

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

INSTITUTO DE HORTICULTURA

**ACTIVIDAD ALELOPÁTICA, CITOTÓXICA Y
ANTIOXIDANTE DE *Petiveria alliacea* L.**

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS
EN HORTICULTURA**

PRESENTA:

RAMONA PÉREZ-LEAL



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

Chapingo, Méx., Agosto de 2004



Instituto de Horticultura

ACTIVIDAD ALELOPÁTICA, CITOTÓXICA Y ANTIOXIDANTE DE *Petiveria alliacea* L.

Tesis realizada por RAMONA PÉREZ LEAL bajo la dirección del comité asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

CONSEJO PARTICULAR

DIRECTOR



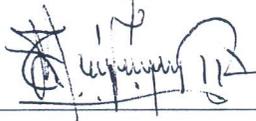
Dra. Maria del Rosario Garcia Mateos

ASESOR



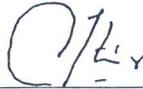
Dra. Maria Teresa Colinas Leon

ASESOR



Dr. Tito Roque Vasquez Rojas

ASESOR



Dr. Mariano Martinez Vasquez

ASESOR



Dr. Marcos Soto Hernandez

LECTOR EXTERNO



Dra. Ana Maria Castillo

DATOS BIOGRÁFICOS

La autora del presente trabajo Químico Farmacéutico Biólogo RAMONA PÉREZ LEAL, es originaria de Culiacán Sinaloa. Realizó estudios de educación superior en la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa con sede en Culiacán, donde curso la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo, Los estudios de Maestría los realizó en el Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo donde curso la Maestría en Ciencias en Horticultura.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la oportunidad de realizar uno mas de mis sueños.

Deseo además expresar mi agradecimiento a la Universidad Autónoma Chapingo, especialmente al Departamento de Fitotecnia, por haberme brindado la oportunidad de realizar mis estudios de Doctorado. Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo financiero otorgado.

A la Directora del presente trabajo, Dra. Rosario García Mateos, por su valiosa asesoría y por los alientos de impulso y empeño en la realización del mismo, A la Dra. Teresa Colinas León por su disponibilidad en la revisión de la tesis y su apoyo académico, Al Dr. Tito Roque Vásquez Rojas por su colaboración en la revisión de la tesis, por su apoyo y por su aliento a seguirme superando, Al Dr. Mariano Martínez Vásquez por su valioso apoyo académico, Al Dr. Marcos Soto Hernández por su ayuda en la realización de esta tesis.

Al Personal del Laboratorio de Semillas del Departamento de Fitotecnia por su valioso apoyo y calidez en su trato en especial al Sr. Eugenio por su valiosa ayuda en el laboratorio. A la M. C. Teresa Ramírez Apan y al M. C. Antonio Nieto Camacho del Laboratorio de Pruebas Biológicas del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México por su colaboración en la elaboración de las pruebas de citotoxicidad y antioxidantes.

A Joel Domínguez Viveros, por su ayuda y apoyo en cada paso de este trabajo.

A todas las personas que directa o indirectamente participaron en la realización de este trabajo y que involuntariamente no mencioné.

DEDICATORIAS

*A mi familia por su incondicional
apoyo y por guiarme siempre en la realización
de mis metas*

*A mi Esposo Joel
por su dedicación y amor*

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
ÍNDICE DE CUADROS	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
ÍNDICE DE ANEXOS	xvi
RESUMEN	xvii
ABSTRACT	xvii
I INTRODUCCIÓN	1
II OBJETIVOS	4
III ANTECEDENTES	5
3.1 Taxonomía	5
3.2 Distribución	5
3.3 Nombres comunes	7
3.4 Hábitat	7

CONTENIDO	PÁGINA
3.5 Características morfológicas del genero <i>Petiveria</i>	8
3.6 <i>Petiveria alliacea</i> L	8
3.7 Antecedentes fitoquímicos de <i>P. alliacea</i>	10
3.7.1 Raíz	12
3.7.2 Tallo	13
3.7.3 Hoja	14
3.7.4 Inflorescencia y semilla	14
3.8 Metabolitos sulfurados presentes en <i>P. alliacea</i>	16
3.9 Etnobotánica	17
3.10 Actividad Biológica	17
3.10.1 Actividad antihipertensiva	17
3.10.2 Actividad contráctil uterina	18
3.10.3 Actividad analgésica	18

CONTENIDO	PÁGINA
3.10.4 Actividad antiinflamatoria	19
3.10.5 Actividad inmunomoduladora	20
3.10.6 Actividad como antiagregante plaquetario	21
3.10.7 Actividad anticancerígena	21
3.10.8 Actividad bactericida y fungicida	23
3.10.9 Actividad insecticida y acaricida	24
3.11 Actividad alelopática	25
3.12 Actividad citotóxica	31
3.13 Actividad antioxidante	33
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	36
4.1 Recolecta del material vegetal	36
4.2 Evaluación de la actividad alelopática	36
4.2.1 Preparación de extractos	36

CONTENIDO	PÁGINA
4.2.2 Preparación de los tratamientos	37
4.2.3 Bioensayos <i>in vitro</i>	37
4.2.4 Bioensayos en suelo	38
4.2.5 Análisis estadístico	39
4.3 Evaluación de la actividad citotóxica	40
4.3.1 Preparación de extractos	40
4.3.2 Características de las líneas celulares cancerosas	41
4.3.3 Propagación y mantenimiento de líneas celulares	41
4.3.4 Inoculación de las placas	45
4.3.5 Adición de los compuestos de prueba	48
4.3.6 Concentración y distribución de los compuestos en un ensayo primario	48
4.3.7 Curvas Concentración – Respuesta	50

CONTENIDO	PÁGINA
4.3.8 Fijación de las células	50
4.3.9 Teñido de las placas	51
4.3.10 Solubilización del complejo SRB-PTS	51
4.3.11 Procesamiento de datos	51
4.4 Evaluación de la actividad antioxidante	54
4.4.1 Preparación de extractos	54
4.4.2 Bioensayo para la evaluación de la actividad antioxidante	54
4.4.3 Análisis estadístico	55
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
5.1 Actividad alelopática	57
5.1.1 Porcentaje de germinación <i>in vitro</i>	57
5.1.2 Velocidad de germinación acumulada <i>in vitro</i>	64
5.1.3 Bioensayo en suelo	66

CONTENIDO	PÁGINA
5.2 Efecto citotóxico	69
5.3 Efecto antioxidante	72
VI CONCLUSIONES	77
VII LITERATURA CITADA	79
VIII ANEXOS	87

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO		PÁGINA
1	Compuestos identificados presentes en <i>Petiveria alliacea</i> L.	15
2	Plantas utilizadas comúnmente para evaluar la actividad alelopática.	29
3	Líneas celulares cancerosas empleadas.	41
4	Diferencias en la germinación total y el desarrollo de plántulas de cuatro especies por el extracto acuoso de <i>P. alliacea</i> L.	63
5	Actividad citotóxica de los extractos acuoso, butanólico y de diclorometano de hoja y de diclorometano de raíz de <i>P. alliacea</i>	70
6	Actividad citotóxica del extracto acuoso de hoja liofilizado de <i>P. alliacea</i> .	71
7	Actividad antioxidante de extractos butanólico y acuoso de hoja y butanólico de raíz de <i>P. alliacea</i>	73
8	Concentración inhibitoria media del extracto butanólico de hoja de <i>P. alliacea</i>	73

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Distribución mundial de <i>Petiveria alliacea</i> L.	6
2	Distribución de <i>Petiveria alliacea</i> L. en la República Mexicana	6
3	Metabolitos encontrados en <i>P. alliacea</i> L.	11
4	Compuestos sulfurados encontrados en raíz de <i>P. alliacea</i> L.	13
5	Trans-N-metil-4-metoxiprolina presente en tallo de <i>Petiveria alliacea</i> L.	13
6	Esquema de la reacción entre el DPPH y el grupo sulfhidrilo.	35
7	Diagrama de las placas para inoculación de células en citotoxicidad	47
8	Diagrama de placa para inoculación de compuestos prueba en ensayos de citotoxicidad	49
9	Diagrama de placa para preparación de diluciones seriadas en ensayos de citotoxicidad	50
10	Metodología del ensayo de citotoxicidad	53
11	Efecto del extracto acuoso de <i>P. alliacea</i> en la germinación de cuatro especies probadas. Tukey ($p= 0.05$)	58

FIGURA		PÁGINA
12	Efecto del extracto metanólico de <i>P. alliacea</i> en la germinación de cuatro especies probadas. Tukey (p= 0.05)	60
13	Efecto del extracto de diclorometano de <i>P. alliacea</i> en la germinación de cuatro especies probadas. Tukey (p= 0.05)	62
14	Efecto del extracto acuoso de <i>P. alliacea</i> en la velocidad de germinación acumulada (VGA) de cuatro especies vegetales	65
15	Efecto del extracto metanólico de <i>P. alliacea</i> en la velocidad de germinación acumulada (VGA) de cuatro especies vegetales	65
16	Efecto del extracto de diclorometano de <i>P. alliacea</i> en la velocidad de germinación acumulada (VGA) de cuatro especies vegetales	66
17	Efecto del extracto acuoso y hoja molida de <i>P. alliacea</i> en la germinación de semillas (A) y el desarrollo de plántulas (B) de lechuga en suelo	68
18	Curva de valoración antioxidante del extracto butanólico de hoja de <i>P. alliacea</i>	74
19	Estructura antioxidante típica de los flavonoides (quercetina)	75
20	Flavonoides presentes en <i>Petiveria alliacea</i> L	76

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO		PÁGINA
A	Resultados del análisis estadístico para el extracto acuoso	87
B	Resultados del análisis estadístico para el extracto metanólico	88
C	Resultados del análisis estadístico para el extracto de diclorometano	89

ACTIVIDAD ALELOPÁTICA, CITOTOXICA Y ANTIOXIDANTE DE *Petiveria alliacea* L.

ALLELOPATHIC, CITOTOXIC AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF *Petiveria alliacea* L.

Ramona Pérez-Leal¹ y Maria del Rosario García-Mateos²

RESUMEN

La especie *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae), planta herbácea de gran importancia en la herbolaria tradicional, usada como antirreumático, abortivo, antipirético, anticancerígeno, antiinflamatorio. Adicionalmente, se reporta su actividad insecticida y acaricida, debida probablemente a la presencia de compuestos derivados de azufre. Sin embargo, se desconoce su actividad alelopática, antioxidante. El objetivo que se planteó en la presente investigación fue evaluar la actividad alelopática en cuatro especies de semillas *in vitro* y en suelo, así como la actividad citotóxica en cinco líneas celulares y antioxidante. Se probaron diferentes concentraciones de los extractos acuosos, metanólico y de diclorometano de hoja. Los índices evaluados en semillas de *Triticum aestivum*, *Oriza sativa*, *Lactuca sativa* y *Amaranthus hypocondriacus* fueron: germinación total (G_t) y velocidad de germinación acumulada (VGA). Adicionalmente, se trataron las semillas de lechuga con una mezcla de diferentes proporciones de hoja y suelo, otra con extracto acuoso y suelo. Se evaluaron el G_t , VGA, longitud de parte aérea (LPA) y desarrollo radicular (LR). La actividad antioxidante de diferentes extractos de hoja y de raíz se realizó de acuerdo al método descrito por Blois. La evaluación citotóxica de varios extractos se llevó a cabo con cinco líneas celulares según el método propuesto por Monks. En la evaluación alelopática, los extractos orgánicos resultaron ser más fitotóxicos que el extracto acuoso, afectando significativamente a lechuga y amaranto. Las semillas de trigo y lechuga que germinaron con el extracto acuoso no todas llegaron a desarrollarse como plántulas. En cambio en la evaluación realizada en suelo, no se observó efecto fitotóxico en la germinación de las semillas de lechuga, afectándose únicamente la longitud de la parte aérea de las plántulas, por lo tanto, los extractos probados de *Petiveria alliacea* resultaron ser moderadamente fitotóxicos, lo cual coincide con sus características de hábitat, sustentadas en observaciones en campo. Por otro lado, el extracto butanólico de hoja presentó efecto antioxidante siendo la concentración inhibitoria media de $IC_{50} = 264.54$ ppm. De los cinco extractos probados, el extracto acuoso fue el que mostró mayor efecto citotóxico en la línea celular de leucemia, con un porcentaje de inhibición de 70.1% a la concentración 100 μ M.

Palabras Clave: aleopatía / fitotoxicidad / *Petiveria alliacea* / Phytolaccaceae / germinación / extractos.

ABSTRACT

The species *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae) is an herbaceous plant of great importance in traditional medicine, and has been used for its anti-rheumatic, abortive, antipyretic, anti-carcinogenic and anti-inflammatory properties. In addition, it is reported to act as an insecticide and acaricide, probably due to the presence of compounds derived from sulfur. However, its allelopathic and anti-oxidant activity is unknown. The objective of the present study was to evaluate the allelopathic activity in four species of seed, *in vitro* and in the soil, as well as the cytotoxic and anti-oxidant activity in five cellular lines. Different concentrations were tested of the aqueous, methanolic and dichloromethanic leaf extracts. The indices evaluated in *Triticum aestivum*, *Oriza sativa*, *Lactuca sativa* and *Amaranthus hypocondriacus* seeds, were: total germination (G_t) and accumulated germination velocity (VGA). In addition, lettuce seeds were treated with a mixture of different proportions of leaf and soil, and another mixture of aqueous extract and soil. An evaluation was made of the G_t , VGA, length of the aerial portion (LPA) and radicular development (LR). The anti-oxidant activity of different leaf and root extracts were carried out according to the method described by Blois. The cytotoxic evaluation of various extracts was made with five cellular lines according to the method proposed by Monks. In the allelopathic evaluation, the organic extracts were more phytotoxic than the aqueous extract, significantly affecting the lettuce and amaranth. Not all of the wheat and lettuce seeds which germinated with the aqueous extract developed into seedlings. However, in the evaluation carried out in the soil, no phytotoxic effect was observed in the germination of the lettuce seeds, and only the length of the aerial portion of the seedlings was affected. Therefore, the tested extracts of *Petiveria alliacea* resulted moderately phytotoxic, which coincides with its habitat characteristics, based on field observations. On the other hand, the butanolic leaf extract presented an anti-oxidant effect, with the inhibitory concentration medium of $IC_{50} = 264.54$ ppm. Of the five extracts tested, the aqueous extract showed the greatest cytotoxic effect on the cellular line of leukemia, with an inhibitory percentage of 70.1% at a concentration of 100 μ M.
Key words: allelopathy / phytotoxicity / *Petiveria alliacea* / Phytolaccaceae / germination / extract.

¹ Doctoral Candidate

² Director

I. INTRODUCCIÓN

Algunos principios activos procedentes del metabolismo secundario de las plantas han sido fuente de agentes utilizados hoy en la terapéutica. Sin embargo, Verpoorte (2000) señala que hasta 1998 se encontraban descritos cerca de 85 000 metabolitos secundarios, no obstante, esta cifra es aún baja si se toma en cuenta que existen 250 000 especies vegetales en nuestro planeta.

Por otro lado, debido al daño potencial para la salud humana que producen los herbicidas sintéticos, recientemente se ha notado un aumento del interés por realizar investigaciones en este campo. Para ello se han propuesto alternativas en la búsqueda de herbicidas naturales (Dudai *et al.*, 1999). Por lo tanto el estudio de la actividad alelopática donde los metabolitos secundarios producidos por plantas influyen sobre el crecimiento y desarrollo de sistemas biológicos, es útil en la investigación de nuevos modelos de herbicidas naturales, mas específicos y menos dañinos que los sintéticos utilizados en la agricultura (Macias, 1995).

México ocupa el segundo lugar a nivel mundial con 3 352 especies de plantas de uso medicinal después de China (con 5 000 plantas medicinales) (Bye *et al.*, 1992). Entre las numerosas plantas mexicanas utilizadas en medicina tradicional se encuentra la especie *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae), usada principalmente como agente anticancerígeno (Pérez, 2001). Extractos acuosos de varias plantas, entre ellas *P. alliacea*, se administraron a pacientes

voluntarios, enfermos de cáncer, del Programa de Plantas Medicinales de la Universidad Autónoma Chapingo. Los resultados indicaron una mejoría en un rango de 0 a 100 %, entre los diferentes voluntarios, observándose que el cáncer de: próstata, hígado, cérvico uterino y de mama, fueron donde los niveles de mejoría estuvieron mas altos (Pérez, 2001). Cabe mencionar que estos estudios se realizaron tomando en cuenta la información etnobotánica de la especie y no a un estudio farmacológico o actividad citotóxica.

Por lo tanto, el conocimiento empírico de la actividad anticancerígena de los extractos acuosos de *P. alliacea* que señala Pérez (2001), justifica la realización de la evaluación de la actividad citotóxica de los extractos responsables de dicha actividad.

La literatura señala que algunos metabolitos secundarios de naturaleza fenólica, como algunos flavonoides, actúan como agentes antioxidantes, debido principalmente a su habilidad para atrapar radicales libres. Los flavonoides, como agentes terapéuticos, se recomiendan en el tratamiento de aterosclerosis, enfermedades neurodegenerativas, en algunos tipos de cáncer, en la afectación del sistema inmunológico, cataratas y desórdenes cardiovasculares según Frei (1994) y Packer *et al.* (1999). A pesar de su presencia, en esta especie no se ha informado la actividad antioxidante; la identificación de estos metabolitos puede justificar algunas de las propiedades medicinales que se le atribuyen. Por lo tanto, existe la necesidad de evaluar la actividad antioxidante de algunos extractos de *P. alliacea*.

Finalmente, las evidencias e investigaciones sobre la actividad biológica de algunos metabolitos secundarios la especie son limitadas, se considera que el conjunto de elementos expuestos justifican ampliamente la realización del presente proyecto, para lo cual se plantearon los siguientes objetivos.

II. OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar la actividad alelopática, citotóxica y antioxidante de extractos acuosos y orgánicos de *Petiveria alliacea* L.

ESPECÍFICOS

- Evaluar la actividad alelopática de extractos de hoja de diferente polaridad de *P. alliacea* en semillas de monocotiledóneas (trigo y arroz) y dicotiledóneas (lechuga y amaranto).
- Evaluar la actividad alelopática de la hoja de *P. alliacea* molida, en la germinación de semillas de lechuga en suelo.
- Evaluar la actividad citotóxica *in vitro* de extractos de diferente polaridad de hoja y raíz
- Evaluar la actividad antioxidante *in vitro* de extractos de diferente polaridad de hoja y raíz

III. ANTECEDENTES

3.1 Taxonomía

Reino:	Plantae
Subreino:	Tracheobionta
Superdivisión:	Spermatophyta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Caryophyllidae
Orden:	Caryophyllales
Familia:	Phytolaccaceae
Género:	Petiveria
Especie:	alliacea

3.2 Distribución

El género *Petiveria* pertenece a la familia Phytolaccaceae, en donde destacan principalmente las especies *Phytolacca americana* L. y *Petiveria alliacea* L. En particular, el género *Petiveria* es conocido por dos especies nativas de nuestro continente, *Petiveria tetrandra* que se encuentra restringida al Brasil y la especie *Petiveria alliacea* que se distribuye desde Florida, México y las Antillas hasta Paraguay y Argentina (Figura 1) (De Sousa *et al.*, 1990; Anónimo a, 1984; Anónimo b, 2004).

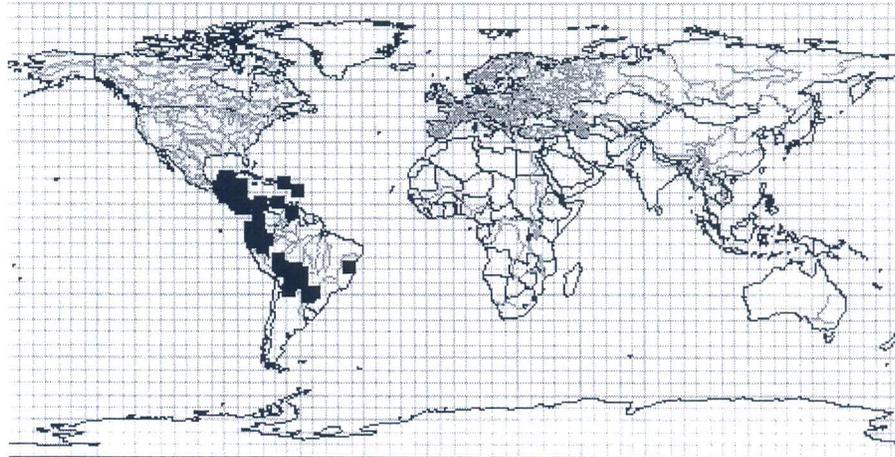


Figura 1. Distribución mundial de *Petiveria alliacea* L. (Missouri Botanical Garden, 2004).

En la República Mexicana *Petiveria* se localiza en 22 estados, principalmente en Veracruz, Chiapas, Oaxaca, Guerrero y Yucatán (Figura 2) (Pérez, 2001).

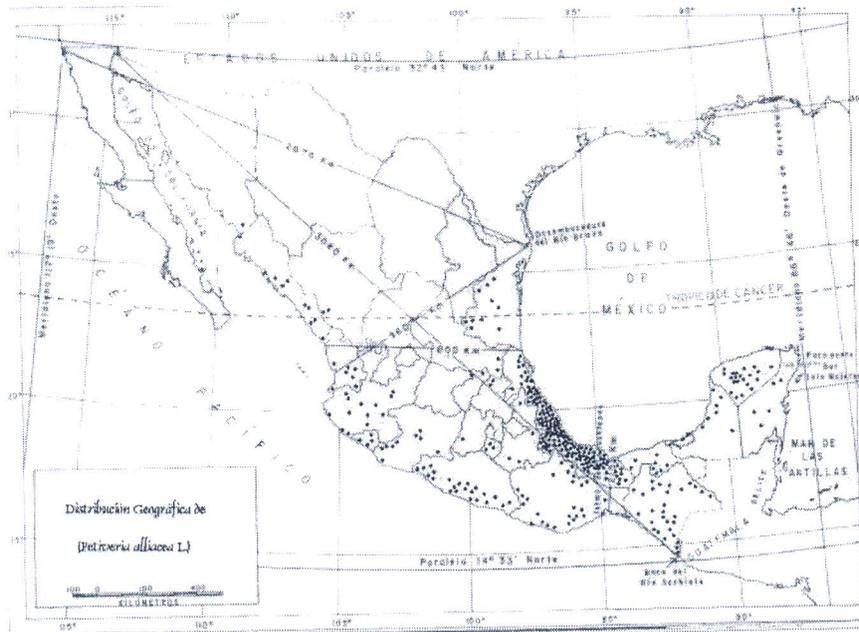


Figura 2. Distribución de *Petiveria alliacea* L. en la República Mexicana.

3.3 Nombres comunes

Se reportan cerca de 43 nombres diferentes entre los cuales los más frecuentes en México son hierba del zorrillo, payché y hoja de zorrillo; en Colombia se conoce como anamú; apacina en Guatemala; guinea, pipi y tipi en Brasil y mapurite en Venezuela.

3.4 Hábitat

El intervalo altitudinal predominante fluctúa entre 0 y 199 msnm, sin embargo puede encontrarse también hasta los 2000 m, se localiza con la vegetación que va desde acahual de selva mediana (0-800 m) hasta bosque mesófilo de montaña (2000 m) (Pérez, 2001). Esta especie se desarrolla predominantemente sobre roca sedimentaria reciente e ígneas extrusivas, en menor cantidad en sedimentaria mesozoica, sedimentaria cenozoica y metamórfica paleozoica, y muy escasamente sobre ígneas intrusivas cenozoicas y metamórfica mesozoica (Pérez, 2001).

Principalmente, crece en suelos aluviales hidromórficos y halomórficos, en oxisoles (lateríticos), rendzinas negras y rendzinas rojas, suelos derivados de cenizas volcánicas y de ando, también en litosoles y regosoles y en aridizoles (sierozem, solonetz, chesnut, desértico, yermosol) y ocasionalmente en vertisoles (Pérez, 2001). Predomina en clima cálido sumhúmedo (Aw), con menor frecuencia en templado húmedo (Cw) y cálido húmedo (Am), y escasamente, en templado húmedo (Cf), cálido húmedo (Af), semiseco (BSw) y (BSx'), y templado subhúmedo (CX') (Pérez, 2001).

3.5 Características morfológicas del genero *Petiveria*.

Este género se caracteriza por arbustos, o hierbas; erectos o ligeramente extendidos, pubescentes a glabrescentes, tejidos con olor a ajo. Hojas alternas, ovadas, elípticas a lanceoladas, membranosas a ligeramente coriáceas; estípulas subuladas, diminutas, caducas. Inflorescencias terminales y axilares, espigas simples o rara vez racimos; bráctea basal sobre el pedicelo; dos bracteolas por debajo de los sépalos; flores perfectas, zigomórficas, subsésiles; cuatro sépalos, persistentes, ligeramente endurecidos y acrescentes en el fruto, no recurvados; pétalos ausentes; de 4 a 8 estambres, alternos a los sépalos o dispuestos irregularmente sobre un disco hipógino, los filamentos están libres, las anteras dorsifijas; ovario súpero, solitario, oblongo, el estigma sésil, penicilado. El fruto es un aquenio alargado, cuneiforme cubierto en la mitad inferior por el perianto persistente, con dos lóbulos en el ápice, y de 3 a 6 cerdas uncinadas; semilla erecta, linear, con perispermo escaso y el embrión erecto (Anónimo a, 1984).

3.6 *Petiveria alliacea* L.

Características Botánicas

Hierbas hasta 1 m de altura, con olor penetrante a zorrillo, pubescentes en las ramas jóvenes y glabrescentes en las viejas. Tallo delgado, algunas veces anguloso, verdoso, cuando seco con pequeñas manchas negras. Hojas generalmente en pequeños brotes, de 2.5 a 15.5 cm de largo por 1 a 8 cm de

ancho, el haz verde oscuro, el envés mas claro, el margen entero, el ápice acuminado o algunas veces agudo, la base atenuada a ligeramente obtusa; nervación broquidódroma a eucamptódroma, con 5 a 8 pares de nervios; pecíolo linear, ligeramente acanalado, generalmente corto, de 0.2 a 1.3 cm de largo, glabrescente (Anónimo a, 1984).

Inflorescencias terminales y axilares, rara vez opositifoliales, espigas simples, raramente paniculadas, erectas o inclinadas en la punta, hasta 38 cm de largo por 0.2 a 0.6 cm de ancho, con hasta casi 50 flores por espiga; pedúnculo erecto, de 0.4 a 2.7 cm de largo, escasamente pubescente; bráctea persistente, subulada a triangular, de 0.1 a 0.2 mm de largo, poco pubescente, ligeramente mucronada; dos bracteolas, persistentes, triangulares de 1 a 2 mm de largo; el pedicelo hasta de casi 1 mm de largo o ausente (Anónimo a, 1984).

Flores alternas, cruciformes; sépalos imbricados, blancos a amarillentos durante antesis, verdoso después de la antesis, angostamente elípticos a oblongo-lineales, de 3 a 5.5 mm de largo por 0.7 a 1 mm de ancho, con nervación paralela; de 5 a 7 estambres, persistentes en el fruto, los filamentos amarillos a verdosos, desiguales, de 1 a 3 mm de largo, las anteras de 0.7 a 2.5 mm de largo; carpelo de 1 a 2.5 mm de largo por 0.5 a 1 mm de ancho, densamente pubescente y con 4 cerdas apicales, la placentación basal, el óvulo subgloboso alargado, de 0.75 a 2 mm de largo por 0.25 a 0.75 ancho, el estigma sobre el lado ventral del ovario, de 0.5 a 1 mm de largo (Anónimo a, 1984).

El fruto es un aquenio, sobresaliente del perianto, verdoso a pardo oscuro, de 2.5 a 8 mm de largo por 0.75 a 3 mm de ancho, pubescente, el ápice con dos lóbulos, cada uno con dos cerdas uncinadas, cada cerda de 2 mm de largo; semilla erecta con perispermo escaso. La floración se lleva a cabo casi todo el año, mas frecuentemente en época de lluvias (Anónimo a, 1984).

Las características más importantes que se toman en cuenta para la diferenciación de las especies es el número de ganchos y la longitud de los pedicelos. *Petiveria alliacea* presenta 4 ganchos y frutos subsésiles, y *Petiveria tetrandra* contiene 6 ganchos con pedicelos más largos de casi 5 mm de largo (Anónimo a, 1984).

Los especialistas señalan seis sinonimias:

Petiveria octandra L.

Petiveria foetida

Petiveria ochroleuca Moc. & Sessé

Petiveria hexandria Sessé. & Moc.

Petiveria alliacea L. var. *Grandifolia* (L.)

Petiveria alliacea L. var. *Octandra* (L.) (Wilson 1932).

3.7 Antecedentes fitoquímicos de *P. alliacea*

En el caso de la *Petiveria alliacea* se ha estudiado ampliamente la composición química de las hojas y raíz como de la planta completa, identificando diferentes tipos de metabolitos. Los primeros estudios realizados en 1972 por Szczepanski

et al. señalaron al metabolito bencil-2-hidroxi-etil-trisulfuro presente en la planta completa. Después De Sousa *et al.* (1990) describieron la presencia de varias cumarinas, del cis-3,5-difenil-1,2,4-tritolano, trans-estilbeno, benzaldehído, ácido benzoico y azufre elemental (Cuadro 1).

Kubec y Musah (2001) aislaron de la raíz dos diasterómeros denominados Petiverina A y Petiverina B; las estructuras correspondieron a dos sulfóxidos de la S-bencil-L cisteína; la diferencia fue en el arreglo espacial, presentando en el primero la configuración absoluta "S" para el átomo de azufre, y para el segundo la configuración "R". Estos isómeros también se han encontrado en otros tejidos de la planta (raíz y tallo) predominando la Petiverina B (isómeros RcSs) (Figura 3).

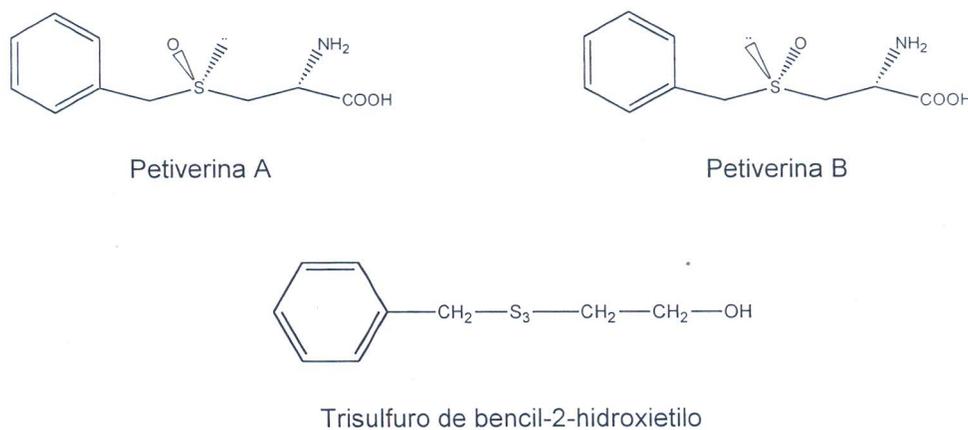


Figura 3. Metabolitos encontrados en *P. alliacea* L.

3.7.1 Raíz

Germano y Sertié (1995) reportaron la presencia de alcaloides, antraquinonas, flavonoides, taninos, saponinas, aceites esenciales y cumarinas en el extracto de raíz; previo a esto, Malpezzi *et al.* (1994) reportaron la presencia en raíz de N-metil-4-metoxi-prolina (Figura 6) y compuestos sulfurados como el dibenciltrisulfóxido, bencil-2-hidroxietiltrisulfuro y tritoliacina. Adicionalmente, De Sousa *et al.* (1990) aislaron en este tejido el trisulfuro de dibencilo y el triterpeno β -sitosterol.

Recientemente en el 2001, Coelho *et al.* reportaron por primera vez la presencia de un compuesto natural en Phytolacaceae, el disulfuro de dipropilo, y otros compuestos como el sulfuro de dibencilo, disulfuro de dibencilo, trisulfuro de dibencilo, tetrasulfuro de dibencilo, hidroximetilsulfuro de bencilo y di(benciltrio) metano (Figura 5), de los cuales el trisulfuro de dibencilo ha sido descrito anteriormente para esta especie por De Souza *et al.* en 1990 (Cuadro 1).

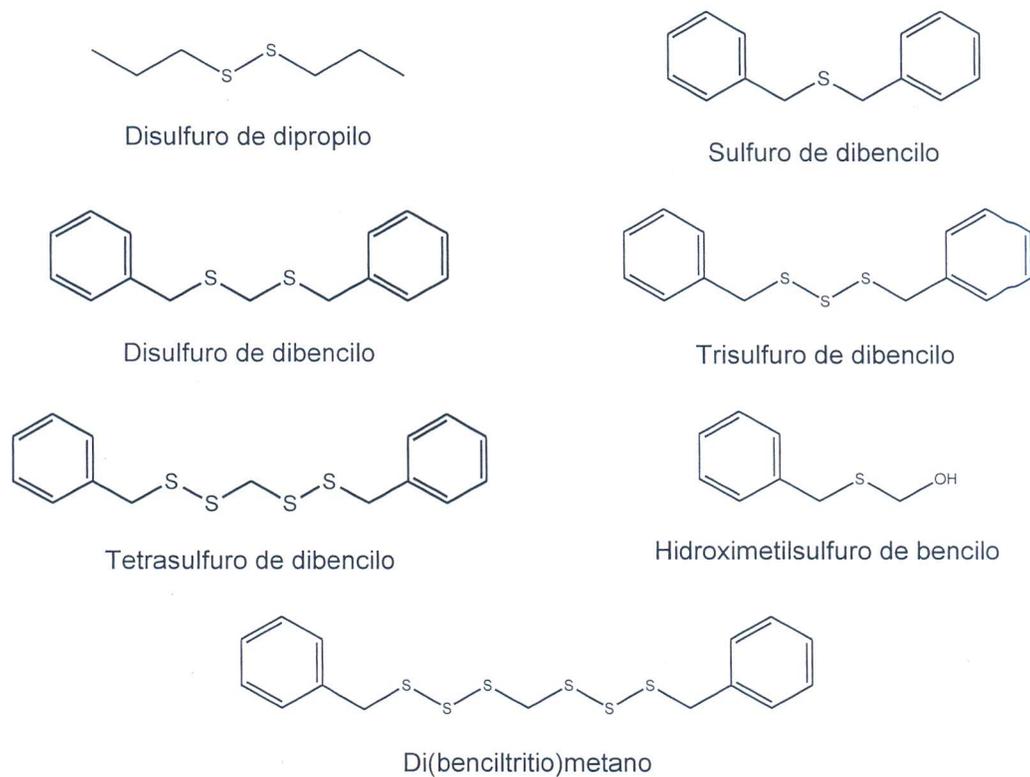


Figura 4. Compuestos sulfurados encontrados en raíz de *P. alliacea* L.

3.7.2 Tallo

De Sousa *et al.* (1990) identificaron en tallo de *P. alliacea* un metabolito de naturaleza polar, el trans-N- metil- 4- metoxiprolina (Figura 5.), nunca antes descrito, también al β -sitosterol, alantoína y al ácido lignocérico (Cuadro 1).

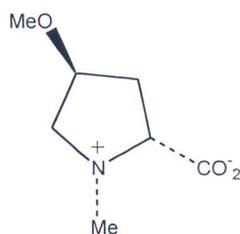


Figura 5. Trans-N-metil-4-metoxiprolina presente en tallo de *Petiveria alliacea* L.

3.7.3 Hoja

De Sousa *et al.* (1990) describieron la presencia de alantoína, alcohol lignocérico, lignocerato de lignocerol y α -friedlinol; mas adelante, Delle Monache y Cuca (1992) reportaron en el extracto etanólico de hojas, tres flavonoides conocidos y tres nuevos C- alquilados derivados de pinocembrina: la 6-formil-8-metil-7-O-metilpinocembrina, 6-hidroximetil-8-metil-7-O-metilpinocembrina y 6-hidroximetil-8-metil-5,7-di-O-metilpinocembrina, respectivamente (Figura 18). Los 3-O-ramnósidos del dihidrocampferol, la dihidroquercetina y la miricetina (Cuadro 1).

3.7.4 Inflorescencia y semilla

De Sousa *et al.* (1990) y Oluwole y Bolarinwa (1998) reportaron la presencia de pinitol en inflorescencias, y el análisis fitoquímico preliminar del extracto metanólico de semillas dio pruebas positivas para alcaloides, glicósidos cardiacos y lípidos; y pruebas negativas para antraquinonas y fenoles (Cuadro 1). Aunque hasta ahora no han sido descritas las estructuras de algunos de ellos.

Cuadro 1. Compuestos identificados en *Petiveria alliacea* L.

Tejido	Compuesto	Referencia
Planta completa	<p>Compuestos sulfurados Bencil 2-hidroxietil trisulfuro</p> <p>Aminoácidos Petiverina A y B</p> <p>Coumarinas</p> <p>Otros Cis-3,5 difenil 1,2,4-tritiolano Benzaldehido Ácido benzoico Trans-estilbeno</p>	<p>(Szczepanski <i>et al.</i>, 1972)</p> <p>(Kubec y Musah, 2001)</p> <p>(De Sousa <i>et al.</i>, 1990)</p> <p>(De Sousa <i>et al.</i>, 1990)</p>
Hoja	<p>Aminoácidos Petiverina A y B</p> <p>Flavonoides 6-formil-8-metil-7-O-Metilpinoembrina 6-hidroximetil-8-metil-7-O-Metilpinoembrina 6-hidroximetil-8-metil-5,7-di-O-Metilpinoembrina 3-O-ramnosidos de Dihidrocampferol Dihidroquercetina Miricetina</p> <p>Lípidos Lignocerol</p> <p>Terpenoides α-friedelinol</p>	<p>(Kubec y Musah, 2001)</p> <p>(De Sousa <i>et al.</i>, 1990)</p> <p>(Delle Monache y Cuca, 1992)</p> <p>(De Sousa <i>et al.</i>, 1990)</p> <p>(De Sousa <i>et al.</i>, 1990)</p>
Tallo	<p>Aminoácidos Trans-N-metil-4-metoxiprolina</p> <p>Lípidos Ácido lignocérico</p> <p>Terpenoides β-Sitosterol</p>	<p>(De Sousa <i>et al.</i>, 1990)</p>
Raíz	<p>Compuestos sulfurados Sulfuro de dipropilo Disulfuro de dibencilo Trisulfuro de dibencilo Tetrasulfuro de dibencilo Monosulfuro de Bencilhidroximetilo Di(benciltrio)metano Dibenciltrisulfoxido Bencil-2-hidroxietiltrisulfuro</p> <p>Aminoácidos N-metil-4 -metoxi-prolina Petiverina Ay B</p> <p>Terpenoides β-Sitosterol</p>	<p>(Coelho <i>et al.</i>, 2001)</p> <p>(DeSousa <i>et al.</i>, 1990)</p> <p>(DeSousa <i>et al.</i>, 1990)</p> <p>(Kubec y Musah, 2001)</p> <p>(DeSousa <i>et al.</i>, 1990)</p>
Inflorescencia	<p>Terpenoides Pinitol</p>	<p>(De Sousa <i>et al.</i>, 1990)</p>

3.8 Metabolitos sulfurados presentes en *P. alliacea*

En investigaciones recientes se han encontrado en las diferentes partes de *P. alliacea*, la presencia de compuestos sulfurados como el dibenciltrisulfóxido, bencil-2-hidroxietiltrisulfuro, el disulfuro de dipropilo, los aminoácidos sulfurados petiverina A y B, además de otros compuestos como el sulfuro de dibencilo, disulfuro de dibencilo, trisulfuro de dibencilo, tetrasulfuro de dibencilo, monosulfuro de bencilhidroximetilo (Kubec y Musah, 2001).

Algunas de las actividades descritas para la especie como son genotoxicidad y citotoxicidad se deben a estos compuestos; sin embargo el responsable de la mayoría de ellas es el trisulfuro de dibencilo, el cual actúa como insecticida contra *Cylas formicarius elegantulus* e *Hypothenemos ampei*, como acaricida contra *Boophilus microplus*, tiene actividad inmunomodulatoria, antimitótica y genotóxica.

Estos compuestos son estructuralmente análogos a algunos compuestos identificados en especies como *Allium* spp, una de las especies mas estudiadas con actividad asociada principalmente a la presencia de compuestos sulfurados como la aliicina (dialiltiosulfonato) y otros tiosulfonatos. Se les atribuyen propiedades antimicrobiana, anticancerígena, cardiovascular, antiagregante plaquetario, atrayente/repelente de insectos y animales, entre otras (Block, 1992)

3.9 Etnobotánica

P. alliacea es una planta comúnmente usada en la medicina tradicional de Sudamérica. Se administra en cápsulas que contienen polvo de hojas y raíces secas y en extractos acuosos de *P. alliacea*, ampliamente utilizados para el tratamiento de un gran número de enfermedades tales como dismenorrea (dolor pélvico asociado al ciclo menstrual), parálisis, reumatismo, fiebre, diarrea, dolor de muela, así como para el cáncer (Oliveira, 1988).

Investigaciones etnobotánicas en República Dominicana, señalan que *P. alliacea* es frecuentemente usada por sanadores en tratamientos, mejorando las condiciones de la mujer, esto es, empleada como un emenagogo provocando la menstruación y como abortífero. La raíz es usada como infusiones para el tratamiento de calambres, nervios, histeria, tumores y contracciones musculares (Ososki *et al.*, 2002).

En México se usa como antirreumático, antiespasmódico, abortivo, antipirético, anticancerígeno, antigripal, antitusivo, cicatrizante, antiinflamatorio y sudorífico (Pérez, 2001).

3.10 Actividad Biológica

3.10.1 Actividad antihipertensiva

Parapar de la Riestra y Moisés en el 2001 reportaron que el extracto acuoso de toda la planta de *P. alliacea* disminuía la actividad funcional de la capa

glomerular del riñón en ratas Wistar, produciendo por lo tanto una mayor excreción de agua y sodio, así como retención de potasio por la orina, lo que favoreció la disminución de la presión arterial en estos animales.

3.10.2 Actividad contráctil uterina

Oluwole y Bolarinwa (1998) al probar el extracto metanólico de la semilla en ratas Wistar, encontraron un incremento en la frecuencia y fuerza de las contracciones uterinas, lo cual justifica el uso que se le da al extracto acuoso de raíz en diferentes países de América sobre el tratamiento en las labores de parto en las mujeres embarazadas y su uso como abortífero y emenagogo. Aunque en estudios posteriores, realizados por Rosner *et al.* (2001) se reportó que el uso de la planta como abortífero, puede causar neurotoxicidad debida al trisulfuro de dibencilo.

3.10.3 Actividad analgésica

Con el propósito de evaluar en dos modelos experimentales el efecto analgésico de la *P. alliacea*, Furones *et al.* (1996a) administraron por vía oral una decocción de hojas a una dosis de 100 mgkg^{-1} , no se encontraron diferencias significativas entre los controles y los grupos tratados, lo cual sugiere que para este estudio *P. alliacea* en las dosis empleadas no posee acción analgésica.

3.10.4 Actividad antiinflamatoria

Germano *et al.* (1993) compararon el extracto acuoso de *P. alliacea* con un antiinflamatorio comercial y observaron que tiene un efecto similar al antiinflamatorio naproxen (un inhibidor clásico de la ciclooxigenasa), en la prueba tópica para dermatitis. El mecanismo por el cual este extracto produjo un efecto antiinflamatorio no es completamente claro, pero las investigaciones epidemiológicas lo asocian con inhibidores de la ciclooxigenasa (Deby *et al.*, 1984).

En ensayos posteriores Germano y Sertié (1995) probaron la actividad antiinflamatoria del extracto hidroalcohólico de raíz de *P. alliacea* en el modelo de edema inducido por carragenina, observando inhibición de la inflamación. Sin embargo, Furones *et al.* (1996) señalaron no haber encontrado diferencias significativas en las dosis empleadas al evaluar la actividad antiinflamatoria y analgésica del extracto acuoso de hojas de *P. alliacea* en ratas, en los modelos experimentales de pleuresía por carragenina, granuloma por algodón e involución del timo por adrenalectomía, lo que sugiere que no posee acción antiinflamatoria en los modelos y en la dosis empleadas.

3.10.5 Actividad inmunomodulatoria

Williams *et al.* (1997) probaron el extracto hexánico de hojas y tallos de *P. alliacea* y el metabolito trisulfuro de dibencilo en ratones adultos y observaron un marcado efecto inmunomodulatorio de ambos.

Rosner *et al.* (2001) reportaron que los principales compuestos en actividad bactericida e inmunomodulatoria en *Petiveria* son lipofílicos (no polares) concordando con los reportados por Williams *et al.* (1997). Los autores encontraron al trisulfuro de dibencilo como uno de los compuestos inmunomodulatorios más activos presentes en el extracto hexánico de la planta. Adicionalmente, describieron la inhibición del crecimiento neuronal, el decremento de la actividad mitocondrial en el neuroblastoma y el desensamble de microtúbulos debidos también a la acción del trisulfuro de dibencilo.

En el 2001, Cifuentes *et al.* probaron los extractos hexánico, metanólico y acuoso de raíz y hoja de *P. alliacea* sobre el Sistema Nervioso Central (SNC) y observaron que el extracto hexánico de raíz disminuyó ligeramente la actividad motora espontánea y el de hoja causó hiperexcitabilidad en ratones albinos machos y hembras (Cifuentes *et al.*, 2001).

3.10.6 Actividad como antiagregante plaquetario

Villar *et al.* (1997) encontraron que el extracto acuoso de toda la planta *P. alliacea* es activo antiagregante plaquetario, demostraron que los

antiagregantes plaquetarios son útiles en la prevención de trombos, particularmente en lo relacionado con el riesgo de infarto y trombosis cerebral y en la prevención de oclusiones vasculares y hemodiálisis. Se indica que el uso de antiagregantes plaquetarios para la prevención secundaria reduce el riesgo del golpe y el ataque fatal al miocardio.

3.10.7 Actividad anticancerígena

En *P. alliacea* se han observado efectos citotóxicos en linfocitos humanos *in vitro* y en células de médula ósea de ratón *in vivo*. Hoyos *et al.* (1992) observaron actividad genotóxica del extracto alcohólico de la planta con retardo en la proliferación celular, pero no detectaron la inhibición de la mitosis celular. En células de médula ósea de ratón se encontraron resultados similares. Los autores concluyeron que *P. alliacea* podría ocasionar el efecto mutagénico y carcinogénico.

En una investigación posterior Malpezzi *et al.* (1994) estudiaron la alteración del desarrollo del óvulo de erizo de mar, como un modelo conveniente para evaluar la citotoxicidad, teratogenicidad y efecto antineoplásico de nuevos compuestos. En el estudio, se investigó el efecto antimitótico de algunas fracciones obtenidas del extracto hidroalcohólico de raíz de *P. alliacea* durante el desarrollo del óvulo de erizo de mar (*Lytechinus variegatus*). Observaron que la fracción acuosa no modificó el desarrollo normal de la fragmentación del huevo, la fracción etérea a una concentración menor de $10 \mu\text{gml}^{-1}$ fue siempre la más activa y el efecto

inhibitorio en la primera fragmentación fue de 42 %, mientras que con el extracto hidroalcohólico de raíz, la inhibición fue solamente de 5 al 10 %.

Los autores concluyeron que el efecto observado en el modelo se debió a la presencia de bencilpolisulfuros, presentes en la fracción activa del extracto hidroalcohólico de la especie, el cual probablemente inhibe la síntesis de ADN, y consecuentemente la duplicación nuclear, la división celular y el desarrollo del embrión (Malpezzi *et al.*, 1994).

Posteriormente Coelho *et al.* (2001) probaron la actividad anticancerígena de los metabolitos: disulfuro de dipropilo, disulfuro de dibencilo y el tetrasulfuro de dibencilo; en un bioensayo con levaduras para agentes ADN-modificantes, encontrando un efecto moderado en ADN.

Recientemente, Ruffa *et al.* (2002) estudiaron el extracto metanólico de *P. alliacea* en la línea celular del carcinoma humano hepatocelular: Hep G2 y observaron que a pesar de que esta planta es utilizada en Cuba en el tratamiento de pacientes con cáncer y leucemia, no mostró ningún efecto inhibitorio en la línea celular en el rango de las dosis ensayadas (15.5 – 1000 µg/ml), lo que sugirió la utilización de dosis mayores para descartar la actividad anticancerígena (Ruffa *et al.*, 2002).

3.10.8 Actividad bactericida y fungicida

Berger *et al.* (1998) y Cáceres *et al.* (1998), describieron la actividad inhibitoria de los extractos de baja polaridad de *P. alliacea* en el protozooario *Trypanosoma cruzi*.

Coelho *et al.* (2001) reportaron que el extracto cloroformo:metanol (2:1) obtenido de raíz inhibió varias cepas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, indicando fuerte actividad sobre las cadenas mutantes de la levadura, este extracto también mostró una potente actividad inhibitoria contra los hongos *Cladosporium cladosporioides* y *Cladosporium sphaerospermum*.

Por otra parte, Carrillo *et al.* en 1997 administraron por separado extractos acuosos de cuatro plantas y la mezcla de ellos, entre las cuales se encontró *P. alliacea*, con la finalidad de evaluar el efecto toxico sobre *Pasteurella multocida*, bacteria responsable del cólera aviar (cólera de las aves). Las cuatro plantas utilizadas en el ensayo mostraron acción preventiva contra la bacteria (Carrillo *et al.*, 1997). La combinación de las plantas mostró mejor acción preventiva contra *P. multocida*. Los taninos, alcaloides, flavonoides y sesquiterpenolactonas, son comunes en la composición química de las cuatro plantas, pero las combinaciones de estas, mostraron mayor efecto preventivo, debido a una acción coadyuvante, ejerciendo una inhibición bacteriana contra *Pasteurella multocida* (Carrillo *et al.*, 1997).

Echevarría y Torres (2001) evaluaron el efecto del extracto etanólico al 30% de *P. alliacea* sobre el crecimiento *in vitro* de *Giardia lamblia*. Los resultados obtenidos mostraron un marcado efecto anti-giardiasis.

3.10.9 Actividad insecticida y acaricida

Lyndon *et al.* (1997) identificaron al trisulfuro de dibencilo (DBTS) aislado previamente de la raíz. Al evaluar y comparar la actividad insecticida y acaricida del DBTS con tres insecticidas comerciales: dimetoato, gama-HCH y carbaril, en la hembra adulta de *Boophilus microplus*, encontraron que el DBTS resultó más eficiente, obteniendo una DL_{50} de $0.918 \text{ mg}\cdot\text{peso}^{-1}$ a las 96 horas de realizado el bioensayo en comparación a las encontradas para los insecticidas dimetoato, gama-HCH y carbaril, siendo de 4.50, 6.9 y $9.3 \text{ mg}\cdot\text{peso}^{-1}$, respectivamente. También reportaron los autores una potente actividad insecticida del DBTS en *Cylas formicarius elegantulus* y *Hypothenemus ampei*, la DL_{50} del DBTS sobre *C. elegantulus* fue de $0.123 \mu\text{g}$ por insecto (Lyndon *et al.*, 1997).

Recientemente, Elizalde-Sánchez (2004) reportó moderada toxicidad de los extractos: acuoso, metanólico y de diclorometano de hoja de *P. alliacea* en el control de mosca blanca (*Trialeurodes vaporariorum* W.) en un cultivo de tomate hidropónico en condiciones de invernadero.

3.11 Actividad alelopática

La presión ejercida por factores abióticos a lo largo del proceso evolutivo de los vegetales ha provocado el desarrollo de numerosas rutas biosintéticas a través de las cuales sintetizan y acumulan en sus órganos una gran variedad de metabolitos secundarios. Se sabe que muchos juegan un papel importante en interacciones complejas entre organismos vivos con el entorno natural. Entre ellos existen sustancias que producidas por una planta le proporcionan beneficios al provocar determinados efectos fisiológicos sobre otras plantas o animales. Estas sustancias se denominan aleloquímicos y el fenómeno en el cual están involucradas se designa con el nombre de aleloquímia, cuando esta relación se establece entre individuos vegetales se denomina alelopatía (Anaya *et al.*, 1994).

Alelopatía se refiere a cualquier proceso que involucre a metabolitos secundarios producidos por plantas, algas, bacterias y hongos, que influya sobre el crecimiento de sistemas biológicos (Anónimo c, 1996).

Una revisión de literatura desde 1970 muestra 67 géneros y 97 especies de hidrofitas herbáceas vasculares reportadas por su actividad alelopática. El género más frecuente es *Eleocharis* con 11 especies y la especie más frecuentemente usada como blanco es la lechuga (Elakovich y Wooten, 1995).

En *P. alliacea* no se han encontrado estudios que señalen la actividad fitotóxica y/o alelopática. Las observaciones de campo y las características de hábitat, así

como la investigación reciente realizada por Zavala (2003) describe la actividad fitotóxica de diversos extractos de raíz en la germinación de semillas de lechuga y amaranto.

En la evaluación del efecto alelopático, se han descrito ampliamente varias evidencias de las interacciones alelopáticas de plantas que contienen aleloquímicos volátiles. La mayoría de los inhibidores de la germinación y del desarrollo han sido producidos por angiospermas perennes. Entre los compuestos identificados como alelopáticos se encuentran los compuestos fenólicos derivados del ácido cinámico, también se han identificado otros compuestos inhibitorios como los flavonoides, cumarinas, alcaloides, glicósidos cianogénicos, proteínas y aminoácidos. Se puede añadir a esta lista, los terpenoides, incluidos los terpenos volátiles principales componentes de los aceites esenciales con actividad alelopática y su posible uso como herbicida (Anaya, 2003).

Una variedad de agentes alelopáticos son sintetizados y almacenados en diferentes células de la planta ya sea en forma libre o conjugada con otras moléculas y son liberadas al entorno en respuesta a diferentes tipos de estrés (bióticos y abióticos). Muy poco se sabe sobre la liberación de aleloquímicos del tejido vivo, incluyendo los modos de regulación o influencia ambiental sobre esos procesos. Se puede afirmar que el modo de liberación de un agente alelopático depende de su naturaleza química. Las plantas superiores liberan regularmente compuestos orgánicos por volatilización de sus superficies, a

través de lixiviados de hojas y de exudados radiculares. Eventualmente, los constituyentes químicos de todos los organismos son liberados al entorno a través de procesos de descomposición, incorporándose a la matriz del suelo.

Los compuestos alelopáticos de la planta donadora, pueden interferir directamente con los procesos metabólicos primarios de la planta receptora. La actividad biológica de estos compuestos, va a depender de su naturaleza química, de su concentración, de la sensibilidad de la planta receptora, del proceso metabólico implicado y de las condiciones ambientales.

La interferencia de los alelopáticos con los procesos metabólicos es diversa, lo que implica una gran variedad de modos de acción de los alelopáticos. Cuando el efecto de un alelopático producido por una planta se manifiesta, por ejemplo, a través de la inhibición del crecimiento radicular, esto significa que se está afectando de manera específica el funcionamiento de diversos organelos celulares: mitocondrias (respiración) y cloroplastos (fotosíntesis); diversas estructuras: meristemos primarios y secundarios (división y elongación); las propiedades de las membranas e interfiriendo en la cinética enzimática, síntesis de proteínas, estructura cromosómica, etc. (Anaya, 2003).

La determinación de los mecanismos directos y los modos de acción por medio de los cuales, los compuestos alelopáticos inhiben el crecimiento de las plantas, es la clave para encontrar algunos de los usos potenciales de los aleloquímicos. La mayoría de los estudios acerca de los modos de acción de los alelopáticos,

se han realizado con ácidos fenólicos, ya que muchos de ellos alteran diversas funciones metabólicas, incluyendo la división celular, la absorción de nutrimentos, la respiración, la fotosíntesis y la función de los estomas (Anaya, 2003).

Aun no se ha establecido el modo primario de acción de algún compuesto alelopático, aunque se conocen algunas acciones fisiológicas de varias clases de químicos, de los cuales algunos tienen mecanismos comunes de acción (Einhellig, 1995).

Los aleloquímicos contra las plantas superiores son típicamente caracterizados como supresores de la germinación de semillas, causantes de daños en el crecimiento de raíz y otros meristemas, o inhibidores de la germinación. Por ejemplo para las quinonas, juglona y sorgoleona se indica una acción primaria en la producción de ATP, inhibiendo la evolución del oxígeno en los cloroplastos y también afectan fuertemente las funciones mitocondriales (Einhellig, 1995).

Otros ejemplos son el bloqueo de cloroplastos por sorgoleona, el cual se da en el fotosistema complejo II, la alteración del potencial de la membrana por derivados del ácido cinámico y benzoico, y perturbaciones en el sitio inicial de acción en membrana (Einhellig, 1995).

Para investigar la actividad alelopática se realizan bioensayos como un procedimiento integral, son necesarios para la evaluación del potencial

alelopático de especies y para seguir su actividad durante la extracción, purificación e identificación de compuestos bioactivos (ensayos biodirigidos). El bioensayo mas ampliamente utilizado para evaluar la actividad alelopática consiste en determinar la inhibición o la estimulación de la germinación de semillas (Leather y Einhelling, 1986).

Los ensayos de germinación y los de crecimiento de plántulas se utilizan ampliamente debido a que son sencillos y permiten una evaluación rápida de la respuesta de la especie vegetal a un agente aleloquímico determinado, como especie receptora se puede utilizar cualquier maleza o cultivo. Siendo las mas utilizadas las que se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Plantas utilizadas comúnmente para evaluar la actividad alelopática

Angiospermas	Familias	Especies
Dicotiledóneas	Cruciferae	<i>Lepidium sativum</i> L. (berro)
	Compositae	<i>Lactuca sativa</i> L. (lechuga)
	Solanaceae	<i>Lycopersicon esculentum</i> L. (tomate)
	Umbeliferae	<i>Daucus carota</i> L. (zanahoria)
Monocotiledóneas	Liliaceae	<i>Allium cepa</i> L. (cebolla)
	Gramínea	<i>Triticum aestivum</i> L. (trigo)
		<i>Hordeum vulgare</i> L. (cebada)
		<i>Zea mays</i> L. (maíz)

Fuente: Leather y Einhelling, 1986.

Se han encontrado muchos factores que pueden alterar la germinación cuando se prueban aleloquímicos, entre los cuales está la temperatura, el ciclo de luz y sombra, la disponibilidad de oxígeno, el potencial osmótico y otras interferencias. Por ejemplo muchas especies silvestres germinan mejor cuando

se incuban alternando temperaturas máximas y mínimas específicas; sin embargo, en algunos casos (ácidos fenólicos en girasol silvestre) el efecto fue una introducción en los requerimientos de temperatura máxima y mínima para las propiedades de la disolución utilizada; otra precaución que es necesario observar es el volumen de la disolución por caja de *petri*, esto se soluciona con una prueba preliminar para optimizar el volumen de la disolución sin inducir en condiciones anaeróbicas. La última es el diseño experimental donde se debe usar un amplio número de semillas y repeticiones para un buen análisis estadístico, generalmente se usa un mínimo de 6 repeticiones de 50 semillas cada una, específicamente con semillas pequeñas de especies silvestres (Leather y Einhellung, 1986).

En el estudio del papel de los compuestos alelopáticos en las plantas, hay al menos tres aspectos que se deben considerar: (1) los compuestos que actúan como autocontroladores de la germinación, pueden estimular la germinación a bajas concentraciones, (2) la formación de microcélulas que facilitan el transporte de terpenos no polares a través de las membranas celulares, (3) y el efecto sinergista que ocurre cuando se está trabajando con mezclas, pues existen muchos ejemplos donde las mezclas son mucho más potentes que los compuestos simples, tal es el caso en algunos ácidos fenólicos (Macías *et al.*, 1997).

Como en el caso de cualquier compuesto bioactivo, el efecto de un alelopático depende de que su concentración en el medio alcance un cierto umbral; es

frecuente que algunos alelopáticos que inhiben el crecimiento de algunas especies a una concentración dada pueden estimularlo a concentraciones mas bajas. Por otro lado, es muy probable que en la mayoría de los casos, en que se produce una interacción de tipo alelopático entre una planta y otro organismo, en dicha interacción intervenga no solo un compuesto, si no una mezcla de ellos. De esta manera dentro de la alelopatía, los fenómenos aditivos, sinérgicos, la potenciación de efectos o bien la neutralización de los mismos, pueden presentarse con frecuencia, haciendo mas complejo su estudio en el medio natural. Los estudios *in vitro* pueden resolver algunos de estos problemas, ya que se realizan en condiciones controladas y se manejan factores conocidos (Elakovich y Wooten, 1995).

3.12 Actividad citotóxica

Se conoce como citotoxicidad a la capacidad de algunos compuestos de ocasionar muerte celular, sin especificar el mecanismo por el cual esta ocurre.

En cáncer pueden existir mecanismos diferentes que inhiben la actividad proliferativa de células tumorales por compuestos citotóxicos de origen natural. Estos afectan el ciclo celular, regulación de la expresión del agente tumoral, la inducción de apoptosis, así como la inducción de diferenciación celular (Kim, 2002).

El cáncer se caracteriza por la existencia de células que han sufrido un cambio en los mecanismos de control que regulan la capacidad de diferenciación y

proliferación. Cada célula proliferativa atraviesa un proceso secuencial de crecimiento y diferenciación con fases como: presíntesis, síntesis de ADN, postsíntesis y mitosis (Pezzuto, 1996).

Uno de los métodos para evaluar la actividad citotóxica es propuesto por Monks *et al.* (1991) consiste en el uso de la sulforrodamina B (SRB), un colorante rosa brillante con dos grupos sulfónicos, en condiciones medianamente ácidas. La SRB se une a residuos de aminoácidos de proteínas básicas en células fijadas a ácido tricloroacético (TCA) para proveer un índice sensible del contenido de proteína celular que es lineal al rango de densidad celular en al menos dos órdenes de magnitud (Skehan *et al.*, 1990).

La sensibilidad del ensayo de SRB es comparada favorablemente con sensibilidades de ensayos fluorescentes y es superior a otros ensayos que utilizan luz visible. Este ensayo da un punto colorido que no es destructible, indefinidamente estable y visible a simple vista. Provee también una medida sensible de citotoxicidad inducida por fármacos, es útil en la cuantificación de clonogenicidad. La SRB fluoresce fuertemente con excitación láser a 488 nm y puede ser medida cuantitativamente a un nivel simple celular por un citómetro de fluorescencia (Skehan *et al.*, 1990).

3.13 Actividad antioxidante

La mayoría de las plantas sintetizan compuestos de naturaleza fenólica, inducida por factores externos e internos: la radiación UV, la alta intensidad

luminosa, las bajas temperaturas, las heridas, la baja concentración de nutrimentos y el ataque de patógenos. Se ha señalado que el estrés abiótico promueve la producción de especies reactivas de oxígeno (radicales libres) entre las células (Sakihama y Michael, 2002).

Algunos compuestos fenólicos como flavonoides, precursores de la lignina y la vitamina C (ascorbato), no solo actúan como antioxidantes en plantas (Sakihama y Michael, 2002), sino también en animales, por la captura de las especies reactivas de oxígeno. Un antioxidante es un radical atrapador o agente antirradicalar, antilipoperoxidante o antioxígeno. La actividad antirradicalar en una sustancia, es la disponibilidad de atrapar radicales libres, como el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) y el α,α -difenil- β -picrilhidracilo (DPPH) entre otros (Pincemal y Deby, 1982).

Al respecto, en *P. alliacea* se han identificado compuestos de naturaleza fenólica, como algunos flavonoides (Cuadro 1). A pesar de su presencia, en la especie no se ha reportado la actividad antioxidante. Sin embargo, la identificación de estos metabolitos en la especie puede justificar la actividad medicinal que se le atribuye, como antiinflamatoria y anticancerígena (Sakihama y Michael, 2002).

La literatura señala que la actividad biológica de los radicales libres es variada pues se asocian a enfermedades como arterosclerosis, enfermedades

neurodegenerativas, algunos tipos de cáncer, la afectación del sistema inmunológico, cataratas y desórdenes cardiovasculares (Frei, 1994; Packer *et al.* 1999).

En la evaluación de la actividad antioxidante se realizan tres modelos diferentes: la capacidad antilipoperoxidante, la capacidad de reaccionar con el oxígeno y la capacidad atrapadora de radicales libres (Blois, 1958).

Actualmente, una prueba bastante útil consiste en utilizar un radical estable α,α -difeníl- β -picrilhidracilo (DPPH) que es ampliamente usado debido al magnetismo que le confiere su electrón desapareado, este puede aceptar un electrón o un radical hidrógeno para hacerse estable y transformarse en molécula diamagnética, cuando el electrón se aparea la absorción disminuye y la decoloración resultante es estequiométrica con respecto al número de electrones que adquiere (Hippeli, 1999) (Blois, 1958).

La absorción óptica del DPPH es moderadamente estable con respecto a los cambios en pH, excepto para disoluciones altamente alcalinas, pero se ha encontrado que la absorción a 517 m μ es independiente a un pH de 5.0 a 6.5. Se obtiene una curva de calibración empleando cisteína como sustancia donadora de electrones (Niwa, 1999; Blois, 1958).

Se ha visto que el DPPH podría oxidar y ser decolorado el color violeta por la

cisteína, glutatión, ácido ascórbico, tocoferol, compuestos aromáticos polihidroxilados (hidroquinona, pirogalol, etc.) y aminas aromáticas (p-fenilendiamina, p-amino fenol, etc.).

En su interacción con compuestos que tienen grupos oxidables reversibles, el DPPH da resultados consistentes con el siguiente mecanismo (Figura 4.):



Figura 6. Esquema de la reacción entre el DPPH y el grupo sulfhidrilo.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Recolecta del material vegetal

La recolecta del material vegetal (hojas maduras de *P. alliacea*) se realizó en los alrededores de la población de Juan Rodríguez Clara, ubicada en la zona sur del estado de Veracruz, región de clima cálido, en los 18°00" de latitud norte y 95°24" de longitud oeste a una altitud de 95 m., una temperatura promedio de 25 °C y una precipitación pluvial media anual de 1266 mm. Se recolectaron varios individuos distribuidos al azar procurando que todos correspondieran a la misma etapa fenológica. El material fue certificado en el Herbario Nacional (MEXU) de la Universidad Nacional Autónoma de México, asignándole el número de registro 1042314.

4.2 Evaluación de la actividad alelopática

4.2.1 Preparación de extractos

El material vegetal se secó en una estufa Tork durante 6 h a una temperatura de 50 °C y se molió mecánicamente en un molino Thomas-Wiley. Para obtener el extracto acuoso, el material se maceró durante 24 h a temperatura ambiente. El extracto metanólico se obtuvo mediante una maceración del material vegetal con el disolvente metanol durante 3 días a temperatura ambiente. El extracto de diclorometano se preparó de manera similar que el anterior. Los extractos crudos resultantes se obtuvieron evaporando el disolvente a presión reducida en un rotavapor Büchi.

4.2.2 Preparación de los tratamientos

Se prepararon seis disoluciones de diferente concentración (0.5 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 % y 5 %) del extracto acuoso y como testigo se usó agua destilada. Las diferentes disoluciones, de cada uno de los extractos orgánicos, se obtuvieron de una solución madre preparada previamente partiendo de los extractos crudos. Así, para el extracto metanólico las concentraciones fueron 0 %, 0.5%, 1.5%, 2.5%, 3.5% y 5% y para el extracto de diclorometano fueron 0 %, 0.5 %, 1.5%, 2.5%, y 3.5%, para ambos se utilizó agua destilada como testigo.

4.2.3 Bioensayos *in vitro*

Las concentraciones se probaron en semillas de dos especies de monocotiledóneas, trigo (*Triticum aestivum* L) y arroz (*Oriza sativa* L.) y en dos especies de dicotiledóneas; lechuga (*Lactuca sativa* L.) y amaranto (*Amaranthus hypocondriacus* L.). A las semillas utilizadas en este bioensayo, previamente se les realizaron pruebas de viabilidad. El experimento de fitotoxicidad se llevó a cabo según el método descrito por Anaya *et al.* (1999). Así, en cajas de *petri* de 10 cm de diámetro sobre papel filtro Wattman No. 1 se adicionaron por separado 2.5 ml de cada concentración del extracto acuoso, se depositaron 50 semillas por tratamiento. Para los extractos orgánicos, a diferencia del extracto anterior, se adicionaron 1.5 ml de cada concentración dejándose evaporar antes de depositar las semillas, finalmente, se agregaron 2.5 ml de agua destilada a cada caja. El testigo se preparó de manera similar utilizando disolvente correspondiente puro, y posteriormente evaporándolo. Los

tratamientos se colocaron en una germinadora bajo condiciones de luz continua con una intensidad luminosa de $15.39 \mu\text{mols}^{-1}\text{m}^{-2}$, humedad relativa de 80 % y una temperatura de 25 °C.

Las variables que se consideraron para evaluar la fitotoxicidad, fueron germinación total (G_t ; porcentaje de semillas germinadas) según Chiapusio *et al.* 1997. y velocidad de germinación acumulada (VGA; número de semillas germinadas por tiempo) (Maguire, 1962). Las lecturas se tomaron cada 24 horas, la última lectura se realizó tomando en cuenta el ciclo de germinación establecido para cada semilla, según se establece en las Reglas Internacionales para el Ensayo de Semillas (Anónimo d, 1976).

4.2.4 Bioensayos en suelo

Se realizaron dos pruebas, una empleando hoja seca y molida y la otra con extractos acuosos de hoja. De acuerdo al método propuesto por Chou *et al.* (1998), el material vegetal en diferentes proporciones (0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 g) se mezcló por separado con 10 g de suelo arcilloso para cada tratamiento, el cual se obtuvo a 15 cm de profundidad del Campo Experimental de Chapingo, previamente seco y tamizado para obtener partículas de 2 mm de diámetro y remover los residuos de planta. Se utilizaron cajas de polipropileno de 12 X 12 X 6 cm para depositar la mezcla. Se mantuvo la humedad del suelo adicionando agua destilada a capacidad de campo. Después de transcurrido el tiempo de descomposición de las hojas: 2, 4, 12, 24, 32 y 64 días para cada

tratamiento, correspondiendo a la menor concentración el menor tiempo de descomposición, y así sucesivamente, se sembraron 50 semillas de lechuga.

La segunda prueba se realizó preparando diferentes extractos acuosos (0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 % p/v), a partir del material vegetal seco y molido. En recipientes similares a los de la prueba anterior, se mezcló 100 g de suelo arcilloso con 10 ml de cada extracto respectivamente, posteriormente, se sembraron 50 semillas de lechuga.

Todos los tratamientos se colocaron en una germinadora bajo condiciones de luz continua a una intensidad luminosa de $15.39 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ a una temperatura de 25 °C y humedad relativa del 80%, en ambas pruebas. Después de los 7 días de la siembra se midió el porcentaje de germinación (G_t), la longitud de parte aérea (LPA) (hojas primarias y tallo), velocidad de germinación acumulada (VGA) y el desarrollo radicular (LR).

4.2.5 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron realizando el ANAVA para un diseño experimental en completamente al azar con cuatro repeticiones por tratamiento y una comparación de medias de Tukey mediante el uso del software SAS versión 8.20, 2004 (Anónimo e, 2004).

Esta parte de la investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Fisiología Vegetal, de Usos múltiples, de Ecología y de Semillas del Departamento de Fitotecnia, de la Universidad Autónoma Chapingo.

4.3 Evaluación de la actividad citotóxica

4.3.1 Preparación de extractos

La hoja de *P. alliacea* se secó a temperatura ambiente y se molió mecánicamente para obtener los extractos: butanólico (BuOH-H), de diclorometano (CH_2Cl_2 -H) y acuoso liofilizado (LA-H); de la misma manera se trató la raíz para obtener el extracto de diclorometano (CH_2Cl_2 -R).

Para la preparación del extracto acuoso se colocó la hoja con agua, en maceración durante 24 h a temperatura ambiente, el extracto obtenido se congeló a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ y se liofilizó. Los extractos orgánicos se obtuvieron mediante una maceración de raíz con diclorometano y hoja con diclorometano y butanol por separado durante 3 días a temperatura ambiente. Los extractos crudos resultantes se obtuvieron evaporando el disolvente a presión reducida en un rotavapor Büchi.

Para la determinación de la actividad citotóxica a una concentración de 50 mgml^{-1} se emplearon 1.5 mg de los extractos butanólico de hoja (nBuOH-H), diclorometano de raíz y de hoja, y del liofilizado acuoso de hoja (LAPA). Para

las curvas de concentración – respuesta: se utilizaron 3 mg del extracto acuoso liofilizado de hoja.

Se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO), buffer de fosfato (PBS) y agua desionizada como vehículos para solubilizar las muestras.

4.3.2 Características de las líneas celulares cancerosas

Los extractos se probaron en cinco líneas celulares de cáncer humano, su origen y características se describen en el Cuadro 3. Solo se deben emplear las líneas celulares a partir del pase 3 (F3) (Toma de una alícuota del cultivo para introducir a medio de cultivo nuevo y permitir la división y reproducción de la línea celular) al pase 20 (F20)

Cuadro 3. Líneas celulares cancerosas empleadas.

Línea celular	Tejido de origen	Tiempo de duplicación (horas)	Densidad del inóculo cél/ml	Cél/pozo (100 µl)	Cosechar con tripsina	Fijar Cél. TCA (%)	Línea/placa
U251	SNC	25.4	7.5×10^4	7 500	Si	50	A(b,c,d)
PC-3	Próstata	28.7	7.5×10^4	7 500	Si	50	A(e,f,g)
HCT-15	Colón	18.1	10×10^4	10 000	Si	50	B(b,c,d)
MCF-7	Mama	25.6	5×10^5	5 000	Si	50	B(e,f,g)
K562	CML	19.0	5×10^5	5 000	No	80	C(a,b,c)

(TCA:ácido tricloroacético, CML:leucemia mieloblástica crónica, SNC:sistema nervioso central)

4.3.3 Propagación y mantenimiento de líneas celulares

Todos los pasos se llevaron a cabo en una campana de flujo laminar previamente esterilizada por 30 min con luz U.V. y desinfectada con alcohol

etilico y cloruro de benzalconio según la metodología propuesta por Monks *et al.*, (1991).

1. Se extrajo del frasco dewar (a $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$) un vial de cada una de las líneas y se descongeló a temperatura ambiente

2. En frascos de cultivo T75, se agregaron 25 ml del medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino (10 %) y antibióticos–antimicóticos GIBCO (penicilina G sódica $10\ 000\ \mu\text{gml}^{-1}$, sulfato de estreptomycin y $25\ \mu\text{gml}^{-1}$ de amfotericina B como funguicida, en 0.85 % de solución salina) y posteriormente se agregó 1 ml del inóculo de líneas celulares usando una pipeta por línea. Se anotó en un extremo del frasco el número de pase (F), que en este caso correspondió a $F=0$. Se incubaron los frascos por 24 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en atmósfera de CO_2 – aire (5:95 %).

3. A las 24 horas se examinaron los frascos al microscopio para observar si las células se habían adherido al sustrato y si estaban libres de contaminación. Si esto pasaba, se introducían las botellas a la campana y se removía el medio.

Se agregaron nuevamente 25 ml de medio completo y se incubó hasta que alcanzó del 70-80 % de confluencia.

4. Se cosecharon las células adherentes (no se aplicó para la línea K562): siendo desprendidas por acción de una disolución de Tripsina-EDTA (0.05 %).

El procedimiento de tripsinización se llevó a cabo en el siguiente orden:

- a. Se desechó el medio de cultivo al frasco recolector
- b. Se agregaron 5 ml de buffer de fosfato (PBS) y se bañó suavemente el fondo del frasco donde estaba la monocapa de las células
- c. Se desechó al frasco colector el PBS con los restos celulares
- d. Se adicionó 0.8 ml de solución de tripsina en los frascos T25 y 1.5 ml para los frascos T75
- e. Se colocaron en forma horizontal por no más de 2 minutos para que la solución de tripsina cubriera la monocapa
- f. Se levantó el frasco y se dio un ligero golpe a éste para favorecer el desprendimiento de las células
- g. Se agregaron 5 ml del medio de cultivo RMPI-1640 y se observó al microscopio si se completaba la disgregación de las células
- h. Usando una pipeta estéril de 1 ml se transfirió la suspensión de cada una de las líneas celulares a tubos cónicos rotulados
- i. Para la línea K562 se transfirió la suspensión de células, con una pipeta estéril, a un tubo cónico y se centrifugó a 1000 rpm/5 min. Se decantó el sobrenadante y se agregaron 5 ml del medio de cultivo.

5. La inoculación de los frascos se llevó a cabo en la siguiente secuencia: se rotularon los frascos T25 para cada línea, se agregaron 5 ml del medio de

cultivo a todos los frascos y por último se agregaron 50-100 μ l de la suspensión de las células cosechadas.

6. Los frascos para la duplicación se eligieron de la siguiente manera: Se observó al microscopio que los cultivos estuvieran aproximadamente entre el 70-90 % de confluencia, de apariencia saludable, y que pocas de ellas se encontraran flotando, que estuvieran libres de contaminación, que el medio de cultivo tuviera un color rojo ligero.

No se usaron los frascos si el medio de cultivo era rojo intenso, ni cuando el medio fue de color amarillo, porque indicó que probablemente las células no crecieron apropiadamente, o bien por que hubo un crecimiento excesivo de las mismas, respectivamente.

7. Se continuó realizando pases cada cuatro o cinco días dependiendo de la confluencia de los cultivos.

8. Para la realización de los bioensayos, los cultivos se empezaron a usar cuando estos estuvieron en el pase $F=3$, y se desecharon cuando llegó al $F=20$.

9. Los frascos de cultivo inoculados, antes de ser introducidos a la incubadora se rociaron con alcohol etílico, y en el interior de la incubadora se aflojó ligeramente la tapa del mismo para permitir el intercambio de CO_2 .

10. Los desechos de los cultivos fueron colectados en un frasco de 500 ml que contenía 10 ml de disolución de hipoclorito de sodio al 6 %.

4.3.4 Inoculación de las placas

1. Después de cosechar cada una de las líneas celulares, se prosiguió a contar las células en suspensión.

- a. Se agregaron 100 μ l de la suspensión de células y 900 μ l de azul de tripano en microtubos de 1.5 ml, estériles, obteniendo un factor de dilución de 10.
- b. Se agitó suavemente el tubo y se tomaron 10 μ l de la suspensión, se depositaron entre la ranura del hemocitómetro y el cubreobjeto. Se llenaron las dos cámaras del hemocitómetro, se uso el objetivo 10x del microscopio para realizar el conteo.
- c. Se contaron las células que se encontraban entre los cuatro cuadrantes externos de la cámara. Se hizo esta operación dos veces y se obtuvo el promedio de cuatro cuentas de la siguiente manera:

Promedio de células = $[\text{Núm. de células} / 4 \text{ cuadrantes}]_{n1} + [\text{Núm. de células} / 4 \text{ cuadrantes}]_{n2} + \dots + [\text{Núm. de células} / 4 \text{ cuadrantes}]_{n4}$

- d. Para obtener las células/ml se realizó la siguiente operación:

Células/ml = (promedio de células) * (factor de dilución) * 10^4

10^4 = constante de calibración del hemocitómetro

- e. En un frasco estéril se tomó un volumen "x" del inóculo y se agregó medio de cultivo para ajustar la población que se requiere para cada línea, como se indicó en el Cuadro 3.
- f. Con una micropipeta multicanal se agregaron 100 μ l de medio de cultivo en las filas A y H de todas las placas.
- g. Se colocaron 100 μ l de la suspensión celular a tres pozos como se indica en el diseño de placas (Tz, A, B, C) (Figura 5).
- h. Se incubaron las placas inoculadas por 24 horas

Plato cero (Tz): renglones A y H: medio de cultivo sin células
(lectura de fondo:b)

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
U251											
PC-3											
MD											
K562											
HCT											
MCF											
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12

Plato A: renglones A y H: medio de cultivo sin células (b)

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
U251											
U251											
U251											
PC-3											
PC-3											
PC-3											
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12

Plato B: renglones A y H: medio de cultivo sin células (b)

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
HCT											
HCT											
HCT											
MCF											
MCF											
MCF											
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12

Plato C: renglones A y H: medio de cultivo sin células (b)

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
K562											
K562											
K562											
K562											
K562											
K562											
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12

Figura 7. Diagrama de las placas para inoculación de células en citotoxicidad

4.3.5 Adición de los compuestos de prueba

1. En microtubos de 1.5 ml se añadió 0.5 ml del extracto, se agregó 1 ml del vehículo y se llevó a cabo la solubilización de la muestra.
2. Se hicieron las diluciones correspondientes en los medios de cultivo.
3. Se adicionaron 100 μ l de la solución con la muestra de prueba y vehículo empleado.
4. A la placa de tiempo cero (Tz) se le adicionaron 100 μ l de medio de cultivo y a los 10 min se agregó ácido tricloroacético (TCA) frío y se introdujo al refrigerador por una hora, a esta acción se le denomina fijación de las células.
5. Se incubaron las placas con el extracto por 48 horas.

4.3.6 Concentración y distribución de los compuestos en un ensayo primario

1. Se probó la concentración de 50 mgml^{-1} , ésta es una concentración submáxima, que muestra si el compuesto de prueba es o no citotóxico

2. Para las líneas celulares se prepararon 2.5 ml de solución con el compuesto de prueba. En un frasco de vidrio se adicionaron: 487.5 μ l de agua desionizada + 12.5 μ l de disolución del compuesto de prueba + 2 ml de medio de cultivo

Cada muestra tuvo el mismo orden en las tres placas experimentales (A, B y C) por lo que se incluyeron en las placas un total de 10 muestras. Las columnas 11 y 12 llevaron vehículo en medio de cultivo en la misma proporción en la que están las muestras (pozos testigo), y en la columna 12 se puso medio de cultivo (blanco) (Figura 6).

Plato A: Compuesto de prueba (M#)

M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	Veh	med
M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	Veh	med
M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	Veh	med
M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	Veh	med
M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	Veh	med
M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	Veh	med
M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	Veh	med
M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	Veh	med

Figura 8. Diagrama de placa para inoculación de compuestos prueba en ensayos de citotoxicidad

4.3.7 Curvas Concentración – Respuesta

Se prepararon cinco diluciones seriadas y se llenaron las columnas a partir de la menor concentración a la mayor: ejemplo Mx o My: 0.1, 0.31, 1.0, 3.1 y 10 mgml⁻¹ (Figura 7).

En cada placa se colocaron dos compuestos de prueba:

Plato A: Compuestos de prueba

		Mx					My				
10	3.1	1.0	0.31	0.1	veh	med	0.1	0.31	1.0	3.1	10
10	3.1	1.0	0.31	0.1	veh	med	0.1	0.31	1.0	3.1	10
10	3.1	1.0	0.31	0.1	veh	med	0.1	0.31	1.0	3.1	10
10	3.1	1.0	0.31	0.1	veh	med	0.1	0.31	1.0	3.1	10
10	3.1	1.0	0.31	0.1	veh	med	0.1	0.31	1.0	3.1	10
10	3.1	1.0	0.31	0.1	veh	med	0.1	0.31	1.0	3.1	10
10	3.1	1.0	0.31	0.1	veh	med	0.1	0.31	1.0	3.1	10
10	3.1	1.0	0.31	0.1	veh	med	0.1	0.31	1.0	3.1	10

Figura 9. Diagrama de placa para preparación de diluciones seriadas en ensayos de citotoxicidad

4.3.8 Fijación de las células

1. Se fijaron las placas con TCA por 1 hora a 4 °C
2. Se lavaron las placas con agua de la llave 4 veces
3. Las placas se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 horas.

4.3.9 Teñido de las placas

1. Se agregaron 100 μ l de SRB 1 % con la pipeta multicanal y se dejó que el colorante tiñera por 30 minutos.
2. Se lavó en tres ocasiones con ácido acético (1%) usando un dispensador de 8 canales
3. Se dejaron secar las placas a temperatura ambiente

4.3.10 Solubilización del complejo SRB-PTS

1. Se empleó una pipeta multicanal de doce pozos para agregar 100 μ l del buffer TRIZMA
2. Se colocaron las placas por 10 minutos en el agitador de placas
3. Se leyó a 515 nm en un lector de ELISA (Figura 8).

4.3.11 Procesamiento de datos

1. Se obtuvo el promedio de la densidad óptica (DO) de los renglones A y H que corresponde a la lectura de fondo del medio (b): (DO_b)
2. Se obtuvo el promedio de la DO de los 3 renglones por línea celular de los pozos con el compuesto de prueba (DO_t), así como la del vehículo (DO_v)
3. Se obtuvo el promedio de la DO cada línea celular de la placa de tiempo cero (Tz):DO_{tz}

DO_{pf} = densidad óptica de proteínas fijadas al pozo

DO_v = densidad óptica real del grado de citotoxicidad

4. Se realizaron las siguientes operaciones para cada fila y línea celular para las muestras: $DO_{pf} = (DO_t) - (DO_b)$ para el vehículo: $DO_{pf} = (DO_{vt}) - (DO_b)$

$DO_r = DO_{pf} - DO_t$

La densidad óptica es proporcional al crecimiento celular e inversamente proporcional al grado de citotoxicidad de un compuesto prueba (Monks *et al.*, 1991).

5. La citotoxicidad se reporta como el porcentaje de inhibición del crecimiento celular y se determina de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\% \text{Inhibición del crecimiento} = 100 - (DO_r \text{ (muestra)} / DO_r \text{ (vehículo)}) * 100$$

6. Para determinar la concentración que inhibe el 50 % del crecimiento celular (IC₅₀), se hace una regresión lineal de los porcentajes de inhibición contra el logaritmo de la concentración.

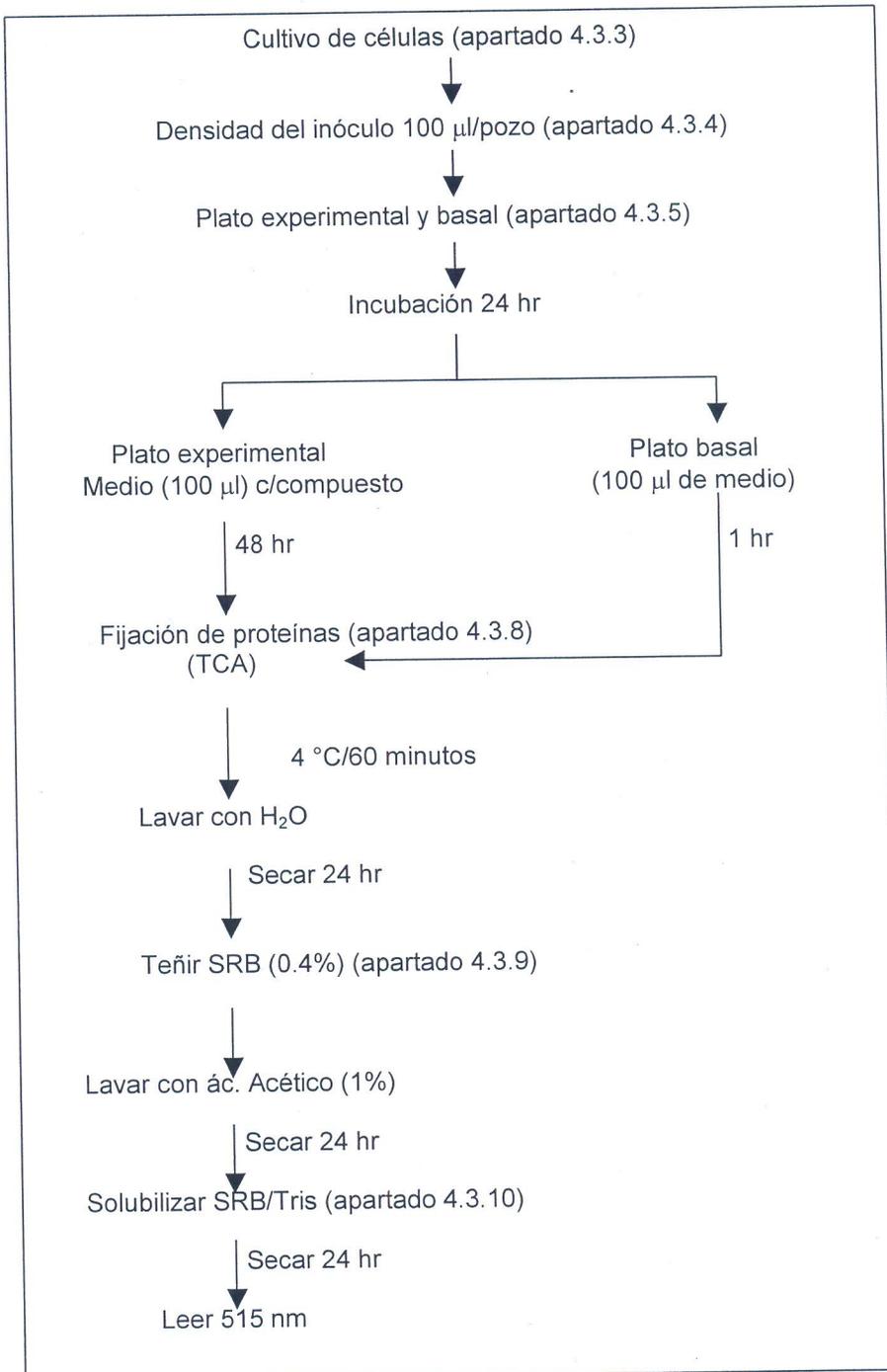


Figura 10. Metodología del ensayo de citotoxicidad (Monks *et al.*, 1991).

4.4 Evaluación de la actividad antioxidante

4.4.1. Preparación de extractos

El material vegetal (hoja y raíz) se secó a temperatura ambiente y se molió mecánicamente para obtener tres extractos: butanólico (BuOH-H) y acuoso liofilizado (LA-H) ambos se prepararon a partir de hoja y el butanólico (BuOH-R) a partir de raíz. Cabe mencionar que se eligieron estos extractos debido a la naturaleza polar, de los flavonoides (compuestos con actividad antioxidante y atrapadora de radicales libres) (Miura e Isao, 1998).

Para la preparación del extracto acuoso, la hoja se maceró durante 24 h a temperatura ambiente. Para eliminar el contenido de agua, se congeló la muestra a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y después se liofilizó por 72 horas. Los extractos orgánicos se obtuvieron mediante una maceración del material vegetal hoja y raíz por separado, con n-butanol por 3 días a temperatura ambiente, el extracto crudo resultante se obtuvo evaporando el disolvente a presión reducida en un rotavapor Büchi.

4.4.2 Bioensayo para la evaluación de la actividad antioxidante

El ensayo de la actividad antioxidante se llevó a cabo según la metodología propuesta por Blois (1958). En una cámara de micropozos se colocaron las

diferentes concentraciones de los extractos con una disolución etanólica al 5×10^{-4} M y 100 μ M de disolución etanólica de DPPH al 0.2 %. Se incubaron a 37 °C por 30 min, y posteriormente, se midieron las absorbancias en un espectrofotómetro Bio-Tek Instrument Elx 808 Ultramicroplate reader, a 515 nm. Esto se llevó a cabo por triplicado. Se determinó el porcentaje de inhibición de cada compuesto por comparación con una disolución blanco de DPPH en etanol a la misma concentración.

4.4.3 Análisis estadístico

Se calculó el valor de la concentración inhibitoria media (IC_{50}) que se define como la concentración de la muestra requerida para atrapar el 50 % de radicales DPPH libres. El porcentaje de reducción del DPPH, se calculó empleando la siguiente ecuación.

$$\text{El \% de reducción de DPPH} = (C-E/C)100$$

donde: C = absorbancia de la disolución de DPPH (100 ppm)

E = absorbancia de la mezcla de DPPH 100 ppm/compuesto problema

Se comparó con la IC_{50} del α -tocoferol que es de 17.07 ppm, usado como estándar

Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANAVA) seguida de una prueba de Dunett, para aislar los grupos con diferencia significativa para valor de $p \leq 0.05$ y para $p \leq 0.01$, se consideraron como diferencias significativas con respecto al control elegido.

Las evaluaciones de la actividad antioxidante y citotóxica de los extractos seleccionados se realizaron en el Laboratorio de Pruebas Biológicas del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Actividad alelopática

5.1.1 Porcentaje de germinación *in vitro*

Al evaluar la fitotoxicidad del extracto acuoso mediante el porcentaje de inhibición de la germinación en las dos especies de semillas monocotiledóneas se encontró que en trigo y en arroz existen diferencias estadísticas entre tratamientos con respecto al testigo. En la concentración mas baja de 0.5 %, se observó un porcentaje de inhibición de la germinación en arroz del 11.0 % y en trigo del 4.6 %. Al probar el mismo extracto en las semillas dicotiledóneas de lechuga y de amaranto, desde la concentración del 2.0 %, se encontraron diferencias estadísticas entre tratamientos con respecto al testigo con porcentajes de inhibición del 31.0 y 10.6 %, respectivamente (Anexo A) (Figura 9).

Al comparar estos resultados con los obtenidos en la concentración mas alta (5.0 %) del extracto acuoso en las cuatro especies, se observó que las semillas de lechuga y amaranto presentaron 98.5 y 90.6 % de inhibición; en arroz y en trigo 17.0 y 33.5%, respectivamente. Es importante hacer notar el incremento brusco del porcentaje de inhibición de la germinación únicamente en lechuga y amaranto a partir de las concentraciones mas altas (4.0 y 5.0 %) (Figura 9).

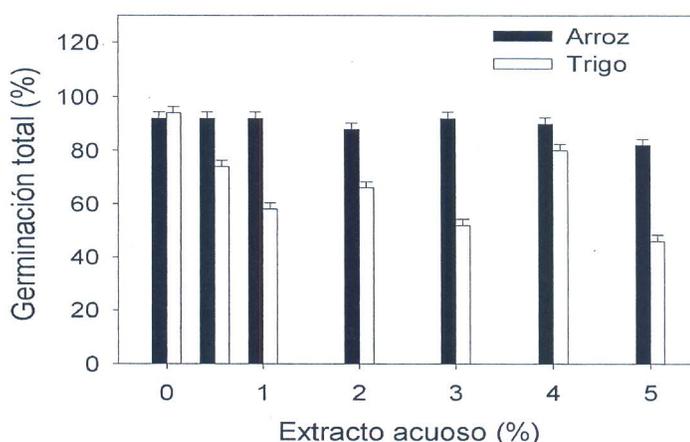
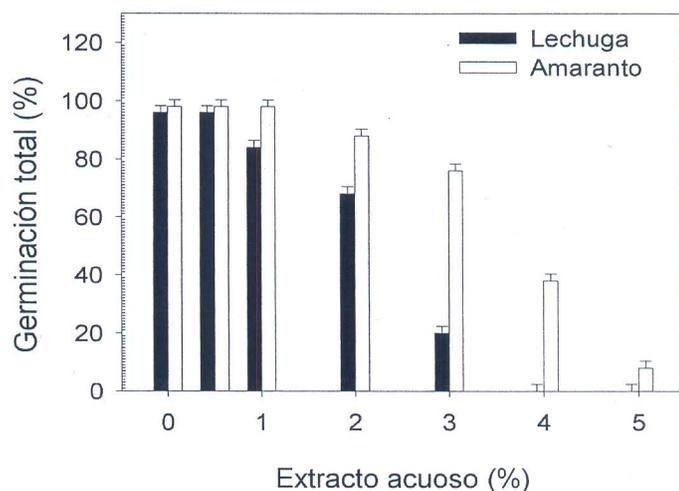


Figura 11. Efecto del extracto acuoso de *P. alliacea* en la germinación de las cuatro especies probadas. Tukey ($p= 0.05$).

Existen numerosas investigaciones realizadas con extractos de diversas especies que señalan consistentemente el efecto fitotóxico y alelopático de estas mezclas y sus componentes; entre las que destacan: *Artemisia princeps* (Bong-Seop y Kyeong, 1992), *Delonix regia* (Chou y Lih-Ling, 1992), *Melilotus messanensis* (Macias *et al.*, 1997), sorgo (Einhelling y Souza, 1992), y algunas crucíferas (Vanghn y Boydston, 1997). Específicamente en México, se ha trabajado con *Piper auritum* (Anaya *et al.*, 1974), *Ambrosia cumanensis* (Anaya

y Del Amo, 1978), *Ipomea tricolor* (Anaya et al., 1990), *Malmea depressa* y *Stauranthus perforatus* (Anaya et al., 1994) y *Metopium brownei* (Anaya et al., 1999), entre otras. Al respecto, Zavala (2003) en un estudio posterior probó varios extractos, entre ellos el extracto de diclorometano de raíz de *P. alliacea* sobre semillas de lechuga y amaranto.

Al comparar ambos estudios, se observó que Zavala (2003) obtuvo un porcentaje de inhibición de la germinación menor en lechuga y amaranto al encontrado en la presente investigación.

Un estudio semejante realizado por Chou y Yang (1982), en donde evaluaron la toxicidad de extractos acuosos de hojas de bambú (*Phyllostachys edulis*) y de una conífera (*Cryptomeria japonica*) en semillas de lechuga, arroz y el pasto rye grass, reportó alta toxicidad de los preparados de bambú a la concentración del 5.0 %, en contraste con lo obtenido en la conífera; por lo tanto, se puede inferir que el extracto acuoso de hoja de *P. alliacea* resultó fitotóxico también en la misma concentración. Las diferencias en la germinación observadas en trigo, arroz, lechuga y amaranto también coinciden con lo descrito por Chou y Yang (1982), en donde señalan que al medir el crecimiento radicular y las germinaciones encontraron no sólo diferencias entre variedades, sino también entre especies, esto también se observó en la presente investigación.

Con el extracto metanólico se observaron diferencias significativas importantes entre tratamientos y entre el testigo para las cuatro especies. A diferencia de las

restantes, en la semillas de lechuga se presentó el mayor porcentaje de inhibición (97.6 %) desde la concentración mas baja de 0.5 %, en cambio fue de 6.0, 10.0 y 6.6 % para arroz, trigo y amaranto, respectivamente (Anexo B) (Figura 10).

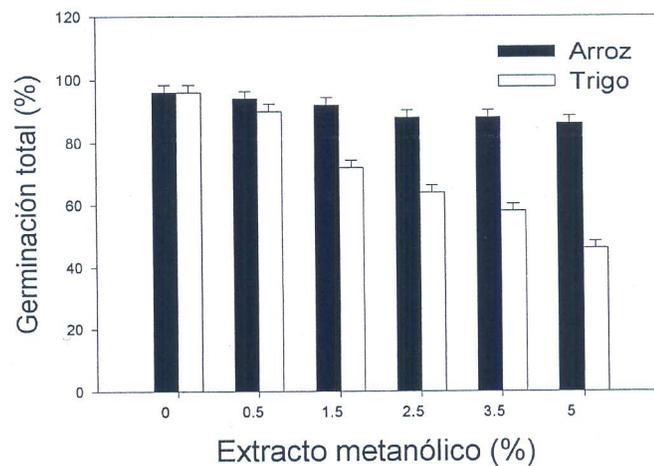
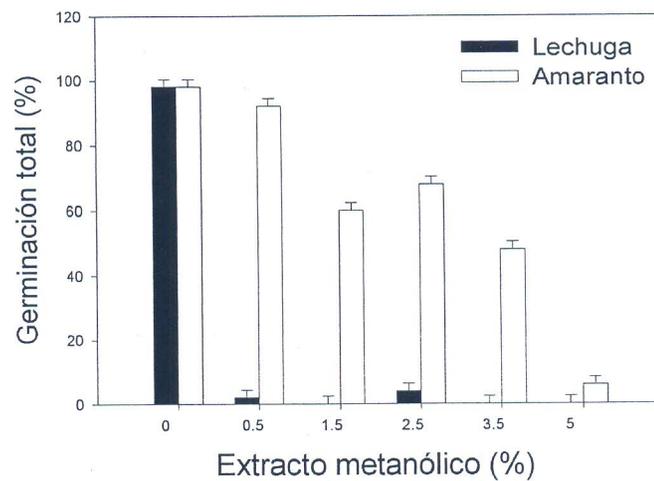


Figura 12. Efecto del extracto metanólico de *P. alliacea* en la germinación de las cuatro especies probadas. Tukey ($p= 0.05$).

Con respecto, al extracto de diclorometano no se observaron diferencias estadísticas significativas en arroz y trigo, en contraste con lechuga y amaranto, donde se encontraron diferencias a partir de la concentración mas baja con un porcentaje de inhibición para las dos últimas especies de 27.0 y 31.6 %, respectivamente. Como en el extracto acuoso, en este caso también se disparó el porcentaje de inhibición de la germinación en lechuga y amaranto pero a partir de las concentraciones de 1.5 y 2.5 %, respectivamente (Anexo C) (Figura 11).

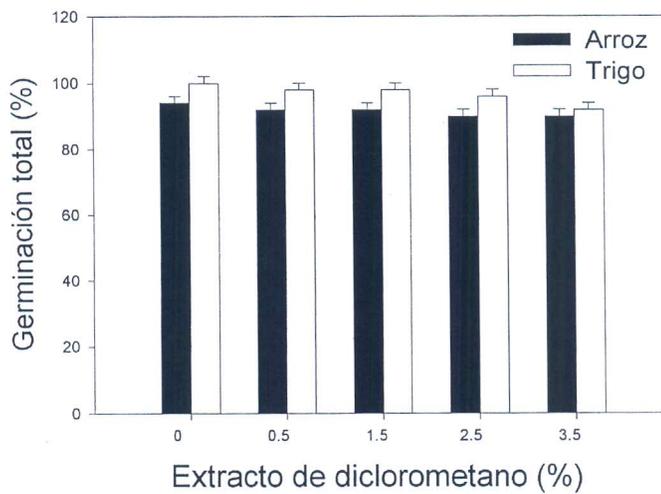
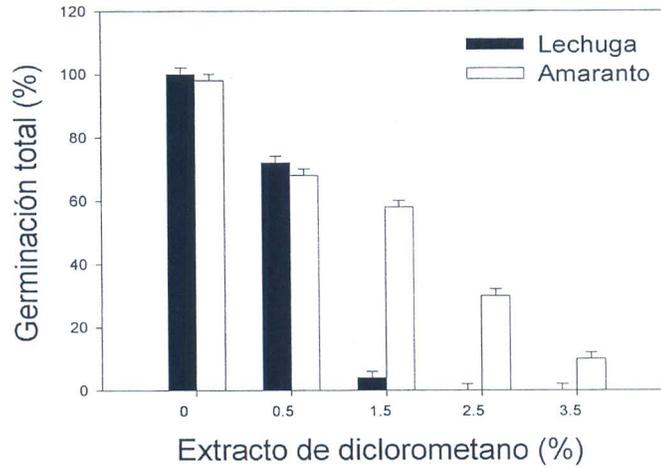


Figura 13. Efecto del extracto de diclorometano de *P. alliacea* en la germinación de las cuatro especies probadas. Tukey ($p= 0.05$).

Como observación adicional, al evaluar el efecto del extracto acuoso, en el Cuadro 4 se puede comparar el porcentaje de plántulas en desarrollo con el porcentaje de germinación en trigo, arroz, lechuga y amaranto. Se observó que de las semillas de trigo y lechuga que germinaron, no todas se encontraron en condiciones óptimas de desarrollo, es decir, ausencia del desarrollo del meristemo apical de raíz y de hojas primarias, no así para los extractos

orgánicos. En el extracto metanólico hubo germinación y desarrollo de las plántulas de arroz, lechuga y amaranto, y solo se afectó la longitud de la raíz y la parte aérea de trigo; en el extracto de diclorometano no se observaron estos efectos.

Cuadro 4. Diferencias en la germinación total y el desarrollo de plántulas de cuatro especies por el extracto acuoso de *P. alliacea*.

Conc. (%)	Extracto acuoso							
	Arroz		Trigo		Lechuga		Amaranto	
	GT (%)*	Plántulas en desarrollo (%)	GT (%)*	Plántulas en desarrollo (%)	GT (%)*	Plántulas en desarrollo (%)	GT (%)*	Plántulas en desarrollo (%)
0.0	93.0a	100.0a	95.5a	100.0a	96.5a	100.0a	98.0a	100.0a
0.5	92.0ab	100.0a	78.5ab	92.3ab	96.5a	100.0a	99.5a	100.0a
1.0	93.0a	100.0a	58.0ab	88.6b	85.0a	100.0a	99.5a	100.0a
2.0	88.0ab	100.0a	67.0ab	94.7ab	69.0b	44.2b	89.5ab	100.0a
3.0	92.0ab	100.0a	52.0b	18.3c	20.5c	0.0c	76.5b	100.0a
4.0	91.4ab	100.0a	81.0ab	2.5c	1.5d	0.0c	39.0c	100.0a
5.0	82.5b	94.5b	46.0b	0.0c	1.5d	0.0c	9.5d	100.0a

*En sentido vertical las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p=0.05$).

Al comparar el efecto fitotóxico sobre la germinación de los tres extractos en la cuatro especies, se señala que el extracto acuoso resultó ser el menos tóxico para todas; en lo que se refiere a los extractos orgánicos, el metanólico fue mas tóxico para las semillas de lechuga y el extracto de diclorometano resultó mas tóxico para amaranto. De los resultados anteriores también se puede inferir que la germinación de las semillas de lechuga fue la que se vio mas afectada por los tres extractos, siendo posiblemente las mas sensible, además el extracto de

diclorometano afectó selectivamente a las dicotiledóneas, debido quizás: 1) a la presencia de metabolitos de diferente naturaleza química, 2) a su capacidad de penetración en la semilla y tejido, 3) a la dispersión y acumulación en los compartimentos intracelulares, o 4) a la diferente solubilidad de las fracciones en agua. Al respecto, se puede inferir que por la naturaleza menos polar del extracto con mayor actividad en este caso el extracto de diclorometano, el o los metabolitos responsables de la actividad fitotóxica son de naturaleza lipofílica lo cual puede facilitar la penetración a través de los componentes celulares.

Cabe mencionar que en la presente investigación las condiciones ambientales (temperatura, humedad e intensidad luminosa) se mantuvieron bajo riguroso control. La literatura señala que los factores físicos pueden interactuar sinérgicamente con sustancias con actividad alelopática para producir interacciones más complejas; sin embargo para el presente estudio éstas se pueden descartar.

5.1.2 Velocidad de germinación acumulada *in vitro*

Se calculó adicionalmente la velocidad de germinación acumulada (VGA) (Chiapusio *et al.*, 1997), encontrando que a partir de la concentración del 2.0 % para el extracto acuoso hubo solamente en amaranto una disminución de la VGA. Los extractos orgánicos: metanol y diclorometano afectaron por igual y drásticamente las semillas de lechuga y amaranto desde la concentración más baja 0.5 y 1.5 %, respectivamente. Finalmente, trigo y arroz mostraron un leve descenso al tratarlos con ambos extractos (Figuras 12, 13 y 14), estos

resultados coincidieron con los observados para G_t , debido a que la comparación de medias de tukey para cada índice presentó un comportamiento similar.

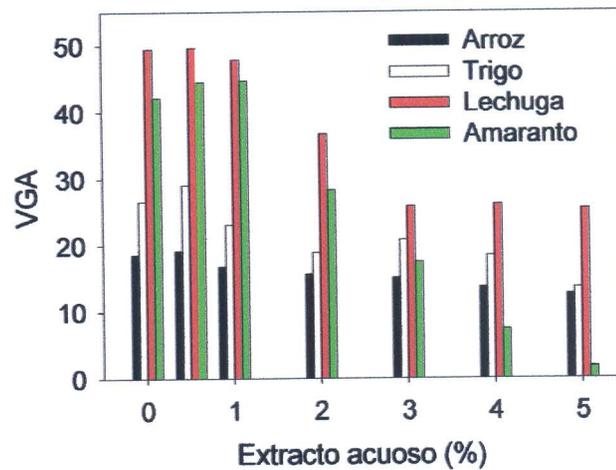


Figura 14. Efecto del extracto acuoso de *P. alliacea* en la velocidad de germinación acumulada (VGA) de cuatro especies vegetales.

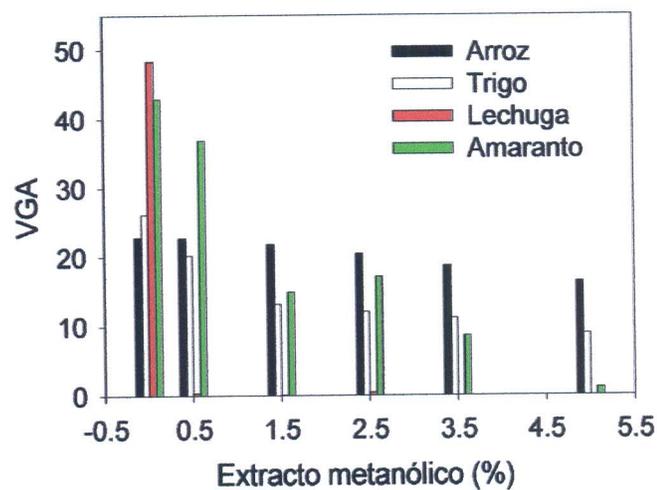


Figura 15. Efecto del extracto metanólico de *P. alliacea* en la velocidad de germinación acumulada (VGA) de cuatro especies vegetales.

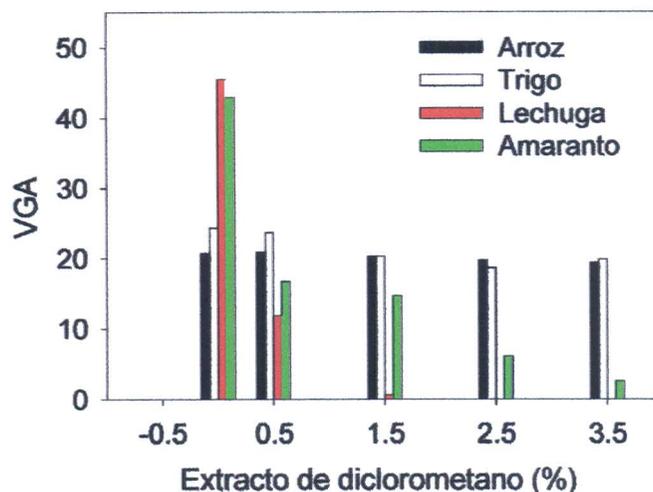


Figura 16. Efecto del extracto de diclorometano de *P. alliacea* en la velocidad de germinación acumulada (VGA) de cuatro especies vegetales.

Por otro lado, aunque se observó muy baja fitotoxicidad del extracto acuoso en comparación con los orgánicos, el primero tiene menos implicaciones ecológicas, razón por la cual existen pocos estudios realizados con extractos de naturaleza orgánica, es decir, los preparados acuosos por su fácil obtención pueden ser empleados por su actividad fitotóxica y bajo costo por pequeños agricultores. Aunque en la búsqueda de nuevos herbicidas, los estudios con extractos orgánicos permiten extraer mayor diversidad de metabolitos, en algunos casos con mayor potencial fitotóxico que las mezclas, estos pueden servir de modelo para la síntesis de nuevos fitotóxicos naturales.

5.1.3 Bioensayo en suelo

En la Figura 15 se muestran los resultados de la actividad alelopática del extracto acuoso y hoja molida mezclados con suelo en semillas de lechuga. Los

análisis estadísticos mostraron la ausencia de diferencias significativas en el porcentaje de germinación entre tratamientos y el testigo, para ambos bioensayos. En cambio se presentan las diferencias estadísticas significativas del desarrollo de plántulas de lechuga entre tratamientos y el testigo. A diferencia de los efectos observados *in vitro*, en los bioensayos realizados en suelo se desarrollaron las plántulas de manera óptima, lo que permitió inferir que el suelo es quizá una variable determinante en el efecto alelopático de algunos extractos en el proceso de germinación, lo cual coincide con lo que señalan Chou y Yang (1982).

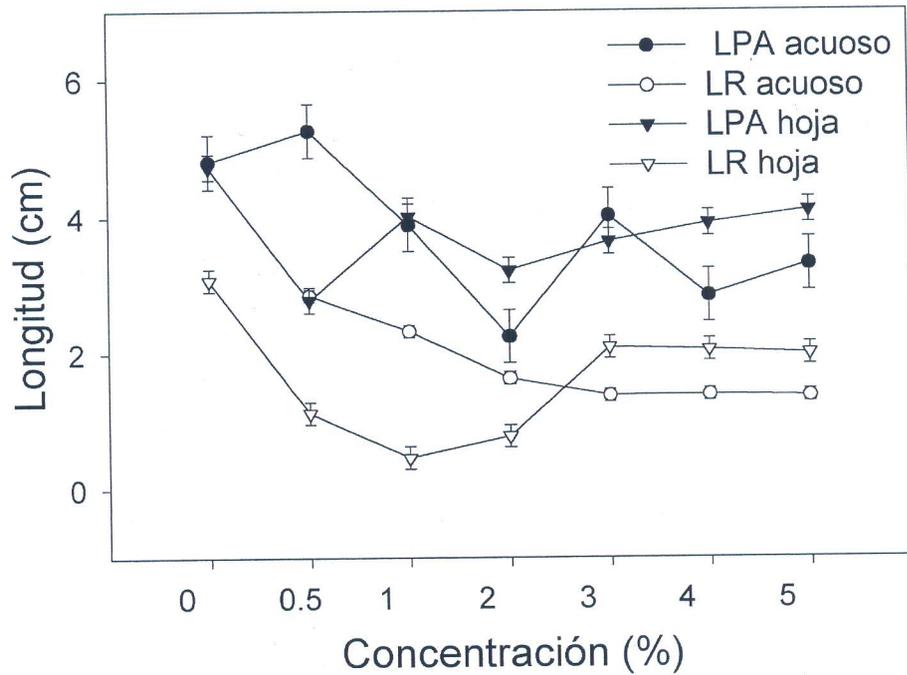
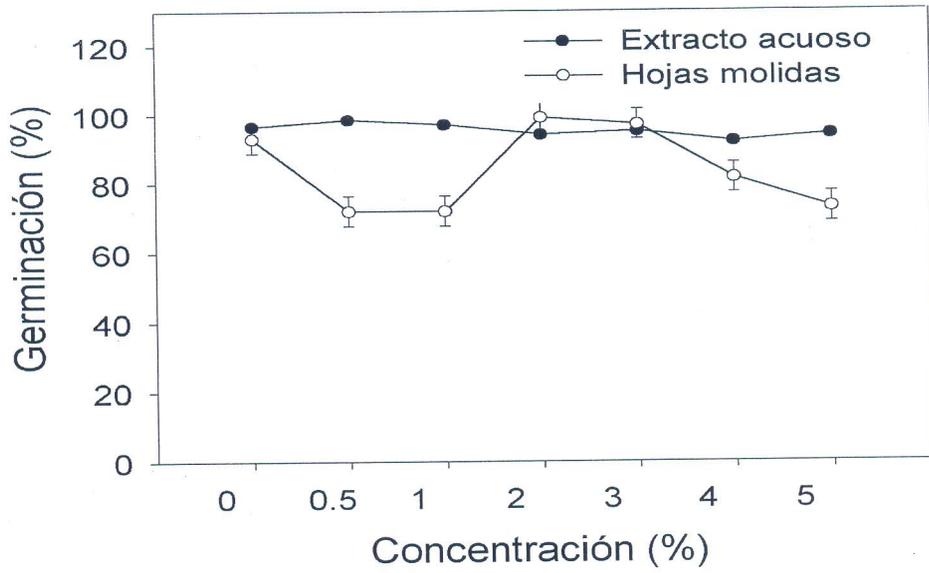


Figura 17. Efecto del extracto acuoso y hoja molida de *P. alliacea* en la germinación de semillas (A) y el desarrollo de plántulas (B) de lechuga en suelo.

Adicionalmente, Chou y Kuo en (1986) reportaron que la mimosina aislada de hojas de *Leucaena leucocephala*, inhibe la división celular y la síntesis del DNA, RNA y proteínas de *Paramecium tetraurellia*, presentando un efecto fitotóxico importante en semillas de lechuga, arroz y algunas especies de *Acacia*, *Casuarina*, *Liquidambar* y *Mimosa*. La literatura también señala que *P. alliacea* presenta una probable inhibición de la síntesis de DNA durante la división celular, resultado observado al evaluar el efecto citotóxico en el desarrollo del embrión de erizo de mar (*Lytechinus variegatus*) (Malpezzi *et al.* (1994), lo cual podría justificar el efecto fitotóxico descrito en la presente investigación, como lo señalan Chou y Kuo en 1986.

5.2 Efecto citotóxico

En las pruebas de citotoxicidad que se realizaron con los extractos BuOH-H, CH₂Cl₂ -H y CH₂Cl₂ -R y LA-H en las cinco líneas celulares (de próstata, mama, colon, leucemia y SNC) se hicieron las siguientes observaciones: el extracto CH₂Cl₂ -R mostró mayor actividad en todas las líneas celulares, excepto en la línea de cáncer de mama. El porcentaje de inhibición fue de 81.1 y 62.2 % a la concentración de 50 mgml⁻¹ para las líneas de leucemia y próstata, respectivamente, lo cual coincide los resultados etnobotánicos obtenidos por Pérez (2001) donde observó que el extracto acuoso de la planta completa de *P. alliacea* inhibía el crecimiento celular en cáncer de prostata. El extracto acuoso liofilizado mostró también una elevada citotoxicidad, con un porcentaje de inhibición del 70.1 % únicamente para la línea de leucemia (Cuadro 5).

Cuadro 5. Actividad citotóxica de los extractos acuoso, butanólico y de diclorometano de hoja y de diclorometano de raíz de *P. alliacea*.

Línea celular	Extractos			
	LA-H	BuOH -H	CH ₂ CL ₂ -R	CH ₂ CL ₂ -H
U251 (SNC)				
Prom	0.808	1.190	0.987	1.206
t-b	0.745	1.136	0.934	1.145
t-tz	0.434	0.717	0.515	0.726
%gl	24.791	13.437	37.764	12.330
PC-3 (Próstata)				
Prom	0.870	1.784	1.138	1.475
t-b	0.807	1.730	1.085	1.414
t-tz	0.486	1.141	0.496	0.825
%gl	24.476	13.074	62.186	37.154
K562 (Leucemia)				
Prom	1.047	1.619	0.602	1.446
t-b	0.596	1.507	0.497	1.307
t-tz	0.397	1.331	0.321	1.131
%gl	70.078	21.594	81.095	33.412
HCT-15 (Cólon)				
Prom	na	1.722	1.342	1.743
t-b	na	1.663	1.256	1.659
t-tz	na	1.089	0.682	1.085
%gl	na	10.870	44.149	11.211
MCF-7 (mama)				
Prom	1.693	1.778	1.917	2.350
t-b	1.677	1.923	1.876	2.318
t-tz	1.628	1.863	1.790	2.234
%gl	1.288	1.262	1.189	1.632
%gl	23.391	6.634	12.032	-20.740

*Todos los extractos se evaluaron a una concentración de 50 mgml⁻¹. n.a.= no analizados, prom= lectura promedio de tres repeticiones, t-b= lectura promedio menos lectura de fondo, t-tz= lectura promedio menos lectura del plato cero, %gl= porcentaje de inhibición del crecimiento celular.

La evaluación del LA-H a una mayor concentración (100 mgml⁻¹) permitió observar un porcentaje de inhibición mayor en las líneas celulares de: sistema nervioso central y próstata (40.0 y 33.6 %, respectivamente). Se confirmó la elevada citotoxicidad en la línea de leucemia, con un porcentaje de citotoxicidad del 70.1 % y nula citotoxicidad en las líneas celulares de mama y cólon (Cuadro 6).

Cuadro 6. Actividad citotóxica del extracto acuoso de hoja liofilizado de *P. alliacea*.

Línea celular	Extracto Liofilizado acuoso de hoja					
	0.50 mgml ⁻¹	12.5 mgml ⁻¹	25 mgml ⁻¹	50 mgml ⁻¹	75 mgml ⁻¹	100 mgml ⁻¹
U251 (SNC)						
Prom	1.556	1.561	1.542	1.508	1.404	1.424
t-b	1.460	1.483	1.471	1.432	1.332	1.342
t-tz	1.070	1.093	1.081	1.042	0.942	0.952
%gl	PROM	1.082	0.043	2.604	40.647	40.049
PC-3 (Próstata)						
Prom	2.290	2.202	2.149	1.953	1.762	1.742
t-b	2.194	2.124	2.078	1.877	1.691	1.660
t-tz	1.587	1.518	1.471	1.270	1.084	1.053
%gl	PROM	1.552	5.215	19.961	31.689	33.632
K562 (Leucemia)						
Prom	2.595	2.005	2.347	2.230	2.089	1.405
t-b	2.451	1.791	2.190	2.113	1.954	0.596
t-tz	2.237	19.930	1.976	1.899	1.740	0.398
%gl	PROM	2.014	11.680	5.722	13.580	70.078
HCT-15 (Cólon)						
Prom	1.570	1.568	1.580	1.513	1.468	1.483
t-b	1.383	1.457	1.444	1.371	1.291	1.323
t-tz	1.174	1.245	1.235	1.163	1.083	1.115
%gl	PROM	1.210	-2.133	0.982	7.768	5.042
MCF-7 (mama)						
Prom	2.563	2.620	2.583	2.413	2.435	2.389
t-b	2.376	2.506	2.447	2.271	2.259	2.230
t-tz	1.995	2.125	2.066	1.890	1.878	1.849
%gl	PROM	2.060	-0.281	5.268	-59.960	-57.490

prom= lectura promedio de tres repeticiones, t-b= lectura promedio menos lectura de fondo, t-tz= lectura promedio menos lectura del plato cero, %gl= porcentaje de inhibición del crecimiento celular.

Los resultados de la presente investigación coinciden con los reportes previos realizados por Malpezzi *et al.* (1994). El autor menciona que la fracción butanólica de la raíz fue citotóxica en el modelo de óvulo de erizo de mar, a diferencia, en este caso fue realizado el estudio *in vitro* (líneas celulares) con extracto de diclorometano de raíz. Los extractos restantes, butanólico de hoja y

de diclorometano de hoja no resultaron activos para las líneas celulares probadas utilizando el ensayo de sulforrodamina B.

Al respecto, se han detectado compuestos sulfurados de diversa estructura química en raíz (bencilsulfuros, sulfóxidos de prolina y de cisteína: petiverina A y B) (Cohelo *et al.*, 2001; De Sousa, 1990; Kubec y Musah, 2001) en comparación a los identificados en hoja, únicamente: petiverina A y B (Kubec y Musah, 2001). Según Block (1992) algunos polisulfuros insaturados presentes en las especies *Allium* spp. inhiben la promoción y desarrollo de tumores, así como la reducción de nitritos en el jugo gástrico de ratones.

5.3 Efecto antioxidante

Al evaluar la actividad antioxidante de los extractos butanólico y acuoso de hoja y butanólico de raíz de *P. alliacea* se encontró que el extracto butanólico de hoja (BuOH-H), mostró el mayor efecto antioxidante seguido del extracto butanólico de raíz (BuOH-R). La actividad antioxidante del extracto acuoso liofilizado de hoja fue muy baja, posiblemente debido a la baja solubilidad que presentó el extracto al mezclarlo con la disolución etanólica de DPPH (Cuadro 7).

Cuadro 7. Actividad antioxidante de extractos butanólico y acuoso de hoja y butanólico de raíz de *P. alliacea*

Extracto	Concentración (ppm)	Reducción (%)
BuOH -R	10	1.699
	100	13.425
	1 000	74.301
BuOH -H	10	2.54
	100	21.432
	1 000	92.892
LA-H	10	0.589
	100	3.376
	1 000	9.110

BuOH - R = extracto butanólico de raíz, BuOH - H = extracto butanólico de hoja, LA - H = extracto acuoso liofilizado de hoja

El extracto butanólico de hoja resultó ser el mas activo en el primer ensayo, por lo que se procedió a ampliar el número de concentraciones en el mismo rango para realizar la curva dosis - respuesta, observándose que a una concentración de 316.23 ppm el porcentaje de reducción del DPPH fue de 56.41 ± 5.30 y a la concentración de 1000 ppm el porcentaje de reducción del DPPH fue de 90.20 ± 1.72 (Cuadro 8).

Cuadro 8. Concentración inhibitoria media del extracto butanólico de hoja de *P. alliacea*

Concentración (ppm)	$A_{515\text{ nm}}$	Reducción del DPPH (%)	IC ₅₀ (ppm)
0	0.593 ± 0.01	-	
100	$0.474 \pm 0.02^*$	20.19 ± 3.17	
177.83	$0.390 \pm 0.03^{**}$	34.44 ± 5.05	264.54 ± 32.09
316.23	$0.260 \pm 0.03^{**}$	56.41 ± 5.30	
562.34	$0.126 \pm 0.02^{**}$	78.76 ± 4.07	
1000	$0.058 \pm 0.01^{**}$	90.20 ± 1.72	

Los valores en sentido vertical muestran diferencias significativas de $p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.01$ (**) en la prueba de Dunett.

La IC_{50} observada para el extracto BuOH-H fue de 264.54 ± 32.09 ; superior a la descrita para el estándar α -tocoferol (17.07), lo cual indica que es mucho menor la capacidad atrapadora del radical DPPH del extracto BuOH-H a la del estándar es decir, los extractos BuOH-H y BuOH-R resultaron ser débiles atrapadores de radicales libres comparados con el α -tocoferol (Figura 18).

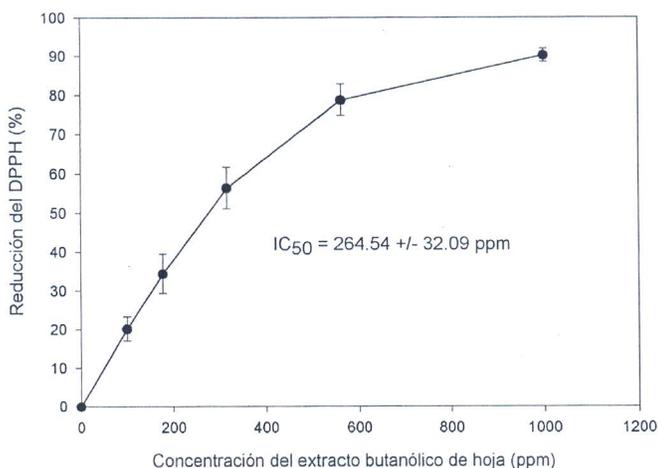


Figura 18. Curva de valoración antioxidante del extracto butanólico de hoja de *P. alliacea*.

Aunque se ha reportado que la actividad antioxidante de los flavonoides corresponde a una relación estructura - actividad por la presencia de ciertas características estructurales en la molécula; existen otros flavonoides que presentan la actividad atrapadora de radicales libres y no cumplen con las características estructurales deseadas, como son: a) que tengan una doble ligadura en 3 conjugada con un grupo 4-oxo en el anillo C; b) un radical

hidroxilo en 3 y 5 (anillos A y C), con un grupo 4-oxo, y c) que presenten un grupo o-hidroxi en el anillo B (Figura 19) (Miura e Isao, 1998).

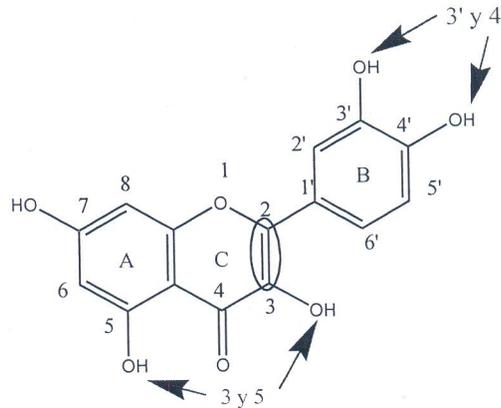


Figura 19. Estructura antioxidante típica de los flavonoides (quercetina).

De los tres extractos evaluados (BuOH-H; BuOH-R y LA-H), el preparado butanólico de hoja fue el que presentó mayor actividad antioxidante en comparación al de raíz, el acuoso de hoja mostró actividad muy baja debido a la poca solubilidad en el disolvente empleado para el análisis. Al respecto, la literatura señala la presencia de flavonoides en hoja, no identificados en raíz (Delle Monache y Cuca, 1992).

Por lo tanto, puede inferirse que la actividad antioxidante encontrada en ambos extractos de *P. alliacea* podría deberse a la presencia de flavonoides reportados en la literatura, aunque éstos no tienen las características estructurales

deseadas (Figura 20), como se han descrito con otros flavonoides (Pincemal y Deby, 1982).

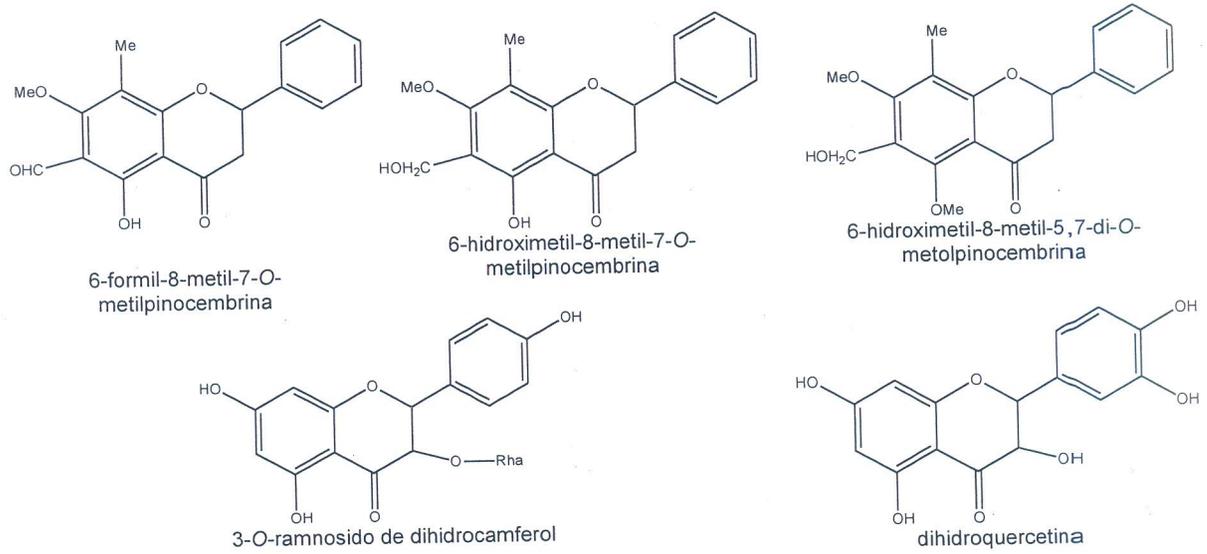


Figura 20. Flavonoides presentes en *Petiveria alliacea* L. (Delle Monache y Cuca, 1992).

VI. CONCLUSIONES

De la presente investigación se puede concluir que los extractos probados de *Petiveria alliacea* resultaron moderadamente fitotóxicos.

La evaluación de las variables: germinación total (Gt) y velocidad de germinación acumulada (VGA) permitieron detectar actividad fitotóxica moderada de los extractos orgánicos (metanólico y de diclorometano) de hoja en las semillas de lechuga y amaranto. El extracto acuoso resultó menos tóxico que los orgánicos; el extracto menos polar (diclorometano) fue el mas tóxico.

En las cuatro especies de semillas probadas, las semillas de lechuga fueron las mas sensibles, frente a los tres extractos probados.

El extracto acuoso afectó principalmente la germinación de las semillas de trigo y lechuga, algunas de las que germinaron presentaron necrosis en sus tejidos, a diferencia de las de arroz y amaranto que se desarrollaron normalmente.

En los estudios realizados con hoja molida y con extracto acuoso mezclado con suelo, no se observó inhibición en la germinación total de semillas de lechuga; en ambos estudios se afectó significativamente la longitud de la parte aérea de las plántulas de lechuga.

En las cinco líneas celulares probadas (SNC U251; próstata PC-3; leucemia K562; colon HCT-15; mama MCF-7), los extractos acuoso de hoja y de diclorometano de raíz resultaron citotóxicos en un porcentaje 70.1 y de 81.1

respectivamente, para la línea de leucemia. El extracto de diclorometano de raíz también afectó la línea celular de próstata considerablemente.

En la evaluación de la actividad antioxidante, el extracto butanólico de hoja fue el más efectivo en la reducción del DPPH, con un porcentaje de reducción del 90.2, seguido del extracto butanólico de raíz, el cual presentó un porcentaje de reducción del 74.3, a una concentración en ambos casos de 1 000 ppm.

De la investigación se puede concluir que al menos algunos de los extractos de la especie *Petiveria alliacea* mostraron actividad alelopática, antioxidante y citotóxica. Es necesario señalar la importancia de aislar e identificar posteriormente los metabolitos presentes en cada uno de los extractos que presentaron actividad biológica, con la finalidad de detectar cuales son los principios activos de las mezclas evaluadas.

VII. LITERATURA CITADA

- Anaya A., L., M. C. Siade, S. Chatelain. 1974. Allelopathic activity of the essential oil of *Piper auritum*, In: Sixth International Congress of Essential Oils. Illinois, E.U, pp27-28.
- Anaya A., L., S. Del Amo. 1978. Allelopathic potencial of *Ambrosia cumanensis* H. B. K. (Compositae) In: a tropical zone of México. Journal of Chemical Ecology 4:289-304.
- Anaya A., L., M. R. Calera, R. Pereda-Miranda. 1990. Allelopathic potential of compounds isolated from *Ipomea tricolor* Cav. (Convolvulaceae). Journal of Chemical Ecology 16:2145-2152.
- Anaya A., L., B. E. Hernández-Bautista, H. R. Pelayo-Benavides. 1994. Allelopathy in Mexican plants: more recent studies. In: Allelopathy Organisms, processes, and applications. American Chemical Society Symposium Series 582. Washington, D. C. USA. pp. 224-241.
- Anaya A., L., R. Mata, F. Rivero-Cruz. 1999. Allelochemical potential of *Metopium brownei* (Jacq.) Urban (Anacardiaceae). Journal of Chemical Ecology 25:141-156.
- Anaya A., L. 2003. Alelopatía. In: Ecología Química. Editorial Plaza y Valdés, México D.F. pp. 255- 298.
- Anónimo a. 1984. Instituto Nacional sobre Recursos Bióticos Xalapa-Veracruz. Phytolacaceae. Flora de Veracruz. Fascículo 36. México. 36p.
- Anónimo b. 2004. Missouri Botanical Garden. Specimen Data Base <http://www.Missouribotanicalgarden.htm> 12/04/2004.
- Anónimo c. 1996. IAS. International Allelopathy Society. Proceedings of the First World Congress on Allelopathy. Cádiz España, Septiembre pp. 59-60.
- Anónimo d. 1976. Reglas internacionales para ensayos de semillas. Ministerio de Agricultura. Dirección General de Producción Agraria. Instituto Nacional de

Semillas y Plantas de Vivero. Carr. De la Coruña Km 7.5 Madrid España pp. 56-59.

Anónimo e. 2004. Statistical Analysis System. SAS/STAT User's Guide (Release 8.20) Cary, NC, USA. SAS Inst. Inc.

Berger L., C. A. Barrientos, A. Cáceres. 1998. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections II. Activity of extracts and fractions of five Guatemalan plants against *Trypanosoma cruzi*. Journal of Ethnopharmacology 62:107-115.

Block E. 1992. The organosulfur chemistry of the genus *Allium* – implications for the organic chemistry of sulfur. Chemical International Ed. England 31:1135-1178.

Blois M., S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 181:1199-1200.

Bong-Seop K., W. Y. Kyeong. 1992. Allelopathic effects of water extracts of *Artemisia princeps* var. *Orientalis* on selected plant species. Journal of chemical ecology 18(1):39-51.

Bye R., L. E. Estrada., y M. E. Linares. 1992. Recursos Genéticos en Plantas Medicinales de México pp.: 361-372 *In*: Plantas Medicinales de México, Introducción a su Estudio. Estrada, L. E. (ed). Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México.

Cáceres A., B. López., S. González. 1998. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. 1 Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. Journal of Ethnopharmacology 62:195-202.

Carrillo C., M., E. A. Chinchilla., R. A. Toledo. 1997. Prevención del cólera aviar, con extractos acuosos de plantas, en pollos de engorde. Agronomía Mesoamericana 8(2):152-158.

Chiapusio G., A. M. Sánchez., M. J. Reigosa. 1997. Do germination indices adequately reflect allelochemical effects on the germination process?. *Journal of Chemical Ecology* 23(11):2445-2453.

Chou C., H., C. M. Yang. 1982. Allelopathic research of subtropical vegetation in Taiwan. *Journal of Chemical Ecology* 8(12):1489-1507

Chou C., H., Y. L. Kuo. 1986. Allelopathic research of subtropical vegetation in Taiwan. *Journal of Chemical Ecology* 12(6):1431-1448.

Chou C., H., L. Lih-Ling. 1992. Allelopathic substances and interactions of *Delonix regia* (BOJ) RAF. *Journal of chemical ecology* 18(12):2285-2303.

Chou C., H., C. Y. Fu., S. Y. Li. 1998. Allelopathic potential of *Acacia confusa* and related species in Taiwan. *Journal of Chemical Ecology* 24(12):2131-2150.

Cifuentes M., C., M. P. Gómez-Serranillos., I. Iglesias. 2001. Neuropharmacological profile of ethnomedicinal plants of Guatemala. *Journal of Ethnopharmacology* 76:223-228.

Coelho B., P. J. C., M. C. Young., A. M. Giesbrecht. 2001. Antifungal polysulphides from *Petiveria alliacea* L. *Phytochemistry* 57:743-747.

Deby C., J. Pincemail., P. Hans. 1984. Mechanisms of free radicals production in the AA cascade and role of antilipoperoxidants and free radical scavengers. *In: Cerebral ischemia*, (A. Bes, P. Braquet eds.) Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam pp. 249-258.

Delle Monache F., L. E. Cuca. 1992. 6-C-formyl and 6-C-hydroxymethyl flavonones from *Petiveria alliacea*. *Phytochemistry* 31(7):281-282.

De Sousa J., R., A. J. Demuer., J. A. Pinheiro. 1990. Dibenzyl trisulphide and trans-N-methyl- α -methoxyproline from *Petiveria alliacea*. *Phytochemistry* 29(11):3653-3655.

- Dudai N., A. Poljakoff-Mayber., A. M. Mayer. 1999. Essential oils as allelochemicals and their potential use as bioherbicides. *Journal of Chemical Ecology* 25(5):1079-1089.
- Echevarría A., I. D. Torres. 2001. Efecto de un extracto de *Petiveria alliacea* L. Sobre el crecimiento de *Giardia Lamblia in vitro*. *Revista Cubana de Medicina Militar* 30(3):161-165.
- Einhelling F., A., I.T. Souza. 1992. Phytotoxicity of sorgoleone found in grain sorghum root exudates. *Journal of Chemical Ecology* 18(1):1-11.
- Einhellig F., A. 1995. mechanism of action of Allelochemicals in Allelopathy. Capítulo 7. *In: Allelopathy Organisms, Processes and Applications*. American Chemical Society. Washington, DC. pp. 97-113.
- Elakovich D., S., and W. J. Wooten. 1995. Allelopathic, Herbaceous, Vascular Hydrophytes. Capítulo 4. *In: Allelopathy Organisms, Processes and Applications*. American Chemical Society. Washington, DC. pp. 58-71.
- Elizalde-Sánchez, E. 2004. Toxicidad de *Petiveria alliacea* L. En mosca blanca (*Trialeurodes vaporariorum* W.) en laboratorio y en tomate (*Lycopersicon esculentum* M.) bajo invernadero. Tesis de Maestría, Instituto de Horticultura, Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, México pp. 63-76.
- Frei B.1994. Natural antioxidants in human health and disease. Academic Press.UK.
- Furones M., J. A., F. R. Moron., Z. G. Pinedo. 1996. Ausencia de actividad antiinflamatoria del extracto acuoso liofilizado de *Petiveria alliacea* (anamú) en ratas. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 1:34 -37.
- Furones M., J. A., R. F. Moron., G. Z. Pinedo. 1996a. Ausencia de la acción analgésica de la *Petiveria alliacea* (anamú) en ratones. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 1:16 -18.
- Germano D., H. P., J. A. Sertié. 1995. Pharmacological assay of *Petiveria alliacea*. II: oral anti-inflammatory activity and gastrotoxicity of a hydroalcoholic

root extract. *Fitoterapia*. 56:195-202.

Germano, D., H. P., L. L. O. Caldeira, A. A. G. Mazella. 1993. Topical anti-inflammatory activity and toxicity of *Petiveria alliacea*. *Fitoterapia* 64:59- 62.

Girón L., M., F. Virginia., and A. Alonzo. 1991. Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the caribs of Guatemala. *Journal of Ethnopharmacology* 3:173-187.

Hippeli S., E. 1999. Inhibition of biochemical model reactions for inflammatory processes by plant extracts: a review on recent developments. *Free Radical Research* 31:81-87.

Hoyos L., S., W. W. Au., M. Y. Heo. 1992. Evaluation of the genotoxic effects of a folk medicine, *Petiveria alliacea* (anamú). *Mutation Research* 280:29-32.

Kim J., P. 2002. Cytotoxic anticancer candidates from natural resources. *Curren Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents* 2:485-537.

Kubec R., R. A. Musah. 2001. Cysteine sulfoxide derivates in *Petiveria alliacea*. *Phytochemistry*. 58:981-985.

Leather G., R., F. A. Einhelling. 1986. The science of allelopathy. Putman A. R. and Tang Ch. S. Ed. New York. pp. 89-90.

Lyndon J., A. D. W. Lawrence., V. R. Earle. 1997. An insecticidal and acaricidal polysulfide metabolite from roots of *Petiveria alliacea*. *Pesticide Science* 50:228-232.

Macias F., A. 1995. Allelopathy in the Search for Natural Herbicide Models, Capítulo 23. *In: Allelopathy Organisms, Processes and Applications*. American Chemical Society. Washington, DC. pp. 311-327.

Macias F., A., A. M. Simonet., J. G. Galindo. 1997. Bioactive steroids and triterpenes from *Melilotus messanensis* and their allelopathic potential. *Journal of Chemical Ecology* 23(7):1781-1803.

Maguire J., D. 1962. Speed of germination-aid in selection an evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science* 2:176-177.

Malpezzí E., L. A., S. O. Davino., L. V. Costa. 1994. Antimitotic action of extracts of *Petiveria alliacea* on sea urchin egg developed. *Brazilian Journal of Medical Biological Research* 27(7):92-75.

Miura Y., H., T. Isao. 1998. Active oxygen generation by flavonoids. *Biological Pharmaceutical Bull* 21(2):93-96.

Monks A., D. Scudeiro., P. Skehan. 1991. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the International Cancer Institute* 83(11):757-766.

Niwa Y. 1999. Oxidative injury and its defense system in vivo. *Rinsho Byori-Japanese. Journal of Clinical Pathology* 47(3):189-209.

Oliveira G., M. 1988. "Screening" de plantas nativas da amazonia competencial inibidor da fertilidade em plantas. *Supl. Acta Amazonica* 18(12):129-130.

Oluwole F., S., A. F. Bolarinwa. 1998 The uterine contractile effect of *Petiveria alliacea* seeds. *Fitoterapia LXIX* 1:3-6.

Ososki A., L., P. Lohr., M. Reiff. 2002. Ethnobotanical literature survey of medicinal plants in the Dominican Republic used for women's health conditions. *Journal of Ethnopharmacology* 79:285-298.

Packer L., M. Iramatsu., y T. Yoshikawa. 1999. Antioxidant food supplements in human health. Academic Press. USA.

Parapar de la Riestra J., M. y D. T. Moisés. 2001. Morfometría de la corteza suprarrenal y de los valores séricos de sodio y potasio en ratas tratadas con *Petiveria alliacea*. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* 20:113-7.

Pérez L., R. 2001. *Petiveria alliacea* L. y su influencia en las neoplasias, Tesis de Maestría, Instituto de Horticultura, Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, México pp. 47-49.

- Pezzuto A. 1996. Plant derived anticancer agents. *Biochemical and Pharmacological Research* 53:121-133.
- Pincemal J., C., L. Deby. 1982. Flavonoids and Bioflavonoids. L. Farkas Eds. Belgica. pp. 429-435.
- Rosner H., L. A. D. Williams., A. Jung. 2001. Disassembly of microtubules and inhibition of neurite outgrowth, neuroblastoma cell proliferation, and MAP kinase tyrosine dephosphorylation by dibenzyl trisulphide. *Biochimica et Biophysica Acta* 1540:166-177.
- Ruffa M., J., G. Ferraro., M. L. Wagner. 2002. Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. *Journal of Ethnopharmacology* 79:335-339.
- Sakihama Y., F. C. Michael. 2002. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology* 177:67-80.
- Skehan P., S. Ritsa., S. Dominic. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of National Cancer Institute* 82(13):1107-1112.
- Szczepanski V., Ch., P. Zgorzelak., G. A. Hoyer. 1972. Isolierung, strukturaufklärung and synthese einer antimikrobiell wirksamen substanz aus *Petiveria alliacea* L. *Arzeim-Forsc. (Drug Research)* 22:1975-1976.
- Vanghn S., F., R. A. Boydston. 1997. Volatile allelochemicals released by crucifer green manures. *Journal of Chemical Ecology* 23(9):2107-2116.
- Villar R., J. M. Calleja., C. Morales. 1997. Screening of 17 Guatemalan medicinal plants for platelet antiaggregant activity. *Phytotherapy Research* 11:1-5.
- Verpoorte R. 2000. Plant secondary metabolism. *In: Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism*. Verpoorte, R. y Alfermann. A. (eds.) Kluwer Academic Publishers. Holanda. pp. 86-89.

Williams L., A. D., T. L. The., M. T. Garder. 1997. Immunomodulatory activities of *Petiveria alliacea* L. *Phytotherapy Research* 11:251-253.

Wilson P. 1932. *Phytolaccaceae*. *North American Flora* 21:257-266.

Zavala G., A., A. 2003. Efecto alelopático de los extractos de raíz de *P. alliacea* L. Tesis de Licenciatura, Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, México pp. 3-33.

VIII. ANEXOS

Anexo A

ANAVA: Diseño completamente al azar para extracto acuoso

		Variable de estudio: NSG			
		Arroz	Trigo	Lechuga	Amaranto
F.V	GL	CM	CM	CM	CM
Tratamientos	6	9.48	107.28	0.33	1250.37
\bar{X}		44.07	42.71	49.75	36.5
C.V.		4.11	7.64	1.0	10.18

*nivel de significancia de $\alpha=0.05$, \bar{X} = media del experimento,
C.V. = coeficiente de variación, NSG = Numero de semillas germinadas

Comparación de medias de Tukey para NSG en el extracto acuoso

Especies	Tratamientos						
	0	0.5	1	2	3	4	5
Arroz	46a	44.5ab	43.7ab	43.7ab	45.7a	43.2ab	41.5b
Trigo	49.25a	47.75ab	42.5ab	43ab	42.25ab	41b	33.25c
Lechuga	48.2a	48.2a	42.5a	34.5b	10.2c	0.75d	0.75d
Amaranto	49a	49.7a	49.7a	44.7ab	38.2b	19.5c	4.7d

* En sentido horizontal las medias con la misma letra no son significativamente diferentes (de $\alpha=0.05$)

Anexo B

ANAVA: Diseño completamente al azar para extracto metanólico

		Variable de estudio: NSG			
		Arroz	Trigo	Lechuga	Amaranto
F.V	GL	CM	CM	CM	CM
Tratamientos	5	12.50	354.6	1578.10	1135.1
\bar{X}		45.50	35.75	9.0	31.42
C.V.		3.8592	15.28	11.56	25.71

*nivel de significancia de $\alpha=0.05$, \bar{X} = media del experimento,
C.V. = coeficiente de variación, NSG = Numero de semillas germinadas

Comparación de medias de tukey para NSG en el extracto metanólico

Especies	Tratamientos					
	0	0.5	1.5	2.5	3.5	5
Arroz	48 a	47 ab	46 ab	44 b	44 ab	43.7 b
Trigo	48.2 a	45 a	36 ab	32.2 bc	29 bc	23.5 c
Lechuga	49.5 a	1.2 bc	0.75bc	2.5 b	0.0 c	0.0 c
Amaranto	49.2 ^a	46.7ab	30.5bc	34.5abc	24.5c	3d

*En sentido horizontal las medias con la misma letra no son significativamente diferentes
(de $\alpha=0.05$)

Anexo C

ANAVA: Diseño completamente al azar para extracto de diclorometano

		Variable de estudio: NSG			
		Arroz	Trigo	Lechuga	Amaranto
F.V	GL	CM	CM	CM	CM
Tratamientos	4	2.62	6.42	2262.0	1136.57
\bar{X}		46.25	48.8	17.75	26.65
C.V.		3.99	3.79	20.66	28.77

*nivel de significancia de $\alpha=0.05$, \bar{X} = media del experimento,
C.V. = coeficiente de variación, NSG = Numero de semillas germinadas

Comparación de medias de tukey para NSG en el extracto de diclorometano

Especies	Tratamientos				
	0.0	0.5	1.5	2.5	3.5
Arroz	47.0 a	46.7 a	46.7 a	45.5 a	45.2 a
Trigo	50 a	49.2 a	49.5 a	48.5 a	46.7 a
Lechuga	50 a	36.5 b	2.25 c	0.0 c	0.0 c
Amaranto	49a	34.2ab	29.2bc	15cd	5.7d

*En sentido horizontal las medias con la misma letra no son significativamente diferentes (de $\alpha=0.05$)