



# Histoquímica, contenido de fenoles totales y actividad antioxidante de hoja y de madera de *Litsea glaucescens* Kunth (Lauraceae)

## Histochemistry, total phenolic content and antioxidant activity in leaf and wood of *Litsea glaucescens* Kunth (Lauraceae)

Nery Alicia Tapia-Torres<sup>1,2</sup>, Carmen de la Paz-Pérez-Olvera<sup>1</sup>, Angélica Román-Guerrero<sup>2</sup>, Alejandra Quintanar-Isaías<sup>1</sup>,  
Erísteo García-Márquez<sup>2</sup> y Francisco Cruz-Sosa<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México, D.F., México.

<sup>2</sup> Departamento de Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México, D.F., México.

\* Autor de correspondencia: cppo@xanum.uam.mx

### RESUMEN

*Litsea glaucescens* (laurel) es una especie distribuida ampliamente en México, sus principales usos se centran en la medicina tradicional en forma de infusiones y baños medicinales para el alivio de desórdenes ginecológicos y estomacales. Esta propiedad terapéutica es atribuida a la presencia de compuestos fenólicos en el cuerpo de la planta. En el presente estudio se emplearon técnicas histoquímicas para localizar la presencia de compuestos fenólicos como lignina y taninos, así como lípidos y carbohidratos no estructurales en cortes de hoja y de madera; también se cuantificó el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante de extractos acuosos (92 °C y 25 °C) y metanólicos por los métodos de inhibición de los radicales DPPH y ABTS. Los resultados histoquímicos muestran que tanto las hojas como la madera poseen una concentración importante de compuestos fenólicos, aceites y algunos carbohidratos no estructurales. La caracterización química de los extractos acuosos de la hoja extraídos a 92 °C mostró una mayor concentración de fenoles totales que aquellos extraídos con metanol. En todos los casos, el contenido de fenoles fue mayor en las hojas que en la madera. Los extractos metanólicos obtenidos a partir de la albura mostraron mayor actividad antioxidante que los de duramen, sin importar el método de cuantificación empleado. De acuerdo con los resultados obtenidos, es posible establecer una interrelación entre el contenido y la distribución de los compuestos fenólicos en los tejidos vegetales y su actividad antioxidante con su uso potencial en la medicina tradicional.

**PALABRAS CLAVE:** cuerpos oleíferos, funcionalidad de extractos metanólicos, laurel silvestre, mesófilo, xilema secundario.

### ABSTRACT

*Litsea glaucescens* is widely distributed in Mexico, its main uses are focused on traditional medicine in the form of teas and medicinal baths to relieve gynecological and stomach disorders. This therapeutic property is attributed to the presence of phenolic compounds through the plant body. In the present study, histochemical techniques were used to locate the presence of phenolic compounds like lignin and tannins, as well as lipids and non-structural carbohydrates in sections of leaves and wood and, to quantify total phenolic content and antioxidant activity by means of scavenging DPPH and ABTS free radicals on leaves and wood aqueous (92 °C and 25 °C) and methanolic extracts. Histochemical results show that leaves and wood displayed a considerable amount of phenolic compounds, oils and non-structural carbohydrates. Chemical characterization of leaves aqueous extracts made up at 92 °C displayed higher total phenolic content than those made with methanol. In all cases, the total phenolics were higher in leaves than in wood samples. Sapwood methanolic extracts showed higher antioxidant activity than heartwood, regardless the quantification method used. In agreement with these results, it is possible to establish an interrelationship between the content and distribution of phenolics on vegetal tissues and its antioxidant activity with its potential use for therapeutic end-uses.

**KEY WORDS:** oil bodies, methanolic extracts functionality, wild laurel, mesophyll, secondary xylem.

## INTRODUCCIÓN

En México la familia Lauraceae tiene gran importancia en el área de la salud por sus aplicaciones en la etnomedicina y los alimentos. Se han identificado 10 taxa de esta familia: *Aiouea*, *Beilschmiedia*, *Cassytha*, *Cinnamomum*, *Licaria*, *Litsea*, *Mocinnodaphne*, *Nectandra*, *Ocotea* y *Persea*, distribuidas en bosques y selvas. Muchas especies de esta familia son utilizadas en medicina tradicional, forraje, aceites esenciales, condimentos y frutos (Lorea, 2002). El fruto de *Persea americana*, el aguacate, es el más comestible y el más conocido; los aceites esenciales que se extraen de él, poseen propiedades terapéuticas y son usados como componente en productos farmacéuticos por sus características físicas y químicas. Las hojas se utilizan en infusión como tónico digestivo y regulador de la menstruación (Jiménez *et al.*, 2001). La canela o corteza de *Cinnamomum verum*, por su aroma y sabor es utilizada como condimento, colorante y saborizante, por sus propiedades químicas, se usa en infusiones para el alivio de algunos desórdenes digestivos y ginecológicos. Las hojas de *Nectandra globosa* (aguacatillo) y *Litsea glaucescens* (laurel silvestre) se emplean como condimento y dado su alto porcentaje de proteína y fibra como forraje para ganado (Jiménez *et al.*, 2007).

*L. glaucescens* tiene asociado un uso medicinal desde tiempos ancestrales para el alivio de trastornos estomacales, problemas ginecológicos, o postparto, y para combatir la esterilidad femenina; asimismo se ha mencionado con propiedades antiinflamatorias (Argueta *et al.*, 1994, Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional mexicana, 2014). La hoja de esta planta generalmente es empleada en forma de infusiones, macerados alcohólicos o inhalaciones de vapor (López *et al.*, 1995; Jiménez-Pérez *et al.*, 2011).

En el sistema agroforestal es usada como cercas vivas. La selección de las especies que constituyen esta práctica se da de acuerdo con la durabilidad natural de la madera y estrechamente relacionada con la densidad básica. Las principales ventajas que presenta esta selección son: reducción de la fuerza de los vientos, sombra para cultivos y para animales domésticos, forraje, control de malezas,

fuerza alternativa de frutos comestibles y leña (Araya *et al.*, 1993; Avendaño y Acosta, 2000). Para *L. glaucescens* la densidad básica se ha encontrado del orden de 0,60 (Torelli, 1982) por lo que se considera pesada y explica su importancia dentro de esta práctica agroforestal.

Esta especie se distribuye desde México hasta Centroamérica y el Norte de Sudamérica y puede encontrarse en regiones templadas (Lorea, 2002). En México, esta planta se distribuye en los estados de Aguascalientes, Chiapas, Durango, Estado de México, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Tamaulipas, Veracruz (Argueta *et al.*, 1994; Avendaño y Acosta, 2000; Luna, 2003; Jiménez *et al.*, 2007; Dávila *et al.*, 2009) y Quintana Roo.

Dada la importancia de esta planta, diversos estudios han publicado la identificación y aislamiento de compuestos químicos como: flavonoides, lignanos, proantocianidinas, alcaloides, aldehídos, terpenos, taninos, carbohidratos y fenoles presentes en extractos clorofórmicos e hidroalcohólicos, con la finalidad de evaluar las actividades antibacterianas, antifúngicas, antiinflamatorias, antiespasmódicas, y antioxidantes (Osuna *et al.*, 2005; Coy y Cuca 2007; Jiménez *et al.*, 2007; Macías, 2009; Macías, 2010; Jiménez-Pérez *et al.*, 2011). En este contexto, López *et al.* (1995) encontraron que los extractos etanólicos de la corteza de *L. glaucescens* son ricos en pinostrobin y pinoembrina, dos flavonoides con efecto terapéutico demostrado para el tratamiento de la dismenorrea. En este sentido Cáceres *et al.* (1987; 1991) observaron que el uso de extractos acuosos y etanólicos de la hoja de *L. guatemalensis* promovía la inhibición del crecimiento *in vitro* contra diversos microorganismos patógenos como *Epidermophyton floccosum* (Harz) Langeron & Miloch., *Microsporum canis* E. Bodin ex. Gueg y *Candida albicans* (Robin) Berkhout. También observaron que los extractos metanólicos de tallos, hojas, frutos y semillas de *L. neesiana* y *L. glaucescens* mostraron actividad moderada contra *Staphylococcus aureus* Rosenbach y *Escherichia coli* Migula (Meckes *et al.*, 1995). Por otra parte, Tucker *et al.* (1992) indicaron la presencia de linalool y cineol en el aceite esencial extraído de hojas de *L. glauces-*



*cens* y *L. guatemalensis* Mez., a los que se les atribuyen propiedades bactericidas y fungicidas.

Cabe resaltar que la presencia de estos componentes está asociada con el crecimiento natural de la planta y conforman parte de las estrategias de defensa contra patógenos y predadores cuando hay daño o infección (Evert, 2006; Yan *et al.*, 2000; Guzmán-Gutiérrez *et al.*, 2012). Dadas las características químicas de estos compuestos, su actividad antioxidante se debe principalmente a las propiedades redox que les permite funcionar como agentes reductores, donadores de hidrógeno, quelantes e inhibidores de especies reactivas de oxígeno (Rice-Evans *et al.*, 1995).

## OBJETIVOS

Determinar y localizar cualitativamente mediante técnicas histoquímicas, la presencia de compuestos fenólicos como lignina y taninos, así como lípidos y carbohidratos no estructurales en hojas frescas, tratadas como té tradicional, hervidas a 92 °C y en infusión alcohólica, así como en secciones frescas de la madera de *Litsea glaucescens*. Asimismo evaluar las propiedades funcionales de los extractos acuosos y metanólicos mediante la cuantificación de la concentración de fenoles totales y su interrelación con la actividad antioxidante *in vitro*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El material biológico utilizado se obtuvo de un árbol de 10 m de altura, con fuste de 5 m y diámetro de 24 cm. El ejemplar se recolectó en una selva mediana subperennifolia en el municipio y ejido Felipe Carrillo Puerto, Quintana Roo. Santos *et al.* (1998), mencionan que este tipo de vegetación es la dominante. El ejido se localiza entre los paralelos 19° 34' 43" de latitud Norte y en los meridianos 88° 02' 43" de longitud Oeste, tiene una altitud de 30 m snm, el clima es Aw<sub>0</sub>, Aw<sub>1</sub> y Aw<sub>2</sub> caracterizado como cálido subhúmedo con una temperatura promedio de 25 °C y una precipitación anual de 800 a 1000 (INEGI, 2010).

El ejemplar de herbario, se identificó y registró en el Herbario Metropolitano UAMIZ Dr. Ramón Riba y Nava con el número 67133 y las muestras de madera en la Xiloteca UAMI con la clave M-279.

## Preparación del material vegetal

Del árbol seleccionado se recolectaron de forma aleatoria cinco kilogramos de hojas y de su fuste, a una altura de 1,30 m (DAP) se cortaron dos rodajas, una de 8 cm y otra de 5 cm de alto.

*Hoja.* Para los estudios histoquímicos de detección y localización de lignina, taninos, lípidos (aceites y ceras) y carbohidratos no estructurales (granos de almidón y pectinas) se seleccionaron 20 hojas. Se elaboraron secciones transversales de la zona media de la lámina de la hoja con un criostato marca Leica a -20 °C. La descripción de los tejidos que conforman este órgano se realizó de acuerdo con Evert (2006). Para la determinación cuantitativa de fenoles totales y actividad antioxidante se utilizaron las hojas restantes. Estas se dejaron secar dentro de una estufa a una temperatura de 30 °C y en oscuridad durante 15 días, posteriormente se molieron y se tamizaron a un tamaño de partícula no mayor a 250 µm de acuerdo con Serrano (2010).

*Madera.* De la rodaja de 8 cm se obtuvieron cubos de 1 cm x 1 cm, tanto de la albura como del duramen. Se obtuvieron secciones transversales, tangenciales y radiales mojando las superficies. A mano alzada se hicieron los cortes empleando navajas de un filo para criostato. En estas se hicieron las pruebas de detección y localización histoquímica de lignina, taninos, lípidos, almidones u otros carbohidratos no estructurales. Se analizaron las paredes y contenidos celulares en fibras, vasos y parénquima axial y radial de albura y duramen.

Para la determinación de los fenoles totales y la actividad antioxidante se utilizó la pieza de 5 cm de la que se separó la albura y el duramen. De cada zona se obtuvieron muestras de aserrín y se consideraron dos categorías de muestras experimentales: de la albura y el duramen. Todas las muestras se tamizaron para obtener partículas no mayores a 250 µm.

## Determinación cualitativa de compuestos fenólicos, lípidos totales y carbohidratos no estructurales.

En los cortes de las hojas y la madera se detectó la lignina (color rojo) empleando el reactivo de Wiesner (fluorogluci-

nol al 2% en etanol al 96%) por cinco minutos en secciones frescas y montando con una gota de HCl 6N (Rivera *et al.*, 1999). También se usó el reactivo de Maüle (solución acuosa de permanganato de potasio al 1%) por cinco minutos en secciones frescas. Estas se lavaron con agua destilada y cubrieron con una solución de HCl al 30% y se montaron con una gota de hidróxido de amonio concentrado (color fucsia) (Vallet *et al.*, 1996).

Para la detección y localización de los taninos, se empleó la técnica de vainillina-HCl (solución saturada de vainillina en etanol al 95%), se cubrieron secciones frescas durante 5 minutos y montando con una gota de HCl 9N (naranja rojizo) (Rivera *et al.*, 1999).

Adicionalmente se empleó Azul de toluidina para contrastar lignina y polifenoles (verde turquesa), carbohidratos (color lila) y aceites (sin color).

Asimismo se empleó Lugol para contrastar lignina (amarillo) de carbohidratos no estructurales (morado azulado) (Rivera *et al.*, 1999).

Se empleó Sudán negro para detectar lípidos totales (ceras y aceites) en paredes celulares o como depósitos (color negro) (Krishnamurthy, 1988). Adicionalmente se hicieron cortes transversales de hojas enteras después de ser tratadas en agua (25 °C y 92 °C) y metanol. En estos cortes se utilizó vainillina y Sudán IV para evaluar la pérdida de compuestos fenólicos solubles en agua y/o presencia de cuerpos oleíferos en el mesófilo de la hoja después de cada tratamiento (Lersten *et al.*, 2006). Los resultados se compararon con cortes de hojas frescas teñidas bajo el mismo procedimiento.

En el estudio histoquímico en hoja y madera se usaron al menos diez secciones para cada tinción.

### Preparación de los extractos de *L. glaucescens*

Para la cuantificación de fenoles totales y la actividad antioxidante se hicieron tres extractos utilizando como solventes agua en ebullición, agua destilada a 25 °C y metanol, con la finalidad de determinar las mejores condiciones de extracción de compuestos fenólicos en hojas y madera (albura y duramen) de *L. glaucescens*. El primero se preparó de acuerdo con Serrano (2010). A 500 mg de muestra

de hoja y de madera se les añadieron 25 mL de agua destilada y se mantuvieron en agitación durante 5 min a una temperatura de 92 °C. El extracto obtenido se filtró y aforó a 25 mL con agua destilada. Este extracto es similar al tradicional té que se prepara con *L. glaucescens*. Los otros dos extractos se prepararon siguiendo la metodología propuesta por Miliauskas *et al.* (2004). A 500 mg de cada muestra de hoja y de madera, se les añadieron 10 mL de agua destilada o metanol, se mantuvieron en agitación durante 30 min a una temperatura de 25 °C, se filtraron y aforaron a 10 mL con el solvente correspondiente.

### Cuantificación de la concentración de fenoles totales (CFT)

La concentración de fenoles totales en los tres extractos de hojas y de madera se midió con un espectrofotómetro UV-VIS Spectronic GENESYS 2, usando el reactivo Folin-Ciocalteu. El contenido de fenoles totales se cuantificó mediante el siguiente procedimiento: a una mezcla de reacción que contiene 1,58 mL de agua desionizada, 20 µL de la solución estándar de ácido gálico o 20 µL de la disolución problema (por triplicado) o 20 µL de agua desionizada si era el blanco, se le agregaron 100 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu (50% v/v). Después de agitar en un vortex se dejó incubar durante 8 minutos y finalmente se añadieron 300 µL de solución de carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) al 20% (p/v). Esta última se incubó durante 30 min a 40 °C. Después se obtuvo la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 765 nm. La solución estándar utilizada fue ácido gálico de 500 mg/mL, de la cual se tomaron alícuotas de 0,625 mg/mL; 1,25 mg/mL; 2,5 mg/mL; 5 mg/mL y 10 mg/mL. El contenido de la muestra se expresó como mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de sólido seco ( $\text{mg}_{\text{EAG}}/\text{mL}_{\text{sólido seco}}$ ) (Singleton y Rossi, 1965).

### Actividad antioxidante

#### *Inhibición del radical 2,2-difenol-1-picrilhidrazil (DPPH)*

La actividad antioxidante se determinó con el método DPPH\* en una cinética realizada a la disolución del radical



se obtuvo un máximo de absorbancia de 516 nm. La evaluación de la actividad antioxidante por la reducción del radical DPPH se realizó de acuerdo con Sánchez-Moreno *et al.* (1998), la mezcla de reacción se obtuvo colocando en un tubo de ensayo 1,5 mL de DPPH y 20 mL de la solución estándar trolox o 20  $\mu$ L de la disolución problema (por triplicado) o 20  $\mu$ L de agua desionizada si era el blanco. Se dejó reaccionar durante 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Se determinaron las lecturas de absorbancia a 765 nm. La reducción del radical se determinó mediante el cálculo de la concentración en equivalentes a la actividad antioxidante (TEAC) por medio de una curva de calibración realizada con trolox a 500  $\mu$ M. Las concentraciones utilizadas que se tomaron fueron 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 150  $\mu$ M, 200  $\mu$ M y 250  $\mu$ M.

#### Inhibición del radical ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS).

La evaluación de la actividad antioxidante por el método ABTS se realizó empleando el ensayo modificado de Ozgen *et al.* (2006), que se basa en la utilización del compuesto ABTS para la formación de un radical libre ABTS<sup>•+</sup> tras la reacción química de ABTS (3,7 mM) y persulfato potásico (1,3 mM) cuyo tiempo de reacción va de 12 h a 16 h. En una cinética realizada a la disolución del radical con el buffer se obtuvo un máximo de absorbancia de 728 nm. Para evaluar la actividad antioxidante por el método ABTS se realizó la mezcla de reacción colocando 1,5 mL de ABTS y 10 mL de la solución estándar trolox o 10  $\mu$ L de la disolución problema (por triplicado) o 10  $\mu$ L de agua desionizada para el blanco. Se dejó reaccionar durante 30 minutos a 38 °C. Se tomó la lectura de absorbancia. Los datos se expresaron como equivalentes de Trolox (TEAC, mM). Para la preparación de la curva estándar se tomaron alícuotas de 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M, 300  $\mu$ M, 400  $\mu$ M y 500  $\mu$ M de la solución de trolox a 1000  $\mu$ M.

#### Análisis estadístico

Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado. Los resultados obtenidos se analizaron con la prueba estadística de comparación múltiple de medias de

Tukey de significancia  $p \leq 0,05$  con el software IBM SPSS Statistics V 17.0.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Características histoquímicas de la hoja.

Las hojas de *Litsea glaucescens* son bifaciales con dos estratos de parénquima en empalizada; los espacios intercelulares en el mesófilo son muy reducidos (Figs. 1A, D, G, E, G y H); la cutícula y las paredes de las células epidérmicas son gruesas y estas últimas con contenido de origen fenólico en las cavidades (Figs. 1D y F); presenta pelos como derivados epidérmicos. Los tratamientos de las hojas como infusión a temperatura ambiente y en ebullición mostraron que los fenoles presentes en la epidermis se van perdiendo después del tratamiento (Figs. 1C y G, 2A-B).

Las paredes de las fibras marginales, las perivasculares, las del xilema y las de los vasos de los haces vasculares primarios de la lámina y del leñoso de la nervadura central, presentan lignificación (Figs. 1A-E). Se identificó un tipo de fenol (reactivo de Mañle) en la pared celular de las fibras perivasculares y marginales de toda la hoja, que Esau (1972) destaca como un compuesto asociado a favorecer una mejor conducción de agua (Fig. 1B). La intensidad registrada para los fenoles en las hojas frescas disminuyó en aquellas tratadas como té y en ebullición (Figs. 2A-B).

En general en las cavidades de las células que dan soporte mecánico y conducción en toda la hoja y las del colénquima anular de la nervadura se identificaron depósitos fenólicos y taninos (Figs 1B-D y F). En el colénquima se presentaron depósitos de aceites y granos de almidón (Figs. 1F y 2D).

Se confirmó la presencia de ceras en la cutícula, aceites en las cavidades de la epidermis y cuerpos oleíferos dentro de las células del parénquima en empalizada (Fig. 2F) y en células oleíferas similares a las que describe Lersten *et al.* (2006) (Figs. 1D, F, H y 2C y E), las que se distribuyen en toda la hoja (Figs. 1B-F y H). Se observaron dos tipos de células oleíferas en el mesófilo: el tipo A localizado entre el parénquima en empalizada (Figs. 1H y 2C

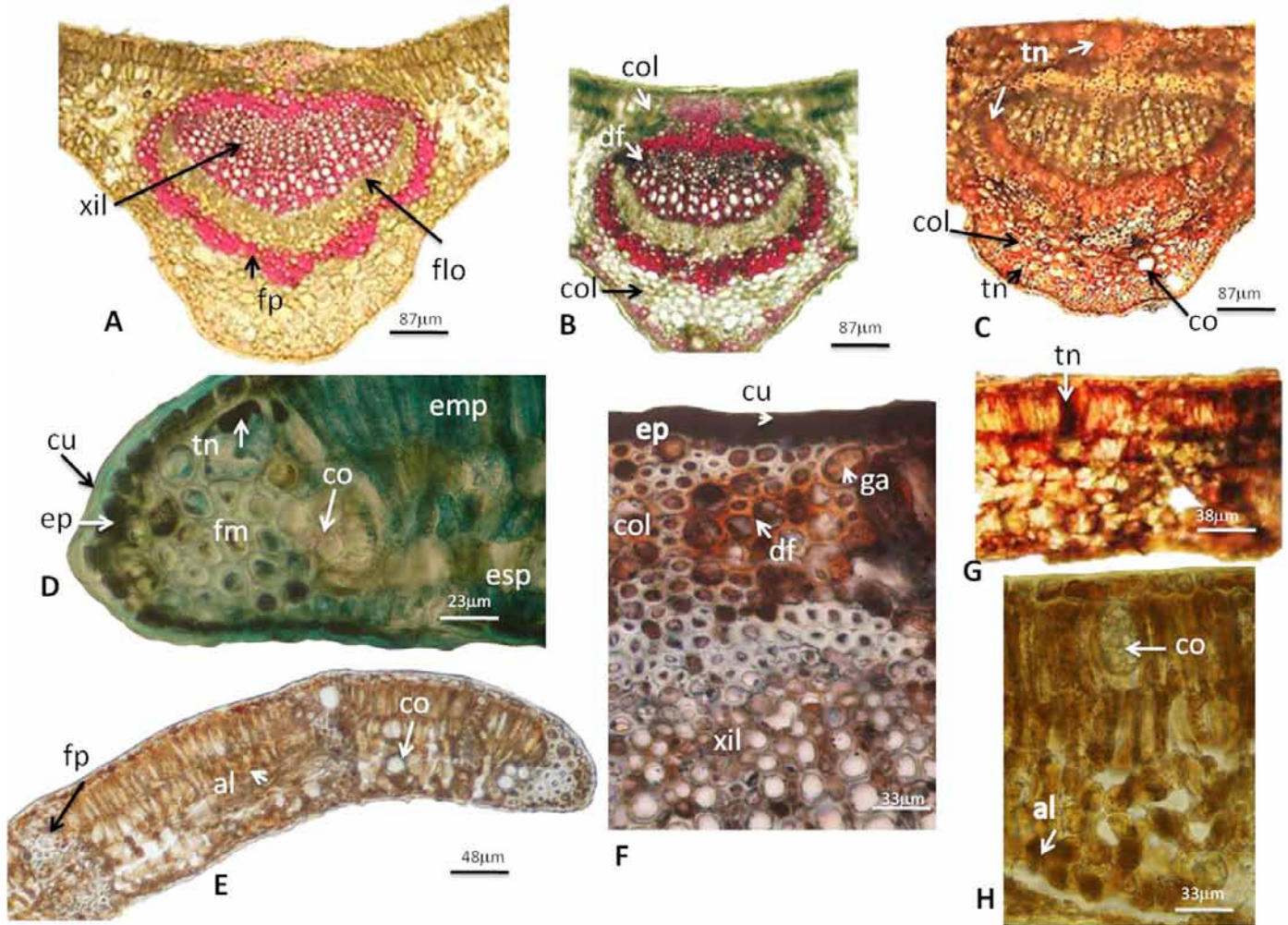


FIGURA 1. Características histoquímicas de la hoja. Nervadura central: A-C y F. Lignificación en fibras perivasculares (fp): A, reactivo de Wiesner. B, reactivo de Mäule, colénquima (col) sin teñir. C, taninos (tn) con vainillina en colénquima y floema. F, cuerpos oleíferos (ga), de fenoles (df) y células oleíferas (co) en colénquima (col), epidermis (ep); ceras en la cutícula (cu) con sudán negro. Lámina de la hoja: D, E, G y H, D, margen de la hoja: fibras marginales (fm), cutícula (cu), contenidos fenólicos en epidermis (ep), células oleíferas (co), parénquima en empalizada (emp) y esponjoso (esp) con azul de toluidina. E y H, distribución y detalle de células oleíferas (co); granos de almidón (al) con lugol. G, taninos (tn) en parénquima en empalizada y esponjoso con vainillina. xil: xilema; flo: floema.

y F), conteniendo muchos cuerpos oleíferos, y el tipo B, entre el parénquima esponjoso de la cara abaxial (Figs. 2A y B), presentando un cuerpo oleífero de gran tamaño. Las hojas tratadas por infusión a 25 °C y a 92 °C mostraron pérdida de cutina (Figs. 2C-F), comparando la intensidad de la tinción de la reacción en los distintos tratamientos. Destacan los resultados en el tratamiento con extracción alcohólica, en la que las células de la epidermis muestran

menor intensidad. Por otro lado se observó que los cuerpos oleíferos contenidos en ambos tipos celulares, A y B, se contraen con los tratamientos, incluso con el alcohólico (Figs. 1H, 2A-C, 2E y F).

Adicionalmente se localizaron taninos en las paredes de las fibras del floema y en las células del parénquima en empalizada, principalmente en el primer estrato adaxial y en algunas células del esponjoso (Figs. 1C y G). En las



hojas empleadas para la infusión a 25 °C y mayormente para aquellas tratadas a 92 °C, se observó una clara disminución en la intensidad de la tinción (Figs. 2A-B).

### Cuantificación de la concentración de fenoles totales y actividad antioxidante en la hoja

En términos generales, la extracción acuosa de compuestos fenólicos empleando altas temperaturas y solventes polares, mejoró significativamente la concentración de fenoles totales (Tabla 1), lo anterior se debe principalmente al número de grupos -OH presentes en los compuestos fenólicos que favorecen su solubilidad en agua y por lo tanto su extracción (Vermerris y Nicholson, 2008). Se ha mencionado que los fenoles al tener más de un grupo -OH cooperan en la solubilidad en agua, además la temperatura juega un papel muy importante en la extracción de dichos compuestos, lo anterior se debe a que ésta favorece el incremento en los coeficientes de difusión y solubilidad de los compuestos fenólicos, al promover la liberación de los polifenoles debido al rompimiento de ciertas estructuras celulares (Wang *et al.*, 2007; Al-Farsi y Lee, 2008).

Los resultados de esta extracción y la presencia de diversos compuestos como taninos, fenoles y aceites en células especializadas en toda la hoja son significativos pues sugiere la razón de la preparación tradicional de infusiones y baños calientes para el alivio a problemas estomacales, ginecológicos y antiinflamatorios (Argueta *et al.*, 1994). Adicionalmente Campagna *et al.* (2012) reportan propiedades antidiarreicas y antisépticas asociándolas a fenoles, lo que representa el papel preponderante del conocimiento tradicional en el tratamiento de este tipo de trastornos. Asimismo la hoja mostró una concentración de fenoles totales significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) cuando se empleó agua a 92 °C respecto al tratamiento a 25 °C (Tabla 1). Cabe mencionar que los extractos metanólicos de las hojas presentaron la menor cantidad de compuestos fenólicos, lo que está relacionado con la forma y uso en que tradicionalmente se administra la hoja. Por otra parte, para ambas pruebas de inhibición de los radicales DPPH y ABTS, los extractos metanólicos y

acuosos a 92 °C presentaron mayor actividad antioxidante que aquellos cuya infusión se llevó a cabo a 25 °C.

De los resultados anteriores resalta que, dependiendo de la forma de la extracción, puede ser el tipo y tiempo del tratamiento en la práctica tradicional.

### Características histoquímicas de la madera

La madera presenta diferencias entre albura y duramen. La primera ocupa de 52% a 55% y el duramen de 45% a 48% del área total del tronco. Los vasos, las fibras y ambos tipos de parénquima presentan paredes muy gruesas con contenidos celulares que varían en composición de albura a duramen. Los radios presentan células oleíferas características de la familia Lauraceae.

La albura exhibió un mayor contenido de compuestos de origen lipídico en tílides, en algunas fibras y en las cavidades de algunas células del parénquima axial y radial (Figs. 3E-I).

El duramen muestra algunos contenidos de las células de los radios no asociados a fenólicos (Figs. 3E y J), sino a aceites que en la albura se observan como carbohidratos no estructurales (Figs. 3 H-I).

La albura presentó reacción a la lignina destacando las unidades de guayacil procedentes de un solo monolignol y para el duramen las de siringil que se forman a partir de dos o tres monolignoles (Vermerris y Nicholson, 2008). En relación con los taninos y depósitos fenólicos, la albura presenta este tipo de componentes en algunas células del parénquima axial y radial (Figs. 3A y B), mientras que en el duramen estos compuestos se han depositado en las paredes de todos los tipos celulares (Figs. 3C-E y J). La presencia de este tipo de compuestos fenólicos en todos los elementos celulares del duramen influye en la diferencia de color con respecto a la albura y de acuerdo con Rivera *et al.* (1999) e Isaza (2007) estos fenoles proporcionan un sistema de defensa ante el ataque de microorganismos (bacterias y virus), insectos y hongos. Lo anterior es una de las razones, de que el duramen en general tiene mayor durabilidad natural que la albura, lo que también está relacionado con la presencia de aceites esenciales (Figs. 3E-J). Los carbohidratos no estructurales, lípidos y depó-



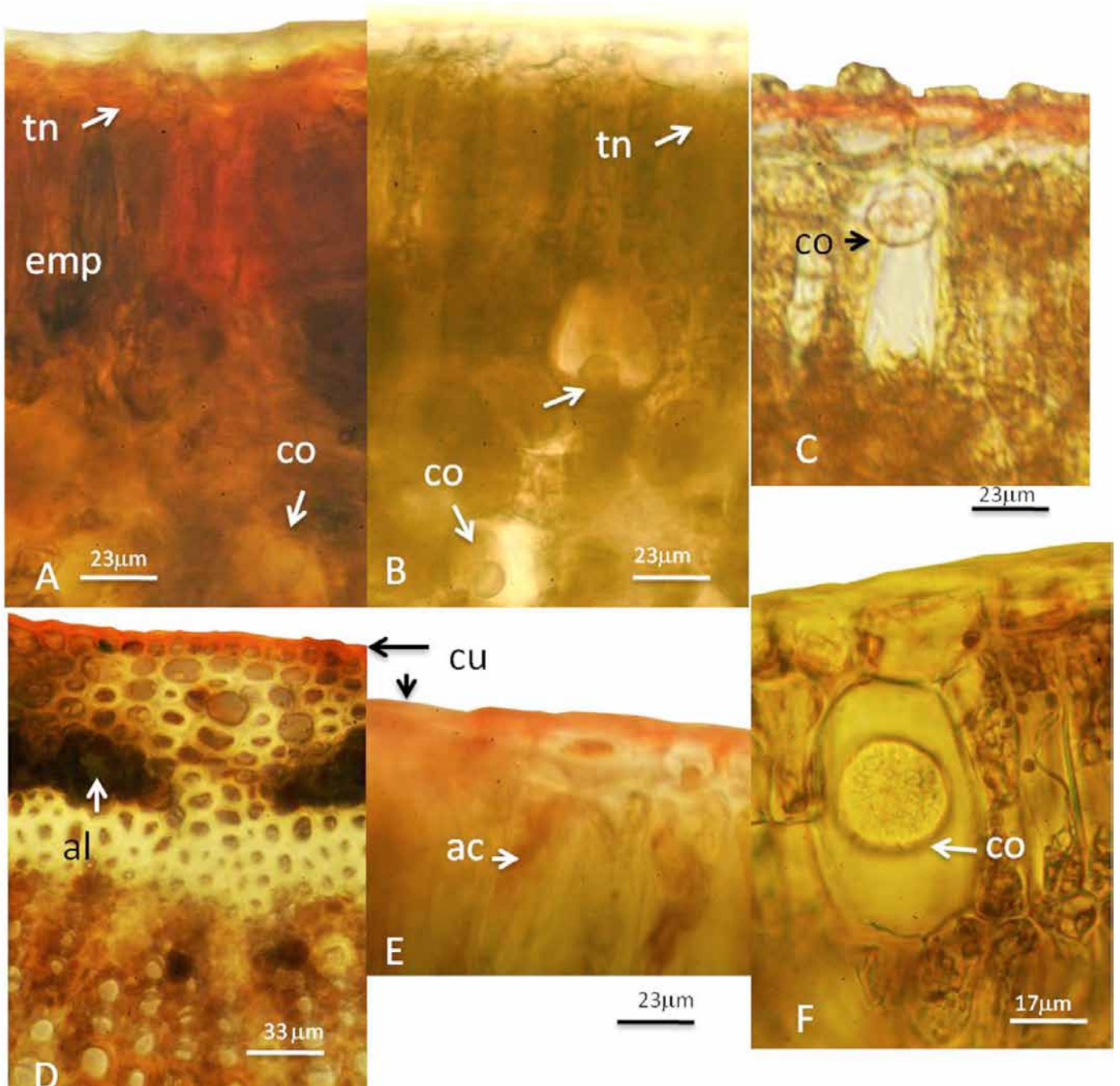


FIGURA 2. Características histoquímicas de la hoja. A. Lámina de la hoja en fresco (vainillina) y B. Lámina de la hoja hervida a 92° C. (vainillina), células oleíferas tipo B. C-F. Sudán IV. C. Lámina de la hoja, hervida a 92 °C. E. Sección de la lámina de la hoja del té y F. Lámina de la hoja del extracto, células oleíferas tipo A, \*cuerpo oleífero. D. Nervadura central. Doble tinción con Sudán IV y Lugol, granos de almidón (ga). Células oleíferas (co), aceites (ac), parénquima en empalizada (emp), cutícula (cu), taninos (tn).



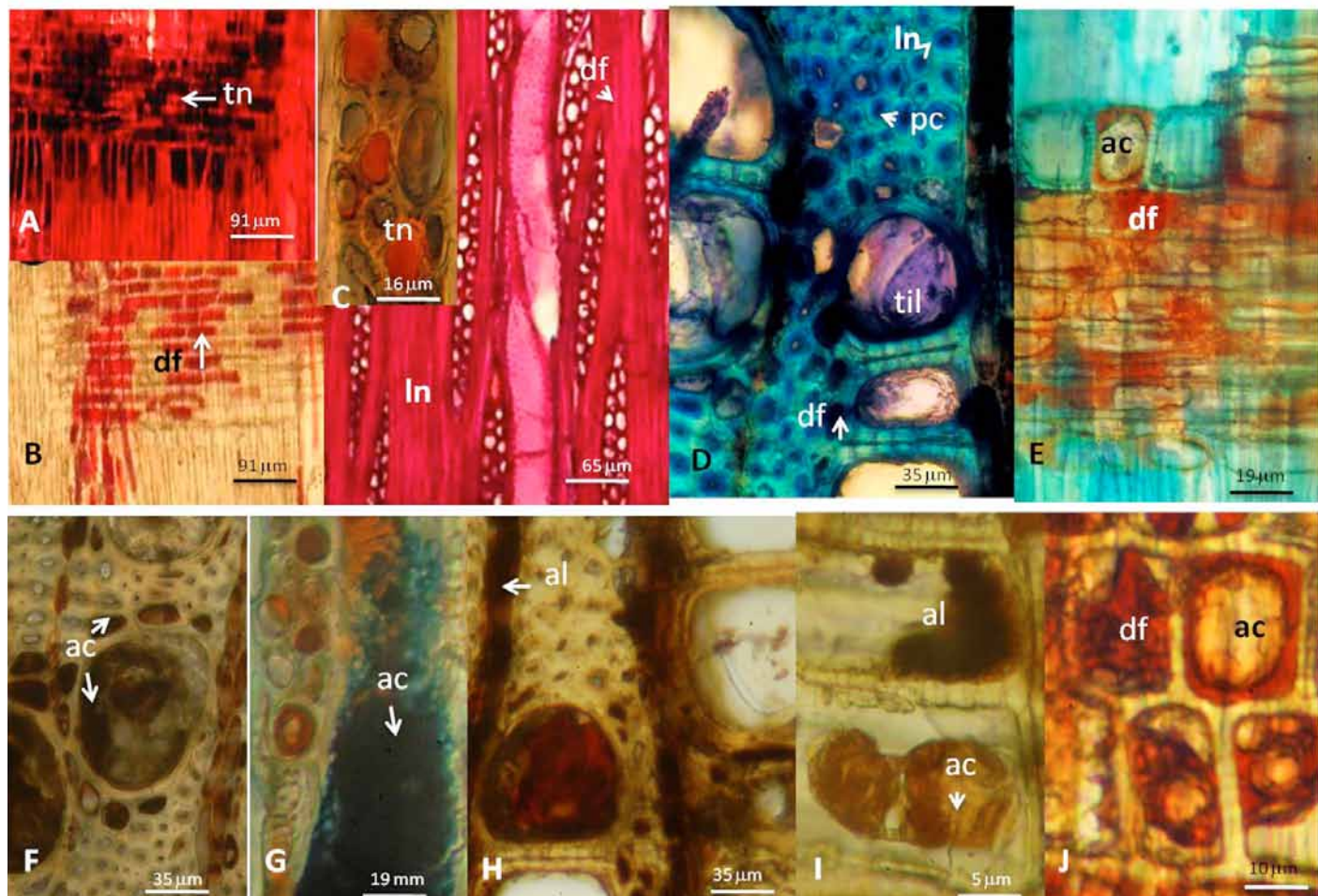


FIGURA 3. Características histoquímicas la madera. A-C. Taninos (tn) en albura: A, vainillina. B, reactivo de Mäule. C, lignina (ln), depósitos fenólico (df) y taninos (tn) en fibras, vasos y paredes de radios en duramen, reactivo de Wiesner. D, lignina (ln) en paredes de fibras y vasos, depósitos fenólicos (df) en cavidades y pectinas (pc) en paredes internas de fibras y en paredes primarias de tílides (til), azul de toluidina. E, depósitos fenólicos (df) y aceites en células de radio (ac) azul de toluidina. F y G, depósitos de aceites (ac) en tílides, sudán negro. H-I, granos de almidón (al) con lugol. I y J, aceites y depósitos fenólicos (df) en células de radio.

sitos fenólicos presentes en albura, zona de transición y duramen contribuyen a comprender el proceso de duraminización en esta especie.

#### Cuantificación de la concentración de fenoles totales y actividad antioxidante de la madera

En lo que respecta a la madera de *L. glaucescens*, la concentración de fenoles totales fue más alta en la albura con extracción metanólica (Tabla 1), aunque destaca que del duramen se puede extraer el mayor contenido de fenoles

totales por ebullición a 92 °C. En relación con la actividad antioxidante se puede observar que la albura mostró la mayor actividad antioxidante para los extractos metanólicos seguida del tratamiento acuoso a 92 °C y finalmente la infusión a 25 °C (Tabla 1). Las diferencias observadas entre el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante en los diferentes tratamientos es debido a la naturaleza química de los solventes, radicales y polaridad de los compuestos fenólicos, de manera que la combinación de estas propiedades conlleva a cambios en la trans-

TABLA 1. Fenoles totales y actividad antioxidante de extractos de hoja y madera *Litsea glaucescens*.

Tratamiento	CFT	DPPH	ABTS
	$[mg_{EAG}/g_{solidos\ secos}]$	TEAC $[\mu M]$	TEAC $[\mu M]$
(Eb <sub>Ho</sub> )	<b>414,3 ± 7,1<sup>a</sup></b>	541,0 ± 38,2 <sup>e</sup>	198,8 ± 13,2 <sup>g</sup>
(Eb <sub>Al</sub> )	267,5 ± 6,3 <sup>e</sup>	<b>838,6 ± 12,6<sup>b</sup></b>	142,3 ± 13,6 <sup>h</sup>
(Eb <sub>Du</sub> )	331,7 ± 2,0	531,0 ± 23,9 <sup>e</sup>	<b>320,4 ± 24,0<sup>d,e</sup></b>
(A <sub>Ho</sub> )	<b>157,1 ± 0,7<sup>a</sup></b>	449,5 ± 36,7 <sup>f</sup>	159,4 ± 1,4 <sup>g,h</sup>
(A <sub>Al</sub> )	146,0 ± 6,8 <sup>g,h</sup>	<b>737,9 ± 24,9<sup>c</sup></b>	274,4 ± 14,1 <sup>e,f</sup>
(A <sub>Du</sub> )	120,2 ± 2,9 <sup>i</sup>	498,4 ± 29,8 <sup>e,f</sup>	<b>355,1 ± 1,9<sup>c,d</sup></b>
(Met <sub>Ho</sub> )	142,3 ± 0,7 <sup>h</sup>	556,2 ± 7,9 <sup>e</sup>	266,3 ± 4,0 <sup>f</sup>
(Met <sub>Al</sub> )	<b>371,1 ± 5,8<sup>b</sup></b>	<b>952,6 ± 212,0<sup>a</sup></b>	545,5 ± 14,9 <sup>b</sup>
(Met <sub>Du</sub> )	268,4 ± 6,9 <sup>e</sup>	834,5 ± 7,3 <sup>b</sup>	<b>705,0 ± 7,9<sup>a</sup></b>

CFT: Fenoles totales. DPPH y ABTS: ensayo de capacidad antioxidante. TEAC: Equivalentes de Troxol. Eb: ebullición; A: agua 25°C; Met: metanol. Ho: hoja; Al: albura; Du: duramen. Valores con letra distinta: significativamente distintos. Valores en negritas: resultados relevantes.

ferencia de electrones y de átomos de hidrógeno, así como la presencia de algunos compuestos sin actividad antioxidante que pueden interferir en la determinación, como los compuestos fenólicos polimerizados (Pérez-Jiménez y Saura-Calixto, 2006).

A pesar de que la actividad antioxidante en los extractos acuosos a 92 °C no fue la mayor, la importancia de su determinación reside en su aplicación terapéutica en la medicina tradicional.

Los estudios realizados por López *et al.* (1995), Osuna *et al.* (2005) y Macías (2010) indican la relevancia que tienen los fenoles como lignanos y taninos al comprobar su actividad terapéutica por sus propiedades antibacterianas, antifúngicas, antiespasmódicas, antitumorales, hormonales, antimicrobianas y como inhibitoria a la replicación del HIV-1 que es el retrovirus que causa el SIDA.

Cabe mencionar que, a pesar de que existen algunos estudios que dan indicio de la composición de ciertos extractos de *L. glaucescens*, la mayoría de los compuestos encontrados poseen baja hidrofiliabilidad debido a que fueron caracterizados a partir de los aceites esenciales de esta planta y extraídos bajo condiciones prolongadas de tiempo y altas temperaturas, como es el caso de la hidrodestilación (Guzmán-Gutiérrez *et al.* 2012), por consiguiente la

presencia de los compuestos terpenoides encontrados bajo las condiciones de extracción probadas en el presente trabajo es casi nula. Además es bien sabido que la exposición de compuestos fenólicos a altas temperaturas por tiempos largos ocasiona la pérdida de los mismos debido a su alta inestabilidad térmica (Liyana-Pathirana y Shahidi, 2005).

Es relevante destacar que la cantidad de compuestos fenólicos con actividad antioxidante extraídos a partir de cualquiera de las tres condiciones probadas en el presente trabajo no contempla su identificación, sino la interrelación de su ubicación en los tejidos vegetales y su uso para definir su funcionalidad con su uso potencial en la medicina tradicional.

Adicionalmente, a pesar de que los extractos metanólicos en madera presentaron mayor actividad antioxidante, el uso de los extractos acuosos justifica la funcionalidad antioxidante sin representar riesgos a la salud en el uso tradicional, resaltando la actividad antioxidante de la albura de la cual aún no existe un registro satisfactorio de su uso.

## CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, se demuestra la presencia de compuestos fenólicos como lig-



nanos y taninos, así como la presencia de aceites y almidones en la hoja y la madera de *Litsea glaucescens*. Desde el punto de vista químico, se encontró que es posible definir una relación entre la concentración de compuestos fenólicos y su localización en los tejidos vegetales, así como la funcionalidad tanto en la planta como en los extractos comúnmente utilizados en la medicina tradicional, justificando su gran potencial para el uso terapéutico.

## RECONOCIMIENTOS

Los autores agradecen a los ejidatarios de Felipe Carrillo Puerto, las facilidades brindadas para la recolección del material de estudio y a la M. en B. Ana Teresa Jaramillo por su apoyo en el procesamiento de fotografías y la revisión del texto. Este estudio fue financiado por la Universidad Autónoma Metropolitana.

## REFERENCIAS

- Al-Farsi, M.A. y C.Y. Lee. 2008. Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from date seeds. *Food Chemistry* 108:977-985.
- Araya, J., J.E. Benavides, R. Arias y A. Ruiz. 1993. Identificación y caracterización de árboles y arbustos con potencial forrajero en Puriscal, Costa Rica. 31-63. Seminario Centroamericano y del Caribe Sobre Agroforestería y Rumiantes Menores. Costa Rica. Comisión Nacional Para el Desarrollo de la Actividad Caprina.
- Argueta, A., L. Cano y M. Rodarte. 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. 3:883-884. Instituto Nacional Indigenista, México, D.F.
- Avendaño, S. e I. Acosta. 2000. Plantas utilizadas como cercas vivas en el estado de Veracruz. *Madera y Bosques* 6(1): 55-71.
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2014. *Litsea glaucescens*. Laurel silvestre. Página electrónica UNAM. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/>
- Cáceres, A., L.M. Girón, S.R. Alvarado, y M.F. Torres. 1987. Screening of antimicrobial activity of plants popularly used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal diseases. *Journal of Ethnopharmacology* 20(3):223-237.
- Cáceres, A., B.R. López, M.A. Girón y H. Logemann. 1991. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 1. Screening for antimycotic activity of 44 plant extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 31(3):263-276.
- Campagna, M., M. Martínez, A. Broussalis y M. Gattuso. 2012. Actividad antioxidante, análisis fitoquímico y micrografía analítica de hojas de *Castela tweedii* (Simaroubaceae). Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 11:498-509.
- Coy, E. y L. Cuca. 2007. Metabolitos con actividad biológica aislados de especies pertenecientes a la familia Lauraceae. *Scientia et Technica* XIII(33)3:363-364.
- Dávila, C.A., F. Flores, J. Morales, R. Clark y E. Molphe. 2009. Abundancia y explotación del laurel silvestre *Litsea glaucescens* Kunth en Aguascalientes, México. III Simposio Nacional de Ecología: Manejo y Conservación de los Ecosistemas de Montaña en México.
- Esau, K. 1972. Anatomía vegetal. Omega. 779p.
- Evert, R. F. 2006. Esau Anatomía vegetal. Meristemas, células y tejidos de las plantas: su estructura, función y desarrollo. 3ed. Omega. 614p.
- Guzmán-Gutiérrez, S.L., R. Gómez-Cancino, J.C. García-Zebadúa, N.C. Jiménez-Pérez y R. Reyes-Chilpa. 2012. Antidepressant activity of *Litsea glaucescens* essential oil: Identification of b-pinene and linalool as active principles. *Journal of Ethnopharmacology* 143(2):673-679.
- INEGI. 2010. Censo de población y vivienda. Quintana Roo. INEGI. Fecha de consulta 08 de marzo del 2012. <http://www3.inegi.org.mx>.
- Isaza, J.H. 2007. Taninos o polifenoles vegetales. *Scientia et Technica* XIII(33):13-18.
- Jiménez, G., H. Pérez, L. Soto, J. Nahed, L. Hernández y J. Carmona. 2007. Livestock, nutritive value and local knowledge of fodder tree in fragment landscapes in Chiapas, Mexico. *Interciencia* 32(4):274-280.
- Jiménez, M.E., M.R. Aguilar, M.L. Zambrano y E. Kolar. 2001. Propiedades físicas y químicas del aceite de aguacate obtenido de puré deshidratado por microondas. *Revista de la Sociedad Química de México* 25(2):89-92.

- Jiménez-Pérez, N.C., F.C. Lorea-Hernández, C.K. Jankowski y R. Reyes-Chilpa. 2011. Essential oils in Mexican bays (*Litsea* spp., Lauraceae): taxonomic assortment and ethnobotanical implications. *Economic Botany* 65(2):178-189.
- Krishnamurthy, K. V. 1988. Methods in plant histochemistry. S. Viswanathan. India. 90 p.
- Liyana-Pathirana, C. y F. Shahidi. 2005. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry* 93(1):47-56.
- Lersten, N.R., A.R. Czapinski, J.D. Curtis, R. Freckmann y H.T Horner. 2006. Oil bodies in leaf mesophyll cells of angiosperms: overview and selected survey. *American Journal of Botany* 93(12):1731-1739.
- López, J., W. Barillas, J. Gómez, F. Lin, A. Al, M. Sharaf y P. Schiff. 1995. Flavonoids of *Litsea glaucescens*. *Planta Médica* 61(2):198.
- Lorea, F. 2002. La familia Lauraceae en el Sur de México: diversidad, distribución y estado de conservación. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 71:59-70.
- Luna, M. 2003. *Litsea glaucescens*. Taxones del bosque mesófilo de montaña de la Sierra Madre Oriental incluidos en la norma oficial mexicana. Base de datos SNIB-Conabio. Proyecto W025.
- Macías, V.E. 2009. Actividad biológica (farmacológica) y/o etnomédica; y compuestos fitoquímicos aislados de algunas especies de los géneros: *Persea*, *Laurus*, *Lindera*, *Aniba*, *Phoebe*, *Nectandra*, *Cassytha*, *Cinnamon*, *Licaria*, *Ravensara*, *Pleurothyrium*, *Dehaasia*, *Apollonias* y *Neolitsea* (Lauraceae). *Duazary* 7(1):130-151.
- Macías, V.E. 2010. Metabolitos secundarios con actividad biológica (farmacológica), aplicación etnobotánica; y fitoquímica de algunas especies de los géneros: *Ocotea*, *Cryptocarya*, *Litsea*, *Caryodaphnosis*, *Machilus* y *Actinodaphne* (Lauraceae). *Duazary* 7(1):152-170.
- Meckes, M., M.L. Villareal, J. Tortoriello, B. Berlin y E.A. Berlin. 1995. A microbiological evaluation of medicinal plant used by the Maya people of southern Mexico. *Phytotherapy Research* 9(4):244-250.
- Miliauskas, G., P. Venskutonis. y T. van Beek. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry* 85(2):231-237.
- Osuna, L., M.E Tapia y A. Aguilar. 2005. Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales. Estudio etnobotánico, fitoquímico y farmacológico. España. Universidad de Barcelona. 173p.
- Ozgen, M., R.N. Reese, A.Z. Tulio Jr., J.C. Scheerens y A.R. Miller. 2006. Modified 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant activity of selected small fruits and comparison to ferric reduction antioxidant power (FRAP) and 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *Journal Agricultural Food Chemistry* 54:1151-1157.
- Pérez-Jiménez, J. y F. Saura-Calixto. 2006. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Research International*, 39(7):791-800.
- Rice-Evans, C.A., N.J. Miller, P.G. Bolwell, P.M. Bramley y J.B. Pridham. 1995. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research* 22(4):375-383.
- Rivera, L., A. Quintanar y C. de la Paz Pérez. 1999. Comparación histoquímica de albura y duramen de tres especies de *Quercus*. *Madera y Bosques* 5(1):27-41.
- Sánchez-Moreno, C., J.A. Larrauri y F. Saura-Calixto. 1998. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal Science Food Agricultural* 76(2):270-276.
- Santos, V. J., M. Carreón y K. C. Nelson. 1998. La organización de ejidos productores forestales de la zona maya. Un proceso de investigación participativa. Serie: Estudios de caso sobre participación campesina en generación, validación y transferencia de tecnología. Red de Gestión de Recursos Naturales. Fundación Rockefeller. 129p.
- Serrano, M.J. 2010. Evaluación de la actividad antioxidante para el aprovechamiento del muérdago que infesta la zona chinampera de Xochimilco. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. 82p.
- Singleton, V.L. y J.A. Rossi. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16(3):144-158.
- Torelli, L. 1982. Estudio promocional de 43 especies tropicales mexicanas. SARH-INIF. México. 73p.



- Tucker, A.O., M.J. Maciarelo y M. Hill. 1992. *Litsea glaucescens* Humb., Bonpl. et Kunth var. *glaucescens* (Lauraceae): a Mexican bay. *Economic Botany* 46(1):21-24.
- Vallet, C., B. Chabbert, Y. Czaninski y B. Monties. 1996. Histochemistry of lignin deposition during sclerenchyma differentiation in alfalfa stems. *Annals of Botany* 78:625-632.
- Vermerris, W. y R. Nicholson. 2008. Phenolic compound biochemistry. Springer. 276p.
- Wang, J., B. Sun, Y. Cao, Y. Tian y X. Li. 2007. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chemistry* 106(2):804-810.
- Yan, X.H., F.X. Zhang, H.H. Xie y X.Y. Wei. 2000. A review of the studies on chemicals constituents from *Litsea* Lam. *Journal of Tropical and Subtropical Botany* 8(2):171-176.

Manuscrito recibido el 4 de diciembre de 2013.

Aceptado el 12 de Julio de 2014.

Este documento se debe citar como:

Tapia-Torres, N.A., C. de la Paz-Pérez-Olvera, A. Román-Guerrero, A. Quintanar-Isaías, E. García-Márquez y F. Cruz-Sosa. 2014. Histoquímica, contenido de fenoles totales y actividad antioxidante de la hoja y de la madera de *Litsea glaucescens* Kunth (Lauraceae). *Madera y Bosques* 20(3):125-137.