la síntesis de diferentes tipos y cantidades de toxinas como una cualidad genética, entonces otra alternativa para incrementar la productividad sería la identificación y selección de plantas de alto rendimiento en PA1. La variabilidad observada en la producción de PA1 resultaría una ventaja para el mejoramiento genético de *Karwinskia parvifolia* por el potencial de productividad a bajo costo.

La dosis y época de aplicación son factores importantes y sobre esto, Guerrero (2000), menciona que para olivar de una producción media de 25 a 30 kg, una dosis aconsejable podría ser de 1 Ud de N/olivo y año y que la época de aplicación del nitrógeno más apropiada sería la del momento en que se termina la recolección.

En melocotonero, que también es una drupácea, al igual que *Karwinskia*, se recomiendan dosis de un kilogramo de nitrógeno por árbol fraccionadas en dos aplicaciones, y la época de aplicación debe hacerse la primera en enero y la segunda después de la formación del hueso y cuando la producción ha sido abundante, también se podría hacer una pequeña aportación después de la cosecha.

En el girasol, el mismo autor señala que la época crítica de cualquiera de los tres elementos básicos, N, P y K, es la época de crecimiento inicial, en la cual la falta o insuficiencia de estos tres elementos nutritivos ejerce una influencia negativa fuerte sobre las plantas, influencia que no se puede corregir

posteriormente, aunque se aseguren las mejores condiciones de nutrición y que la falta de uno de los tres elementos durante veinte días, coincidentes con la época de absorción máxima de estos elementos, influye poco en la producción, al contrario de lo que ocurre en la época de crecimiento inicial.

En el cultivo de la vid, que pertenece al orden de las ramnales, al igual que el género *Karwinskia*, la época más adecuada para la fertilización del viñedo es durante el reposo invernal, y si se localiza para ponerlo al alcance de las raíces, debe hacerse con suficiente antelación a la brotación (enero-febrero), para no dañar las raíces en período de actividad (Guerrero, 2000).

Loomis y Connor (2002), mencionana que durante el crecimiento vegetativo, las plantas anuales requieren grandes cantidades de nutrimentos para formar el aparato fotosintético en las hojas, particularmente del nitrógeno y que en la mayoría de los cultivos, hasta el 70% del nitrógeno total absorbido se encuentra en granos o semillas al final del ciclo.

La aplicación de altas dosis de nitrógeno durante las etapas iniciales de crecimiento de remolacha azucarera es esencial para incrementar los rendimientos, pero durante las últimas etapas de crecimiento, particularmente en el llenado de las raíces, altas dosis de nitrógeno se caracterizan por bajas concentraciones de azúcar y altas concentraciones de grupos amino y minerales. Esto es debido a que los tejidos de almacenamiento se mantienen en una etapa juvenil.

La calidad de la remolacha azucarera no solo depende de la nutrición mineral, sino también está influenciada por factores ambientales. En años con baja precipitación pluvial y alta intensidad luminosa, generalmente producen bajos rendimientos de raíces, aunque esas raíces normalmente contienen altas concentraciones de azúcares, así como en aminoácidos y minerales, lo cual es típico para condiciones de estrés por humedad, que tiene como consecuencia un pobre crecimiento radicular, con la consiguiente acumulación de azúcares, compuestos aminados y minerales en las raíces. Se obtienen óptimos rendimientos de azúcar cuando prevalecen condiciones de alta intensidad luminosa y un suministro adecuado de humedad, asociado a un suplemento nutricional satisfactorio durante las últimas semanas de crecimiento de remolacha azucarera, (Mengel, 2001).

Por otro lado, Guerrero (2000) menciona que “las bacterias nitrificantes que actúan sobre la materia orgánica, para formar, primero compuestos amoniacales y luego nitratos, tienen un mínimo de temperatura alto (9°C) y su óptimo mucho más”. Navarro (2003) señala que su temperatura óptima del proceso de nitrificación se sitúa en un óptimo de 27 a 30°C, que pueden variar con la región, por adaptación o selección de las bacterias nitrificantes. A 0°C o menos, no se produce la nitrificación y empieza este proceso a 1.5°C y alcanza su óptimo aproximadamente a los 30°C. Estas bacterias requieren un adecuado suministro de calcio, fósforo, cobre y magnesio; así como otros oligoelementos tales como hierro, molibdeno y boro. También requieren un pH = 6-8.

Las bacterias pueden ser autótrofas o heterótrofas. Las primeras obtienen su energía de la oxidación de constituyentes minerales, como  $\text{NH}_4^+$ , S y Fe, y la mayor parte de su carbono del  $\text{CO}_2$ . Las heterótrofas obtienen su energía y carbono de la materia orgánica del suelo, (Navarro, 2003).

Considerando que las temperaturas mínimas promedio que se registran en el área metropolitana de Monterrey son superiores a  $9^\circ\text{C}$  durante el mes de enero, que resulta el período más frío; así como al hecho de que las plantas cultivadas de *K. humboldtiana* emiten brotes vegetativos y florales a partir del mes de enero, si las condiciones de temperatura y humedad resultan favorables, entonces se decidió dividir la aplicación de fertilizantes en dos partes, utilizando el 70 % (primera parte) durante la segunda quincena del mes de diciembre, es decir, previo al inicio de la emisión de brotes vegetativos y florales y la segunda parte del fertilizante (30 %) durante la segunda quincena del mes de mayo, temporada de intensa floración y al mismo tiempo de crecimiento y maduración de los primeros frutos de la floración del mes de enero.

### ***Producción de PA1***

Lišková *et al.*, (1999) reportaron un costo aproximado a los mil dólares americanos por gramo de PA1; mientras que en datos actuales del Área de Producción de PA1 del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la U. A. N. L., se menciona que para la obtención de un gramo de PA1 se requieren aproximadamente 10 kg de endocarpios secos

obtenidos de plantas silvestres de *K. parvifolia*. Considerando que el PHS tiene una proporción aproximada de 16% con respecto al PFF, entonces serían requeridos alrededor de 62.5 kg ( $10/0.16 = 62.5$ ) de fruto fresco (PFF) para la obtención de un gramo de PA1. Por lo tanto, una mayor producción de fruto por planta incrementará la productividad de PA1 con la consecuente disminución de costos.

En otros cultivos es conocido que el uso de fertilizantes representa una de las opciones para lograr mayores rendimientos en la producción de campo, particularmente el nitrógeno (Mengel *et al.*, 2001; Baričević & Zupančič 2002; Epstein & Bloom 2005).

Por otro lado, considerando que la síntesis de PA1 es una cualidad genética en las especies del género *Karwinskia*, entonces la identificación de plantas con mayor concentración de PA1, combinado con una fertilización adecuada, producirá incrementos importantes en los contenidos de PA1.

## CAPÍTULO 3

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Material de *campo*

Para la extracción y cuantificación de PA1 se utilizaron frutos de 16 plantas establecidas desde 1991 en el vivero de plantas con potencial farmacológico del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, las cuales fueron numeradas sucesivamente del 1 al 16.

Para conocer las condiciones de crecimiento de las plantas durante el curso de la investigación, se tomaron 4 muestras de suelo de las plantas: 5, 10, 13 y 14 (Enero del 2006), a fin de determinar su contenido de N, P, K, Cu, Fe, Mn, Zn, así como de sales solubles y el pH del suelo. Para la toma de las muestras se limpió de hojarasca la capa superficial del suelo y con pala pocera se hicieron 2 excavaciones de 30 cm de profundidad, distribuidas en la periferia del área de goteo. Con la pala se tomaron “rebanadas de suelo” a lo largo del perfil del suelo (30 cm); las sub-muestras fueron mezcladas completamente y del total de suelo por planta, se tomaron aproximadamente 2 kg de suelo.

Por lo que respecta a las condiciones climatológicas que se presentaron durante el período de la investigación, particularmente sobre temperaturas promedio y precipitación pluvial, se obtuvieron datos de la Zona Centro (Obispado) de Monterrey, Nuevo León, México, y proporcionados por el Sistema de Monitoreo Ambiental (SIMA).

Como fertilizante nitrogenado se utilizó sulfato de amonio,  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ ; a razón de 0.500 kg de nitrógeno por árbol, distribuido en dos aplicaciones por ciclo de producción, para un total de 2.44 kg de sulfato de amonio  $(1.000 \text{ kg} * 0.500 \text{ kg}) / 0.205 \text{ kg}$ ). En cuanto al azufre, esto significaría un aporte adicional de 0.592 kg por árbol  $[(0.2426 / 0.205) * 0.500 \text{ kg} = 0.592 \text{ kg}]$ . También se utilizaron materiales propios de un vivero.

### **3.2 Método de campo**

Para evaluar el efecto del nitrógeno y la variabilidad entre plantas sobre la productividad de PA1, se planeó una investigación a través de un diseño cruzado estándar 2x2, dos secuencias y dos ciclos de producción, (Jones & Kenward, 1989). La selección de plantas de *K. parvifolia* se realizó en base a su distribución geográfica dentro del vivero y después fueron aleatorizadas a cada una de las dos secuencias de tratamientos: 8 plantas fueron asignadas a la secuencia de tratamientos SN-CN (plantas: 01, 02, 03, 07, 10, 11, 14 y 15); mientras que las 8 plantas restantes, (plantas: 04, 05, 06, 08, 09, 12, 13, 16);

fueron asignadas a la secuencia CN-SN (SN = sin nitrógeno; CN = con nitrógeno).

### **3.3 Datos basales**

Como actividad preliminar a la aplicación del fertilizante, las 16 plantas fueron cosechadas durante los meses de octubre y noviembre del 2004. Después de la cosecha se llevó a cabo una poda de formación a fin de uniformizar el tamaño de las plantas.

### **3.4 Fertilización**

El fertilizante fue aplicado e incorporado en una zanja de 15 cm de ancho x 15 cm de profundidad por dentro de la zona de goteo, distribuido en dos aplicaciones, 70% en la segunda quincena de diciembre del 2004 y 30% aplicado en la segunda quincena de mayo del 2005 para el primer ciclo de producción, y esta aplicación de mayo coincidió con la emisión de brotes vegetativos y botones florales en forma generalizada en la mayoría de las plantas (14 de 16 plantas). En las mismas fechas (diciembre del 2005 y mayo del 2006); se repitió el procedimiento de fertilización para el segundo ciclo de producción, pero en forma cruzada; es decir, las plantas que recibieron suplemento nitrogenado durante el año 2005, en el 2006 no recibieron el suplemento; mientras que las plantas que no recibieron suplemento nitrogenado durante el año 2005, en el 2006 si recibieron suplemento nitrogenado. Después

de cada fertilización se aplicaron riegos en todas las plantas y estos se repitieron de manera constante cada tres semanas durante el experimento.

Se observaron algunas plantas de apariencia fenotípica amarillenta, cloróticas y para evaluar el grado de clorosis se contó con la participación de cuatro observadores independientes entre sí, los cuales recibieron una breve explicación acerca de la investigación y después de esta, ellos observaron cada una de las 16 plantas y otorgaron una calificación de 1 a 10, dependiendo del grado de clorosis, donde una calificación de 1 representó el menor grado de clorosis, y una de 10 fue otorgada para la planta con mayor clorosis. Se tomaron datos en ambos grupos de plantas, tanto las que recibieron fertilizante, como las que no lo recibieron.

Por lo que respecta a la medición del grado de clorosis correspondiente a este primer ciclo de producción (2005), cuyos datos son ordinales (del 1 al 10), y no siguen una distribución normal; estos fueron agrupados, ordenados y analizados en SPSS 13.0, a través de la *prueba de suma de rangos de Wilcoxon* y un  $\alpha=0.05$ , (Olivares, 1995).

### **3.5 Descripción de medición de variables**

En el período de septiembre a octubre del 2005 y en el mismo período del 2006, cuando alguna de las 16 plantas presentó madurez en la mayoría de sus frutos, la planta fue cosechada en su totalidad, incluyendo frutos verdes.

Por ejemplo: cuando la planta 10 fue cosechada, se le tomó el dato del total de peso fresco. En ese mismo día se tomaron dos muestras (muestra 1 y muestra 2) de 100 frutos maduros frescos cada una y se colocaron por separado en cajas *petri*. A cada muestra se le tomó su peso de 100 frutos frescos. Los 100 frutos de la muestra 1 fueron despulpados y se tomó su peso de 100 endocarpios frescos.

Tanto la cosecha total, como las dos muestras, se colocaron a temperatura ambiente de laboratorio (22 a 24°C) por un período de 30 días. Después de este período, se tomó el peso total de rendimiento de fruto seco por planta (RFSP); el peso de 100 frutos secos (PFS) de la muestra 2, y el peso de 100 endocarpios secos (PHS) de la muestra 1.

Este mismo procedimiento descrito para el ejemplo de la planta 10, se repitió en las 16 plantas durante los 2 años de cosecha, con lo cual se completó la información de campo para un total de 32 datos por cada una de las variables: (RFSP); (PFS); y (PHS).

Para obtener la concentración de PA1 (CONCPA1), se tomaron las 32 muestras de 100 frutos secos cada una (muestra 2 de cada planta, de cada año) y se procedió al molido y tamizado de las muestras por separado, a fin de tomar una muestra de 0.5 g del polvo más fino y colocarlas en tubos de ensayo para su extracción sólido-líquido y su análisis por HPLC.

La estimación del contenido de PA1 por planta (mgPA1) se obtuvo de la siguiente manera: por ejemplo, la planta 10 produjo 761.7 g de peso seco (RFSP) en la cosecha del año 2005, y del análisis por HPLC de su correspondiente muestra de 100 frutos, resultó una concentración de 835.4 µg

de PA1/g de peso seco. Entonces se multiplicaron ambos valores y resultó un contenido de 636324.18  $\mu\text{g}$  de PA1/planta = 636.3 mg de PA1/planta en la cosecha del año 2005. Con este mismo procedimiento se estimaron los contenidos de PA1 en las 16 plantas durante dos años que duró la investigación.

### 3.6 Material de laboratorio

La extracción y cuantificación de la concentración de PA1 se realizó en las instalaciones del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la U. A. N. L.

Se utilizaron 32 cajas *petri*; 1 balanza analítica; 1 licuadora; 32 tubos de ensayo con tapón para fruto molido; 32 tubos de ensayo con tapa de rosca para muestra de 0.5 g; 32 tubos de ensayo para extracto líquido; 32 tubos de ensayo para diluciones; 2 matraces con boca esmerilada; 32 pipetas, 1 agitador Vortex, acetato de etilo, 1 rotavapor Buchi 461, nitrógeno, metanol, filtro millipore de 0.5  $\mu\text{m}$ , viales, insertos y un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) Agilent 1100; columna Hypersil ODS; 2.1 mm de diámetro interno x 100 mm de longitud y 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula, Agilent; detector ultravioleta de longitud de onda variable a 269 nm; temperatura de columna a 30 °C y temperatura de automuestreador a 25 °C; volumen de inyección: 7  $\mu\text{L}$  y fase móvil: metanol:ácido acético al 5 % (75:25 %) v/v.

### 3.7 Método de laboratorio

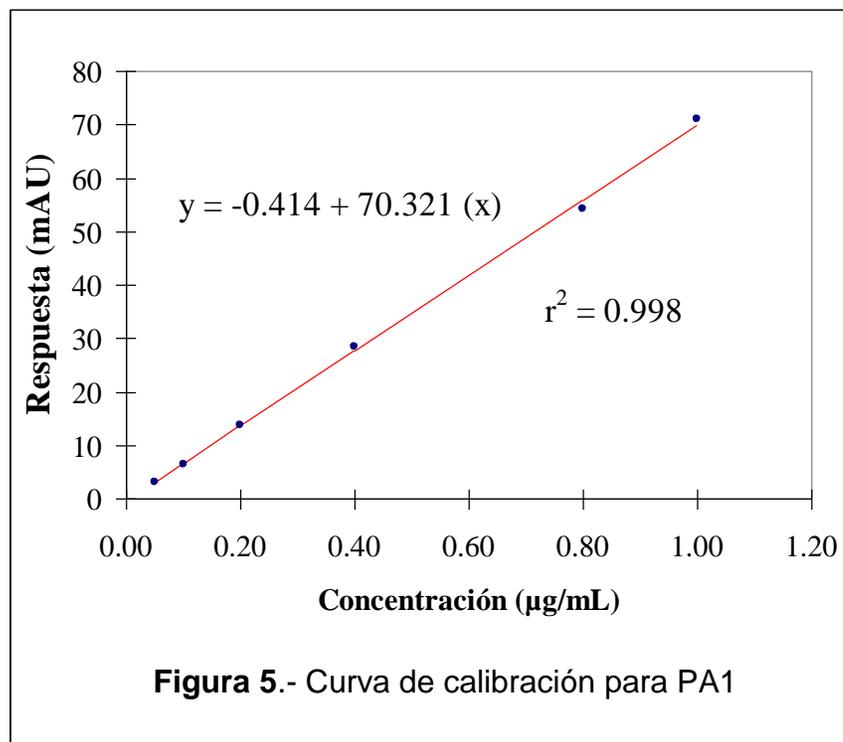
Para el proceso de extracción sólido-líquido de PA1 se tomó una muestra de 0.5 g de fruto molido por cada muestra de 100 frutos secos. Para la toma de la muestra de 0.5 g, se procedió de la siguiente manera:

1. En una licuadora de uso normal se molieron los frutos por un tiempo de 2 minutos para cada una de las 32 muestras;
2. Se pasó a un tamiz de 595 orificios por pulgada cuadrada, se sacudió vigorosamente el vaso, la tapa y la base de la licuadora para capturar la totalidad del material correspondiente a la muestra;
3. El material cribado se capturó en papel encerado de 40 x 30 centímetros y enseguida se depositó en un tubo de ensayo con tapón, del cual se tomó la muestra respectiva de 0.5 g;
4. Este material vegetal se colocó en un tubo de ensayo con rosca para su extracción;
5. Para cada muestra se repitieron los pasos 1, 2, 3 y 4, con las siguientes consideraciones: se colocó papel encerado nuevo para cada muestra, se limpió cuidadosamente el tamiz, la licuadora y cada una de sus partes antes de iniciar el molido de cada muestra;

Para la extracción y cuantificación de peroxisomicina A1 por HPLC, se siguió el método de Salazar *et al.*, (1996).

6. Para la extracción se agregaron 5 mL de acetato de etilo y el extracto se colocó en un agitador Vortex por 2 minutos y se dejó reposar la mezcla por 2 minutos para sedimentar la parte espesa del extracto y se filtró a través de un filtro millipore de 0.5  $\mu\text{m}$ ;
7. La agitación de 2 minutos y el reposo de 2 minutos, así como el filtrado del extracto se repitieron en 3 ocasiones por muestra;
8. El extracto acumulado de las tres repeticiones del proceso de *agitación-sedimentación-filtrado* de acetato de etilo se vació en un matraz con boca esmerilada y éste se colocó en un rotavapor Buchi 461, a una temperatura de 38 °C y 60 rpm hasta evaporar el solvente;
9. Después de la evaporación se agregaron 2 mL de acetato de etilo en el matraz para capturar el extracto y la solución resultante se colocó en un tubo de ensayo de 5 mL y fue llevado a sequedad con nitrógeno;
10. Al final se obtuvieron 32 tubos de ensayo con el extracto adherido a sus paredes y cada tubo fue sellado con una tapa de parafilm y cubierto con papel de aluminio y llevado a refrigeración para ser analizados por HPLC;
11. Para resuspender el extracto se utilizó un volumen fijo de 500  $\mu\text{L}$  de fase móvil (metanol:ácido acético al 5 %, 75:25 % v/v);
12. Los tubos se agitaron para resuspender el extracto seco;

13. Se hicieron diluciones en proporción de 1:500 y para ello se tomaron 10  $\mu\text{L}$  del extracto reconstituido y 4990  $\mu\text{L}$  de la solución de metanol:ácido acético;
14. De la dilución 1:500 se tomaron 100  $\mu\text{L}$  y en sus respectivos viales, estos fueron colocados en el automuestreador del HPLC para su análisis;
15. Se obtuvieron 32 cromatogramas en los que se identificó el área bajo la curva de interés (mAU = miliunidades de absorbancia) y sus respectivos tiempos de retención (Figura 5);
16. Para la determinación de PA1 se obtuvo una curva de calibración y para ello se analizaron 6 concentraciones conocidas de PA1: 0.05; 0.10; 0.20; 0.40; 0.80 y 1.00  $\mu\text{g/mL}$ , con lo cual se obtuvo la ecuación de la recta:  $y = -0.414 + 70.321 x$ ; y una  $r^2 = 0.998$ , donde  $y$  = absorbancia y para obtener la concentración de PA1 se despejó  $x$  en cada muestra.



### 3.8 Método estadístico

Para comprobar que el nitrógeno y las plantas influyen sobre el rendimiento de fruto seco por planta (RFSP); concentración de PA1 por gramo de peso seco; (CONCPA1); contenido de PA1 por planta (mgPA1); peso de 100 frutos secos (PFS); peso de 100 endocarpios secos (PHS), se procedió a realizar el análisis de varianza sobre datos de cada una de las variables mencionadas.

### 3.8.1 Diseño experimental

Se trabajó en base a un *Diseño Cruzado Estándar 2x2*, dos secuencias, dos ciclos de producción.

Un diseño cruzado (DC) es un diseño de mediciones repetidas, tales que cada una de las unidades experimentales (UE) recibe diferentes tratamientos durante los diferentes períodos de tiempo, i.e., las UE se cruzan de un tratamiento a otro durante el curso del experimento. Esto es un contraste con un diseño completamente al azar (DCA), donde las UE son aleatorizadas para tratamientos y permanecen con ese tratamiento a través de la duración del experimento, (Vonesh and Chinchilli, 1997),

Las razones para considerar un DC en las etapas de planeación de un experimento o prueba, es que el diseño pudiera producir una comparación más eficiente de tratamientos que un DCA, esto es, pocas UE pueden ser requeridas en el DC para obtener el mismo nivel de poder estadístico, precisión y eficiencia que un DCA, lo cual resulta razonable, puesto que cada una de las UE sirve como su propio control.

Por otro lado, el uso de un DC permite evaluar directamente la productividad de cada planta, puesto que se evalúan al menos dos años de cosecha, por lo tanto al hacer las comparaciones de año con año, se observan los cambios por efecto del *tratamiento*, del *periodo* de cosecha, así como del efecto propio de la *planta*, por tanto con ello sabríamos qué plantas producen mayores concentraciones de PA1 y, en ese sentido se harán las selecciones de

plantas más productivas y con ello proseguir con otros experimentos a partir de las plantas seleccionadas.

Si hay suficiente evidencia de que las plantas producen toxinas como una cualidad genética, entonces resulta imperativo conocer cuáles plantas son las más productivas y seleccionarlas para posteriormente hacer otras investigaciones. Por tanto un diseño que permite la evaluación individual de las plantas sería el DCE 2x2, dos secuencias, dos años, que podría continuar para un DC de orden superior.

Es por ello importante iniciar con este tipo de experimentos para conocer su potencial de desarrollo en cultivares, además del efecto de los fertilizantes.

Para el análisis de varianza se utilizó el programa WinNonLin® 2.1. Los análisis de regresión cuadrática y lineal se hicieron a través del programa EXCEL® 2007. Para los análisis de correlación de Pearson se utilizó el programa SPSS® 13.0.

### 3.8.2 Hipótesis estadísticas

H<sub>01</sub>: no hay diferencia entre el rendimiento de fruto seco por efecto del nitrógeno.

H<sub>a1</sub>: el nitrógeno influye sobre el rendimiento de fruto seco por planta.

H<sub>02</sub>: no hay diferencia entre las concentraciones de PA1 por efecto del nitrógeno.

H<sub>a2</sub>: el nitrógeno influye sobre las concentraciones de PA1.

H<sub>03</sub>: no hay diferencia entre el contenido de PA1 por efecto del nitrógeno.

H<sub>a3</sub>: el nitrógeno influye sobre el contenido de PA1.

H<sub>04</sub>: no hay diferencia entre el peso de fruto seco por efecto del nitrógeno.

H<sub>a4</sub>: el nitrógeno influye sobre el peso de fruto seco.

H<sub>05</sub>: no hay diferencia entre el peso de endocarpio seco por efecto del nitrógeno.

H<sub>a5</sub>: el nitrógeno influye sobre el peso de endocarpio seco.

### 3.8.3 Modelo matemático

Para la prueba se utilizó el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + G_k + S_{ik} + P_j + T_{(j,k)} + e_{ijk}$$

Donde:

$\mu$  = Media general;

$G_k$  = Efecto fijo de la secuencia  $k$ .

$S_{ik}$  = Efecto aleatorio de la  $i$ -ésima planta en la  $k$ -ésima secuencia, donde  $i = 1, 2, \dots, nk$  y  $k = 1, 2, \dots, g$ ;

$P_j$  = Efecto fijo del  $j$ -ésimo año de producción, donde  $j = 1, \dots, p$  y  $\sum P_j = 0$ ;

$T_{(j,k)}$  = Es el efecto fijo directo del tratamiento en la  $k$ -ésima secuencia, el cual es aplicado en el  $j$ -ésimo año de producción y  $\sum T_{(j,k)} = 0$ ;

$e_{ijk}$  = Es el error aleatorio (*intra-planta*) en la observación  $Y_{ijk}$ .

Datos:

Número de tratamientos: = 2 (0 y 1: 0= sin fertilizante; 1= con fertilizante)

Número de secuencias: = 2 (01 y 10)

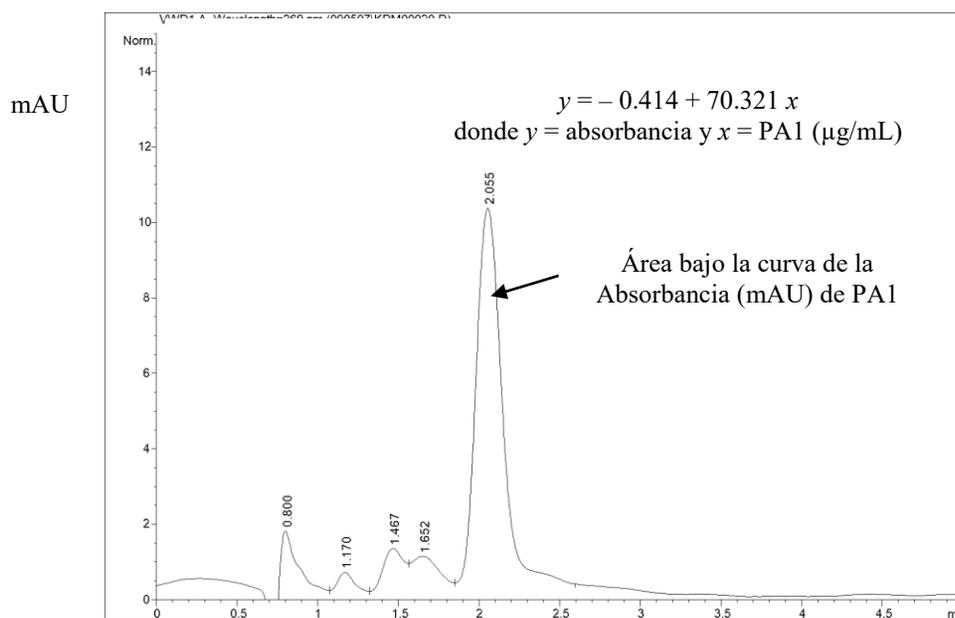
Número de años: = 2 (P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>)

Número de plantas: = 16

3.8.4 Croquis de un diseño cruzado estándar 2x2, dos secuencias, dos ciclos de producción.

Croquis de un diseño cruzado estándar 2 x 2 (dos secuencias y dos ciclos de producción).					
n total	Asignación de plantas a cada secuencia de tratamientos		Ciclos de producción		
			2005		2006
16 Plantas	A L E A T O R I Z A C I Ó N	Secuencia 1 (1-2)  <i>Plantas:</i> 01; 02; 03; 07; 10; 11; 14; 15	Sin Nitrógeno	D E S C A N S O	Con Nitrógeno
		Secuencia 2 (2-1)  <i>Plantas:</i> 04; 05; 06; 08; 09; 12; 13; 16	Con Nitrógeno		Sin Nitrógeno

## Ejemplo de cromatograma de PA1



**Figura 6.** Tiempo de retención (min) de PA1 y otras sustancias y solventes

Se identificaron las 4 plantas con mayor concentración promedio de PA1 y se clasificaron como plantas tipo Kp1; también se identificaron las 4 plantas de menor concentración de PA1 como tipo Kp3; mientras que las 8 plantas restantes, que produjeron valores intermedios de PA1, fueron identificadas como plantas tipo Kp2.

## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### **4.1 *Datos basales (cosecha de 2004)***

Durante los meses de octubre y noviembre del año 2004, y previo a la aplicación de fertilizante, las 16 plantas seleccionadas fueron cosechadas y los datos de producción muestran un promedio general de  $506.5 \pm 459.5$  g de fruto seco por planta.

En muestras de 300 frutos cada una, el peso seco por fruto resultó en  $0.100 \pm 0.032$  g; mientras que el peso seco por endocarpio resultó con un promedio de  $0.035 \pm 0.008$  g.

#### **4.2 *Características generales del suelo: pH y conductividad eléctrica***

Después de la cosecha, en la etapa invernal, se analizaron cuatro muestras de suelo del vivero y en las muestras 1 y 2, resultaron deficiencias de N, P, Fe y Mn; mientras que K, Cu y Zn resultaron con niveles óptimos. En las muestras 3 y 4 resultaron deficiencias de N, Fe y Mn; mientras que en P, K, Cu y Zn resultaron niveles óptimos. El pH del suelo donde crecieron las plantas de

*K. parvifolia*, sobre las cuales se llevó a cabo esta investigación, mostró un pH promedio de  $7.9 \pm 0.08$ , lo que indicaría que es un suelo moderadamente alcalino; mientras que el contenido de sales solubles totales por el método extracto de saturación, mostró una conductividad eléctrica con valor promedio de  $0.40 \pm 0.07$  mS/cm a 25°C, lo que indica que se trata de un suelo no salino (Anexo-Resultados de Laboratorio).

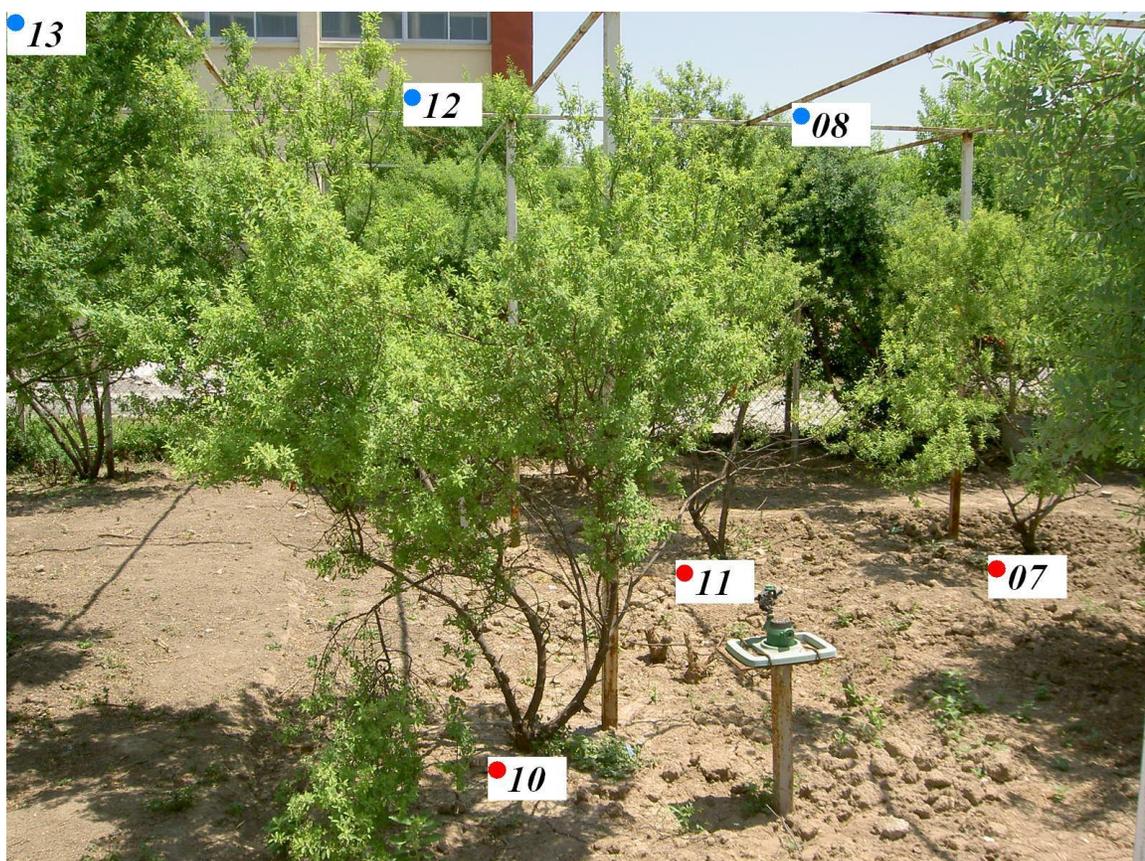
### **4.3 Desarrollo del cultivo: apariencia fenotípica**

Por lo que respecta a la apariencia fenotípica, se pudo observar que las plantas que fueron fertilizadas con nitrógeno mostraron un verdor relativamente intenso, mientras que las plantas que no recibieron fertilizante mostraron diversos niveles de clorosis, (Figura 7).

Se hizo una evaluación de campo y resultó que las 8 plantas sin nitrógeno con 4 repeticiones, tuvieron una  $\mu = 4.8 \pm 2.6$ ; mientras que las 8 plantas con nitrógeno y 4 repeticiones, tuvieron una  $\mu = 2.6 \pm 1.1$ .

El estadístico de *la prueba de suma de rangos de Wilcoxon* mostró un valor  $W = 46.5$ , y un valor de  $p = 0.024$  (prueba bilateral), lo cual indica una diferencia estadística significativa entre los dos grupos de plantas y se confirmó que el nitrógeno tiene efecto sobre el grado de clorosis y, por lo tanto en la actividad fotosintética, lo cual se traduciría en una mayor acumulación de materia seca en las plantas fertilizadas.

En suelos de pH elevado, como sería el caso del vivero de *Karwinskia*, Guerrero (2000) menciona que es común observar deficiencias de hierro, manganeso y zinc, lo cual se confirmó con el resultado del análisis de suelo, en el cual resultaron deficiencias (método de Olsen modificado) de manganeso y hierro, además de nitrógeno.



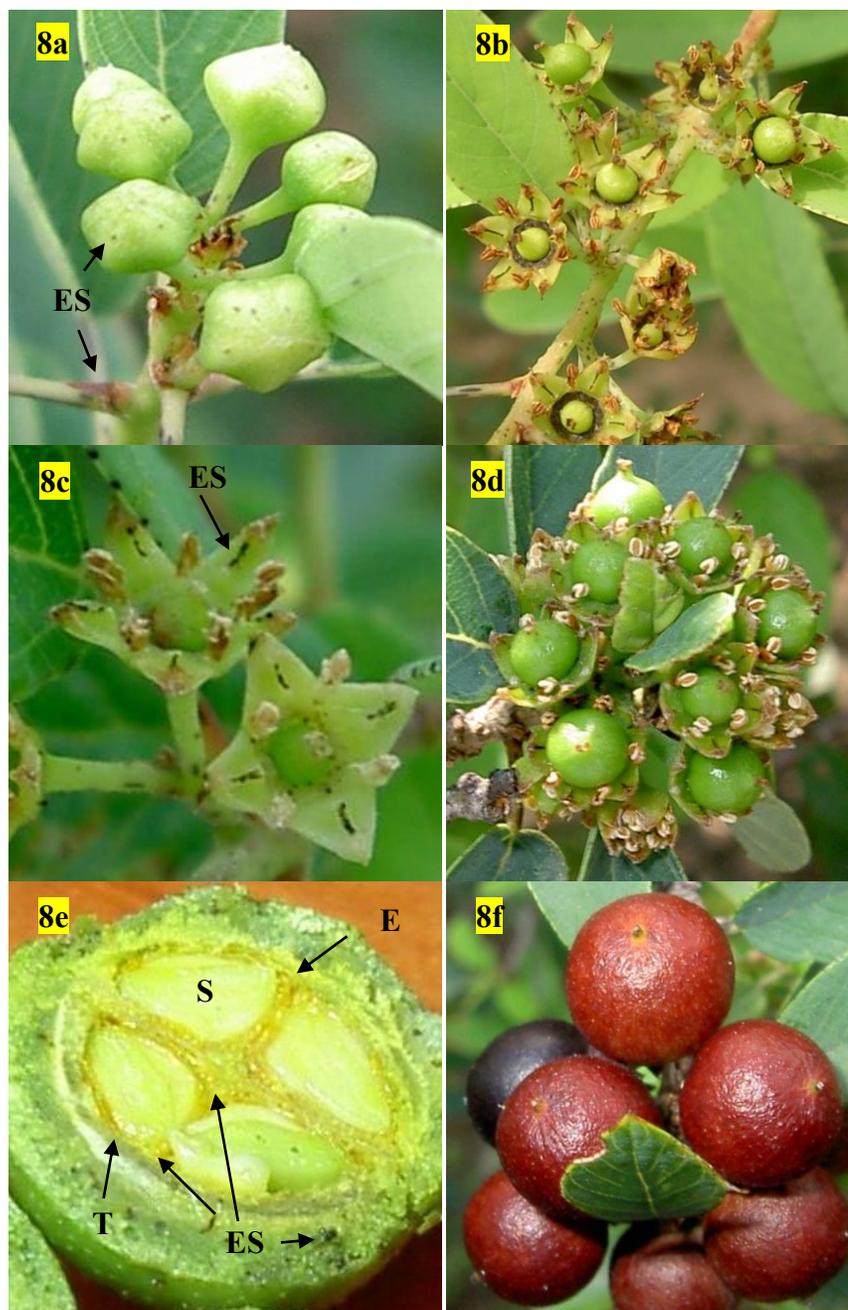
**Figura 7.** En plantas de *K. parvifolia* que recibieron suplemento nitrogenado (plantas 08, 12, 13), se observa un verde intenso, mientras que las plantas que no recibieron suplemento nitrogenado (plantas 07, 10, 11), se observan amarillentas, cloróticas.

Navarro (2003) menciona que las deficiencias de hierro inician con amarilleamiento de las zonas foliares intervenales de las hojas más jóvenes debido a la poca movilidad del elemento en la planta. Es común observar frutos más pequeños y de maduración precoz, con acumulaciones de ácido cítrico, nitratos y aminoácidos libres, tales como arginina, asparragina y glutamina...en casos graves se llega a una ausencia total de clorofila. En invierno se manifiesta más intensamente la clorosis férrica debido a que disminuye la respiración y con ésta, la absorción de hierro.

Las deficiencias de N, Fe y Mn que se observaron en las muestras de suelo explicarían, en parte, que las plantas se vean cloróticas, particularmente en la etapa invernal.

#### *4.3.1 Floración, maduración del fruto y cosecha*

En el curso de esta investigación se observó que la emisión de botón floral se presentó para las primeras 2 plantas durante el mes de marzo; en 12 plantas dio inicio durante el mes de mayo y las últimas 2 plantas lo hicieron durante el mes de junio. En las Figuras 8a, 8b, 8c se observan diferentes plantas en etapa de floración. Los frutos crecieron y maduraron (Figuras 8d, 8e, 8f) y durante el mes de septiembre se cosecharon 10 plantas y en el mes de octubre fueron cosechadas las 6 plantas restantes. En la Figura 9 se puede observar el reinicio intenso de floración, el cual coincidió con el crecimiento y maduración del fruto generado de la floración previa. Esta nueva floración tuvo su mayor intensidad al inicio del verano y fue disminuyendo gradualmente hacia el mes de octubre.



**Figura 8.** Diferentes etapas fenológicas en la especie *Karwinskia parvifolia* bajo condiciones de cultivo: **8a)** Botón floral en planta 6; **8b)** Floración en planta 11; **8c)** Floración en planta 14; **8d)** Crecimiento de fruto en planta 13; **8e)** Corte ecuatorial de fruto verde, donde se observan 4 embriones; se observan estructuras secretorias (ES) en color amarillo en la testa (T) de la semilla (S) y en el endocarpio (E); **8f)** Maduración de fruto en planta 2. En botón floral, órganos florales, pecíolos, bordes de las hojas y venas principales, así como en tallos, se observan estructuras secretorias.



**Figura 9.** Las plantas de *Karwinskia parvifolia* son perennifolias, de polinización entomófila y durante el período junio-julio se observó el reinicio de floración en forma simultánea con crecimiento y maduración de fruto. En la figura se observa una abeja polinizando una flor y frutos en diferente etapa de crecimiento y maduración.

#### **4.4 Resultados generales de campo y de laboratorio**

##### **4.4.1 Rendimiento de fruto fresco y de fruto seco por planta**

El rendimiento total de fruto fresco (RFFP) de las dos cosechas (2005 y 2006) en 16 plantas de *Karwinskia parvifolia* fue de 64481.74 g, con promedio general de  $2015.05 \pm 2054.53$  g por planta. Este fruto fresco, después de secarse a temperatura ambiente de laboratorio, resultó en un rendimiento de 23717.00 g de fruto seco (RFSP), con promedio general de  $741.16 \pm 768.91$  g de peso seco (Cuadro A-I).

#### *4.4.2 Concentración de PA1*

El promedio general de las concentraciones de PA1 observadas en las 32 muestras de 100 frutos por planta resultó en  $319.68 \pm 221.27$   $\mu\text{g}$  de PA1 por gramo de peso seco (Cuadro A-I).

#### *4.4.3 Contenido de PA1*

El contenido total de PA1 que fue estimado a partir del rendimiento por planta y su respectiva concentración de PA1, resultó en 7523.19 mg, con un promedio general ( $n=32$ ) de  $235.10 \pm 280.50$  mg de PA1 por planta (Cuadro A-I).

#### *4.4.4 Peso de 100 frutos y de 100 endocarpios secos*

El peso seco por 100 frutos secos resultó en un promedio de  $8.95 \pm 3.53$ ; mientras que el peso de 100 endocarpios secos resultó en  $3.74 \pm 0.96$  g (Cuadro A-I), lo que daría un estimado de 1111 frutos por 100 g de fruto seco y de 2703 endocarpios por 100 g de endocarpios secos, respectivamente.

### **4.5 Resultados por tratamiento**

Los datos de interés fueron agrupados por tratamiento y este procedimiento se realizó para todas las variables estudiadas, a saber: rendimiento de fruto seco por planta (RFSP); concentración de PA1 por gramo de peso seco (CONCPA1); contenido de PA1 por planta (mgPA1); peso de 100 frutos secos (PFS); y peso de 100 endocarpios secos (PHS), (Cuadro I).

Cuadro I. Resultados promedio y desviación estándar (DE) por tratamiento en cosechas de los años 2005 y 2006 en <i>K. parvifolia</i> .				
Variable	Tratamiento	<i>n</i>	Promedio	DE
RFSP	SN (2005 y 2006)	16	648.56	668.45
	CN (2005 y 2006)	16	833.75	869.91
CONCPA1	SN (2005 y 2006)	16	318.98	237.32
	CN (2005 y 2006)	16	320.39	211.79
mgPA1	SN (2005 y 2006)	16	226.50	279.61
	CN (2005 y 2006)	16	243.69	290.28
PFS	SN (2005 y 2006)	16	8.49	2.93
	CN (2005 y 2006)	16	9.41	4.10
PHS	SN (2005 y 2006)	16	3.69	0.89
	CN (2005 y 2006)	16	3.79	1.06
RFSP = rendimiento de fruto seco por planta; CONCPA1 = concentración en $\mu\text{g}$ de PA1 por gramo de peso seco; mgPA1 = contenido estimado en mg de PA1 por planta; PFS = peso de 100 frutos secos; peso de 100 endocarpios secos; SN = sin suplemento nitrógeno; CN = con suplemento nitrogenado; <i>n</i> = tamaño de muestra.				

#### 4.6 Rendimiento promedio por año de cosecha

Para la comparación de años, se procedió al agrupamiento de los datos de los tratamientos SN y CN correspondientes al año 2005 y 2006, a fin de obtener el promedio del tratamiento sin nitrógeno (SN) más el tratamiento con nitrógeno (CN). Este procedimiento se realizó para todas las variables, a saber: RFSP; CONCPA1; mgPA1; PFS; y PHS (Cuadro II).

Cuadro II. Resultados promedio y desviación estándar (DE), el cual incluye resultados de los dos tratamientos por año de cosecha.				
Variable	Año	<i>n</i>	Promedio	DE
RFSP	2005 (SN y CN)	16	914.06	905.58
	2006 (SN y CN)	16	568.25	581.38
CONCPA1	2005 (SN y CN)	16	366.32	264.64
	2006 (SN y CN)	16	273.06	162.81
mgPA1	2005 (SN y CN)	16	332.31	331.01
	2006 (SN y CN)	16	137.88	181.30
PFS	2005 (SN y CN)	16	9.80	4.49
	2006 (SN y CN)	16	8.11	2.04
PHS	2005 (SN y CN)	16	4.00	1.16
	2006 (SN y CN)	16	3.48	0.66
RFSP = rendimiento de fruto seco por planta; CONCPA1 = concentración en µg de PA1 por gramo de peso seco; mgPA1 = contenido estimado en mg de PA1 por planta; PFS = peso de 100 frutos secos; peso de 100 endocarpios secos; SN = sin suplemento nitrógeno; CN = con suplemento nitrogenado; <i>n</i> = tamaño de muestra.				

#### **4.7 Resultados del análisis de varianza y pruebas de hipótesis**

Para comprobar que el nitrógeno y el tipo de plantas influyen sobre el rendimiento de fruto seco por planta (RFSP); concentración de PA1 por gramo de peso seco; (CONCPA1); contenido de PA1 por planta (mgPA1); peso de 100 frutos secos (PFS); peso de 100 endocarpios secos (PHS), se procedió a realizar el análisis de varianza bajo un diseño cruzado estándar 2x2, dos secuencias, dos años (Cuadros A-II y A-III).

Los análisis de varianza se realizaron para cada una de las variables bajo estudio (RFSP; CONCPA1; mgPA1; PFS; y PHS), interpretándolos a través de sus respectivas fuentes de variación. La fuente de variación *efecto residual*, se muestra en un párrafo separado para las variables estudiadas, a fin de facilitar su explicación y dado que es un requisito el que su efecto no resulte significativo, lo cual se detalla a continuación (Cuadro A-III).

Si hubiese efecto residual en el análisis de varianza ( $p < 0.05$ ), se descartarían los resultados del segundo ciclo de producción y se tomarían en cuenta sólo los datos del primer ciclo. En este último caso, el análisis estadístico se realizaría a través de un diseño completamente al azar, o inclusive una prueba de  $t$  para grupos independientes.

##### **4.7.1 Efecto residual**

El análisis de varianza no mostró efecto residual para ninguna de las cinco variables estudiadas, a saber: rendimiento de fruto seco por planta (RFSP), con

valor de  $p = 0.4400$ ; concentración de PA1 ( $\mu\text{g}$  de PA1/g de peso seco), con valor de  $p = 0.8179$ ; contenido (mg) de PA1 por planta, con valor de  $p = 0.6875$ ; peso seco de 100 frutos (PFS), con valor de  $p = 0.0866$ ; y peso seco de 100 endocarpios (PHS), con valor de  $p = 0.1765$ ; por lo tanto, al no haber efecto residual, se consideró apropiado utilizar los datos de los dos años de cosecha para el análisis estadístico en las cinco variables bajo estudio (Cuadro A-III).

#### *4.7.2 Prueba de hipótesis a través de los análisis de varianza:*

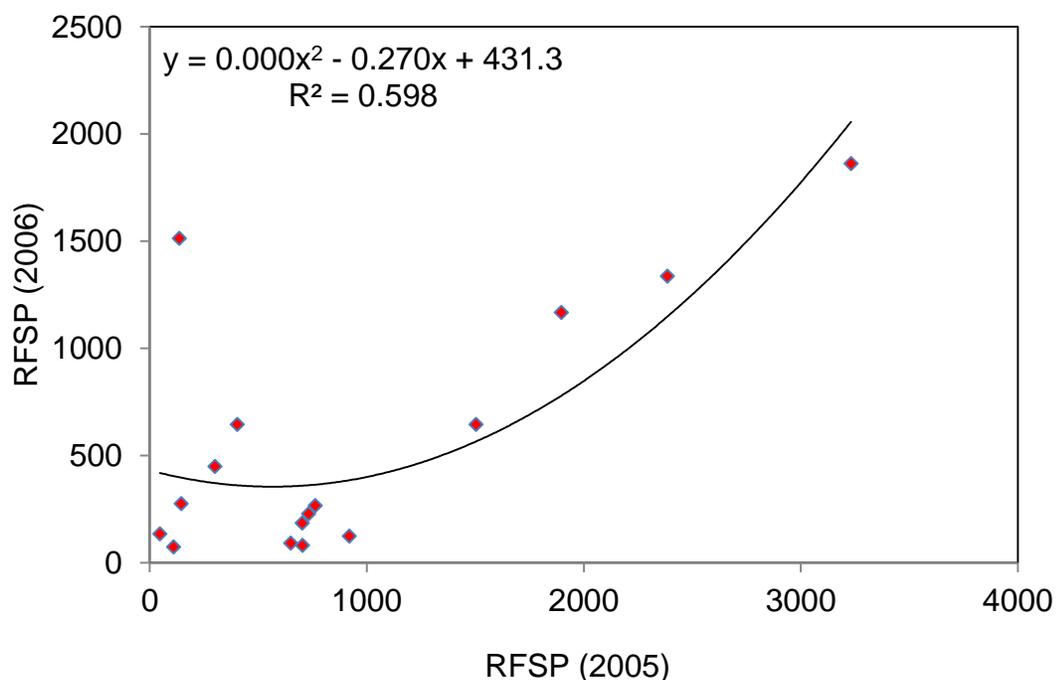
##### *4.7.2.1 Hipótesis 1 ( $H_{a1}$ ). El nitrógeno influye sobre el rendimiento de fruto seco por planta (RFSP)*

En esta variable se observó diferencia altamente significativa por efecto de planta, con valor de  $p = 0.0036$ ; mientras que las fuentes de variación año y tratamiento no mostraron diferencia significativa, con valores de  $p = 0.0509$  y  $p = 0.2721$ . En el valor de  $p = 0.0509$ , para el efecto de año sobre el rendimiento de fruto seco por planta, se puede observar que apenas rebasa el nivel de significancia de 0.0500, lo cual sugiere que el año sí influye en realidad sobre el rendimiento de fruto seco por planta (Cuadro A-II).

Considerando el efecto significativo de plantas sobre el peso de fruto seco, en esta variable se observaron valores tan altos como  $2546.75 \pm 968.38$  g, que correspondió al rendimiento promedio en dos años de cosecha de la planta 13, y tan bajos como  $91.15 \pm 62.72$  g, que correspondió a la planta 11, (Cuadro A-I).

El rendimiento promedio de fruto seco por planta del año 2005 resultó en  $914.06 \pm 905.58$  g; mientras que en el año 2006, fue de  $568.25 \pm 581.38$  g (Cuadro II).

Considerando el diagrama de dispersión de datos del RFSP, se hizo un análisis de regresión cuadrática entre los resultados del año 2006, contra los resultados del año 2005. Se observaron altos rendimientos entre las plantas en ambos años de cosecha. Las plantas que produjeron altos rendimientos durante 2005, también lo hicieron durante 2006. En el análisis de regresión resultó un coeficiente de determinación  $R^2 = 0.598$ , lo cual muestra que los datos tienen un ajuste moderadamente alto e indican que además del efecto de las plantas hay un efecto ambiental que tiende a influir sobre el rendimiento de fruto seco, (Figura 10).



**Figura 10.** Diagrama de dispersión de datos entre el rendimiento de fruto seco por planta en gramos (RFSP) de los años 2005 y 2006, en 16 plantas de *Karwinskia parvifolia*.

#### 4.7.2.2 Hipótesis 2 ( $H_{a2}$ ). El nitrógeno influye sobre las concentraciones de PA1 (CONCPA1)

El análisis de varianza mostró diferencia altamente significativa por efecto de planta sobre la concentración de PA1, con valor de  $p = 0.0005$ . En relación con el efecto del año, el análisis de varianza mostró diferencia significativa entre las concentraciones de PA1, con valor de  $p = 0.0375$ ; mientras que el efecto de tratamiento no fue significativo sobre las concentraciones de PA1, con valor de  $p = 0.9727$  (Cuadro A-II).

Los resultados indican que las plantas influyeron significativamente sobre las concentraciones de PA1 (CONCPA1). En esta fuente de variación (plantas), se observaron valores tan altos como  $678.38 \pm 222.05$  y  $58.26 \pm 20.35$   $\mu\text{g}$  de PA1/g p.s., que correspondieron a las concentraciones promedio de PA1 en las plantas 10 y 2, respectivamente (Cuadro A-I).

La concentración promedio de PA1 por planta del año 2005 fue de  $366.32 \pm 264.64$   $\mu\text{g}$  de PA1/g p.s., y resultó superior en un 34.15 % a la que se obtuvo del año 2006, que fue de  $273.06 \pm 162.81$   $\mu\text{g}$  de PA1/g p.s. (Cuadro II).

Masarovičová *et al.*, (2000) reportaron que el suplemento de nitrógeno influyó significativamente sobre la concentración de PA1 en las hojas de *K. parvifolia* bajo condiciones controladas de crecimiento, pero en esta investigación no se observó evidencia estadística de que el nitrógeno influya sobre la concentración de PA1 en frutos maduros de 16 plantas de *K. parvifolia* cultivadas en vivero; es decir, el nitrógeno pudiera tener efecto sobre la

concentración de PA1 a nivel de hojas, pero no en frutos y en éstos sería más bien un efecto indirecto, particularmente con un incremento en el PFS y PHS, así como en el rendimiento de las cosechas (RFSP), lo cual produciría en su conjunto un incremento en el contenido de PA1 (mgPA1).

Por otro lado, se comprobó que el ambiente (año de cosecha) tiene influencia sobre las concentraciones de PA1 en *K. parvifolia*, lo cual coincide con los resultados de Luján (1999), quien agrupó en períodos mensuales durante un año continuo las cosechas de 51 plantas de *K. humboldtiana* cultivadas en vivero y observó que los frutos cosechados (en las 51 plantas) en los meses de agosto y septiembre produjeron mayores concentraciones de PA1 que las obtenidas en las cosechas de los meses de abril y mayo en esas mismas plantas; también observó que las concentraciones de PA1 se van modificando gradualmente durante los meses del año y que están inversamente correlacionadas con las concentraciones de la toxina T-544 (Luján, 1999), que es otra de las sustancias sintetizadas en *K. humboldtiana* y reportada por Dreyer *et al.*, (1975) y que otros investigadores han evaluado en su toxicidad al igual que con PA1, (Garza *et al.*, 1992; Gómez *et al.*, 2005).

Otros investigadores ya han reportado trabajos sobre la variabilidad en concentraciones de toxinas, pero ha sido entre especies del género *Karwinskia* o entre localidades o ambientes de producción sobre los contenidos de PA1 y otras toxinas como T-496 y T-544, (Guerrero *et al.*, 1987; Luján *et al.*, 1995; Waksman *et al.*, 1997; Hanáčková *et al.*, 1997; Lišková *et al.*, 1999; Luján, 1999; Masarovičová *et al.*, 2000; Piñeyro & Waksman, 2000); mientras que en este

trabajo se reporta la variabilidad entre plantas cultivadas de una misma especie (*K. parvifolia*) sobre la concentración de PA1.

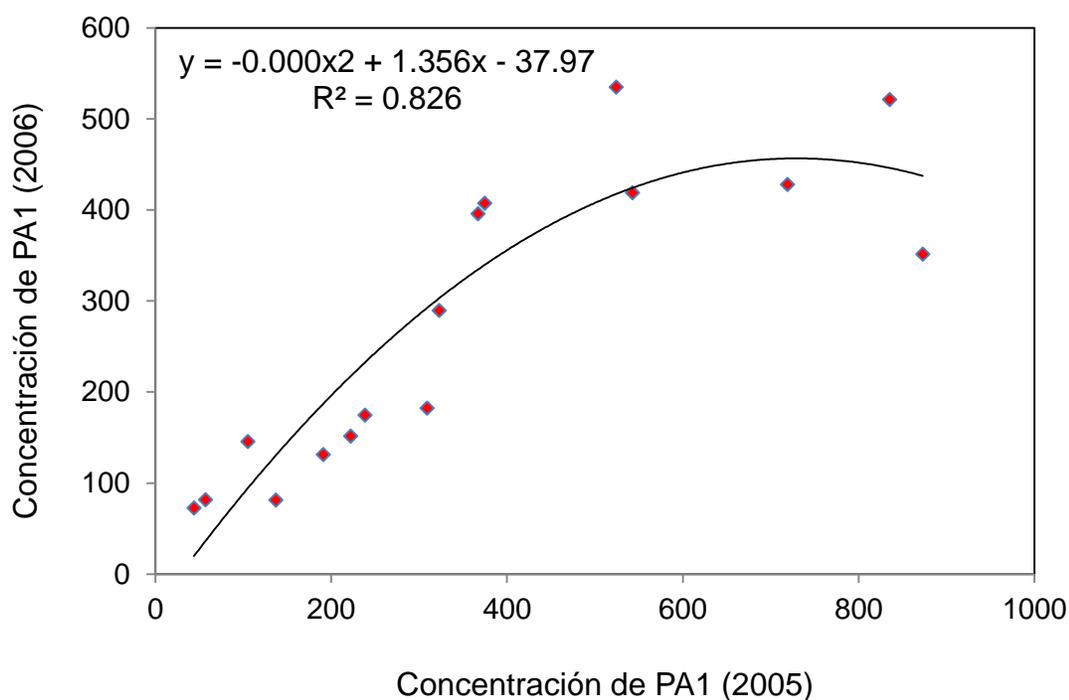
En esta investigación se observó que las plantas de *K. parvifolia*, aun cuando fueron cultivadas en vivero, produjeron diferentes formas, tamaños y pesos de frutos, en los cuales se cuantificó por primera vez la variabilidad entre plantas sobre la concentración de PA1; y en las 16 plantas estudiadas durante dos años de cultivo, resultaron concentraciones promedio de PA1 ( $\mu\text{g PA1/g}$  de peso seco) por planta tan bajas como  $58.3 \pm 20.4$  (planta 2) y tan altas como  $678.4 \pm 222.0$  (planta 10). El hecho de que hayan resultado concentraciones de PA1 tan contrastantes entre plantas de una misma especie, que se cultivan en vivero bajo condiciones relativamente homogéneas en cuanto a radiación solar, temperatura, precipitación pluvial y frecuencia de riego entre otras condiciones de cultivo, sugiere que aun cuando los factores ambientales influyan sobre la síntesis de PA1, las concentraciones de esta sustancia estarían altamente influenciadas por el genotipo de cada planta en particular.

Masarovicová *et al.*, (2000) reportaron promedios de  $120 \pm 5$  y de  $143 \pm 6 \mu\text{g}$  de PA1 por gramo de peso seco en hojas de *K. parvifolia* suplementadas con nitrógeno en dosis baja y alta, respectivamente; Hanáčková (1999) trabajó con testas+endocarpios, en exocarpios y en embriones de *K. parvifolia* y reportó valores de 984, 34.96 y 16.28  $\mu\text{g}$  de PA1 por gramo de peso seco, respectivamente; Waksman *et al.*, (1997) reportaron concentraciones de PA1 de 0.50 a 1.03 % en frutos y endocarpios de plantas silvestres de *K. parvifolia* y de 0.20 a 0.70 % de PA1 en frutos de plantas silvestres de

*K. humboldtiana*; Guerrero *et al.*, (1987) reportaron concentraciones de PA1 en frutos de plantas silvestres de *K. humboldtiana* de 0.20 a 0.90 %; mientras que en el Área de Producción de PA1 del Departamento de Farmacología y Toxicología se obtiene 1 gramo de PA1 por cada 10 kg de endocarpios secos de plantas silvestres de *K. parvifolia*, es decir; el equivalente a 100 µg de PA1 por gramo de peso seco (comunicación personal, 2007).

Kumate (1993), menciona que “En el tejo del Pacífico: *Taxus brevifolia*, el extracto de la corteza mostró actividad inhibitoria *versus* tumores murinos: las leucemias L1210, P388 y P1534, el carcinoma 256 de Walker y el sarcoma 180 entre otros. El principio activo es el taxol, un diterpeno, una molécula muy compleja de síntesis difícil y costosa; y agrega que “El rendimiento de taxol es 0.01% por peso de la corteza, aproximadamente un kilo por 9 toneladas, de cada árbol se puede obtener un gramo o 2-3 dosis”, (A la fecha se tienen otras fuentes de taxol). Y agrega que en Estados Unidos mueren anualmente 12 000 enfermos de cáncer ovárico metastásico y la cantidad se incrementaría hasta 50 000 si se incluyesen los casos de cáncer mamario, (Kumate, 1993).

Considerando la dispersión de los datos, se ajustó un modelo cuadrático en el análisis de regresión entre los resultados del año 2006, contra los resultados del año 2005 (Figura 11) y resultó un coeficiente de determinación  $R^2 = 0.826$ , lo cual muestra un ajuste de los datos relativamente alto, e indica que además del efecto de plantas, hay un componente ambiental que influyó significativamente sobre las concentraciones de PA1.



**Figura 11.** Diagrama de dispersión de datos entre las concentraciones de PA1 [ $\mu\text{g PA1} \cdot \text{g ps}$ ] de los años 2005 y 2006, en 16 plantas de *Karwinskia parvifolia*.

#### 4.7.2.3 Hipótesis 3 ( $H_{a3}$ ). El nitrógeno influye sobre el contenido de PA1 por planta ( $\text{mgPA1}$ )

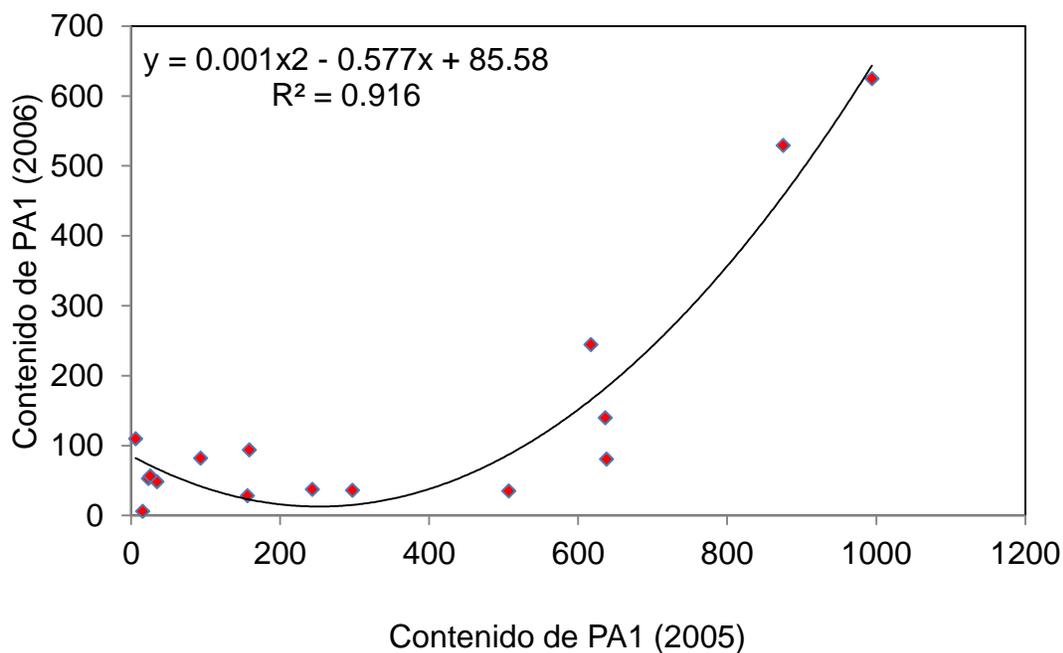
En esta variable se observó que tanto el efecto de planta, como el efecto de año resultaron altamente significativos, con valores de  $p = 0.0025$  y  $p = 0.0038$ ; mientras que el efecto de tratamiento no resultó significativo, con valor de  $p = 0.7643$  (Cuadro A-II).

En relación con el efecto de las plantas sobre el contenido de PA1 ( $\text{mgPA1}$ ), se observaron valores tan altos como  $809.46 \pm 261.03$  y  $10.54 \pm 6.39$  mg de

PA1, que correspondieron a las estimaciones de los contenidos promedio de PA1 de las plantas 4 y 7, respectivamente (Cuadro A-I).

El promedio del contenido de PA1 por planta en el año 2005 fue de  $332.31 \pm 331.01$  mg, y resultó superior en un 141.0 % al contenido de PA1 del año 2006, que fue de  $137.88 \pm 181.30$  mg (Cuadro II).

Considerando la dispersión de los datos sobre el contenido de PA1, se procedió a realizar un análisis de regresión cuadrático entre los resultados del año 2006, contra los resultados del año 2005. El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) fue de 0.916, (Figura 12). Este resultado muestra un ajuste de los datos relativamente alto e indica que además del efecto de las plantas, hay otra fuente de variación que influyó significativamente sobre el contenido de PA1.



**Figura 12.** Diagrama de dispersión de datos entre los contenidos estimados en miligramos de PA1 por planta de los años 2005 y 2006, en 16 plantas de *Karwinskia parvifolia*.

#### 4.7.2.4 Hipótesis 4 ( $H_{a4}$ ). El nitrógeno influye sobre el peso de fruto seco (PFS)

En el análisis de varianza no se observó diferencia significativa por efecto de planta; de año; ni de tratamiento sobre el peso de 100 frutos secos, con valores de  $p = 0.0711$ ;  $p = 0.0866$  y  $p = 0.3331$ , respectivamente. Se observa que los valores de  $p$  para las fuentes de variación plantas y año, rebasan con poco el nivel de significancia de 0.0500, (Cuadro A-II).

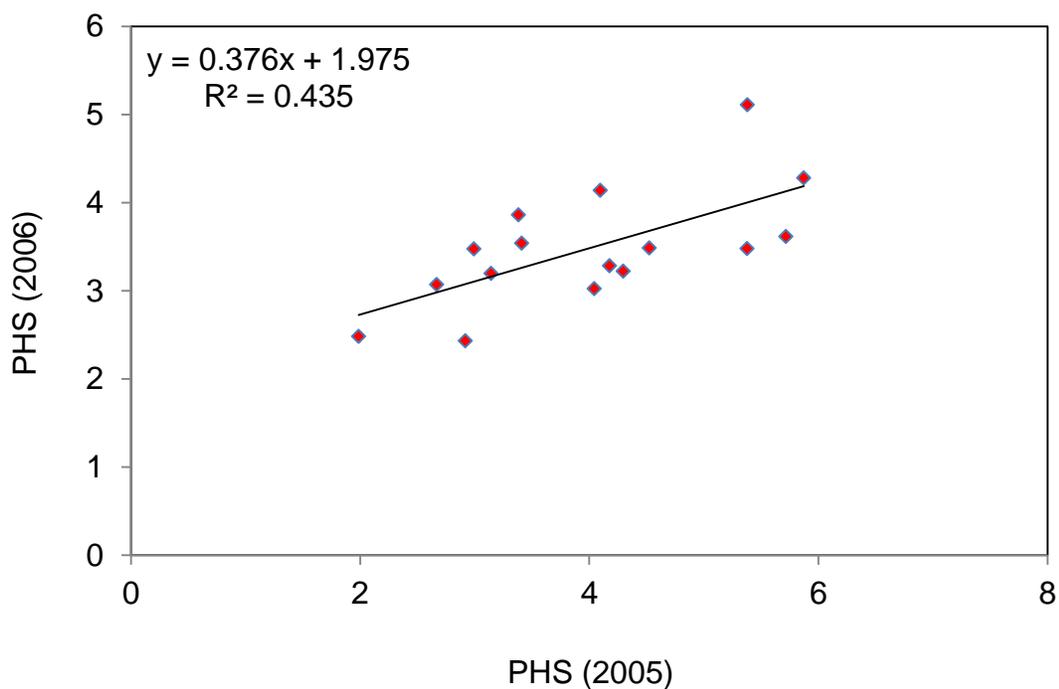
4.7.2.5 *Hipótesis 5 ( $H_{a5}$ ). El nitrógeno influye sobre el peso de endocarpios secos (PHS)*

En esta variable se observó a través del análisis de varianza una diferencia significativa en el peso de 100 endocarpios secos por efecto de planta y año, con valores de  $p = 0.0186$  y  $p = 0.0379$ , respectivamente; mientras que el efecto de tratamiento no resultó significativo, con valor de  $p = 0.6921$  (Cuadro A-II).

Los resultados indican que las plantas influyeron significativamente sobre el peso de 100 endocarpios secos. En relación con esta fuente de variación (plantas), se observaron valores tan altos como  $5.24 \pm 0.19$  y  $2.24 \pm 0.35$  g, que correspondieron a los pesos promedio de las plantas 16 y 7, respectivamente (Cuadro A-I).

El promedio del peso de 100 endocarpios en el año 2005 fue de  $4.00 \pm 1.16$  g, y resultó superior en un 14.94 % al peso obtenido en el año 2006, que fue de  $3.48 \pm 0.66$  g (Cuadro II).

La dispersión de los datos mostró una relación de tipo lineal entre los resultados del año 2006, contra los resultados del año 2005. El análisis de regresión resultó con un coeficiente de dispersión  $R^2 = 0.435$  (Figura 13).



**Figura 13.** Diagrama de dispersión de datos entre el peso seco en gramos de 100 endocarpios por planta de los años 2005 y 2006, en 16 plantas de *Karwinskia parvifolia*.

#### 4.8 **Formación de grupos de plantas con alta, media y baja concentración de PA1**

Considerando las diferencias observadas en las concentraciones de PA1 entre las plantas, se procedió a identificar y agrupar las plantas en tres grupos, en función de las concentraciones promedio de dos años de cosecha en cada planta. Se formaron tres grupos: Kp1, Kp2 y Kp3, de 4, 8 y 4 plantas, respectivamente; con dos repeticiones por planta (cosechas de 2005 y 2006),

cuya característica de agrupamiento fueron las concentraciones de PA1 altas, medias y bajas, respectivamente (Cuadro A-I; Cuadro III).

La comparación entre los promedios de PA1 muestra que las 4 plantas más productivas (grupo Kp1) produjeron 560.9 %  $[(598.35/90.53*100)-100]$  más concentración de PA1 que las 4 plantas menos productivas del grupo Kp3, (Cuadro III). En el Cuadro III también se observa que tanto el PFS como el PHS guardan una correlación positiva con la concentración de PA1 y también resultó que los promedios del grupo Kp1 fueron superiores a los promedios del grupo Kp3 en PFS y PHS. Caso contrario ocurrió con el cociente PHS/PFS.

Cuadro III. Resultados promedio y desviación estándar (DE) de peso seco de 100 frutos (PFS), peso seco de 100 endocarpios (PHS), cociente de PHS/PFS, así como de concentración de PA1 en  $\mu\text{g}$  por gramo de peso seco ( $\mu\text{g}$  PA1/g p. s.) por grupo de plantas (con dos repeticiones cada planta-2005 y 2006) de *K. parvifolia*.

Grupo	PFS (DE)	PHS (DE)	(PHS/PFS)*100 (DE)	$\mu\text{g}$ PA1/g p. s. (DE)
Kp1 (Plantas: 3, 4, 6 y 10)	12.33 (3.21)	4.38 (0.60)	37.40 (5.38)	598.35 (63.11)
Kp2 (Plantas: 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15 y 16)	8.52 (1.72)	3.83 (0.75)	46.10 (5.82)	294.91 (114.16)
Kp3 (Plantas: 1, 2, 5 y 7)	6.45 (1.59)	2.93 (0.60)	47.44 (6.01)	90.53 (31.92)
PA1 = peroxisomicina A1.				

#### **4.9 Resultados del análisis de correlación de Pearson entre variables**

##### *4.9.1 Correlaciones entre CONCPA1 y RFSP; mgPA1; PFS; PHS y correlaciones entre PFS y las demás variables*

También se hicieron análisis de correlación entre las variables estudiadas, particularmente la que está asociada con PA1, los cuales indican que la *concentración de PA1* (CONCPA1) mostró una correlación altamente significativa con las variables PFS; PHS; y mgPA1, con valores del coeficiente de correlación de Pearson  $r = 0.591$  y  $r = 0.503$  y  $r = 0.569$ , respectivamente. Las variables RFFP y RFSP no mostraron correlación significativa con la variable CONCPA1, (Cuadro A-IV).

La variable PFS mostró correlación significativa con el RFSP, y con el PHS, lo cual sería explicable porque PFS y PHS son componentes del rendimiento de las cosechas, es decir, un fruto bien desarrollado tendrá mayor peso por endocarpio y esto se reflejará en un mayor RFSP.

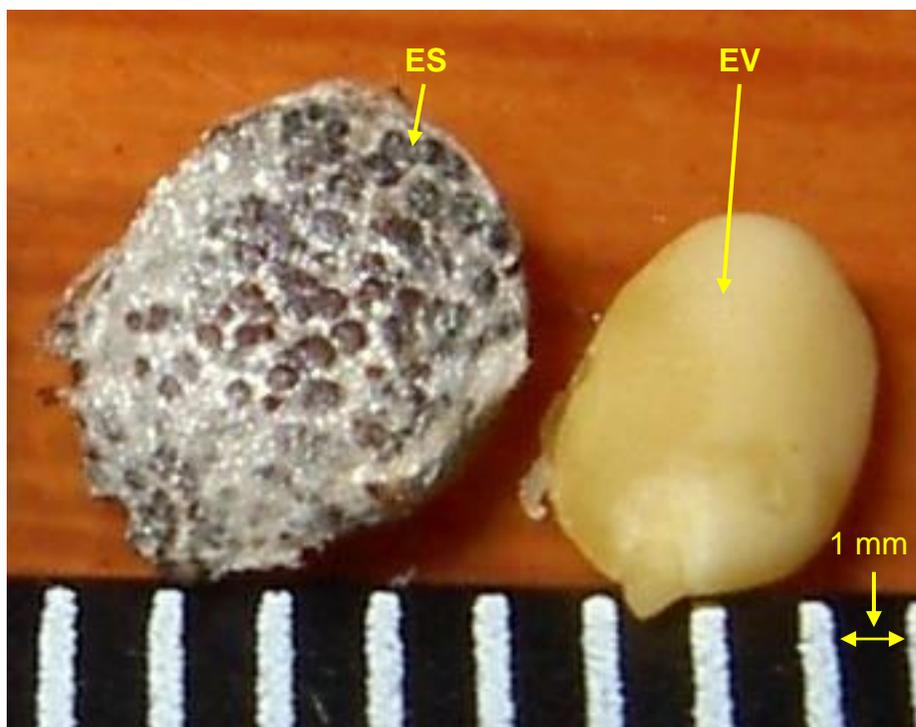
El peso de fruto seco (PFS) también mostró una correlación altamente significativa con las variables CONCPA1 y mgPA1.

##### *4.9.2 Correlaciones entre mgPA y RFSP; mgPA1; PFS; PHS*

Otras correlaciones que destacan son las correspondientes al *contenido de PA1 por planta* (mgPA1). Esta variable mostró una correlación altamente significativa con todas las variables bajo estudio (Cuadro A-IV).

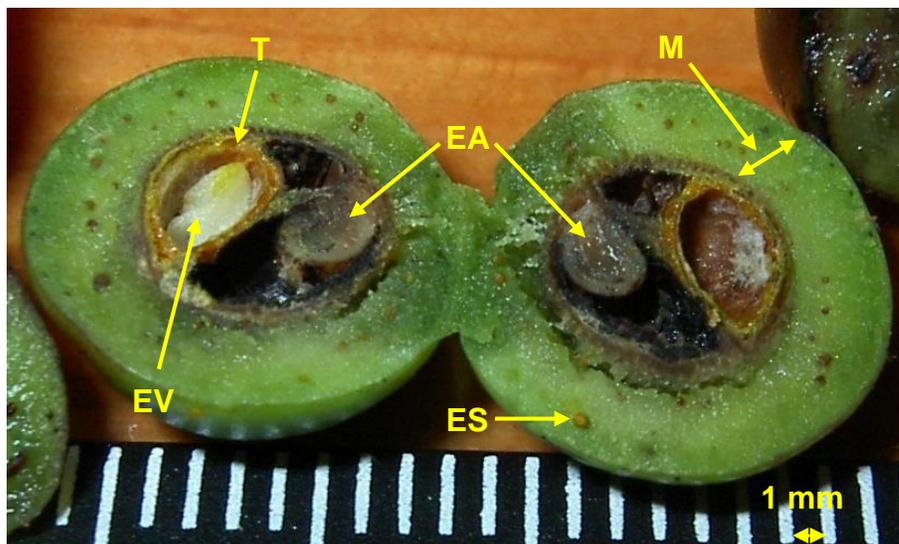
Luján *et al.*, (2007), reportaron que los endocarpios más pesados produjeron mayores porcentajes de germinación y consideraron a éste parámetro como un indicador de la concentración de PA1, dado que un mayor número de semillas por endocarpio estaría asociado con un mayor número de testas y mayor peso, lo que significaría mayores rendimientos de PA1, puesto que es en testas donde se han observado las más altas concentraciones de PA1.

En general, en esta investigación se observó que altos niveles de PA1 están correlacionados positivamente con mayor PFS y mayor PHS en *K. parvifolia*. La correlación significativa entre PA1 y PFS estaría influenciada por la presencia de estructuras secretorias también en el mesocarpio, (Figuras 14, 15, 16, 17), lo cual es importante porque el fruto completo como fuente de PA1 significaría un mayor índice de cosecha, comparado con endocarpios, y esto podría mejorarse a través de prácticas agronómicas para obtener mayores contenidos de embriones viables con su correspondiente cantidad de testas por endocarpio, además de la identificación y selección de plantas de alto rendimiento de PA1, como ocurrió en esta investigación en la que fueron identificadas las 4 plantas que produjeron las más altas concentraciones de PA1, sobre las cuales se esperarían otros estudios para caracterizarlas y confirmar que las concentraciones de PA1 son una cualidad genética individual de cada planta.

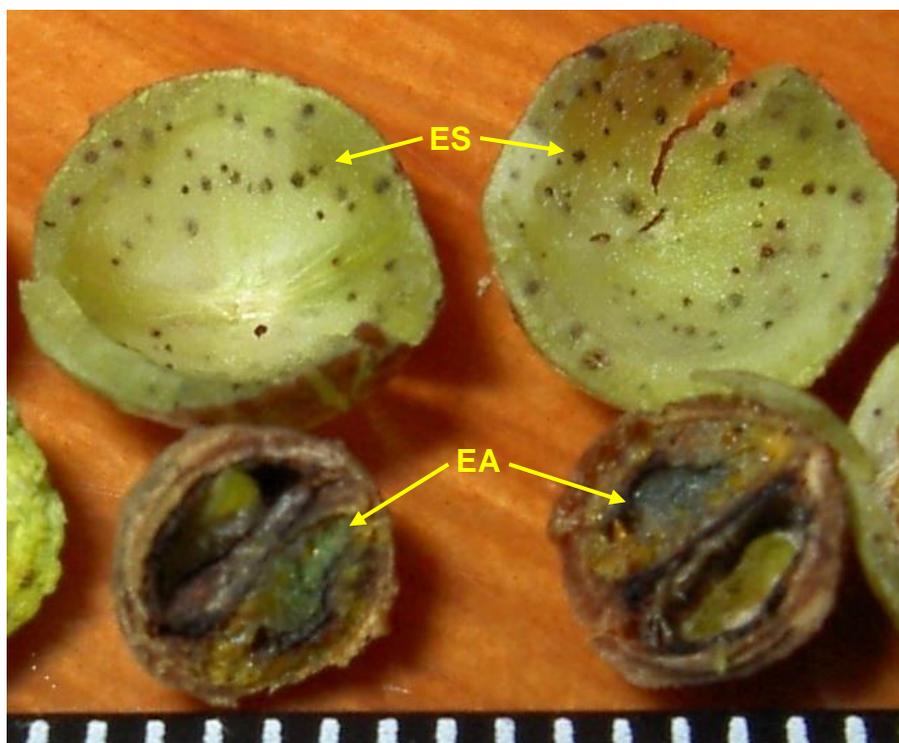


**Figura 14.** Semilla con testa (izquierda) y semilla desnuda (derecha) de *Karwinskia parvifolia*. En la figura se observan estructuras secretorias (ES) que le dan una apariencia rugosa a la testa de semilla; embrión viable (EV) de una semilla sin testa. La distancia entre líneas blancas es de un milímetro (mm).

En la Figura 14 se puede observar una semilla con su testa y otra semilla desnuda de *K. parvifolia*; la cara visible de la testa está recubierta de estructuras secretorias; mientras que en la semilla desnuda, sin testa, hay ausencia de estructuras secretorias. Hanáčková (1999) determinó las concentraciones de PA1 en testas+endocarpios; en exocarpios; y en embriones de *K. parvifolia* y reportó valores de 984, 34.96 y 16.28  $\mu\text{g}$  de PA1 por gramo de peso seco, respectivamente. Esos resultados estuvieron correlacionados con las observaciones anatómicas en las que no encontró cavidades secretorias en los embriones, pero sí en grandes cantidades en la testa.



**Figura 15.** En corte ecuatorial se observan estructuras secretorias (**ES**) en mesocarpio (**M**) de frutos verdes de *K. humboldtiana*; endocarpios con embriones abortados (**EA**) y solo un embrión viable (**EV**); y la testa (**T**) de una semilla. La distancia entre líneas blancas es de 1 mm.



**Figura 16.** Se observan estructuras secretorias (**ES**) en mesocarpio de frutos maduros de *K. parvifolia*; endocarpios con **ES** en café oscuro, con embriones abortados (**EA**), sin embriones viables. La distancia entre líneas es de 1 mm.



**Figura 17.** Estructuras secretorias (**ES**) en mesocarpio (**M**) de frutos maduros de *K. parvifolia*. La distancia entre líneas blancas es de 1 mm.

En la Figura 15, se observan estructuras secretorias (ES) de color amarillo-café en el mesocarpio de frutos verdes de *K. humboldtiana*. También se observan abundantes ES de color café oscuro en el mesocarpio de los frutos maduros de *K. parvifolia* (Figuras 16 y 17). En las Figuras 15 y 16 se observan embriones abortados y abundantes ES en el mesocarpio y en un agrandamiento de la figura se pueden observar ES de color amarillo-café oscuro en las paredes internas de la testa de la semilla y del endocarpio, lo cual sugiere que aun cuando los embriones abortasen, persistirían ES, aunque quizá en número disminuido, comparado esto con el número de ES que se generarían de tener endocarpios con cuatro embriones.

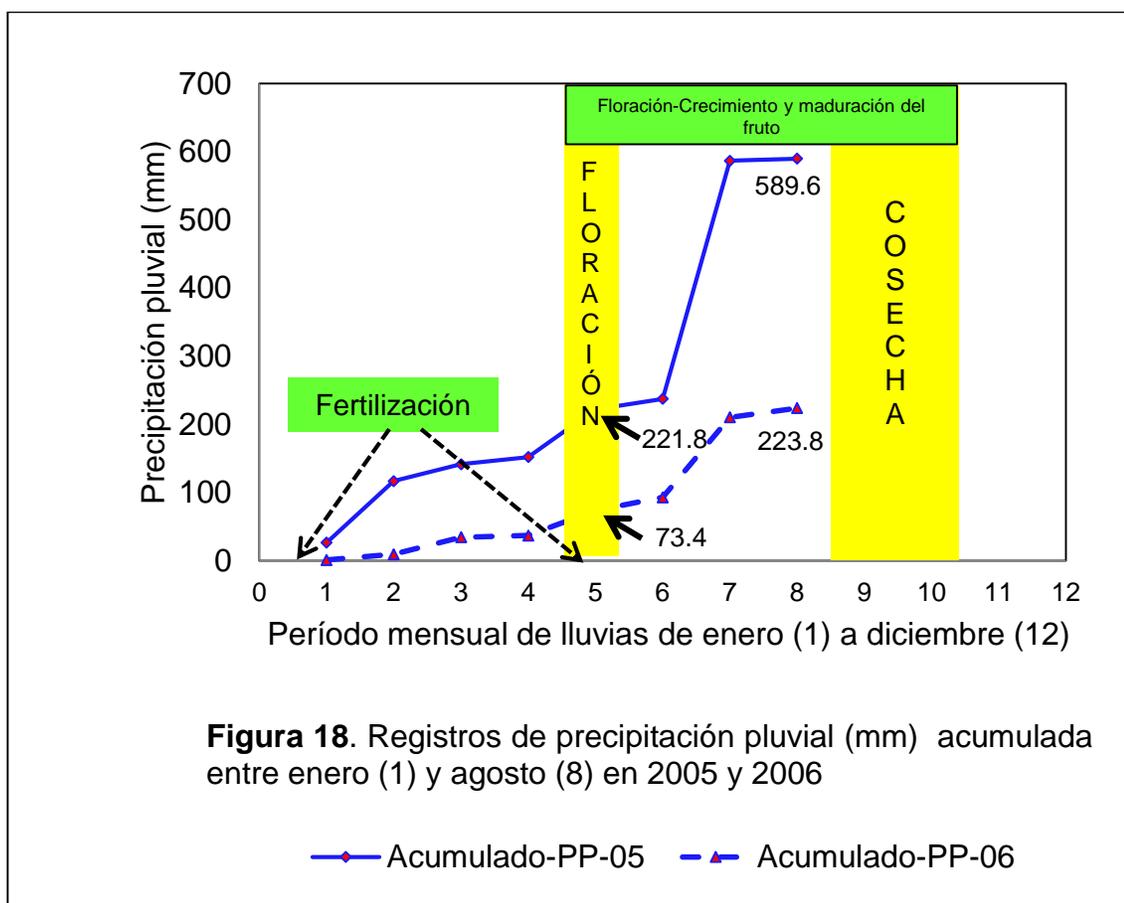
Considerando las diferencias observadas entre los dos años de la investigación y entre los dos grupos de plantas en cuanto a RFSP, CONCPA1, mgPA1, PFS y PHS; con resultados todos ellos superiores en la producción de 2005, comparada con la producción de 2006; y por otro lado, a mayores rendimientos observados en general, en el grupo de plantas con secuencia de tratamientos CN(2005)-SN(2006), comparado con el grupo de plantas con secuencia de tratamientos SN(2005)-CN(2006), se obtuvieron datos de precipitación pluvial y temperaturas (Cuadro A-V).

En relación con el ambiente, la precipitación pluvial (PP), así como la temperatura son factores que han mostrado influencia sobre las concentraciones de PA1, (Luján, 1999). En el Cuadro A-V se pueden observar las condiciones climatológicas que prevalecieron durante la investigación, particularmente las temperaturas y precipitación pluvial.

En cuanto a las temperaturas que se presentaron durante los años 2005 y 2006, en el Cuadro A-V no se aprecian diferencias importantes con respecto a las temperaturas promedio.

Considerando que la cosecha se realizó durante los meses de septiembre a octubre tanto en 2005 como en 2006, la PP si tendría un impacto relativamente mayor, ello si consideramos que para el mes de mayo, período en que la floración se generalizó en las plantas (14 de 16 plantas), la PP acumulada en 2005 fue de 221.8 mm; mientras que en ese mismo período pero de 2006, la PP fue de 73.4 mm. Para el mes de agosto, previo a la cosecha, la PP acumulada

en 2005 fue de 589.6 mm, mientras que para ese mismo mes, pero de 2006, la PP acumulada fue de 223.8 mm (Figura 18).



La precipitación pluvial acumulada de enero al mes de agosto de los años 2005 y 2006 resultó con una diferencia de casi el triple (589.6 y 223.8), siendo mayor en 2005, lo cual significa que tan solo por este hecho, un incremento en la transformación del nitrógeno molecular atmosférico en nitrógeno del suelo utilizable, esto debido a que el nitrógeno puede oxidarse y pasar a la forma de óxidos por acción de las descargas eléctricas y ser transportados por la lluvia y depositarlo en suelo en forma de ácido nitroso o nítrico (Navarro, 2003).

Otro aspecto relevante es que en la segunda quincena de mayo se aplicó la segunda dosis de sulfato de amonio, y considerando que la PP fue superior en el año 2005, tanto al inicio de la floración, como en la etapa de crecimiento y maduración de fruto (Figura 18); entonces los procesos de disociación del sulfato de amonio, nitrificación y absorción del suplemento nitrogenado se verían favorecidos en el año 2005, a causa de una mayor disponibilidad de humedad en el suelo.

En general, los resultados del grupo de plantas con nitrógeno (CN) fueron superiores en el año 2005 a los obtenidos del grupo de plantas sin nitrógeno (SN); mientras que en el año 2006, los resultados fueron al revés, el grupo CN produjo menores promedios que el grupo SN (Cuadro A-VI). Estos resultados coincidieron con una precipitación pluvial acumulada, de enero al mes de agosto, previo a la cosecha, de 589.6 y 223.8 mm, para los años 2005 y 2006, respectivamente.

Los resultados indican que las plantas mantienen la misma tendencia, en general, de producir ya sean valores altos o bajos en ambos años de estudio, aunque las concentraciones de PA1 resultaron más altas en las cosechas de 2005 que las de 2006, es decir, al componente genético de las plantas habría que agregar el efecto ambiental, que en este caso sería la precipitación pluvial, que fue más abundante en el período de floración, crecimiento y maduración del fruto durante 2005 que durante 2006 (Figura 18).

En esta investigación, en que se utilizaron plantas de *K. parvifolia*, se confirman los resultados de Luján (1999), quien observó que la síntesis de PA1, tanto en *K. humboldtiana* como en *K. parvifolia* (Choix) se ve incrementada con la aplicación de riego adicional a la precipitación pluvial y coincide con otra investigación de Luján *et al.*, (1995), quienes reportaron que la aplicación del riego influye positivamente sobre la síntesis de PA1.

Luján (1999) también observó que en frutos verdes de *K. humboldtiana* la aplicación del riego no mostró efecto sobre la concentración de PA1; mientras que en frutos verdes de *K. parvifolia* (Choix) la aplicación del riego sí influyó positivamente sobre la concentración de PA1, comparados con frutos de temporal.

Durante el año 2005, las 16 plantas seleccionadas se desarrollaron bajo condiciones de menor competencia por los recursos tales como nutrimentos, agua, luz, y esto propició un mayor crecimiento vegetativo para todas las plantas en general, pero particularmente para las plantas que recibieron fertilización nitrogenada durante 2005. En comparación con el año 2005, para el año 2006 las plantas reiniciaron su crecimiento a partir de una mayor estatura y área foliar, lo que generó una mayor demanda de nutrimentos y agua particularmente, comparado con las necesidades del 2005. No obstante esa mayor demanda de agua, se mantuvo la frecuencia de riegos cada tres semanas y para la etapa en que las plantas reiniciaron su crecimiento vegetativo y floración en 2006, las precipitaciones pluviales registradas durante 2006 fueron menores que las registradas en 2005.

## **CAPÍTULO 5**

### **CONCLUSIONES**

Hipótesis 1: Aunque no se observó evidencia estadística del efecto directo del nitrógeno sobre la concentración de dicha sustancia, si se observaron mejores rendimientos de fruto seco en las plantas que recibieron suplemento nitrogenado. También se observó que altos niveles de PA1 están correlacionados positivamente con mayor peso seco por fruto y mayor peso seco por endocarpio.

Hipótesis 2: Por otro lado, las plantas sí mostraron diferencia estadística significativa en sus concentraciones individuales de PA1.

En esta investigación se observó una diferencia significativa por efecto de año de cosecha.

En esta investigación se observó que las plantas mantuvieron la misma tendencia, en general, de producir ya sean valores altos o bajos en ambos años de estudio, aunque las concentraciones promedio de PA1, incluyendo las 16 plantas CN y SN, resultaron más altas en las cosechas de 2005 que en las de 2006. Esta alta concentración de PA1 durante 2005 coincidió con mayor

precipitación pluvial durante la etapa de floración, crecimiento y maduración del fruto en 2005, comparada con la que se presentó durante 2006 para esa misma etapa fenológica.

Cuando se comparó la planta con menor concentración de PA1 (planta 2 produjo 43.9  $\mu\text{g PA1}^*\text{g p s}$ ), contra la planta que mostró la mayor concentración de PA1 (planta 6 produjo 872.7  $\mu\text{g PA1}^*\text{g p s}$ ); entonces la diferencia resultó más contrastante y en consecuencia sería requerido un volumen de fruto seco 20 veces superior en la planta 2, al que se utilizaría si las extracciones fuesen a partir de frutos de la planta 6.

La industria farmacéutica podría considerar la incorporación de este tipo de estudios en sus investigaciones sobre productos naturales con potencial farmacológico.

## **PERSPECTIVAS**

1. Reproducir por semilla las plantas de alto rendimiento de PA1.
2. Estudiar la morfología de las plantas, particularmente las estructuras secretorias.
3. Evaluar niveles de humedad sobre la concentración de PA1.
4. Reproducir por injerto las plantas de alto rendimiento de PA1.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Arellano-Cervantes E, JF Mendoza-Cruz y FJ Domínguez-Chávez (1994). Intoxicación por *Karwinskia johnstonii*, Fernández: estudio de 12 pacientes. Bol Med Hosp Infant Mex. Volumen 51-Número 2, Febrero, 1994.
2. Baričević, D. & A. Zupančič (2002). The Impact of Drought Stress and/or Nitrogen Fertilization in Some Medicinal Plants. In. Breeding Research on Aromatic and Medicinal Plants. Editors: Christopher B. Johnson and Chlodwig Franz. THE HAWORTH HERBAL PRESS, INC., New York, USA. pp 53-64.
3. Bidwell RGS, (1993). Fisiología Vegetal. Primera edición en español. Ed. A. G. T. Editor, S. A., México, D. F. pp. 277-281.
4. Billings, WD, 1977. Las plantas y el ecosistema. 3a. Edición en español, trad. de la 4a. Edición en inglés por el Dr. Javier Valdés Gutiérrez. EDITORIAL HERRERO HERMANOS SUCESORES, S. A., México, D. F. 169 p.
5. Calderón, AE. 1989. Fruticultura general. Ed. LIMUSA, México, D. F. p. 283-360.
6. CPHA (California Plant Health Association) (2004). Manual de Fertilizantes para Cultivos de Alto Rendimiento. Tr. Manuel Guzmán Ortiz. Ed. LIMUSA, S. A. DE C. V., GRUPO NORIEGA EDITORES; México, D. F. 366p.
7. Dreyer, D., I. Arai, C. D. Bachman, W.R. Anderson, R. G. Smith, G. D. Daves (1975). Toxins Causing Noninflammatory Paralytic Neuronopathy. Isolation and Structure Elucidation. Journal of the American Chemical Society 97: 4985-4990.
8. Epstein E and AJ Bloom (2005). Mineral Nutrition of Plants. Principles and perspectives. 2ª ed. SINAUER ASSOCIATES, INC-PUBLISHERS, Massachusetts, U.S.A. 400p
9. Finck A (1988). Fertilizantes y Fertilización. Fundamentos y Métodos para la Fertilización de los Cultivos. Tr. Valentín H Fernández. Ed. REVERTÉ, S.A.; Barcelona, España. 439p.
10. Garza-Ocañas, L., G. C. Hsieh, D. Acosta, O. Torres-Alanís, A. Piñeyro-López (1992). Toxicity assessment of toxins T-514 and T-544 of Buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*) in primary skin and liver cell cultures. Toxicology 73: 259-267.

11. Gómez-Silva, M., L. Garza-Ocañas, N. Waksman, V. Rivas, A. Piñeyro-López (2005). In vitro metabolism and toxicity assessment of toxin T-514 (Peroxisomicine A1) of *Karwinskia humboldtiana* in microsomes and primary cultured hepatocytes. *Toxicology in Vitro* 19: 47-53.
12. Guerrero G. A. (2000). El Suelo, los Abonos y la Fertilización de los Cultivos. Ed. Mundi-Prensa. Barcelona, España. 206p.
13. Guerrero, M., A. Piñeyro, N. Waksman (1987). Extraction and quantification of toxins from *Karwinskia humboldtiana* (tullidora). *Toxicon* 25: 565-568.
14. Hanácková, Z. (1999). Ontogénesis de las estructuras internas y algunas características anatómicas y embriológicas de *Karwinskia parvifolia* (Rhamnaceae). Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Comeniana, Bratislava, Eslovaquia. 65 p.
15. Hanácková, Z., N. Waksman, M. Mikuš, A. Lux, D. Lišková, E. Masarovicová (1997). Structure, physiology and toxin content in leaves of *Karwinskia humboldtiana* in vivo and in vitro. *Acta F. R. N. Univ. Comen., Physiol. Plantarum* XXIX: 95-100.
16. Jones, B. & M. G. Kenward (1989). Design and Analysis of Cross-Over Trials. Ed. Chapman-Hall, London, England. 340 p.
17. Klages, KHW, 1942. Ecological crop geography. ED. THE MACMILLAN COMPANY. New York, U.S.A. p. 73-161; 472-601.
18. Kumate J (1993). La medicina herbolaria contemporánea. In: La investigación científica de la herbolaria medicinal mexicana (p. 11-15). Editores: Secretaría de Salud. México, D. F.
19. Liskova D, A. Lux, A. Piñeyro-López, and R. Luján-Rangel 1999. XIII "Karwinskia Species (Buckthorn): In Vitro Culture, Micropropagation, and the Production of Toxin Anthracenone". In: Y.P.S. Bajaj, Biotechnology in Agriculture and Forestry, Medicinal and Aromatic Plants XI, Alemania, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Vol. 43, 223-242.
20. Loomis, RS and DJ Connor (2002). Ecología de Cultivos. Productividad y Manejo en Sistemas Agrarios. ED. EDICIONES MUNDI-PRENSA. Impreso en España. pp. 591.
21. Luján Rangel R., R. González y A. Piñeyro, (1991). Propagación del género *Karwinskia*. Memorias del IX Encuentro Regional de Investigación Biomédica, Facultad de Medicina, U. A. N. L., Monterrey, N. L., México. p. 6.
22. Luján Rangel R., R. González y A. Piñeyro, (1992a). Propagación del género *Karwinskia*. Memorias del X Encuentro Regional de Investigación Biomédica. Facultad de Medicina de la U. A. N. L. Monterrey, N. L. p. 181-182.

23. Luján Rangel R., R. González y A. Piñeyro, (1992b). Propagación del género *Karwinskia*. Memorias del XV Congreso Nacional de Farmacología, San Miguel de Allende, Guanajuato, México.
24. Luján RR, R González y A Piñeyro, 1992c. Inventario forestal de *Karwinskia parvifolia*. Su producción en el norte de Sinaloa y sur de Sonora. Memorias de X Encuentro Regional de Investigación Biomédica. Facultad de Medicina de la U. A. N. L., Monterrey, N. L. p. 181.
25. Luján Rangel R., R. González y A. Piñeyro, (1993a). *Karwinskia humboldtiana* y su fructificación. Memorias del XI Encuentro Regional de Investigación Biomédica. Facultad de Medicina de la U. A. N. L., Monterrey, N. L. p. 96.
26. Luján Rangel R., R. González y A. Piñeyro, (1993b). Enfermedades del género *Karwinskia*. Memorias del XI Encuentro Regional de Investigación Biomédica. Facultad de Medicina de la U. A. N. L. Monterrey, N. L. p. 112.
27. Luján Rangel R., R. González y A. Piñeyro, (1993c). Efecto del frío sobre *Karwinskia parvifolia*. Memorias del XI Encuentro Regional de Investigación Biomédica. Facultad de Medicina de la U. A. N. L. Monterrey, N. L., México. p. 97.
28. Luján, Rangel R., N. Waksman, R. J. González y A. Piñeyro, (1993d). La humedad y su importancia en la producción de la T-514. Memorias del XI Encuentro Regional de Investigación Biomédica. Facultad de Medicina de la U. A. N. L. Monterrey, N. L. p. 111.
29. Luján, Rangel R., R.J. González y A. Piñeyro, (1994a). Métodos de cosecha en *Karwinskia humboldtiana*. Memorias del XII Encuentro Regional de Investigación Biomédica. Facultad de Medicina de la U. A. N. L. Monterrey, N. L., México. p. 21.
30. Luján, Rangel R., R.J. González, N. Waksman, R. Durón y A. Piñeyro, (1994b). Planeación, organización y ejecución de la cosecha de 3 toneladas de fruto seco de *Karwinskia parvifolia*. Memorias del XII Encuentro Regional de Investigación Biomédica. Facultad de Medicina de la U. A. N. L. Monterrey, N. L., México. p. 22.
31. Luján, Rangel R., R. J. González, N. Waksman y A. Piñeyro, (1994c). Beneficio del fruto de *Karwinskia parvifolia*. Memorias del XII Encuentro Regional de Investigación Biomédica. Facultad de Medicina de la U. A. N. L. Monterrey, N. L., México. p. 23.
32. Luján, R. R., N. Waksman, M. L. Salazar y A. Piñeyro L. (1995). Producción de antracenas en varias especies de *Karwinskia* bajo diferentes condiciones de cultivo. Memorias del XIII Congreso Nacional de Investigación Biomédica. Facultad de Medicina de la U. A. N. L., Monterrey, N. L., México. p. 20.

33. Luján, R. R., (1999). Efecto del período de cosecha, tamaño del fruto, riego y especie sobre el contenido de Peroxisomicina A1 (T-514) en plantas del género *Karwinskia*. Tesis de Maestría. Facultad de Agronomía, U. A. N. L., Marín, N. L., México. 115 p.
34. Luján-Rangel, R., E. Olivares-Sáenz, R. E. Vázquez-Alvarado, L. Garza-Ocañas, O. Torres-Alanís (2005). Efecto del nitrógeno sobre la producción de T-514 en plantas del género *Karwinskia*. Memorias del XXIII Ciclo de Seminarios. División de Estudios de Posgrado, Facultad de Agronomía-UANL., Marín, N. L., México.
35. Luján-Rangel, R., E. Olivares-Sáenz, R. E. Vázquez-Alvarado, L. Garza-Ocañas, O. Torres-Alanís (2006). Producción fitoquímica y aplicación de nitrógeno en *Karwinskia*. Memorias del XXIV Ciclo de Seminarios. División de Estudios de Posgrado, Facultad de Agronomía de la U. A. N. L., Marín, N. L., México.
36. Luján-Rangel, R., E. Olivares-Sáenz, R. E. Vázquez-Alvarado, L. Garza-Ocañas, O. Torres-Alanís (2007a). Síntesis de peroxisomicina A1 (PA1) en frutos de *Karwinskia parvifolia*: efecto del nitrógeno y de la variabilidad entre plantas cultivadas en vivero. Memorias del XXVI Ciclo de Seminarios. División de Estudios de Posgrado, Facultad de Agronomía de la U. A. N. L., Marín, N. L., México.
37. Luján-Rangel, R., E. Olivares-Sáenz, R. E. Vázquez-Alvarado, L. Garza-Ocañas, O. Torres-Alanís (2007b). Germinación como parámetro de selección en *Karwinskia* por su potencial de productividad en peroxisomicina A1. *Phyton* 76: 61-77.
38. Martínez, M, 1933. Las Plantas Medicinales de México. Ed. BOTAS, México, D.F. p 464-466.
39. Masarovičová, E., R. Welschen, A. Lux, H. Lambers, K. Argalášová, E. Brandšteterová and A. Caniova (2000). Photosynthesis, biomass partitioning and peroxisomicine A1 production of *Karwinskia* species in response to nitrogen supply. *Physiologia Plantarum* 108: 300-306.
40. Mengel K., E. A. Kirkby, H. Kosegarten, T. Appel (2001). Principles of Plant Nutrition. 5<sup>a</sup> ed. KLUWER ACADEMIS PUBLISHERS. Printed in the Netherlands. 849 p.
41. Natham, P. J. (1987). Contribución química al estudio multidisciplinario de la tullidora (*Karwinskia humboldtiana*). *Revista de la Academia de Artes y Ciencias de Puerto Rico*. 2:19-23.
42. Navarro G, (2003). Química agrícola. El suelo y los elementos químicos esenciales para la vida vegetal. 2da. Ed. Ediciones MUNDI PRENSA, Madrid, España. 487p.

43. Olivares SE (1995). Diseños Experimentales con Aplicación a la Experimentación Agrícola y Pecuaria, Apuntes de Diseños Experimentales. Sub'Dirección de Estudios de Posgrado. Facultad de Agronomía, U. A. N. L., Marín, N. L.
44. Piñeyro-López, A., L. Martínez de Villarreal and R. González-Alanís (1994). In vitro selective toxicity of toxin T-514 from *Karwinskia humboldtiana* (buckthorn) plant on various human tumor cell lines. *Toxicology* 92: 217-227.
45. Piñeyro-López, A. & N. Waksman (2000). Chemistry, Structure and Biological Activity of Anthracenones of the *Karwinskia* Genus. In: Atta-ur-Rahman (ed), *Natural Products Chemistry*. Elsevier Science B. V. 22: 555-606
46. Ramírez-Durón, R., A. García-Luna, L. Garza-Ocañas, A. Piñeyro-López and N. Waksman de Torres (2002). *Pharmaceutical Biology* 40 (6): 440-447.
47. Rivas GV (2001). Estudio estereoquímico por RMN de las peroxisomicinas, isoperoxisomicinas y tullidinoles aislados de plantas del género *Karwinskia*. Tesis doctoral. Facultad de Medicina, U. A. N L.
48. Rivas, V. & N. Waksman (2001). *Natural Product Letters* 15 (4): 243-251.
49. Rivas, V., G. Cuevas, L. Garza and N. Waksman (2005). *Arkivoc* 12: 224-233.
50. Salazar, M. L., A. Piñeyro and N. Waksman (1996). A reverse phase HPLC method for Quantification of peroxisomicine and other anthracenonic compounds. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 19(9): 1391-1403.
51. Salazar, R., V. Rivas, G. González, and N. Waksman (2006). *Fitoterapia*, 77: 398-400.
52. Sary F (1993). *Plantas venenosas*. Versión española de Felipe Ruiz Ayuso. Ed. Susaeta Ediciones, S. A., Eslovaquia.
53. Vines, R. A., 1984. *Trees of Central Texas*. Ed. University of Texas Press, Austin, Texas, U. S. A., pp. 281-283.
54. Vonesh, EF and VM Chinchilli, (1997). *Linear and Nonlinear Models for the Analysis of Repeated Measurements*. ED. MARCEL DEKKER, INC. New York, N.Y., U.S.A., pp. 119-202.
55. Waksman M. N., A. Santoyo, R. Ramírez, A. Piñeyro-López, R. Fernández N. (1997). Cuantificación de T 514 (Peroxisomicina A1) en dos plantas del género *Karwinskia*. *POLIBOTÁNICA* 5:13-19.
56. Waksman N, ML Salazar, L. Cisneros, V García, R Luján, A Piñeyro, 1993. Estudio químico de hojas, raíz y tallo de *K. parvifolia* y *K. humboldtiana*. *Memorias del XI Encuentro Regional de Investigación Biomédica*. Facultad de Medicina de la U. A. N. L. Monterrey, N. L. p. 204.

**APÉNDICE.-**

Cuadro A-I. Resultados promedio ( $n = 2$ ) y desviación estándar del rendimiento de fruto fresco por planta (RFFP); rendimiento de fruto seco por planta (RFSP); concentración en  $\mu\text{g}$  de PA1 por gramo de peso seco ( $\mu\text{g PA1/g p.s.}$ ); contenido de PA1 por planta (mg); peso en g de 100 frutos secos (PFS); peso en g de 100 endocarpios secos (PHS). Los datos se tomaron de la cosecha de 16 plantas de *Karwinskia parvifolia* durante dos años consecutivos.

Planta	RFFP (g)	RFSP (g)	$\mu\text{g PA1 / g}$ p.s.	Contenido de PA1 por planta (mg)	PFS (g)	PHS (g)
1	1507.45 (675.22)	524.50 (172.39)	69.29 (17.53)	37.85 (21.14)	6.54 (0.25)	2.67 (0.35)
2	2218.85 (2608.73)	824.30 (974.25)	58.26 (20.35)	57.94 (73.53)	6.43 (2.53)	3.17 (0.04)
3	873.25 (845.49)	393.20 (440.10)	573.45 (205.90)	270.79 (333.34)	9.92 (2.00)	4.00 (0.73)
4	5003.90 (1057.55)	1532.40 (515.34)	529.53 (7.74)	809.46 (261.03)	15.48 (2.67)	5.08 (1.13)
5	2565.10 (984.43)	1074.70 (606.13)	125.43 (28.53)	126.15 (45.36)	8.35 (1.01)	3.62 (0.34)
6	1372.05 (820.60)	480.25 (354.76)	612.06 (368.60)	359.32 (394.15)	14.70 (7.02)	4.67 (1.49)
7	286.50 (50.63)	92.00 (25.46)	109.15 (39.29)	10.54 (6.39)	4.46 (1.50)	2.24 (0.35)
8	618.72 (370.35)	210.45 (93.83)	206.54 (44.89)	41.36 (9.93)	6.78 (1.13)	3.47 (0.09)
Continua...						

Cuadro A-I. Continua...						
Planta	RFFP (g)	RFSP (g)	$\mu\text{g PA1 / g}$ p.s.	Contenido de PA1 por planta (mg)	PFS (g)	PHS (g)
9	930.40 (855.74)	370.50 (394.42)	390.84 (23.29)	140.21 (145.53)	9.01 (4.57)	3.73 (0.63)
10	1198.55 (562.08)	514.85 (349.10)	678.38 (222.05)	388.02 (351.14)	9.22 (4.23)	3.76 (0.76)
11	267.10 (213.69)	91.15 (62.72)	480.90 (87.43)	41.09 (22.19)	5.80 (1.06)	3.23 (0.34)
12	820.45 (250.95)	375.45 (106.14)	245.62 (89.64)	87.46 (7.59)	7.72 (1.86)	2.87 (0.29)
13	6555.90 (1863.51)	2546.75 (968.38)	161.08 (42.15)	430.63 (263.33)	8.52 (1.34)	3.53 (0.72)
14	5477.25 (842.80)	1861.25 (741.83)	381.37 (20.61)	702.17 (244.54)	9.61 (0.62)	4.12 (0.03)
15	1293.70 (1368.53)	522.35 (561.51)	306.13 (23.52)	166.51 (184.18)	9.50 (2.35)	4.43 (1.34)
16	1251.70 (561.87)	444.40 (364.73)	186.85 (49.67)	92.09 (90.22)	11.22 (1.15)	5.24 (0.19)
Totales	64481.74	23717.00		7523.19		
Promedio (DE)	2015.05 (2054.53)	741.16 (768.91)	319.68 (221.27)	235.10 (280.50)	8.95 (3.53)	3.74 (0.96)

Cuadro A-II. Análisis de varianza para rendimiento de fruto seco por planta (RFSP); concentración de PA1 por gramo de peso seco (CONCPA1); contenido de PA1 por planta (mgPA1); peso de 100 frutos secos (PFS) y peso de 100 endocarpios secos (PHS).						
Variable	F. de V.	SC	GL	CM	Fcalc	$p$
RFSP	Secuencia	611230.96	1	611230.96	2.91	0.1100
	Planta(Sec)	13546646.06	14	967617.58	4.61	0.0036
	Año	956690.28	1	956690.28	4.56	0.0509
	Tratamiento	274355.28	1	274355.28	1.31	0.2721
	Error	2938837.56	14	209916.97		
Variable	F. de V.	SC	GL	CM	Fcalc	$p$
CONCPA1	Secuencia	4950.13	1	4950.13	0.38	0.5498
	Planta(Sec)	1258617.24	14	89901.23	6.82	0.0005
	Año	69583.15	1	69583.15	5.28	0.0375
	Tratamiento	15.96	1	15.96	0.00	0.9727
	Error	184539.06	14	13181.36		
F. de V. = Fuentes de variación; SC = Suma de cuadrados; GL = Grados de libertad; CM = Cuadrados medios; Fcalc = F calculada; $p$ = probabilidad						
Continua...						

Cuadro A-II. Continua...						
Variable	F. de V.	SC	GL	CM	Fcalc	$p$
mgPA1	Secuencia	21187.11	1	21187.11	0.84	0.3755
	Planta(Sec)	1759004.66	14	125643.19	4.97	0.0025
	Año	302447.53	1	302447.53	11.96	0.0038
	Tratamiento	2363.28	1	2363.28	0.09	0.7643
	Error	354020.66	14	25287.19		
Variable	F. de V.	SC	GL	CM	Fcalc	$p$
PFS	Secuencia	51.41	1	51.41	7.63	0.0153
	Planta(Sec)	211.89	14	15.13	2.25	0.0711
	Año	22.88	1	22.88	3.40	0.0866
	Tratamiento	6.77	1	6.77	1.00	0.3331
	Error	94.34	14	6.74		
Variable	F. de V.	SC	GL	CM	Fcalc	$p$
PHS	Secuencia	2.65	1	2.65	6.49	0.0232
	Planta(Sec)	18.28	14	1.31	3.20	0.0186
	Año	2.14	1	2.14	5.26	0.0379
	Tratamiento	0.07	1	0.07	0.16	0.6921
	Error	5.71	14	0.41		
F. de V. = Fuentes de variación; SC = Suma de cuadrados; GL = Grados de libertad; CM = Cuadrados medios; Fcalc = F calculada; $p$ = probabilidad						

Cuadro A-III. Prueba estadística para evaluar el efecto residual.				
Variables	CM de Secuencia	CM de Planta(Sec)	F. calc.	$p$
RFSP	611230.96	967617.58	0.63	0.4400
CONCPA1	4950.13	89901.23	0.06	0.8179
mgPA1	21187.11	125643.19	0.17	0.6875
PFS	51.41	15.13	3.40	0.0866
PHS	2.65	1.31	2.03	0.1765
CM = Cuadrados medios; (Sec) = secuencia; F. calc. = F calculada; $p$ = probabilidad				

Cuadro A-IV. Resultados sobre el análisis de correlación de Pearson ( $r$ ) entre las variables RFSP; PFS; PHS; CONCPA1; mgPA1. El tamaño de muestra fue de 32 para cada variable.

Variables		(RFFP) Rendimiento de fruto fresco por planta	(RFSP) Rendimiento de fruto seco por planta	(PFS) Peso seco de 100 frutos	(PHS) Peso seco de 100 endocarpios	(CONCPA1) $\mu\text{g}$ de PA1 por gramo de peso seco
(RFSP) Rendimiento de fruto seco por planta	$r$	0.956(**)				
	$p$	<b>&lt;0.0001</b>				
(PFS) Peso seco de 100 frutos	$r$	0.390(*)	0.393(*)			
	$p$	<b>0.0273</b>	<b>0.0262</b>			
(PHS) Peso seco de 100 endocarpios	$r$	0.3045	0.3233	0.868(**)		
	$p$	0.0901	0.0711	<b>&lt;0.0001</b>		
(CONCPA1) $\mu\text{g}$ de PA1 por gramo de peso seco	$r$	0.0036	-0.0111	0.591(**)	0.503(**)	
	$p$	0.9843	0.9520	<b>0.0004</b>	<b>0.0033</b>	
(mgPA1) Contenido estimado (mg) de PA1 por planta	$r$	0.713(**)	0.719(**)	0.741(**)	0.636(**)	0.569(**)
	$p$	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0007</b>

Cuadro A-V. Temperatura promedio y precipitación pluvial durante los años 2005 y 2006.

Período mensual	Temperatura mensual promedio (°C)		Precipitación pluvial (mm)	
	2005	2006	2005	2006
Ene	16.5	17.8	26.4	1.0
Feb	15.3	16.9	90.2	8.4
Mar	20.7	21.9	24.6	24.9
Abr	23.5	26.0	10.7	2.5
May	24.8	26.7	69.9	36.6
Jun	28.5	28.1	15.5	19.6
Jul	28.0	27.8	349.3	117.3
Ago	27.9	28.5	3.0	13.5
Sep	27.5	25.7	59.4*	369.6*
Oct	21.9	23.1	198.1*	55.5*
Nov	19.4	19.0	7.1	35.0
Dic	15.5	14.2	15.5	86.2
Total			869.8	770.0
* Períodos mensuales en que se realizó la cosecha.				

Cuadro A-VI. Resultados promedio  $\pm$  (DE) por tratamiento; por año; para las variables: RFFP; RFSP; CONCPA1; mgPA1; PFS y PHS. En todas las variables se utilizó un tamaño de muestra de 8 plantas.

Variable	2005			2006		
	SN	CN	CN/SN	SN	CN	CN/SN
RFFP (DE)	1655,53 (1931,00)	2690,94 (2456,58)	1.63	2088,61 (2149,74)	1625,14 (1859,80)	0.78
RFSP (DE)	683,26 (762,85)	1144,86 (1026,45)	1.68	613,86 (610,56)	522,64 (588,86)	0.85
CONCPA1 (DE)	378,05 (299,68)	354,59 (244,86)	0.94	259,91 (151,36)	286,20 (183,01)	1.10
mgPA1 (DE)	297,99 (339,39)	366,64 (341,92)	1.23	155,01 (201,65)	120,74 (170,60)	0.78
PFS (DE)	8,07 (3,50)	11,53 (4,91)	1.43	8,92 (2,39)	7,30 (1,30)	0.82
PHS (DE)	3,67 (1,09)	4,33 (1,20)	1.18	3,72 (0,70)	3,24 (0,56)	0.87

RFSP = rendimiento de fruto seco por planta; CONCPA1 = concentración de PA1 en  $\mu\text{g}$  por gramo de peso seco; mgPA1 = contenido de PA1 en mg por planta; PFS = peso de 100 frutos secos; PHS = peso de 100 endocarpios secos; SN = sin nitrógeno; CN = con nitrógeno; DE = desviación estándar.

Anexo

<b>UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN FACULTAD DE AGRONOMÍA</b>		
<b>LABORATORIO DE SUELOS PLANTAS Y AGUAS</b>		
MUESTRA No. 110106		
MUESTRA PROCEDENTE DE: Farmacología y Toxicología, Facultad de Medicina de la U. A. N. L.		
REMITIDA POR: Rubén Luján Rangel		
ESPECIFICACIONES: Muestra No. 1		
<b>DETERMINACIÓN</b>	<b>ANÁLISIS</b>	<b>CLASIFICACIÓN AGRONÓMICA</b>
REACCIÓN (Reacción Suelo-Agua 1:2)	pH 7.9	Moderadamente alcalino
NITRÓGENO TOTAL	0.09 %	Pobre
FÓSFORO EXTRAÍBLE (Método Olsen Modificado)	5.39 ppm	Nivel crítico
POTASIO EXTRAÍBLE (Método Olsen Modificado)	0.93 meq/100 g	Óptimo
COBRE EXTRAÍBLE (Método Olsen Modificado)	3.26 ppm	Óptimo
FIERRO EXTRAÍBLE (Método Olsen Modificado)	4.31 ppm	Nivel crítico
MANGANESO EXTRAÍBLE (Método Olsen Modificado)	0.38 ppm	Deficiente
ZINC EXTRAÍBLE (Método Olsen Modificado)	4.56 ppm	Óptimo
SALES SOLUBLES TOTALES (Método Extracto de Saturación)	Conductividad Eléctrica 0.34 mS/cm a 25°C	No salino
Marín, N. L., a 20 de Enero del 2006		

<b>UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN FACULTAD DE AGRONOMÍA</b>		
<b>LABORATORIO DE SUELOS PLANTAS Y AGUAS</b>		
MUESTRA No. 120106		
MUESTRA PROCEDENTE DE: Farmacología y Toxicología, Facultad de Medicina de la U. A. N. L.		
REMITIDA POR: Rubén Luján Rangel		
ESPECIFICACIONES: Muestra No. 2		
<b>DETERMINACIÓN</b>	<b>ANÁLISIS</b>	<b>CLASIFICACIÓN AGRONÓMICA</b>
REACCIÓN (Reacción Suelo-Agua 1:2)	pH 8.0	Moderadamente alcalino
NITRÓGENO TOTAL	0.12 %	Medianamente pobre
FÓSFORO EXTRAÍBLE (Método Olsen Modificado)	7.65 ppm	Nivel crítico
POTASIO EXTRAÍBLE (Método Olsen Modificado)	0.54 meq/100 g	Óptimo
COBRE EXTRAÍBLE (Método Olsen Modificado)	4.40 ppm	Óptimo
FIERRO EXTRAÍBLE (Método Olsen Modificado)	5.55 ppm	Nivel crítico
MANGANESO EXTRAÍBLE (Método Olsen Modificado)	0.45 ppm	Deficiente
ZINC EXTRAÍBLE (Método Olsen Modificado)	6.11 ppm	Óptimo
SALES SOLUBLES TOTALES (Método Extracto de Saturación)	Conductividad Eléctrica 0.34 mS/cm a 25°C	No salino
Marín, N. L., a 20 de Enero del 2006		

<b>UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEON FACULTAD DE AGRONOMÍA</b>		
<b>LABORATORIO DE SUELOS PLANTAS Y AGUAS</b>		
MUESTRA No. 130106		
MUESTRA PROCEDENTE DE: Farmacología y Toxicología, Facultad de Medicina de la U. A. N. L.		
REMITIDA POR: Rubén Luján Rangel		
ESPECIFICACIONES: Muestra No. 3		
<b>DETERMINACIÓN</b>	<b>ANÁLISIS</b>	<b>CLASIFICACIÓN AGRONÓMICA</b>
REACCIÓN (Reacción Suelo-Agua 1:2)	pH 7.9	Moderadamente alcalino
NITRÓGENO TOTAL	0.16 %	Medianamente pobre
FÓSFORO EXTRAÍBLE (Método Olsen Modificado)	29.43 ppm	Óptimo
POTASIO EXTRAÍBLE (Método Olsen Modificado)	0.59 meq/100 g	Óptimo
COBRE EXTRAÍBLE (Método Olsen Modificado)	3.61 ppm	Óptimo
FIERRO EXTRAÍBLE (Método Olsen Modificado)	11.85 ppm	Nivel crítico
MANGANESO EXTRAÍBLE (Método Olsen Modificado)	0.98 ppm	Deficiente
ZINC EXTRAÍBLE (Método Olsen Modificado)	5.18 ppm	Óptimo
SALES SOLUBLES TOTALES (Método Extracto de Saturación)	Conductividad Eléctrica 0.48 mS/cm a 25°C	No salino
Marín, N. L., a 20 de Enero del 2006		

<b>UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN FACULTAD DE AGRONOMÍA</b>		
<b>LABORATORIO DE SUELOS PLANTAS Y AGUAS</b>		
MUESTRA No. 140106		
MUESTRA PROCEDENTE DE: Farmacología y Toxicología, Facultad de Medicina de la U. A. N. L.		
REMITIDA POR: Rubén Luján Rangel		
ESPECIFICACIONES: Muestra No. 4		
<b>DETERMINACIÓN</b>	<b>ANÁLISIS</b>	<b>CLASIFICACIÓN AGRONÓMICA</b>
REACCIÓN (Reacción Suelo-Agua 1:2)	pH 7.8	Ligeramente alcalino
NITRÓGENO TOTAL	0.18 %	Mediano
FÓSFORO EXTRAÍBLE (Método Olsen Modificado)	37.85 ppm	Óptimo
POTASIO EXTRAÍBLE (Método Olsen Modificado)	0.70 meq/100 g	Óptimo
COBRE EXTRAÍBLE (Método Olsen Modificado)	2.34 ppm	Óptimo
FIERRO EXTRAÍBLE (Método Olsen Modificado)	5.46 ppm	Nivel crítico
MANGANESO EXTRAÍBLE (Método Olsen Modificado)	0.31 ppm	Deficiente
ZINC EXTRAÍBLE (Método Olsen Modificado)	6.42 ppm	Óptimo
SALES SOLUBLES TOTALES (Método Extracto de Saturación)	Conductividad Eléctrica 0.42 mS/cm a 25°C	No salino
Marín, N. L., a 20 de Enero del 2006		

## RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

### RUBÉN LUJÁN RANGEL

El autor nació el 28 de diciembre de 1954 en el Municipio de Francisco I. Madero, Coah.; hijo de Víctor Luján Ramírez y Ofelia Rangel Rivera.

Escolaridad:

Título de Ingeniero Agrónomo Fitotecnista, egresado de la Facultad de Agronomía de la U. A. N. L. en el año de 1989.

Grado de Maestro en Ciencias, egresado de la Facultad de Agronomía de la U. A. N. L. en el año de 1999.

### EXPERIENCIA LABORAL:

1984-1986 Promotor Agrario en la Secretaría de la Reforma Agraria, Cadereyta Jiménez, Nuevo León.

1986-1987 Jefe de la Promotoría # 10 de la Secretaría de la Reforma Agraria, San Rafael, Galeana, Nuevo León.

1987-1989 Jefe de la Promotoría # 8 de la Secretaría de la Reforma Agraria, Dr. Arroyo, Nuevo León.

1989-1992 Jefe del Departamento de Intendencia de la Facultad de Medicina de la U. A. N. L.

1989-1998 Jefe del Departamento de Lavandería del Hospital Universitario de la Facultad de Medicina de la U. A. N. L.

1990-1998 Jefe del Departamento de Costura del Hospital Universitario de la Facultad de Medicina de la U. A. N. L.

1991-a fecha Investigador Responsable del vivero de especies vegetales con potencial farmacológico del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la U. A. N. L.

1998-a fecha Investigador Responsable del Área de Análisis Farmacocinético y Estadístico del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la U. A. N. L.

1998-a fecha Maestro del curso práctico de la materia: *Farmacología y Toxicología*, en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la U. A. N. L.

**SUPERACION ACADEMICA:**

PERIODO	CURSO/TALLER
Jul/1998	“Filosofía de la Calidad Siguiendo la Ruta Deming”. Facultad de Medicina, U. A. N. L., Monterrey, N. L.
Sep/1998	“Control de Calidad: Métodos Analíticos”, Facultad de Medicina, U. A. N. L., Monterrey, N. L.
Abr/1999	Medicamentos Genéricos: Desarrollo y Evaluación Auditorio: CANIFAR, México, D. F.
Jul/1999	Seminario de Inducción para la Formación de Terceros Autorizados en Estudios de Bioequivalencia, Facultad de Medicina, U. A. N. L., Monterrey, N. L.
Nov/1999	Consideraciones Prácticas de los Procesos de Evaluación de los Medicamentos Genéricos Intercambiables. AMEFAR, México, D. F.
Sep/2000	“Manejo de Contingencias de Unidades Clínicas. Estudios de Bioequivalencia”. Facultad de Medicina, U. A. N. L., Monterrey, N.L.
Oct/2000	“Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución”, Facultad de Medicina, U. A. N. L., Monterrey, N. L.
Mar/2001	Estadística Médica Básica. Facultad de Medicina, U. A. N. L., Monterrey, N. L.
May/2001	Estadística Médica Intermedia. Facultad Medicina, U. A. N. L., Monterrey, N. L.
Jun/2001	Estadística Médica Avanzada: Facultad de Medicina, U. A. N. L., Monterrey, N. L.
Oct/2002	“Cómo Escribir un Artículo Científico” XX Congreso Nacional de Investigación Biomédica: Facultad de Medicina, U. A. N. L., Monterrey, N. L.
Oct/2003	“Primer Curso Básico de Buenas Prácticas Clínicas en Investigación”. XXI Congreso Nacional de Investigación Biomédica: Facultad Medicina, U. A. N. L., Monterrey, N. L.
Oct/2003	Taller: “ESTADÍSTICA APLICADA A FENÓMENOS BIOLÓGICOS”, XXI Congreso Nacional de Investigación Biomédica: Facultad de Medicina, U. A. N. L., Monterrey, N. L.

Oct/2003 Taller: Monitoreo Clínico, Estudios Clínicos y de Bioequivalencia: CEDECAN. México, D. F.

Mzo-Myo/04 Programa de Capacitación Docente.

Módulo I. “*Los responsables de la formación médica*”.

Módulo II. “*Actualización en la enseñanza de la medicina*” Facultad de Medicina, U. A. N. L., Monterrey, N. L.

Jul/2005 Curso: Estadística aplicada a pruebas de intercambiabilidad y elaboración de reportes. Diplomado en medicamentos genéricos intercambiables. Módulo 3. AFM, A. C., México, D. F.

### **PARTICIPACION COMO PONENTE EN CONGRESOS/SIMPOSIOS:**

1992 TITULO: “Inventario forestal de *Karwinskia parvifolia* y su producción estimada en el norte de Sinaloa y sur de Sonora”. X Encuentro de Investigación Biomédica “Dr. Eusebio Guajardo”, celebrado del 19 al 23 de octubre de 1992 en la Facultad de Medicina de la U. A. N. L., Monterrey, N. L., México.

1992 TITULO: “Propagación del género *Karwinskia*”. XV Congreso Nacional de Farmacología, celebrado del 8 al 12 de noviembre de 1992 en la ciudad de San Miguel de Allende, Guanajuato.

1993 TITULO: “Efecto del frío sobre *Karwinskia parvifolia*”. XI Encuentro de Investigación Biomédica, celebrado del 18 al 22 de octubre de 1993 en la Facultad de Medicina de la U. A. N. L., Monterrey, N. L., México.

1993 TITULO: “La humedad y su importancia en la producción de la T-514”. XI Encuentro de Investigación Biomédica, celebrado del 18 al 22 de octubre de 1993 en la Facultad de Medicina de la U. A. N. L., Monterrey, N. L., México.

1993 TITULO: “Estudio químico de hojas, raíz y tallo e *K. parvifolia* y *K. humboldtiana*”. XI Encuentro de Investigación Biomédica, celebrado del 18 al 22 de octubre de 1993 en la Facultad de Medicina de la U. A. N. L., Monterrey, N. L., México.

1993 TITULO: “Enfermedades del género *Karwinskia* (Reporte de un caso)”. XI Encuentro de Investigación Biomédica, celebrado del 18 al 22 de octubre de 1993 en la Facultad de Medicina, U. A. N. L., Monterrey, N. L., México.

- 1993 TITULO: "*Karwinskia humboldtiana* y su fructificación". XI Encuentro de Investigación Biomédica, celebrado del 18 al 22 de octubre de 1993 en la Facultad de Medicina de la U. A. N. L., Monterrey, N. L., México.
- 1994 TITULO: "Caracterización morfológica y anatómica de la hoja en 2 especies del género *Karwinskia* Zucc. (Rhamnaceae) bajo condiciones de cultivo I". XII Encuentro de Investigación Biomédica, celebrado del 24 al 28 de octubre de 1994 en la Facultad de Medicina de la U. A. N. L., Monterrey, N. L., México.
- 1994 TITULO: "Planeación, organización y ejecución de la cosecha de 3 toneladas de fruto seco de *Karwinskia parvifolia*". XII Encuentro de Investigación Biomédica, celebrado del 24 al 28 de octubre de 1994 en la Facultad de Medicina de la U. A. N. L., Monterrey, N. L., México.
- 1994 TITULO: "Métodos de cosecha en *Karwinskia humboldtiana*". XII Encuentro de Investigación Biomédica, celebrado del 24 al 28 de octubre de 1994 en la Facultad de Medicina de la U. A. N. L., Monterrey, N. L., México.
- 1994 TITULO: "Beneficio del fruto de *Karwinskia parvifolia*". XII Encuentro de Investigación Biomédica, celebrado del 24 al 28 de octubre de 1994 en la Facultad de Medicina de la U. A. N. L., Monterrey, N. L., México.
- 1995 TITULO: "Producción de antracenas en varias especies de *Karwinskia* bajo diferentes condiciones de cultivo. XIII Congreso Nacional de Investigación Biomédica, celebrado del 23 al 27 de octubre de 1995 en la Facultad de Medicina de la U. A. N. L., Monterrey, N. L., México.
- 1999 TITULO: "Correlaciones entre variables demográficas y parámetros farmacocinéticos en **amoxicilina** y su aplicación en la selección de voluntarios para estudios de bioequivalencia". XVII Congreso Nacional de Investigación Biomédica, celebrado del 18 al 22 de octubre de 1999 en la Facultad de Medicina de la U. A. N. L., Monterrey, N. L., México.
- 1999 TITULO: "Correlaciones entre variables demográficas y parámetros farmacocinéticos en **ciprofloxacina** y su aplicación en la selección de voluntarios para estudios de bioequivalencia". XVII Congreso Nacional de Investigación Biomédica, celebrado del 18 al 22 de octubre de 1999 en la Facultad de Medicina de la U. A. N. L., Monterrey, N. L., México.

- 2002 TITULO: "Niveles de Plomo en Población Infantil de la Ciudad de Monterrey y su Area Metropolitana y su Correlación con Marcadores Biológicos de Daño". XX Congreso Nacional de Investigación Biomédica, celebrado del 23 al 25 de octubre de 2002 en la Facultad de Medicina de la U. A. N. L., Monterrey, N. L., México.
- 2003 Evaluador en Trabajos de Investigación. XXI Congreso Nacional de Investigación Biomédica, celebrado del 22 al 24 de octubre de 2003 en la Facultad de Medicina de la U. A. N. L., Monterrey, N. L., México.
- 2004 TITULO: "Contaminación ambiental por PM10 y Ozono y la incidencia de enfermedades alérgicas: estudio comparativo en el periodo de 1998 a 2001". XX Congreso Nacional de Investigación Biomédica, celebrado del 20 al 22 de octubre de 2004 en la Facultad de Medicina de la U. A. N. L., Monterrey, N. L., México.
- 2004 TITULO: "Estudio comparativo de tres medicamentos genéricos de azitromicina". XXII Congreso Nacional de Investigación Biomédica, celebrado del 20 al 22 de octubre de 2004 en la Facultad de Medicina de la U. A. N. L., Monterrey, N. L., México.
- 2004 TITULO: "Estudio comparativo de tres medicamentos genéricos de ciclosporina A". XXII Congreso Nacional de Investigación Biomédica, celebrado del 20 al 22 de octubre de 2004 en la Facultad de Medicina de la U. A. N. L., Monterrey, N. L., México.

#### **PUBLICACIONES:**

- Dic/07 Germinación como parámetro de selección en *Karwinskia* por su potencial de productividad en peroxisomicina A1. *Phyton* 76: 61-77.  
**Luján-Rangel R,** E Olivares-Sáenz, RE Vázquez-Alvarado, L Garza-Ocañas, O Torres-Alanís, (2007).
- Nov/07 Efecto del nitrógeno y variabilidad entre plantas sobre la productividad de PA1 en *Karwinskia parvifolia*. *Phyton*, En revisión.  
**Luján-Rangel R,** E Olivares-Sáenz, RE Vázquez-Alvarado, L Garza-Ocañas, O Torres-Alanís, D. Padilla-Alonso, H. Garza-Ulloa.

- Ene/08 Biosafety of Alacramyn in healthy human volunteers. Clinical Toxicology. En revision.
- Torres-Alanís O, L Garza-Ocañas, H Garza-Ulloa, E Tamez-de la O, R Reyes-Araiza, **R Luján-Rangel**.*
- Sep/07 Evaluation of the Bioequivalence of Single 100-mg Doses of Two Oral Formulations of Cyclosporin A Microemulsion: A Randomized, Open-Label, Two-Period Crossover Study in Healthy Adult Male Mexican Volunteers. Clinical Therapeutics / Vol. 29, Number 9, 2007. pp 2049-2054.
- A Piñeyro L, E Piñeyro G, O Torres A, R Reyes A, M Gómez S, N Waksman, ME Salazar, **R Luján R***
- Ene/06 “Evaluación del efecto de la combinación de ácido 2,3 dimercaptosuccínico (DMSA) y ácido ascórbico como terapia en la intoxicación por plomo en ratas”. CIENCIA, UANL/VOL. IX, No. 1, ENERO-MARZO 2006.
- Y Alcaráz C, O Torres A, L Garza O, **R Luján R**, XS Ramírez G.*
- Ene/06 “Bioavailability of Two Oral Formulations of Loratadine 20 mg with Concomitant Ketoconazole: An Open-Label, Randomized, Two-Period Crossover Comparison in Healthy Mexican Adult Volunteers”. Clinical Therapeutics. Vol. 28 Number 1, 2006. pp 110-115.
- A Piñeyro L, E Piñeyro G, O Torres A, R Reyes A, M Gómez S, N Waksman, **R Luján R**, A de Lago, D Trejo, M González y S Namur.*
- Oct/05 “Bioavailability of Two Oral Formulations of Azithromycin 500 mg: A Randomized, Open-Label, Two-Period Crossover Comparison in Healthy Mexican Adult Subjects”. Clinical Therapeutics. Vol. 27 Number 10. 2005. pp 1607-1611.
- A Piñeyro L, E Piñeyro G, O Torres A, R Reyes A, M Gómez S, N Waksman, **R. Luján R**, A de Lago, M González S. Namur.*
- 2001 “Estudio de bioequivalencia cruzada, a dosis única, en dos tratamientos, dos períodos y dos secuencias en condiciones de ayuno, de dos preparados de pravastatina, (Kenstatin y Pravacol) para administración oral”. Revista Mexicana de Aterosclerosis AMPAC, Vol. 4 No. 1, Enero-Marzo 2001
- A Piñeyro L, O Torres A, N Waksman, R Reyes A, E Piñeyro G, M Gómez S, **R. Luján R**, E Tamez de la O, M Ruíz C.*

- 1999 (Capítulo en libro) XIII “*Karwinskia* Species (Buckthorn): In Vitro Culture, Micropropagation, and the Production of Toxin Anthracenone”. In: Y.P.S. Bajaj, *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Medicinal and Aromatic Plants XI*, Alemania, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Vol. 43, pp 223-242, (1999).
- D Liskova, A Lux, A Piñeyro L, and **R Luján R.***
- 1999 “Estudio para evaluar la bioequivalencia entre dos formulaciones de ciprofloxacina, el cipprofur y la ciproxina”. *Investigación Médica Internacional, Vol 26 No. 1 pp 46-52. diciembre de 1999.*
- A Piñeyro L, O Torres A, N Waksman, M Gómez S, **R Luján R,** E Piñeyro G.*
- 1999 “Efecto del período de cosecha, tamaño de fruto, riego y especie sobre el contenido de Peroxisomicina A1 (T-514) en plantas del género *Karwinskia*”. Tesis de Maestría. Facultad de Agronomía-Facultad de Medicina de la U. A. N. L., Monterrey, N. L., México.

#### **OTRAS INVESTIGACIONES Y/O ACTIVIDADES DOCENTES:**

- 1998-Fecha Investigador Responsable del Análisis Farmacocinético y Estadístico en más de 60 Estudios de Bioequivalencia y/o biodisponibilidad sobre diversos fármacos, realizados en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la U. A. N. L., para la Industria farmacéutica.
- Jul/99 Ponente en: Seminario de Inducción para la Formación de Terceros Autorizados en Estudios de Bioequivalencia. Facultad de Medicina, U. A. N. L., Monterrey, N. L.
- Nov/03 Instructor en: “Pruebas de Intercambiabilidad y Terceros Autorizados”. Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C. México,D.F.
- May/04 Instructor en: “DIPLOMADO DE MEDICAMENTOS GENÉRICOS INTERCAMBIABLES”. Módulo 1: Diseño de Protocolos para Estudios de Bioequivalencia. Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C., México, D. F.