



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

**ALGUNAS CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS Y
QUÍMICAS DE LA HOJA Y DE LA MADERA DE
Litsea glaucescens Kunth (LAURACEAE)**

T E S I S

para obtener el Diploma de
Especialista en Biotecnología

P R E S E N T A

Biol. Nery Alicia Tapia Torres

Directores: Dr. Francisco Cruz Sosa.
Dra. Carmen de la Paz Pérez Olvera.

México, D. F.

Noviembre, 2011

México, D.F. a 30 de Noviembre del 2011

El lector designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó
la idónea comunicación de resultados

ALGUNAS CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS Y QUÍMICAS DE LA HOJA Y DE LA
MADERA DE *Litsea glaucescens* Kunth (LAURACEAE)

que presentó

Nery Alicia Tapia Torres

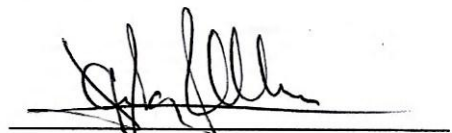
Comité Tutorial:

Directores:

Dr. Francisco Cruz Sosa.



Dra. Carmen de la Paz Pérez Olvera



Lector:

Dr. Fernando Rivera Cabrera



DEDICATORIA

A mi esposo Raúl, por su apoyo incondicional e impulso en todos los proyectos personales y profesionales. Gracias por el amor pues haberte conocido hace que cada día sea una mujer feliz, realizada y mejor persona.

A mis hijos Sandy y Beto que son una gran motivación para continuar con mi preparación como madre y profesionista. Gracias por su amor, optimismo, apoyo y comprensión en los tiempos que lo necesite.

A mi madre Lulú por enseñarme los valores de responsabilidad y honestidad que hoy en día me han permitido continuar con mi vida en lo personal y profesional. Gracias ma este es un humilde pago a tus esfuerzos.

A todos mis seres queridos por mostrar su entusiasmo e interés en el procedimiento de lo que hoy es una realidad, gracias por sus muestras de cariño y apoyo.

Me considero afortunada de contar con una familia que está preocupada y ocupada por ayudarme en todo momento. Sin duda han marcado la diferencia en mí y me han hecho muy feliz, este humilde pero significativo logro lo comparto con todos ustedes. Gracias

AGRADECIMIENTOS

Mi sincero agradecimiento a todas las personas que me brindaron su apoyo, para la realización de este proyecto, en especial:

Al Dr. Francisco Cruz Sosa por su asesoría, apoyo y confianza.

A la Dra. Carmen de la Paz Pérez Olvera por acogerme e impulsarme para continuar con mi preparación profesional, por su paciencia, disponibilidad, asesoría y comfortable compañía durante mi estancia.

A los M. en Biotecnología Angélica Román Guerrero y Eristeo García Márquez por su disponibilidad de tiempo, espacio, asesoría y agradable compañía.

Al Dr. Jorge Soriano Santos y a las Ings. María Belem y Adriana Ortiz Hernández por las facilidades otorgadas durante mi estancia en su laboratorio, por su tiempo y asesoría.

Al Dr. Fernando Rivera Cabrera por la revisión de este trabajo.

Al Biol. Exp. Jesus Rivera Tapia compañero siempre dispuesto a orientarme y a colaborar.

Al Biol. Jorge Santana por la identificación del material biológico.

Al señor Dionisio Yam y Filiberto Yam por su gran apoyo en la recolecta del material biológico y por compartir sus conocimientos.

Al señor Elías Ruiz Juárez del taller de carpintería por su ayuda en el procesado de la madera.

A la maestra Silvia Rebollar por su impulso para que continuará con mi preparación profesional gracias por su amistad.

RESUMEN

La familia Lauraceae tiene una amplia distribución mundial, está formada principalmente por árboles y arbustos a excepción del género *Cassytha* que es una parásita trepadora. La importancia de estudiar especies de esta familia es por la utilidad que tienen las hojas, las ramas, la madera, la corteza y los frutos; en medicina tradicional, farmacología, aceites esenciales, forraje, condimento, construcción, frutos comestibles y ornamentales.

En México se han identificado 10 géneros que se distribuyen en las zonas tropicales y se extienden hasta las zonas templadas. En particular *Litsea* es un género reconocido como aromático; esta característica química es de interés tradicional y comercial para alimentación, perfumería y medicina.

Litsea glaucescens Kunth, tiene su origen en México y se distribuye también en algunos países de América latina. Esta especie se presenta como árbol o arbusto; es conocida comúnmente por los habitantes de las diferentes localidades como pimientillo o laurel y ha sido utilizada de forma tradicional en medicina (ramas, corteza y hojas), como condimento (hojas) y en construcción (madera).

El uso de esta especie en medicina tradicional es a través de tés y baños calientes postparto elaborados con las hojas y las ramas, a los cuales se les ha inferido una acción antiinflamatoria, la cual puede deberse a la presencia de compuestos fenólicos ya que estos tienen la acción de retardar o inhibir el daño oxidativo de las células y su efecto contra algunas enfermedades degenerativas dada a su actividad antioxidante evitando el estrés oxidativo y disminuyendo el daño producido por el exceso de radicales libres; dando como resultado la implementación de grupos activos en productos farmacéuticos y alimentarios haciendo énfasis en la potencialidad de los alimentos para la promoción de la salud.

Dada la importancia de los compuestos fenólicos en este trabajo se detectaron, localizaron y cuantificaron en las hojas que es el órgano más usado en la medicina tradicional y en el xilema secundario que es un tejido conocido comúnmente como madera. Además se evaluó su actividad antioxidante con el propósito de conocer la potencialidad terapéutica de *Litsea glaucescens*.

Las hojas y la madera de *L. glaucescens* se recolectaron en una selva mediana subperennifolia del municipio de Felipe Carrillo Puerto, Quintana Roo. El material biológico se identificó y registró en el Herbario Metropolitano y en la xiloteca de la Universidad Autónoma Metropolitana.

La detección de los fenoles se realizó con pruebas histoquímicas para la observación de fenoles (azul de toluidina) de los cuales se eligieron la lignina (reactivo de Wiesner), tipos de lignina (reactivo de Mäule) y taninos (vainillina/HCl). La localización se efectuó en cortes transversales del material fresco de 10 hojas las cuales se cortaron con un micrótopo de rotación con un grosor de 35 a 50 μ ; y 10 cortes transversales, 10 tangenciales y 10 radiales para cada una de las dos zonas de la madera que se conocen como albura y duramen los cortes se efectuaron con un micrótopo de deslizamiento con un grosor de 25 a 35 μ .

Para las pruebas de cuantificación de fenoles totales y evaluación de la actividad antioxidante se prepararon tres extractos con dos tipos de disolventes agua y metanol a partir de una molienda del material secado a temperatura ambiente.

La cuantificación de fenoles totales se realizó de acuerdo al Método de Folin-Ciocalteu tomando como solución estándar ácido gálico a 500 mg/mL, de la cual se tomaron alícuotas a partir de 0.625 y hasta 10 mg/mL. El contenido de fenoles totales de las muestras se expresa en mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de sólido seco.

La actividad antioxidante se evaluó por dos métodos *in vitro* conocidos como DPPH y ABTS, estos dos métodos son considerados los más estables y confiables para su evaluación. Ambos métodos se evaluaron mediante el cálculo de la concentración en equivalentes a la actividad antioxidante (TEAC) por medio de una curva de calibración hecha con Trolox a partir de una concentración de 500 y 1000 μ M respectivamente. El radical DPPH \cdot se preparó de forma directa a 0.025 g/L y el radical libre ABTS $^{2+}$ se obtuvo tras la reacción química de persulfato potásico. Para la discusión de los resultados se realizó la prueba estadística de comparación múltiple de medias de Tukey con significancia de $p \leq 0.05$.

De los resultados de la detección y localización de fenoles como la lignina y los taninos, se tiene que para las hojas la lignina está presente en el xilema, en una vaina de fibras perivasculares y en un paquete de fibras en el limbo. Y los taninos se localizan en el floema, colénquima, parénquima en empalizada y esponjoso.

En la madera, la albura presenta lignina en los vasos, fibras, parénquima axial y radial, y los taninos se localizaron solo en las células de parénquima axial y radial. Para el

caso del duramen la lignina y los taninos se localizan en los vasos, fibras y parénquima axial y radial.

La presencia de fenoles en las hojas y la madera está ligada a la función de cada tejido o célula que los constituye. La lignina está presente en tejidos y células de conducción y sostén para lo cual es necesario el depósito de este polímero fenólico en las paredes celulares dando rigidez y los taninos se encuentran en tejidos y células de almacenamiento y fotosintéticas otorgándole a la planta un sistema de defensa ante el ataque de microorganismos y macroorganismos.

Los resultados de la cuantificación de fenoles totales y la evaluación de la actividad antioxidante de acuerdo a la prueba de Tukey se concluye lo siguiente. La muestra que tiene menor concentración de fenoles totales es la mezcla albura y duramen con el extracto de agua a 25°C con un valor de $65.742 \pm 1.068 \text{ mg}^{\text{EAG}}/\text{g}_{\text{sólido seco}}$ y la mayor concentración la presentó la muestra de hoja con el extracto de agua a 100°C con un valor de 414.263 ± 7.059 . También se encuentra una diferencia significativa entre el tipo de extracción acuosa a 100°C y a 25°C, presentándose la mayor concentración de fenoles totales a 100°C por lo que la temperatura es un factor influyente. Esto puede deberse a que las hojas y la madera están posicionalmente en diferentes partes de la planta, es decir, las hojas están expuestas a la radiación solar con lo cual se oxidan con mayor facilidad, y su tiempo de vida es corto en comparación a la madera que es un tejido cubierto por otros tejidos secundarios como el cambium vascular, el floema y la peridermis que en conjunto se conocen como corteza.

De los resultados del método de DPPH' la muestra con menor actividad antioxidante en equivalentes a trolox en μM , es la mezcla de albura y duramen en agua (25°C) con un valor de 255.172 ± 2.758 y la mayor actividad la presenta la albura en metanol 952.643 ± 21.997 . En cuanto al tipo de extracción en agua la temperatura es un factor influyente a excepción de la muestra del duramen.

De los resultados del método de ABTS⁺ la muestra con menor actividad antioxidante en equivalentes a trolox en μM , es la mezcla de albura y duramen en agua (25°C) con un valor de 61.333 ± 9.724 y la mayor actividad la presenta la albura en metanol 705.047 ± 7.867 .

Con los resultados obtenidos de las pruebas químicas se concluye que no hay proporcionalidad entre la concentración de fenoles totales con la actividad antioxidante, esto puede deberse a que cada compuesto fenólico contribuye de forma y proporción

diferente, además de la interacción que presenten con otros compuestos y entre ellos mismos.

Los resultados sugieren que la hoja y la madera de *Litsea glaucescens* ofrecen una fuente natural de antioxidantes y tienen potencialidad de uso terapéutico.

ABSTRACT

The Lauraceae family has a worldwide distribution, comprises a group of trees and shrubs with exception of *Cassytha* that is a genus of parasitic vines. A high content of essential oils are found in many Lauraceae species that are important for spices and perfumes. The hard wood of several species is a source for timber around the world. A great number of species are in danger of extinction due to over exploitation as medicinal plants or timber extraction and also for loss of habitat. The avocado, an edible fruit is classified in the flowering plant family Lauraceae along with cinnamon, camphor and bay.

The family is distributed throughout tropical, subtropical areas and cloud forest and has several relict species living in temperate areas of both hemispheres. The Lauraceae family contains in Mexico ten species mostly from warm or tropical regions and extended into temperate zones. *Litsea* is recognized as a genere with aromatic properties; sometimes the flowers, leaves and fruits are used as medicine and for extracting essential oils used in perfumery.

Litsea glaucescens Kunth is an evergreen tree or shrub. It is native from southern North America, mostly in Mexico and is distributed by Mexico and Central America. *L. glaucescens* is a genus commonly called Mexican bay because it is has been used extensively for various uses, as a condiment and for medicinal purposes. The wood is used for construction and lumber.

The use of this species in the traditional medicine is through teas and postpartum warm baths made with leaves and branches; ethnomedicinal information about *L. glaucescens* comprises anti-inflammatory properties because it contains phenolic compounds and they have been reported to have multiple biological effects, including antioxidant activity, this activity is mainly due to their redox properties. The importance of the antioxidant constituents of plant materials is in the maintenance of health and protection from degenerative diseases.

In order to focus on the role of phenolic compounds in *L. glaucescens*, in this work phenolic compounds were extracted, detected and quantified at leaves (plant parts more used in folk medicine) and in secondary xylem (known as wood). Total phenolic content

and antioxidant activity at leaves and secondary xylem was evaluated in order to provide an overview of raw materials that have nutritional importance and/or of the potential for applications in the promotion of health and prevention against damages caused by free radicals.

L. glaucescens foliage and wood were collected in semi evergreen forest at Felipe Carrillo Puerto town, Quintana Roo. A voucher of the plant was previously identified and registered at Herbario Metropolitano and Wood Collection Laboratory of Metropolitan Autonomous University – Iztapalapa.

Histochemical localization of phenols (toluidine blue) in plant structures was developed to lignin (Wiesner test), types of lignin (Mäule test) and tannins (vanillin/HCl test). Transverse sections of fresh material (ten leaves) was used for phenols localization, leaf tissue were cut with a rotation microtome with a thickness of 35 a 50 μM ; for wood material (sapwood and heartwood) was made ten transverse, tangential and radial cuts with a thickness of 25 a 35 μM , respectively.

Total phenolic constituents and antioxidant capacity of plant extracts (leaves and wood) were performed employing distilled water (room temperature and boiling point) and methanol (room temperature). Ground leaves, sapwood and heartwood sawdust was made from dry material at room temperature.

Total phenolic content was measured by Folin-Ciocalteu assay. Using gallic acid 500 mg/mL as standard total phenolic content (standard curve was prepared using concentrations 0.625 - 10 mg/L) was expressed as mg GA equivalent/g of dry extract

Antioxidant capacity tests were carried out by both DPPH and ABTS assays which are considered stables and reliable. Results of DPPH and ABTS assays were expressed as TEAC in μM of Trolox, 500 and 1000 μM , respectively. DPPH was dissolved in methanol to 0.025 g/L and a stable stock solution of ABTS $\cdot+$ was produced by reacting aqueous solution of ABTS with potassium persulfate. Tukey multiple media comparison tests was executed. A P value of less than 0.05 was assumed for significant differences.

Phenolic compounds as lignin in leaves was detected and localized in xylem, perivascular fibers sheath and in fiber bundle at leaves edges and tannins were detected and localized in phloem, collenchyma and palisade parenchyma.

Phenolic compounds as lignin in sapwood was detected and localized in vessels, fibers, axial and radial parenchyma and tannins were detected and localized in phloem, collenchymas, palisade and spongy parenchyma. By other side, lignin and tannins in heartwood were detected and localized in vessels, fibers, axial and radial parenchyma.

Phenolic compounds are essential for the growth and reproduction of plants, and are produced as a response for defending injured plants against pathogens. Lignin binding the cells, fibers and vessels which constitute wood and the lignified elements of plants, the principal function of lignin is support through strengthening of wood and tannins are mainly physically located in the vacuoles or surface wax of plants and play a role in protection from predation and in plant growth regulation.

Total phenolic content assay showed the presence of phenolic compounds in *L. glaucescens*. Water extract at room temperature from sapwood – heartwood mixture has the total phenols lowest concentration ($65.742 + 1.068 \text{ mg}^{\text{EAG}}/\text{g}$ dry weight) in contrast to the sample of water extract at $100 \text{ }^\circ\text{C}$ from leaf with total phenols highest concentration (414.263 ± 7.059 dry weight), therefore boiling water is a key factor in extraction of total phenolic compounds. Using Tukey test we can conclude that there was significant differences toward total phenolic content of extracts each extract. This difference in total phenols content may be due to these substances accumulate in different plant tissues and cells during ontogenesis and under the influence of various environmental stimuli such as solar radiation, respectively; wood is a internal tissue covered by others secondary tissues as vascular cambium, phloem and peridermis known as bark.

The presence of phenolic compounds in extracts of *L. glaucescens* determined the presence of antioxidant compounds. DPPH method shows that water extract at room temperature from sapwood – heartwood mixture has lowest antioxidant activity in μM trolox equivalents (255.172 ± 2.758) in contrast to the sample of methanol extract from sapwood with highest antioxidant activity (952.643 ± 21.997) therefore temperature of water is a key factor in antioxidant activity except in heartwood sample.

ABTS⁺⁺ method shows water extract at room temperature from sapwood – heartwood mixture has lowest antioxidant activity in μM trolox equivalents (61.333 ± 9.724) in contrast to the sample of methanol extract from sapwood with highest antioxidant activity (705.047 ± 7.867).

This investigation further supports the view that *L. glaucescens* is promising source of natural antioxidants. A low correlation between antioxidant properties and total phenolic content was found, indicating that each phenolic compound contributes differently to the antioxidant properties of these plant extracts.

The results of this work shows that leaves and wood of *L. glaucescens* are a natural source of antioxidant compounds and has a potential use in therapeutic applications.

CONTENIDO

Dedicatoria	3
Agradecimientos	4
Resumen	5
Abstract	8
Introducción	12
Justificación	17
Hipótesis	19
Objetivo general	20
Objetivos particulares	20
Metodología	
Recolección, identificación y clasificación del material biológico	21
Detección y localización de fenoles	23
Preparación del material biológico	26
Preparación de los extractos	27
Cuantificación de la concentración de fenoles totales	27
Método del radical 2,2-difenol-1-picrilhidrazil (DPPH')	28
Método ABTS	29
Resultados	
Detección y localización de fenoles	30
Cuantificación de la concentración de fenoles totales	35
Método del radical 2,2-difenol-1-picrilhidrazil (DPPH')	35
Método ABTS	36
Discusión	37
Conclusiones	39
Sugerencias	39
Bibliografía	40
Anexo A. Curva estándar de fenoles totales para la hoja	44
Anexo B. Curva estándar de fenoles totales para la madera	45
Anexo C. Curva estándar del método DPPH' para la hoja	46
Anexo D. Curva estándar del método DPPH' para la madera	47
Anexo E. Curva estándar del método ABTS para la hoja	48
Anexo F. Curva estándar del método ABTS para la madera	49
Anexo G. Resultados presentados en eventos especializados	50

ALGUNAS CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS Y QUÍMICAS DE LA HOJA Y DE LA MADERA DE *Litsea glaucescens* Kunth (LAURACEAE)

INTRODUCCIÓN

La familia Lauraceae tiene una distribución pantropical y subtropical que se extiende a regiones templadas, está formada principalmente por árboles y arbustos a excepción del género *Cassytha* que es una parásita trepadora. La familia tiene 55 géneros y 3000 especies aproximadamente (Heywood 1985). La importancia de esta familia en general es por la utilidad de diversas especies en medicina tradicional, farmacología, forraje, aceites esenciales, condimento, construcción, frutos comestibles y ornamentales (Lorea 2002). Las partes de la planta que se emplean para los usos anteriormente descritos son la hoja, la madera, la corteza y los frutos.

Las hojas de algunas lauráceas se han utilizado en la extracción de aceites esenciales tal es el caso de dos especies conocidas como laurel que son *Litsea glaucescens* Kunth y *Laurus nobilis* L. que en un estudio realizado por Tucker *et al.* (1992) comparó la comparación química del aceite esencial, mencionando que estas especies tienen componentes como el linalol y cineol que les proporcionan propiedades bactericidas y fungicidas. *L. nobilis* se ha representado en el escudo nacional mexicano y se dibuja en la parte inferior derecha del escudo; cabe mencionar que hicieron un cambio en el arreglo morfológico de las hojas, pues lo representan verticilado lo cual no corresponde al arreglo original que es alterno (Aguilar *et al.* 2004). Las hojas de *Nectandra globosa* Aubl. Mez. (aguacatillo) y *Litsea glaucescens* se emplean como forraje. La primera se usa para rumiantes de la región de Puriscal, Costa Rica, además se citan otros usos de la especie en cercas vivas y leña (Araya *et al.* 1993). La segunda sirve de alimento para borregos pelibuey en el municipio de Trinitaria, Chiapas; de las trece especies estudiadas esta obtuvo el mayor porcentaje de proteína cruda y fibra, también citan usos en medicina tradicional, como condimento y ornamental (Jiménez *et al.* 2007).

El uso de la madera comercial para construcción está ligado al estudio de sus cualidades anatómicas y propiedades físico-mecánicas, que al evaluarlas se logra potencializar usos o justificar cualitativa y cuantitativamente el uso tradicional. Ejemplos de esto en algunas maderas de lauráceas como *Chlorocardium rodiei* (Schomb.) Rohwer, H. G. Richt. & van der Werff (sipiri) esta especie se usa para construcción de muelles y barcos, y en un estudio realizado por Richter y Dallwitz (2000) describen la anatomía y el peso específico que es una propiedad física que indica la durabilidad natural de una

madera; el resultado obtenido es 1.1 g/cm³ con este valor se considera como dura y durable naturalmente. La madera de *Aniba rosaeodora* Ducke (palo de rosa) se ha utilizado como fuente de extracción de aceites esenciales, por su alto porcentaje de linalol que sirve como materia prima para la fabricación de ésteres que se emplean en la industria de perfumería y jabones (Ortuño 2006).

Una corteza muy utilizada como condimento es *Cinnamomum verum* J. Presl (canela), el aroma que expide y su sabor es agradable motivo por el cual la extracción de los aceites esenciales presentes en esta corteza se han utilizado como colorante y saborizante industrial en alimentos, además en la medicina tradicional se usa en infusiones para la cura de algunos desordenes ginecológicos y digestivos. Estudios químicos han identificado la presencia de flavonoides, lignanos, proantocianidinas, aldehídos, terpenos, taninos y carbohidratos en extractos clorofórmicos e hidroalcohólicos, para demostrar sus propiedades antibacterianas, antifúngicas y antiespasmódicas (Osuna *et al.* 2005).

El fruto comestible más reconocido de esta familia es el aguacate (*Persea americana* Mill.), los aceites y aceites esenciales que se extraen de este fruto poseen propiedades terapéuticas y son usados como componente en productos farmacéuticos por sus características físicas y químicas (Jiménez *et al.* 2001). Las hojas de esta especie se han utilizado en infusión como tónico digestivo y regulador de la menstruación al cual si se agrega raspadura de la semilla, sirve como antitusivo (Muñoz *et al.* 2004). La madera también ha sido usada en fondos y costillas de guitarras, y el estudio anatómico realizado por Rogel (1982) recomienda el uso de esta por sus características estéticas en muebles finos, chapa para gabinetes, repisas para objetos pesados, cajas para relojería, juguetes, utensilios de cocina y artesanías.

En México se han identificado 10 géneros de esta familia y son: *Aiouea*, *Beilschmiedia*, *Cassytha*, *Cinnamomum*, *Licaria*, *Litsea*, *Mocinnodaphne*, *Nectandra*, *Ocotea* y *Persea*; éstos se distribuyen en las zonas tropicales y templadas de este país (Lorea 2002). Particularmente y de acuerdo con Heywood (1985) el género *Litsea* tiene aproximadamente 400 especies, en su mayoría son conocidas como laurel y son aromáticas lo que las hace atractivas para su estudio pues pueden ser utilizadas en saborizantes y fragancia en cosmética, tal es el caso de *Litsea guatemalensis* Mez, donde Ortiz (2005) ha reportado un 26.8 % de 1,8-cineol, lo que justificaría estos usos; esta especie se usa también como condimento, ornato y en la medicina tradicional de Guatemala para aliviar fiebre, resfriados, infecciones del aparato digestivo y artritis.

En particular *Litsea glaucescens* Kunth, especie de estudio, se distribuye en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, México y Venezuela. Esta especie se puede presentar como árbol o arbusto. México es el país de origen y tiene una amplia distribución en las regiones tropical subtropicales y templadas de este país (Luna 2003); es conocida comúnmente por los habitantes de las diferentes localidades como pimientillo o laurel. Se han presentado ya algunos usos de la especie como forraje y construcción. Aunado a estos se suma la presencia de esta en el sistema agroforestal conocido como cercas vivas reportado por Avendaño y Acosta (2000). Cabe mencionar que la selección de las especies que constituyen esta práctica se da de acuerdo a su durabilidad y características ecológicas del sitio, de entre las principales ventajas que presenta esta selección encontramos que constituyen una fuente alternativa de frutos comestibles, forraje, leña y medicamentos; también los pobladores se benefician en la reducción de la fuerza de los vientos, evaporización, invasión de malezas, sombra para cultivos y animales domésticos.

Otros autores como Dávila *et al.* (2009a y 2009b), evaluaron la situación actual de esta especie en Sierra del Laurel y Sierra Fría en Aguascalientes, la conclusión es que las poblaciones silvestres del laurel se están disminuyendo debido a la práctica religiosa de Domingo de Ramos, por la recolecta de grandes cantidades de hojas para la elaboración de los ramos que se usan para esta ceremonia y también porque coincide en el tiempo de los inicios del proceso de floración afectando de manera directa la producción de semilla. Ante esta problemática realizaron un sistema de propagación de la semilla *in vitro* a través de la embriogénesis somática, con lo cual lograron la viabilidad de su propagación. Después de la ceremonia religiosa la gente lleva sus ramos a sus viviendas para utilizarlos posteriormente para curar enfermedades respiratorias y como condimento.

Un uso recurrente para *L. glaucescens* se da en la medicina tradicional mexicana y al respecto UNAM (2010) ha realizado un compilado a través de su publicación electrónica donde se citan este tipo de uso en México, por ejemplo en Morelos el uso de las ramas en infusiones para aliviar problemas ginecológicos de entuertos postparto y contra la esterilidad femenina, además se recomiendan baños corporales en casos de dismenorrea. Los baños calientes con ramas que tengan o no flores, en conjunto con otras especies como *Potentilla candicans* Kunth, *P. rubra* Willd. ex Schldl., *P. staminea* Rydb. (suealdas), *Silene laciniata* Cav. (metatera) y *Buddleja cordota* Kunth (tepozán) sirven para que no se hinchen las mujeres después del parto. En Chiapas y Oaxaca el uso de infusiones de hojas sirven para aliviar dolor de estómago y, en el caso de reumas

por enfriamiento se hierven en conjunto con hojas de *Cestrum roseum* Kunth (hendiodilla) y *Buddleja cordota* (tepozán), el enfermo se acuesta y descubre los pies al vapor de la preparación y posteriormente se cubre.

Esta cualidad de funcionar como antiinflamatorio y curar algunas afecciones gastrointestinales y ginecológicas se debe a la composición química que tiene esta especie, pues se sabe que los organismos vegetales sintetizan una variedad de metabolitos secundarios, entre los que se encuentran los alcaloides, terpenos y compuestos fenólicos, éstos últimos constituyen más de 8000 estructuras conocidas en el reino vegetal, encontrándose en raíces, tallos, hojas y frutos. Además tienen gran actividad de reacción, por lo que se encuentran en la mayoría de los casos combinados con un ácido orgánico como el ácido gálico o con un azúcar como en el caso de los ácidos fenólicos, los flavonoides y las antocianidinas o bien con ellas mismas para formar un polímero como los taninos (Gutiérrez *et al.* 2008, Vermerris y Nicholson 2008).

El interés de estudiar estos compuestos ha aumentado debido a que pueden retardar o inhibir el daño oxidativo de las células y su efecto contra algunas enfermedades como ciertos cánceres y desordenes cardíacos dado por su poderosa actividad antioxidante (García 2007).

El daño oxidativo se da por la participación del oxígeno en diversas reacciones de oxidación, conocidas como procesos de oxido-reducción (redox), su reducción secuencial dentro de las células conduce a la formación de las llamadas especies reactivas del oxígeno (ROS), que son moléculas muy pequeñas altamente reactivas debido a la presencia de una capa de electrones de valencia no apareada de entre las que se encuentran los iones oxígeno, los radicales libres y los peróxidos, los cuales pueden producir daños a la célula en el ácido desoxirribonucleico (ADN), oxidación de ácidos grasos poliinsaturados y oxidación de aminoácidos. De forma análoga existen especies reactivas del nitrógeno (RNS), del cloro (RCIS) y del bromo (RBrS) (Halliwell 2006).

Los procesos naturales de protección contra la agresión oxidativa en nuestro organismo, es por procesos enzimáticos que como su nombre lo indica son enzimas que ejercen su acción fundamentalmente a nivel intracelular e interfieren la fase de iniciación de la síntesis de radicales libres inactivando las moléculas precursoras de los mismos como la catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y glutatión transferasa que son las encargadas de desarmar a los radicales libres sin desestabilizarse; otros procesos son los no enzimáticos como α -tocoferol, ácido ascórbico, β -catotenos y polifenoles estos son captadores de radicales libres (Venereo 2002). Estos procesos de defensa contra la

producción de radicales libres antes mencionados reaccionan como antioxidantes con lo cual estabilizan los compuestos altamente reactivos convirtiéndolos en inocuos ya que actúan en los diferentes procesos de la secuencia oxidativa y tienen más de un mecanismo de acción o actividad biológica.

Existen métodos que permiten la evaluación de la actividad antioxidante y estos pueden ser *in vitro* e *in vivo*. Los primeros se conocen como simples, rápidos y fiables, aunque no reflejan las condiciones fisiológicas de la célula viva y no toman en cuenta aspectos como el metabolismo de la misma, dan una idea preliminar de lo que puede suceder en situaciones complejas, es decir si un sustrato presenta baja actividad antioxidante *in vitro* es probable que sea nula en un ensayo *in vivo*, en cambio si el sustrato presenta alta actividad antioxidante *in vitro* entonces es probable que en un ensayo *in vivo* pueda actuar en el metabolismo del organismo. Ejemplos de métodos *in vitro* son:

Actividad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC): Se emplea para la determinación de la actividad antioxidante de alimentos y suplementos nutricionales. Este método mide la degradación oxidativa de la fluoresceína después de interaccionar con los radicales peróxido. La protección ejercida por los antioxidantes se cuantifica a través de la fluorescencia (Magalhaes *et al.* 2008).

Captación de radicales libres por superóxido dismutasa (SOD): Cataliza la dismutación de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno. Debido a esto es una importante defensa antioxidante en la mayoría de las células expuestas al oxígeno (Dudonné *et al.* 2009).

Potencia antioxidante reductora férrica (FRAP): Este método evalúa la actividad reductora de Fe^{+3} a Fe^{+2} de una sustancia. Se emplea habitualmente en los diferentes fluidos del organismo, así como diferentes componentes y complementos de la dieta (Huang *et al.* 2005).

JUSTIFICACIÓN

La familia Lauraceae tiene importancia en el área de la salud por sus aplicaciones en la etnomedicina y los alimentos, motivo por el cual se han estudiado algunas especies en Colombia aislando diferentes compuestos químicos como alcaloides, terpenos y fenoles, con la finalidad de evaluar su actividad biológica como: antibacteriales, antifúngicas, antiinflamatorias y antioxidantes (Coy y Cuca 2007; Macías 2009, 2010).

El género *Litsea* lo incluye en su estudio Macías (2010) donde detectó un lignano conocido como (+)-5-O-demetoxiepiexcelsina y algunos terpenos que mostraron una moderada actividad inhibitoria a la replicación del HIV-1 que es el retrovirus que causa el SIDA. López *et al.* (1995) encontraron en un extracto etanólico de la corteza de *L. glaucescens* dos flavanonas (pinostrobin y pinocembrina) y la dihidrochalcona 2', 6'-dihidroxi-4'-methoxydihydrochalcone. Las flavanonas son precursoras de los flavonoides y pueden presentar actividad antitumoral, hormonal, antimicrobiana y efectos terapéuticos contra la fragilidad capilar causada por la hipertensión venosa. Y la dihidrochalcona es un endulzante que puede utilizarse en goma de mascar, lavados bucales, pastas dentales y productos farmacéuticos en los cuales sean aceptables las características de gusto descritas.

Entre los compuestos químicos aislados en especies de la familia y en específico en *L. glaucescens* encontramos compuestos fenólicos, estos tienen importancia de estudio por presentar actividad antioxidante con la cual actúan como agentes reductores, donadores de protones, estabilizadores de oxígeno y ayudan a inhibir, activar o proteger enzimas específicas en el organismo (Vásquez *et al.* 2007, Gutiérrez *et al.* 2008, Ramos *et al.* 2008, Rosales *et al.* 2010), además su estudio tiene importancia en diversos productos farmacéuticos y alimentarios por estar ligados a la potencialidad de los alimentos para la promoción de la salud, mejorar el bienestar y reducir el riesgo de enfermedades.

El estudio de López *et al.* (1995) da los resultados obtenidos para el análisis químico de la corteza que es el conjunto de tres tejidos secundarios llamados cambium vascular que cumple con la función de meristemo, floema con la función de conducción (agua, sales, nutrientes) y peridermis que reviste a la planta. La presencia de fenoles en la madera y en las hojas puede estar presente debido al uso de las hojas y ramas en la etnomedicina.

La madera es el tejido secundario llamado xilema que se ubica en la parte interna del árbol o arbusto, este tejido tiene dos zonas químicamente distintas conocidas como la

albura y el duramen. La albura es en un árbol vivo la parte activa que contiene células vivas, muertas y material de reserva, cuya función primordial es conducción y el duramen es la parte que carece de células vivas, tiene sustancias extractivas y su función es de sostén. Estas zonas en ocasiones pueden diferenciarse por un cambio en la coloración. El color así como el olor y el sabor son características de la madera que tienen un origen químico donde el color se origina por sustancias colorantes llamadas xilócromas, depositadas en el interior de las células, que impregnan al mismo tiempo a las paredes celulares; entre estas sustancias encontramos derivados tánicos, resinas y gomas; el olor se debe a la presencia de sustancias volátiles como resinas y aceites esenciales existentes en las células, las cuales al volatilizarse desprenden su olor y el sabor (Tortorelli 1956). También se sabe que la presencia de componentes químicos de las paredes celulares que conforman a la madera varían dependiendo de la especie así como el proceso de muerte celular, el cual puede terminar en la transformación de los compuestos químicos de las paredes (lignina); producción de extractivos (taninos) e inclusiones minerales que se depositan en el lumen o en la pared (Rivera *et al.* 1999).

Dado el valioso uso de *L. glaucescens* en la etnomedicina, la falta de estudios químicos que le infieran una propiedad terapéutica y partiendo de la base de que los fenoles pueden contribuir a esta propiedad, este trabajo cuantificó, detectó y localizó a estos compuestos al mismo tiempo que evaluó su actividad antioxidante para conocer la potencialidad terapéutica que tiene la especie.

HIPÓTESIS

La composición química de la hoja de *L. glaucescens* le confiere propiedades terapéuticas, mismas que se pueden atribuir a la presencia de fenoles, con lo cual se podrá potencializar la madera de esta especie con las mismas propiedades.

OBJETIVO GENERAL

Analizar algunas pruebas químicas de la hoja y de la madera de *Litsea glaucescens*, que permitan potencializar su uso terapéutico

OBJETIVOS PARTICULARES

- Detectar y localizar fenoles en la hoja y en la madera
- Cuantificar la concentración de fenoles totales en la hoja y en la madera
- Evaluar la actividad antioxidante en la hoja y en la madera

METODOLOGÍA

Recolección, identificación y clasificación del material biológico

Las hojas y la madera se obtuvieron de un árbol de *Litsea glaucescens* que se recolectó en una selva mediana subperennifolia perteneciente al municipio y ejido conocido como Felipe Carrillo Puerto, Quintana Roo (Fig. 1).

El ejido de Felipe Carrillo Puerto 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 msnm y una población total de 21530 personas. El clima es Aw₀, Aw₁ y Aw₂ caracterizado como cálido subhúmedo con una temperatura promedio de 25°C con una precipitación anual de 800 a 1000 mm (INEGI 2010).

De acuerdo a la clasificación de la FAO-UNESCO los suelos en el ejido corresponden a redzinas, vertisol crómico y vertisol gleico. El sistema hidrológico tiene características muy particulares, se presentan los cenotes que son fuente de abastecimiento de agua para los pobladores. El tipo de vegetación dominante es la selva mediana subperennifolia (Santos *et al.* 1998).

La identificación de la especie se realizó por personal del Herbario Metropolitano UAMIZ Dr. Ramón Riba y Nava y registró en el mismo con el número 67133 (Fig. 2a). Las muestras de madera se registraron en la xiloteca UAMIZ con el número M-279 (Fig. 2b).

Clasificación botánica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Laurales

Familia: Lauraceae

Género: *Litsea*

Especie: *Litsea glaucescens* Kunth

Nombres comunes: Pimientillo, laurel, laurelillo, laurel silvestre (Luna 2003).

Distribución en México: Aguascalientes, Chiapas, Durango, Estado de México, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, Tamaulipas y Veracruz (Avendaño y Acosta 2000, Luna 2003, Jiménez *et al.* 2007, Dávila *et al.* 2009a, UNAM 2010).

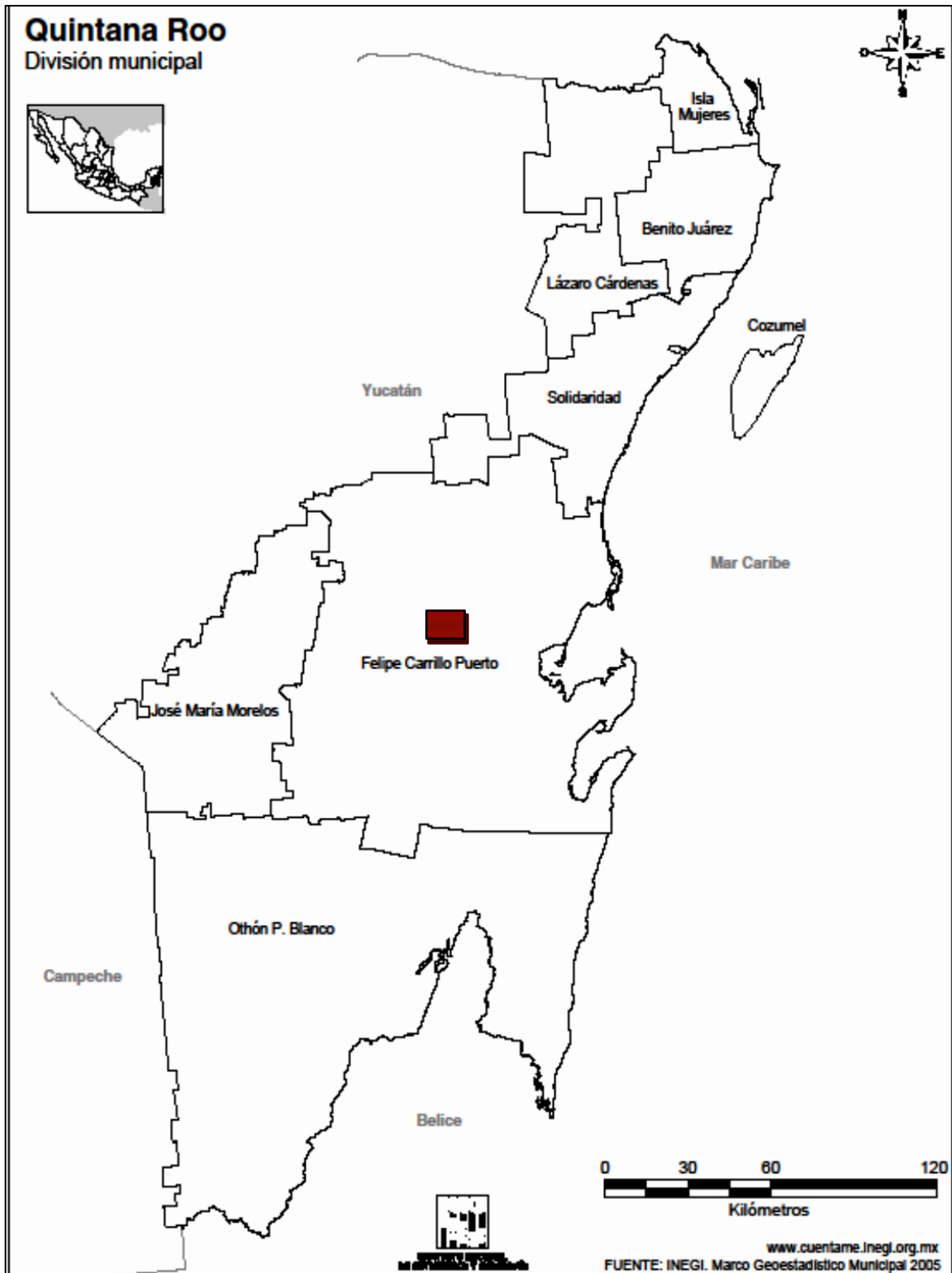


Figura 1. Ubicación del sitio de recolecta. Mapa tomado del Marco Geoestadístico Municipal (INEGI 2005).

Características botánicas: Árbol monoico perennifolio de 10 m. de altura, corteza fisurada de color castaño grisáceo a café amarillento con numerosas lenticelas, hojas simples, alternas, de forma lanceolada o elíptico-lanceoladas de 8 cm de largo por 2.5 de ancho, margen entero, ápice acuminado, base atenuada, lámina coriácea verde oscuro en el haz y verde claro en el envés, con glándulas que producen un olor agradable, peciolo de 0.4 a 0.7 cm de largo (Fig. 2c, d). Fructifica de Junio a octubre (Luna 2003).



Figura 2. *Litsea glaucescens*. a. Ejemplar de herbario, b. tablillas de xiloteca, c. corteza y d. hoja.

Detección y localización de fenoles

Se seleccionaron pruebas histoquímicas que den reacción para detectar fenoles en general, ligninas y taninos. Los diferentes reactivos se aplicaron en cortes anatómicos de la hoja y la madera.

La detección de fenoles en general se realizó con azul de toluidina este es un colorante que se puede comportar como ortocromático (tiñe de color azul) o metacromático (tiñe de color violeta-rojo), dependiendo del pH y de la naturaleza química de la sustancia teñida.

Para la reacción se disuelve el azul de toluidina en un buffer de acetato a pH= 4, se sumergen los cortes durante 5 minutos, por último se lavan y montan con la solución de buffer de acetato a pH=4. La presencia de cualquier tipo de fenol da una coloración azul o verde azulado y de paredes lignificadas una coloración azul violeta o rojo violeta (Vermerris y Nicholson 2008).

Las ligninas son polímeros fenólicos que se forman a partir de la polimerización de tres unidades monoméricas fundamentales: los monolignoles *p*-cumaril-alcohol, coniferil-alcohol y sinapil-alcohol. Y se clasifican en guayacil lignina (coniferil-alcohol), guayacil-siringil-lignina (coniferil y sinapil-alcohol) o guayacil-siringil-*p*-hidroxifenil-lignina (se forma a partir de los tres) (Ray 2008). Por esta razón se utilizaron dos reactivos para la detección de la lignina uno es el de Wiesner que tiñe a todos los tipos de ligninas dando un color rojo y el de Mäule que identifica las ligninas con unidades de guayacil de color amarillo y con unidades de siringil en color rojo (Vallet *et al.* 1996).

La reacción del reactivo de Wiesner se realizó con una solución de fluoroglucinol al 2% en etanol al 96%, donde se sumergió la muestra durante 5 minutos y se montó con una gota de HCl 6N.

La reacción del reactivo de Mäule se realizó con una solución acuosa de permanganato de potasio al 1% por 5 minutos, se lavó con agua destilada, se cubrió con una solución de HCl al 30%, para decolorar parcialmente, se retiró el HCl y se montó con una gota de hidróxido de amonio concentrado (Vallet *et al.* 1996).

Los taninos son polímeros fenólicos solubles en agua, con pesos moleculares entre 500 y 3000, que además de dar reacciones fenólicas usuales, tienen la propiedad de precipitar alcaloides, gelatina y proteínas. Han sido utilizados como componentes comunes en alimentos y bebidas de origen vegetal, a los cuales contribuyen en el sabor y palatabilidad por su astringencia. El curtido consistente en el establecimiento de enlaces entre las fibras de colágeno de la piel, lo que le confiere resistencia al agua, calor y abrasión. También se han utilizado en la producción de colorantes, tintas, vinos y cervezas. En farmacia solo se cuenta con antidiarreicos a pesar de que se han reportado otras propiedades biológicas como antioxidantes, antitumorales, antibacteriales y antivirales (Isaza 2007).

Los taninos se detectaron con la técnica de vainillina-HCl, preparando una solución saturada de vainillina en etanol al 95%, donde se sumergió la muestra durante 5 min. y se montó con una gota de HCl 9N. La presencia de taninos da una coloración en rojo (Rivera *et al.* 1999).

La localización de fenoles, lignina y taninos se observó en cortes anatómicos de las hojas y la madera. Los cortes transversales de la hoja se realizaron de la parte media de 10 hojas con un micrótopo de rotación de 30 a 50 μ de grosor (Fig. 3) y los cortes transversales, tangenciales y radiales de cubos de madera de las dos zonas conocidas como albura y duramen con medidas de 1.5 x 1.5 cm, con un micrótopo de deslizamiento de 25 a 35 μ de grosor (Fig. 4).

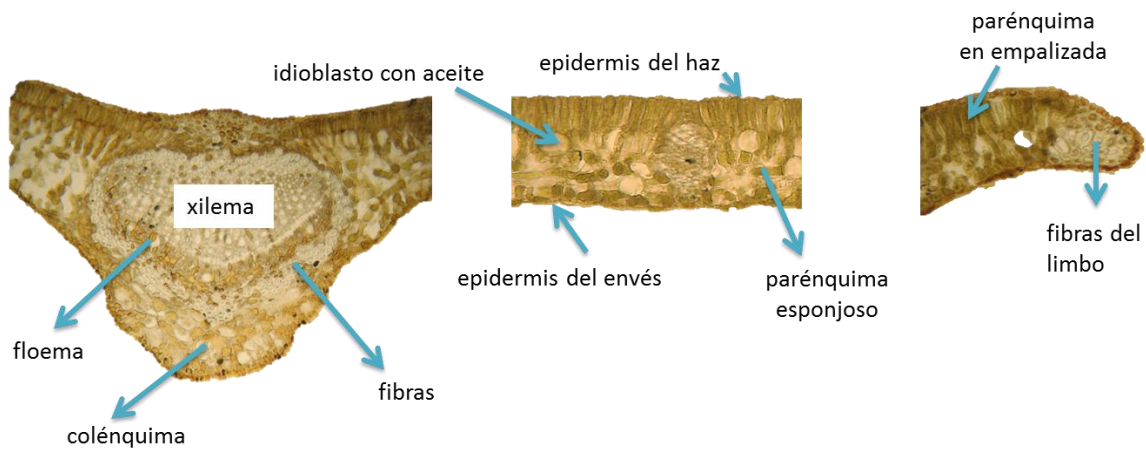


Figura 3. Hoja. Corte transversal (20x).

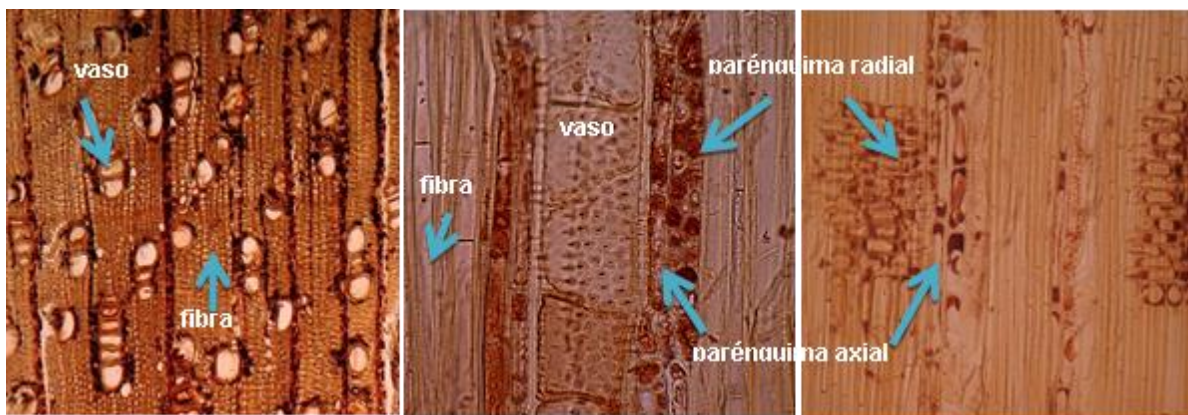


Figura 4. Madera. a. corte transversal (5x), b. corte tangencial (20x), c. corte radial (10x)

Preparación del material biológico

Para cuantificar los fenoles totales y evaluar la actividad antioxidante se requiere de la preparación de extractos con el material biológico de las hojas y la madera, este material se preparó secándolo a temperatura ambiente y en oscuridad, después se

molieron hasta obtener harinas que se tamizaron para obtener partículas de 250 μm (Fig. 5d y 6d). Las hojas se separaron de la rama, se secaron y se molieron con un procesador de alimentos (Fig. 5a, b, c).



Figura 5. Preparación de las hojas. a. rama, b. hojas secas, c. procesador de alimentos, d. harina.

La madera se molió en el taller de carpintería de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y debido a la diferencia de color entre la albura y el duramen se cortaron por separado con una sierra cinta y la molienda se hizo con una sierra orbital (Fig. 6a, b, c). Se consideraron tres muestras para la madera y son albura, duramen y una mezcla de ambas.



Figura 6. Preparación de la madera. a. troza de madera, b. cierra cinta, c. cierra orbital, d. harinas.

Preparación de los extractos

De las harinas de las cuatro muestras se prepararon las siguientes extracciones:

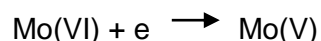
Extracción con agua a 100°C: Se pesan 0.5 g de la muestra en una balanza analítica y se colocan en un matraz de 100 mL, donde se añadieron 25 mL de agua destilada, se deja en ebullición con agitación durante 5 minutos. Después se filtra y afora a 25 mL con agua destilada (Serrano 2010).

Extracción con solventes: Se sigue la metodología propuesta por Miliauskas *et al.* (2004). Se pesan 0.5 g de la muestra se colocan en un matraz de 100 mL, donde se añadieron 10 mL de agua 25°C o metanol (solventes) y se mantiene en agitación durante 30 minutos. Concluido este tiempo se filtra la muestra y se afora a 10 mL con el solvente.

Cuantificación de la concentración de fenoles totales

La concentración de fenoles totales en los extractos de las hojas y la madera se midió con un espectrofotometro UV-VIS Spectronic GENESYS 2, basándose en la reacción colorimétrica de oxido reducción, mediante el método donde se utiliza el reactivo Folin-Ciocalteu. Este método se basa en la transferencia de un electrón para evaluar la

actividad reductora que tiene una muestra por la presencia de fenoles los cuales independientemente de su estructura, forman complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico que reaccionan bajo condiciones alcalinas reduciendo estos complejos en óxidos cromógenos de color azul intenso de tungsteno ($W_8 O_{23}$) y molibdeno ($Mo_8 O_{23}$) (Huang *et al.* 2005, Gutierrez *et al.* 2008), la reacción es:



El contenido de fenoles totales se cuantificó con una mezcla de reacción que contiene 1.58 mL de agua desionizada, 20 μ L de la solución estándar de ácido gálico ó 20 μ L de la disolución problema (por triplicado) ó 20 μ L de agua desionizada si es el blanco, se agregan 100 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu (50% v/v), se agita en un vortex se deja incubar durante 8 min por último se añaden 300 μ L de solución de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 20%, se agita en un vortex y se mantiene durante 30 min a 40°C. Se lee la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 765 nm (Singleton y Rossi 1965).

La solución estándar utilizada fue ácido gálico de 500 mg/mL, de la cual se tomaron alícuotas de 0.625, 1.25, 2.5, 5 y 10 mg/mL (Anexo a, b). El contenido de la muestra se expresa como mg de equivalentes de ácido gálico por g de sólido seco ($mg^{EAG}/mL_{sólido\ seco}$).

Método del radical 2,2-difenol-1-picrilhidrazil (DPPH')

La actividad antioxidante se determinó con el método colorimétrico que se basa en la reducción de la absorbancia medida a una longitud de onda a 520 nm del radical DPPH'. La deslocalización de un electrón desapareado le otorga un color violeta al radical. Cuando una disolución de DPPH' reacciona con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno o con otra especie radical (R^{\cdot}) se reduce como DPPH-H ó DPPH-R y se produce una pérdida de absorbancia que se muestra de color amarillo. Este cambio de coloración se monitorea para determinar la actividad antioxidante en la muestra de las hojas y la madera. 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 a Sánchez-Moreno *et al.* (1998), la mezcla de reacción se obtuvo colocando en un tubo de ensaye 1.5 mL de DPPH y 20 μ L de la solución estándar trolox ó 20 μ L de la disolución problema (por triplicado) ó 20 μ L de agua desionizada si es el blanco. Se deja reaccionar durante 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Se

utiliza metanol para ajustar el espectrofotómetro a cero. Se lee la absorbancia a una longitud de onda de 516 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 μ M. Las concentraciones utilizadas que se tomaron son 50, 100, 150, 200 y 250 μ M (Anexo c, d).

Método ABTS

La evaluación de la actividad antioxidante por el método ABTS se realizó utilizando el ensayo modificado que informó Ozgen *et al.* (2006) que se basa en la utilización del compuesto ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)) para la formación de un radical libre ABTS^{•+} tras la reacción química de ABTS (3.7 mM) y persulfato potásico (1.3 mM) la cual se deja reaccionar de 12 a 16 h. Una vez formado el radical ABTS^{•+} se diluye con buffer de acetatos 20 mM a pH= 4.55 hasta obtener un valor de absorbancia comprendido en 0,70 ($\pm 0,01$) a 728 nm. En una cinética realizada a la disolución del radical con el buffer se obtuvo un máximo de absorbancia de 728 nm. La solución estándar utilizada es trolox. Para la preparación de la curva estándar se tomaron alícuotas de 50, 100, 200, 300, 400 y 500 μ M de la solución de trolox a 1000 μ M (Anexo e, f).

Para evaluar la actividad antioxidante por el método ABTS se realizó la mezcla de reacción colocando 1.5 mL de ABTS y 10 μ L de la solución estándar trolox ó 10 μ L de la disolución problema (por triplicado) ó 10 μ L de agua desionizada si es el blanco. Se deja reaccionar durante 30 minutos a 38°C. Se lee la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 728 nm. Los datos se reportan en equivalentes de Trolox (TEAC, mM).

Los resultados obtenidos se analizan con la prueba estadística de comparación múltiple de medias de Tukey de significancia $p \leq 0.05$ con el sistema SPSS.

RESULTADOS

Detección y localización de fenoles



Figura 7. Detección y localización de fenoles en la hoja **aumentos**. Fenoles: a. Azul de toluidina (azul). Lignina: b. Reactivo de Wiesner (rojo), c. Reactivo de Mäule (rojo). Taninos: d. Vainillina/HCl (rojo).

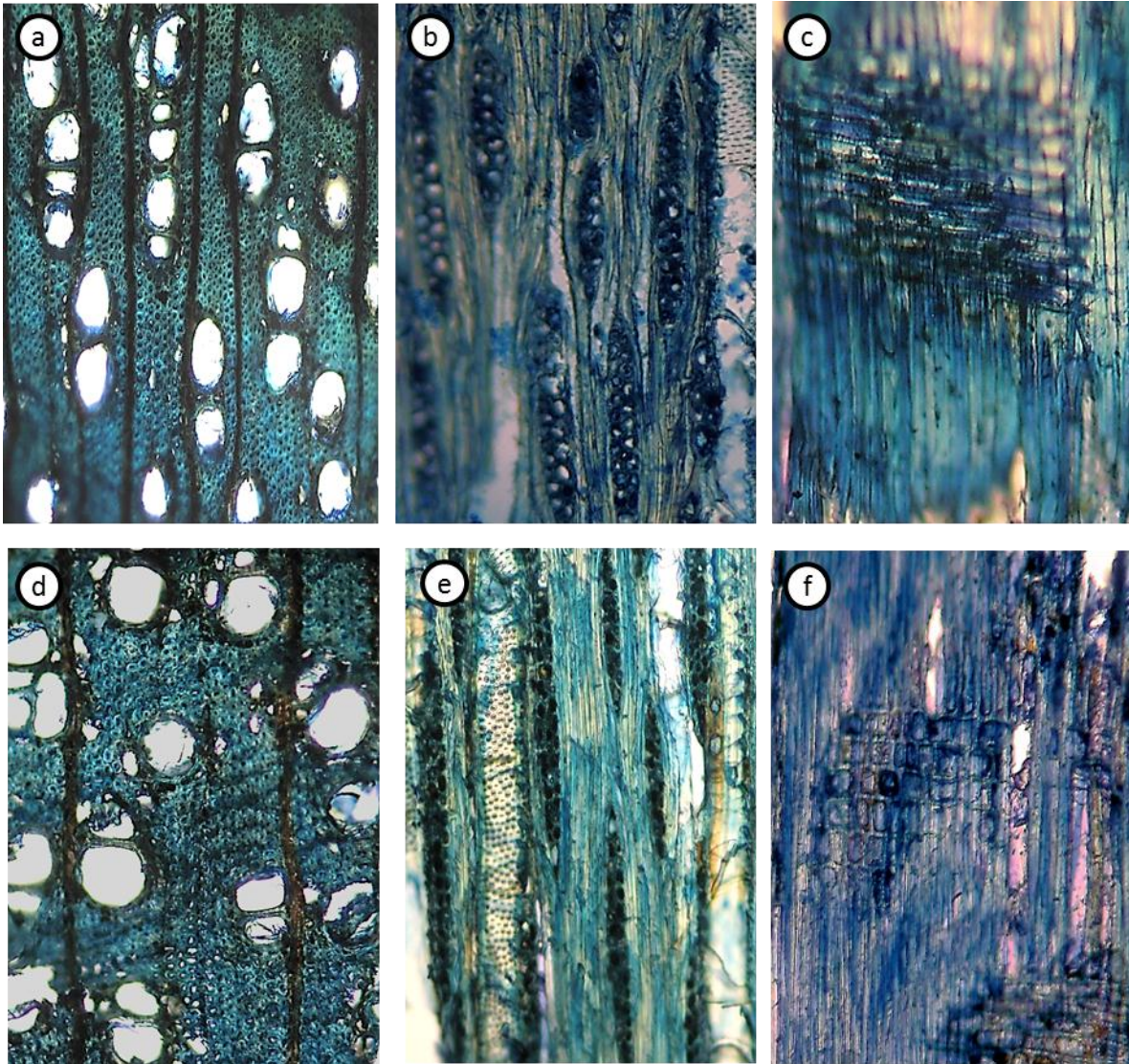


Figura 8. Fenoles con azul de toluidina en cortes de la albura a. transversal (20x), b. tangencial (20x), c. radial (20x) y del duramen d. transversal (20x), e. tangencial (20x), f. radial (20x).

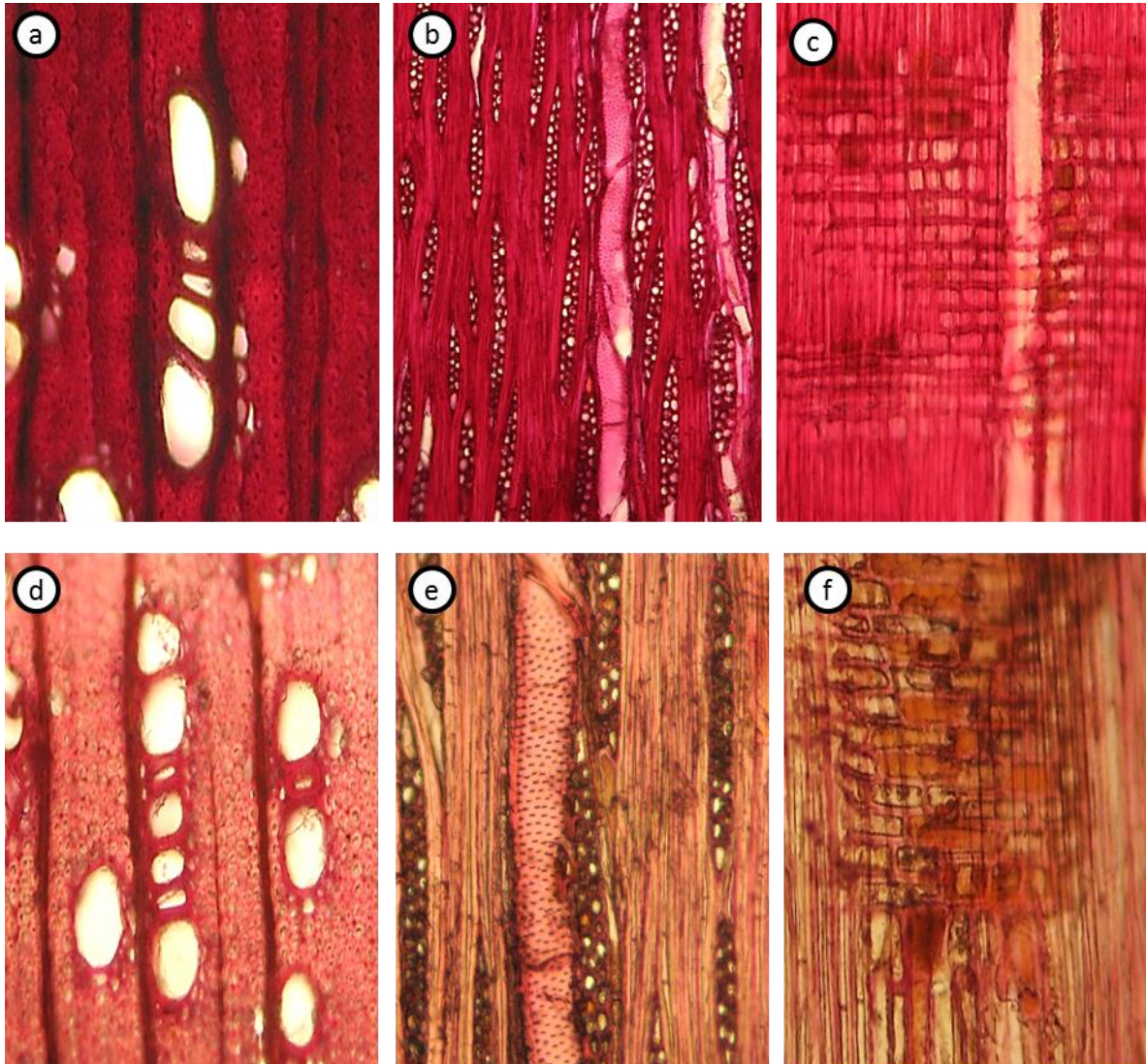


Figura 9. Lignina con reactivo de Wiesner en cortes de la albura a. transversal (40x), b. tangencial (20x), c. radial (40x) y del duramen d. transversal (40x), e. tangencial (40x), f. radial (40x)

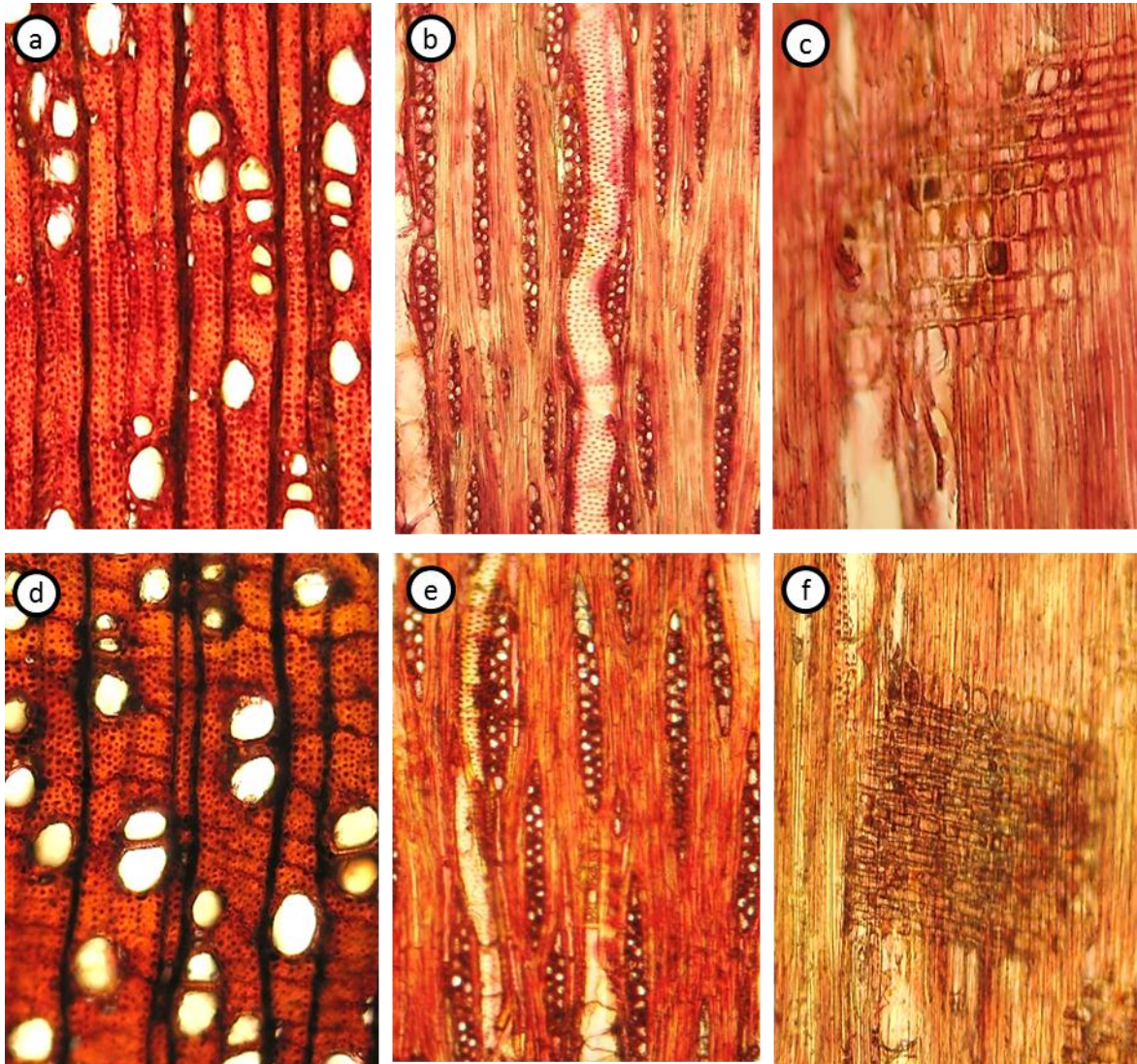


Figura 10. Lignina con reactivo de Mäule en cortes de la albura a. transversal (10x), b. tangencial (10x), c. radial (20x) y del duramen d. transversal (10x), e. tangencial (10x), f. radial (20x).

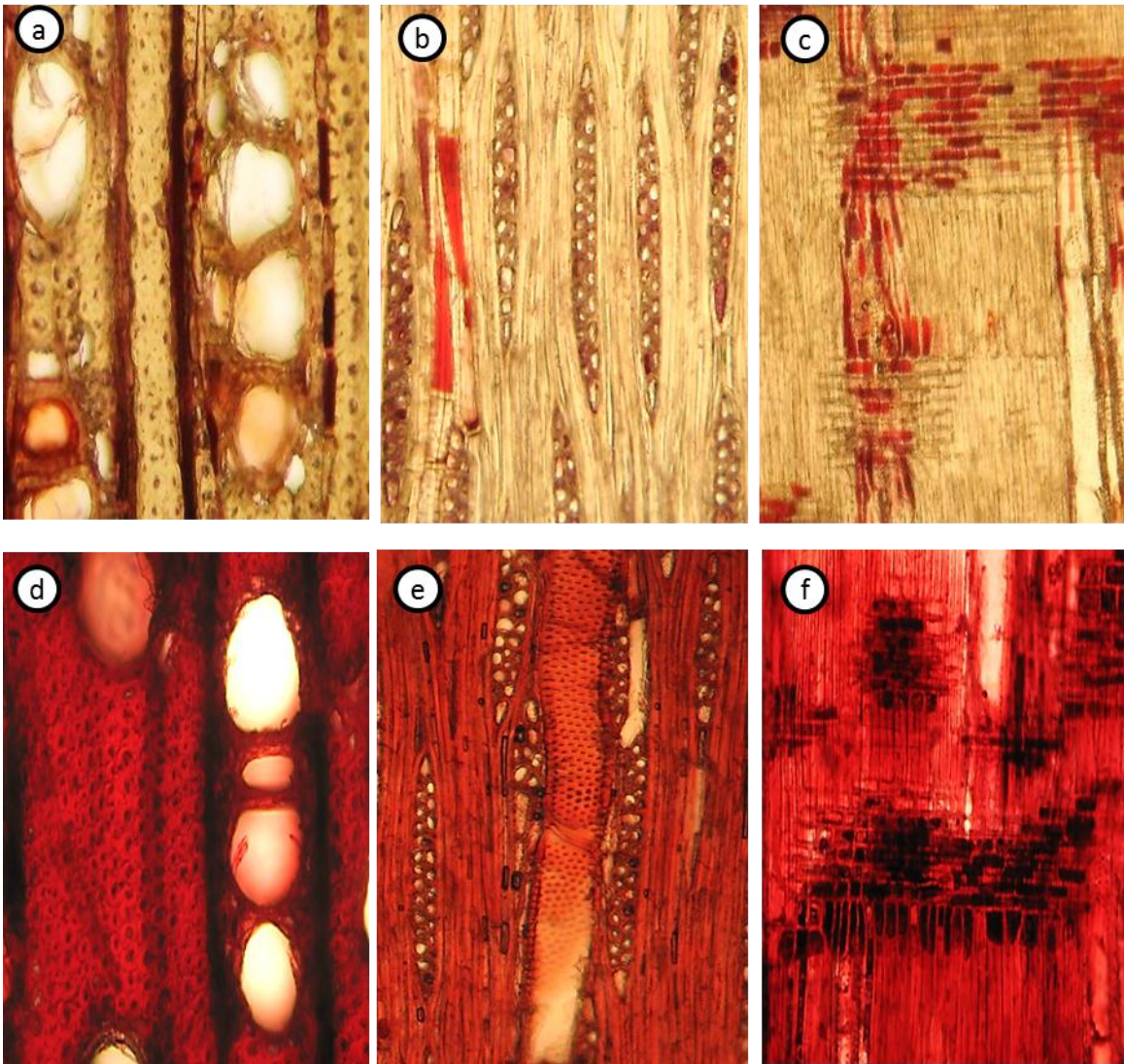


Figura 11. Taninos con vainillina/HCl en cortes de la albura a. transversal (40x), b. tangencial (40x), c. radial (20x) y del duramen d. transversal (40x), e. tangencial (40x), f. radial (20x).

Cuantificación de la concentración de fenoles totales

Se presenta una tabla de los valores correspondientes a la concentración de fenoles totales en equivalentes a ácido gálico de las diferentes muestras estudiadas. Las letras minúsculas diferencian las muestras con un disolvente y las letras mayúsculas las diferencias a los disolventes en una muestra (Tabla 1).

Tabla 1. Concentración de fenoles totales.

Disolvente Muestra	Concentración de fenoles totales [$\text{mg}^{\text{EAG}}/\text{g}_{\text{sólido seco}}$]		
	Agua (100°C)	Agua (25°C)	Metanol
Hojas	414.263 \pm 7.059 (B, d)	157.123 \pm 0.728 (A, c)	142.264 \pm 0.715 (A, a)
Albura	267.479 \pm 6.332 (B, b)	146.016 \pm 6.837 (A, c)	371.091 \pm 5.786 (C, d)
Duramen	331.664 \pm 1.960 (C, c)	120.171 \pm 2.919 (A, b)	268.395 \pm 6.946 (B, b)
Albura y duramen	217.415 \pm 6.066 (B, a)	65.742 \pm 1.068 (A, a)	283.457 \pm 4.150 (B, c)

Método del radical 2,2-difenol-1-picrilhidrazil (DPPH')

Se presenta una tabla con los resultados equivalente a trolox para evaluar la reducción del radical DPPH' que presentan las diferentes muestras estudiadas.

Tabla 2. Reducción del radical DPPH'.

DPPH' Disolvente Muestra	Concentración de Trolox [μM]		
	Agua (100°C)	Agua (25°C)	Metanol
Hojas	540.952 \pm 38.234 (B, b)	449.523 \pm 36.737 (A, b)	556.190 \pm 7.867 (B, a)
Albura	838.620 \pm 12.641 (B, c)	737.931 \pm 24.865 (A, c)	952.643 \pm 21.997 (C, b)
Duramen	531.034 \pm 23.930 (A, b)	498.390 \pm 29.753 (A, b)	834.482 \pm 7.298 (B, c)
Albura y duramen	356.781 \pm 5.742 (B, a)	255.172 \pm 2.758 (A, a)	655.172 \pm 2.389 (C, b)

Método ABTS

Se presentan los resultados en equivalente a trolox de las diferentes muestras estudiadas.

Tabla 3. Actividad antioxidante en equivalentes en trolox de cada muestra.

ABTS'	Concentración de Trolox [μM]		
Disolvente Muestra	Agua (100°C)	Agua (25°C)	Metanol
Hojas	198.756 \pm 13.171 (B, b)	159.422 \pm 1.388 (A, b)	266.311 \pm 4.018 (C, a)
Albura	142.285 \pm 13.627 (A, a)	274.428 \pm 14.051 (B, c)	705.047 \pm 7.867 (C, d)
Duramen	320.380 \pm 23.961 (A, c)	355.142 \pm 1.889 (A, d)	545.523 \pm 14.869 (B, c)
Albura y duramen	331.571 \pm 5.669 (B, c)	61.333 \pm 9.724 (A, a)	377.428 \pm 42.857 (B, b)

DISCUSIÓN

Lignina

Los resultados obtenidos indican que la hoja de *Litsea glaucescens* presenta lignina en los vasos y las fibras del xilema, en las fibras perivasculares y del limbo (Fig. 7b). Con el reactivo de Maüle se detectó por su coloración en rojo, lignina con el grupo funcional siringil (Fig. 7c) (Vallet *et al.* 1996). La presencia de este fenol en el xilema favorece la conducción del agua y en las fibras proporciona sostén (Ray 2008).

En el xilema secundario o madera, el reactivo de Wiesner indicó la presencia de lignina en todos los elementos celulares de la albura y del duramen (Fig. 9), y con el reactivo de Mäule, se detectó lignina con unidades de guayacil en color amarillo la cual coincide con la madera temprana que es la que se forma en primavera-verano y con unidades de siringil en la madera tardía que se forma durante el otoño-invierno (Fig. 10) (Vallet *et al.* 1996). Dávila *et al.* (2009a) menciona que la floración de *L. glaucescens* ocurre durante marzo-abril y Luna (2003) refiere que la fructificación ocurre durante julio-septiembre ambos eventos suceden durante primavera-verano, lo que indica que puede ser la razón de la diferencia en la composición química de la lignina, pues cuando ocurren los eventos la lignina se sintetiza a partir de solo un monolingol (guayacil) y posterior a éstos la lignina se puede formar de dos o tres monolingoles (siringil).

Taninos

En la hoja se localizaron en los tubos cribosos del floema, en el colénquima y en el parénquima en empalizada (Fig. 7d).

En el xilema secundario, en la albura se localizan en las células de parénquima axial y radial (Fig. 11a-c) y en el duramen se encuentran en todos los elementos celulares (Fig. 11d-f), esto indica que los taninos se forman en las células parenquimatosas de la albura y en el proceso de duraminización se translocan a las paredes celulares de los vasos y las fibras a través de las puntuaciones. La presencia de taninos en todos los elementos celulares del duramen influye en la diferencia de color con respecto a la albura. La presencia de taninos en el xilema secundario proporciona un sistema de defensa ante el ataque de microorganismos (bacterias y virus) y macroorganismos (insectos y hongos) (Rivera *et al.* 1999, Isaza 2007).

Fenoles totales

La hoja presentó la mayor concentración de fenoles totales con la extracción acuosa a 100°C (Tabla 1), esto se debe a que los fenoles presentes pueden tener más de un grupo -OH favoreciendo la solubilidad en agua (Vermerris y Nicholson 2008). La

extracción acuosa a 100°C tiene mayor concentración de fenoles totales en comparación con la extracción a 25°C en todas las muestras, por lo que la temperatura puede ser un factor influyente, esta puede ser la razón por la cual en la etnomedicina se preparen tes y baños calientes que proporcionan el alivio de problemas estomacales, ginecológicos y antiinflamatorios (UNAM 2010).

Actividad antioxidante

Los métodos de reducción del radical DPPH y ABTS muestran que la albura tiene la mayor actividad antioxidante con la extracción metanólica (Tabla 2, 3), por lo que se sugiere que en base a los resultados obtenidos, se puedan extraer los fenoles sumergiendo una muestra de albura en alcohol y de la extracción se humedezca un lienzo de tela para posteriormente colocar fomentos en partes inflamadas del cuerpo.

Los estudios realizados por Osuna *et al.* (2005) han identificado en la canela la presencia de flavonoides, lignanos y taninos para demostrar sus propiedades antibacterianas, antifúngicas y antiespasmódicas. Macías (2010) refiere el aislamiento de un lignano en el género *Litsea* que presenta moderada actividad inhibitoria a la replicación del HIV-1 que es el retrovirus que causa el SIDA. López *et al.* (1995) encontraron en *L. glaucescens* dos flavanonas que pueden presentar actividad antitumoral, hormonal, y antimicrobiana. Estos estudios indican que los fenoles como lignanos y taninos pueden presentar actividad terapéutica. Los resultados obtenidos de esta investigación demuestran la presencia de lignanos y taninos en la hoja y la madera de *Litsea glaucescens*, que ofrecen una fuente natural de antioxidantes sugiriendo así la potencialidad de uso terapéutico.

CONCLUSIONES

Se detectó la presencia de los fenoles como lignina y taninos en la hoja y la madera (albura y duramen) de *Litsea glaucescens*.

En la hoja se localizó la lignina en el xilema, en las fibras perivasculares y en las fibras del limbo de la hoja y los taninos en floema, colénquima y parénquima en empalissada.

En la albura se localizó la lignina en los vasos, las fibras, parénquima axial y radial y los taninos solo en las células de parénquima.

En el duramen se localizó la lignina y los taninos en los vasos, las fibras, parénquima axial y radial.

El extracto de la hoja a 100°C presentó la mayor concentración de fenoles totales.

El extracto de la albura con metanol presentó la mayor actividad antioxidante con los dos métodos evaluados.

Los resultados sugieren que la hoja y la madera de *Litsea glaucescens* ofrecen una fuente natural de antioxidantes y tienen potencialidad de uso terapéutico

SUGERENCIA

Se requiere de la realización de estudios adicionales para la caracterización de los compuestos fenólicos y la actividad biológica de éstos para que puedan ser incluidos en formulaciones farmacéuticas.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, M. de L., C. De la Paz Pérez-O. y S. De la Paz Pérez-O. 2004. La flora del escudo nacional mexicano. *Polibotánica* 18: 53-73.
- 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. *In: Seminario Centroamericano y del Caribe sobre Agroforestería y Rumientes menores*. Costa Rica. Comisión Nacional para el desarrollo de la actividad caprina. 419 p.
- Avendaño, S. e I. Acosta. 2000. Plantas utilizadas como cercas vivas en el estado de Veracruz. *Madera y Bosques* 6(1): 55-71.
- Coy, E. y L. Cuca. 2007. Metabolitos con actividad biológica aislados de especies pertenecientes a la familia Lauraceae. *Scientia et Technica* 33: 363-364.
- Dávila, C. A., F. Flores, J. Morales, R. Clark y E. Molphe. 2009a. 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.
- Dávila, C. A., F. Flores, J. Morales y E. Molphe. 2009b. Embriogénesis somática del laurel *Litsea glaucescens* Kunth. III Simposio Nacional de ecología, manejo y conservación de los ecosistemas de montaña en México.
- Dudonné, S, X. Vitrac, P. Coutiéère, M. Woillez y J. Mérillon. 2009. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD and ORAC assays. *Journal Agricultural Food Chemistry* 57:1768-1774.
- García, M. A. 2007. Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales. Primer verano de introducción a la Investigación de la Universidad Autónoma de Querétaro. Fecha de consulta 25 de octubre del 2010. http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2007/56_1UAQGarcíaNava.
- Gutiérrez, D., C. Ortiz y A. Mendoza. 2008. Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas utilizadas para alimentación animal. Simposio de Metrología. Santiago de Querétaro, México.
- Halliwell, B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* 141:312–322.
- Heywood, V. H. 1985. Las plantas con flores. Barcelona. Reverté. 332 p.

- Huang, D., B. Ou y R. Prior. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 53: 1841-1856.
- INEGI. 2005. Marco geoestadístico municipal. Fecha de consulta 08 de marzo del 2011. <http://www.cuentame.inegi.org.mx>
- INEGI. 2010. Censo de población y vivienda. Quintana Roo. INEGI. Fecha de consulta 08 de marzo del 2011. <http://www3.inegi.org.mx>.
- Isaza, J. H. 2007. Taninos o polifenoles vegetales. *Scientia et Technica* 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.
- López, J., W. Barillas, J. Gómez, F. Lin, A. Al, M. Sharaf y P. Schiff. 1995. Flavonoids of *Litsea glaucescens*. Universidad de Costa Rica. *Planta Médica* 61: 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 se 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*, *Caryodaphnopsis*, *Machilus* y *Actinodaphne* (Lauraceae). *Duazary* 7(1): 152-170.
- Magalhaes, L., M. Segundo, S. Reis y J. Lima. 2008. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. *Analytical Chimica Acta* 613: 1-19.
- Miliauskas, G., P. Venskutonis y T. van Beek. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry* 85:231-237.
- Muñoz, O., M. Montes y T. Wilkomirsky. 2004. Plantas medicinales de uso en Chile. *Química y farmacología*. Santiago de Chile. Universitaria. 258 p.

- Ortiz, C. 2005. Obtención y comparación fisicoquímica a nivel laboratorio del aceite esencial de laurel de dos diferentes especies (*Litsea guatemalensis* Mez. y *Litsea glaucescens* Kunth) colectadas en tres diferentes lugares. Universidad de San Carlos de Guatemala. Tesis de licenciatura. 180 p.
- Ortuño, M. F. 2006. Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. España. Aiyana. 276 p.
- 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. 173 p.
- Ozgen M, Reese R. N., Jr. A. Z. Tulio, 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.
- Ramos, E., B. Castañeda y L. Ibáñez. 2008. Evaluación de la actividad antioxidante de plantas medicinales peruanas nativas e introducidas. *Revista de la Academia Peruana de Salud* 15(1): 42-46.
- Ray, E. 2008. Esau anatomía vegetal. Meristemas, células y tejidos de las plantas: su estructura, función y desarrollo. España. Omega. 614 p.
- Richter, H. G. y M. J. Dallwitz. 2000. Commercial timbers: descriptions, illustrations, identification and information retrieval. <http://delta-intkey.com/wood/index.htm>. Fecha de consulta 08/Septiembre/2010.
- 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.
- Rogel, M. de los A. 1982. Estudio anatómico de la madera de seis especies tropicales. Subsecretaría forestal. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales 70 p.
- Rosales, M., M. G. Reyes y J. A. Honorato. 2010. Polifenoles en extractos crudos y fraccionados de la corteza de *Acrocarpus fraxinifolius* y su actividad antioxidante. XVII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica, VI Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica y VII Jornadas Científicas de Biomedicina y Biotecnología Molecular. Guerrero, México.
- 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: 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. 129 p.
- Serrano, M. J. 2010. Evaluación de la actividad antioxidante para el aprovechamiento del muérdago que infesta la zona de chinampera de Xochimilco. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. 82 p.
- Singleton, V. L. y J. A. Rossi. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16: 144-158.
- Tortorelli, L. 1956. Maderas y Bosques Argentinos. ACME. Buenos Aires, Argentina. 910 p.
- Tucker, A. O., M. J. Maciarello y M. Hill. 1992. *Litsea glaucescens* Humb., Bonpl. et Kunth var. *glaucescens* (Lauraceae): a Mexican bay. *Economic Botany* 46(1): 21-24.
- UNAM. 2010. Atlas de las plantas de la medicina tradicional. Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana. *Litsea glaucescens*. Fecha de consulta 21 de septiembre del 2010. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/>.
- 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.
- Vásquez, Á., M. Cala, I. Miranda, G. Tafurt, J. Martínez y E. Stashenko. 2007. Actividad antioxidante y contenido total de fenoles de los extractos etanólicos de *Salvia aratocensis*, *Salvia sochensis*, *Bidens reptans* y *Montanoa ovalifolia*. *Scientia et Technica* 33: 205-207.
- Venero, J. R. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar* 31(2): 126-133.
- Vermerris, W. y R. Nicholson. 2008. Phenolic compound biochemistry. Springer. 267 p.

Anexo A

Se muestran las concentraciones de ácido gálico utilizadas para la elaboración de la curva estándar de fenoles totales en la hoja (Tabla A1) y la gráfica de la curva de ácido gálico (mg/mL) con respecto a la absorbencia a 765 nm, de la cual se obtuvo la ecuación de la recta para la determinación de fenoles totales en equivalentes a ácido gálico (Fig. A1).

Tabla A1. Concentraciones de ácido gálico para la curva estándar.

Ácido gálico [mg/mL]	Absorbencia (765nm)
0.625	0.067 ± 0.008
1.25	0.130 ± 0.006
2.5	0.244 ± 0.008
5	0.467 ± 0.010
10	0.857 ± 0.010

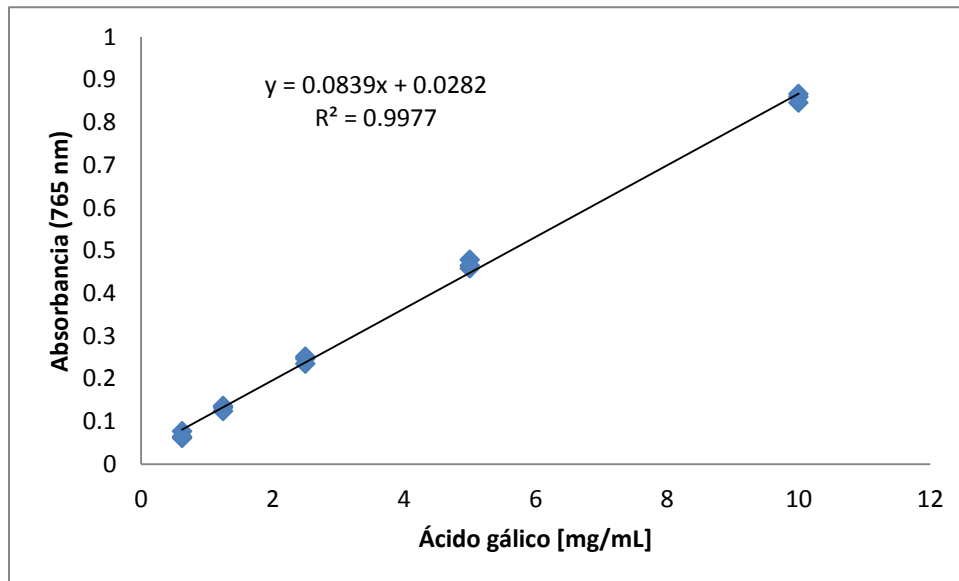


Figura A1. Curva estándar de ácido gálico.

Anexo B

Se muestran las concentraciones de ácido gálico utilizadas para la elaboración de la curva estándar de fenoles totales en la madera (Tabla B1) y la gráfica de la curva de ácido gálico (mg/mL) con respecto a la absorbancia a 765 nm, de la cual se obtuvo la ecuación de la recta para la determinación de fenoles totales en equivalentes a ácido gálico (Fig. B1).

Tabla B1. Concentraciones de ácido gálico para la curva estándar.

Ácido gálico [mg/mL]	Absorbancia (765nm)
0.625	0.053 ± 0.006
1.25	0.139 ± 0.004
2.5	0.214 ± 0.004
5	0.451 ± 0.025
10	0.792 ± 0.024

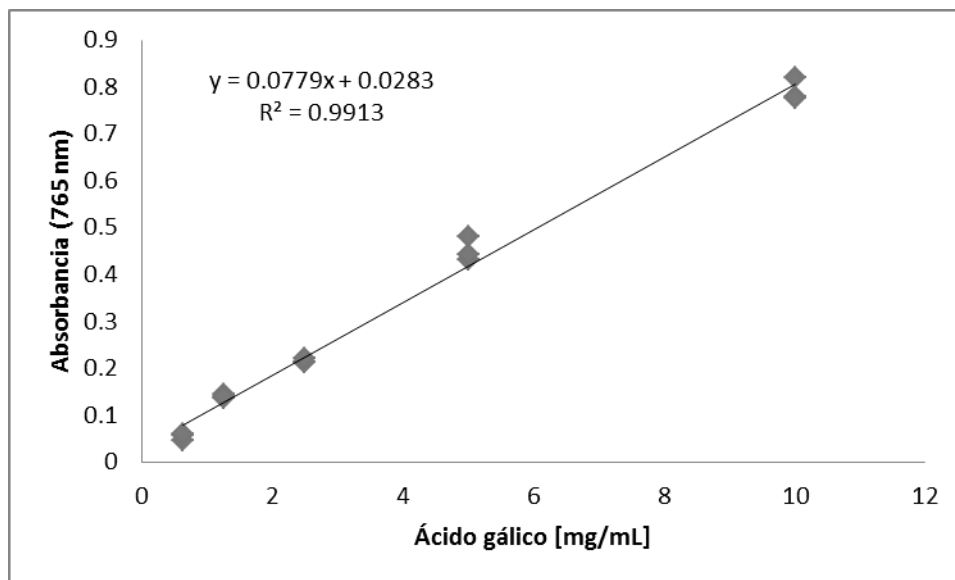


Figura B1. Curva estándar de ácido gálico.

Anexo C

Se muestran las concentraciones de trolox para determinar la reducción del radical DPPH' en sus equivalentes en la hoja, para realizar la curva estándar (Tabla C1) y la gráfica del comportamiento de la curva estándar y la ecuación de la recta (Fig. C1).

Tabla C1. Concentraciones de trolox para la curva estándar.

Trolox [μM]	Absorbancia (516 nm)
50	0.196 ± 1.538
100	0.310 ± 2.413
150	0.462 ± 0.725
200	0.575 ± 1.331
250	0.649 ± 2.523

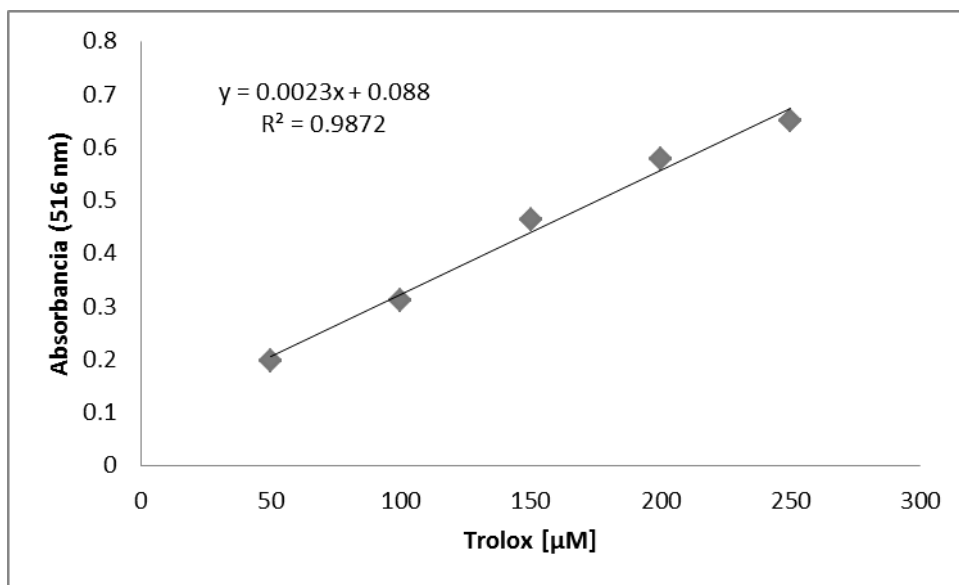


Figura C1. Comportamiento de la curva estándar.

Anexo D

Se muestran las concentraciones de trolox para determinar la reducción del radical DPPH[•] en sus equivalentes en la madera, para realizar la curva estándar (Tabla D1) y la gráfica del comportamiento de la curva estándar y la ecuación de la recta (Fig. D1).

Tabla D1. Concentraciones de trolox para la curva estándar.

Trolox [μM]	Absorbancia (516 nm)
50	0.118 ± 1.027
100	0.247 ± 1.132
150	0.398 ± 1.355
200	0.552 ± 0.293
250	0.682 ± 0.264

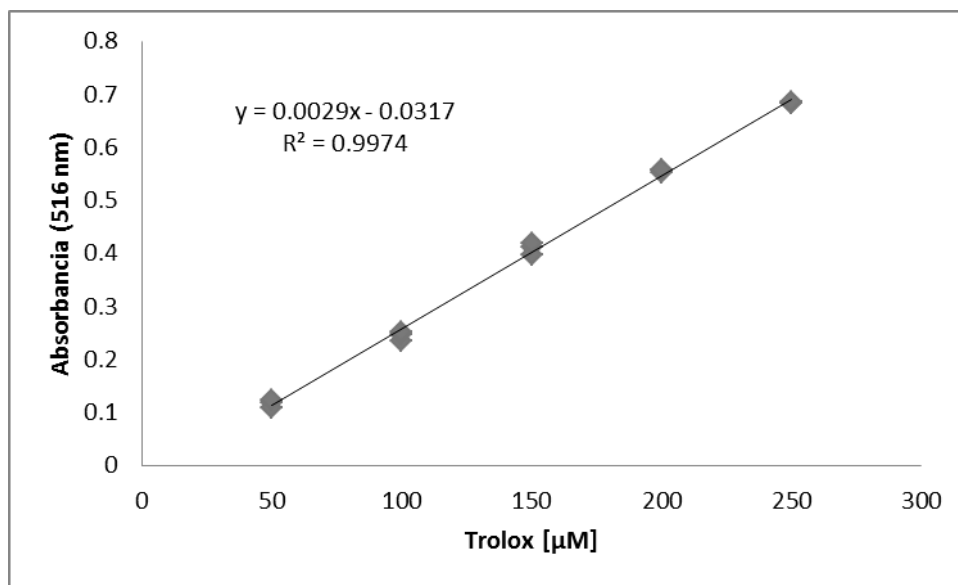


Figura D1. Comportamiento de la curva estándar

Anexo E

Se muestran las concentraciones de trolox para determinar la actividad antioxidante con el método ABTS* en sus equivalentes en la hoja, para realizar la curva estándar (Tabla E1) y la gráfica del comportamiento de la curva estándar y la ecuación de la recta (Fig. E1).

Tabla E1. Concentraciones de trolox para la curva estándar.

Trolox [μM]	Absorbancia (728 nm)
50	0.041 ± 0.223
100	0.146 ± 0.832
200	0.308 ± 1.280
300	0.471 ± 3.398
400	0.612 ± 4.019
500	0.757 ± 0.730

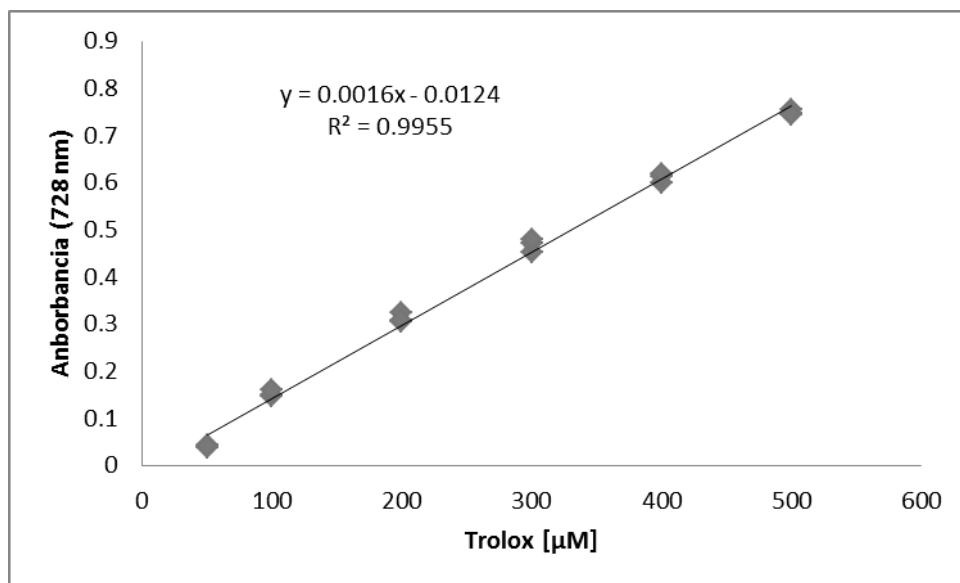


Figura E1. Comportamiento de la curva estándar.

Anexo F

Se muestran las concentraciones de trolox para determinar la actividad antioxidante con el método ABTS* en sus equivalentes en la hoja, para realizar la curva estándar (Tabla F1) y la gráfica del comportamiento de la curva estándar y la ecuación de la recta (Fig. F1).

Tabla F1. Concentraciones de trolox para la curva estándar.

Trolox [μ M]	Absorbancia (728 nm)
50	0.051 \pm 0.223
100	0.159 \pm 0.988
200	0.318 \pm 1.380
300	0.481 \pm 1.853
400	0.622 \pm 1.344
500	0.747 \pm 0.673

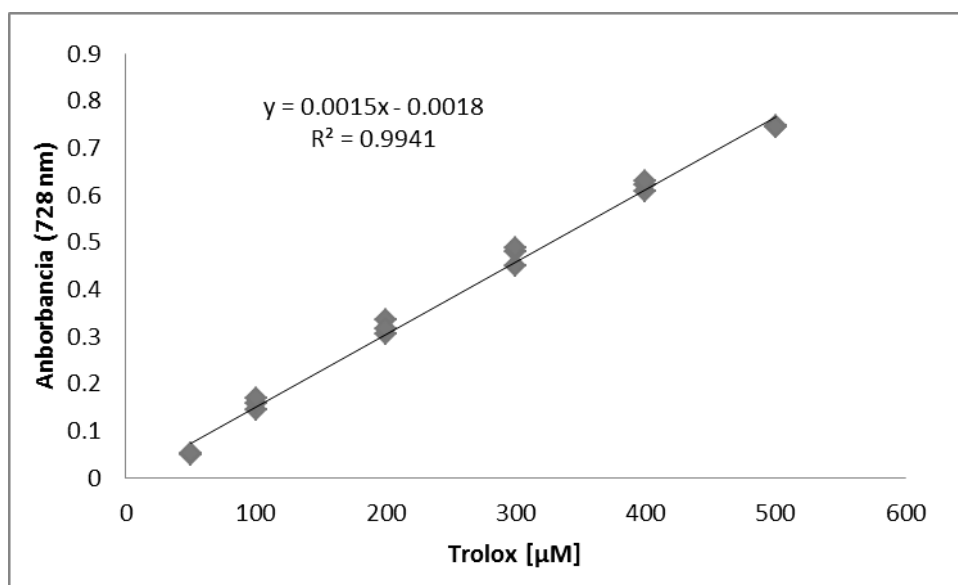


Figura F1. Comportamiento de la curva estándar.

Anexo G

Los resultados de este informe se presentaron en los siguientes eventos especializados:

- XXXIII Congreso Nacional de Histología. Histología del xilema de *Litsea glaucescens* (Lauraceae) de Quintana Roo. Cuernavaca, Morelos. Celebrado del 27 al 29 de octubre del 2010. Modalidad cartel, el cual recibió el premio a segundo lugar.
- XXXIV Congreso Nacional de Histología. Histoquímica de la hoja de *Litsea glaucescens* Kunth (Lauraceae). México, D. F. Celebrado del 26 al 28 de octubre del 2011. Modalidad oral.
- XXXIV Congreso Nacional de Histología. Histoquímica del xilema de *Litsea glaucescens* Kunth (Lauraceae). México, D. F. Celebrado del 26 al 28 de octubre del 2011. Modalidad cartel, el cual recibió el premio a segundo lugar.