

**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 \_\_\_\_\_



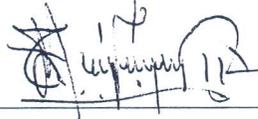
Dra. Maria del Rosario Garcia Mateos

ASESOR \_\_\_\_\_



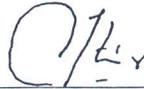
Dra. Maria Teresa Colinas Leon

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

<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
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

<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
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
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>36</b>
4.1 Recolecta del material vegetal	36
4.2 Evaluación de la actividad alelopática	36
4.2.1 Preparación de extractos	36

<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
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

<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
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

<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
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

<b>ANEXO</b>		<b>PÁGINA</b>
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-Leal<sup>1</sup> y Maria del Rosario García-Mateos<sup>2</sup>

### 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  $\mu$ 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  $\mu$ M.  
**Key words:** allelopathy / phytotoxicity / *Petiveria alliacea* / Phytolaccaceae / germination / extract.

<sup>1</sup> Doctoral Candidate

<sup>2</sup> 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

