



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA (FLAVONOIDES) Y ACTIVIDAD  
BACTERICIDA DE HOJAS DE *Spondias Purpurea L.*

BIODIVERSIDAD (FITOQUÍMICA)

Para obtener el título de:

**BIÓLOGA  
PRESENTA:**

**LESLIE STEPHANY ZALDIVAR TORRES**



DIRECTORA DE TESIS: DRA. HORTENSIA ROSAS ACEVEDO

Ciudad de México, 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



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 la alumna **ZALDIVAR TORRES LESLIE STEPHANY**, con número de cuenta **306337965**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **13 de noviembre de 2018** a las **15:00 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

**SECRETARIO** M. en C. ARTURO EDUARDO CANO FLORES

**SUPLENTE** Dra. MARÍA SOCORRO OROZCO ALMANZA

**SUPLENTE** M. en C. FLORENCIA BECERRIL CRUZ

Handwritten signatures of the jury members: Francisca Leonora Sánchez y García Figueroa, Hortensia Rosas Acevedo, Arturo Eduardo Cano Flores, María Socorro Orozco Almanza, and Florencia Becerril Cruz.

El título de la tesis que presenta es: **Caracterización química (Flavonoides) y actividad bactericida de hojas de *Spondias purpurea*.**

Opción de titulación: Tesis.

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

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Ciudad de México, a 24 de octubre de 2018

**DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ**  
DIRECTOR

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"ZARAGOZA"  
DIRECCIÓN

RECIBI  
OFICINA DE EXÁMENES  
PROFESIONALES Y DE GRADO

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

## DEDICATORIAS

*Esta tesis la dedico principalmente a mi padre Rubén: este logro es tuyo, gracias por haberme enseñado que con esfuerzo, trabajo y constancia se consigue lo que te propongas. Gracias por brindarme apoyo incondicional, por tu amor, por escucharme en todo momento, por tu comprensión, por estar siempre conmigo y por el apoyo económico. No tengo forma de agradecerte todo lo que haces por mí desde siempre, te amo papá, gracias.*

*A mi mamá Esperanza: gracias por tu amor, por tu apoyo, por tu cariño, por motivarme siempre y por preocuparte por mí y por mi felicidad, te amo mamá.*

*A mi abuelita Margarita: gracias por cuidarme siempre, por tu inmenso amor hacia mí, gracias por todos los recuerdos hermosos que tengo de tí, hoy por fin cumplo lo que te prometí hace tiempo y sé que aunque no estés físicamente, sé que estas y estarás presente siempre en todo momento conmigo, te amo, gracias por ser mi ángel.*

*A mi abuelita Socorro: gracias por creer en mí siempre, por tu infinito amor, por tus consejos, por alentarme siempre a ser mejor, por estar siempre al pendiente de mí y estar siempre que te necesito, te amo abu.*

*A mis hermanos Jenny y Alex: gracias por enseñarme el amor verdadero, gracias por su apoyo, por todas y cada una de las muestras de amor y cariño que siempre tienen conmigo, por creer y confiar en mí, los adoro y saben que siempre estaré para ustedes.*

*A Cristian: todo sacrificio tiene su recompensa, gracias por tu paciencia, por tu inmenso apoyo, por tu comprensión, por confiar y creer en mí, por alentarme a terminar este logro, gracias por convertirme en mi cómplice en todo momento, muchas gracias por tu bello amor.*

*La dedico con gran cariño para ustedes, por el apoyo incondicional, por creer en mí, por su paciencia y por estar conmigo en todo momento dándome ánimo.*

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de ser parte de ella y forjarme como profesionista.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por permitirme desarrollarme profesionalmente y por brindarme sus instalaciones para poder alcanzar esta meta. Así como también a todos mis profesores por todo el conocimiento que me brindaron.

A la asociación del Sistema Nacional de Recursos Filogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (SINAREFI), por el financiamiento.

A la Dra. Hortensia Rosas Acevedo por su gran enseñanza, por haberme brindado la oportunidad de trabajar con ella, por el apoyo brindado, la orientación, la paciencia y por los conocimientos que me compartió. Ya que sin su ayuda y bajo su dirección no hubiese sido posible realizar este proyecto.

A los Dres. Leonora Sánchez, Arturo Cano, Socorro Orozco y a la maestra Florencia Becerril, por brindarme su asesoría y por el tiempo dedicado a la revisión y corrección de este trabajo, así como sus valiosos consejos.

A los Dres. Teresa Terrazas, Gustavo Ballesteros y Artemio Cruz por la recolecta y donación del material biológico.

A mi tía Lety, por su cariño, por ser un gran ejemplo y por querer siempre lo mejor para mí.

A mi gran amiga Alejandra Madrid, gracias por motivarme siempre a seguir adelante, por ser mi amiga incondicional, por estar siempre, por el cariño hacia mí desde hace años, por tus consejos y tu sincera amistad desde el día que nos conocimos, te quiero.

A mi amigo Alain Bustamante, por su apoyo, por escucharme siempre, por el cariño y por su amistad sincera y leal.

A Janette Jifkins, por su gran apoyo y ayuda incondicional para la elaboración de la práctica en este trabajo, por los recuerdos alegres, las experiencias vividas y los excelentes momentos que pasamos juntas.

A Alina y Gato, por su compañía a lo largo de la carrera, por los buenos momentos que compartimos juntos y por brindarme su gran amistad.

A mis compañeros de laboratorio, Carlos, Oscar, Patricia y Angélica, gracias por hacer amenas las tardes, por las alegrías, su compañía y los buenos momentos.

A Iyaki Flores, gracias por su ayuda y apoyo incondicional, por el cariño, la paciencia, disposición, por tus consejos y por la compañía siempre para mis trámites administrativos, te quiero.

A Paola, por su preocupación hacia mí, por su cariño y por siempre tener tiempo para escucharme.

A mis hermanos Dylan, Bryan y Edson y a Maribel gracias por los consejos, por todas las vivencias juntos, por los buenos momentos en familia y por las alegrías.

# ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS .....	i
LISTA DE CUADROS .....	ii
LISTA DE ABREVIATURAS .....	iii
1.INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO .....	3
2.1 Familia <i>Anacardiaceae</i> .....	3
2.1.1 Descripción botánica.....	4
2.2 Género <i>Spondias</i> .....	4
2.2.1 Descripción botánica del género <i>Spondias</i> .....	5
2.3 <i>Spondias Purpurea</i> .....	6
2.3.1 Clasificación taxonómica .....	6
2.3.2 Descripción botánica de <i>Spondias Purpurea</i> .....	7
2.3.3 Sinonimias .....	9
2.3.4 Nombres comunes.....	9
2.3.5 Usos.....	9
2.3.6 Propiedades medicinales.....	10
2.3.7 Distribución en México de <i>Spondias Purpurea L</i> .....	11
2.4 Estudios químicos.....	13
2.4.1 Estudios químicos realizados en especies de la familia <i>Anacardiaceae</i> .....	13
2.4.2 Estudios químicos realizados en especies del género <i>Spondias</i> .....	13
2.5 Metabolitos primarios .....	15
2.6 Metabolitos secundarios.....	15
2.7 Flavonoides .....	16
2.7.1 Estructura química .....	17
2.8 Clasificación .....	18
2.9 Tipos y fuentes de flavonoides.....	20

2.10 Función biológica de los flavonoides.....	21
3. JUSTIFICACIÓN.....	23
4. HIPÓTESIS.....	24
5. OBJETIVOS.....	25
5.1 Objetivo general .....	25
5.2 Objetivos particulares .....	25
6. MATERIAL Y MÉTODO .....	26
6.1 Secado de las hojas de <i>Spondias purpurea</i> L. ....	26
6.2 Preparación de los extractos orgánicos de las hojas de <i>Spondias Purpurea</i> “Ciruela silvestre macho” .....	26
6.3 Fraccionamiento cromatográfico del extracto hexánico de las hojas de <i>Spondias Purpurea</i> “Ciruela silvestre macho” .....	27
6.4 Purificación de los compuestos .....	29
6.5 Identificación de flavonoides por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).....	29
6.6 Evaluación de la actividad bactericida de los extractos de las hojas de <i>Spondias purpurea</i> “Ciruela silvestre macho” .....	30
6.7 Preparación de la muestra .....	31
6.8 Bioensayo .....	32
6.9 Análisis estadístico.....	33
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
7.1 Aislamiento e identificación estructural del $\beta$ -sitosterol.....	33
7.2 Actividad bactericida de las hojas de <i>Spondias purpurea</i> .....	40
8. CONCLUSIONES .....	43
9. LITERATURA CITADA .....	44

## LISTA DE FIGURAS

Fig.	Contenido	Página
1	Distribución y hábitat de la familia <i>Anacardiaceae</i>	3
2	Hojas de especies de <i>Spondias</i>	5
3	Frutos de <i>Spondias</i>	6
4	A) Árbol de <i>Spondias purpurea</i> B) Hojas C) Flor D) Fruto	8
5	Distribución de <i>Spondias purpurea</i> L. en Mesoamérica	12
6	Estructura básica de flavonoides	17
7	Tipos y estructuras básicas de los flavonoides	19
8	Características estructurales de los principales tipos de flavonoides	20
9	Estructura química de los isoflavonoides Genisteína y Daidzeína	21
10	Extracción de las hojas de <i>Spondias purpurea</i> L. "Ciruela silvestre macho"	27
11	A) Columna del extracto hexánico B) Fracciones obtenidas de las hojas de "Ciruela silvestre macho"	28
12	Evaluación de la actividad antimicrobiana en extracto hexánico, AcOEt y MeOH de las hojas "Ciruela silvestre macho"	32
13	Estructura química del $\beta$ -sitosterol, compuesto aislado de la fracción 12	33
14	Espectro infrarrojo de $\beta$ -sitosterol	34
15	Espectro de RMN $^1\text{H}$ de $\beta$ -sitosterol	35
16	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de $\beta$ -sitosterol	36
17	Actividad bactericida de las hojas de <i>Spondias purpurea</i> "Ciruela silvestre macho"	42

## LISTA DE CUADROS

Cuadro	Contenido	Página
1	Nombre y sitio de colecta de las accesiones	30
2	Fraccionamiento cromatográfico del extracto hexánico de las hojas "Ciruela silvestre macho"	28
3	Concentración de flavonoides en hojas de <i>Spondias purpurea</i>	38
4	Microorganismos utilizados para la determinación de la actividad bactericida	31
5	Especies donde se ha encontrado $\beta$ -sitosterol	37
6	Actividad bactericida de las hojas de <i>Spondias purpurea</i>	41

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ac.	Ácido	$\mu\text{m}$	Micrómetro
AcOEt	Acetato de etilo	$\mu\text{g}$	Microgramo
MeOH	Metanol	$\mu\text{L}$	Microlitro
NaCl	Cloruro de Sodio	atm	Atmosferas
EtOH	Etanol	MHz	Megahertz
$\text{CHCl}_3$	Cloroformo	N	Normal
HCl	Ácido clorhídrico	nm	Nanómetro
IR	Infrarrojo	p.f.	Punto de fusión
$\delta$	Desplazamiento químico	p/v	Peso/volumen
CCF	Cromatografía en capa fina	$\text{RMN}^{13}\text{C}$	Resonancia magnética nuclear de Carbono 13
$\text{Fe}^{3+}$	Ion férrico	$\text{RMN}^1\text{H}$	Resonancia magnética nuclear de Hidrógeno
$\text{Fe}^{2+}$	Ion ferroso	cm-1	Ciclos por centímetro
CCF	Cromatografía en capa fina	HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución

## 1. INTRODUCCIÓN

La medicina tradicional es parte de ese saber que le ha permitido a la humanidad sobrevivir y enfrentar diversas enfermedades, es muy accesible y juega un papel sumamente importante en los países de escasos ingresos, siendo una opción conocida a la que la población tiene acceso en la mayor parte de los casos. Desde la antigüedad, el hombre ha utilizado las plantas como fuente para la elaboración de medicamentos cuya finalidad fue y ha sido controlar la prevalencia de ciertas enfermedades infecciosas, vencer los problemas de resistencia de los microorganismos y disminuir los efectos colaterales que poseen los antimicrobianos de síntesis química (Rangel *et al.*, 2001).

Las plantas medicinales son aquellas que contienen, en alguno de sus órganos, principios activos. En la actualidad se calculan unas 260 000 especies de plantas, de las que el 10 % se puede considerar medicinal (Font P., 1999).

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, concentración y localización varía de acuerdo con la especie o la fuente donde fueron aislados (Anaya *et al.*, 2001).

Entre estos metabolitos son comunes aquellos con funciones defensivas contra insectos, bacterias, hongos, como son los alcaloides, aminoácidos no proteicos, esteroides, fenoles, flavonoides, cumarinas, quinonas, taninos y terpenoides.

Se ha demostrado que existe gran variación en cuanto a la concentración de estos en la planta, no hay un patrón de máxima producción ni órganos especiales de

almacenaje de metabolitos secundarios, sin embargo, lo común es que las mayores concentraciones de estos tipos de compuestos se encuentren en hojas, flores y semillas (Martínez *et al.*, 2012).

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).

*Spondias purpurea* es una importante especie frutal, los frutos son ricos en minerales como fósforo y hierro, así como en vitaminas del complejo B, por lo que se considera con gran potencial económico ya que puede ser materia prima para la industria de la refresquería, confituras y frutos deshidratados (Koziol y Macia, 1998; Lira Júnior *et al.*, 2010; Ruenes-Morales *et al.*, 2010). Las hojas tienen uso terapéutico, se emplean como astringentes, antiespasmódicos, antimicrobianos, febrífugo y antiinflamatorio.

En el presente trabajo se identificaron los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en las hojas de *Spondias purpurea* ya que es una planta reportada en la literatura con distintas propiedades medicinales.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Familia *Anacardiaceae*

La familia *Anacardiaceae* es una familia importante desde el punto de vista económico en cuanto que comprende muchas especies cultivadas por sus frutos comestibles. La familia *Anacardiaceae* comprende alrededor de 76 géneros que se dividen en cinco tribus (*Anacardiaceae*, *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).

Esta familia incluye unas 500 especies herbáceas y arbustivas cuyo origen está en las regiones cálidas y, en menor medida, en las templadas.

*Anacardiaceae* se encuentran en todo el mundo desde hábitats secos a hábitats húmedos, en su mayoría y a baja altitud, principalmente en los trópicos y subtropicos pero extiende en la zona templada. La familia es nativa del hemisferio occidental (desde el sur de Canadá hasta la Patagonia), África, Sur de Europa, Asia templada y tropical, tropical y subtropical de Australia y la mayoría de las islas del Pacífico.



Fig. 1. Distribución y hábitat de la familia *Anacardiaceae* (Stevens, 2001).

### **2.1.1 Descripción Botánica**

Porte: Árboles, arbustos, rara vez lianas.

Hojas: alternas, compuestas e imparipinnadas a veces trifolioladas o simples, los folíolos opuestos o alternos, enteros o aserrados.

Flores: perfectas o imperfectas, actinomorfas, pequeñas; dispuestas en panículas, a menudo muy largas.

Perianto: sépalos 3-5 libres o soldados en la base, a veces persistentes o acrescentes; pétalos 5 libres o basalmente unidos en el receptáculo, raro ausentes.

Estambres: 5-10, dispuestos en 1 o 2 verticilos, libres, raramente unidos, filamentos delgados, anteras con dehiscencia longitudinal; disco anular, intraestaminal, rara vez extraestaminal.

Gineceo: ovario súpero, 1-5 (12) carpelos unidos con un solo lóculo, rara vez los carpelos libres con un óvulo péndulo por cada lóculo, estilos 1-5 libres.

Fruto: drupas o sámaras, generalmente con una semilla, el mesocarpo carnoso o seco con endocarpo óseo.

Semillas: con embrión curvo, endospermo escaso o ausente.

### **2.2 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 de Brasil (Macía y Barfod, 2000; Ruenes *et al.*, 2010).

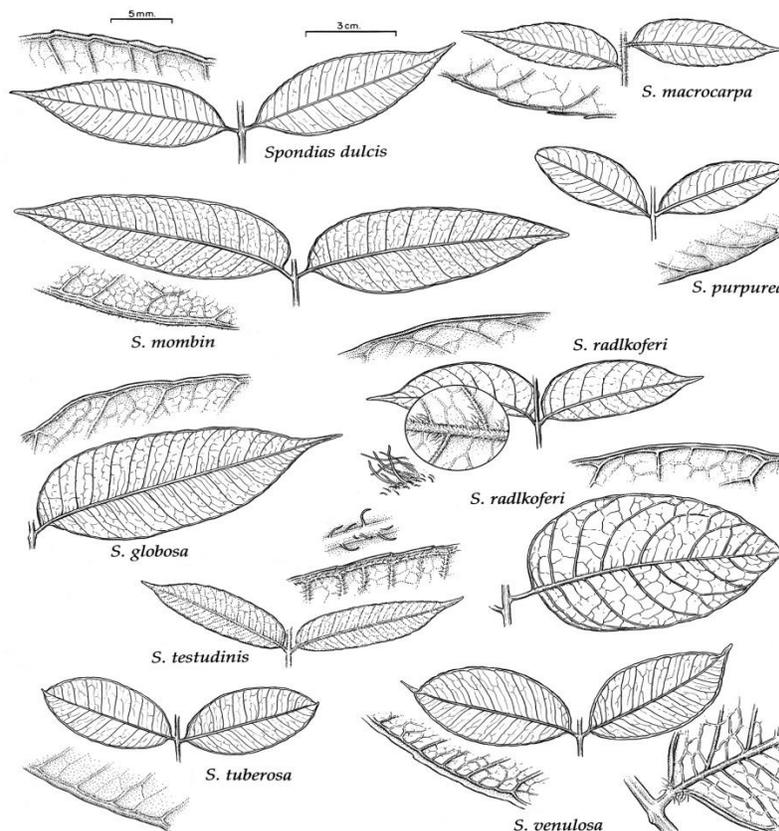
### 2.2.1 Descripción botánica del Género *Spondias*

Porte: Árboles dioicos, pequeños o altos.

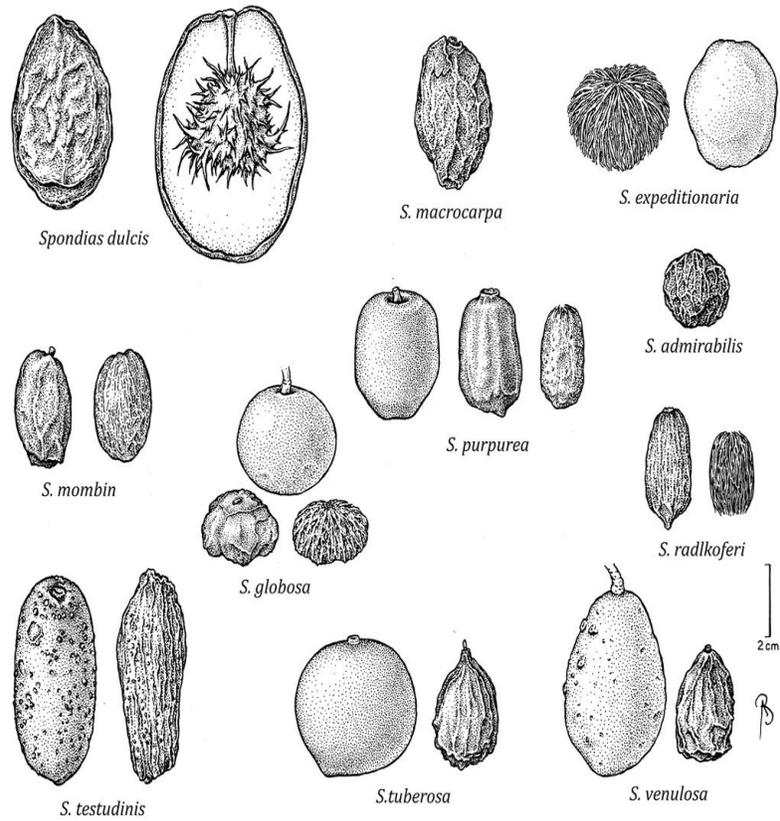
Hojas: alternas imparipinnadas.

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; ovulo 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).



**Fig. 2** Hojas de especies de *Spondias*: *Spondias dulcis*, *S. macrocarpa*, *S. mombin*, *S. globosa*, *S. radlkoferi*, *S. purpurea*, *S. testudinis*, *S. tuberosa*, *S. venulosa*. (Martínez, 2007).



**Fig. 3 Frutos de *Spondias*. *Spondias dulcis*, *S. macrocarpa*, *S. expeditionaria*, *S. mombin*, *S. globosa*, *S. purpurea*, *S. admirabilis*, *S. radlkoferi*, *S. testudinis*, *S. tuberosa* y *S. venulosa*. (Martínez, 2007).**

## **2.3 *Spondias purpurea***

### **2.3.1 Clasificación taxonómica**

Reino:     Plantae

Subreino: Tracheobionta

División: Magnoliophyta

Clase:     Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Orden: Sapindales

Familia: Anacardiaceae

Género: Spondias

Especie: *Spondias purpurea* L.

### **2.3.2 Descripción botánica de *Spondias purpurea***

La planta prefiere regiones de clima cálido y alturas hasta los 700 metros sobre el nivel del mar. Prospera mejor en suelos planos, profundos y fértiles. La planta soporta la sequía.

Arbusto o árbol: pequeño a mediano (3-6 m alto), muy ramificado de tronco con corteza gruesa y rugosa color gris plomo a verdoso.

Hojas: alternas de 12 a 15 cm de largo.

Flores: aparecen en panículas axilares, a veces directamente de las ramas viejas. Pétalos de 4 a 5 color rojo o purpura.

Fruto: drupa elipsoidal, lisa y brillante de color purpura o amarillo jugosa y agridulce, con un hueso de 0.50 a 0.75 cm de largo, grande, fibroso por fuera; contiene de 1 a 5 semillas. Semillas aplanadas, de 12 mm de largo (Orduz J. Rangel M. 2002).

Floración: Florece de febrero a mayo.

Fructificación: Fructifica de mayo a julio.

En Yucatán los frutos maduran de marzo a mayo. Se le puede encontrar en potreros, acahuales, huertos familiares, pastizales. Suelos: pedregoso, somero, aluvial, amarillo arcilloso, roca caliza.



**Fig. 4 A) Árbol de *Spondias purpurea* B) Hojas C) Flor D) Fruto**

Tomados de <http://redbio.una.edu.ni/arboretum/fichas.php?cod=6>

### 2.3.3 Sinonimias

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

### 2.3.4 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).

### 2.3.5 Usos

Como alimento la ciruela mexicana (*Spondias purpurea* L.) es una importante especie frutal. El fruto de ciruela se consume en estado verde o maduro y se le encuentra en huertos familiares, donde se utiliza para autoconsumo o se comercializa en pequeña escala (Maldonado *et al.*, 2007; Ramírez *et al.*, 2008). Los frutos frescos se comen maduros, deshidratados, macerados en alcohol o en salmueras. Se utilizan para elaboración de bebidas refrescantes, gelatinas, mermeladas, siropes y jaleas. Los frutos que no han madurado se utilizan para hacer tartas, salsa verde o se encurten en vinagre para comer con chiles. También se elaboran vinos, vinagres o la chicha (bebida alcohólica).

Además en la industria, la madera sirve para pulpa de papel cajas, fósforos, lápices, bolígrafos, revestimiento de interior en las casas, barcos, y como un sustituto de corcho; también se utiliza como combustible y las cenizas se ocupan para jabón, también sirve como adhesivo ya que la resina se ocupa para la fabricación de pegamentos.

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). También sirve como forraje, ya que las hojas son consumidas ávidamente por el ganado bovino y los frutos por el ganado porcino.

### **2.3.6 Propiedades medicinales**

Las hojas de *Spondias purpurea* L. tienen uso terapéutico y febrífugo (Cáceres *et al.* 1990). En México los frutos se consideran diuréticos y antiespasmódicos; la decocción del fruto se usa para bañar heridas, dolor de cabeza, curar úlceras en la boca e infecciones de encías, con el fruto se prepara un jarabe para curar la diarrea crónica; la decocción astringente de la corteza se usa como remedio para úlceras, disentería, fiebre y para hinchazón por gas intestinal; el jugo de las hojas frescas es un remedio para úlceras. (Cordero y Boshier, 2003).

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, para enfermedades de los ojos, como astringentes, como remedio para aftas, para tumores en infantes y como antiespasmódico para torceduras y traumatismo.

La corteza en polvo se aplica sobre las heridas para la infección, y la decocción de esta se emplea para tratar sarna. Un té hecho de las flores y las hojas se toma para aliviar el dolor de estómago, bilis, uretritis, cistitis, infecciones en ojos y las inflamaciones de garganta (Ayoka *et al.*, 2008).

El jugo de las hojas trituradas y el polvo de las hojas secas se utilizan como cataplasmas sobre las heridas y las inflamaciones. La goma se utiliza como expectorante, las hojas se mencionan en la literatura como abortivo, anti-diarreico, anti-microbiana, anti-viral (Ayoka *et al.*, 2008). El extracto de las hojas aplicado en volumen de 20 mL provoca aborto sin consecuencias para la salud de la hembra. Extractos en alcohol han mostrado una actividad antibacteriana significativa sobre las bacterias Gram (+) y Gram (-) y patógenos para el hombre (Ecolástico, 1999).

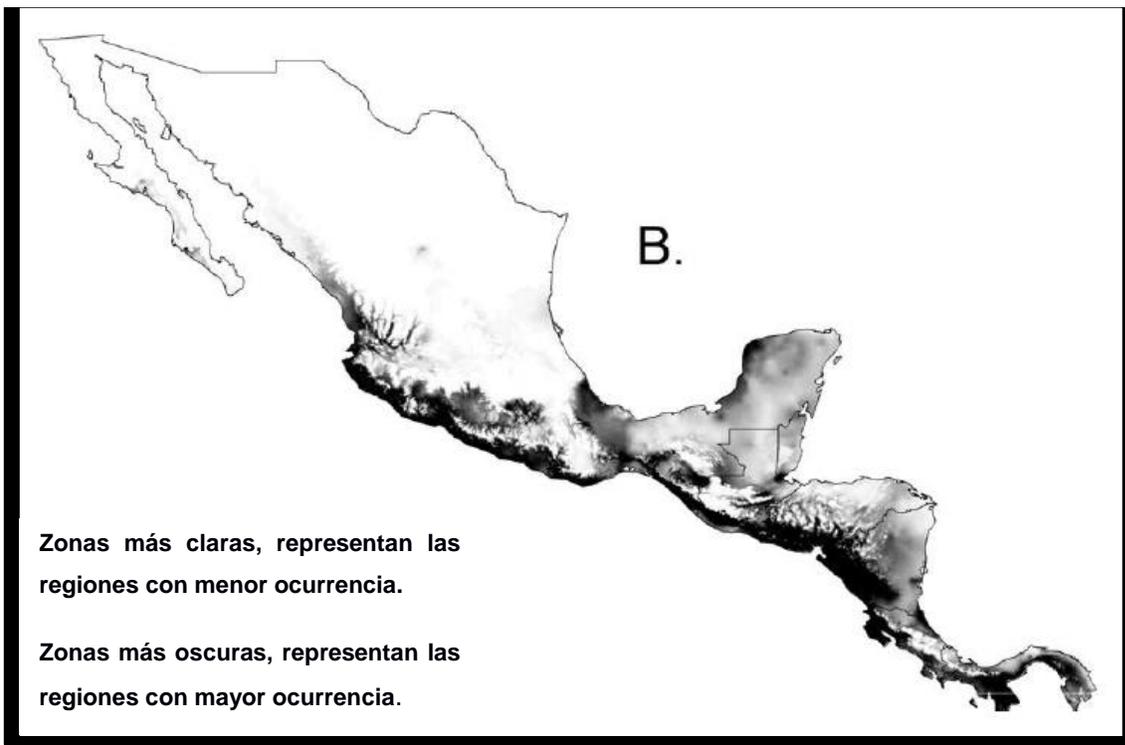
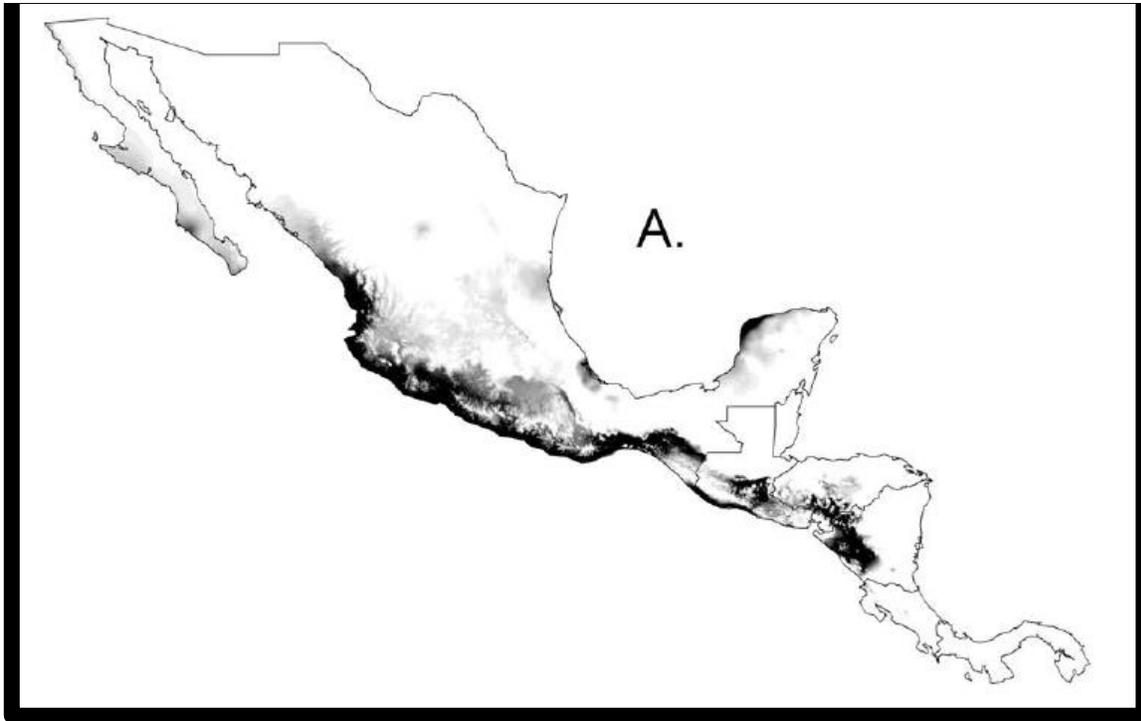
### **2.3.7 Distribución en México de *Spondias purpurea* L.**

El género *Spondias* comprende 17 especies, siete de las cuales son Neotropicales y diez del trópico asiático.

*Spondias purpurea* es originaria de Centro América ubicándola algunos en México y en la actualidad se cultiva en toda América tropical, tienen una distribución natural 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.

En México, la ciruela se distribuye en los estados de ambas costas y en el centro del país. De forma silvestre, *S. purpurea* se encuentra asociada al bosque tropical caducifolio (Padilla *et al.*, 2006).

Las especies *Spondias mombin*, *S. radolkoferi* y *S. purpurea* son nativas de México y forman parte de los bosques tropicales subcaducifolios, bosques de galería y bosques tropicales caducifolios, respectivamente (Rzedowski y Rzedowski, 1999).



**Fig. 5** Distribución de *Spondias purpurea* L. En Mesoamérica (A) silvestres (B) cultivadas  
 Las distribuciones se presentan como las probabilidades acumuladas relativas de la presencia de especies. Tomado de (Miller y Knouft, 2006).

## 2.4 Estudios químicos

### 2.4.1 Estudios químicos realizados en especies de la familia *Anacardiaceae*

Alrededor del 25% de los géneros de esta familia son conocidos por ser tóxicos (Engels *et al.*, 2012).

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, resorcinoles, catecoles especialmente de los lípidos y derivados fenólicos estos últimos responsables de las propiedades toxicas. Se informó también el aislamiento de otros metabolitos secundarios derivados de ácidos cinámicos y la presencia de alcaloides en el género *Dracontomelum* (Correia *et al.*, 2006).

### 2.4.2 Estudios químicos realizados en especies del género *Spondias*

Estudios realizados por Engels (2012) en la cáscara de los frutos de *Spondias purpurea*, reportan la presencia de 21 compuestos entre los cuales se encuentran flavonoides del tipo flavonoles, tales como la quercetina, rhamnetina, kaemferol y kaempferida, glicósidos de quercetina, de kaemferol, de ramnetina y ácidos fenólicos (Engels *et al.*, 2012).

Garduño (2009) reportó que en el extracto hexánico de hojas de *Spondias purpurea* se encuentra  $\beta$ -pineno, estragol,  $\alpha$ -copaeno, metil eugenol,  $\beta$ -cariofileno, aromadendreno,  $\alpha$ -humuleno,  $\beta$ -cadineno, farnesol, trans- $\beta$ -óxido de cariofileno, isofitol, ácido linoléico, condri-laesterol y en el extracto metanólico de hojas de *Spondias purpurea* se encuentra  $\beta$ -cadineno, éster metílico del ácido palmítico, ácido hexadecanoico, linoleato de metilo, ácido alfa-linoléico, isofitol, ácido linoléico, ácido esteárico, ácido fénico, erucilamida, escualeno,  $\delta$ -tocoferol y  $\beta$ -tocoferol.

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.

Ceva-Antunes (2006) reporta 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- $\beta$ -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,  $\alpha$ -pineno, benzoato de metilo,  $\alpha$ -terpinoleno, benzoato de etilo, octanoato de etilo, decanoato de etilo, dodecanoato de etilo, ácido tetradecanoico, tetradecanoato de etilo, ácido hexadecanoico.

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 polímeros, 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; Martínez *et al.*, 2003; Gutiérrez *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2008).

## **2.5 Metabolitos primarios**

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, su explotación es relativamente barata y conducen a la síntesis de los metabolitos secundarios (Petiard, 1987). Entre ellos se encuentran aminoácidos, proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos grasos, algunos ácidos carboxílicos, etc.

## **2.6 Metabolitos secundarios**

Los metabolitos secundarios son derivados de los metabolitos primarios. 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, sabor y color de la planta, 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 contienen nitrógeno (Taiz y Zeiger, 2006).

Prácticamente todas las sustancias que el hombre ha obtenido de las plantas a lo largo de su historia y que ha utilizado con cualquier fin diferente al alimenticio son productos del metabolismo secundario, ejemplo de ellos son los alcaloides, taninos y aceites esenciales que dan el aroma a las flores.

Los metabolitos o productos secundarios no tienen un papel definido en los procesos de respiración, asimilación, transporte, a diferencia de los metabolitos primarios como los carbohidratos, proteínas, ácidos nucleicos (Taiz y Zeiger 1998).

Verpoorte (2000) señala que aproximadamente 85 000 metabolitos secundarios han sido identificados en plantas y aproximadamente cada año se detectan cerca de 4 000.

## **2.7 Flavonoides**

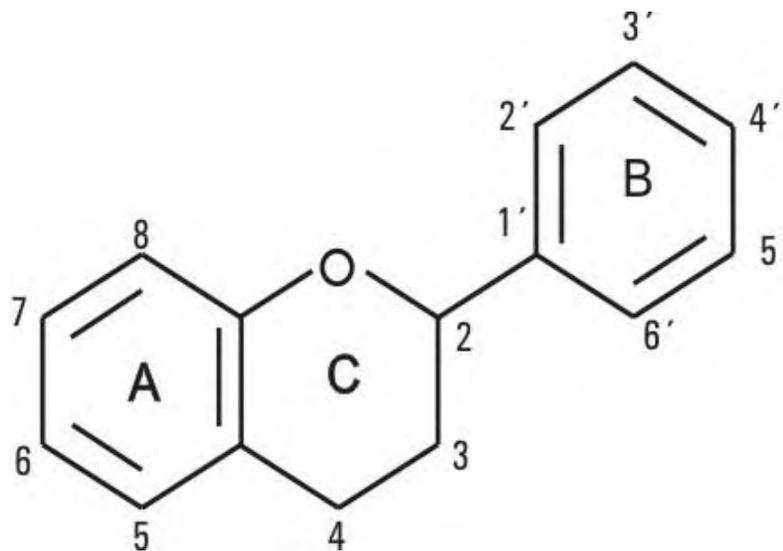
Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales son muy importantes para el desarrollo y buen funcionamiento de las plantas, ya que actúan como agentes protectores contra la luz UV o contra la infección por organismos fitopatógenos; además, estos compuestos presentan propiedades relacionadas con la salud humana, lo cual está basado en su actividad antioxidante. Son compuestos fenólicos constituyentes de la parte no energética de la dieta humana, ya que el organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos. Están ampliamente distribuidos en plantas, frutas, verduras, semillas y diversas bebidas como vino y cerveza (Aherne, 2002).

Se han identificado más de 5 000 flavonoides diferentes (Ross *et al.*, 2002). Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante (Havsteen, 1983; Peres, 1994). Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer (Pace-Asciak *et al.*, 1995; Jang, 1997).

### 2.7.1 Estructura Química

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6', (Fig. 6) (Flores, 2002).

La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química (Bors *et al.*, 1990). Esta estructura básica permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C (Bors *et al.*, 1990).



**Fig. 6 Estructura básica de flavonoides**

## 2.8 Clasificación

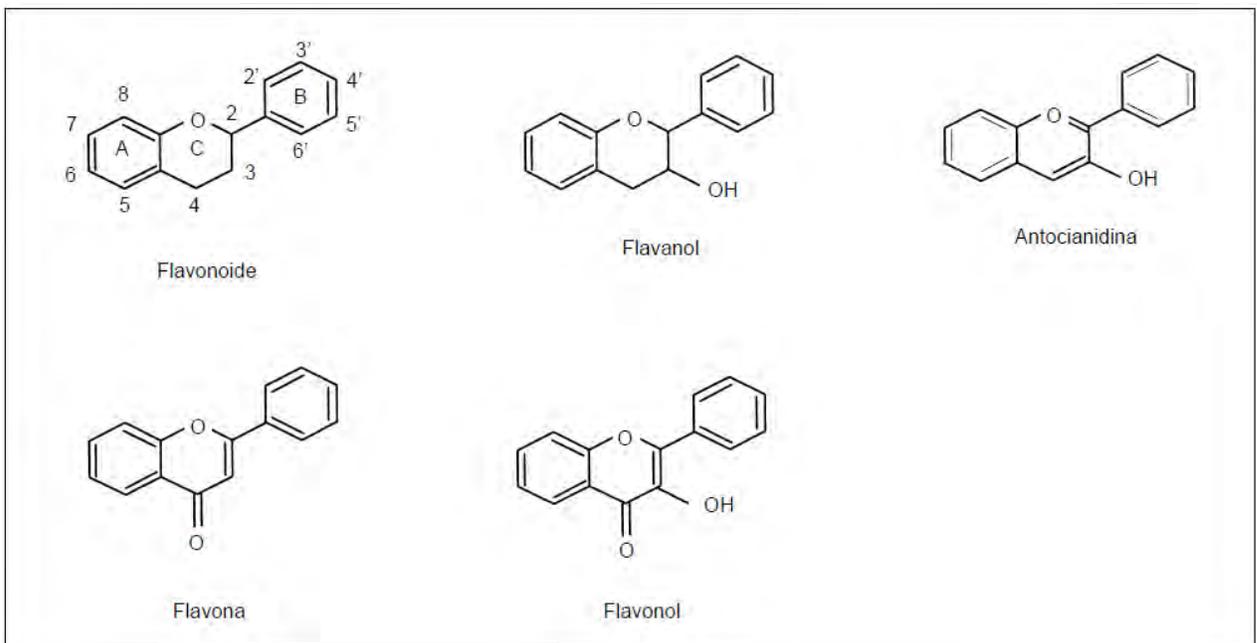
En función de sus características estructurales se pueden clasificar en:

1. Flavanos, como la catequina, con un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
2. Flavonoles, representados por la quercetina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
3. Flavonas, como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.
4. Antocianidinas, que tienen unido el grupo -OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.

Flavanonas y flavanoles, estos compuestos existen en muy pequeñas cantidades comparados con los otros flavonoides. Son incoloros o solo ligeramente amarillos. Por su baja concentración y su característica incolora, ellos han sido grandemente desatendidos, son probablemente los flavonoides menos conocidos. En cambio sus glicósidos son bien conocidos, como son la hesperidina y naringina de la corteza de los frutos cítricos (Pratopopadokis, 1998).

Antocianinas, estos compuestos siempre se encuentran como glicósidos; después de la clorofila, son el grupo más importante de pigmentos en las plantas visibles al ojo humano y proporcionan el color malva, rosa, violeta y azulado a numerosas flores y frutos, como por ejemplo la fresa, el clavel, las manzanas y la uva constituyen hasta aproximadamente 30 % de su masa seca.

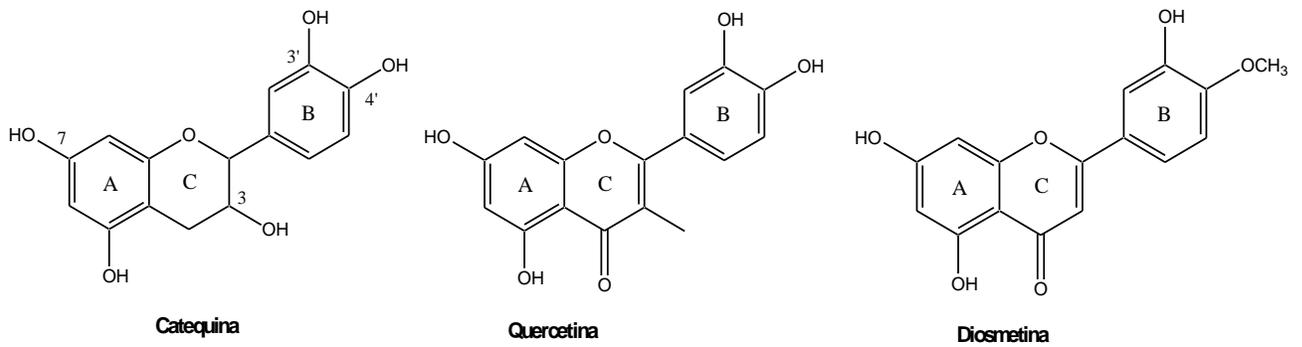
La parte sin azúcares de la molécula flavonoide se llama aglicona. Los glicósidos son más solubles en agua y menos reactivos frente a radicales libres que su aglicona o flavonoide respectivo.



**Fig. 7 Tipos y estructuras básicas de los flavonoides**

A los flavonoles y las flavonas se unen azúcares, preferentemente a la posición C-3 y con menor frecuencia al C-7, de forma que estos compuestos se encuentran comúnmente como O-glicósidos, siendo la D-glucosa el residuo azúcar más frecuente. Otros residuos de azúcares son la D-galactosa, la L-ramnosa, la L-arabinosa, la D-xilosa, así como el ácido D-glucurónico.

Tres características estructurales son importantes para su función: a) La presencia en el anillo B de la estructura catecol u O-dihidroxi; b) La presencia de un doble enlace en posición 2,3; c) La presencia de grupos hidroxilo en posición 3 y 5 (Letan, 1966). La quercetina presenta las tres características, mientras que la catequina solo presenta la segunda y la diosmetina la primera.



**Fig. 8 Características estructurales de los principales tipos de flavonoides**

## 2.9 Tipos y fuentes de flavonoides

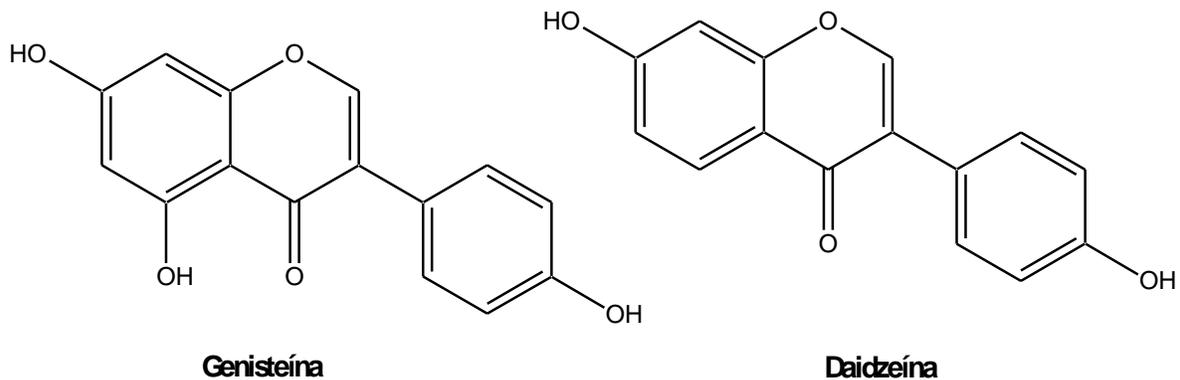
Los flavonoides se encuentran en frutas, verduras, semillas y flores, así como en cerveza, vino, té verde, té negro y soja, los cuales son consumidos en la dieta humana de forma habitual y también pueden utilizarse en forma de suplementos nutricionales, junto con ciertas vitaminas y minerales. Desempeñan un papel importante en la biología vegetal; así, responden a la luz y controlan los niveles de las auxinas reguladoras del crecimiento y diferenciación de las plantas. Otras funciones incluyen un papel antifúngico y bactericida, confieren coloración, lo que puede contribuir a los fenómenos de polinización y tienen una importante capacidad para fijar metales como el hierro y el cobre (Martínez-Florez *et al.*, 2002).

Los flavonoides se ubican principalmente en las hojas y en el exterior de las plantas, apareciendo sólo rastros de ellos en las partes de la planta por encima de la superficie del suelo.

Entre los que se pueden destacar, se han identificado los citroflavonoides como la quercitina, hesperidina, rutina, naranjina y limoneno. La quercitina es un flavonoide amarillo-verdoso presente en cebollas, manzanas, brócoles, cerezas, uvas o repollo rojo. La hesperidina se encuentra en los hollejos de las naranjas y limones.

La naranjina da el sabor amargo a frutas como la naranja, limón y toronja, y el limoneno se ha aislado del limón y la lima.

Los isoflavonoides, que están presentes en los alimentos con soja, tales como porotos, tofu, tempeh, leche, proteína vegetal texturizada, harina. Los dos más conocidos son la genisteína y la daidzeína.



**Fig. 9 Estructura química de los isoflavonoides Genisteína y Daidzeína**

Las proantocianidinas están presentes en las semillas de uva, vino tinto y extracto de corteza del pino marino. Las antocianidinas son pigmentos vegetales responsables del color rojo y de las cerezas. El ácido elágico es un flavonoide que se encuentra en frutas como la uva y en verduras, así como la catequina encontrada en el té verde y negro. El kaemferol aparece en puerros, brócoles, rábano y betabel.

## **2.10 Función Biológica de flavonoides**

Aunque todavía no se conoce exactamente el papel que desempeñan los flavonoides en los vegetales, se tienen algunas evidencias experimentales que sugieren que cumplen una o varias de las siguientes funciones:

a) Su capacidad de absorber ciertas radiaciones ultravioleta, los convierte en filtros solares para proteger los tejidos vegetales de radiaciones dañinas, y además se ha sugerido que participan en el proceso de la fotosíntesis.

b) Sus variados colores y su presencia en tejidos como los de las flores, sugieren que participan en procesos como la reproducción favoreciendo la atracción de insectos polinizadores.

c) Las diferentes actividades biológicas halladas para algunos de los flavonoides (antimicrobiana, antimicótica, entre otras) y las evidencias experimentales de que algunos aumentan la resistencia de ciertas plantas contra diferentes infecciones y enfermedades vegetales (es decir que actúan como fitoalexinas), sugieren que estas sustancias también son un mecanismo químico de defensa vegetal.

d) La capacidad inhibidora de ciertas hormonas vegetales presentada por algunos flavonoides sugiere que actúan como reguladores del crecimiento vegetal (Echeverri, 1987).

### 3. JUSTIFICACIÓN

El uso principal que se le da a *Spondias purpurea* es el consumo de los frutos, sin embargo, se cuenta con estudios etnobotánicos, en los que se indica uso medicinal, por lo cual la evaluación fitoquímica de las hojas permitirá darle un valor agregado a la especie, debido a que estas podrían ser utilizadas como una fuente de compuestos biológicamente activos (Flavonoides). El estudio de diferentes accesiones permitirá la elaboración de una base de datos que a su vez permitirá identificar los ejemplares que sintetizan mayor cantidad de flavonoides. Además de validar el uso tradicional que se ha dado a la especie (Ruanes-Morales *et al.*, 2013).

#### **4. HIPÓTESIS**

Estudios de las especies del género *Spondias*, han demostrado la presencia de una serie de metabolitos secundarios entre los que destacan compuestos fenólicos, compuestos volátiles, polifenoles y polisacáridos; con propiedades antimicrobianas. Por lo que se esperaría que de los extractos de hexano, acetato de etilo y metanol de las hojas *Spondias purpurea* se puedan aislar o detectar la presencia de dichos compuestos.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

- Caracterizar químicamente y evaluar la actividad bactericida de hojas de *Spondias purpurea*.

### 5.2 Objetivos particulares

- Obtener los extractos de las hojas de *Spondias purpurea* empleando disolventes orgánicos de distintas polaridades.
- Evaluar la actividad bactericida de los extractos de una muestra de hojas recolectadas del estado de Morelos, sobre once cepas bacterianas.
- Aislar y purificar los metabolitos secundarios mayoritarios de los extractos de hojas de *Spondias purpurea*.
- Identificar y determinar la concentración de flavonoides presentes en los extractos metanólicos de las hojas de *Spondias purpurea* de los estados de Guerrero, Michoacán, Veracruz y Sinaloa.

## **6. MATERIAL Y MÉTODO**

El material biológico fue recolectado en diferentes estados de México (Morelos, Guerrero, Michoacán, Veracruz y Sinaloa) y fueron donados para esta investigación por la Dra. Teresa Terrazas del instituto de Biología, UNAM, por el Dr. Gustavo Ballesteros y el Dr. Artemio Cruz de la Universidad de Chapingo

Se donaron 14 muestras de 20 g de hojas (Cuadro 1), las cuales fueron analizadas por cromatografía de líquidos de alta resolución y una muestra de 172 g (Ciruela silvestre macho), la cual fue analizada por cromatografía en columna abierta.

### **6.1 Secado de las hojas de *Spondias purpurea* L.**

Las hojas fueron colocadas en un cuarto de secado a una temperatura de 45<sup>0</sup>C hasta eliminar la humedad; una vez secado completamente el material fue triturado.

### **6.2 Preparación de los extractos orgánicos de las hojas de *Spondias purpurea* “Ciruela silvestre macho”.**

Se realizó una extracción exhaustiva como se muestra en la (Fig. 10) a temperatura ambiente, se tomaron 172 g de hojas secas y trituradas de *Spondias purpurea* L. (Ciruela silvestre macho) y se maceró con hexano, acetato de etilo (AcOEt) y metanol (MeOH) en orden ascendente de polaridad. Los filtrados obtenidos fueron sometidos a un proceso de concentración en el rotavapor y el extracto resultante se colocó en frascos previamente pesados y etiquetados para conocer por diferencia de peso la cantidad del extracto.

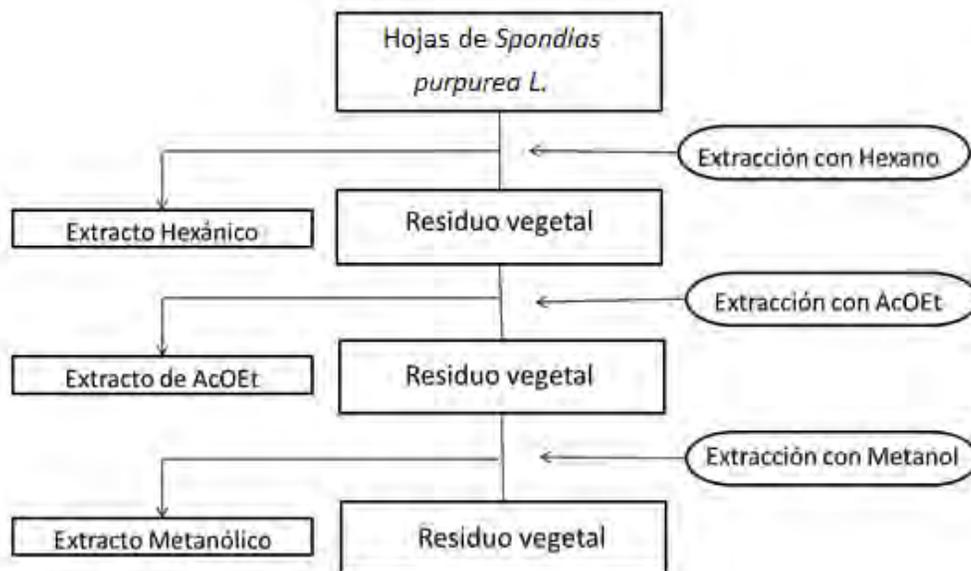


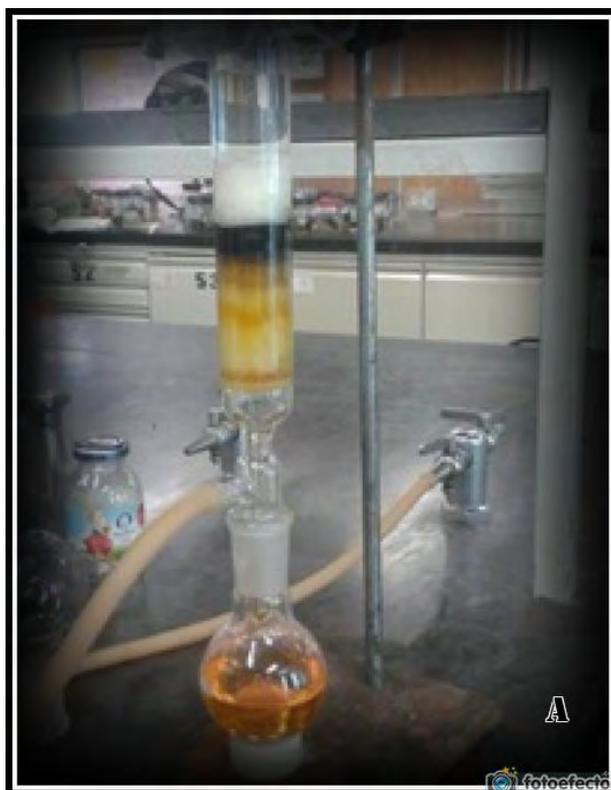
Fig. 10 Extracción de las hojas de *Spondias purpurea* L. “Ciruela silvestre macho”

### 6.3 Fraccionamiento cromatográfico del extracto hexánico de las hojas “Ciruela silvestre macho”

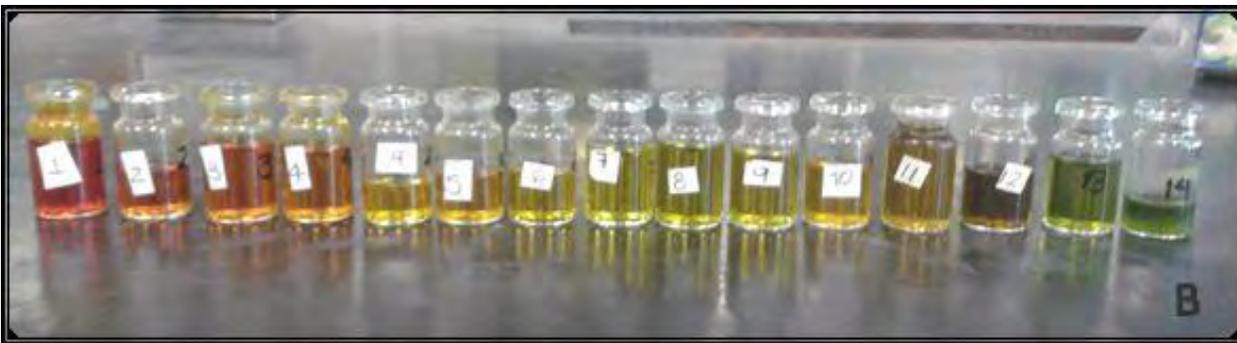
El extracto hexánico (3.52 g) fue adsorbido en gel de sílice (1:1) y separado por cromatografía en columna (Fig. 11). Se utilizaron como eluyentes mezclas de hexano, AcOEt y MeOH en distintas proporciones y en aumento de grado de polaridad. Las fracciones obtenidas y los sistemas de elución se muestran en el Cuadro 2.

**Cuadro 2. Fraccionamiento cromatográfico del extracto hexánico de las hojas "Ciruela silvestre macho"**

Sistema de elución	Proporción	Fracciones obtenidas
Hexano	100%	1 - 19
Hexano – AcOEt	9:1	20 – 34
Hexano – AcOEt	8:2	35 - 52
Hexano – AcOEt	7:3	53 – 65
Hexano – AcOEt	1:1	66 - 77
AcOEt	100%	78 – 88
AcOEt – MeOH	9:1	89 – 102
AcOEt – MeOH	8:2	103 – 115
AcOEt – MeOH	7:3	116 – 129
AcOEt – MeOH	1:1	130 – 142
MeOH	100%	143 – 154



**Fig. 11 A) Columna del extracto hexánico**



**Fig. 11 B) Fracciones obtenidas de las hojas de "Ciruela silvestre macho"**

#### **6.4 Purificación de los compuestos**

Los compuestos se purificaron por cromatografía en capa fina y cromatografía en columna.

#### **6.5 Identificación de flavonoides por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).**

El análisis de los flavonoides en cada muestra (cuadro 3) se realizó con un cromatógrafo Agilent 1100 provisto con un detector de UV, columna C18 Hypersil ODS (125 mm x 4 mm d.i., 5 mm de tamaño de partícula). El flujo de la fase móvil se mantuvo a 1 mLmin<sup>-1</sup> 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 prepararon muestras tomando 500 mg de hojas secas en 5 mL de metanol-agua (80-20) grado HPLC, posteriormente 20 mL de cada muestra fueron inyectados y analizados durante 14 minutos. Para identificar y cuantificar los flavonoides se usaron estándares de kaemferol, quercetina, rutina, isoquercitrina, astragalina y quercitrina (Sigma). Se prepararon soluciones estándar, se inyectaron 5 puntos 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.

**Cuadro 1. Nombre y sitio de colecta de las accesiones**

<b>Muestra</b>	<b>Estado de la República</b>
Ciruela silvestre macho*	Morelos
Guilotia agria tierra caliente	Guerrero
Mulata tierra caliente	Guerrero
Manza de Tepalcatepec	Michoacán
Amarilla	Veracruz
Guingur tierra caliente	Guerrero
Tempranera tierra caliente	Guerrero
Arribeña de Teloloapan, Gro.	Guerrero
Macho de tierra caliente	Guerrero
Ahuehepan de Gro.	Guerrero
Roja chichona	Veracruz
Tuxpana	Veracruz
Sinaloa 3	Sinaloa
Sinaloa 17	Sinaloa

\* = Análisis Fitoquímico de la hoja y Actividad bactericida

### **6.6 Evaluación de la actividad bactericida de los extractos de las hojas de *Spondias purpurea* "Ciruela silvestre macho".**

La actividad antimicrobiana se llevó a cabo mediante la técnica de difusión en agar con discos de papel filtro. En los extractos hexánico, AcOEt y metanólico, los microorganismos utilizados se muestran en el cuadro 4.

**Cuadro 4. Microorganismos utilizados para la determinación de la actividad bactericida (los microorganismos fueron donados por el cepario de la FES-Zaragoza, Campus I).**

<b>Microorganismos</b>	<b>Clasificación</b>
<i>Bacillus cereus</i>	Gram +
<i>Bacillus subtilis</i>	Gram +
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Gram +
<i>Escherichia 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 -

### **6.7 Preparación de la muestra**

Se prepararon dos disoluciones para cada extracto a concentraciones de 200 y 250 mg/mL, los extractos fueron disueltos en el disolvente en el que fueron obtenidos, posteriormente se inocularon discos de papel filtro (6 mm de diámetro), con (20 µL) para ambas concentraciones. Todo el proceso se llevó a cabo en condiciones estériles.

## 6.8 Bioensayo

Para esta técnica se preparó medio de cultivo agar Müller-Hinton y se esterilizó en autoclave en condiciones estándares por 15 minutos, posteriormente se colocó en cajas Petri la cantidad de 20 mL. Una vez solidificado se sembró el microorganismo, ajustado con la suspensión bacteriana equivalente al tubo 3 de la escala de Mc Farland, distribuyéndolo uniformemente con un hisopo.

Posteriormente se colocaron en la superficie del agar inoculado discos de papel filtro previamente impregnados de los extractos (hexano, AcOEt y MeOH), a las concentraciones antes mencionadas (Fig. 12).

Posteriormente las cajas inoculadas se colocaron en incubadora a 37 °C, se midieron los halos de inhibición a las 24 horas. Para todos los experimentos se realizaron 5 repeticiones.



**Fig. 12 Evaluación de la actividad antimicrobiana en extracto hexánico, AcOEt y MeOH de las hojas "Ciruela silvestre macho"**

## 6.9 Análisis estadístico

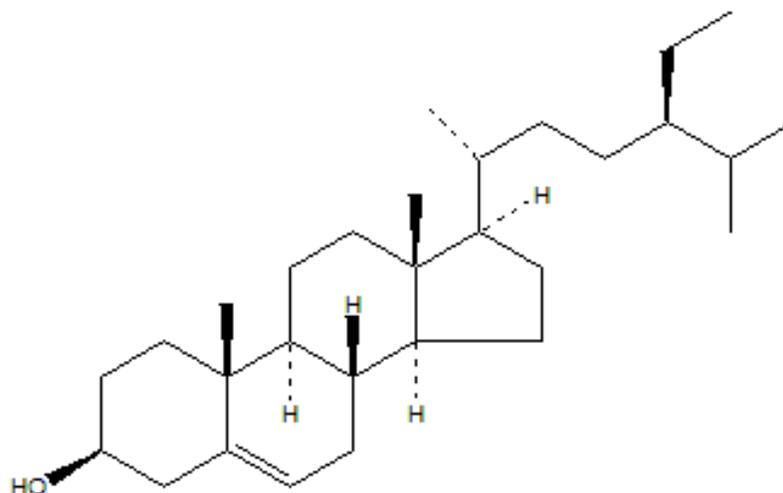
Los datos de las variables respuesta fueron analizados según su comportamiento con una prueba de Kruskal Wallis o Análisis de Varianza y una prueba de agrupación de medias Tukey ( $p < 0.05$ ).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Aislamiento e identificación estructural del $\beta$ -sitosterol

A partir de 3.52 g de extracto hexánico, el cual fue sometido a un fraccionamiento cromatográfico, se obtuvieron 154 fracciones.

En la fracción número 12 obtenida de un sistema de elución Hexano–AcOEt (1:1), por recristalización se recuperaron 25 mg de cristales blancos, los cristales se identificaron como  $\beta$ -sitosterol (Fig. 13).



**Fig. 13 Estructura química del  $\beta$ -sitosterol (compuesto aislado de la fracción 12)**

El IR del compuesto (Fig. 14) mostró las bandas de absorción que aparecieron en  $3430,90\text{ cm}^{-1}$ ,  $2937,99\text{ cm}^{-1}$ ,  $2866,69\text{ cm}^{-1}$ ,  $1640,98\text{ cm}^{-1}$ ,  $1063,67\text{ cm}^{-1}$ ,  $1465,71$ ,  $1382,54$ .

El espectro de RMN  $^1\text{H}$  de  $\beta$ -sitosterol (Fig. 15) mostró las siguientes señales, en 500 MHz con  $\delta= 0.67$  (s, 3H, Me, H-18)  $0.99$  (s, 3H Me H-19)  $3.51$  (m, 1H H3)  $5.35$  (s, 1H, H6).

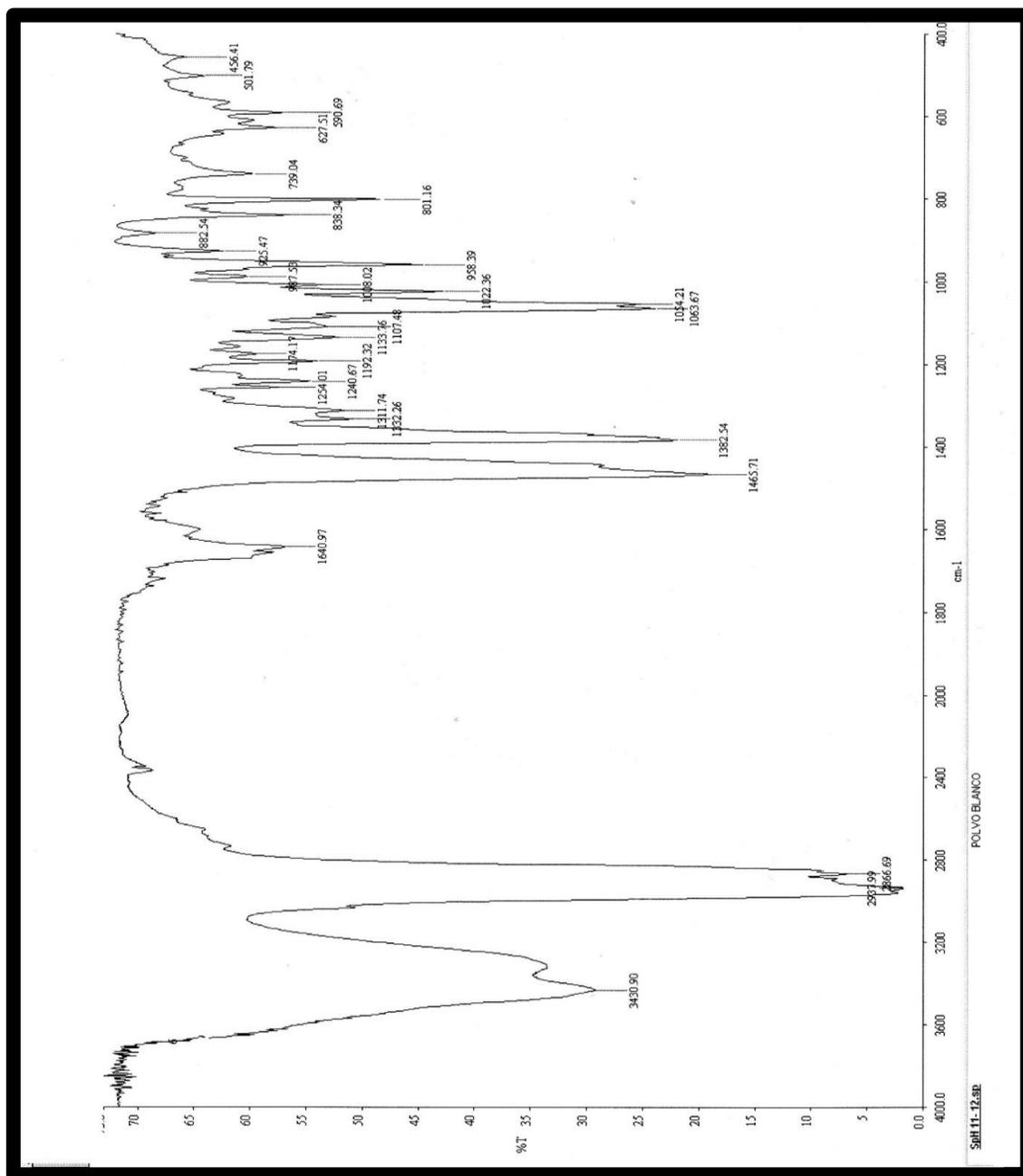


Fig. 14 Espectro del IR de  $\beta$ - Sitosterol

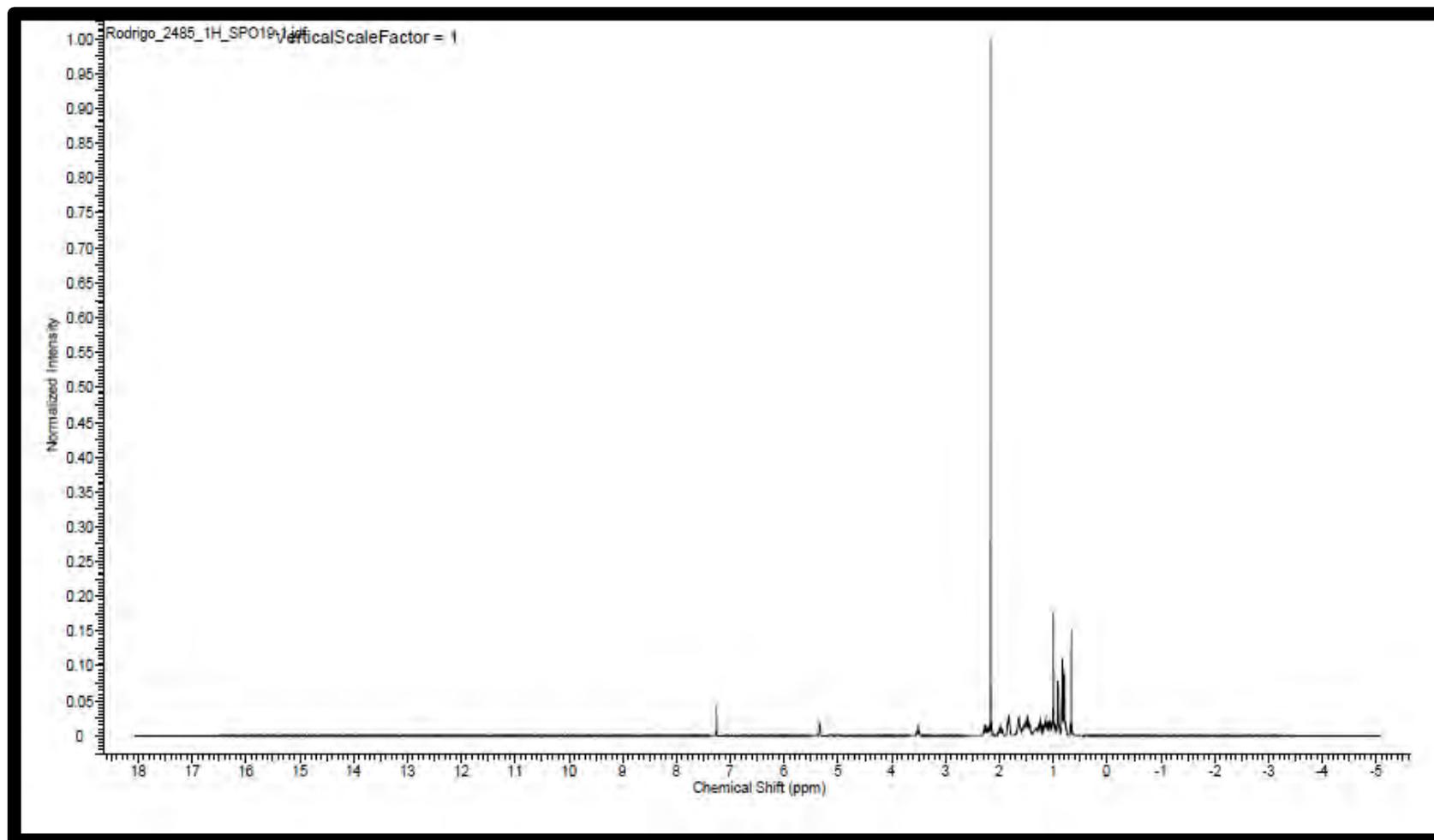


Fig. 15 Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de  $\beta$ -sitosterol

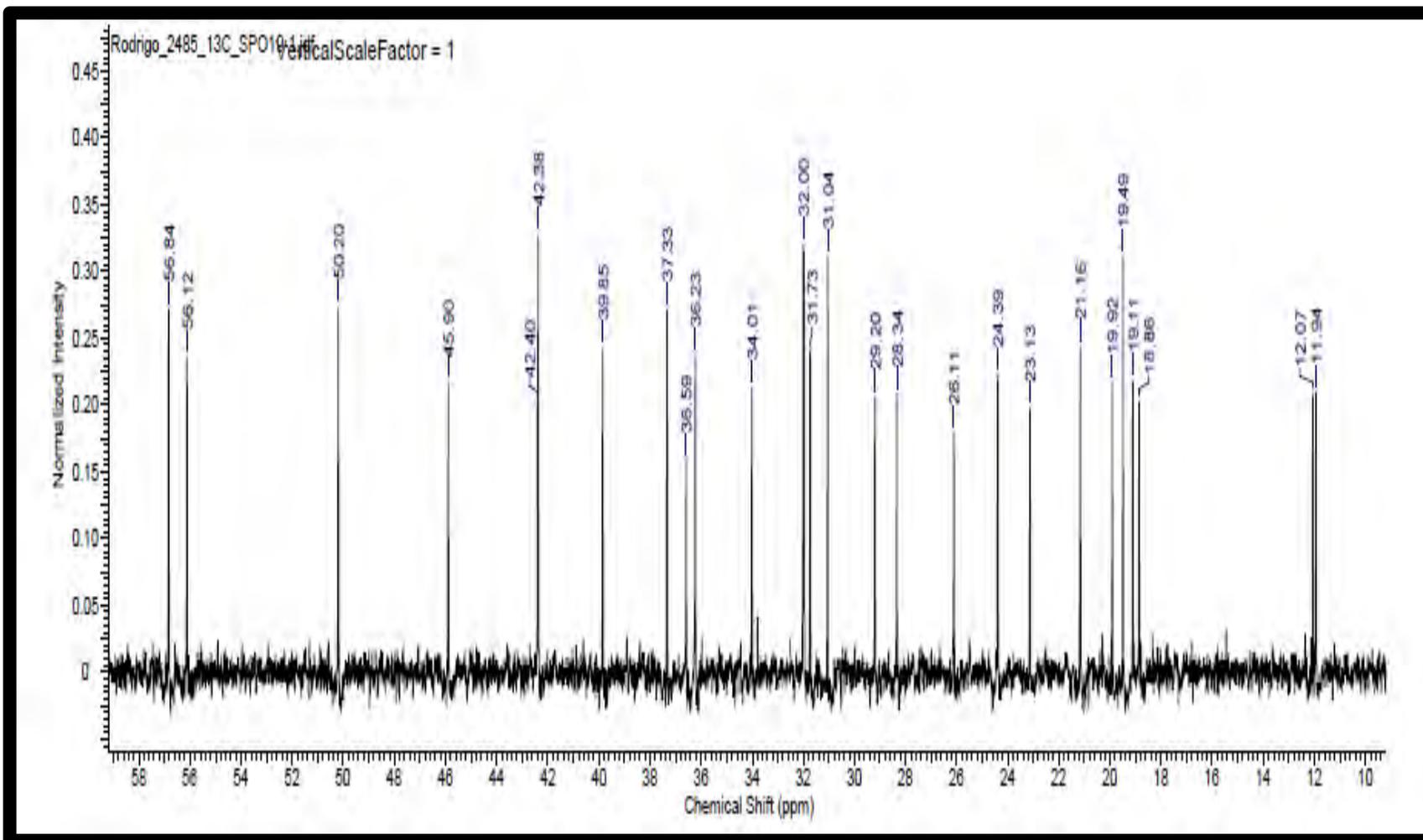


Fig. 16 Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de  $\beta$ -sitosterol

El  $\beta$ -sitosterol (59 mg; 1.67%), también se ha reportado en otras partes de la planta, así como en especies del mismo género, en el cuadro 5 se enlistan algunas especies y partes de la planta donde se ha identificado el compuesto.

**Cuadro 5. Especies donde se ha encontrado  $\beta$ -sitosterol**

<b>Especie</b>	<b>Parte de la planta</b>	<b>Referencia</b>
<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	Del Valle, 2009
<i>Spondias purpurea L.</i>	Corteza	Vázquez, 2012

El  $\beta$ -sitosterol es un fitoesterol de amplia distribución en el reino vegetal. Se ha demostrado que el  $\beta$ -sitosterol ejerce actividad sedante (Aguirre-Hernández *et al.*, 2009), modula la secreción de citocinas pro-antiinflamatorias (Desai *et al.*, 2009), exhibe actividad antiproliferativa e induce la apoptosis (Dong-Oh *et al.*, 2009).

**Cuadro 3. Concentración de flavonoides en hojas de *Spondias purpurea***

Flavonoides ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )					
Muestra	Rutina	Quercetina	Kaemferol	Isoquercitrina	Astragalina o quercitrina
Guilotia agria tierra caliente	Nd	$0.55 \pm 0.03$	Nd	$1.004 \pm 0.26$	$0.235 \pm 0.03$
Mulata tierra caliente	Nd	$0.63 \pm 0.08$ *	Nd	$1.40 \pm 0.04$	$1.20 \pm 0.01$ **
Manza de tepalcatepec	$0.350 \pm 0.04$	$0.06 \pm 0.02$	$0.040 \pm 0.010$	$0.87 \pm 0.06$	$0.96 \pm 0.05$
Amarilla	$0.180 \pm 0.03$	$0.27 \pm 0.01$	$0.030 \pm 0.003$	$0.12 \pm 0.008$	$0.24 \pm 0.008$
Tempranera tierra caliente	$0.411 \pm 0.05$	$0.27 \pm 0.01$	Nd	$0.89 \pm 0.02$	$1.05 \pm 0.009$
Arribeña de Teloloapan	Nd	$0.17 \pm 0.007$	Nd	$0.40 \pm 0.01$	$0.26 \pm 0.004$
Macho de tierra caliente	Nd	$0.09 \pm 0.01$	Nd	$1.06 \pm 0.13$	$0.26 \pm 0.2$
Ahuehepan	Nd	$0.27 \pm 0.01$	Nd	$0.62 \pm 0.07$	$0.40 \pm 0.01$
Roja chichona	$0.020 \pm 0.007$	$0.13 \pm 0.008$	$0.031 \pm 0.003$	$1.07 \pm 0.01$	$0.14 \pm 0.007$
Sinaloa 3	$0.129 \pm 0.0043$	$0.06 \pm 0.0023$	Nd	$0.0048 \pm 0.002$	$0.4731 \pm 0.0071$
Guingur tierra caliente	$0.002 \pm 0.0004$	$0.47 \pm 0.0002$	$0.044 \pm 0.0019$	Nd	$0.3960 \pm 0.0018$
Poroche roja	$0.006 \pm 0.0007$	$0.06 \pm 0.0011$	$0.030 \pm 0.0008$	Nd	$0.0935 \pm 0.0007$
Tuxpana	$0.013 \pm 0.0128$	$0.10 \pm 0.0004$	$0.038 \pm 0.0165$	Nd	Nd
Sinaloa 17	$0.001 \pm 0.0005$	$0.33 \pm 0.0049$	$0.043 \pm 0.0024$	Nd	$0.4151 \pm 0.0041$

Los datos representan la media  $\pm$  el error estándar de tres repeticiones de la concentración de flavonoides. Nd = No detectado Mayor concentración \* Menor concentración \*\*

Todas las muestras presentan **quercetina**, siendo la muestra “Mulata de tierra caliente” del estado de Guerrero, la que la biosintetiza en mayor proporción. Con respecto a **rutina** este flavonoide se presenta en 9 de las 14 muestras analizadas y se detectó en mayor proporción en la muestra “Tempranera de tierra caliente”, también del estado de Guerrero. El **kaemferol** se detectó en 7 de las 14 muestras analizadas, siendo la que sintetiza mayor cantidad “Guingur, tierra caliente”, del estado de Guerrero, no obstante es el que se presenta en menor concentración en todas las muestras analizadas. La **isoquercitrina** se presenta en 10 de las 14 muestras analizadas, sintetizada en mayor proporción por la muestra “Mulata de tierra caliente”, del estado de Guerrero. La **astragalina o quercitrina** se presenta en 13 de las 14 muestras analizadas, siendo la muestra “Mulata de tierra caliente” la que sintetiza mayor cantidad de este flavonoide (cuadro 3).

Para la especie de estudio solo se han aislado kaemferol y quercetina del fruto (Engels *et al*, 2012), para otras estructuras de la planta no se encuentran informes de la presencia de flavonoides, por lo cual este trabajo sería el primer informe de la presencia de flavonoides en hojas.

Los flavonoides son un grupo de metabolitos secundarios de amplia distribución que se encuentran en todos los órganos de las plantas y protegen de la radiación de la luz ultravioleta, de agentes patógenos y de herbívoros; además de ser responsables del color de algunas flores y frutos (Heim *et al.*, 2002). Las frutas y vegetales pueden contener hasta 300 mg/kg de peso fresco, se estima que los humanos consumen entre 20 y 80 mg de flavonoides por día (Ishige *et al.*, 2001).

La **quercetina** se ubica en frutas y verduras, este compuesto previene el desarrollo de tumores, puede producir arresto celular e induce la apoptosis, posee también actividad antiviral, antiinflamatoria y antimicrobial (Pawlikowska-Pawlęga *et al.*, 2007; Skibola y Smith, 2000). Recientemente Gayoso y colaboradores (2017) describieron el potencial neuroprotector de quercetina para el tratamiento de enfermedades como el Alzheimer.

El **kaemferol** se encuentra en té, brócoli, manzanas, fresas y frijoles, se ha demostrado que puede regular a las células cancerosas al inducir la apoptosis (Chen y Chen, 2013). La **isoquercitrina** es un potente antioxidante (Hoon *et al.*, 2010), también se ha encontrado que ejerce un efecto hepatoprotector al contra el daño que ejerce el acetaminofen (Xie *et al.*, 2016) actúa como antiinflamatorio ya que inhibe a la prostaglandina E<sub>2</sub>, se sabe que reduce la producción de interleucina 6 en células MG-63 de osteosarcoma, inhibe la angiogénesis *in vitro* (Valentova *et al.*, 2014), induce apoptosis en *Candida albicans* (Yun *et al.*, 2016) ; mientras que la **rutina** exhibe actividad antioxidante, vasodilatadora y antiinflamatoria (Marcarini *et al.*, 2011; Shing-Chuan *et al.*, 2002).

Cómo puede observarse todos los flavonoides detectados en las hojas poseen actividad biológica, lo que los hace de interés alimenticio, farmacológico y cosmético.

## **7.2 Actividad bactericida de las hojas de *Spondias purpurea***

Se evaluó la actividad bactericida de los extractos en las hojas de *Spondias purpurea* frente a once cepas bacterianas. En el cuadro 6 se muestran los resultados de la actividad bactericida de los extractos, donde no hubo actividad en ninguno de los extractos (Fig. 17).

**Cuadro 6. Actividad bactericida de las hojas de *Spondias purpurea***

Halo de inhibición (mm)						
Microorganismos	Extractos (200 mg/mL)			Extractos (250 mg/mL)		
	Hexano	Acetato de Etilo	Metanol	Hexano	Acetato de Etilo	Metanol
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter faecalis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus mutans</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Shigella flexneri</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aureginosa</i>	-	-	-	-	-	-

- Indica que no hay actividad bactericida

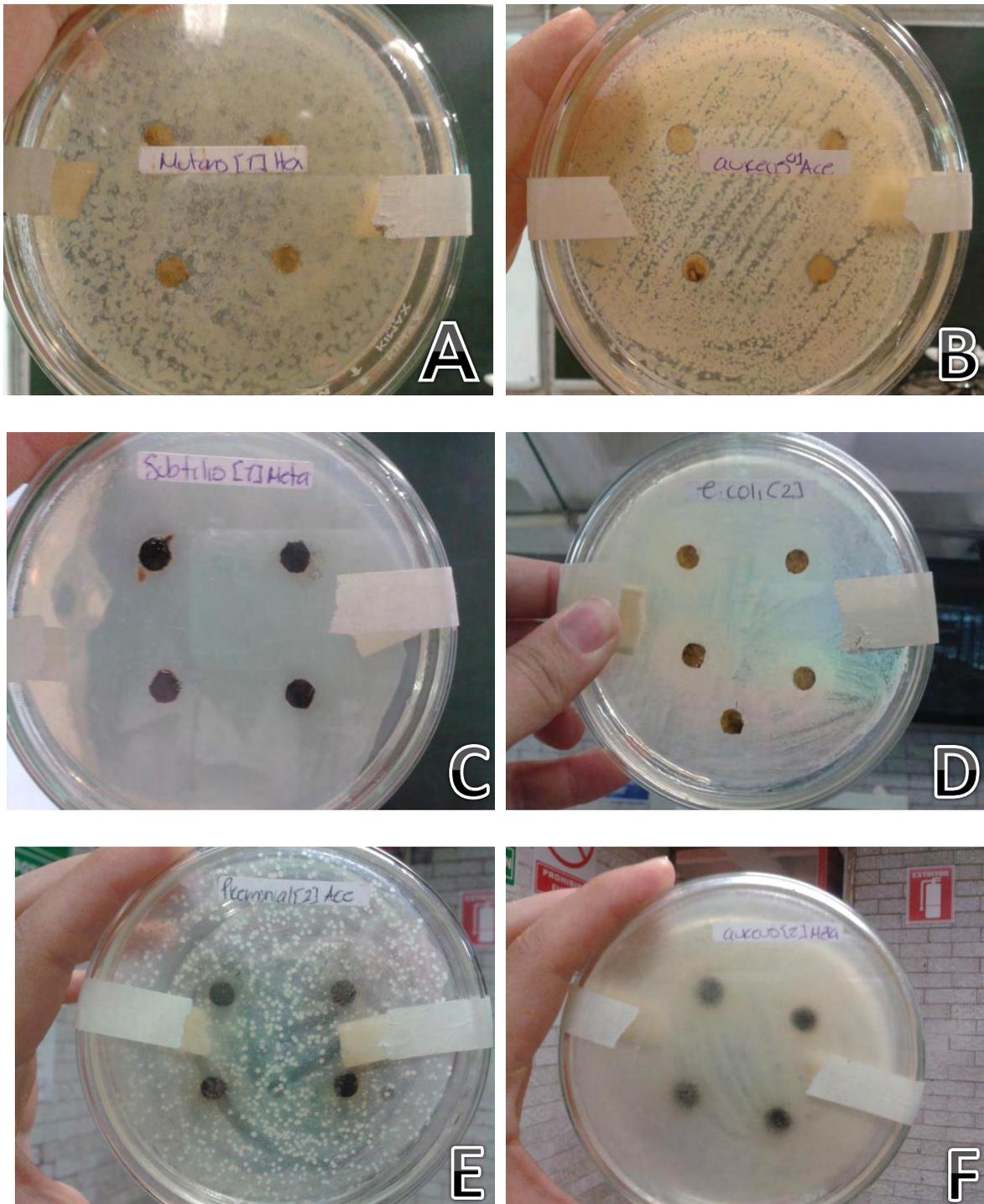


Fig. 17 Actividad bactericida de las hojas de *Spondias purpurea* "Ciruela silvestre macho" A) Extracto hexánico 200 mg/mL sobre *S. mutans*, B) Extracto de AcOEt 200 mg/mL sobre *S. aureus*, C) Extracto metanólico 200 mg/mL sobre *B. subtilis*, D) Extracto hexánico 250 mg/mL sobre *E. coli*, E) Extracto AcOEt 250 mg/mL sobre *K. pneumoniae*, F) Extracto metanólico 250 mg/mL sobre *S. aureus*.

## 8. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados se puede concluir que:

- Los extractos de hexano, acetato de etilo y metanol de las hojas del estado de Morelos “ciruela silvestre macho” no ejercen actividad bactericida a ninguna de las dos concentraciones utilizadas, en ninguna de las once cepas evaluadas.
- Por primera vez se informa de la presencia del  $\beta$ -sitosterol en las hojas de *Spondias purpurea*.
- Todas las muestras del estado de Guerrero sintetizan quercetina, isoquercitrina y astragalina o quercitrina.
- La muestra “Mulata de tierra caliente” del estado de Guerrero, es la que sintetiza en mayor proporción (Isoquercitrina, Astragalina y Quercetina) tres de los cinco flavonoides analizados.
- Todas las muestras analizadas sintetizan quercetina.

## 9. LITERATURA CITADA

- Aguirre-Hernández E., Rosas H., Soto-Hernández M., Martínez A., Moreno J. Gonzalez-Trujano E. (2009). Bioactivity guide isolation of  $\beta$ -sitosterol and some fatty acids as active compounds in the anxiolytic and sedative effects of *Tilia Americana* var. *Mexicana*. *Planta Medica*. (73) pp. 1148-1155.
- Aherne S., O'Brien N. (2002) Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*. (18) pp. 75-81.
- Anaya A., Espinosa G., Cruz O. (2001). *Relaciones Químicas entre Organismos: Aspectos Básicos y Perspectivas de su Aplicación*. Ed. Plaza y Valdés, México. pp. 165-166.
- Ayoka A., Akomolafe R., Akinsomisoye S., Ukponmwan E. (2008). Medicinal and Economic Value of *Spondias mombin*. *African Journal of Biomedical Research*, Vol. 11 pp. 129 -136.
- Benavides J. (1994). *Árboles y Arbustos Forrajeros en América Central*. CATIE. Serie Técnica. Informe Técnico No. 236 vol. 2 pp. 271.
- Bors W., Heller W., Christa M. (1990). Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol*. (186) pp. 343-355.
- Cabrera C. (2000). *Anacardiaceae* de la Península de Yucatán: taxonomía, florística y etnobotánica. Universidad Autónoma de Yucatán. Etnoflora yucateca fascículo 15 pp. 36-38.
- Cáceres A., Cano O., Samayoa B., Aguilar L. (1990). Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. Screening of 84 plants against enterobacteria. *Journal of Ethnopharmacology*.

- Castillo G., Martínez S. (2007). Manual de Fitoterapia. Ed. Elsevier Masson. Barcelona España. pp. 25-34.
- Ceva-Antunes P., Ribeiro B., Silva S., Carvalhoda C., Antunes O. (2006). Analysis of volatile composition of siriguela (*Spondias purpurea* L.) by solid phase microextraction (SPME). LWT (39) pp. 436–442.
- Chen A., Chen Ch. (2013). A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. Food Chemistry (138) pp. 2099–2107.
- Cordero J., Boshier D. (2003). Árboles de Centroamérica. Un manual para extensionistas. Oxford Forestry Institute CATIE. Reino Unido. pp. 889-892.
- Correia S., David P., David M. (2006). Metabolitos secundarios de especies de *Anacardiaceae*. Química Nova. Vol. 29 (6) pp. 1287-1300.
- 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. (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.
- Desai F., Ramanathan M., Fink C., Wilding G., Weinstock G., Awad A. (2009). Comparison of the immunomodulatory effects of the plant sterol  $\beta$ -sitosterol to simvastatin in peripheral blood cells from multiple sclerosis patients. Vol. 9 pp. 153-157.
- Dong-Oh Moon, Kyeong-Jun L., Yung H., Gi-Young (2009).  $\beta$ -sitosterol induced-apoptosis is mediated by the activation of ERK and the downregulation of Akt in MCA-102 murine fibrosarcoma cells. *International Immunopharmacology* vol. 7 (8) pp. 1044-1053.

- Echeverri L. (1987). Productos naturales biológicamente activos, departamento de química. Universidad de Antioquia. Medellín. pp. 124-126
- Ecolástico D. (1999). Estudio etnobotánico y agroecológico de especies vegetales utilizadas con fines medicinales del municipio de Cahabén. Tesis doctoral. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. pp. 12-14.
- Engels C., Gräter D., Ezquivel P., Jimenez V., Gänzle M., Schieber A. (2012). Characterization of phenolic compounds in jocote (*Spondias purpurea* L.) peels by ultrahigh-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Food research international*. vol. 46 Issue 2 pp. 557-562.
- Flores S. (2002). Los flavonoides, propiedades y acciones antioxidantes. España. Pp. 35-39.
- Font P., (1999). Plantas medicinales. El Dioscórides renovado. Barcelona, España: Editorial Península. pp. 821.
- Garduño P. (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.
- Gayoso E., Ibiapina M., Elena P., José S., Nereide S., Maria J., Juan M., (2017). Effect of the oral administration of nanoencapsulated quercetin on a mouse model of Alzheimer's disease. *International Journal of Pharmaceutics* Vol. 517 Issues 1-2 pp 50-57.
- Gutiérrez de G., Martínez M., Sanabria L., Pinto G., Igartuburu J. (2005). 1D- and 2D-NMR spectroscopy studies of the polysaccharide gum from *Spondias purpurea* var. *lutea*. *Food Hydrocolloids* 19 pp. 37-43.
- Harborne, J. (1982). Introduction to Ecological Biochemistry 4a ed. Academic. San Diego, California. USA.

- Havsteen B. (1983). Flavonoids a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol.* (32) pp. 1141-1148.
- Heim K., Tagliaferro A., Bobilya D. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry.* (13) pp. 572–584.
- Hoon J., Beum J., Eun H., Neville N. (2010). Isoquercitrin is the most effective antioxidant in the plant *Thuja orientalis* and able to counteract oxidative-induced damage to a transformed cell line (RGC-5 cells). *Neurochemistry International.* (57) pp. 713-721.
- Ishige K., Schubert J., Sagara M. (2001). Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radical Biology & Medicine.* Vol. 30 (4) pp. 433–446.
- Jang M., Cai L., Udeani G. (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science.* (275) pp. 218-221.
- Judprasong K., Charoenkiatkul S., Thiyajai P., Sukprasansap M. (2013). Nutrients and bioactive compounds of Thai indigenous fruits. *Food Chemistry.* 140 pp. 507–512.
- Koziol J., Macía J. (1998). Chemical composition, nutritional evaluation, and economic prospects of *Spondias purpurea* (*Anacardiaceae*). *Economic Botany* 52 (4) pp. 373-380.
- Letan A. (1966). The relation of structure to antioxidant activity of quercitin and some of its derivatives. (31) pp. 518-523.
- Lira Júnior J., Bezerra J., Lederman I., Moura J. (2010). Producto y características físicoquímicas de clones de ciruela en Zona Norte de Pernambuco. 5 (1) pp. 43-48.

- Macía J., Barfod S. (2000). Economic Botany of *Spondias purpurea* (Anacardiaceae) In Ecuador. *Economic Botany* 54(4) pp. 449-458.
- Maldonado M., Vargas G., Molina R., Sol A. (2007). Frutales Tropicales de Tabasco, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Instituto para el Desarrollo de Sistemas de Producción del Trópico Húmedo. Villahermosa, México. pp. 71.
- 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.
- Marcarini J., Ferreira M., Cabral R., Ribeiro L., Hoffmann C., Mantovani M. (2011). Investigation of cytotoxic, apoptosis-inducing, genotoxic and protective effects of the flavonoid rutin\_in HTC hepatic cells. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 63 (5) pp. 459-465.
- Martínez A., Soto F., Almeida M., Herмосilla R., Martínez O. (2012). Metabolitos secundarios y actividad antibacteriana in vitro de extractos de hojas de *Anacardium Occidentale* L. (marañón). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 17 (4) pp. 320-329.
- Martínez E., Ramos A. (2007) Un nuevo género de *Anacardiaceae* de la Península de Yucatán. *Acta Botanica Hungarica* 49(3-4) pp. 353-354.
- Martínez M., Pinto G., 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.
- Martínez M., Pinto G., González M., Herrera J., Oulyadi H., Guilhaudis L. (2008). New structural features of *Spondias purpurea* gum exudate. *Food Hydrocolloids* 22 pp. 1310-1314.

- Martínez M. (1979). Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México.
- Martínez-Flórez S., González J., Culebras J., Tuñón M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Hospital XVII. (6) pp. 271-278.
- Miller A., 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.
- Orduz R., Rangel M. (2002). Frutales tropicales potenciales para Piedemonte llanero. Corpoica.
- Pace-Asciak C., Hahn S., Diamandis E., Soleas G., Goldberg D.,. (1995). The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation in eicosanoid synthesis: implication for protection against coronary heart disease. *Clin Chim Acta*. (235) pp. 207-219.
- Padilla V., Cuevas G., Ibarra M., Moreno G. (2006). Riqueza y biogeografía de la flora arbórea del estado de Colima, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*.
- Pawlikowska-Pawłęga B., Gruszecki W., Misiak L., Paduch R., Piersiak T., Zarzyka B., Pawelec J., Gawron A. (2007). Modification of membranes by quercetin, a naturally occurring flavonoid, via its incorporation in the polar head group. *Biochimica et Biophysica*. pp. 2195–2204.
- Peres W. (1994). Radicales libres en niveles biológicos. Ed. Universidad de Católica de Pelotas. Brasil. pp. 49-81.
- Petiard V. (1987). El cultivo de células. *Mundo Científico* 7 pp 730-736.

- Pinto G., Martínez M., Mendoza J., Ávila D., Ocandot E., Rivas E. (1996). Structural study of the polysaccharide isolated from *Spondias purpurea* gum exudate. *Carbohydrate Research*. 290 pp. 97-103.
- Pinto G., Martínez M., Mendoza J., Ocandot E., Rivas E. (1995). Comparison of three *Anacardiaceae* gum exudates. *Biochemical Systematics and Ecology*. Vol. 23 (2) pp. 151-156.
- Prasad M. (2008). Characterization of bioactive and biochemical constituents in *Spondias mangifera* fruit. Tesis. The University of Mysore.
- Pratopopadokis E. (1998). Characterization of citrus *Aurantium* and *C. taiwanica* rootstocks by isoenzyme and essential oil analysis. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. Vol. 73 (1) pp. 81-85.
- Ramírez H., Castellanos J., Muñoz R., Palomino G., Pimienta E. (2008). Sistemas de producción de *Spondias purpurea* (*Anacardiaceae*) en el centro-occidente de México. *Revista Biología Tropical*.
- Rangel D., García I., Velasco J., Buitrago D., Velazco E. (2001). Actividad antimicrobiana de los extractos etanólico, acetónico y acuoso de *Baccharis nitida* Pers. *Rev. Fac. Farm.* (42) pp. 43 - 46.
- Ross J., Kasum C. (2002). Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr.* (22) pp. 19-34.
- Ruanes-Morales, M.R., P. Montañez, M. Ferrer, P. Correa, L. Silveira. (2013). Usos y costumbres de la ciruela. UADY, SNIC, SINAREFI.
- Ruenes M., Casas A., Jiménez O., Caballero J. (2010). Etnobotánica de *Spondias purpurea* L. (*Anacardiaceae*) en la península de Yucatán. *Interciencia*. Vol. 35 (4) pp. 247-254.

- Rzedowski G., Rzedowski J. (1999). Flora del Bajío y regiones adyacentes. Instituto de Ecología, A. C. Centro Regional del Bajío de Pátzcuaro, Michoacán. Fascículo 78 pp. 44.
- Shing-Chuan S., Woan L., Hui Y., Chun H., Ching H., Ling L., Yen C. (2002). In vitro and in vivo inhibitory activities of rutin, wogonin and quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide and prostaglandin production. *European Journal of Pharmacology*. 446 (3) pp. 87-194.
- Skibola C., Smith M. (2000). Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radical Biology & Medicine*. (29) 375–383.
- Stevens, P.F., (2001). Angiosperm Phylogeny Website. Version 9. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.
- Taiz L., Zeiger E. (1998). Surface protection and secondary defense compounds. En: *Plant Physiology*. 2a ed. Sinauer Associates, Inc., Publishers. USA.
- Taiz L., Zeiger E. (2006). Fisiología Vegetal I. 3a ed. Publicaciones de la Universidad Jaume I. pp 533-536.
- Valentova K., Vrba J., Bancírová M., Kren.V. (2014). Isoquercitrin: Pharmacology, toxicology and metabolism. *Food and Chemical Toxicology*. (68) pp. 267-262.
- Vazquez O. (2012). Aislamiento de metabolitos secundarios de la corteza de *Spondias purpurea* L. Tesis, Fes Zaragoza. UNAM.
- Verpoorte R. (2000). Secondary Metabolism, metabolic engineering of plants secondary metabolism. Kluwer Academic Publishers. pp. 1-29
- Xie W., Wang M., Chen Ch., Zhang X., Melzig M. (2016). Hepatoprotective effect of isoquercitrin against acetaminophen-induced liver injury. *Life Sciences*. (152) pp. 180-189.
- Yun J., Woo E., Lee D. (2016). Isoquercitrin, isolated from *Aster yomena* triggers ROS-mediated apoptosis in *Candida albicans*. *Journal of Functional Food*., (22) pp. 437-357.