

Actividad antioxidante, análisis fitoquímico y micrografía analítica de hojas de *Castela tweedii* (Simaroubaceae)

[Antioxidant activity, phytochemical analysis and micrographic characterization of *Castela tweedii* (Simaroubaceae) leaves]

María N. CAMPAGNA¹, María L. MARTINEZ¹, Adriana BROUSSALIS² & Martha GATTUSO¹.

¹Farmacobotánica, Facultad de Ciencias, Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Suipacha 531 – S2002LRK Rosario, Argentina.

²Farmacognosia, IQIMEFA (UBA-CONICET) Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
Contactos / Contacts: María N. CAMPAGNA - E-mail address: mcampagn@fbioyf.unr.edu.ar

Abstract

Castela tweedii is a small tree belonging to Simaroubaceae family. Infusions of its leaves are used in folk medicine to treat gastrointestinal disorders and diarrhea. In this work, we evaluated the antioxidant activity of ethanol and dichloromethane leaves extracts against DPPH radical (2,2-difenilpicrilhidrazil) in order to justify, at least in part, its popular use. Ethanol extract showed scavenging activity, with an $IC_{50}=0.1288$ mg/mL. Responsible compounds for these activity were tannins, flavonoids and phenylcarboxylic acids, among them we identified rutin and chlorogenic acid. Microscopic and histochemical analysis of leaves was carried out to develop useful characterizations that will allow a future identification and authentication of raw material: such as, the presence of mucilaginous hypodermis, leaf of dorsiventral structure, 1 to 2 rows of empalizada parenchyma with tannin deposits, anomocytic stomata in low epidermis and simple, unicellular trichomes in both epidermis.

Keywords: *Castela tweedii*; Simaroubaceae; antioxidant activity; histochemistry; micrography.

Resumen

Castela tweedii es un árbol de bajo porte perteneciente a la Familia Simaroubaceae, las infusiones de sus hojas son utilizadas en la medicina popular Argentina para el tratamiento de desordenes gastrointestinales y diarreas. Con el objetivo de fundamentar el uso popular de esta especie se evaluó la actividad antioxidante de los extractos etanólicos y diclorometánicos de forma cuantitativa y cualitativa frente al radical 2,2-difenilpicrilhidrazilo (DPPH); el extracto etanólico demostró actividad obteniéndose una $CI_{50}= 0,1288$ mg/mL. El análisis fitoquímico mostró que los compuestos responsables de esta actividad fueron taninos, flavonoides y ácidos fenilcarboxílicos, entre ellos se identificó rutina y ácido clorogénico. Además se realizó el estudio morfoanatómico e histoquímico de las hojas que aportó datos de valor diagnóstico para el control de calidad de la droga vegetal: presencia de una hipodermis mucilaginosa, estructura dorsiventral con una a dos hileras de parénquima en empalizada conteniendo taninos, estomas anomocíticos solo en la epidermis abaxial y tricomas simples unicelulares en ambas epidermis.

Palabras Claves: *Castela tweedii*, Simaroubaceae; actividad antioxidante; histoquímica; micrografía.

Recibido | Received: 9 de Marzo de 2012.

Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form: 20 de Abril de 2012.

Publicado en línea | Published online: 30 de Noviembre de 2012.

Este artículo puede ser citado como / This article must be cited as: María N. Campagna, María L. Martínez, Adriana Broussalis, Martha Gattuso. 2012. Actividad antioxidante, análisis fitoquímico y micrografía analítica de hojas de *Castela tweedii* (Simaroubaceae). *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat* 11(6): 498 – 509.

INTRODUCCIÓN

Castela tweedii Planch (Simaroubaceae) es un arbusto dioico de 1 a 3 metros de altura, perteneciente a la familia de las Simaroubaceae. Esta familia, desde el punto de vista anatómico, se caracteriza por la polifilia existente entre las especies que la componen (Fernando y Quin, 1992; Fernando *et al.*, 1995). El género *Castela* es neotropical y comprende 12 especies americanas, con la presencia de dos especies en Argentina: *C. tweedii* y *C. coccinea* (Xifreda y Seo, 2006). *Castela tweedii* es conocida vulgarmente como “granadilla” o “molle single”. Crece en la Argentina en las Provincias Biogeográficas Paranaense, del Espinal y Pampeana, extendiéndose hasta el sur de Brasil, centro occidental de Paraguay y Uruguay (Xifreda y Seo, 2006). Este arbusto de corteza rugosa, cinérea y longitudinalmente estriada, posee hojas simples, elípticas, de base obtusa o aguda y ápice agudo, de borde entero a dentado en la mitad apical, cortamente pecioladas. Espinas axilares, pubérulas a glabras. Flores en fascículos axilares, pediceladas, pedicelos rodeados en la base por un involucre de brácteas y bractéolas escariosas. Cáliz de 4 sépalos casi libres, triangulares, pubérulos y rojizos. Pétalos rojizos-amarillentos, elípticos. Estambres de filamentos engrosados hacia la base, pilosos. Gineceo sobre un disco glabro. Fruto de 1 a 4 mericarpos drupáceos, subovoides, rojizos, violáceos a negros, 6-7 mm de longitud por 5-6 mm de latitud. Florece en primavera. (Burkart y Bacigalupo, 2005). En la medicina popular Argentina la infusión de las hojas de *C. tweedii* es utilizada contra “dolores de vientre,” diarreas sanguinolentas (Martinez Crovetto, 1981) y otros desórdenes gastrointestinales. Existen referencias históricas al uso medicinal de esta especie (Dominguez, 1939): Bonpland en 1850, recomienda al Gral. Urquiza, el uso de la corteza, hojas y raíz de la granadilla contra la disentería, diarreas y fiebres intermitentes. También la reconoce como tónico gástrico.

Se encuentra ampliamente documentado el hecho de que el estrés oxidativo provocado por un desbalance de radicales libres y/o especies reactivas del oxígeno, puede provocar daños a diversos órganos, jugando un rol preponderante en la patogénesis de diversos padecimientos clínicos (Cross *et al.*, 1987; Halliwell y Gutteridge, 1988; Halliwell *et al.*, 1992), incluyendo enfermedades cardiovasculares (McCord, 1985; Jeroudi *et al.*, 1994), del hígado (Comporti, 1985), pulmones (Ryrfeldt *et al.*, 1993), desórdenes neurológicos (Adams y Odunze, 1991) diabetes

(Oberley, 1998) y desórdenes gastrointestinales (Otamiri y Sjødahl, 1991; Simmonds y Rampton, 1993; Das y Banerjee, 1993). Los radicales libres de oxígeno están involucrados en la patogénesis de lesiones isquémicas en la mucosa del intestino, por lo tanto los compuestos antioxidantes juegan un rol preponderante en el tratamiento de las lesiones intestinales generadas por isquemias. (Sasaki y Joh, 2007). Se ha demostrado que la administración de depuradores de radicales libres previene daños a la mucosa intestinal (Oh *et al.*, 2001), lo que sugiere que el uso tradicional de las infusiones de *C. tweedii* podría estar asociado con sus propiedades antioxidantes. Existe escasa información publicada sobre la actividad biológica de los extractos de *Castela tweedii*, en cambio, se encuentra reportada actividad antioxidante para otra especie del mismo género que comparte su hábitat: *Castela coccinea* (Campagna *et al.*, 2011). Con estos antecedentes, creemos que es importante evaluar la actividad antioxidante de esta especie que permita avalar, en parte, su uso popular, y conocer la naturaleza de los compuestos responsables de dicha actividad. No existen, hasta el momento, estudios fitoquímicos sobre *C. tweedii*. La mayor parte de los estudios existentes se han centrado principalmente en la determinación de la presencia de compuestos amargos denominados cuasinoides en distintas especies del género, como ser *C. peninsularis*, *C. poliandra* (Grieco *et al.*, 1994; Grieco *et al.*, 1995; Grieco *et al.*, 1999), *C. texana* (Dou *et al.*, 1996) y *C. tortuosa* (Kubo *et al.*, 1992; Kubo *et al.*, 1993). Además, creemos importante realizar un estudio morfoanatómico e histoquímico que aporte caracteres que permitan la correcta identificación y autenticación de esta especie. Es de destacar que son escasas las especies vegetales nativas de Argentina y aún de Latinoamérica, que han sido estudiadas desde este punto de vista morfoanatómico e histoquímico y faltan de ellas estudios micrográficos, requisito indispensable para las Farmacopeas herbarias de todo el mundo, que permitan un correcto control de calidad de la droga vegetal.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal

Se examinó material fresco y de los herbarios BAA, MCNS, SF, SI Y UNR, los que son citados conforme a las siglas respectivas (Holmgren *et al.*, 1990):

Material recolectado y estudiado

Argentina. *Prov. Corrientes: Dpto. Curuzú Cuatiá*, (29° 21' 76" S 58° 37' 23,38" O) 68 m s.n.m. 24-XI-07. Oakley, Giacoboni y De Felipe 55 (UNR). *Prov. Santa Fe: Dpto San Jerónimo*, Loc. Pto Gaboto, Monte Histórico, (32° 25' 55,31" S 60° 48' 28" O) 11 m s.n.m.) 09-V-10. Gattuso, S. 2016 (UNR).

Material de Herbario de Referencia

ARGENTINA. *Prov. Misiones: Dpto. Iguazú*, Loc. El Dorado, 1-VIII-51 Montes 15413 (MO); Santa Ana, Rodríguez 514 s/f (SI); *Dpto. Candelaria*, Loreto, 31-VIII-44 Montes 249 (SI). *Prov. Chaco: Dpto. 1 de Mayo*, arroyo Iné ruta nacional 11, 15-VIII-67, Krapovickas 13027 (SI); *Prov. Entre Ríos: La Paz*, Paso Yunque, río Guayquiraró, 7-XI-73, Burkart et al 29950. (SI); *Dpto. Uruguay*, Loc. Concepción del Uruguay, arroyo La China, 25-IX-61, Burkart 22616. (SI); *Dpto. Uruguay*, Loc. Concepción del Uruguay, arroyo El Curro, 19-X-49. Burkart 91534 (SI); *Dpto. Villaguay*, Loc. Villaguay, 13-X-62, Chiarelli s/n° 91534 (BAB); Paraná, 16-II-80, Jozami y Muñóz 584 (SI); Paraná, Paracao, 31/X/62, Burkart 23705 (SI); Santa Fe: *Dpto San Lorenzo*, Monte Histórico, 27-IX-76, Lewis 1430 (UNR); *Dpto San Jerónimo*, Loc. Pto Gaboto, 26-VIII-82, Fernández Jorge 6164 (UNR);

Obtención de los extractos

10 g de hojas secas y molidas fueron extraídas por maceración con diclorometano (DCM) 3 veces sucesivas durante 24 h cada uno a temperatura ambiente. Los extractos fueron reunidos y concentrados a presión reducida obteniéndose: 2,0 g de extracto DCM seco de hoja. Otros 10 g de hojas secas y molidas fueron extraídas por maceración con etanol (ETOH) 3 veces sucesivas durante 24 h cada uno a temperatura ambiente. Los extractos fueron reunidos y concentrados a presión reducida obteniéndose 2,0 g de extracto ETOH seco de hoja (Martinez et al., 2009). Todos los extractos luego se re-suspendieron en los respectivos solventes para los ensayos fitoquímicos, o en etanol para los ensayos de actividad antioxidante.

Actividad depuradora del radical libre DPPH

Análisis cuantitativo

Para la determinación de la actividad antioxidante de los extractos diclorometánicos y etanólicos se utilizó el reactivo 2,2-difenilpicrilhidrazilo (DPPH) (PM = 394.33) (Sigma Aldrich Chemicals Company, EEUU) preparado en solución alcohólica con etanol calidad pro-análisis. El experimento se realizó de acuerdo al método de Blois (Blois, 1958) levemente modificado

(Molyneux, 2004; Argolo et al., 2004). Una alícuota de cada extracto (20 µL) se diluye en etanol (con concentraciones de los extractos que van desde 0.01 a 0.2 mg/mL) y se agrega una solución etanólica 90 mM del radical DPPH, llevando a un volumen final de 1 mL. Se midió la disminución de la absorbancia a 515 nm, cada 1 minuto, hasta los 20 min., ya que durante este tiempo el radical es estable. Los valores de absorbancia se obtuvieron en un espectrofotómetro BioChrom DC1, con cubetas plásticas de 1,5 mL y paso óptico de 0,5 cm. Se utilizó Acido Ascórbico como control positivo (0,05 mg/mL) y la solución de DPPH sólo con etanol como control negativo. Se calculó el porcentaje de depuración, según la siguiente ecuación:

$$\% \text{Depuración} = (\text{Abs}_{\text{CN}} - \text{Abs}_{\text{M}}) / \text{Abs}_{\text{CN}} \times 100$$

Donde:

CN: Control Negativo

M: Muestra

Se obtuvo también la Concentración Inhibitoria (CI₅₀): cantidad de antioxidante necesaria para disminuir en un 50% la concentración inicial del radical DPPH; de cada extracto por extrapolación de una regresión lineal.

Análisis cualitativo

Se realizó por cromatografía en capa delgada (CCD). Se utilizaron distintos sistemas cromatográficos: (Wagner y Bladt, 2001; Martinez et al., 2009):

Sistema cromatográfico I: Fase estacionaria (FE): Sílica gel 60 (*Silica gel 60 F₂₅₄ Merck Labs., Alemania*) Fase móvil (FM): acetato de etilo/ácido acético/ácido fórmico/agua (10: 1,1: 1,1: 2,6).

Sistema cromatográfico II: FE: Sílica gel 60F; FM: cloroformo/ácido acético/metanol/agua (60: 32: 12: 8).

Sistema cromatográfico III: FE: placa de celulosa MN 300 UV₂₅₄ (Polygram); FM: ácido acético 15%.

Se sembró 15 µL de cada uno de los extractos y se reveló la placa con una solución etanólica del radical DPPH (200µM) (Argolo et al., 2004). Los compuestos con capacidad antioxidante se observan como bandas amarillas (forma reducida del radical DPPH) sobre un fondo púrpura.

Análisis Fitoquímico

Cromatografía en capa delgada

Para determinar la naturaleza química de los compuestos antioxidantes se realizaron duplicados de las placas analizadas con DPPH que se revelaron con diferentes reactivos: Reactivo de productos naturales (RPN), solución de FeCl₃ al 10%. Se utilizaron distintos sistemas cromatográficos (Wagner y Blatt, 2001; Martínez *et al.*, 2009):

Sistema cromatográfico I: FE: Sílica gel 60 F 254 (Merck); FM: acetato de etilo/ácido acético/ácido fórmico/agua (10: 1,1: 1,1: 2,6); revelador: Reactivo de Productos Naturales (2-aminoetil difenilborinato, Fluka).

Sistema cromatográfico II: FE: Sílica gel 60F; FM: cloroformo/ácido acético/metanol/agua (60: 32: 12: 8); Reveladores: Reactivo de Natural Products y solución de FeCl₃ al 10%.

Sistema cromatográfico III: FE: placa de celulosa MN 300 UV₂₅₄ (Polygram); FM: ácido acético 15%; revelador: reactivo de Natural Products.

Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAE)

El análisis de compuestos polifenólicos por CLAE se realizó en un equipo Varian 9012 con un detector UV – visible Varian 9050 y un detector con arreglo de fotodiodos Varian Polycrom 9065. La detección UV se realizó a 325 nm. Se utilizó una columna RP18 Gemini 5 μ (150 nm x 4.6 nm di). Se empleó una fase móvil (FM) binaria compuesta por los solventes A: H₂O-AcOH (98:2) y B: MeOH-AcOH (98:2). El volumen de inyección fue de 20 μL y el flujo de 1.3 mL/ min. Para la preparación de las fases móviles se emplearon solventes Sintorgan grado HPLC. Las soluciones del extracto y los patrones se inyectaron a través de filtros Millipore SJHVO 13NS, 13 nm de diámetro.

Para el análisis de los compuestos polifenólicos por CLAE se utilizaron sustancias patrón Sigma de rutina y Carl Roth de ácido clorogénico.

Análisis Morfoanatómico

Se utilizó material fresco, fijado en FAA (álcohol etílico 70°, Acido Acético glacial, Formaldehído y Agua 50:5:30:15). Las hojas se cortaron transversalmente con micrótopo tipo Minot, previa inclusión en parafina (Gattuso y Gattuso, 2002) para el análisis de la epidermis las láminas foliares se diafanizaron según la técnica de Strittmatter (Strittmatter, 1973). Se coloreó con Safranina Fast-

Green (Strittmatter, 1979) y Violeta de Cresilo (Strittmatter, 1980).

Las fotomicrografías fueron obtenidas con microscopio Carl Zeiss Axiolab y equipo fotográfico MC80. Los detalles de la epidermis en superficie fueron observados con microscopio electrónico de barrido (MEB) Leitz AMR 1000; las muestras fueron fijadas en glutaraldehído al 4%, deshidratadas en alcoholes ascendentes y metalizadas con oro paladio (O'Brien y Mc Cully, 1981).

Análisis Histoquímico

Secciones transversales de las hojas, previa inclusión en parafina fueron coloreadas con Violeta de Cresilo para la detección de mucilagos (Strittmatter, 1980).

Se utilizaron cortes transversales de material fresco, tratados con solución acuosa al 10% de FeCl₃ o con Rvo. de Lugol para la detección de taninos y depósitos de almidón respectivamente (WHO, 1998; WHO, 2011; D'Ambrogio de Argueso, 1986).

Los cristales de oxalato de calcio fueron observados bajo luz polarizada (AHP, 2011).

RESULTADOS**Actividad antioxidante****Análisis cuantitativo**

La capacidad depuradora de DPPH fue evaluada para los extractos etanólico y diclorometanico. Ambos extractos mostraron actividad de manera dosis-dependiente (Figura 1B).

El comportamiento cinético de los extractos se observa en la Figura 1A donde se grafica el porcentaje de DPPH consumido a distintos tiempos: cada un minuto hasta los 20 min., tiempo durante el cual el radical DPPH permanece estable, para una concentración final de extracto de 0,1mg/mL. El extracto etanólico alcanza el estado estacionario después de los 15 min. de reacción, obteniéndose un porcentaje de depuración de DPPH alto: 73%. Por el contrario, el extracto diclorometánico reacciona de forma más rápida frente al radical, alcanzando el estado estacionario a los 5 min. de reacción pero con un porcentaje de depuración bajo: 38% (Figura 1A). La CI₅₀ fue calculada graficando el porcentaje de depuración de DPPH en función de distintas concentraciones de extracto (Figuras 1B). Los valores de CI₅₀ y el porcentaje de depuración de DPPH son considerados buenos parámetros para medir la eficacia antioxidante de compuestos puros y extractos (Argolo *et al.*, 2004). La CI₅₀ del extracto diclorometánico resulto ser muy alta: 0.5217 mg/mL, en comparación con la obtenida para el extracto etanólico: 0.1288

mg/mL. Para el control positivo se calculó una $CI_{50} = 2.9 \mu\text{g/mL}$. Por lo tanto, el extracto etanólico posee una actividad antioxidante significativa, mientras que

el diclorometánico constituye una fuente pobre de compuestos con actividad antioxidante.

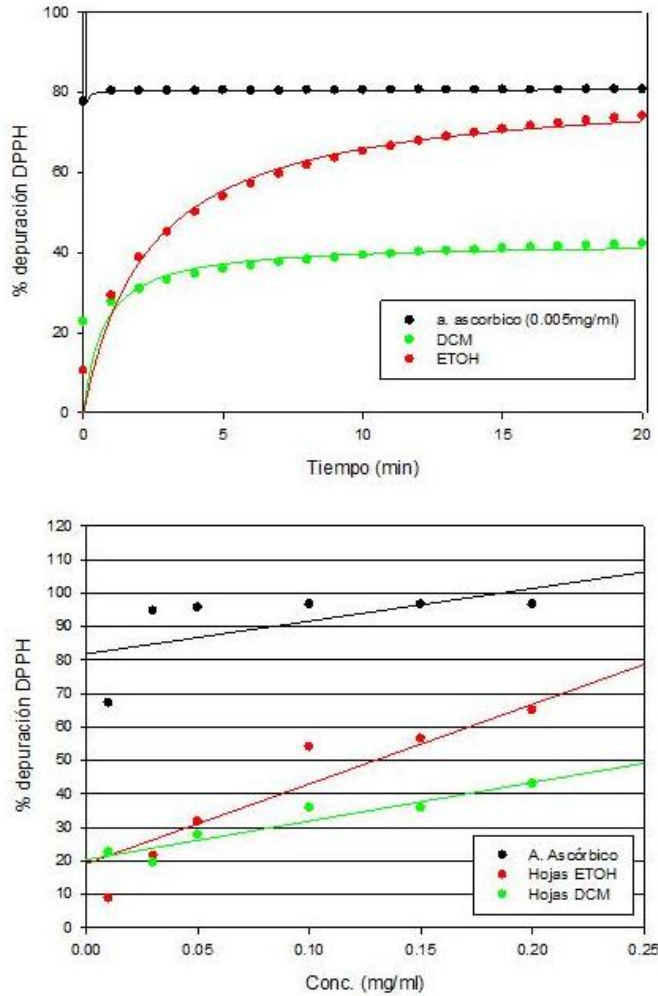


Figura 1

Análisis cuantitativo de la actividad oxidante, determinada por espectrofotometría a 515nm por reacción con solución metanólica de DPPH. A (arriba): porcentaje de depuración del radical DPPH a distintos tiempos de incubación. Concentración de los extractos: 0,1mg/mL. **B (abajo):** porcentaje de depuración del radical DPPH a distintas concentraciones de extractos a los 5 min de ensayo.

Análisis cualitativo

Se evaluó la capacidad depuradora del radical libre DPPH del extracto etanólico, que fue el que presentó mayor actividad antioxidante. Para el análisis, se utilizó CCD. Los compuestos con capacidad antioxidante revelan como bandas amarillas sobre un fondo púrpura, dependiendo su intensidad de la cantidad y naturaleza del compuesto antioxidante (Argolo et al., 2004) La elución del extracto etanólico, en el Sistema Cromatográfico I, reveló la presencia de

4 bandas con actividad depuradora del radical DPPH (Figura 2B). Dichas bandas corresponden a compuestos de naturaleza polifenólica, pudiendo ser estos flavonoides y ácidos fenilcarboxílicos. Entre ellos se observa la presencia de una banda que coincide en Rf y color con el marcador rutina, y otra banda con Rf = 0.62 y coloración azul/verdosa coincidente con el marcador ácido clorogénico (Figura 2A).

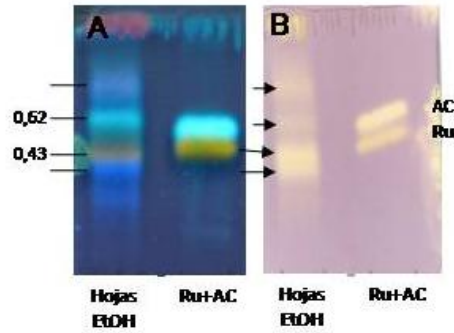


Figura 2

Análisis cualitativo de la actividad antioxidante utilizando CCD y solución etanólica de DPPH. Sistema Cromatográfico I, FM: Acetato de etilo/Ac. Acético/Ac. Fórmico/H₂O (10:1,1:1,1:2,6) **A**, revelado con Rvo. de Natural Products, observación con luz UV 365nm; **B**: revelado con solución metanólica 0,4M de DPPH. **Ru**: rutina, **AC**: ácido clorogénico.

En el Sistema Cromatográfico II se observan 5 bandas que revelan con DPPH (Figura 3B). Las bandas con $R_f = 0.31$, 0.16 y 0.10 corresponden a compuestos que revelan con $FeCl_3$, pudiendo ser estos taninos y ácidos fenilcarboxílicos (Figura 3C). Las bandas con actividad antioxidante de $R_f = 0.38$ y

mayores revelan con NP y corresponden a flavonoides y ácidos fenólicos, se repite la presencia de una banda, de $R_f = 0.43$, que coincide con la rutina, y otra de $R_f = 0.38$ que corresponde al ácido clorogénico (Figura 3A).

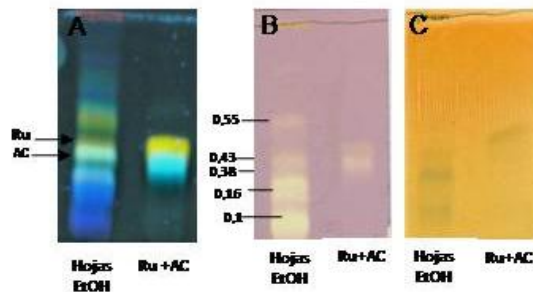


Figura 3

Análisis cualitativo de la actividad antioxidante utilizando CCD y solución etanólica de DPPH. Sistema cromatográfico II: FM: Cloroformo/Ac. Acético/ metanol/ H₂O (60:32:12:8). **A**: revelado con Rvo. Natural Products, observación con luz UV 365nm, **B**: revelado con solución metanólica 0,4M de DPPH, **C**: revelado con solución al 10% de $FeCl_3$. **Ru**: rutina, **AC**: ácido clorogénico.

En el Sistema Cromatográfico III las bandas con actividad antioxidante también se corresponden con flavonoides y ácidos fenilcarboxílicos (Figura 4A, B). Nuevamente se verifica, en este sistema, una banda de $R_f = 0.52$ y color naranja al revelar con NP correspondiente a la rutina, y la banda de $R_f = 0.72$ y color azul/verdoso correspondiente al ácido clorogénico.

Asimismo el análisis cromatográfico por CLAE del extracto etanólico de hojas permitió confirmar la presencia del glicósido flavonoide rutina (tiempo de retención (t_r) aproximado: 31 min.) y el ácido clorogénico (t_r aproximado: 11.6 min.), por comparación de sus tiempos de retención y de sus espectros UV con las respectivas sustancias testigo comerciales.

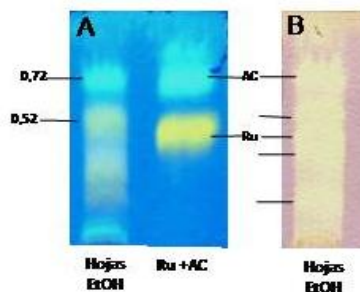


Figura 4

Análisis cualitativo de la actividad antioxidante utilizando CCD y solución metanólica de DPPH. Sistema Cromatográfico III: placa de celulosa, FM: ácido acético al 15%. **A:** revelado con Rvo. de Naturals Products, observación con luz UV 365nm. **B:** revelado con solución metanólica 0,4M de DPPH. **Ru:** rutina, **AC:** ácido clorogénico.

Descripción Macroscópica

Las hojas de *C. tweedii* son simples, de 3 a 4 x 1,5 a 2.5 cm, cartáceas a subcoriáceas, cortamente

pecioladas, oblongo a elípticas de borde entero a dentado en la mitad apical (Figura 5A; Figura 6A). Se ubican en las axilas de las espinas.

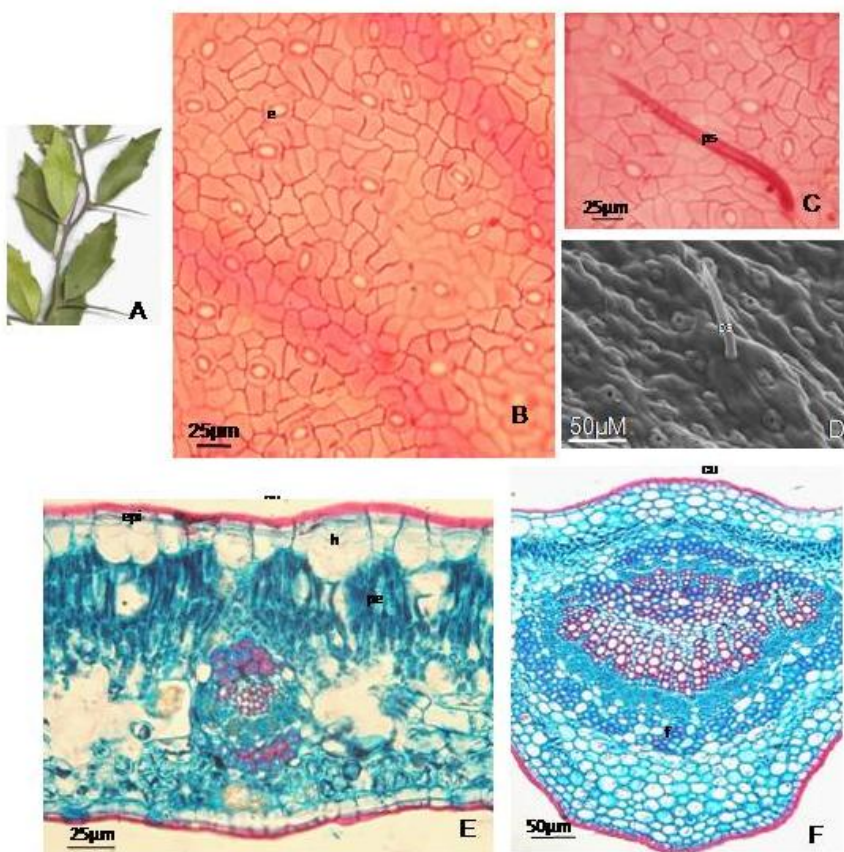


Figura 5

Castela tweedii P., fotomicrografías de hoja: **A:** detalle de rama con hojas y espinas; **B-D:** vista superficial de la epidermis abaxial, **B-C:** observación con MO, coloración con Safranina. **D:** observación con MEB, **E-F:** sección transversal del limbo, observación con MO, coloración con Safranina-Fast green. **E:** semilimbo, **F:** nervio medio, **e:** estoma, **ps:** pelo simple, **cu:** cutícula, **epi:** epidermis, **h:** hipodermis, **pe:** parénquima en empalizada, **f:** fibras.

Descripción Microscópica**Lámina en vista superficial**

La epidermis adaxial posee una cutícula gruesa y lisa. Las células son poligonales de paredes anticlinales rectas, y elongadas sobre los nervios. No se observan estomas. Presenta pelos simples, unicelulares de paredes engrosadas, que se ubican con mayor densidad sobre las nervaduras (Figura 6B).

La epidermis abaxial presenta cutícula gruesa y lisa. Las células son poligonales de menor tamaño que las de la epidermis adaxial, con paredes anticlinales levemente sinuosas. Presenta estomas del tipo anomocítico y pelos simples de iguales características que los de la epidermis adaxial (Figuras 5B, C y D; Figura 6B).

Lámina en corte transversal

La epidermis adaxial es uniestratificada con cutícula gruesa y lisa. Existe una hipodermis muy desarrollada, por sectores biestratificada (Figura 5E; Figura 6E).

La hoja es hipoestomática. El mesófilo es de estructura dorsiventral, con una a dos hileras de parénquima en empalizada (Figura 5E). El parénquima esponjoso es laxo y contiene drusas y cristales solitarios de oxalato de calcio de gran tamaño (Figura 6C). En posición subepidérmica, reforzando el haz central y los bordes de la lámina se observa colénquima del tipo laminar. El nervio medio está formado por 8 a 10 haces colaterales abiertos dispuestos en forma de arco y reforzados por una vaina conspicua de fibras blandas (Figura 5F; Figura 6D). Los haces de nervios menores se hallan rodeados de una vaina parenquimática.

La epidermis abaxial es uniestratificada, con cutícula gruesa y lisa (Figura 5E).

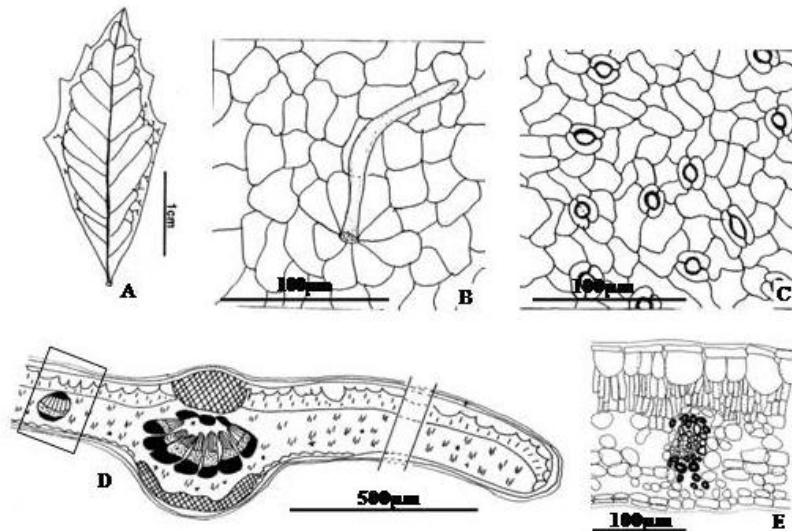


Figura 6

Castella tweedii P., representaciones esquemáticas de hoja: **A:** morfología foliar; **B-C:** vista superficial, **B:** epidermis adaxial; **C:** epidermis abaxial; **D:** representación esquemática sección transversal del folíolo, **E:** detalle de lo indicado en **D**.

Análisis Histoquímico

En corte transversal de la hoja se observa una hipodermis muy desarrollada conteniendo mucílagos, estos se evidencian al teñir el material con Violeta de Cresilo (Figura 7A, B)

La tinción con FeCl_3 al 10% revela la presencia de taninos en las células parenquimáticas, principalmente en el parénquima en empalizada (Figura 7D).

En el mesófilo se observan abundante Idioblastos cristalíferos conteniendo drusas de oxalato de calcio (Figura 7C).

DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluó la actividad depuradora de los extractos etanólicos y diclorometánicos de hojas de *Castela tweedii*. Los dos extractos mostraron actividad depuradora de forma dependiente de la concentración, siendo el extracto etanólico el más activo, con un valor de $CI_{50} = 0,1288$ mg/mL y un porcentaje de inhibición del DPPH del 73%. El valor de CI_{50} obtenido para el extracto DCM fue alto (0.5217 mg/ml), por lo tanto el poder depurador de este extracto es bajo, siendo el extracto diclorometánico una fuente pobre de compuestos antioxidantes. El uso del parámetro CI_{50} para inferir actividad antioxidante sin el análisis de la reacción cinética, puede llevar a interpretaciones parciales o insuficientes del tema (Roginsky y Lissi,

2005). El estudio de la cinética en el presente trabajo (Figura 1A) demuestra que el extracto etanólico alcanza el estado estacionario después de los 15 min. de reacción, mientras que el diclorometánico lo hace antes, sin embargo, el extracto etanólico posee mayor capacidad de depuración. Este comportamiento está relacionado con la naturaleza y concentración de los compuestos antioxidantes presentes en los extractos (Sanchez-Moreno *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 2002). El análisis cualitativo, para poder inferir cual es la naturaleza de los compuestos responsables de la actividad, se realizó con el extracto etanólico. Los compuestos activos fueron taninos, flavonoides y ácidos fenilcarboxílicos. Entre los compuestos responsables de la actividad antioxidante, se verificó, por cromatografía en capa delgada y cromatografía líquida de alta eficiencia, la presencia de rutina y ácido clorogénico.

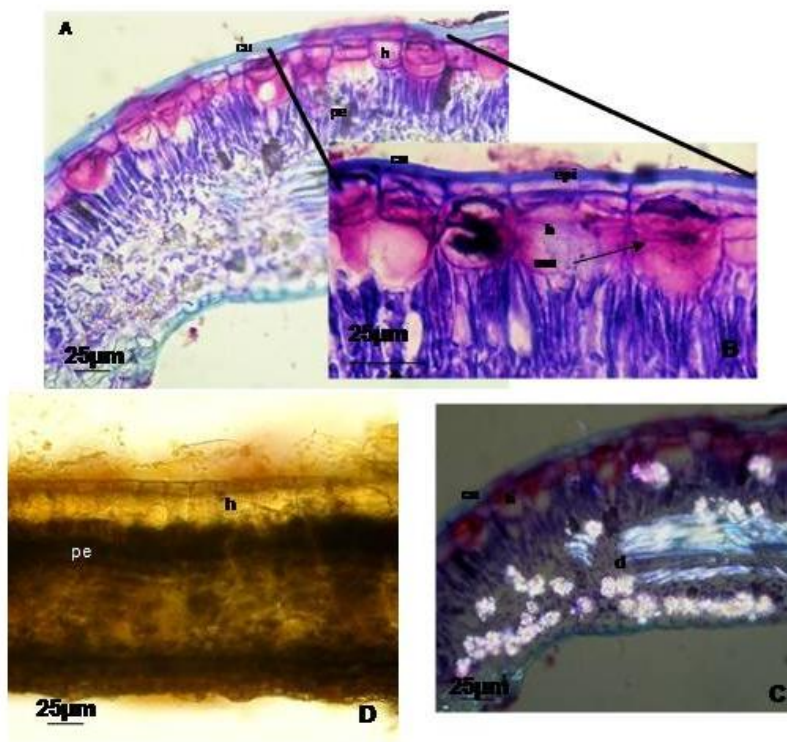


Figura 7

Castela tweedii P., análisis histoquímico de hoja: **A-D**: sección transversal de hoja, observación con MO. **A-B**: tinción con violeta de cresilo, **A**: mesófilo; **B**: detalle de la hipodermis conteniendo mucílagos, **C**: observación de cristales de oxalato de calcio con luz polarizada, **D**: distribución de los depósitos de taninos, **cu**: cutícula, **epi**: epidermis, **h**: hipodermis, **pe**: parénquima en empalizada, **mu**: mucílagos, **d**: drusas.

No existen publicaciones previas sobre actividad biológica de *Castella tweedii*, sin embargo, si lo hay sobre la actividad antioxidante de extractos de *Castella coccinea* (Campagna et al., 2011), especie del mismo género nativa de Argentina. En el citado trabajo, se evalúa la capacidad antioxidante de extractos etanólicos y diclorometánicos *in vitro*, frente al radical DPPH; para *C. coccinea*, al igual que para *C. tweedii*, todos los extractos muestran actividad dosis-dependiente, siendo también, el extracto etanólico de hojas el más activo. Para *C. coccinea* la capacidad antioxidante ($CI_{50} = 0.015$ mg/ml) es atribuida a los flavonoides presentes en el extracto, aunque no se pudo identificar de cual o cuales se trata. En el presente trabajo, la actividad depuradora de radicales libres del extracto etanólico de *C. tweedii*, también fue atribuida a flavonoides y ácidos fenólicos, identificándose entre ellos a la rutina y al ácido clorogénico. Este es el primer trabajo donde se reporta la presencia de estos compuestos en extractos de *C. tweedii*, dichos compuestos podrían ser utilizados como marcadores químicos de los extractos de hoja de *C. tweedii* para el control de calidad de la planta. La rutina, además de ser un potente depurador de los radicales hidroxilo y superóxido (Bonbardelli y Marazzoni, 1993), presenta un efecto gastro-protector relacionado con sus propiedades antioxidantes, más aún, se sugiere que este flavonoide debería utilizarse en tratamientos clínicos de desórdenes gástricos (La Casa et al., 2000). Los flavonoides en general, son conocidos por sus propiedades depuradoras del oxígeno *in vivo* e *in vitro*. De esta manera, la rutina y el ácido clorogénico contribuyen a la actividad antioxidante determinada en *C. tweedii*. Asimismo, muchos autores coinciden en afirmar que además contribuyen en la prevención de lesiones gástricas inducidas por diversos factores (Alarcón de la Lastra et al., 1993).

Mediante distintas pruebas histoquímicas se pudo determinar la presencia de mucílagos en la hipodermis de la hoja y depósito de taninos en el parénquima, fundamentalmente en el parénquima en empalizada. La presencia de taninos en las hojas también fue confirmada por cromatografía en capa delgada. Se demostró que los taninos son, en parte, los responsables de la actividad antioxidante del extracto etanólico. La acción farmacológica de los taninos deriva de sus propiedades astringentes, por vía interna ejercen un efecto antidiarreico y antiséptico, por lo tanto el efecto medicinal atribuido a las infusiones de hojas de *C. tweedii* podría deberse a la gran

cantidad de taninos presentes en sus hojas. Por otra parte, los mucílagos, también presentes en las hojas como se demostró en las pruebas histoquímicas realizadas, poseen diversos usos farmacológicos, tanto los taninos como los mucílagos poseen efecto benéfico demostrado sobre úlceras, inflamaciones e irritaciones intestinales, diarreas y disentería.

El estudio de la actividad biológica y el análisis fitoquímico de *C. tweedii* se completó con una caracterización micrográfica de la droga vegetal que permitirá una correcta identificación y autenticación del material. En la bibliografía consultada, las obras clásicas sobre la anatomía de los órganos vegetativos de las Dicotiledoneas (Solereeder, 1908; Metcalfe y Chalk, 1972), no se hallaron datos de la especie aquí estudiada, si se menciona el género *Castella*. Hasta ahora, no existían trabajos que aportaran datos morfoanatómicos de *Castella tweedii* que faciliten su identificación, solo existe una completa descripción de *Castella coccinea* (Cortadi et al., 2009). Durante el presente trabajo se obtuvieron caracteres de valor diagnóstico que permitieran la identificación de *C. tweedii*: las hojas simples, cortamente pecioladas y de textura cartácea a subcoreacea, con bordes dentados en la mitad apical. El mesófilo es de estructura dorsiventral, hecho que la diferencia de *C. coccinea* que presenta el mesófilo de estructura céntrica (Cortadi et al., 2009). La presencia de una hipodermis mucilaginoso muy desarrollada, numerosas drusas de oxalato de calcio de gran tamaño, epidermis simples con estomas anomocíticos solo en la epidermis inferior y pelos simples unicelulares en ambas epidermis, acordando con lo señalado por Solereeder (1908) y Metcalfe y Chalk (1972) para el género. Es valioso destacar que varios de los caracteres observados, como ser, la morfología espinescente, la textura cartácea de las hojas, la presencia de una gruesa cutícula, una hipodermis con alto contenido de mucílagos y la gran cantidad de taninos presentes en el parénquima, ponen de manifiesto el carácter xeromórfico de *Castella tweedii*. Existen caracteres bien definidos que permiten su diferenciación de *C. coccinea*: las hojas con bordes dentados en la mitad apical de estas es característico de *C. tweedii*, y la estructura dorsiventral del mesófilo en *C. tweedii* mientras que en *C. coccinea* la estructura de este es céntrica (Cortadi, 2009).

CONCLUSIÓN

La capacidad depuradora de radicales libres que posee el extracto de hojas atribuida a flavonoides, ácidos

fenilcarboxílicos y taninos; la identificación entre estos de rutina y ácido clorogénico, así como también la gran cantidad de mucílagos presentes en la hipodermis de la hoja avalan el uso popular de las hojas de *Castela tweedii*.

REFERENCIAS

- Adams JD, Odunze IN. 1991. Oxygen free radicals and Parkinson's disease. **Free Radic Biol Med** 10: 161 - 169.
- AHP. American Herbal Pharmacopoeia. 2011 **Botanical Pharmacognosy. Microscopic Characterization of Botanical Medicines**. Chapter 4, Microscopy for identification of botanical raw materials. Edited by Upton R, Graff A, Jolliffe G, Länger R, Williamson. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Alarcon de la Lastra C, Lopez A, Motilva V. 1993. Gastroprotection and prostaglandin E2 generation in rats by flavonoids of *Dittrichia fiscosa*. **Planta Med** 59: 497 - 500.
- Argolo ACC, Sant'Ana AEG, Pletsch M, Coelho LCBB. 2004. Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*. **Bioresource Technology** 95: 229 - 233
- Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. **Nature** 181: 1199 - 1200.
- Bombardelli E, Morazzoni P, 1993. The flavonoids: new perspectives in biological activities and therapeutics. **Chim Oggi** 11: 25 - 28.
- Burkart A, Bacigalupo N. 2005. **Flora ilustrada de Entre Rios (Argentina)**. Parte IV. Dicotiledóneas Arquiclamídeas. B: Geraniales a Umbelliflorales. Colección Científica del INTA, Tomo VI, IV. Buenos Aires. Argentina.
- Campagna MN, Ratti MS, Sciara M, García Vescovi E, Gattuso M, Martínez ML. 2011. Biological activities of *Castela coccinea* Griseb. extracts. **Lat Am J Pharm** 30: 39 - 44.
- Choi CW, Kim SC, Hwang SS, Choi BK, Ahn HJ, Lee MY, Park SH, Kim SR. 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science** 163: 1161 - 1168.
- Comporti M. 1985. Lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. **Lab Invest** 53: 599 - 623.
- Cortadi A, Andriolo L, Campagna MN, Martínez ML, Di Sapio O, Gattuso M, Gattuso S. 2009. Estudio farmacobotánico de hojas, cortezas y leños de Simaroubaceae (*sensu lato*) de Argentina. Parte I. *Alvaradoa subovata* Cronquist, *Picramnia parvifolia* Engl., *Picramnia sellowii* Planch. y *Castela coccinea* Griseb.). **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 9: 20 - 37.
- Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM, Harman D. 1987. Oxygen radicals and human disease. **Ann Intern Med** 107: 526 - 545.
- D'Ambrogio de Argüeso A. 1986. **Manual de técnicas en histología vegetal**. Ed. Hemisferio sur SA, Buenos Aires, Argentina.
- Das D, Banerjee RK. 1993. Effect of stress on the antioxidant enzymes and gastric ulceration. **Mol Cell Biochem** 125: 115 - 125.
- Dominguez JA. 1939. Urquiza y Bonpland, antecedentes históricos. La disentería en el Ejército Grande en formación, en 1850. **Trab Inst Bot Farmacol** 59: 1 - 19.
- Dou J, Mc Chesney JD, Sinderlar RD, Goins DK, Walker LA. 1996. A new quassinoid from *Castela texana*. **J Nat Prod** 59: 73 - 76.
- Fernando E, Quinn C. 1992. Pericarp anatomy and systematics of the Simaroubaceae *sensu lato*. **Austral J Bot** 40: 263 - 289.
- Fernando E, Quinn C. 1995. Picramniaceae, a new family, and a recircumscription of Simaroubaceae. **Taxon** 44: 177 - 181.
- Fernando E, Gadek P, Quinn C. 1995. Simaroubaceae, an artificial construct: evidence from *RB CL* sequence variation. **Amer J Bot** 82: 92 - 103.
- Gattuso MA, Gattuso SJ. 2002. **Técnicas Histológicas en Material Vegetal**. Ed. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR. Argentina.
- Grieco PA, Moher ED, Seya M, Huffman J, Grieco HJ. 1994. A quassinoid (peninsularinone) and a steroid from *Castela peninsularis*. **Phytochemistry** 37: 1451 - 1454.
- Grieco PA, Vander Roest JM, Piñeiro-Nuñez MM, Campaigne EE, Carmack M. 1995. Polyandrol, a C₁₉ quassinoid from *Castela poliandra*. **Phytochemistry** 38: 1463 - 1465.
- Grieco PA, Haddad J, Piñeiro-Nuñez, MM, Huffman JC. 1999. Quassinoids from the twigs and thorns of *Castela poliandra*. **Phytochemistry** 50: 637 - 645.
- Halliwell B, Gutteridge JM. 1988. Free radicals and antioxidant protection: mechanisms and significance in toxicology and disease. **Hum Toxicol** 7: 7 - 13.

- Halliwell B, Gutteridge, JM, Cross CE. 1992. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? **J Lab Clin Med** 119: 598 - 620.
- Holmgren PK, Holmgren NH, Barnett LC. 1990. **Index Herbariorum**. Ed. New York Botanical Garden, New York, USA.
- Jeroudi MO, Hartley CJ, Bolli R. 1994. Myocardial reperfusion injury: role of oxygen radicals and potential therapy with antioxidants. **Am J Cardiol** 73: 2B - 7B.
- Kubo I, Murai Y, Chaudhuri SK. 1992. Structure of chaparramarin, a quassinoid from *Castela tortuosa*. **Phytochemistry** 31: 3262 - 3264.
- Kubo I, Murai Y, Chaudhuri SK. 1993. Castelalin, a quassinoid from *Castela tortuosa*. **Phytochemistry** 33: 461 - 463.
- La Casa C, Villegas I, Alarcon de la Lastra C, Motilva V, Martin Calero MJ. 2000. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. **J Ethnopharmacol** 71: 45 - 53.
- Martínez ML, Campagna MN, Ratti MS, Nocito I, Serra E, Gattuso S, Gattuso MA. 2009. Trypanocide activity of *Castela coccinea* Griseb. Extracts. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 8: 211 - 218.
- Martinez Crovetto R. 1981. **Plantas utilizadas en medicina en el NO de Corrientes**. Miscelanea 69. Fundación Miguel Lillo, Tucumán, Argentina.
- Mc Cord JM. 1985. Oxygen-derived free radicals in post ischaemic tissue injury. **N Engl J Med** 3: 159 - 163.
- Metcalfe C, Chalk L. 1972. **Anatomy of the Dicotyledons**. Vol I. Clarendon Press. Oxford, London, UK.
- Molyneux, P. 2004, The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin J Sci Technol** 26: 211 - 219
- Oberley LW. 1988 Free radicals and diabetes. **Free Rad Biol Med** 5: 113 - 124.
- O'Brien T, McCully M. 1981. **The study of plant structure, principles and selected methods**. Termarcaphi Pty Ltd., Melbourne, Australia.
- Oh TY, Lee JS, Ahn BO, Cho H, Kim WB, Surch YJ, Cho SW, Hahm KB. 2001. Oxidative Damages are critical in Pathogenesis of reflux esophagitis: implication of antioxidants in its treatment. **Free Rad Biol Med** 30: 905 - 915.
- Otamiri T, Sjobahl R. 1991. Oxygen radicals: their role in selected gastrointestinal disorders. **Dig Dis Sci** 9: 133 - 141,
- Roginsky V, Lissi E A. 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chem** 92: 235 - 254
- Ryrfeldt A, Bannenberg G and Moldeus P. 1993. Free radicals and lung disease. **Br Med Bull** 49: 588 - 603.
- Sasaki M, Joh T. 2007. Oxidative Stress and Ischemia-Reperfusion Injury in Gastrointestinal Tract and Antioxidant, Protective Agents. **Clin Biochem Nutr** 40: 1 - 12.
- Sanchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F, 1998. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **J Sci Food Agric** 76: 270 - 276
- Simmonds NJ, Rampton DS. 1993. Inflammatory bowel disease—a radical view. **Gut** 34: 865 - 868.
- Solereeder HO. 1908. **Systematic anatomy of the Dicotyledons I**. Clarendon Press, London, UK.
- Strittmater C. 1973. Nueva técnica de diafanización. **Bol Soc Argent Bot** 15: 126 - 129.
- Strittmater C. 1979. Modificación de una técnica de coloración Safranina-Fast green. **Bol Soc Argent Bot** 18: 121 - 122.
- Strittmater C. 1980. Coloración con Violeta de Cresyl. **Bol Soc Argent Bot** 19: 273 - 276.
- Wagner H, Bladt S. 2001. **Plant drug analysis**. Second edition. Ed. Springer, Munich, Germany.
- WHO. 1998. **Quality control methods for medicinal plant materials**. Ed. World Health Organization, Ginebra, Suiza.
- WHO. 2011. **Quality control methods for medicinal plant materials**. Updated edition. Ed. World Health Organization, Ginebra, Suiza.
- Xifreda C, Seo M. 2006. **Flora Fanerogámica Argentina**, Fascículo 99.138. Simaroubaceae. Proflora-Conicet.