



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Aislamiento de metabolitos secundarios de la
corteza de *Spondias purpurea* L.**

BIODIVERSIDAD (FITOQUÍMICA)

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO
PRESENTA:**

Oscar Geovanny Vázquez Cortes

DIRECTORA DE TESIS: Dra. Hortensia Rosas Acevedo



México, D.F.

Febrero 2014.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

"ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.

Comunico a usted que el alumno **VÁZQUEZ CORTES OSCAR GEOVANNY**, con número de cuenta **301067607**, de la carrera de Biología se le ha fijado el día **25** del mes de **febrero** de 2014 a las **14:00 hrs.** para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE DRA. FRANCISCA LEONORA SÁNCHEZ Y GARCÍA FIGUEROA

VOCAL DRA. HORTENSIA ROSAS ACEVEDO

Hortensia Rosas

SECRETARIO Q. MARTHA TRINIDAD JULIETA OLIVEROS GARCÍA

M.O. Oliveros

SUPLENTE BIÓL. FLORENCIA BECERRIL CRUZ

Flores

SUPLENTE DRA. EVA AGUIRRE HERNÁNDEZ

Eva Aguirre Herdez

El título de la tesis que presenta es: **Aislamiento de metabolitos secundarios de la corteza de *Spondias purpurea* L.**

Opción de titulación: tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D.F., a 6 de enero de 2014

Dr. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR
ZARAGOZA
DIRECCIÓN



RECIBI
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de pertenecer a ella y forjarme como profesionista.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por permitirme desarrollarme profesionalmente, por brindarme sus instalaciones y recursos para alcanzar mis metas, por los buenos recuerdos y amistades que me permitió crear y por todas las personas que en ella conocí.

A la Dra. Hortensia Rosas Acevedo por permitirme realizar este trabajo bajo su dirección, por todo el conocimiento que compartió conmigo, por los consejos que me brindo y por la paciencia y dedicación durante el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Leonora Sánchez por facilitarme un área de trabajo para desarrollar parte de esta investigación, por los conocimientos que compartió conmigo y por el tiempo que dedico a la revisión de este trabajo.

A la Dra. Eva Aguirre por la asesoría y realización del análisis de HPLC, así mismo, por los conocimientos que compartió conmigo y el tiempo que dedico a la revisión de este trabajo.

A la Dra. Teresa Terrazas por proporcionarme la corteza de *Spondias Purpurea* y por su ayuda para la identificación de la misma.

A la Q. A. Verónica Muños Ocotero por brindarme su asesoría y ayuda en la determinación de polifenoles y taninos.

A la Q. Marta Oliveros y a la Biol. Florencia Becerril por el tiempo que dedicaron a la revisión y corrección de este trabajo así como sus valiosos consejos.

DEDICATORIAS

A mi mamá: Gracias por el apoyo incondicional que me has brindado, por tu comprensión, por todos los sacrificios que hiciste para que yo pudiera llegar hasta donde estoy el día de hoy, gracias por aguantar todos esos momentos de enojo, gracias por estar siempre ahí, al pendiente de mí y preocuparte; sé que el tiempo no me alcanzaría para agradecerte todo lo que has hecho por mí. Gracias mamá te quiero.

A mi hermano: si aunque no lo creas, también te agradezco a ti, porque a pesar de no demostrarnos el afecto que tenemos, sé que está implícito y que siempre contaremos el uno con el otro, gracias por aguantar a este "Amargado".

A mi padre: gracias por motivarme a seguir adelante y ofrecerme tu apoyo.

A mi prima Silvia: parte de este logro es tuyo, gracias al tiempo que me dedicaste y a los conocimientos que me brindaste, pero sobre todo a la paciencia que tuviste para enseñarme. Gracias por ayudarme a pasar mis exámenes.

A los Metepequeños: Martha, Alex, Irving y Aldo gracias por acompañarme a lo largo de la carrera, gracias por todos esos momentos tan alegres que pasamos, esas celebraciones de cumpleaños tan especiales y todas las peleas, los golpes y los debates que compartimos pero sobre todo gracias por brindarme su amistad.

A mis amigos del Laboratorio: (Los patrones) Carlos, Angi, Pato, Fany, Janet, Lalo y Manuel gracias por hacerme tan alegres los días en el laboratorio, y compartir buenos momentos.

A mis amigos de la FESZ: en especial a Sarahi, Pame, lyss, Brenda, Gaby, Gloria, Ana, Viry y Mauricio con quienes eh compartido muy buenos momentos, todos son muy importantes y espero seguir conservando su amistad a lo largo de los años.

Al KALBOM: Kary, Aide, Liuvia y Blanca gracias por la amistad que durante tanto tiempo me han brindado y por todos los momentos que hemos pasado.

MUCHAS GRACIAS A TODOS.

“No te molestes en ser mejor que tus contemporáneos o tus predecesores, intenta ser mejor que tú mismo” (William Faulkner)

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABLAS.....	iii
LISTA DE GRÁFICAS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 Meristemas.....	3
2.1.1 Crecimiento secundario.....	4
2.2 Peridermis o Corteza.....	4
2.2.1 Desarrollo de la peridermis.....	5
2.3 Metabolitos primarios.....	7
2.4 Metabolitos secundarios.....	7
2.5 Polifenoles.....	9
2.5.1 Taninos.....	11
2.5.2 Lignina.....	12
2.6 Familia <i>Anacardiaceae</i>	13
2.7 Género <i>Spondias</i>	14
2.8 <i>Spondias purpurea</i> L.	14
2.8.1 Clasificación taxonómica.....	14
2.8.2 Descripción botánica de <i>Spondias purpurea</i>	14
2.8.3 Sinonimias.....	17
2.8.4 Nombres comunes.....	17
2.8.5 Usos.....	17
2.8.6 Propiedades medicinales.....	17
2.8.7 Distribución en México de <i>Spondias purpurea</i> L.	18
2.9 Estudios químicos.....	20
2.9.1 Estudios químicos realizados en especies de la familia <i>Anacardiaceae</i>	20
2.9.2 Estudios químicos realizados en especies del género <i>Spondias</i>	20
3. JUSTIFICACIÓN.....	29
4. HIPÓTESIS.....	30

5. OBJETIVOS	31
5.1 Objetivo general	31
5.2 Objetivos particulares.....	31
6. MATERIAL Y MÉTODO.....	32
6.1 Material vegetal.....	32
6.2 Secado de la corteza de <i>Spondias purpurea</i> L.	32
6.3 Obtención de los extractos orgánicos	33
6.4 Fraccionamiento cromatográfico del extracto hexánico.....	35
6.5 Fraccionamiento cromatográfico del extracto de acetato de etilo.....	35
6.6 Fraccionamiento cromatográfico del extracto metanólico.....	36
6.7 Reacción de hidrólisis del extracto metanólico.....	36
6.8 Fraccionamiento cromatográfico de la fracción de AcOEt del extracto metanólico hidrolizado	36
6.9 Purificación de los compuestos	38
6.10 Identificación de los compuestos aislados	39
6.11 Determinación de polifenoles en los extractos de AcOEt y MeOH.....	39
6.12 Determinación de la presencia de Taninos mediante la prueba de Gelatina - sal.....	39
6.13 Cuantificación de taninos por el método de yodato de potasio	39
6.13.1 Preparación de solución de referencia.....	39
6.13.2 Preparación de la muestra	39
6.14 Cuantificación de lignina	40
6.15 Identificación de flavonoides por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) de los extractos de AcOEt y MeOH	41
6.16 Determinación de la actividad bactericida de los extractos de la corteza de <i>Spondias purpurea</i>	41
6.16.1 Preparación de los discos	42
7. RESULTADOS y DISCUSIÓN	43
7.1 Aislamiento e identificación estructural del β -sitosterol	43
7.2 Extractos metanólico y AcOEt	46
7.3 Determinación de polifenoles en los extractos de AcOEt y MeOH.....	46
7.4 Determinación de la presencia de taninos mediante la prueba de Gelatina - sal	47
7.5 Cuantificación de taninos por el método de yodato de potasio.	48
7.6 Cuantificación de lignina	48

7.7 Identificación de flavonoides por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) de los extractos de AcOEt y MeOH.....	49
7.8 Efecto bactericida de la corteza de <i>Spondias purpurea</i>	50
8. CONCLUSIONES.....	58
9. LITERATURA CITADA.....	59
ANEXO I.....	66
ANEXO II.....	68

LISTA DE FIGURAS

Fig.	Contenido	Pagina
1	Esquema de la estructura interna del tallo de una especie leñosa	5
2	Desarrollo de la peridermis y formación del ritidoma	6
3	Estructura química de compuestos polifenólicos no flavonoides	10
4	Estructura química de compuestos polifenólicos flavonoides	12
5	Estructura química de la lignina y sus precursores	13
6	A) Árbol de <i>Spondias purpurea</i> , B) Inflorescencia C) Flor, D) Hojas y fruto, E y F) Corteza de <i>Spondias purpurea</i>	16
7	Distribución de <i>Spondias purpurea L.</i> en Mesoamérica	19
8	Descortezamiento	32
9	Corteza molida y seca para macerar	33
10	Esquema del proceso de maceración de la corteza de <i>Spondias purpurea</i>	23
11	A) Maceración de la corteza, B) Extractos hexánico, C) Extractos de AcOEt, D) Extractos metanólico E) Concentración de los extractos y F) Extractos finales	34
12	A) Cromatografía en columna del extracto hexánico, B) Cromatografía en columna del extracto de AcOEt, C) Cromatografía en columna del extracto metanólico	37
13	A) Cromatografía en columna de la fracción de AcOEt del extracto metanólico hidrolizado, B) Fracciones obtenidas	38
14	A) Cromatografía de las fracciones 17 – 23 del extracto hexánico B) estructura química de (β -sitosterol)	43
15	Espectro infrarrojo de β -sitosterol	44

Fig.	Contenido	Pagina
16	Espectro de RMN 1H de β -sitosterol	45
17	Determinación de polifenoles por cromatografía en capa fina de los extractos de AcOEt y MeOH	47
18	Precipitado de taninos en los extractos de AcOEt y MeOH	47
19	Cromatograma del extracto de AcOEt y MeOH	49
20	Halos de inhibición del crecimiento bacteriano	57
21	Ampliación del espectro de RMN ¹ H	67

LISTA DE TABLAS

Tabla	Contenido	Página
1	Algunos compuestos aislados de <i>Spondias purpurea</i> L	23
2	Fraccionamiento cromatográfico del extracto hexánico	35
3	Fraccionamiento cromatográfico del extracto de acetato de etilo	36
4	Fraccionamiento cromatográfico del extracto metanólico	37
5	Fraccionamiento cromatográfico de la fracción de AcOEt del extracto metanólico hidrolizado	38
6	Microorganismos utilizados para la determinación de la actividad bactericida	42
7	Especies donde se ha reportado β -sitosterol	46
8	Estándares utilizados para la identificación de flavonoides	50
9	Actividad bactericida de los extractos de la corteza de <i>Spondias purpurea</i>	50
10	Desplazamientos químicos de RMN ¹ H de β -sitosterol	66

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica	Contenido	Página
1	Actividad bactericida del extracto hexánico	51
2	Actividad bactericida del extracto de AcOEt	52
3	Actividad bactericida del extracto metanólico	53
4	Actividad bactericida de los extractos orgánicos sobre <i>B. cereus</i>	54
5	Actividad bactericida de los extractos orgánicos sobre <i>S. agalactiae</i>	54
6	Actividad bactericida de los extractos orgánicos sobre <i>S. mutans</i>	55
7	Actividad bactericida de los extractos orgánicos sobre <i>S. aureus</i>	55
8	Actividad bactericida de los extractos orgánicos sobre <i>S. pyogenes</i>	56
9	Actividad bactericida de los extractos orgánicos sobre <i>S. flexneri</i>	56

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado	Abreviatura	Significado
Ac.	Ácido	m	Metro
AcOEt	Acetato de etilo	mg	Miligramo
atm	Atmosferas	μm	Micrómetro
°C	Grado Celsius	μg	Microgramo
CCF	Cromatografía en capa fina	μL	Microlitro
CHCl ₃	Cloroformo	min.	Minutos
cm	Centímetro	mL	Mililitro
cm ⁻¹	Ciclos por centímetro	mm	Milímetro
δ	Desplazamiento químico	MHz	Megahertz
EtOH	Etanol	N	Normal
Fe ⁺³	Ion férrico	NaCl	Cloruro de Sodio
Fe ⁺²	Ion ferroso	nm	Nanómetro
g	Gramo	%	Por ciento
HCl	Ácido clorhídrico	p.f.	Punto de fusión
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución	p/v	Peso/volumen
hrs.	Horas	RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de Carbono 13
IR	Infrarrojo	RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de Hidrogeno
MeOH	metanol		

1. INTRODUCCIÓN

La etnomedicina se define como la medicina propia de un grupo y de una cultura ya que los sistemas terapéuticos se constituyen de acuerdo a las características culturales de los grupos. Si varían estos, si varían las culturas, varían también las maneras de entender la salud y enfermedad, las formas de abordar los problemas y las propuestas de soluciones (Brown 1998).

La medicina tradicional está fuertemente arraigada en la sociedad, siendo preferida por muchas personas sobre cualquier otro tipo de tratamiento médico. Desempeña además un papel especialmente importante en comunidades aisladas o de bajos recursos, siendo la única opción conocida, o en la mayoría de los casos a la que la población tiene acceso. Debido a esto, las plantas superiores y sus extractos han sido usados por la humanidad como fuente de agentes terapéuticos desde el comienzo de la historia. Actualmente, con el creciente interés que ha despertado la medicina herbolaria, a diario crece el número de estudios que confirman la utilidad de las plantas para el tratamiento de diversas enfermedades (Marcano y Hasegawa, 2002).

Las plantas producen y almacenan una gran cantidad de compuestos o metabolitos primarios y secundarios. Los metabolitos secundarios son los más relevantes para los investigadores de productos naturales, puesto que son la fuente de los compuestos biológicamente activos, estos metabolitos son acumulados en la planta y su composición química, su concentración y localización varía de acuerdo con la especie o la fuente donde fueron aislados (Anaya *et al.*, 2001).

Cuando estos metabolitos secundarios son aislados, purificados e identificados, y su actividad biológica es probada, pueden utilizarse en la medicina herbolaria tradicional o bien en la medicina moderna para el consumo del ser humano, así como en la industria alimenticia y la agricultura (Anaya *et al.*, 2001).

En las últimas décadas, los estudios químicos de extractos vegetales han proporcionado numerosos compuestos que han probado ser indispensables en la medicina moderna, la mayoría de los productos naturales usados actualmente proceden de plantas medicinales usadas tradicionalmente; como consecuencia del interés por todo lo natural, hoy gozan de creciente popularidad muchas plantas de la

medicina tradicional, de las cuales, un gran número han sido sometidas a intensas investigaciones fitoquímicas. En el transcurso de estos estudios se han hecho avances significativos respecto a la elucidación estructural, configuración y síntesis de los metabolitos secundarios aislados, muchos de los cuales han sido sometidos a ensayos clínicos (Mamani, 1999).

La razón fundamental del renovado interés del mundo de la industria farmacéutica y la medicina por las sustancias bioactivas de origen natural, es debido a que aproximadamente el 80% de la población mundial vive en países que se encuentran en vías de desarrollo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que el 80% de esta población usa casi exclusivamente, la medicina tradicional para sus necesidades primarias (Nudelman, 2004). Por lo tanto para esta población, que no puede costearse los medicamentos existentes en el mercado, es necesario realizar un estudio de estas plantas para buscar la máxima seguridad y eficacia y para desarrollar una forma de uso medicinal normalizada y estable (Mamani, 1999). Aproximadamente el 25% de los medicamentos prescritos en EE. UU. y Canadá contienen principios activos que derivan de una forma u otra de productos naturales de plantas, muchas de las cuales han sido descubiertas a través del conocimiento popular transferido a lo largo de generaciones (Nudelman, 2004; Mamani, 1999).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Meristemos

El árbol, al igual que todo organismo vivo, experimenta procesos de crecimiento los cuales permiten el incremento dimensional de los mismos. Este crecimiento se produce en zonas especializadas constituidas por células que poseen capacidad de división, estas zonas reciben el nombre de tejidos meristemáticos (Williams y León, 2001).

Se pueden distinguir diferentes tipos de tejidos meristemáticos y éstos se pueden clasificar de acuerdo a varios criterios:

a) Según su posición:

- Meristemo apical: se encuentra ubicado en el ápice de un órgano.
- Meristemo lateral: se ubica en la periferia de un órgano.
- Meristemo intercalar: meristemos localizados entre los tejidos que el organismo produce.

b) Según su origen:

- Meristemo primario: proviene directamente de células que nunca han perdido su capacidad de división.
- Meristemo secundario: se origina a partir de células diferenciadas que nuevamente adquieren su capacidad de división.

Los meristemos permiten que se produzca el crecimiento del árbol en sentido longitudinal y diametral. El crecimiento longitudinal, también llamado crecimiento primario, se produce por la acción del meristemo apical; mientras que el crecimiento diametral o en grosor, también denominado crecimiento secundario, se produce por divisiones que ocurren en el cambium vascular y en menor proporción, en el cambium cortical (Williams y León, 2001).

2.1.1 Crecimiento secundario

El crecimiento secundario es el incremento en diámetro o grosor del tallo, ramas y raíces de las plantas y comienza con la formación del cambium vascular. El cambium vascular es un meristemo de tipo lateral e intercalar, normalmente forma una capa continua localizada periféricamente desde el ápice hasta la raíz. En las primeras etapas de crecimiento secundario, el incremento diametral del tallo como consecuencia de la actividad del cambium vascular produce el rompimiento de la capa protectora inicial del tallo: la epidermis. Es necesario que se desarrolle una nueva capa protectora hacia el lado externo del floema, que se encargue de darle protección a los tejidos ubicados hacia el lado interno y allí ocurre la formación del cambium cortical o felógeno (Williams y León, 2001).

2.2 Peridermis o Corteza

La peridermis, es un tejido protector de origen secundario, reemplaza a la epidermis cuando el eje crece en diámetro y se destruye la epidermis. La formación de peridermis es un fenómeno común en los tallos y raíces de las especies leñosas que aumentan en grosor por crecimiento secundario. Estructuralmente, la peridermis consta de tres partes (Fig. 1) el **felógeno o cambium suberoso**, que es el meristemo que produce la peridermis; el **suber o corcho**, producido por el felógeno hacia el exterior; y la **felodermis**, tejido parecido al parénquima y constituido por células derivadas del felógeno hacia el interior de la planta (Esau, 1985).

El término peridermis debe distinguirse claramente del vocablo *corteza* empleado comúnmente, éste se aplica a todos los tejidos que quedan por fuera del cambium vascular, tanto en el periodo de crecimiento primario como en el secundario. También se usa más específicamente para designar el tejido que se acumula en la superficie del eje de la planta como resultado de la actividad del felógeno (Esau, 1985).

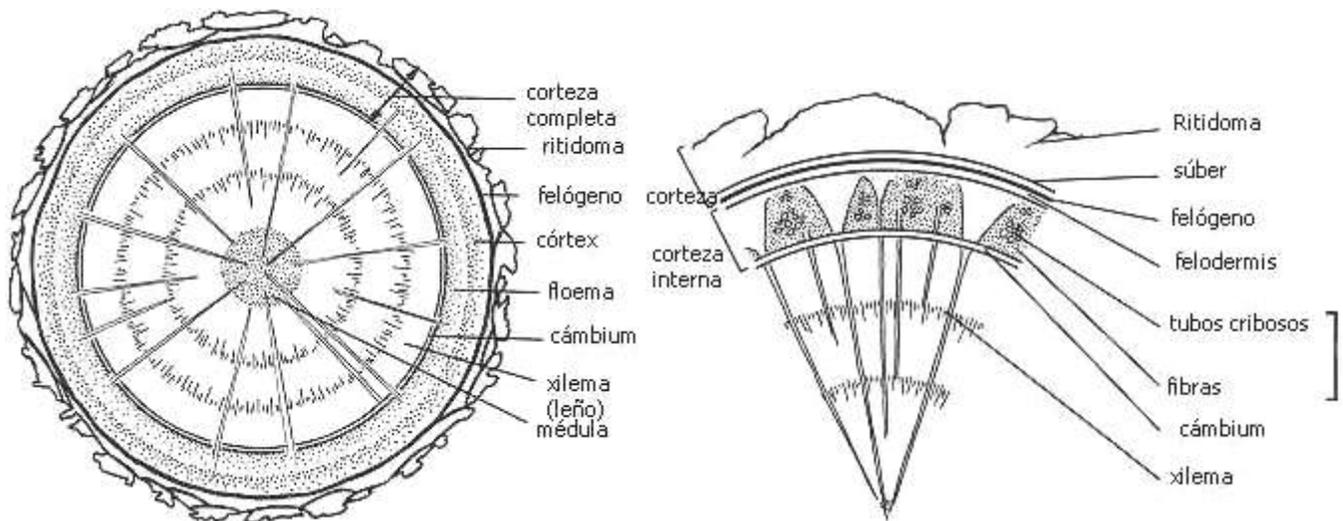


Fig. 1 Esquema de la estructura interna del tallo de una especie leñosa tomada de <http://www.biologia.edu.ar/plantas/corteza.htm>

2.2.1 Desarrollo de la peridermis

El felógeno puede originarse a partir de las células vivas de la epidermis o de células parenquimáticas o colenquimáticas que se encuentran debajo de la epidermis. Estas células se desdiferencian, es decir que retoman la actividad meristemática; para ello pierden sus vacuolas centrales y sufren divisiones periclinales. Como resultado de la primera división mitótica se forman dos células, la externa pasa a constituir el súber mientras que la interna permanece como células del felógeno. Posteriores divisiones de las células del felógeno formarán la felodermis hacia el interior (Fig. 2). Este primer felógeno forma la peridermis que reemplaza en su función a la epidermis. Tanto la epidermis como los tejidos ubicados por dentro de la misma mueren, ya que el súber aísla los mismos de las sustancias nutritivas y el agua (Fahn, 1985).

Con la continuación del crecimiento secundario éste primer felógeno es reemplazado con uno nuevo, formado hacia el interior del primero. Para formar estos siguientes felógenos ya son las células del parénquima del floema secundario las que se desdiferencian. Las siguientes peridermis pueden formarse en anillos completos o en bandas. Con la formación de cada peridermis, mueren los tejidos que quedan por fuera, resultando en la formación de una capa o costra dura. Estos tejidos muertos ubicados por fuera del último felógeno funcional se denominan técnicamente ritidoma o simplemente

corteza externa. La parte viva que queda por dentro del felógeno funcional es el floema y se denomina corteza interna (Fig. 2) (Fahn, 1985).

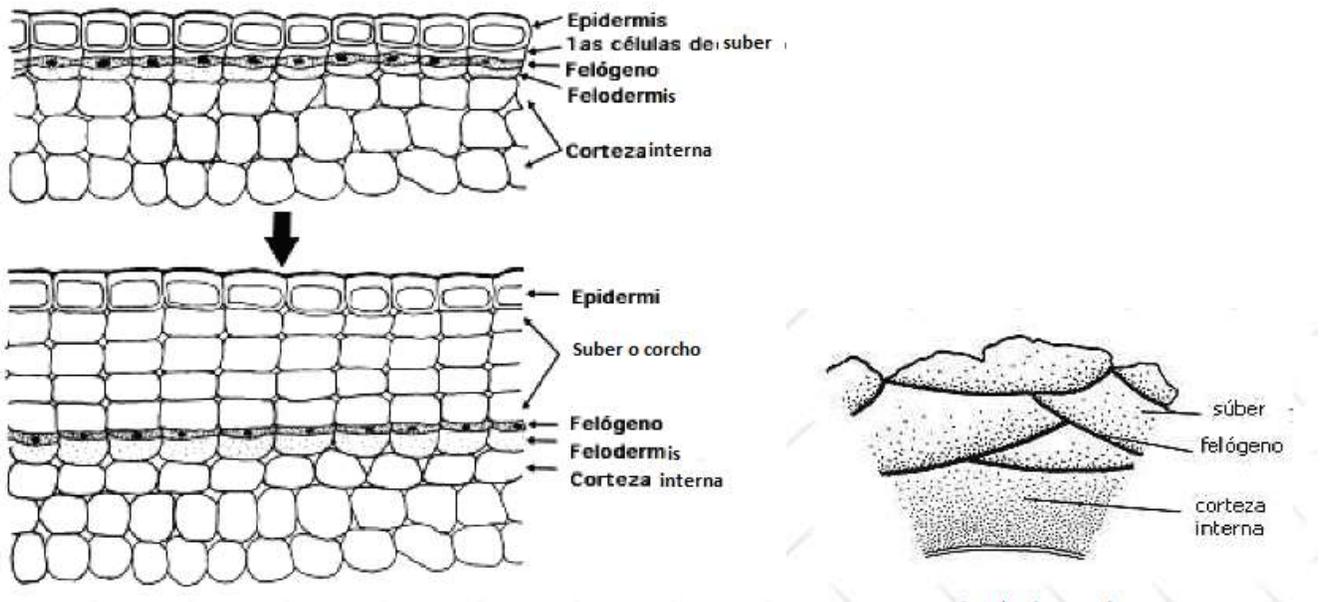


Fig. 2 Esquema del desarrollo de la peridermis y formación del ritidoma

<http://www.biologia.edu.ar/plantas/corteza.htm>

En los estudios de corteza se toman en cuenta tanto sus características externas (forma, consistencia, color, olor, estructuras especiales como espinas, sustancias secretadas) como sus características internas como espesor, presencia de anillos de crecimiento, radios, diferenciación de las diferentes capas constituyentes de la corteza, patrones especiales producidos por algunos elementos floemáticos. Entre las características externas también se puede incluir la presencia de lenticelas, así como algunas características de las mismas: forma, tamaño, número y arreglo (Williams y León, 2001).

La estructura de la corteza depende básicamente de la relación entre la velocidad de crecimiento de la madera y de la corteza. Debido a que el cambium deposita capas sucesivas de madera en su superficie interna, la corteza debe adaptarse a una circunferencia en incremento constante (Pennington y Sarukhán, 2005).

Los siguientes patrones de corteza son los más frecuentes:

- a) Lisa, corteza externa sin fisuras o escamas con apariencia más o menos tersa desde una distancia de 1 a 2 mm

- b) Escamosa, la corteza externa se desprende en piezas semejantes a tejas, de grosor y tamaños variable. Las escamas pueden ser bastantes pequeñas pero gruesas, en forma de cuña redondeada o conchas, que dejan una depresión profunda al desprenderse.
- c) Fisurada, caracterizada por surcos y costillas longitudinales.

La corteza interna puede presentar algunas características útiles para la identificación en campo. La textura, por ejemplo varía desde fibrosa a muy quebradiza, esta última con escasas fibras y muchas células pétreas y de estructura bastante granulosa, en algunos árboles como *Spondias mombin*, la corteza interna está dispuesta en conspicuas bandas tangenciales, lo que se conoce como corteza laminada (Pennington y Sarukhán, 2005).

2.3 Metabolitos primarios

Una de las diferencias entre plantas y animales es su capacidad de síntesis de numerosas y diversas sustancias de naturaleza química diferente, presentan propiedades muy diversas, aunque su papel fisiológico en la planta es muchas veces no del todo conocido. En particular los vegetales, igual que otros organismos mediante sus procesos metabólicos sintetizan dos categorías de metabolitos: primarios y secundarios, aunque esta distinción resulta totalmente arbitraria pues no hay una división precisa entre metabolismo primario y secundario (Harborne, 1982).

Los metabolitos primarios, muy abundantes en la naturaleza son indispensables para el desarrollo fisiológico de la planta; se encuentran presentes en grandes cantidades, son de fácil extracción y su explotación es relativamente barata y conducen a la síntesis de los metabolitos secundarios que se acumulan en la planta en pequeñas cantidades, a veces en células especializadas, lo que hace que su extracción sea difícil y costosa. Entre los metabolitos primarios se encuentran aminoácidos proteicos, proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos grasos, algunos ácidos carboxílicos, etc. (Castillo y Martínez, 2007).

2.4 Metabolitos secundarios

Las plantas producen una gran cantidad y diversidad de compuestos orgánicos que no parecen tener una función directa en el crecimiento y desarrollo, estas sustancias se conocen con el nombre de metabolitos secundarios, productos secundarios o productos naturales. Los metabolitos secundarios no tienen función reconocida o directa en los procesos de fotosíntesis, respiración, transporte de

solutos, síntesis de proteínas, asimilación de nutrientes, diferenciación o formación de carbohidratos, proteínas y lípidos (Taiz y Zeiger, 2006).

Se caracterizan por tener una distribución restringida en el reino vegetal; es decir, un metabolito secundario determinado se encuentra con frecuencia en una sola especie vegetal o grupo de especies relacionadas, mientras que los metabolitos primarios se encuentran en todo el reino vegetal (Taiz y Zeiger, 2006). En general, los metabolitos secundarios son responsables del olor, del sabor y del color de la planta, y también de sus propiedades medicinales (Castillo y Martínez, 2007). Los metabolitos secundarios vegetales pueden dividirse en tres grupos químicamente diferentes: terpenos, fenoles y compuestos que contiene nitrógeno (Taiz y Zeiger, 2006).

La expresión del metabolismo secundario es una característica de la especialización celular, indica que la formación del metabolito secundario en contraste con el metabolito primario no tiene importancia para la célula productora. Sin embargo, un metabolito secundario puede tener significado para el organismo productor como un todo, porque está implicado en relaciones ecológicas, es decir, en la relación de la planta productora con los otros organismos de su entorno natural. Ejemplo de ello, son los pigmentos de las flores que atraen a los insectos polinizadores y los compuestos que inhiben el crecimiento de otros organismos (sustancias alelopáticas) o que protegen la planta de infecciones (fitoalexinas) o de los depredadores (disuasorios nutritivos) (Abrahamson, 1989; Harborne, 1989).

Otros metabolitos secundarios tienen importancia fisiológica (los esteroides, constituyentes de las biomembranas, la lignina, polímero natural) o sirven como señales que integran la diferenciación celular y el metabolismo en diferentes partes del organismo vegetal (Piñol y Palazón, 1993).

En vista de la relación que tienen los metabolitos secundarios con el metabolismo primario de los grupos químicos que pueden formar parte de su molécula y los cambios que esta puede experimentar, y considerando el número y clase de precursores, enzimas y coenzimas que intervienen en su biogénesis, podemos entender que numerosos factores físicos, químicos y biológicos, externos e internos, pueden afectar su producción (Anaya, 2003).

Entre los factores más importantes se encuentran:

- Radiación (calidad de luz)
- Intensidad de la luz
- Fotoperiodo
- Edad, estado fenológico y órgano de la planta
- Deficiencias minerales (Nitrógeno, Azufre, Fosforo, Potasio, Magnesio, Boro, Calcio)
- Temperatura
- Estrés hídrico
- Compuestos orgánicos diversos presentes en el medio
- Factores genéticos
- Interacciones bióticas intra e interespecíficas
- Contaminantes sintéticos

Las presiones que estos factores ejercen sobre la planta, se modifican en el tiempo y en el espacio creando condiciones complejas y heterogéneas, ocasionando que las plantas pongan en juego diversos mecanismos de adaptación en la lucha por la supervivencia. La adaptación involucra cambios en la bioquímica básica de la célula, que pueden observarse a varios niveles del metabolismo (Anaya, 2003).

2.5 Polifenoles

Los compuestos polifenólicos son metabolitos secundarios de las plantas que están diseñados con un anillo aromático, que lleva uno o más restos hidroxilo, varias clases pueden considerarse de acuerdo con el número de anillos de fenol y a los elementos estructurales que se unen a estos anillos (Andrés *et al*, 2010).

Los compuestos polifenólicos varían ampliamente en estructura, desde los más simples (monómeros y oligómeros) hasta los polímeros complejos de peso molecular alto (taninos). Se han identificado más de 4000 compuestos polifenólicos individuales, los cuales se han dividido en dos grandes grupos: los flavonoides y los no flavonoides. Estos últimos incluyen a las moléculas más sencillas, como los ácidos fenólicos con esqueletos químicos de seis carbonos (C_6), ligados o no con esqueletos de dos hasta cuatro carbonos (C_6-C_4) (Fig. 3). Ejemplos más complejos de compuestos no flavonoides son aquellos

cuyos esqueletos poseen su porción C₆ unida a porciones C₂ y a otro anillo C₆, como en el caso de los estilbenos, galotaninos o elagitaninos. Estos últimos son conocidos como taninos hidrolizables, los más complejos de los fenoles no flavonoides (Dai y Mumper, 2010; Quideau *et al.*, 2011). En la (Fig. 3) se muestra la estructura química de compuestos polifenólicos no flavonoides.

Los polifenoles flavonoides tienen un esqueleto químico que consta de tres porciones: dos anillos aromáticos y un anillo heterocíclico oxigenado (C₆-C₃-C₆). Los flavonoides conforman el grupo más variado estructuralmente, debido a que su esqueleto base tiene numerosas posibilidades de sustitución por grupos hidroxilo (-OH), metoxilo (-O-CH₃), acilo (-CO), y glucósidos. Algunos compuestos flavonoides y sus estructuras químicas básicas se muestran en la (Fig. 4) (Dai y Mumper, 2010; Quideau *et al.*, 2011).

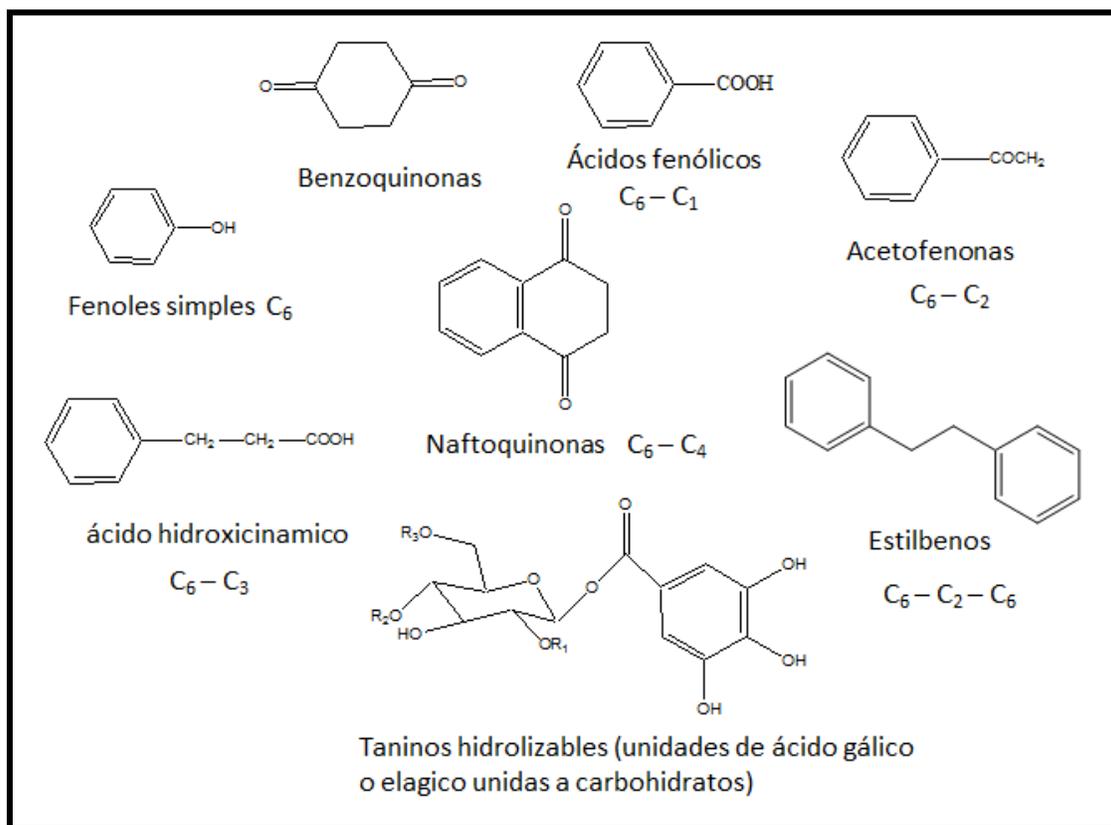


Fig. 3 Estructura química de compuestos polifenólicos no flavonoides.

2.5.1 Taninos

Los taninos son compuestos polifenólicos, y se pueden encontrar en ambos grupos, flavonoides y no flavonoides, formando compuestos de muy alto peso molecular (>500 UMA), llamados, en ambos casos, taninos. Sin embargo, cada grupo origina un tipo específico de taninos: los no flavonoides polimerizan para formar taninos hidrolizables, mientras que ciertos flavonoides, al polimerizar, forman taninos condensados (Cheynier, 2005).

Los taninos hidrolizables son moléculas polifenólicas de tamaño discreto, de naturaleza no polimérica, capaces de ser hidrolizados por ácidos o enzimas a un azúcar y a un ácido carboxílico fenólico; mientras que los taninos condensados son moléculas oligoméricas o poliméricas de unidades flavan-3-ol (Fig. 4), unidas a través de enlaces C₄ a C₈, o menos frecuentemente, C₄ a C₆ de dos unidades consecutivas, de diverso tamaño y constitución según su origen (Vázquez, 2012).

Los taninos son compuestos que no solo poseen un elevado peso molecular, sino además presentan suficientes grupos hidroxilo unidos a estructuras fenólicas que les confieren la característica de formar complejos con proteínas, minerales y otras macromoléculas. Los taninos hidrolizables, como los galotaninos o elagitaninos, provienen de la esterificación de compuestos polifenólicos no flavonoides, como el ácido gálico o elágico, respectivamente. Por su parte, los taninos condensados o proantocianidinas, provienen de la esterificación de compuestos polifenólicos flavonoides, como las catequinas o flavan-3-oles (Reed, 2010).

Ambos tipos de taninos, al ser compuestos polifenólicos, han sido tema de múltiples revisiones científicas, entre sus propiedades destacan, la capacidad de unirse a proteínas ricas en aminoácidos como prolina, glicina y ácido glutámico (Cheynier, 2005) y péptidos por dos interacciones importantes: puentes de hidrógeno (entre el grupo carbonilo de los péptidos y los hidrógenos del grupo hidroxilo de polifenoles) e interacción hidrofóbica (entre los aminoácidos neutros y los anillos aromáticos de los taninos). Cabe señalar a este respecto que todas estas interacciones dependen de la preferencia de cada molécula de tanino para arreglarse tridimensionalmente, y de su estado coloidal (Vázquez, 2012).

Otra de las propiedades que se han reportado en los taninos, es su toxicidad frente a microorganismos. Reed (2010) identifica tres mecanismos de toxicidad de los taninos sobre microorganismos: la inhibición de la enzima y la privación del sustrato, la acción sobre las membranas, y la privación de iones metálicos. La inhibición de la enzima y la privación de sustrato son características de las interacciones proteína tanino.

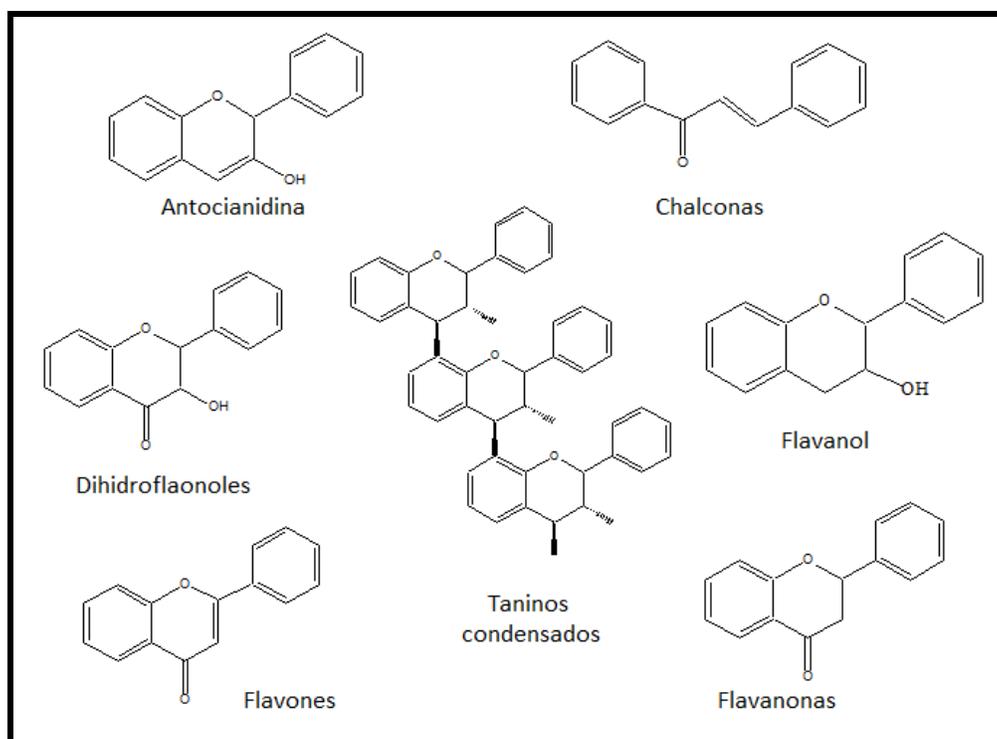


Fig. 4 Estructura química de compuestos polifenólicos de tipo flavonoides.

2.5.2 Lignina

La lignina es un polímero altamente ramificado de fenilpropanoides (Fig. 5). Después de la celulosa, es la sustancia orgánica más abundante en las plantas. Se encuentra covalentemente unida a la celulosa y a otros polisacáridos de la pared celular. Es insoluble en agua y en la mayoría de los solventes orgánicos lo que hace muy difícil su extracción sin degradarla. Desempeña un papel estructural fundamentalmente, su naturaleza química es la base de su dureza mecánica y de su rigidez que se manifiesta en los tallos lignificados, los troncos de los árboles, imprimiendo su “carácter” a la madera. Se encuentra en la pared celular de varios tejidos de soporte y de transporte, en traqueidas y en los vasos del xilema. Principalmente se deposita en la pared secundaria, fortalece los tallos y tejidos vasculares permitiendo el crecimiento vertical y la conducción de agua y minerales a través del xilema. Se forma a partir de tres derivados fenilpropanoides: los alcoholes coniferílico, cumarílico y sinapílico, (Fig. 5) de manera que cada uno de ellos puede formar numerosos enlaces y ramificaciones haciendo que cada lignina pueda ser única. También tiene función protectora dado que su resistencia mecánica evita que las plantas sean alimento para animales y, además, su naturaleza química hace que sea difícil digerirla por los herbívoros (Avalos y Perez, 2009).

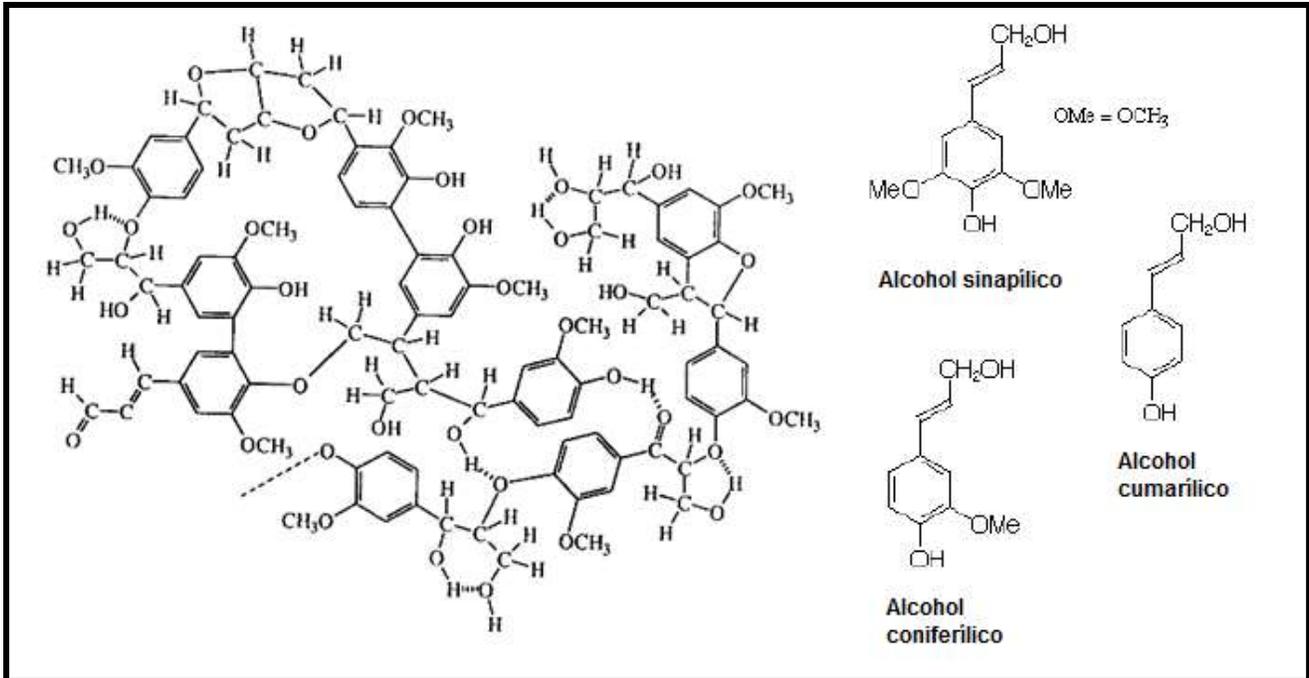


Fig. 5 Estructura química de la lignina y sus precursores

2.6 Familia Anacardiaceae

La familia *Anacardiaceae* comprende alrededor de 76 géneros que se dividen en cinco tribus (*Anacardieae*, *Dobineae*, *Rhoeae*, *Spondiadeae* y *Semecarpeae*) dentro de los géneros más estudiados se encuentran: *Anacardium*, *Cotinus*, *Mangifera*, *Pistacia*, *Rhus*, *Schinopsis*, *Schinus*, *Tapiria*, *Toxicodendron* y *Spondias*. De los cuales se conocen a nivel mundial más de 600 especies distribuidas en ambos hemisferios (Engels *et al.*, 2012). Son plantas de distribución tropical, subtropical y de zonas templadas. En algunas regiones del Globo, por ejemplo en Sudamérica, hay especies de relevancia económica por ser maderables; en nuestro país se cultivan por sus frutos el mango (*Mangifera indica*) y el marañón (*Anacardium occidentale*), en tanto que el pirul (*Schinus molle*) es muy común como árbol ornamental y de sombra. Del género *Spondias* se conocen especies apreciadas por sus frutos comestibles (Rzedowski y Rzedowski, 2005).

2.7 Género *Spondias*

El género *Spondias* es nativo de la región Neotropical y Tropical del sureste asiático, pertenece a la familia *Anacardiaceae* y comprende 17 especies de las cuales siete son Neotropicales y diez del trópico asiático. En el continente americano su distribución se extiende desde México hasta Perú y el sur del Brasil (Macía y Barfod, 2000; Ruenes *et al.*, 2010).

Son **Arboles** dioicos, pequeños o altos. **Hojas** alternas imparipinnadas. **Flores** pequeñas, en panículas terminales o laterales; cáliz 4-5 partido, deciduo, los segmentos subimbricados; pétalos 4-5 extendidos, valvados en los botones; disco cupular, crenado; estambres 9-10, insertados debajo del disco; ovario sésil, libre, con 4-5 lóculos; estilos 4-5; óvulo solitario, péndulos. **Fruto** drupáceo resinoso, el endocarpo óseo, grande, 1-5 locular; semillas péndulas, con testa membranosa, embrión recto, los cotiledones alargados, plano-convexos, la radícula corta (Cabrera, 2000).

2.8 *Spondias purpurea* L.

2.8.1 Clasificación taxonómica

Reino:	<i>Plantae</i>	Orden:	<i>Sapindales</i>
División:	<i>Magnoliophyta</i>	Familia:	<i>Anacardiaceae</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>	Género:	<i>Spondias</i>
Subclase:	<i>Rosidae</i>	Especie:	<i>Spondias purpurea</i> L.

(APG III 2009).

2.8.2 Descripción botánica de *Spondias purpurea*

Arbusto o árbol: pequeño, hasta de 10 (15) m de alto caducifolio; tronco hasta de 40 (80) cm de diámetro (Fig. 6 A) corteza grisácea, lisa o verrucosa, copa frondosa y amplia, muy extendida en sentido horizontal (Fig. 6 E y F) (Rzedowski y Rzedowski, 1999).

Hojas: imparipinnadas, sobre peciolas de 2 a (4) cm de largo, lámina oblonga o elíptica en contorno general, de 8 a 15 cm de largo, peciólulos de 0.5 a (3) mm de largo, con frecuencia pilosos, foliolos (3) a 12 pares, alternos u opuestos, oblicuamente oblongos o elípticos a obovados, de 1.5 a 6 cm de largo y

0.7 a 3 cm de ancho, ápice redondeado a agudo, en ocasiones cortamente acuminado, base asimétrica, cuneada o algo atenuada a obtusa, borde entero a levemente aserrado, membranáceos, glabros a pilosos, especialmente sobre las nervaduras del envés (Fig. 6 D) (Rzedowski y Rzedowski, 1999).

Inflorescencias: en forma de panículas racemiformes o subcapitadas, (Fig. 6 B) de (0.5)1 a 4(8) cm de largo, produciéndose a lo largo de las ramillas cuando la planta se encuentra desprovista de hojas, pedicelos articulados, bracteolados, de 0.5 a 4 mm de largo; segmentos del cáliz 5, rosados a rojos, ampliamente ovados, de alrededor de 1 mm de largo, fimbriados en el margen; pétalos 5, rojos a morados, oblongo-lanceolados, de alrededor de 3 mm de largo, involutos, de ápice agudo y encorvado, glabros; estambres 10, subiguales o desiguales, un poco más cortos que los pétalos, anteras de 0.5 a 1 mm de largo (estériles en las flores femeninas); disco anular, carnoso, subentero dividido en 5 nectarios contiguos, a veces más o menos bilobados; ovario profundamente lobado, estilos (3)4 a 6, cortos y gruesos después, el gineceo reducido en las flores masculinas (Fig. 6 C) (Rzedowski y Rzedowski, 1999).

Fruto: drupa generalmente anaranjada, roja, café-rojiza o de color morado, a veces amarilla, (Fig. 6 D) oblongo-cilíndrica, de 1.5 a 3.5 (5 en las plantas cultivadas) cm de largo por (1)1.5 a 2.5 cm de diámetro, endocarpo (hueso) amarillo, fibroso, conteniendo una o más semillas (Rzedowski y Rzedowski, 1999).



Fig. 6 A) Árbol de *Spondias purpurea*, B) Inflorescencia C) Flor, D) Hojas y fruto, Tomados de <http://redbio.una.edu.ni/arboretum/fichas.php?cod=6>



Fig. 6 E y F) Corteza de *Spondias purpurea*

2.8.3 Sinonimias

Spondias cirouella Tussac; *Spondias cytherea* Sonn. ; *Spondias macrocarpa* Engl. ; *Spondias mombin* L.; *Spondias purpurea* fo. *Lutea* (Macfadyen) Fawcett & Rendle; *Warmingia macrocarpa* Engl. (Cordero y Boshier, 2003).

2.8.4 Nombres comunes

Nombres comunes en México. Ciruelo, Ciruela, Ciruela colorada, Abal (Rep. Mex.); Chatsutsocoscatan, Tsusocostata, Smucuco-scatan (l. totonaca, Ver.); Ciruela Campechana (Ver., Chis., Yuc.); Huitzó (l. zoque, Chis.); Jocote (Oax., Tab., Chis.); Jondura, Poon (Chis.); Biaxhi, Biagi, Biadxi, Yaga-piache (l. zapoteca); Atoyaxócotl, Mazaxocotl (l. náhuatl antigua); Chak-abal, Ix-houen, Chi-abal, Kosumil muluch-abal (l. maya, Yuc.); Ciruelo de San Juan (Yuc.); Cuaripá (l. huichol, Jal.); Shuiutipi'chic (l. popoluca, Ver.); Mauí (l. chinanteca, Oax.); Schizá, El Shimalo-schindzá (l. chonatl, Oax.); Cundaria, Tuñ (Oax.); Tuxpana (Tab.); Cupú (l. tarasca); Ciruelo cimarrón (Ver.); Ten (l. huasteca, S.L.P.) (Martínez, 1979; Ruenes, 2010).

2.8.5 Usos

Comestible: el fruto se come crudo, hervido, seco en jugos, vinos, licores, vinagres, en mermeladas y jaleas, así mismo, las hojas tiernas son comestibles. **Industrial:** la madera sirve para pulpa de papel cajas, fósforos, lápices, bolígrafos, revestimiento interior de las casas y barcos, y como un sustituto de corcho; también se utiliza como combustible y las cenizas se ocupan para jabón, mientras que la resina se ocupa para la fabricación de pegamentos. **Forrajero:** las hojas son consumidas ávidamente por el ganado bovino y los frutos por el ganado porcino.

Otros usos: al igual que otras especies del género como *Spondias mombin* se usa para cercas vivas, en huertos caseros, potreros y asociados a cultivos perennes (Benavides, 1994; Cordero y Boshier, 2003).

2.8.6 Propiedades medicinales

En México los frutos de *Spondias purpurea* L. se consideran diuréticos y antiespasmódicos; La decocción del fruto se usa para bañar heridas y curar úlceras en la boca, con la fruta se prepara un jarabe para curar la diarrea crónica; la decocción astringente de la corteza se usa como remedio para la sarna, úlceras, disentería y para hinchazón por gas intestinal; el jugo de las hojas frescas es un remedio para úlceras y la decocción de las hojas o la corteza se usa para la fiebre (Cordero y Boshier, 2003).

Engels (2012) reporta que frutas y otras partes del árbol de *Spondias purpurea* y especies relacionadas se han utilizado también para el tratamiento de diversas enfermedades tales como diarrea, úlceras, aftas, la disentería, y la hinchazón; mientras los extractos de hojas acuoso y metanólico, presentan propiedades antibacterianas.

Benavides (1994) indica que las hojas, corteza, brotes tiernos, resina y jugo de frutos, se usan para casos de fiebres, diarreas, disolver piedras de la vesícula, como vermífugo, y diurético, para enfermedades de los ojos, como astringentes, como remedio para aftas, para tumores en infantes. Para combatir disentería amebiana para la ictericia, y como antiespasmódico para torceduras y traumatismo.

2.8.7 Distribución en México de *Spondias purpurea* L.

S. purpurea junto con las especies *Spondias mombin* y *S. radolkoferi* son nativas de México y forman parte de los bosques tropicales subcaducifolios, bosques de galería y bosques tropicales caducifolios respectivamente *S. mombin* y *S. purpurea* tienen una distribución natural como se muestra en la (Fig. 7 A y B) que va desde Sinaloa hasta Chiapas en la vertiente del Pacífico y desde Tamaulipas hasta la península de Yucatán en la vertiente del Golfo de México (Ruenes, 2010).

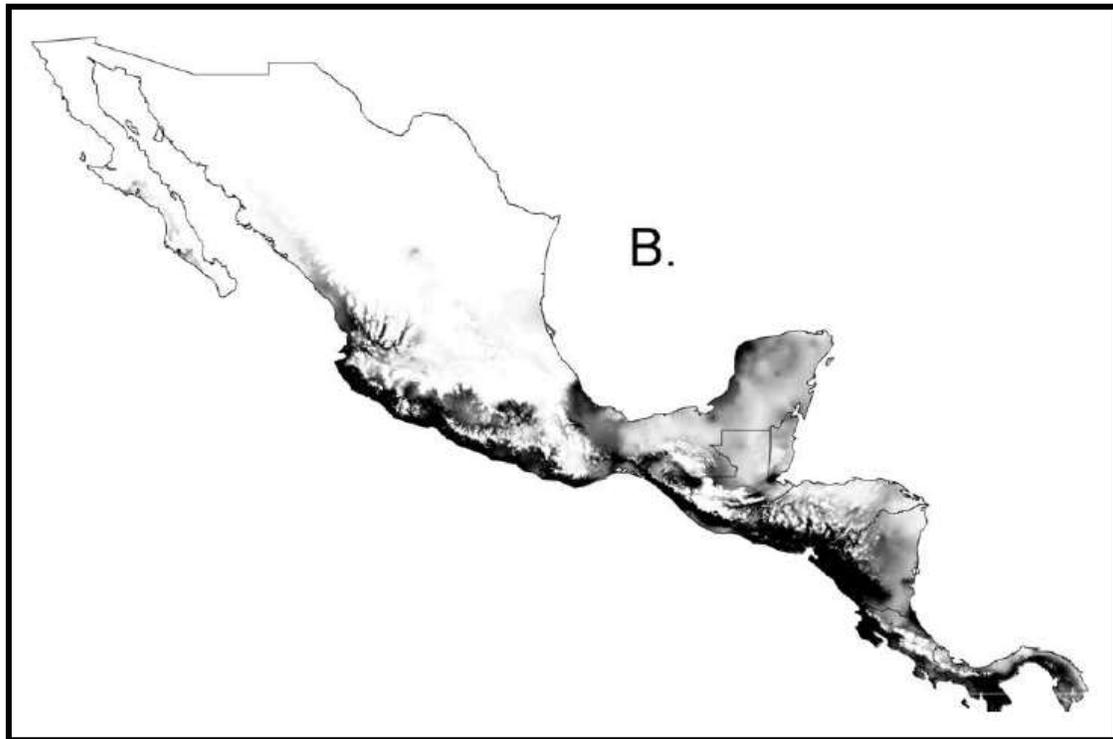
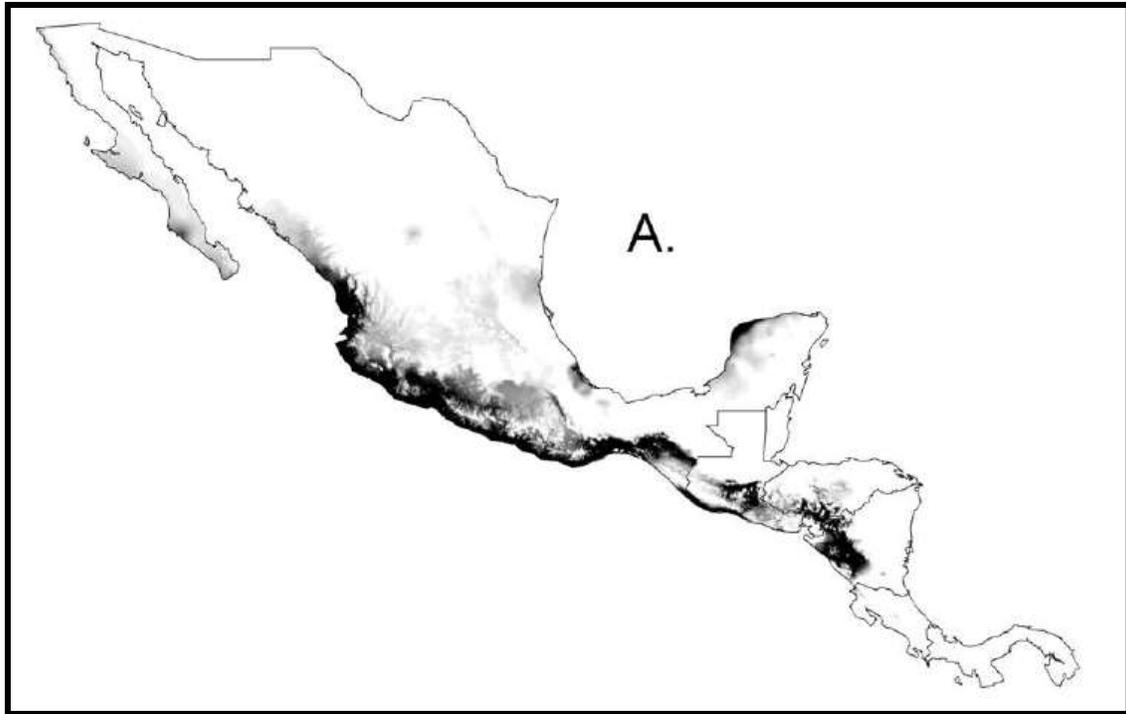


Fig. 7 Distribución de *Spondias purpurea* L. En Mesoamérica (A) silvestres (B) cultivadas en. Las distribuciones se presentan como las probabilidades acumuladas relativas de la presencia de especies. Zonas más claras representan las regiones con menor ocurrencia, mientras que las zonas más oscuras representan las regiones con mayor ocurrencia Tomado de (Miller y Knouft, 2006).

2.9 Estudios químicos

2.9.1 Estudios químicos realizados en especies de la familia *Anacardiaceae*

Cerca del 25% de los géneros de esta familia son conocidos por ser tóxicos, ya que presentan sustancias como catecoles, resorcinoles o una mezcla de estas sustancias llamadas lípidos fenólicos. Estas sustancias pueden estar presentes en diferentes partes de la planta, principalmente en el género *Rhus*. Se cree que el 50-60% de los estadounidenses sufren dermatitis causada por *Rhus radicans* ("hiedra venenosa"), *Rhus diversibolum* ("el roble venenoso"), *R. vernix* y *R verniciflua*. Estas especies tienen una oleorresina conocido en Occidente como urushiol. La resina se forman mediante la mezcla de n-alkilcatecoles con cadena lateral con 15 y 17 átomos de carbono de los cuales 3-n- alquencil catecoles son los más frecuentes. De modo general las especies tóxicas de esta familia están restringidas a las tribus (*Anacardieae*, *Dobineae*, *Semecarpeae* y la mayoría de los géneros de la tribu *Rhoeae* (Aguilar *et al.*, 2003; Correia *et al.*, 2006).

Desde el punto de vista químico, los géneros más estudiados de esta familia son *Mangifera*, *Rhus* (*Toxicodendron*), *Anacardium*, *Spondias*, *Lannea*, *Semecarpus*, *Schinus*, *Pistacia*, *Lithraea*, *Melanorrhoea* y *Tapirira*. Los estudios de estas especies han permitido verificar la presencia de flavonoides del tipo biflavonoides, terpenos, esteroides, xantonas, y sustancias responsables de las propiedades tóxicas. Se informó también el aislamiento de otros metabolitos secundarios derivados de ácidos cinámicos y fenoles y la presencia de los únicos alcaloides presentes en la familia en el género *Dracontomelum* (Correia *et al.*, 2006).

2.9.2 Estudios químicos realizados en especies del género *Spondias*

Se reportó la presencia de 21 compuestos en la cáscara de los frutos de *Spondias purpurea*, entre los cuales se encuentran flavonoides del tipo flavonoles, tales como la quercetina, rhamnetina, kaempferol y kaempferida, glicósidos de quercetina, glicósidos de kaempferol, glicósidos de rhamnetina y ácidos fenólicos (Engels *et al.*, 2012). (Tabla 1)

Garduño (2009) reportó en el extracto hexánico de hojas de *Spondias purpurea* obtenido por maceración los siguientes compuestos: β -pineno, estragol, α -copaeno, metil eugenol, β -cariofileno, aromadendreno, α -humuleno, β -cadineno, farnesol, *trans*- β -óxido de cariofileno, isofitol, ácido linoléico, condriolaesterol y en el extracto metanólico de hojas de *Spondias purpurea* se encuentra β -

cadineno, éster metílico del ácido palmítico, ácido hexadecanoico, éster metílico del ácido linoléico, 9,12,15-ácido octadecatrienoico, isofitol, ácido linoléico, ácido esteárico, fenol 3-pentadecil, heptadecadienil fenol, erucilamida, escualeno, δ -tocoferol y β -tocoferol algunos de estos compuestos se muestran en el (Tabla 1).

Estudios realizados sobre los compuestos volátiles en la pulpa de los frutos de *Spondias purpurea*, mostraron la presencia de 27 compuestos entre los cuales se encuentran alcoholes como: etanol, 1-butanol, 3-hexen-1-ol, 2-hexen-1-ol, 1-hexanol; aldehídos, ésteres como: acetato de etilo, propionato de etilo, crotonato de etilo, caproato de metilo, caproato de etilo, benzoato de etilo entre otros; cetonas, compuestos terpénicos como limoneno y copaeno como se muestran en el (Tabla 1). En la pulpa de los frutos de *Spondias lutea*, se hallaron 34 compuestos entre los cuales se encuentran alcoholes como: etanol, 1-butanol, prenol y 1-hexanol; aldehídos, ésteres como: propionato de etilo, acetato de etilo, butirato de etilo, butirato de butilo, caproato de etilo; cetonas, compuestos terpénicos como: canfeno, limoneno, ocimeno, geranol, β -mirceno, β -linalol, α -terpinol y otros compuestos como ácido acético, ácido palmítico (Augusto *et al.*, 2000).

Corthout *et al.*, (1994) reportó la presencia de una serie de ácidos 6-alquenil-salicílico, estos fueron aislados del extracto etanólico de hojas y tallos de *Spondias mombin*, los ácidos identificados fueron: 6-(8'Z,11'Z,14'Z-heptadecatrienil)-salicílico, 6-(8'Z,11'Z-heptadecadienil)-salicílico, 6-(10'Z-heptadecenil)-salicílico, 6-(12'Z-nonadecenil)-salicílico y 6-(15'Z-heneicosenil)-salicílico.

Del extracto metanólico de hojas de *Spondias purpurea* se aisló el ácido 2-hidroxi-6-(Z-pentadec-8'-enil)-benzoico, también se identificaron los compuestos volátiles presentes en las hojas, donde se reportó la presencia de 88 compuestos de los cuales se identificaron 43 mayoritarios, de los cuales, los que se encuentran en mayor presencia son: el 2-hexenal, benzaldehído, el ácido hexanoico, el salicilato de metilo y el 1-nonen-3-ol (Mendoza, 2010).

Del Valle (2009) reportó en la fracción hexánica del extracto metanólico del endocarpo (huesos) de *Spondias purpurea* la presencia del ácido 2-hidroxi-6-(Z-pentadec-8'-enil)-benzoico y también reporta los constituyentes más abundantes en el aceite de los frutos, los cuales fueron: benzaldehído, metoximetilbenceno, nonanal, α -cubebeno y salicilato de metilo. Por otra parte, en el aceite esencial de las hojas los constituyentes mayoritarios, fueron: 2-hexenal, 6-metil-5-hepten-2-ona, nonanal,

cariofileno, eugenol, 3-hexen-1-ol, alcohol bencílico, salicilato de metilo, benzaldehído y ácido hexanoico.

Ceva-Antunes (2006) reportó los compuestos volátiles obtenidos de la pulpa de *Spondias purpurea* donde los ésteres son la clase principal de compuestos obtenidos, se identificaron acetato de etilo, butirato de butilo, caproato de etilo, acetato de hexilo, benzoato de metilo; seguidos por aldehídos hexanol, 3-hexen-1-ol, trans-2-hexenal, 2-hexen-1-ol, acetato de hexilo y acetato de etilo también se encontraron alcoholes simples como: 3-hexen-1-ol, 2-hexen-1-ol, hexanol, 1-octen-3-ol, también se identificaron acetofenona, y monoterpenos como limoneno, *tran*- β -ocimeno. Koziol y Macía (1998) reportan una gran cantidad de compuestos volátiles obtenidos de los frutos de *Spondias purpurea*, entre los que se encuentran: hexanol, 2-hexanol, acetato de 3-metilbutilo, acetato de 4-pentenilo, acetato de 3-metil-2-butenol, 2-heptanol, 2,6,6-trimetil-2-etilenetetrahidro-2H-pirano, 2,4-heptadienol, acetato de 3-hexenol, fenil acetaldehído, α -pineno, benzoato de metilo, α -terpinoleno, benzoato de etilo, octanoato de etilo, decanoato de etilo, dodecanoato de etilo, ácido tetradecanoico, tetradecanoato de etilo, ácido hexadecanóico como se observan en el (Tabla 1).

Estudios realizados en los exudados de la goma de *Spondias purpurea*, *Spondias dulcis*, *Spondias mombin*, *Spondias cytherea*, *Spondias purpurea var. Lutea* coinciden en la composición de los exudados, cuyos constituyentes mayoritarios son la galactosa, arabinosa, manosa, xilosa, ramnosa y residuos de ácido urónico; los ácidos de azúcar están representados por ácidos galacturónicos, ácidos glucorónicos (Pinto *et al.*, 1995; Pinto *et al.*, 1996; Pinto *et al.*, 2000; Pinto *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2003; Gutiérrez *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2008).

Asimismo se han realizado estudios para conocer el valor nutricional de especies como *Spondias mombin* en los que se encontraron algunos carotenoides como: luteína, zeinoxantina, β -criptoxantin, α -caroteno y β -caroteno (Hauck *et al.*, 2011).

Tabla 1. Algunos compuestos aislados de *Spondias purpurea* L.

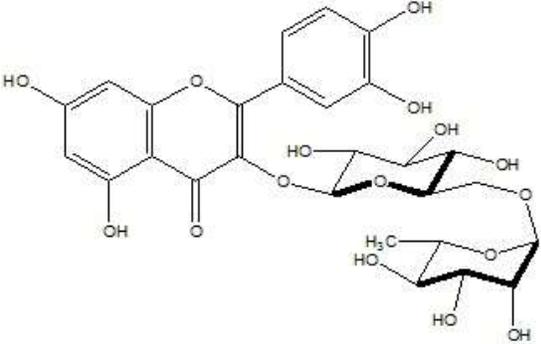
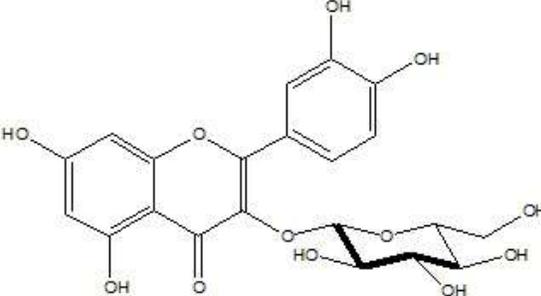
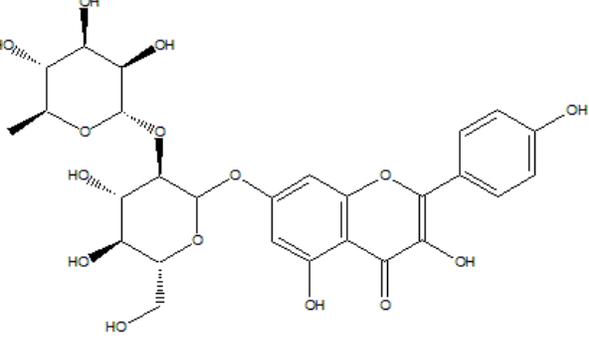
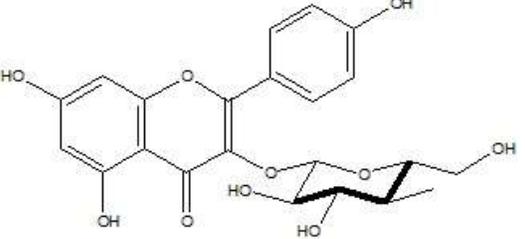
Compuesto	Parte de la planta	Referencia
 <p>Rutin</p>	Cáscara de los frutos	Engels <i>et al.</i> , 2012
 <p>Isoquercetina</p>	Cáscara de los frutos	Engels <i>et al.</i> , 2012
 <p>Kamferol 3-O- rutinosido</p>	Cáscara de los frutos	Engels <i>et al.</i> , 2012
 <p>Astragalín</p>	Cáscara de los frutos	Engels <i>et al.</i> , 2012

Tabla 1. Algunos compuestos aislados de *Spondias purpurea* L. (Continuación)

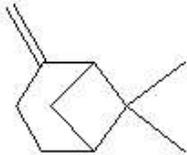
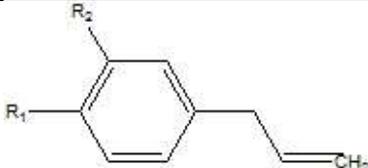
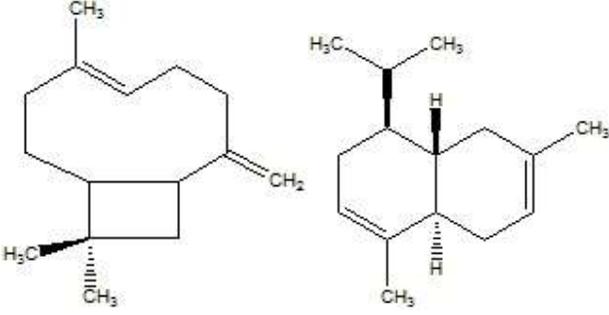
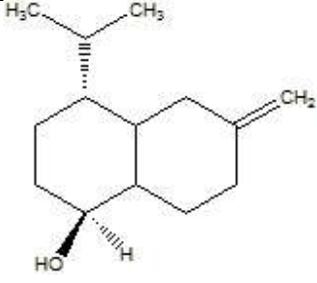
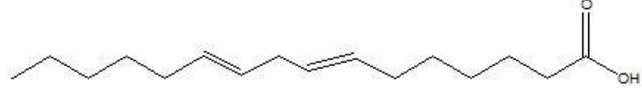
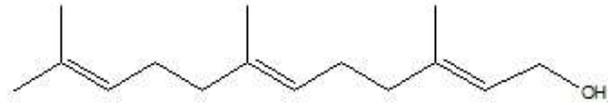
 <p>β-pineno</p>	<p>Extracto hexánico de hojas</p>	<p>Garduño; 2009</p>
 <p>Estragol= $R_1 = OCH_3$ Metil eugenol = $R_1 = OCH_3$ $R_2 = OCH_3$</p>	<p>Extracto hexánico de hojas</p>	<p>Garduño; 2009</p>
 <p>β-cariofileno β-cadineno</p>	<p>Extracto hexánico de hojas</p>	<p>Garduño; 2009</p>
 <p>β-cadinol</p>	<p>Extracto hexánico de hojas</p>	<p>Garduño; 2009</p>
 <p>Ácido linoleico</p>	<p>Extracto Metanólico de hojas</p>	<p>Garduño; 2009</p>
 <p>Farsenol</p>	<p>Extracto hexánico de hojas</p>	<p>Garduño; 2009</p>

Tabla 1. Algunos compuestos aislados de *Spondias purpurea* L. (Continuación)

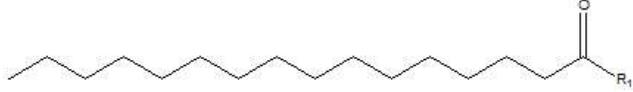
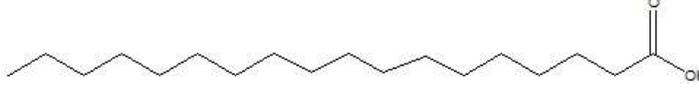
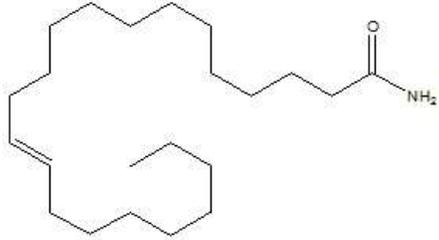
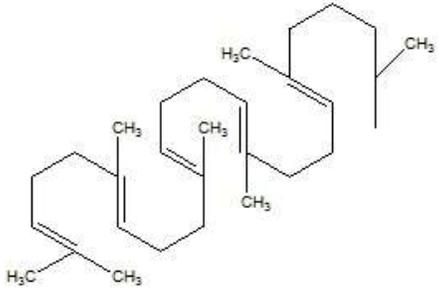
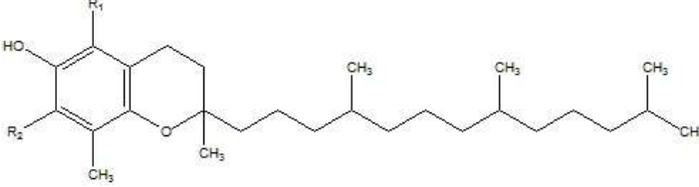
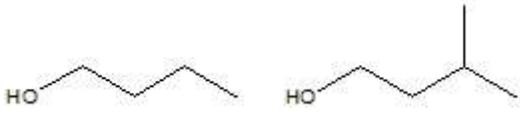
 <p>1* Ácido Palmítico = R₁ = OH 2* Metil ester del ácido palmítico = R₁ = OCH₃</p>	<p>1* Extracto hexánico y metanólico de hojas 2* Extracto Metanólico</p>	<p>1* Garduño; 2009 Augusto <i>et al.</i>, 2000 2* Garduño; 2009</p>
 <p>Ácido estearico</p>	<p>Extracto Metanólico de hojas</p>	<p>Garduño; 2009</p>
 <p>Erucilamida (Dococenamida)</p>	<p>Extracto Metanólico de hojas</p>	<p>Garduño; 2009</p>
 <p>Escualeno</p>	<p>Extracto Metanólico de hojas</p>	<p>Garduño; 2009</p>
 <p>β-Tocoferol = R₁ = CH₃ R₂ = H δ-Tocoferol = R₁ = H R₂ = H</p>	<p>Extracto Metanólico de hojas</p>	<p>Garduño; 2009</p>
 <p>1-butanol Alcohol isoamílico</p>	<p>Pulpa de los frutos</p>	<p>Augusto <i>et al.</i>, 2000</p>

Tabla 1. Algunos compuestos aislados de *Spondias purpurea* L. (Continuación)

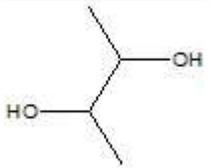
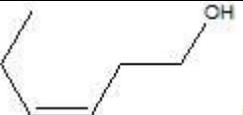
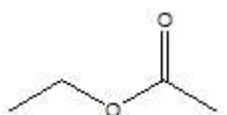
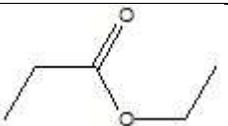
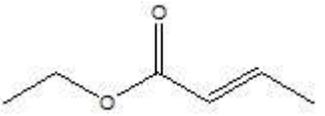
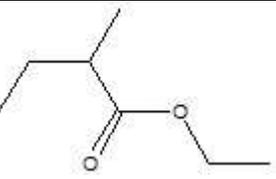
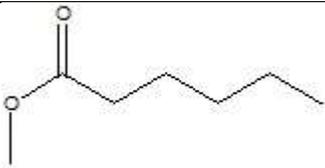
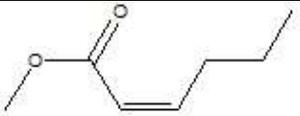
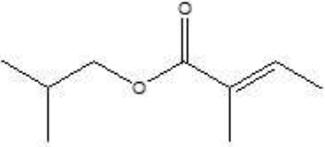
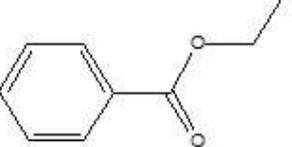
 <p>Alcohol amilico</p>  <p>2,3-butanodiol</p>	Pulpa de los frutos	Augusto <i>et al.</i> , 2000
 <p>3-Hexen-1-ol</p>  <p>1-Hexanol</p>	Pulpa de los frutos	Augusto <i>et al.</i> , 2000
 <p>Acetato de etilo</p>  <p>Propionato de etilo</p>	Pulpa de los frutos	Augusto <i>et al.</i> , 2000
 <p>Crotonato de etilo</p>  <p>2-metilbutirato de etilo</p>	Pulpa de los frutos	Augusto <i>et al.</i> , 2000
 <p>Acetato isoamilico</p>  <p>Caproato de metilo</p>	Pulpa de los frutos	Augusto <i>et al.</i> , 2000
 <p>2-hexanoato de metilo</p>  <p>Caproato de etilo</p>	Pulpa de los frutos	Augusto <i>et al.</i> , 2000
 <p>2-metilcrotonato de isobutilo</p>  <p>Benzoato de etilo</p>	Pulpa de los frutos	Augusto <i>et al.</i> , 2000

Tabla 1. Algunos compuestos aislados de *Spondias purpurea* L. (Continuación)

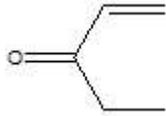
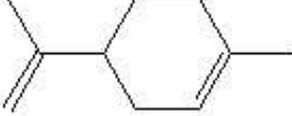
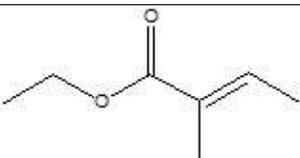
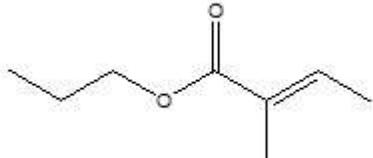
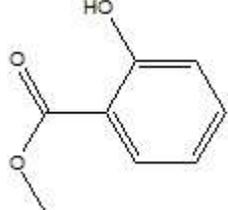
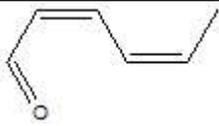
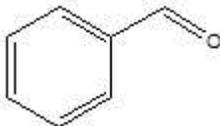
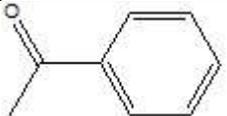
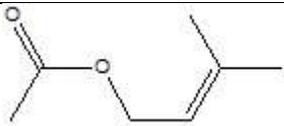
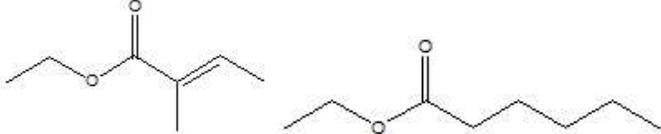
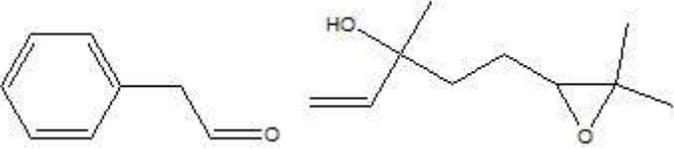
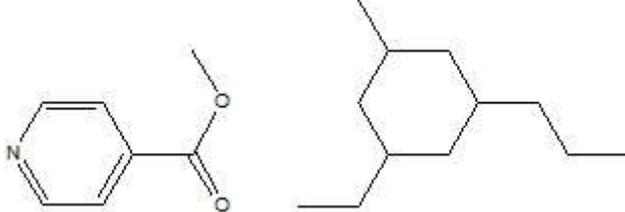
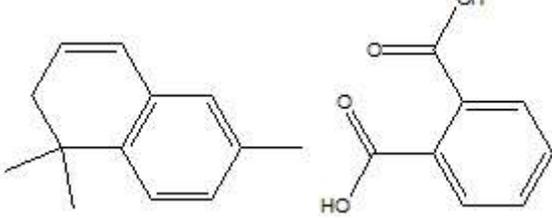
 <p>1-penten-3-ona</p>	 <p>Limoneno</p>	Pulpa de los frutos	Augusto <i>et al.</i> , 2000
 <p>Tiglato de etilo</p>	 <p>Acetato de hexilo</p>	Pulpa de los frutos	Ceva-Antunes <i>et al.</i> , 2006
 <p>Tiglato de propilo</p>	 <p>2-hidroxibenzoato de metilo</p>	Pulpa de los frutos	Ceva-Antunes <i>et al.</i> , 2006
 <p><i>Trans</i>-2-pental</p>	 <p>2,4-hexadienal</p>	Pulpa de los frutos	Ceva-Antunes <i>et al.</i> , 2006
 <p>Benzaldehido</p>	 <p>1-Octen-3-ol</p>	Pulpa de los frutos	Ceva-Antunes <i>et al.</i> , 2006
 <p>Acetofenona</p>		Pulpa de los frutos	Ceva-Antunes <i>et al.</i> , 2006
 <p>3-metilbutil acetato</p>	 <p>3-metil-2-buten-1-ol-acetato</p>	frutos	Koziol y Macía; 1998

Tabla 1. Algunos compuestos aislados de *Spondias purpurea* L. (Continuación)

 <p>Etil 2-metil but-2-enoato Hexanoato de etilo</p>	Frutos	Koziol y Macía; 1998
 <p>Fenilacetaldehido Oxido de linalool</p>	Frutos	Koziol y Macía; 1998
 <p>4-piridinecarboxilato de metilo 3-etil-5-metil-1-propil ciclohexano</p>	Frutos	Koziol y Macía; 1998
 <p>Octanoato de etilo</p>	Frutos	Koziol y Macía; 1998
 <p>1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftaleno Ácido 1,2-dihidronaftaleno</p>	Frutos	Koziol y Macía; 1998

3. JUSTIFICACIÓN

Los estudios etnobotánicos de *Spondias purpurea* L. atribuyen a esta especie propiedades medicinales, principalmente para infecciones ocasionadas por bacterias, las cuales son tratadas ocupando distintas partes de la planta, razón por la cual ha sido fuente de estudio para la identificación de los compuestos responsables de dicha acción. Los estudios fitoquímicos se han realizado principalmente en el fruto y algunos estudios en hojas, así como en los exudados de la madera; sin embargo, no existen estudios químicos reportados en la corteza. Por esta razón en el presente trabajo se llevó a cabo un estudio químico de la corteza de *Spondias purpurea* L. y la evaluación de su actividad bactericida.

4. HIPÓTESIS

De acuerdo a lo reportado en la literatura, las especies del género *Spondias* sintetizan una serie de metabolitos secundarios en distintas partes de la planta, entre los que destacan compuestos volátiles, polifenoles y polisacáridos, por lo cual se esperaría aislar o identificar compuestos de este tipo en la corteza de *Spondias purpurea* L. Así mismo también se ha reportado actividad bactericida en los extractos de algunas partes de *Spondias purpurea* por lo cual, se esperaría encontrar actividad de este tipo en los extractos de la corteza.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- Realizar el estudio químico de la corteza de *Spondias purpurea* L.

5.2 Objetivos particulares

- Obtener los extractos orgánicos de la corteza de *Spondias purpurea* empleando disolventes orgánicos de distintas polaridades.
- Aislar y purificar los compuestos mayoritarios
- Identificar la estructura de los compuestos mayoritarios por medio de técnicas espectroscópicas como IR, RMN¹³C, y RMN¹H
- Determinar la presencia de polifenoles y taninos, en los extractos
- Evaluar el efecto bactericida de los extractos orgánicos de la corteza de *Spondias purpurea*

6. MATERIAL Y MÉTODO

6.1 Material vegetal

La corteza fue recolectada en Morelos, México (recolectada y donada por Dr. Gustavo Ballesteros y el Dr. Artemio Cruz), la identificación del material vegetal fue realizada por la Dra. Teresa Terrazas del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBUNAM) donde se encuentra depositada una muestra de referencia. Se eligieron árboles sanos y el descortezamiento se realizó tratando de no dañar el cambium vascular (Fig. 8)



Fig. 8 A) Descortezamiento , B) trozos de corteza para secar y moler

6.2 Secado de la corteza de *Spondias purpurea* L.

Los fragmentos de la corteza fueron colocados en un cuarto de secado a una temperatura de 45 °C hasta eliminar la humedad; una vez secado completamente el material, fue molido como se muestra en la (Fig. 9) con ayuda de un molino de cuchillas.



Fig. 9 Corteza molida y seca para macerar

6.3 Obtención de los extractos orgánicos

Se realizó una extracción exhaustiva como se muestra en la (Fig. 10) a temperatura ambiente, para lo cual se tomaron 250 g de la corteza seca y molida de *Spondias purpurea* L. y se maceró con hexano, acetato de etilo (AcOEt) y metanol (MeOH) en orden ascendente de polaridad. El exceso de disolvente se eliminó en un rotavapor BUCHI CH-9230 y se obtuvieron tres extractos: hexánico, de acetato de etilo y metanólico, los extractos resultantes se colocaron en frascos previamente pesados y etiquetados para conocer por diferencia de peso la cantidad del extracto como se muestra en la (Fig. 11).

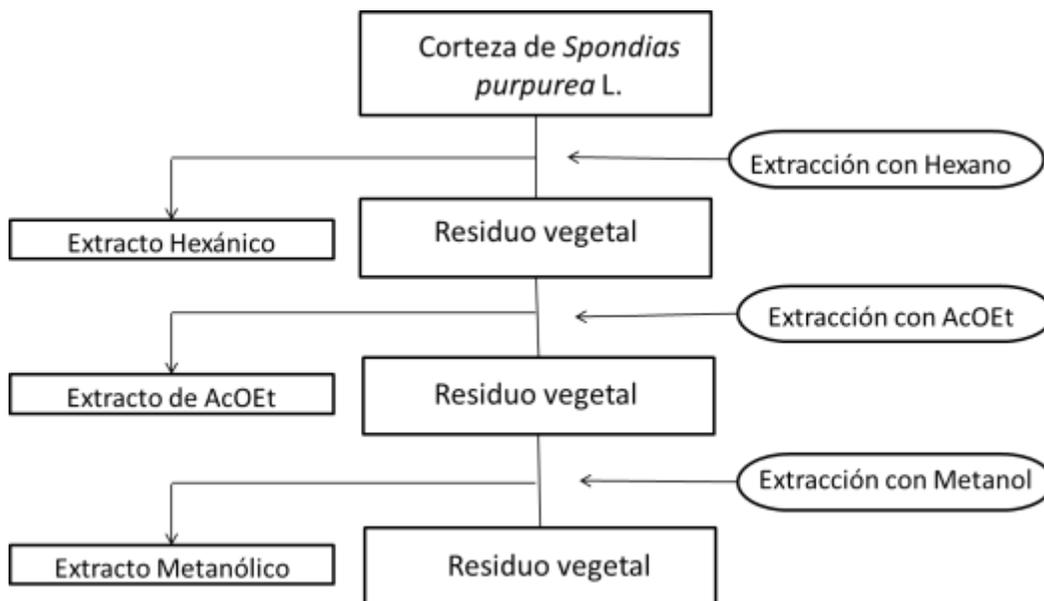


Fig. 10 Esquema del proceso de maceración de la corteza de *Spondias purpurea* L.

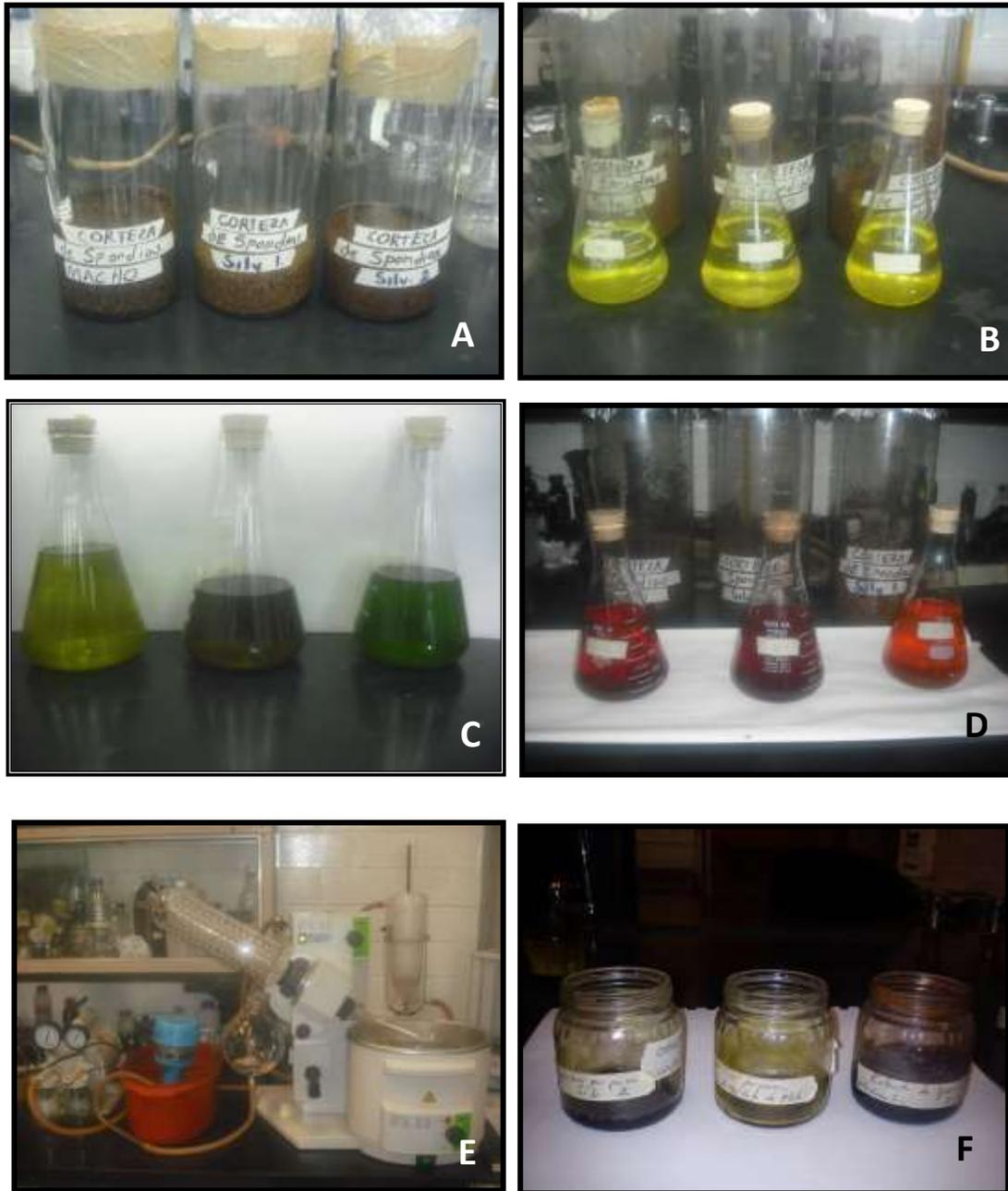


Fig. 11 A) Maceración de la corteza, B) Extractos hexánico, C) Extractos de AcOEt, D) Extractos metanólico E) Concentración de los extractos y F) Extractos pesados.

6.4 Fraccionamiento cromatográfico del extracto hexánico

El extracto hexánico (2.6 g) fue adsorbido en gel de sílice para CCF 60G, MERCK y separado por cromatografía en columna (Fig. 12) Se utilizaron como eluyentes mezclas de hexano, AcOEt y MeOH en distintas proporciones y en aumento de grado de polaridad. Tanto las fracciones obtenidas como los sistemas de elución se muestran en el (Tabla 2) se obtuvieron 122 fracciones de 25 mL cada una.

Tabla. 2 Fraccionamiento cromatográfico del extracto hexánico

Sistema de elución	Proporción	Fracciones obtenidas
hexano	100%	1-10
hexano – AcOEt	9:1	11 – 40
hexano – AcOEt	8:2	41 - 58
hexano – AcOEt	7:3	59 – 69
AcOEt	100%	70 – 74
AcOEt – MeOH	9:1	75 – 83
AcOEt – MeOH	8:2	84 – 100
AcOEt – MeOH	7:3	101 – 109
AcOEt – MeOH	1:1	110 – 115
MeOH	100%	116 – 122

6.5 Fraccionamiento cromatográfico del extracto de acetato de etilo

El extracto de AcOEt (2.2 g) fue adsorbido en el 100% de su peso en gel de sílice para CCF 60G, MERCK y separado por cromatográfica en columna (Fig. 12) Se utilizaron como eluyentes mezclas de hexano, AcOEt y MeOH en distintas proporciones y en aumento de grado de polaridad. Tanto las fracciones obtenidas como los sistemas de elución se muestran en el (Tabla 3) Se obtuvieron 119 fracciones de 25 mL cada una.

Tabla. 3 Fraccionamiento cromatográfico del extracto de acetato de etilo

Sistema de elución	Proporción	Fracciones obtenidas
hexano	100%	1 – 5
hexano – AcOEt	9:1	6 – 32
hexano – AcOEt	8:2	33 – 45
hexano – AcOEt	7:3	46 – 56
hexano – AcOEt	1:1	57 – 72
AcOEt	100%	73 – 88
AcOEt – MeOH	7:3	89 – 104
AcOEt – MeOH	1:1	105 – 112
MeOH	100%	113 – 119

6.6 Fraccionamiento cromatográfico del extracto metanólico

El extracto de metanólico (15 g) fue adsorbido en el 100% de su peso en gel de sílice para CCF 60G, MERCK y fue separado por cromatografía en columna (Fig. 12). Se utilizaron como eluyentes mezclas de hexano, AcOEt y MeOH en distintas proporciones y en aumento de grado de polaridad. Tanto las fracciones obtenidas como los sistemas de elución se muestran en el (Tabla 4) Se obtuvieron 93 fracciones de 100 mL cada una.

6.7 Reacción de hidrólisis del extracto metanólico

Se colocaron 10 g del extracto metanólico y se adiciono EtOH: HCl en proporción (2:1) respectivamente, se dejó a reflujo durante 2 hrs. y se detuvo la reacción agregando hielo, posteriormente se extrajo con AcOEt para recuperar la fase orgánica, la cual fue sometida a un fraccionamiento cromatográfico

6.8 Fraccionamiento cromatográfico de la fracción de AcOEt del extracto metanólico hidrolizado

Se adsorbieron 0.95 g de extracto de AcOEt en gel de sílice para CC y se separaron por cromatografía en columna (Fig. 13) Se utilizaron como eluyentes mezclas de hexano, AcOEt y MeOH en distintas proporciones y en aumento gradual de polaridad. Tanto las fracciones obtenidas como los sistemas de elución se muestran en el (Tabla 5) cada fracción colectada fue de 10 mL.

Tabla. 4 Fraccionamiento cromatográfico del extracto metanólico

Sistema de elución	Proporción	Fracciones obtenidas
hexano	100%	1 – 6
hexano – AcOEt	9:1	7 – 12
hexano – AcOEt	8:2	13 – 14
hexano – AcOEt	7:3	15 – 20
hexano – AcOEt	1:1	21 – 25
AcOEt	100%	26 – 33
AcOEt – MeOH	9:1	34 - 48
AcOEt – MeOH	8:2	49 – 58
AcOEt – MeOH	7:3	59 – 70
AcOEt – MeOH	1:1	71 – 81
MeOH	100%	82 – 93

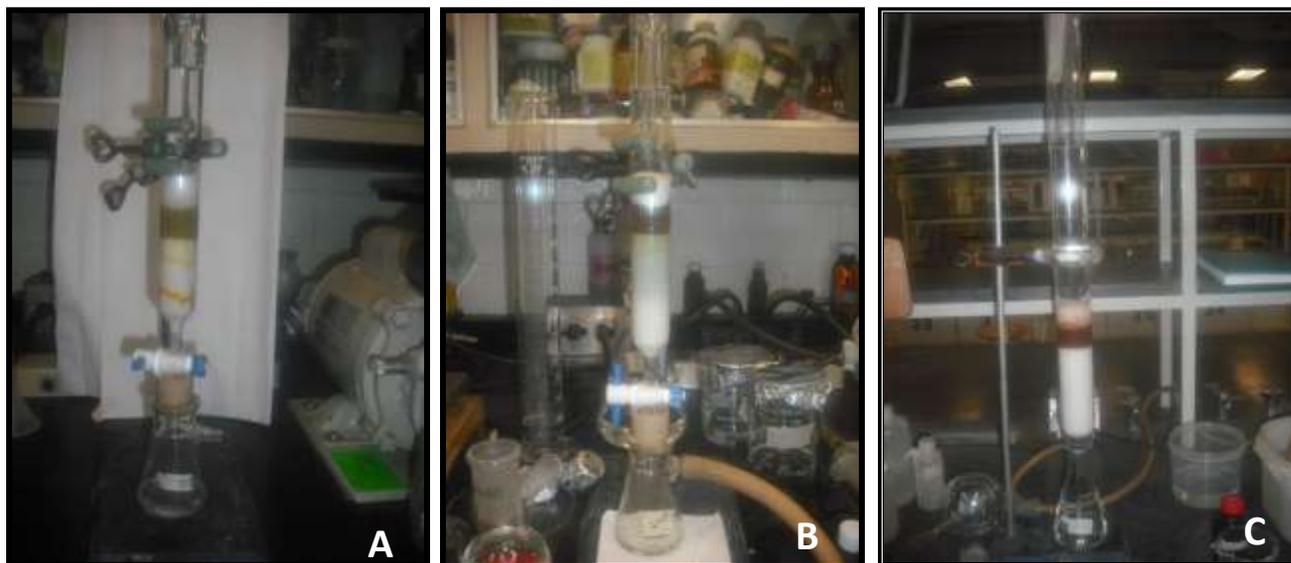


Fig. 12 Cromatografía en columna del extracto A) hexánico, B) extracto de AcOEt, C) extracto metanólico

Tabla.5 Fraccionamiento cromatográfico de la fracción de AcOEt del extracto metanólico hidrolizado

Sistema de elución	Proporción	Fracciones obtenidas
hexano: AcOEt	9:1	1 – 2
hexano: AcOEt	1:1	3 – 14
hexano :AcOEt	8:2	15 – 27
AcOEt	100%	28 – 36
AcOEt: MeOH	1:1	37- 41
MeOH	100%	42 – 48

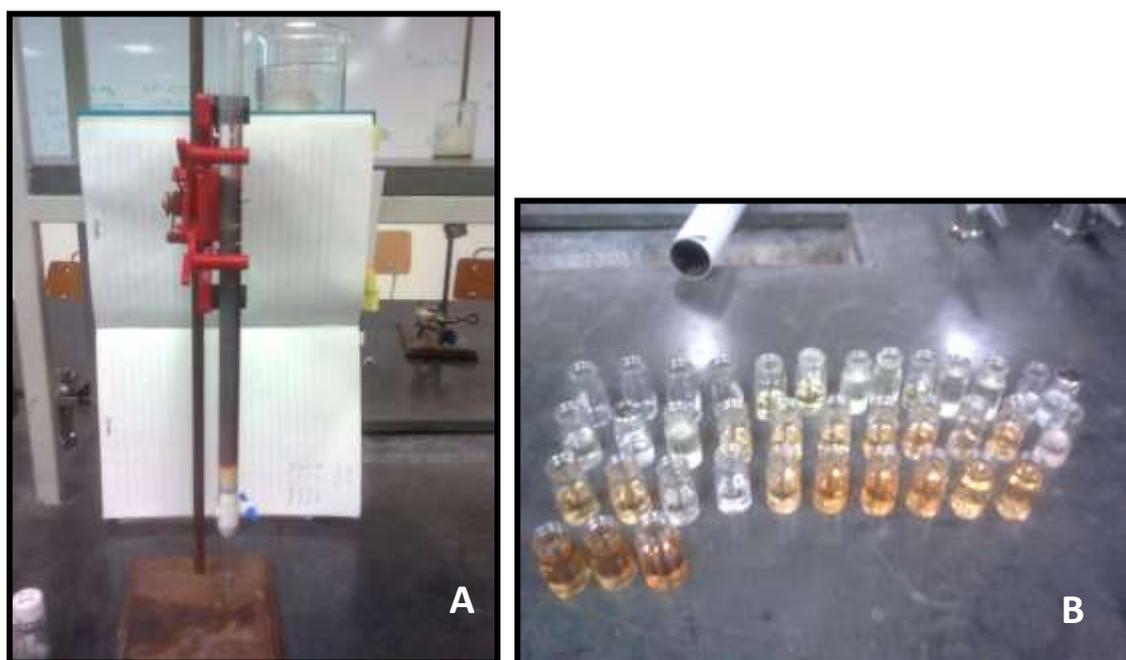


Fig. 13 A) Cromatografía en columna de la fracción de AcOEt del extracto metanólico hidrolizado, B) Fracciones obtenidas

6.9 Purificación de los compuestos

Los compuestos se purificaron por recristalización y cromatografía en columna.

6.10 Identificación de los compuestos aislados

Los metabolitos aislados fueron identificados por su p.f. y mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas tales como la RMN (^1H , ^{13}C).

6.11 Determinación de polifenoles en los extractos de AcOEt y MeOH

Se prepararon dos soluciones:

Solución A) solución acuosa al 1% de ferrocianuro de potasio y una Solución B) solución acuosa al 2% de cloruro férrico, cantidades iguales de solución A y B se mezclaron al momento de rociar la placa, y posteriormente se aplicó HCl 2N como revelador. Las placas fueron eluidas en un sistema CHCl_3 : acetona: ac. fórmico (3.5: 1: 0.5). Se determinó la presencia de polifenoles por la aparición de bandas de color azul.

6.12 Determinación de la presencia de Taninos mediante la prueba de Gelatina - sal

Se prepararon tres tubos de ensayo, a cada uno se le agregó 0.5 mL (1.25 mg) de extracto metanólico, posteriormente al primer tubo se le añadió 0.5 mL de NaCl al 0.85% p/v, al segundo se le añadió 0.5 mL de solución de gelatina al 1% p/v y al tercer tubo se le agregó una mezcla de 1 mL de gelatina al 1% más 1 mL de solución de NaCl al 0.85% p/v y de cada uno se tomó 0.5 mL para las pruebas. Se determinó la presencia de taninos por la formación de un precipitado en el tubo de ensayo.

6.13 Cuantificación de taninos por el método de yodato de potasio

6.13.1 Preparación de solución de referencia

Se utilizó el método propuesto por Camacho (2012). Se preparó una solución de referencia con ácido tánico de pureza conocida (88%) en acetona al 70 % que contenía 1 mg/mL. Se pesaron 11.36 mg de ácido tánico y se transfirió a un matraz volumétrico de 10 mL donde se disolvió y aforó con acetona al 70%, se tomó una alícuota de 0.2 mL y se colocó en un tubo de ensayo con 1 mL de yodato de potasio al 2.5% a 25°C, se agitó en un vortex durante 1 min y se calentó en baño de agua a 25°C por 7 min.

6.13.2 Preparación de la muestra

Se tomó una alícuota de 1 mL de extracto disuelto en acetona al 70% (1 mg /1 mL), se transfirió a un tubo de 5 mL y se aforó con acetona al 70%, se tomó una alícuota de 0.2 mL y se colocó en un tubo de

ensayo con 1 mL de yodato de potasio al 2.5% a 25°C, se agitó en un vortex durante 1 min y se calentó en baño de agua a 25°C por 7 min.

Transcurrido el periodo de calentamiento en baño de agua a 25°C, se determinó la absorbancia de la solución de referencia, así como de la muestra a una longitud de onda de 550 nm, utilizando una mezcla de 5 mL de yodato de potasio al 2.5 % a 25 °C y 1 mL de acetona al 70% como blanco.

La cantidad de taninos en el extracto metanólico se calculó mediante la fórmula:

$$(A_m/A_s)(C_s/V_m) \times 5 = \text{mg/mL de taninos en el extracto}$$

En donde:

Am: absorbancia de la muestra

As: absorbancia de la solución de referencia.

Cs: concentración de la solución de referencia en mg/mL

Vm: volumen de la muestra en mL.

5: factor de disolución de la muestra.

6.14 Cuantificación de lignina

Se envió una muestra de corteza seca y molida a la Facultad de Medicina y Veterinaria de la Universidad Nacional Autónoma de México, en el Laboratorio de Análisis Químicos para Alimentos.

La cuantificación de lignina se realizó mediante el método Van Soest, el cual consistió en hervir con un detergente neutro a reflujo, la muestra de corteza previamente secada, de la cual se obtuvo un residuo insoluble compuesto principalmente de celulosa, hemicelulosa, y lignina.

El residuo insoluble se sometió a reflujo con una solución detergente en medio ácido, el cual disolvió el contenido celular más la hemicelulosa, dejando un residuo insoluble compuesto principalmente por celulosa y lignina. El contenido de lignina presente en el residuo se obtuvo mediante la oxidación de compuestos orgánicos con H₂SO₄ y el porcentaje de lignina se obtuvo por diferencia de las dos fracciones anteriores.

6.15 Identificación de flavonoides por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) de los extractos de AcOEt y MeOH

El análisis de los flavonoides en cada extracto se realizó por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) por sus siglas en inglés, con un cromatógrafo Agilent 1100 provisto con un detector de UV, columna C₁₈ Hypersil ODS (125 mm x 4 mm d.i., 5 µm de tamaño de partícula). El flujo de la fase móvil se mantuvo a 1 mLmin⁻¹ y consistió de acetonitrilo - agua, pH 2.5, en proporción 15:85, a una temperatura de 30 °C. El equipo se calibró a una longitud de onda de 350 nm. Se preparó una muestra del extracto de acetato de etilo y el extracto metanólico, tomando 5 mg de extracto en 1 mL de metanol grado HPLC posteriormente 20 µL de cada muestra fueron inyectados y analizados durante 14 minutos.

Para identificar los flavonoides presentes en los extractos de AcOEt y MeOH de la corteza de *Spondias purpurea*, se usaron estándares de kaemferol, quercetina, rutina, luteolina, naringina y naringenina así como isoquercitrina y astragalina de la marca Sigma. Se prepararon soluciones estándar de tal forma que se inyectaron cinco concentraciones, desde 0.048 µg hasta 0.4 µg de cada flavonoide. Se obtuvo la curva estándar correspondiente y las interpolaciones se hicieron con el programa ChemStation de Agilent Co.

6.16 Determinación de la actividad bactericida de los extractos de la corteza de *Spondias purpurea*

Se llevó a cabo mediante la técnica de difusión en agar con discos propuesta por Kirby-Bauer en 1966. La técnica consistió en preparar el medio de cultivo con agar Müller – Hinton el cual se esterilizó en autoclave a 1.5 atm de presión durante 15 min, posteriormente se colocó en cajas Petri y una vez solidificado se inoculó el microorganismo, el cual se ajustó en el número 3 según la escala de McFarland. Posteriormente se colocaron cinco discos con la concentración conocida del extracto en cada caja Petri, los microorganismos utilizados se muestran en el (Tabla 6).

Para la evaluación de los resultados, las cajas inoculadas se incubaron por 24 hrs. a 37 °C, la actividad bactericida se determinó midiendo en mm el diámetro de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de cada disco (Rodríguez *et al*, 2005;).

Tabla 6. Microorganismos utilizados para la determinación de la actividad bactericida

Microorganismos	Descripción
<i>Bacillus cereus</i>	Gram +
<i>Bacillus subtilis</i>	Gram +
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Gram +
<i>Eschere. coli</i>	Gram -
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram +
<i>Enterobacter fecalis</i>	Gram +
<i>Streptococcus mutans</i>	Gram +
<i>Shigella flexneri</i>	Gram -
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Gram +
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Gram -
<i>Pseudomonas aureginosa</i>	Gram -

6.16.1 Preparación de los discos

Se prepararon dos disoluciones para cada extracto, una para la concentración de 200 mg (0.1 g de extracto) y otra para la concentración de 250 mg (0.125 g de extracto), los extractos secos fueron disueltos en (0.5 mL) del disolvente en el que fueron obtenidos, posteriormente se impregnaron discos de papel filtro de 6 mm de diámetro con (20 µL) para ambas concentraciones. Todo el proceso se llevó a cabo en condiciones estériles.

7. RESULTADOS y DISCUSIÓN

7.1 Aislamiento e identificación estructural del β -sitosterol

A partir de 2.6 g de extracto hexánico, el cual fue sometido a un fraccionamiento cromatográfico, se obtuvieron 122 fracciones de 25 mL, y por cromatografía en capa fina, las fracciones (20 – 23) obtenidas en un sistema de elución hexano – AcOEt (1:1) se reunieron, ya que, presentaban un perfil cromatográfico similar como se muestra en la (Fig. 14 A) y por recristalización se recuperaron 20 mg de un compuesto cristalino blanco, presentó un rendimiento de 0.76% con un p.f.= 130 - 137 °C, fue identificado como β -sitosterol (Fig. 14 B).

El IR del compuesto (Fig. 15) mostró las bandas de absorción que aparecieron en 3430.90 cm^{-1} (OH), 2937.99 cm^{-1} (CH_2), 2866.69 cm^{-1} (CH), 1640.98 cm^{-1} (C = C), 1063.67 cm^{-1} (CO), 1465.71 cm^{-1} (CH_2), 1382.54 cm^{-1} ($-\text{CH}_2(\text{CH}_3)$)

El espectro de RMN ^1H (Fig. 16) mostró las siguientes señales, en ($\text{CHCl}_3\text{-d}$, 500 MHz): δ 0.67 (3H, *s*, H-18), 0.80 (3H, *d*, $J_{27,25} = 6.2\text{ Hz}$, H-27), 0.79 (3H, *d*, $J_{26,25} = 6.2\text{ Hz}$, H-26), 0.81 (3H, *t*, $J_{29,28} = 7.4\text{ Hz}$, H-29), 0.85 (3H, *d*, $J_{21,20} = 6.5\text{ Hz}$, H-21), 0.90 (3H, *s*, H-19), 5.33 (1H, *m*, H-3), 5.34 (1H, *br.s*, H 6).

En el ANEXO I se muestran las señales para cada protón, así como una ampliación del espectro RMN ^1H

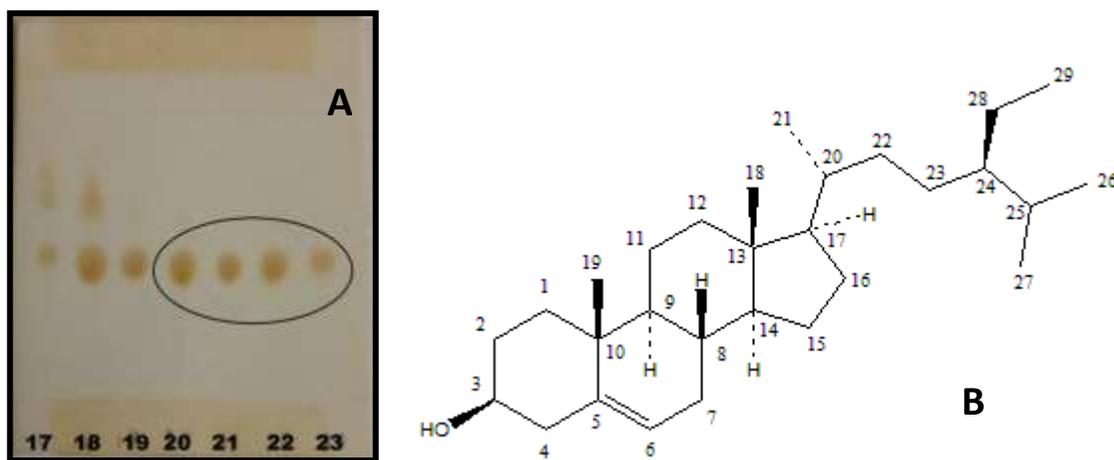


Fig. 14 A) Cromatografía en capa fina de las fracciones 17-23 del extracto hexánico de corteza de *Spondias purpurea* eluida en hexano: AcOEt (8:2) y revelada con sulfato sérico B) Estructura química β -sitosterol

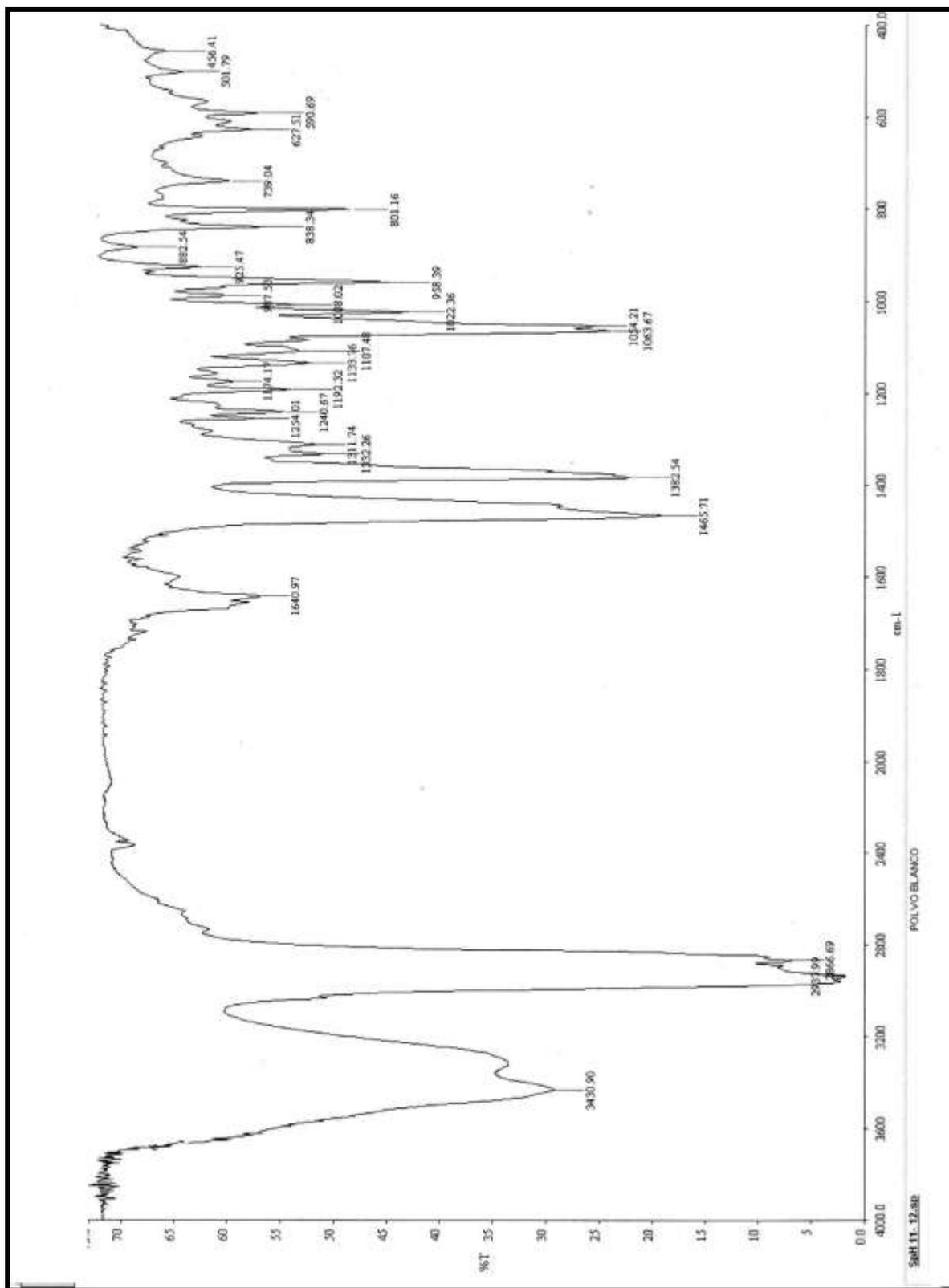


Fig. 15 Espectro del IR de β - Sitosterol

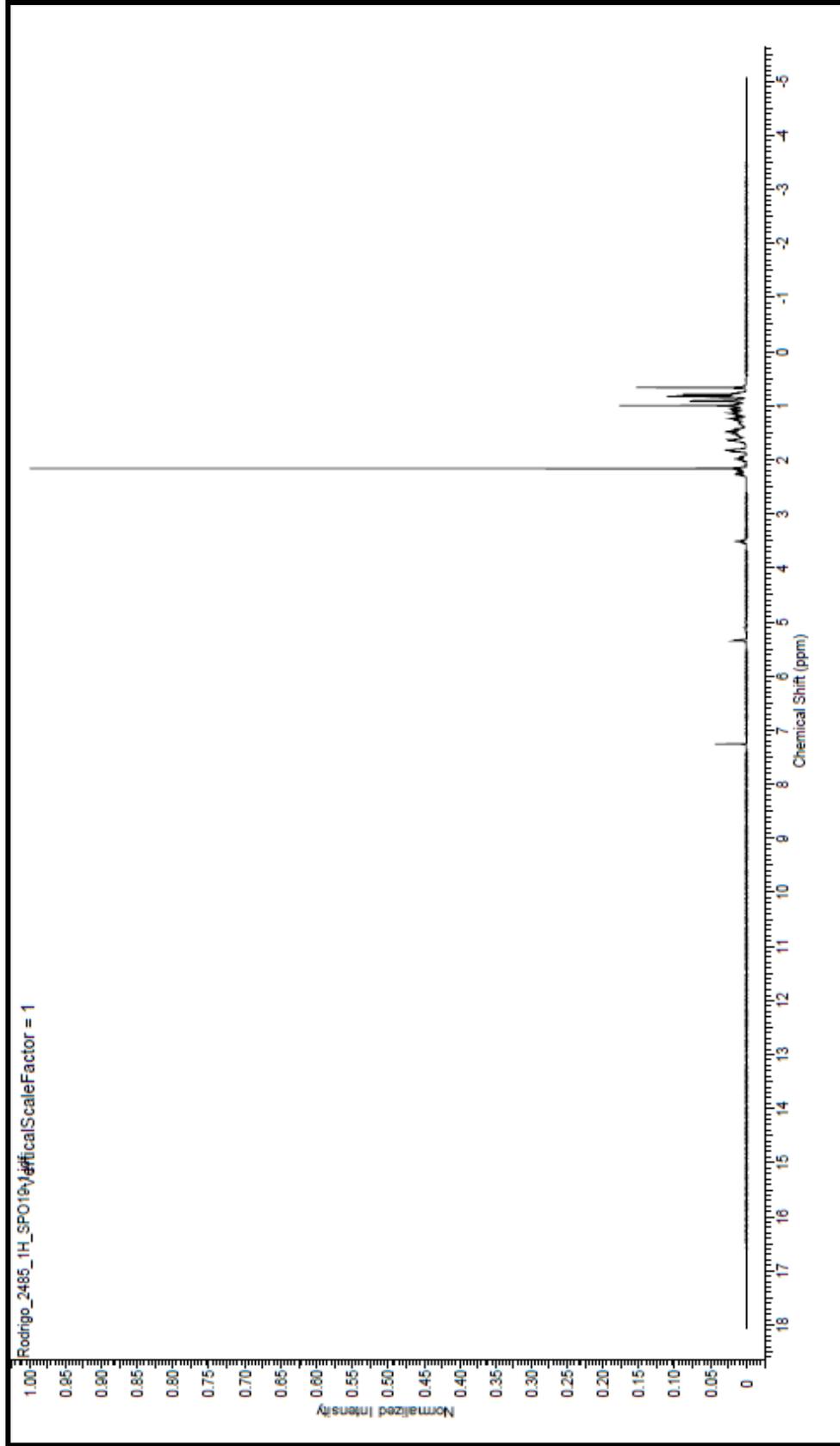


Fig. 16 Espectro de RMN ^1H de β -sitosterol

El β -sitosterol, también se ha reportado en otras partes de la planta, así como en especies del mismo género, en el (Tabla 7) se enlistan algunas especies y partes de la planta donde se ha identificado el compuesto.

Tabla 7. Especies donde se ha encontrado β -sitosterol

Espece	Parte de la planta	Referencia
<i>Spondias pinnata</i>	Partes aéreas	Das <i>et al.</i> , 2011; Prasad, 2008
<i>Spondias pinnata</i>	Pulpa de los frutos	Judprasong <i>et al.</i> , 2013
<i>Spondias purpurea</i>	Endocarpo (huesos)	Del Valle, 2009

7.2 Extractos metanólico y AcOEt

De los extractos de AcOEt y MeOH no se logró recuperar ningún compuesto por recristalización, esto puede considerarse debido a la naturaleza química de los extractos, ya que en ellos se encuentran los compuestos de mayor polaridad, dentro de estos compuestos está la presencia de polifenoles y taninos.

7.3 Determinación de polifenoles en los extractos de AcOEt y MeOH

La determinación de polifenoles dio positivo, al identificar la presencia de bandas en color azul, al ser reveladas con una solución de ferrocianuro de potasio y cloruro férrico y posteriormente con HCl 2N para intensificar el color, como se muestra en la (Fig. 17) la reacción se basó en la reducción de Fe^{+3} a Fe^{+2} debido a la presencia de polifenoles, seguido de la formación de un complejo de ferrocianuro ferroso, conocido como azul de Prusia. Lo cual indica la presencia de polifenoles principalmente en el extracto de AcOEt.

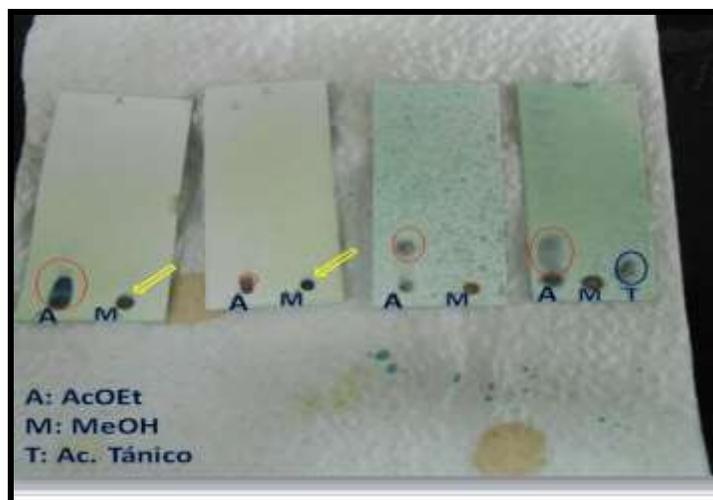


Fig. 17 Determinación de polifenoles por cromatografía en capa fina, de los extractos de AcOEt y MeOH, eluidas en un sistema CHCl_3 : acetona: ac. fórmico (3.5:1:0.5) y revelada con solución acuosa de ferrocianuro de potasio al 1%, solución acuosa de cloruro férrico al 2% y HCL 2N

7.4 Determinación de la presencia de taninos mediante la prueba de Gelatina - sal

La prueba de la gelatina - sal en los extractos de AcOEt y MeOH, mostró una presencia de taninos significativa en el extracto metanólico, como se muestra en la (Fig. 18) en comparación con el extracto de AcOEt, ya que en el extracto metanólico se observó un precipitado en concentración mayor, mientras que en el extracto de AcOEt solo se observa turbia la muestra lo cual podría significar que se encuentran en una cantidad mínima.



Fig. 18 Precipitado de taninos en los extractos de acetato de etilo y metanol.

La formación de complejos entre los taninos y las proteínas es su propiedad más básica. Químicamente esta propiedad se manifiesta con el incremento de turbidez y la disminución de las proteínas totales solubles, siendo los taninos condensados los que evidencian esta característica de manera importante, frente a los hidrolizables, que presentan una escasa actividad en la formación del turbio proteico (Álvarez, 2007).

Se ha reportado en otros estudios la presencia de taninos, obtenidos del extracto metanólico y del extracto acuoso de las raíces de *Spondias mangifera* (Acharyya *et al.*, 2011). Así mismo Das *et al.*, (2011) reporta en su estudio la presencia de taninos y compuestos polifenólicos en el extracto etanólico de la corteza de *Spondias pinnata* mediante test químicos para identificación de compuestos. Diby *et al.*, (2012) reportaron la presencia de taninos en el extracto acuoso, así como en la fracción de acetato de etilo de la corteza de *Spondias mombin*.

Aguilar *et al.*, (2012) realizaron un estudio para determinar la presencia de taninos condensados en once especies maderables, en el que encontraron que *Spondias mombin* presenta un 2% de taninos condensados en su corteza. Así mismo, también se detectó la presencia de taninos en los idioblastos del tallo de *Spondias dulcis* (Sant'anna, 2006) y Gonzales *et al.*, (2006) reporta la presencia de aproximadamente 2% de taninos en el follaje de árboles de *Spondias purpurea*.

7.5 Cuantificación de taninos por el método de yodato de potasio.

Utilizando la fórmula propuesta por Camacho (2012) se establecieron los miligramos por mililitro de muestra, tomando en cuenta que (1 mg de extracto fue disuelto en 1 mL de acetona), los resultados mostraron 0.7 mg/mL de taninos en la muestra, lo cual quiere decir que en 1 g de extracto, 700 mg corresponden a taninos.

7.6 Cuantificación de lignina

La cantidad de lignina presente en la corteza de *Spondias purpurea* corresponde al 30.1 % del peso total en seco. Estudios previos han reportado cantidades de 7.6 % en hojas de *Spondias mombin* (Mora, 2007) y 11.8 % en hojas de *Spondias mombin* (Roncayo y Buelvas, 2003).

7.7 Identificación de flavonoides por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) de los extractos de AcOEt y MeOH

Se realizó la identificación de flavonoides, ya que, estudios previos han mostrado la presencia de estos metabolitos en *Spondias purpurea*. Engels (2012) reportó la presencia de flavonoides en el exocarpo de los frutos, entre los cuales se encontraron quercetina, isoquercitrina, rutina, astragalín, rhamnina y kaempferol.

El análisis por HPLC reveló la posible presencia de flavonoides, ya que la longitud de onda utilizada fue de 350 nm, los cromatogramas de los extractos de AcOEt y MeOH mostraron algunos compuestos (Fig. 19) sin embargo, los tiempos de retención no corresponden a los estándares utilizados (Tabla 8).

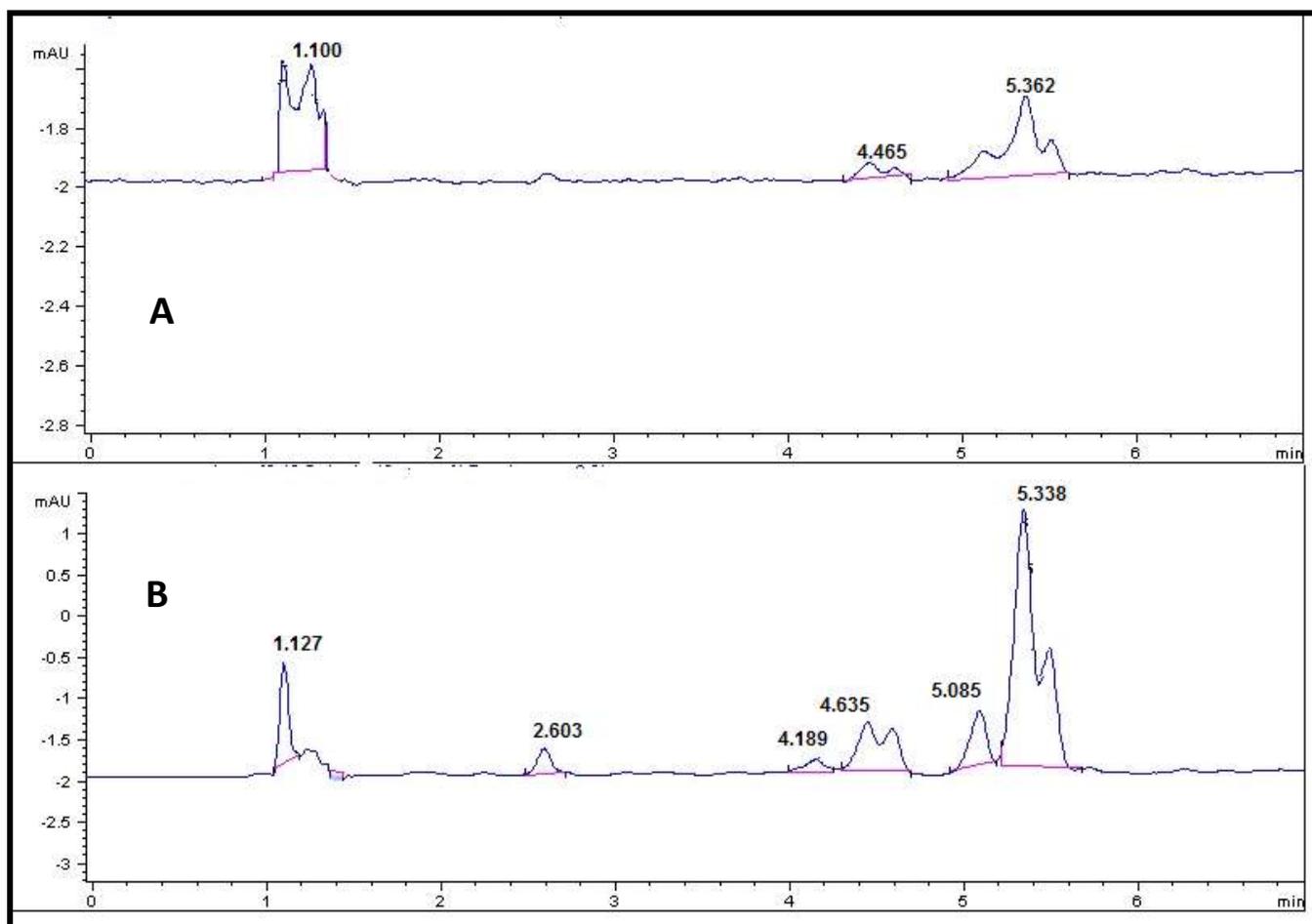


Fig. 19 A) Cromatograma del extracto de MeOH B) Cromatograma del extracto de AcOEt

Tabla 8. Estándares utilizados en HPLC para identificación de flavonoides.

Estándar	Tiempo	Estándar	Tiempo de
Rutina	3.932	Luteolina	9.0
Isoquercitrina	4.623	Quercetina	9.169
Astragalina	5.739	Naringenina	11.33
Naringina	5.85	Kaempferol	11.837

7.8 Efecto bactericida de la corteza de *Spondias purpurea*

En el (Tabla 9) se muestran los resultados de la actividad bactericida de los extractos de la corteza de *Spondias purpurea*, tanto para la concentración de 200 mg/mL como para la concentración de 250 mg/mL los cuales mostraron actividad sobre las distintas cepas.

Tabla 9. Actividad bactericida de los extractos de corteza de *Spondias purpurea*

Halo de inhibición (mm)						
Microorganismos	Concentracion (200 mg/mL)			Concentracion (250 mg/mL)		
	hexano	AcOEt	metanol	hexano	AcOEt	metanol
<i>Bacillus cereus</i>	-	10.8±0.30	10	9±0.30	8.6±0.21	-
<i>Streptococcus agalactiae</i>	9.6±0.57	10.6±0.46	12.1±1.07	9.3±0.33	10.3±0.3	10.6±0.4
<i>Streptococcus mutans</i>	9.1±0.94	8.8±0.40	10.2±0.56	8.3±0.46	8.5±0.62	10±0.26
<i>Shigella flexneri</i>	-	10.2±0.31	-	7.8±0.2	7.3±0.21	10.2±0.28
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	9.3±0.33	9.6±0.30	11±0.37
<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	-	-	20	24	16±1
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter faecalis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Ps. aureginosa</i>	-	-	-	-	-	-

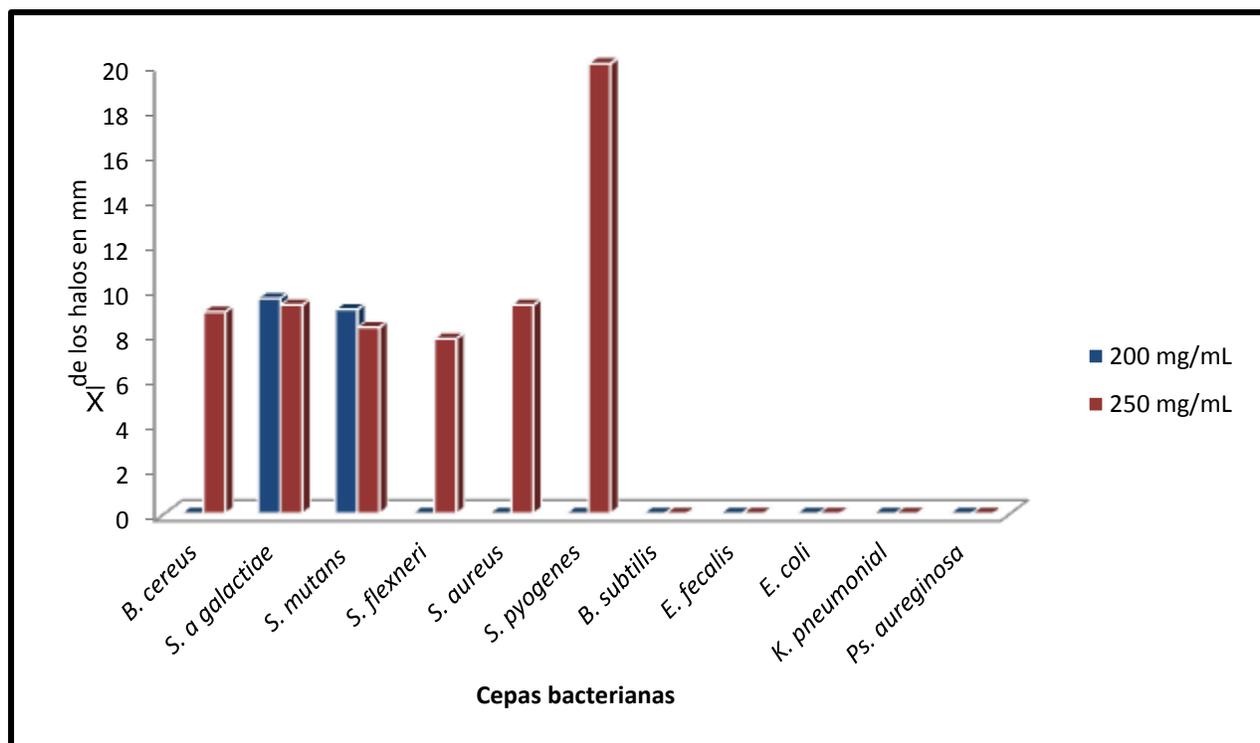
- Indica que no hay actividad bactericida

Los valores se muestran como la media ± el error estandar, n = 5

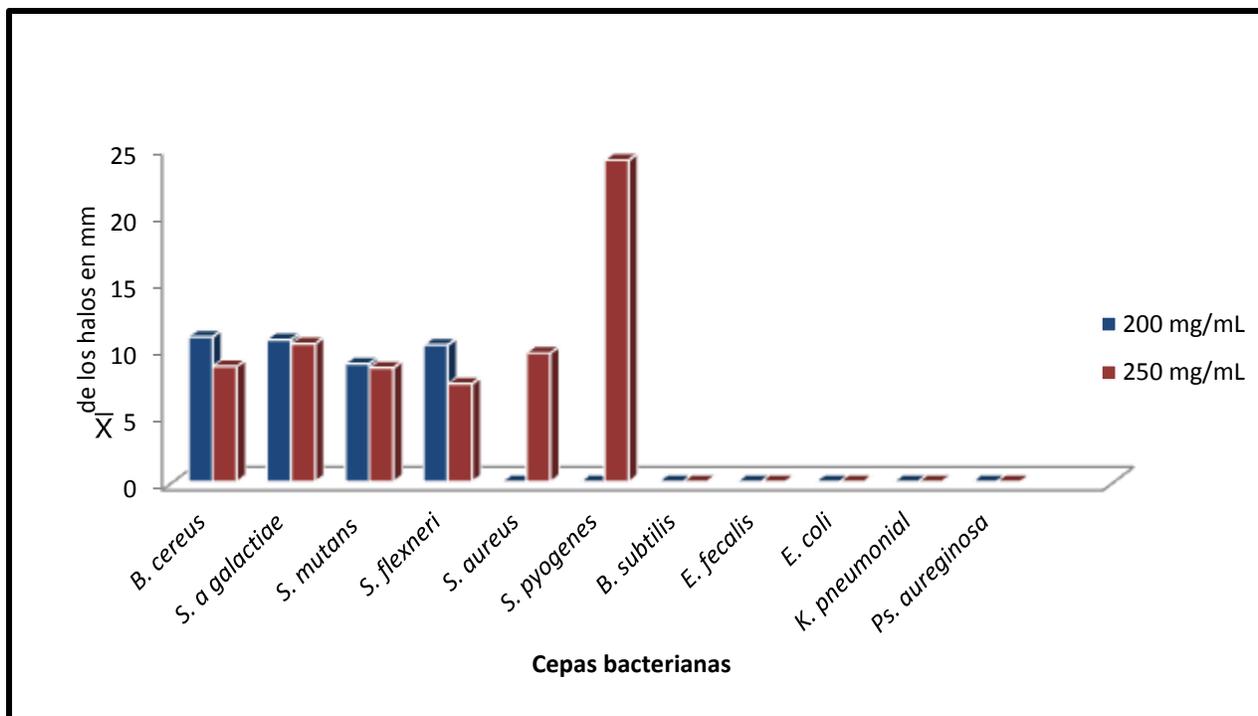
El Analisis de Varianza se muestra en el ANEXO II

Con base en la naturaleza del solvente, el extracto hexánico a una concentración de 200 mg/mL presento efecto bactericida sobre *S. agalactiae* y *S. mutans*, sin embargo a una concentración de 250 mg/mL, presento actividad sobre *B. cereus*, *B. agalactiae*, *S. mutans*, *S. flexneri*, *S. aureus* y *S. pyogenes* siendo esta última cepa contra la que mejor efecto se registró, como se muestra en la (Gráfica 1). Estudios previos realizados por Miranda *et al.*, (2012) demostraron que el extractos hexánico de hojas de *Spondias purpurea* presentó actividad frente a *B. cereus* y *S. aureus* lo cual concuerda con los resultados obtenidos para este estudio, donde se demostró que el extracto hexánico de corteza presentan actividad para ambas sepas.

El extracto de AcOEt, para la concentración de 200 mg/mL presento efecto bactericida sobre *B. cereus*, *S. agalactiae*, *S. mutans* y *S. flexneri*, mientras a una concentración de 250 mg/mL el efecto se presentó sobre *B. cereus*, *S. agalactiae*, *S. mutans*, *S. flexneri*, *S. aureus* y *S. pyogenes*; el mayor efecto se reportó sobre *S. pyogenes* (Gráfica 2) este microorganismo constituye la causa más frecuente de faringitis bacteriana.



Gráfica 1. Efecto bactericida del extracto hexánico

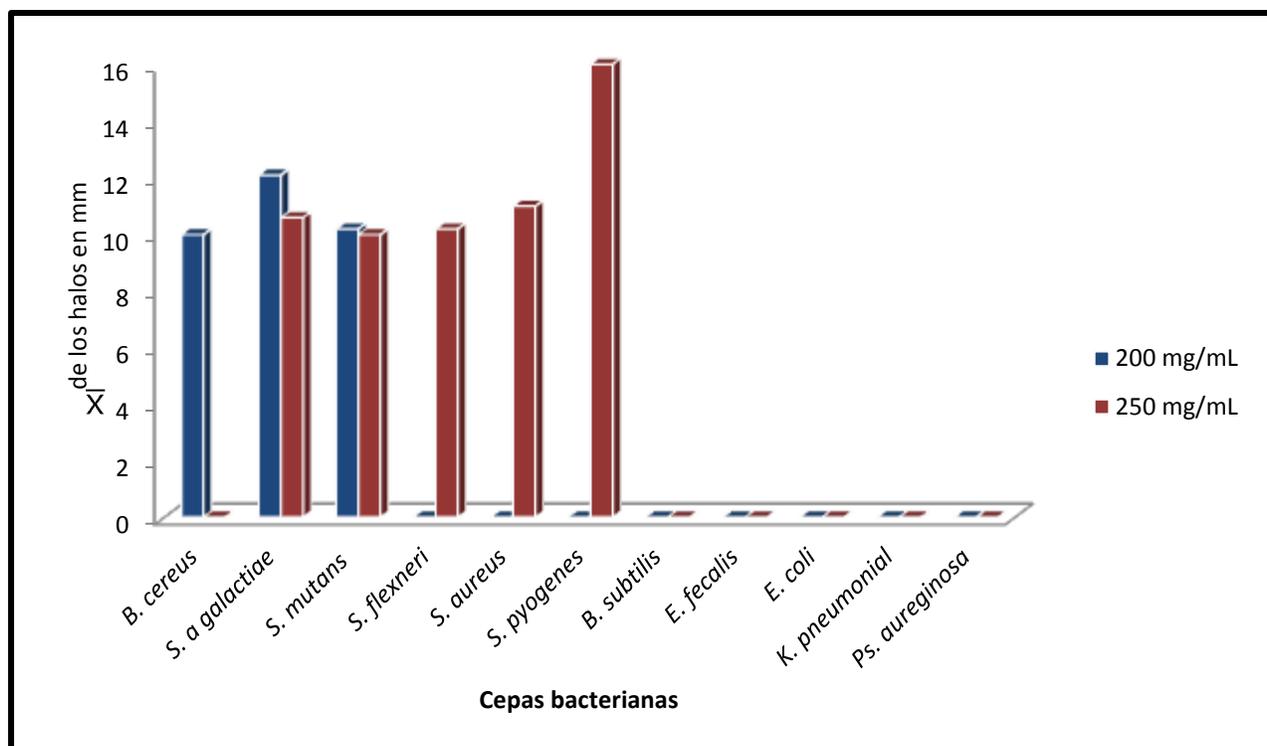


Gráfica 2. Efecto bactericida del extracto de AcOEt

El extracto metanólico mostró actividad frente a *B. cereus*, *S. agalactiae*, *S. mutans*, a una concentración de 200 mg/mL y a concentración de 250 mg/mL mostró actividad contra *S. agalactiae*, *S. mutans*, *S. flexneri*, *S. aureus* y *S. pyogenes*; al igual que en los extractos hexánico y de acetato de etilo el extracto metanólico mostro el mayor efecto sobre *S. pyogenes* como se muestra en la (Gráfica 3). Estudios previos demostraron que el extracto metanólico de hojas de *Spondias purpurea* presentó actividad contra *B. cereus* lo cual concuerda con los resultados obtenidos para este estudio (Miranda *et al*, 2012).

Los resultados obtenidos para *S. mutans* también concuerdan con lo reportado por Mendoza (2010) donde demostró que le extracto metanólico de hojas de *Spondias purpurea* es activo contra *S. mutans*.

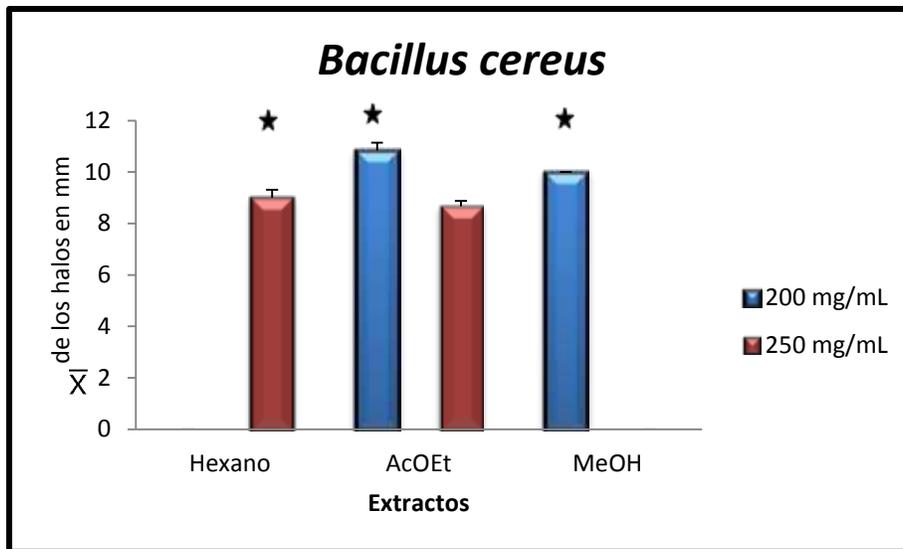
Pérez *et al.*, (2012) reportó la actividad antimicrobiana de los extractos acuosos y EtOH de hojas de *Spondias mombin* frente a *P. aeruginosa*, *E. coli*, *E. fecalis* y *S. aureus* donde el extracto acuoso mostro actividad contra las cuatro cepas y el extracto de EtOH mostro actividad en tres de las cuatro cepas excepto en *E. coli*.



Gráfica 3. Efecto bactericida del extracto metanólico

Estudios realizados en *Spondias mombin* mostraron tener efecto bactericida similar al mostrado por *Spondias purpurea*. Corthout *et al.*, (1994) determinaron la estructura de diversos ácidos fenólicos en extractos de esta *Spondias mombin* a los cuales se les evaluó la actividad antimicrobiana frente *B. cereus*, *S. pyogenes*, y *Mycobacterium fortuitum* demostrando que producían inhibición del crecimiento de dichos microorganismos.

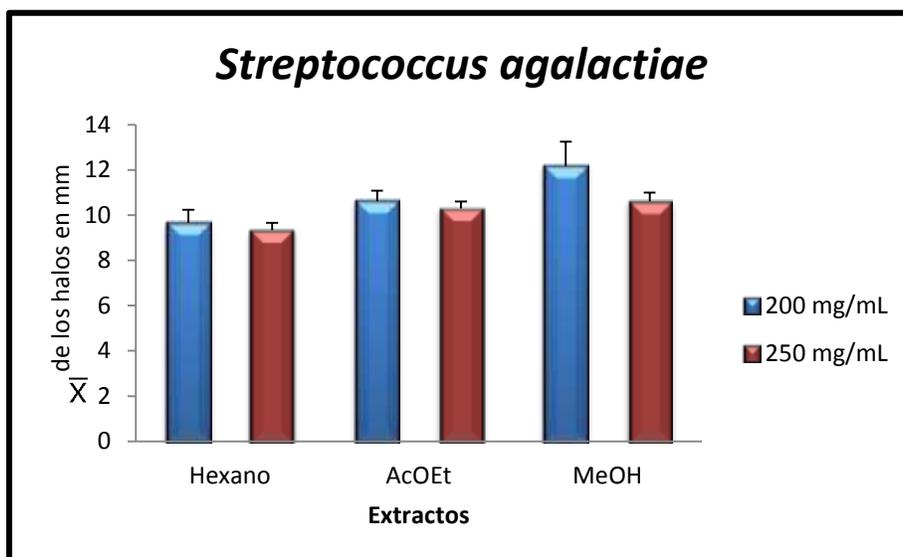
Para *Bacillus cereus* (Gráfica 4) el extracto que presentó el mejor efecto bactericida fue el extracto de AcOEt a una concentración de 200 mg/mL con una media en los halos de inhibición de 10.8 mm, con respecto a *S. agalactiae* (Gráfica 5) los tres extractos mostraron actividad en ambas concentraciones, sin embargo, se obtuvieron mejores resultados a la concentración de 200 mg/mL donde el extracto metanólico mostró el mejor efecto, al igual que en la concentración de 250 mg/mL, los halos de inhibición se muestran en la (Fig. 20).



Gráfica 4. Efecto bactericida de los extractos orgánicos sobre *Bacillus cereus*

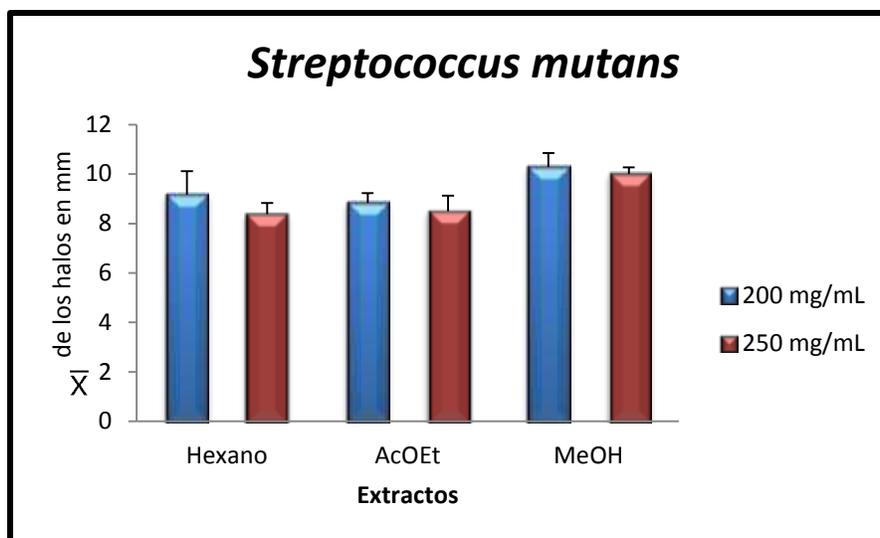
★ Indica ≠ estadística ÷ [] del mismo extracto, con $P < 0.050$.

En la (Gráfica 6) se muestra la actividad de los extractos contra *S. mutans* donde se observa que los tres extractos mostraron actividad en las dos concentraciones utilizadas; el extracto metanólico mostró el mayor efecto para ambas concentraciones, este microorganismo ha sido descrito como el principal agente causal y patógeno primario de la caries dental, una de las enfermedades infecciosas humanas más comunes (Ingraham e Ingraham, 1988).



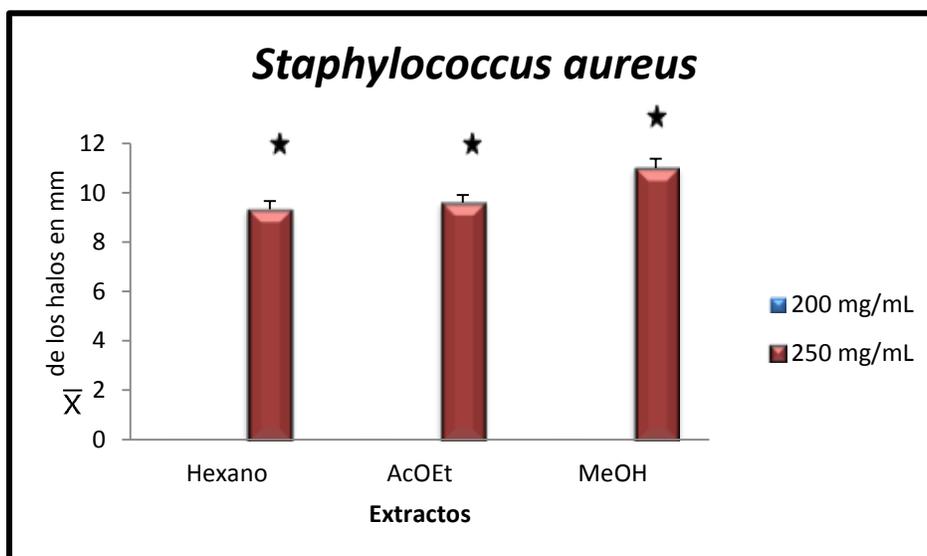
Gráfica 5. Efecto bactericida de los extractos orgánicos sobre *S. agalactiae*

No existe ≠ estadística ÷ [] del mismo extracto con $P < 0.050$.

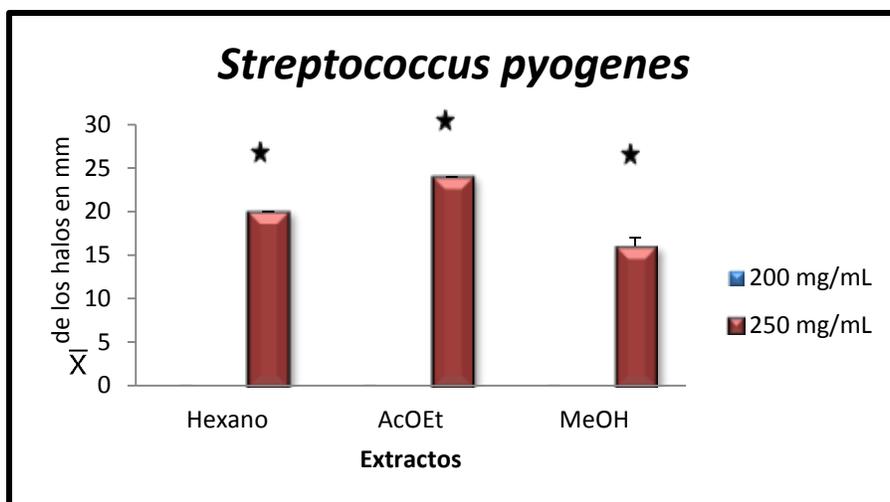


Gráfica 6. Efecto bactericida de los extractos orgánicos sobre *S. mutans*.
No existe \neq estadística \div [] del mismo extracto.

El efecto bactericida contra *S. aureus* se muestra en la (Gráfica 7) la cual mostró efecto en los tres extractos pero solo en la concentración de 250 mg/mL, mientras que en la concentración de 200 mg/mL no se registró efecto. Así mismo *S. pyogenes* (Gráfica 8) mostró un comportamiento similar, ya que, solo los extractos de la concentración de 250 mg/mL presentaron efecto bactericida, sin embargo, a diferencia de *S. aureus* en *S. pyogenes* el extracto que presentó mayor halo de inhibición (Fig. 20) fue el extracto de acetato de etilo.

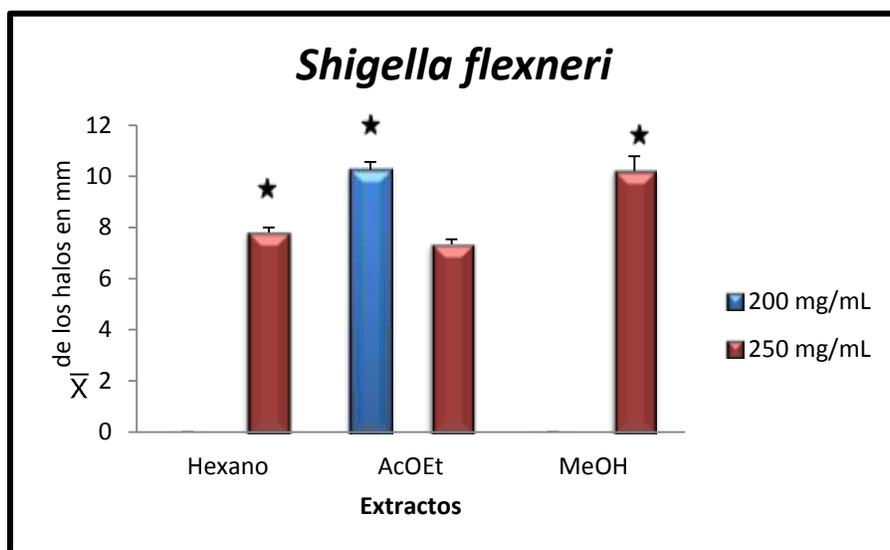


Gráfica 7. Efecto bactericida de los extractos orgánicos sobre *S. aureus*
★ Indica \neq estadística \div [] del mismo extracto, $P < 0.050$.



Gráfica 8. Efecto bactericida de los extractos orgánicos sobre *S. pyogenes*
 ★ Indica ≠ estadística ÷ [] del mismo extracto, P < 0.050.

Para *S. flexneri* (Gráfica 9) el extracto que mostró mejor actividad a una concentración de 200 mg/mL fue el extracto de AcOEt, mientras que para la concentración de 250 mg/mL el extracto metanólico mostró mayor actividad; cabe mencionar que las bacterias de este género son las responsables de causar desde diarreas leves hasta cuadros de diarrea acuosa con fiebre. Estos resultados en particular puede explicar el uso tradicional de esta especie para el tratamiento de afecciones del aparato digestivo.



Gráfica 9. Efecto bactericida de los extractos orgánicos sobre *S. flexneri*
 ★ Indica ≠ estadística ÷ [] del mismo extracto, P < 0.050.

Estudios realizados en *Spondias mombin* mostraron tener efecto bactericida similar al mostrado por *Spondias purpurea*. Corthout *et al.*, (1994) determinaron la estructura de diversos ácidos fenólicos en extractos de esta *Spondias mombin* a los cuales se les evaluó la actividad antimicrobiana frente *B. cereus*, *S. pyogenes*, y *Mycobacterium fortuitum* demostrando que producían inhibición del crecimiento de dichos microorganismos.

Como se puede observar, los extractos que presentaron un mayor efecto bactericida fueron el extracto de AcOEt y MeOH, esto se podría explicar debido a la composición química de los mismos, como se mencionó anteriormente los análisis mostraron la presencia de polifenoles y taninos. Pelczar y Reid, (1992) plantean que los taninos presentan un comportamiento antibacteriano lo cual puede explicarse sobre la base de ciertas propiedades reportadas para estos compuestos como:

La capacidad de precipitar las proteínas, fenómeno que, al ocurrir en la membrana citoplasmática bacteriana, altera la permeabilidad de la misma y por lo tanto, afecta el intercambio de sustancias nutritivas y de desecho conllevando esto a la muerte celular.

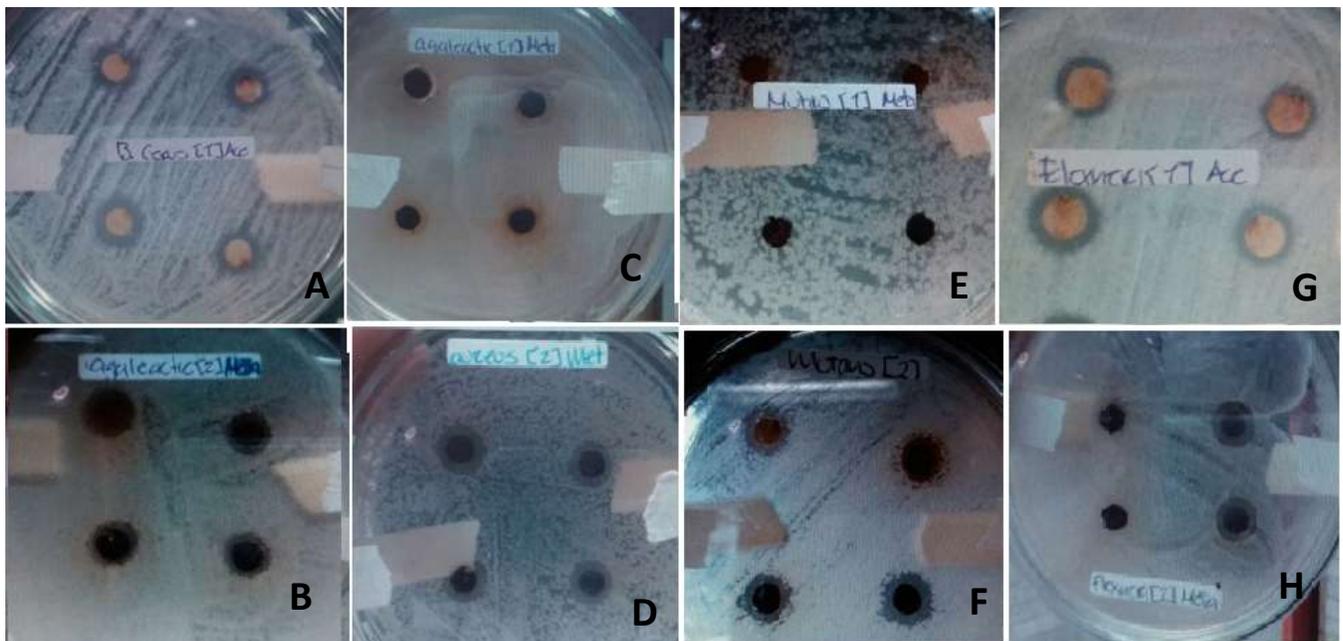


Fig. 20 Halos de inhibición del crecimiento bacteriano A) Extracto metanólico 250 mg/mL sobre *B. cereus*, B) Extracto metanólico 250 mg/mL sobre *S. agalactiae*, C) Extracto metanólico 200 mg/mL sobre *S. agalactiae*, D) Extracto metanólico 250 mg/mL sobre *S. aureus*, E) Extracto metanólico 200 mg/mL sobre *S. mutans*, F) Extracto metanólico 250 mg/mL sobre *S. mutans*, G) Extracto de AcOEt a 200 mg/mL sobre *S. flexneri* y H) Extracto metanólico 250 mg/mL sobre *S. flexneri*.

8. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados podemos concluir que:

- El metabolito secundario mayoritario del extracto hexánico es el β -sitosterol.
- Por primera vez se informa la presencia de β -sitosterol en la corteza de *Spondias purpurea*.
- Los extractos metanólico y AcOEt están constituidos principalmente por polifenoles.
- El 30% del peso de corteza en seco corresponde a lignina.
- Los extractos orgánicos de la corteza de *Spondias purpurea* poseen actividad bactericida sobre seis de las once cepas bacterianas en las concentraciones evaluadas.
- Los extractos de AcOEt y MeOH mostraron mayor efecto bactericida.
- Los halos de inhibición más grandes se presentaron en la concentración de 200 mg/ml excepto en *S. pyogenes* y en *S. aureus* donde no hubo actividad a esa concentración.
- El mayor efecto bactericida se mostró sobre *S. pyogenes* a una concentración de 250 mg/mL.
- Estos resultados confirman que *Spondias purpurea* puede ser considerada con actividad bactericida promisorio y se debe continuar investigando para caracterizar las sustancias bioactivas presentes para encontrar futuras aplicaciones.

9. LITERATURA CITADA

- Abrahamson W. G. (1989). Plant- animal interactions. Ed. McGraw-Hill. USA.
- Acharyya S., Dash G. K., Dash K. S. (2011). Pharmacognostic studies on the root of *Spondias mangifera* Willd. *Journal of Natural Remedies*. vol. 11 (2) pp. 150-157.
- Aguilar O. C., Sosa V., Aguilar O. M. (2003) Toxic phenols in various *Anacardiaceae* species. *Economic Botany*, 57(3) pp. 354-364.
- Aguilar J., Jaén J., Vargas A., Jiménez P., Vega I., Herrera J., Borbón H., Soto R. (2012). Extracción y evaluación de taninos condensados a partir de la corteza de once especies maderables de Costa Rica. *Tecnología en Marcha*. vol. 25 (4) pp. 16-22.
- Álvarez j. (2007). Tanino: la revolución enológica mito o realidad. *Enología* 2 pp. 1-15
- Anaya L. A. (2003). Ecología química. 1ª ed. Ed. Plaza y Valdez. México. pp. 37-39, 63-65.
- Anaya A., Espinosa G. F. J., Cruz O. R. (2001). Relaciones Químicas entre Organismos: Aspectos Básicos y Perspectivas de su Aplicación. 1ª ed. Ed. Plaza y Valdés S.A. de C.V. México. pp. 165-166.
- Andrés C., Medina A., Llorach R., Urpi M., Khan N., Chiva G., Zamora R., Rotches M., Lamuela R. (2010). Phenolic compounds: chemistry and occurrence in fruits and vegetables. In: L.A. De la Rosa, E. Alvarez-Parrilla, G.A. González-Aguilar (eds). *Fruit and Vegetable Phytochemicals, Chemistry, nutritional value and stability*. USA: Wiley-Blackwell. pp. 53-88.
- APG III. (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161 pp. 105-121.
- Augusto F., Pires V. A., Dos Santos T. E., Rivellino S. (2000). Screening of Brazilian fruit aromas using solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 873 pp. 117–127.

- Ávalos G. y Pérez U. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. vol. 2(3)*. pp. 119-145.
- Benavides J. E. (1994). Árboles y Arbustos Forrajeros en América Central. CATIE. Serie Técnica. Informe Técnico No. 236 volumen II pp. 271.
- Brown P. J. (1998). Understanding medical anthropology. Mayfield publishing. London
- Cabrera C. (2000). *Anacardiaceae* de la Península de Yucatán: taxonomía, florística y etnobotánica. Universidad Autónoma de Yucatán. Etnoflora yucateca fascículo 15 pp. 36-38.
- Camacho H. (2012). Innovación de un Método Analítico para la Cuantificación de Taninos en una Formulación Magistral para un Enjuague Bucal de Extracto de Encino. Tesis. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM.
- Castillo G. y Martínez S. (2007). Manual de Fitoterapia. Ed. Elsevier Masson. Barcelona España. pp. 25, 34.
- Ceva-Antunes P., Ribeiro B., Silva S., Carvalhad C., Antunes O. (2006). Analysis of volatile composition of siriguela (*Spondias purpurea* L.) by solid phase microextraction (SPME). *LWT* (39) pp. 436-442.
- Cheynier V. (2005). Polyphenols in foods are more complex than often thought. *American Journal of Clinical Nutrition* 81 pp. 223-229.
- Cordero J. y Boshier D. H. (2003). Árboles de Centroamérica. Un manual para extensionistas. Oxford Forestry Institute CATIE. Reino Unido. pp. 889-892.
- Correia S., David P. J., David M. J. (2006). Metabolitos secundarios de especies de *Anacardiaceae*. *Quim. Nova, vol. 29 (6)* pp. 1287-1300.
- Corthout J., Pieters L., Claeys M., Geerts St., Vanden-Berghe D., Vlietinck A. (1994). Antibacterial and molluscicidal phenolic acids from *Spondias mombin*. *Planta medica*. 60 pp. 460-463.

- DAI J., Mumper R. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 15 pp. 7313-7352.
- Das J., Mannan A., Rahman M., Dinar M., Uddin M., Khan I., Habib M., Hasan N. (2011). Chloroform and Ethanol Extract of *Spondias pinnata* and its Different Pharmacological activity Like-Antioxidant, Cytotoxic, Antibacterial Potential and Phytochemical Screening through In-Vitro Method. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*. vol. 2(4) pp. 1806-1812.
- Del Valle P. P. (2009). Compuestos con actividad antibacteriana sobre bacterias patógenas de la cavidad oral aislados de los frutos de *Spondias purpurea* L. (ciruelo rojo). Tesis, Facultad de Química. UNAM.
- Diby S. B., Koné M., Yapo A. (2012). Potentiel pharmacologique des écorces de tige de *Spondias mombin* L. (*Anacardiaceae*) sur la motricité in vitro du duodénum de lapin; une plante médicinale utilisée dans le traitement traditionnel des troubles digestifs. *Phytothérapie* 10 pp. 306–312.
- Engels C., Gräter D., Ezquivel P., Jimenez V., Gänzle M., Schieber A. (2012). Characterization of phenolic compounds in jocote (*Spondias purpurea* L.) peels by ultra high-perfonama liquid chromatography /electrospray ionization mass spectrometry. *Food research international*. vol. 46 Issue 2 pp. 557-562.
- Esau K. (1985). Anatomía vegetal. 3ª ed. Ed. Omega. Barcelona. pp. 366-379.
- Fanh A. (1985). Anatomía vegetal. Ed. Pirámide. Madrid.
- Forbes B., Sahm D. y Weissfeld A. (2009). Bailey & Scott: diagnostico microbiológico 12ª ed. Ed. Medica Panamericana. Buenos Aires. pp. 194-198.
- Garduño P. C. (2009). Evaluación de polvos y extractos vegetales sobre el desarrollo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Gladioli* (Massey) Snyder y Hansen e identificación de compuestos volátiles. Tesis. IPN Centro de desarrollo de productos bióticos. Yautepec Morelos. pp. 103.

- González G., Ayala B., Gutiérrez V. (2006). Determinación de fenoles totales y taninos condensados en especies arbóreas con potencial forrajero de la Región de Tierra Caliente Michoacán, México. *Livestock Research for Rural Development*. vol. 18 (152).
- Gutiérrez de G. O., Martínez M., Sanabria L., Pinto G. L. de., Igartuburu J. M. (2005). 1D- and 2D-NMR spectroscopy studies of the polysaccharide gum from *Spondias purpurea* var. *lutea*. *Food Hydrocolloids*. 19 pp. 37–43.
- Harborne J. B. (1997). Recent advances en chemical ecology. *Natural Products Reports* 14 pp. 83-98.
- Harborne J. B (1993). Introduction to Ecological Biochemistry 4a ed. Academic. San Diego California.USA.
- Hauck T., Rosenthal A., Deliza R., Oliveira G. R. L. de, Pacheco S. (2011). Nutritional properties of yellow mombin (*Spondias mombin* L.) pulp. *Food Research International*. 44 pp. 2326–2331.
- Ingraham L., Ingraham A. (1998). Introducción a la microbiología Vol. 2. Ed. Reverté. España. pp. 555.
- Judprasong K., Charoenkiatkul S., Thiyajai P., Sukprasansap M. (2013). Nutrients and bioactive compounds of Thai indigenous fruits. *Food Chemistry*. 140 pp. 507–512.
- Quideau S., Deffieux D., Douat-Casassus C., Pouységu L. (2011). Plant polyphenols: Chemistry, biological activities and synthesis. *Angewante Chemie International Edition*. 3 pp. 586-621.
- Koziol J. M. y Macía J. M. (1998). Chemical composition, nutritional evaluation, and economic prospects of *Spondias Purpurea* (*Anacardiaceae*) (Fn1). *Economic Botany* 52 (4) pp. 373-380.
- Macía J. y Barfod S. (2000). Economic Botany of *Spondias purpurea* (*Anacardiaceae*) In Ecuador. *Economic Botany* 54(4) pp. 449-458.
- Mamani T. (1999). Metabolitos secundarios bioactivos de la flora medicinal iberoamericana: *Piper elongatum*, *Copaifera paupera*, *Crossopetalum tonduzii* y *Maytenus cuzcoina*. Tesis doctoral. Universidad de la Laguna. pp. 3-4.
- Marcano D. y Hasegawa M. (2002). Fitoquímica orgánica 2ª ed. Ed. Torino. Venezuela. pp. 29-30.

- Martínez, M. (1979). Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México.
- Martínez M., Pinto G. L. de., González M. B. de., Herrera J., Oulyadi H., Guilhaudis L. (2008). New structural features of *Spondias purpurea* gum exudate. *Food Hydrocolloids*. 22 pp. 1310–1314.
- Martínez M., Pinto G. de., Sanabria L., Beltrán O., Igartuburu J., Bahsas A. (2003). Structural features of an arabinogalactan gum exudates from *Spondias dulcis* (Anacardiaceae). *Carbohydrate Research*. 338 pp. 619–624.
- Mendoza E. (2010). Aislamiento del ácido 2-hidroxi-6-(Z-pentadec-8'-enil)-benzoico a partir de las hojas de *Spondias purpurea* L. Tesis, Facultad de Química. UNAM.
- Miller A. y Knouft J. (2006). GIS-Based characterization of the geographic distributions of wild and cultivated populations of the Mesoamerican fruit tree *Spondias purpurea* (Anacardiaceae). *American Journal of Botany*. 93 (12) pp. 1757–1767.
- Miranda C., Espinosa M., Centurión H., Velázquez M., Alor Ch. (2012). Actividad antimicrobiana de extractos de *Psidium friedrichsthalianum* L., *Pterocarpus hayesii* L., *Tynanthus guatemalensis* L. y *Spondias purpurea* L. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 11 (4). pp. 354-361.
- Mora B. (2007). Nutrición animal. 3ª reimp. De la 1ª ed. Ed. UNED. San José Costa Rica. pp. 18-19.
- Nudelman N. (2004). Química Sustentable. Ed. UNL. Argentina pp. 15.
- Pelczar M., Reid R. (1992). Microbiología. Ed. Pueblo y Educación. La Habana, Cuba.
- Pennington T. D. y Sarukhán J. (2005). Árboles tropicales de México manual para la identificación de las principales especies 3ª ed. Universidad Nacional Autónoma de México. Dirección general de publicaciones y fomento editorial. México pp. 71-73.

- Pérez P., Suárez L., Camacho P., Hung G., García G., Ross M. (2013). Actividad de *Spondias mombin* frente a microorganismos de importancia clínica. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 12 (4). pp. 405-412.
- Pinto G. de., Martínez M., Beltrán O., Rincón F., Igartuburu J., Rodríguez F. (2000). Structural investigation of the polysaccharide of *Spondias mombin* gum. *Carbohydrate Polymers*. 43 pp. 105-112.
- Pinto G. de., Martínez M., Mendoza J. A., Ocantot E., Rivas C. (1995). Comparison of Three *Anacardiaceae* Gum Exudates. *Biochemical Systematics and Ecology*. vol. 23 (2), pp. 151-156.
- Pinto G. de., Martínez M., Mendoza J., Ávila D., Ocando E., Rivas C. (1996). Structural study of the polysaccharide isolated from *Spondias purpurea* gum exudate. *Carbohydrate Research*. 290 pp. 97-103.
- Pinto G. L. de., Martínez M., Sanabria L., Rincón F., Vera A., Beltrán O., Clamens C. (2000). The composition of two *Spondias* gum exudates. *Food Hydrocolloids*. 14 pp. 259–263.
- Piñol M. y Palazón J. (1993). Metabolismo secundario. En: Fisiología vegetal y bioquímica vegetal. Ed. interamericana Mc Graw Hill. España.
- Prasad M. (2008). Caracterization of bioactive and biochemical constituents in *Spondias mangifera* fruit. Tesis. The University of Mysore.
- Reed J. (2010). Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *Journal of Animal Science* 73 pp. 1516-1528.
- Rodriguez C., Gamboa C., y Hernandez C. (2005). Bacteriología general: principios y practicas de laboratorio. Ed. Universidad de Costa Rica. pp. 339.
- Roncayo F. y Buelvas S. (2003). Caracterización nutricional de plantas arbóreas y arbustivas nativas del Bajo Magdalena. *Ciencia pecuaria*. vol. 16 pp. 11-17.

- Ruenes M., Casas A., Jiménez O., Caballero J. (2010). Etnobotánica de *Spondias pururea* L. (*Anacardiaceae*) en la península de Yucatán. *Interciencia*. vol. 35 (4) pp. 247-254.
- Rzedowski G. C. de y Rzedowski J. (1999). Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Instituto de Ecología, A.C. Centro Regional del Bajío Pátzcuaro, Michoacán. Fascículo 78 pp. 44
- Rzedowski G. C. de, Rzedowski J. y colaboradores (2005). Flora fanerogámica del Valle de México. 2a. ed., 1a reimp., Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro (Michoacán) pp. 373-374.
- Taiz L. y Zeiger E. (2006). Fisiología Vegetal I. 3ª ed. Publicaciones de la Universidad Jaume I. pp. 529, 533-534, 536.
- Vazquez F., Alvarez P., López D., Wall-Medrano y A. de la Rosa. (2012). Taninos hidrolizables y condensados: naturaleza química, ventajas y desventajas de su consumo. *Tecnociencia*. vol. 6 (2) pp. 84-93.
- Williams J. y Leon H. (2001). Crecimiento del árbol. Tejidos del árbol adulto. Universidad de los Andes. Merida Venezuela. pp. 1-17.

ANEXO I

Tabla 10. Desplazamientos químicos de RMN¹H de β-sitosterol

Posición	Grupo	δ (ppm)
1	CH ₂	3.48
2	CH ₂	4.98
3	CH	5.33
4	CH ₂	5.16
5	C	-
6	CH	5.34
7	CH ₂	5.14
8	CH	5.11
9	CH	3.49
10	C	-
11	CH ₂	3.54
12	CH ₂	3.5
13	C	-
14	CH	3.52
15	CH ₂	4.99
16	CH ₂	3.51
17	CH	3.52
18	CH ₃	0.67
19	CH ₃	0.9
20	CH	5.01
21	CH ₃	0.85
22	CH ₂	0.83
23	CH ₃	0.91
24	CH	3.53
25	CH	5.02
26	CH ₃	0.79
27	CH ₃	0.8
28	CH ₂	0.99
29	CH ₃	0.81
30	OH (de C ₃)	2

- No existe protón en esa posición

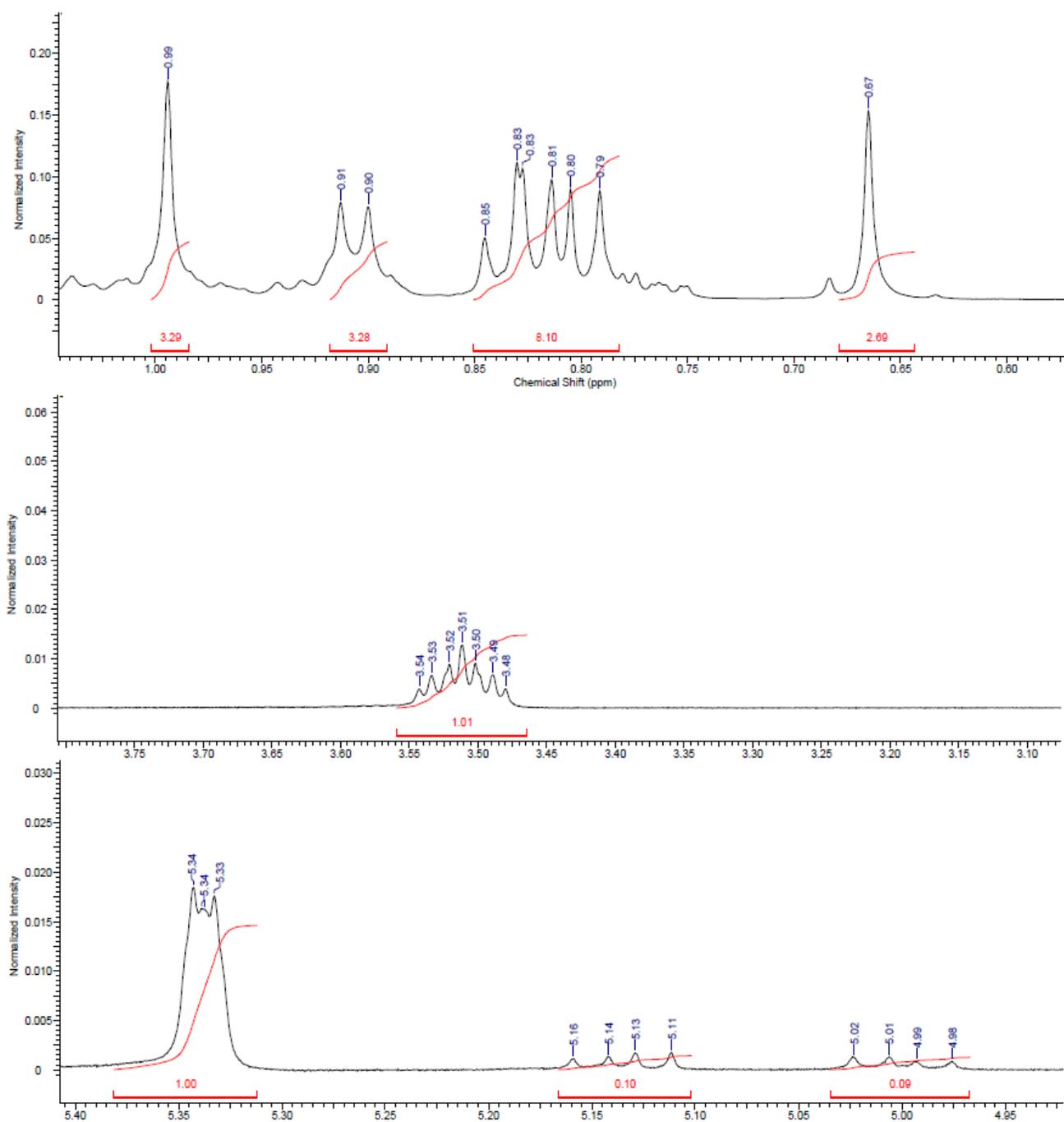


Fig. 21 Ampliación del espectro de RMN ^1H

ANEXO II

B. cereus

Análisis de Varianza

lunes, febrero 03, 2014, 11:48:06 p.

Prueba de normalidad: Error (P < 0.050)

Igualdad de la prueba de varianza: Error (P = 0.827)

Grupo	N	D. Perdidos	Media	Des. std	SEM
hexano 200	5	0	0.000	0.000	0.000
acetato 200	6	0	10.833	0.753	0.307
metanol 200	6	1	10.000	0.000	0.000
hexano 250	6	0	9.167	0.753	0.307
acetato 250	6	0	8.667	0.516	0.211
metanol 250	6	1	0.000	0.000	0.000

Fuente de variación	DF	SS	MS	F	P
Diferencia entre grupos	5	665.545	133.109	513.421	<0.001
Residual	27	7.000	0.259		
Total	32	672.545			

Las diferencias en los valores medios entre los grupos de tratamiento son mayores que lo que se esperaría por casualidad; hay una diferencia estadísticamente significativa (P = <0.001).

Poder de la prueba realizada con alfa = 0.050: 0.636

Todos los procedimientos de comparación por parejas múltiples (Prueba Tukey):

Las comparaciones para el factor:

Comparación	Diferencia de medias	p	q	P	P<0.050
acetato 200 vs. metanol 250	10.833	6	49.691	<0.001	Si
acetato 200 vs. hexano 200	10.833	6	49.691	<0.001	Si
acetato 200 vs. acetato 250	2.167	6	10.423	<0.001	Si
acetato 200 vs. hexano 250	1.667	6	8.018	<0.001	Si
acetato 200 vs. metanol 200	0.833	6	3.822	0.108	No
metanol 200 vs. metanol 250	10.000	6	43.916	<0.001	No
metanol 200 vs. hexano 200	10.000	6	43.916	<0.001	Si
metanol 200 vs. acetato 250	1.333	6	6.116	0.002	Si
metanol 200 vs. hexano 250	0.833	6	3.822	0.108	No
hexano 250 vs. metanol 250	9.167	6	42.046	<0.001	Si
hexano 250 vs. hexano 200	9.167	6	42.046	<0.001	Si
hexano 250 vs. acetato 250	0.500	6	2.405	0.543	No
acetato 250 vs. metanol 250	8.667	6	39.752	<0.001	Si
acetato 250 vs. hexano 200	8.667	6	39.752	<0.001	Si
hexano 200 vs. metanol 250	0.000	6	0.000	1.000	No

B. agalactiae

Análisis de Varianza

lunes, febrero 03, 2014, 11:51:02 p.

Prueba de normalidad: Error ($P < 0.050$)

Igualdad de la prueba de varianza: Error ($P = 0.309$)

Grupo	N	D. Perdidos	Media	Des. std	SEM
hexano 200	10	1	9.667	1.732	0.577
acetato 200	10	2	10.625	1.302	0.460
metanol 200	10	4	12.167	2.639	1.078
hexano 250	10	1	9.333	1.000	0.333
acetato 250	10	0	10.300	0.949	0.300
metanol 20	10	5	10.600	0.894	0.400

Fuente de variación	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	5	34.204	6.841	3.116	0.018
Residual	41	90.008	2.195		
Total	46	124.213			

Las diferencias en los valores medios entre los grupos de tratamiento son mayores que lo que se esperaría por casualidad ; hay una diferencia estadísticamente significativa ($P = 0,018$) .

Poder de la prueba realizada con alfa = 0.050: 0.636

La potencia de la prueba realizada (0.636) es inferior a la potencia deseada de 0.800.

Menos potencia deseado indica que son más propensos a no detectar una diferencia cuando realmente existe . Tenga cuidado en exceso de interpretar la falta de diferencia se encuentra aquí.

Todos los procedimientos de comparación por parejas múltiples (Prueba Tukey).

Las comparaciones para el factor:

Comparación	Diferencia de medias	p	q	P	P<0.050
metanol 200 vs. hexano 250	2.833	6	5.131	0.010	Si
metanol 200 vs. hexano 200	2.500	6	4.527	0.030	Si
metanol 200 vs. acetato 250	1.867	6	3.450	0.167	Si
metanol 200 vs. metanol 250	1.567	6	2.469	0.511	No se encontró
metanol 200 vs. acetato 200	1.542	6	2.725	0.401	No se encontró
acetato 200 vs. hexano 250	1.292	6	2.537	0.481	No
acetato 200 vs. hexano 200	0.958	6	1.882	0.766	No se encontró
acetato 200 vs. acetato 250	0.325	6	0.654	0.997	No se encontró
acetato 200 vs. metanol 250	0.0250	6	0.0419	1.000	No se encontró
metanol 20 vs. hexano 250	1.267	6	2.168	0.646	No se encontró
metanol 20 vs. hexano 200	0.933	6	1.597	0.866	No se encontró
metanol 20 vs. acetato 250	0.300	6	0.523	0.999	No se encontró
acetato 250 vs. hexano 250	0.967	6	2.008	0.715	No se encontró
acetato 250 vs. hexano 200	0.633	6	1.316	0.936	No se encontró
hexano 200 vs. hexano 250	0.333	6	0.675	0.997	No se encontró

Un resultado de "No se encontró " se produce por una comparación cuando no se encontró ninguna diferencia significativa entre los dos medios que cierran esa comparación. Por ejemplo, si usted tenía cuatro medios ordenados en orden, y no encontró diferencias entre los medios 4 vs 2, entonces no probaría 4 vs 3 y 3 vs 2, pero todavía la prueba 4 vs 1 y 3 vs 1 (4 vs 3 y 3 vs 2 están encerrados por 4 vs 2: 4 3 2 1). Tenga en cuenta que no se probaron las medias cerrados es una norma de procedimiento y el resultado de no se encontró debe ser tratada como si no existe una diferencia significativa entre las medias, a pesar de que pueda parecer que existe

S. aureus

Análisis de Varianza

lunes, febrero 03, 2014, 11:55:12 p.

Prueba de normalidad: Error: (P <0,050)

Igualdad de Prueba Varianza: Error: (P <0,050)

Grupo	N	D. Perdidos	Media	Des. std	SEM
hexano 200	10	0	0.000	0.000	0.000
acetato 200	10	0	0.000	0.000	0.000
metanol 200	10	0	0.000	0.000	0.000
hexano 250	10	4	9.333	0.816	0.333
acetato 250	10	0	9.600	0.966	0.306
metanol 20	10	3	11.000	1.000	0.378

Fuente de variación	DF	SS	MS	F	P
Diferencia entre grupos	5	1301.814	260.363	690.059	<0.001
Residual	47	17.733	0.377		
Total	52	1319.547			

Las diferencias en los valores medios entre los grupos de tratamiento son mayores que lo que se esperaría por casualidad; hay una diferencia estadísticamente significativa (P = <0,001).

Poder de la prueba realizada con alfa = 0.050: 1.000

Todos los procedimientos de comparación por parejas múltiples (Prueba Tukey):

Las comparaciones para el factor:

Comparación	Diferencia de medias	p	q	P	P<0.050
metanol 250 vs. metanol 200	11.000	6	51.391	<0.001	Si
metanol 250 vs. acetato 200	11.000	6	51.391	<0.001	Si
metanol 250 vs. hexano 200	11.000	6	51.391	<0.001	Si
metanol 250 vs. hexano 250	1.667	6	6.897	<0.001	Si
metanol 250 vs. acetato 250	1.400	6	6.541	<0.001	Si
acetato 250 vs. metanol 200	9.600	6	49.423	<0.001	Si
acetato 250 vs. acetato 200	9.600	6	49.423	<0.001	Si
acetato 250 vs. hexano 200	9.600	6	49.423	<0.001	Si
acetato 250 vs. hexano 250	0.267	6	1.189	0.958	Si
hexano 250 vs. metanol 200	9.333	6	41.612	<0.001	Si
hexano 250 vs. acetato 200	9.333	6	41.612	<0.001	Si
hexano 250 vs. hexano 200	9.333	6	41.612	<0.001	Si
hexano 200 vs. metanol 200	0.000	6	0.000	1.000	No
hexano 200 vs. acetato 200	0.000	6	0.000	1.000	No se encontró
acetato 200 vs. metanol 200	0.000	6	0.000	1.000	No se encontró

S. mutans

Análisis de Varianza

lunes, febrero 03, 2014, 11:56:43 p.

Prueba de normalidad: Error ($P < 0,050$)

Grupo	N	D. Perdidos	Media	Des. std	SEM
hexano 200	8	2	8.500	7.000	12.000
acetato 200	8	2	8.500	8.000	10.000
metanol 200	8	1	10.000	10.000	10.750
hexano 250	8	0	8.000	7.500	9.000
acetato 250	8	0	8.000	7.000	9.500
metanol 250	8	0	10.000	9.500	10.500

H = 10.595 con 5 grados de libertad. ($P = 0,060$)

Las diferencias en los valores medios entre los grupos de tratamiento no son lo suficientemente grande como para excluir la posibilidad de que la diferencia se debe a la variabilidad del muestreo aleatorio, y no hay una diferencia estadísticamente significativa ($P = 0.060$)

S. flexneri

Análisis de Varianza,

febrero 03 , 2014 , 11:59:17 p.

Prueba de normalidad: Error ($P < 0,050$)

Igualdad de Prueba Varianza: Error ($P < 0,050$)

Grupo	N	D. Perdidos	Media	Des. std	SEM
hexano 200	8	0	0.000	0.000	0.000
acetato 200	8	0	10.250	0.886	0.313
metanol 200	8	0	0.000	0.000	0.000
hexano 250	8	3	7.800	0.447	0.200
acetato 250	8	2	7.333	0.516	0.211
metanol 20	8	3	10.200	1.304	0.583

Fuente de la desviación	DF	SS	MS	F	P
Diferencia entre grupos	5	821.167	164.233	386.878	<0.001
Residual	34	14.433	0.425		
Total	39	835.600			

Las diferencias en los valores medios entre los grupos de tratamiento son mayores que lo que se esperaría por casualidad; hay una diferencia estadísticamente significativa ($P = < 0,001$).

Poder de la prueba realizada con alfa = 0.050: 1.000

Todos los procedimientos de comparación por parejas múltiples (Prueba Tukey):

Las comparaciones para el factor:

Comparación	Diferencia de medias	p	q	P	P<0.050
acetato 200 vs. metanol 200	10.250	6	44.496	<0.001	Si
acetato 200 vs. hexano 200	10.250	6	44.496	<0.001	Si
acetato 200 vs. acetato 250	2.917	6	11.722	<0.001	Si
acetato 200 vs. hexano 250	2.450	6	9.328	<0.001	Si
acetato 200 vs. metanol 250	0.0500	6	0.190	1.000	No
metanol 250 vs. metanol 200	10.200	6	38.836	<0.001	Si
metanol 250 vs. hexano 200	10.200	6	38.836	<0.001	Si
metanol 250 vs. acetato 250	2.867	6	10.276	<0.001	Si
metanol 250 vs. hexano 250	2.400	6	8.237	<0.001	Si
hexano 250 vs. metanol 200	7.800	6	29.698	<0.001	Si
hexano 250 vs. hexano 200	7.800	6	29.698	<0.001	Si
hexano 250 vs. acetato 250	0.467	6	1.673	0.842	Si
acetato 250 vs. metanol 200	7.333	6	29.473	<0.001	Si
acetato 250 vs. hexano 200	7.333	6	29.473	<0.001	Si
hexano 200 vs. metanol 200	0.000	6	0.000	1.000	No

S. pyogenes

Análisis de Varianza

febrero 04, 2014 , 12:01:57 a.

Prueba de normalidad: Error ($P < 0,050$)

Igualdad de Prueba Varianza: Aprobado ($P = 1,000$)

Grupo	N	D. Perdidos	Media	Des. std	SEM
hexano 200	5	0	0.000	0.000	0.000
acetato 200	5	0	0.000	0.000	0.000
metanol 200	5	0	0.000	0.000	0.000
hexano 250	5	0	20.000	0.000	0.000
acetato 250	5	0	24.000	0.000	0.000
metanol 250	5	3	16.000	1.414	1.000

Fuente de variacion	DF	SS	MS	F	P
Diferencia entre grupos	5	3040.000	608.000	6384.000	<0.001
Residual	21	2.000	0.0952		
Total	26	3042.000			

Las diferencias en los valores medios entre los grupos de tratamiento son mayores que lo que se esperaría por casualidad; hay una diferencia estadísticamente significativa ($P = <0,001$).

Poder de la prueba realizada con alfa = 0.050: 1.000

Todos los procedimientos de comparación por parejas múltiples (Prueba Tukey):

Comparisons for factor:

Comparación	Diferencia de medias	p	q	P	P<0.050
acetato 250 vs. metanol 200	24.000	6	173.897	<0.001	Si
acetato 250 vs. acetato 200	24.000	6	173.897	<0.001	Si
acetato 250 vs. hexano 200	24.000	6	173.897	<0.001	Si
acetato 250 vs. metanol 250	8.000	6	43.818	<0.001	Si
acetato 250 vs. hexano 250	4.000	6	28.983	<0.001	Si
hexano 250 vs. metanol 200	20.000	6	144.914	<0.001	Si
hexano 250 vs. acetato 200	20.000	6	144.914	<0.001	Si
hexano 250 vs. hexano 200	20.000	6	144.914	<0.001	Si
hexano 250 vs. metanol 250	4.000	6	21.909	<0.001	Si
metanol 250 vs. Metanol200	16.000	6	87.636	<0.001	Si
metanol 250 vs. acetato 200	16.000	6	87.636	<0.001	Si
metanol 250 vs. hexano 200	16.000	6	87.636	<0.001	Si
hexano 200 vs. metanol 200	0.000	6	0.000	1.000	No
hexano 200 vs. acetato 200	0.000	6	0.000	1.000	No se encontró
acetato 200 vs. metanol 200	0.000	6	0.000	1.00	No se encontró