



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES DE LA AMAZONÍA PERUANA



INFORME FINAL

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y  
ALELOPÁTICA DE LAS HOJAS DE *Piper tenuistylum* C.DC. Y  
*Piper lagenaebaccum* Trel.”

AUTORES : Bach. Orbe Saavedra Paolo  
Bach. Tuesta Pinedo Gabriela

ASESOR : Q.F. Henry Vladimir Delgado Wong.

CO-ASESORES : Dr. Billy Joel Cabanillas Amado.  
Blga. Elsa Liliana Rengifo Salgado.

SAN JUAN BAUTISTA – PERÚ

2013

# ÍNDICE

ÍNDICE.....	2
ÍNDICE DE TABLAS.....	6
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	7
ÍNDICE DE ANEXOS.....	8
RESUMEN.....	9
CAPÍTULO I	
1.1.Introducción.....	11
1.2.Planteamiento del Problema.....	12
1.2.1. Formulación del Problema.....	12
1.3.Objetivos.....	13
1.3.1. General.....	13
1.3.2. Específicos.....	13
CAPÍTULO II	
2.1. Marco Teórico.....	15
2.1.1. Antecedentes.....	15
2.1.1.1. Antecedentes en Antioxidantes.....	15
2.1.1.2. Antecedentes en Alelopatía.....	18
2.1.2. Familia <i>Piperaceae</i> .....	24
2.1.2.1. Taxonomía Familia <i>Piperaceae</i> .....	24
2.1.3. Género <i>Piper</i> .....	24
2.1.4. <i>Piper lagenaebaccum</i> Trel.....	25
2.1.4.1. Nombre Común.....	25
2.1.4.2. Hábitat.....	25
2.1.4.3. Distribución.....	25
2.1.4.4. Descripción Botánica.....	25
2.1.5. <i>Piper tenuistylum</i> C.DC.....	25

2.1.5.1. Nombre Común.....	25
2.1.5.2. Hábitat.....	25
2.1.5.3. Distribución.....	25
2.1.5.4. Descripción Botánica.....	25
2.1.6. Tamizaje Fitoquímico.....	25
2.1.7. Actividad Antioxidante.....	26
2.1.7.1. Introducción.....	26
2.1.7.2. Estrés Oxidativo.....	27
2.1.7.3. ERO.....	27
2.1.7.4. Peroxidación Lipídica.....	28
2.1.7.5. Sistemas de Defensa Celular.....	29
2.1.7.6. Antioxidantes Plasmáticos.....	30
2.1.8. Actividad Alelopática.....	31
2.1.8.1. Concepto y Generalidades.....	31
2.1.8.2. Naturaleza Química de los Compuesto Alelopáticos.....	32
2.1.8.3. Biosíntesis de los Agentes Alelopáticos.....	35
2.1.8.4. Mecanismos de Acción de los Agentes Alelopáticos.....	36
2.1.8.4.1. Limitaciones en el estudio de los mecanismos de acción.....	36
2.1.8.4.2. Efectos sobre la Actividad Enzimática.....	37
2.1.8.4.3. Efectos sobre la Fotosíntesis.....	38
2.1.8.4.4. Efectos sobre la Respiración.....	39
2.1.8.5. Metodología de la Investigación en Alelopatía.....	39
2.1.8.6. Importancia del conocimiento de los procesos alelopáticos.....	42
2.2. Definiciones Operacionales.....	44
2.2.1. Variable Independiente.....	44
2.2.2. Variable Dependiente.....	44
2.3. Hipótesis.....	45
<b>CAPÍTULO III</b>	
3.1. Metodología.....	47

3.2. Método de Investigación.....	47
3.2.1. Marcha Fitoquímica Preliminar.....	47
3.2.2. Actividad Antioxidante.....	55
3.2.3. Actividad Alelopática.....	64
3.3. Población y Muestra.....	66
3.3.1. Población Vegetal.....	66
3.3.2. Tratamiento de la Muestra.....	66
3.3.3. Muestra Vegetal.....	66
3.3.4. Criterios de Inclusión.....	66
3.3.5. Criterios de Exclusión.....	66
3.4. Instrumentos.....	67
3.4.1. Materiales y Reactivos, Instrumentos y Equipos.....	67
3.4.1.1. Material Biológico.....	67
3.4.1.2. Material de Laboratorio.....	67
3.4.1.3. Reactivos.....	68
3.4.1.4. Equipos.....	69
3.4.1.5. Materiales Varios.....	70
3.5. Procedimientos de Recolección de Datos.....	70
3.5.1. Recolección de Material Vegetal.....	70
3.5.2. Toma de Datos.....	71
3.6. Plan de Análisis e Interpretación.....	72
3.6.1. Marcha Fitoquímica Preliminar.....	72
3.6.2. Actividad Antioxidante.....	72
3.6.3. Actividad Alelopática.....	72
 CAPÍTULO IV	
4.1. Resultados.....	74
4.1.1. Evaluación de la Marcha Fitoquímica Preliminar de los Extractos de las hojas de <i>Piper tenuistylum</i> Trel. y <i>Piper lagenaebaccum</i> C.DC.....	74
4.1.2. Evaluación de la Actividad Antioxidante de los Extractos de las hojas de <i>Piper tenuistylum</i> Trel. y <i>Piper lagenaebaccum</i> C.DC.....	76

4.1.3. Evaluación de la Actividad Alelopática de los Extractos de las hojas de <i>Piper tenuistylum</i> Trel. y <i>Piper lagenaeabaccum</i> C.DC.....	86
DISCUSIÓN.....	88
CONCLUSIONES.....	89
RECOMENDACIONES.....	90
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N°1: Curva Estándar de ÁCIDO ASCÓRBICO (DPPH).....	56
TABLA N°2: Curva Estándar de QUERCETINA (DPPH).....	57
TABLA N°3: Curva Estándar de TROLOX (DPPH).....	57
TABLA N°4: Análisis de Extractos (DPPH) – <i>Piper tenuistylum</i> C. DC. ....	58
TABLA N°5: Análisis de Extractos (DPPH) – <i>Piper lagenaebaccum</i> Trel.....	58
TABLA N°6: Curva Estándar de ÁCIDO ASCÓRBICO (ABTS).....	61
TABLA N°7: Curva Estándar de QUERCERINA (ABTS).....	62
TABLA N°8: Curva Estándar de TROLOX (ABTS).....	62
TABLA N°9: Análisis de Extractos (ABTS).....	63
TABLA N°10: Evaluación de la Marcha Fitoquímica Preliminar de los extractos de las hojas de <i>Piper tenuistylum</i> Trel. y <i>Piper lagenaebaccum</i> C.DC.....	75
TABLA N°11: Resultados de la Curva Estándar de ÁCIDO ASCÓRBICO (DPPH).....	76
TABLA N°12: Resultados de la Curva Estándar de QUERCETINA (DPPH).....	77
TABLA N°13: Resultados de la Curva Estándar de TROLOX (DPPH).....	78
TABLA N°14: Actividad Antioxidante de <i>Piper tenuistylum</i> Trel. (DPPH).....	79
TABLA N°15: Actividad Antioxidante de <i>Piper lagenaebaccum</i> C.DC. (DPPH).....	80
TABLA N°16: Resultados de la Curva Estándar de ÁCIDO ASCÓRBICO (ABTS).....	81
TABLA N°17: Resultados de la Curva Estándar de QUERCETINA (ABTS).....	82
TABLA N°18: Resultados de la Curva de Calibración de TROLOX (ABTS).....	83
TABLA N°19: Actividad Antioxidante de <i>Piper tenuistylum</i> Trel. (ABTS).....	84
TABLA N°20: Actividad Antioxidante de <i>Piper lagenaebaccum</i> C.DC. (ABTS).....	85
TABLA N°21: Actividad Alelopática de <i>Piper tenuistylum</i> Trel. y <i>Piper lagenaebaccum</i> C.DC. (ABTS).....	86

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO N°1: Diagrama de Flujo – Marcha Fitoquímica Preliminar.....	54
GRÁFICO N°2: Diagrama de Flujo – Actividad Alelopática.....	63
GRÁFICO N°3: Porcentaje de Inhibición vs Concentración (ÁCIDO ASCÓRBICO - DPPH).....	76
GRÁFICO N°4: Porcentaje de Inhibición vs Concentración (QUERCETINA - DPPH).....	77
GRÁFICO N°5: Porcentaje de Inhibición vs Concentración (TROLOX - DPPH).....	78
GRÁFICO N°6: Porcentaje de Inhibición vs Concentración ( <i>Piper tenuistylum</i> Trel. - DPPH).....	79
GRÁFICO N°7: Porcentaje de Inhibición vs Concentración ( <i>Piper lagenaebaccum</i> C.DC. - DPPH).....	80
GRÁFICO N°8: Porcentaje de Inhibición vs Concentración (ÁCIDO ASCÓRBICO - DPPH).....	81
GRÁFICO N°9: Porcentaje de Inhibición vs Concentración (QUERCETINA - DPPH)...	82
GRÁFICO N°10: Porcentaje de Inhibición vs Concentración (TROLOX-DPPH).....	83
GRÁFICO N°11: Porcentaje de Inhibición vs Concentración ( <i>Piper tenuistylum</i> Trel. - ABTS).....	84
GRÁFICO N°12: Porcentaje de Inhibición vs Concentración ( <i>Piper lagenaebaccum</i> C.DC. - ABTS).....	85
GRÁFICO N°13: Actividad Alelopática de los extractos de las hojas de <i>Piper tenuistylum</i> Trel. y <i>Piper lagenaebaccum</i> C.DC.....	86

## ÍNDICE DE ANEXOS

FOTO N°1: <i>Piper tenuistylum</i> C. DC. – HOJAS.....	98
FOTO N°2: <i>Piper tenuistylum</i> C. DC. – INFLORESCENCIA.....	98
FOTO N°3: <i>Piper lagenaebaccum</i> Trel. – HOJAS E INFLORESCENCIA.....	99
FOTO N°4: <i>Piper lagenaebaccum</i> Trel. – INFLORESCENCIA.....	99
ESQUEMA N°1: Tratamiento de la muestra.....	100
ESQUEMA N°2: Procedimiento en Alelopatía.....	100
ESQUEMA N°3: Procedimiento en Antioxidantes – MÉTODO DPPH.....	101
ESQUEMA N°4: Procedimiento en Antioxidantes – MÉTODO ABTS.....	101



## RESUMEN

El presente estudio, tuvo como objetivo evaluar la actividad antioxidante y alelopática de las hojas de *Piper tenuistylum* C.DC. y *Piper lagenaebaccum* Trel. las especies fueron recolectadas en el Jardín Botánico de Plantas Medicinales del Centro de Investigaciones Alpahuayo (CIA) en la Reserva Nacional Alpahuayo – Mishana, ubicado en el Distrito de San Juan, Región Loreto. Se separaron las hojas de las ramas, se secó a temperatura ambiente por una semana, luego se colocó a secar en estufa a 35°C, se molió y fueron almacenadas en refrigeración. La marcha fitoquímica se realizó según el procedimiento de Rondina & Coussio – 1969. La evaluación de la actividad antioxidante del extracto etanólico se realizó mediante el método de DPPH y ABTS según Sharma (2009)<sup>6</sup> y Mensor (2001)<sup>7</sup>, para la lectura de la absorbancia se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis Cary 60. La actividad alelopática del extracto etanólico se realizó según Fujii (1990)<sup>23</sup>, a concentraciones de 10, 3, 1, 0.3 y 0.1 mg/mL. La marcha fitoquímica de los extractos etanólicos reportaron la presencia grupos fenólicos libres, triterpenos y/o esteroides, alcaloides, leucoantocianidinas y catequinas, y aminogrupos primarios o secundarios. En la actividad antioxidante de los extractos etanólicos, por el método de DPPH, demostró mayor porcentaje de inhibición EC50 la especie *Piper lagenaebaccum* Trel. siendo esta de 23.2560mg/μL a diferencia de la especie *Piper tenuistylum* C.DC. la cual fue de 57.6617mg/μL. Por el método de ABTS, demostró mayor porcentaje de inhibición EC50 la especie *Piper lagenaebaccum* Trel. siendo esta de 21.4405mg/μL a diferencia de la especie *Piper tenuistylum* C.DC. la cual fue de 95.2871mg/μL. En la actividad alelopática, el extracto etanólico de *Piper tenuistylum* C.DC. demostró mayor porcentaje de inhibición siendo esta de 54% y 81% a una concentración de 3 y 10 mg/mL respectivamente; a diferencia del extracto etanólico de *Piper lagenaebaccum* Trel. con un porcentaje de inhibición de 73% a una concentración de 10mg/mL.

**Palabras Claves:** Actividad Antioxidante, Actividad Alelopática, *Piper tenuistylum* C.DC., *Piper lagenaebaccum* Trel., EC50.

# CAPÍTULO I

## 1.1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, las especies vegetales están siendo estudiadas debido a su potencial farmacológico, en especial por su alto contenido en compuestos químicos que le proporcionan actividades terapéuticas importantes, que hoy en día son de principal interés en el área médica y cuidado de la salud.

Gracias al estudio de la capacidad antioxidante en especies vegetales, se están desarrollando métodos innovadores en el tratamiento de patologías degenerativas, que están desplazando a los tratamientos médicos invasivos con altos efectos secundarios y colaterales.

En el estudio de especies vegetales con actividad antioxidante se ha demostrado que se puede combatir, inhibir y neutralizar la formación y proliferación de radicales libres, lo cual conlleva a una mejora en la calidad de vida en personas que presenten males oncológicos como el cáncer; además al influir de esta manera las personas están mejor informadas sobre la prevención y tratamiento que pueden proporcionar la variedad de plantas medicinales.

Con respecto a las técnicas en insecticidas y plaguicidas, las que utilicen especies vegetales están desplazando a aquellas de origen químico las cuales en su mayoría han presentado daño a la salud de los seres vivos.

Los beneficios que muestra, no solo contribuye con el desarrollo agrícola y forestal sino también para combatir contra ciertas enfermedades transmitidas por vectores (malaria, dengue y algunas parasitosis).

Muchas especies vegetales poseen compuestos aleloquímicos que aún no han sido descubiertos por el desinterés o el desconocimiento de sus propiedades alelopáticas, que por lo general poseen compuestos altamente activos, con el fin de ser utilizados para su posterior tratamiento y comercialización.

Finalmente en el presente estudio deseamos incentivar el interés en la investigación de dos especies que aún no han sido debidamente explotadas en su potencial antioxidante y alelopático.

## 1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la Amazonía Peruana, gracias a su amplia Biodiversidad, contamos con una extensa variedad de especies vegetales, las cuales, por sus propiedades medicinales, son empleadas por el poblador amazónico para el tratamiento de diversas patologías o dolencias. Es así como, nuestra riqueza vegetal nos permite encontrar nuevas alternativas que puedan ser de gran utilidad para el beneficio de la salud y actividades del ser humano.

Dentro de la flora amazónica, encontramos en gran cantidad y abundante número especies pertenecientes a la familia *Piperaceae*, cuyo género *Piper*, se encuentra ampliamente distribuido en la región. Este género, presenta numerosos usos del tipo medicinal, cosmético, alimenticio y agrícola; en la localidad, encontramos especies endémicas, las cuales no cuentan con estudios previos. No obstante, respecto a los metabolitos secundarios del género, se reporta la presencia de flavonoides, terpenos y grupos fenólicos, lo que explicaría el uso que se les atribuye a estas.

En la actualidad, las numerosas enfermedades degenerativas, se deben a la excesiva oxidación de los radicales libres. Los antioxidantes controlan y regulan esta oxidación, evitando la acumulación de radicales libres en el organismo, y por ende la regulación y tratamiento de estas patologías.

La actividad alelopática, adquirió una gran importancia en los últimos años, por su valor biológico, debido a las interacciones entre especies vegetales, ya sean dañinas o benéficas. Es decir, estas interacciones influyen en el crecimiento y desarrollo de sistemas biológicos.

El género *Piper*, presenta metabolitos secundarios, lo que explicaría la presencia de actividad antioxidante y alelopática, además al encontrar especies que aún no fueron estudiadas, permiten interesarse más en su estudio y en los posibles beneficios que se podrían encontrar.

### 1.2.1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Presentarán actividad antioxidante y acción alelopática las hojas de *Piper tenuistylum* C.DC. y *Piper lagenaebaccum* Trel.?

### **1.3. OBJETIVOS**

#### **1.3.1. GENERAL**

- Evaluar la actividad antioxidante y alelopática de las hojas de *Piper tenuistylum* C.DC. y *Piper lagenaebaccum* Trel.

#### **1.3.2. ESPECÍFICOS**

- Determinar mediante tamizaje fitoquímico los metabolitos secundarios de las especies *Piper tenuistylum* C.DC. y *Piper lagenaebaccum* Trel.
- Evaluar la actividad antioxidante los extractos etanólicos de las hojas de *Piper tenuistylum* C.DC. y *Piper lagenaebaccum* Trel.
- Evaluar la actividad alelopática de los extractos etanólicos de las hojas de *Piper tenuistylum* C.DC. y *Piper lagenaebaccum* Trel.

# CAPÍTULO II

## 2.1.MARCO TEÓRICO

### 2.1.1.ANTECEDENTES

#### 2.1.1.1. ANTECEDENTES EN ANTIOXIDANTES

**YOSHIKAWA et al** (1994), sostuvo que las *Piperaceaes*, en especial *Piper elongatum* poseen compuestos químicos aprovechables con actividad biológica, con actividad antioxidante, actividad antifúngica y como prevención para el cáncer.

**MASUOKA et al.**, (1997)<sup>16</sup>, determinó que los estándares de antioxidantes naturales,  $\alpha$ -tocopherol y quercetina son ideales para realizar ensayos en el barrido de radicales libres en especial el de 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH).

**ONO et al.**, (1997)<sup>16</sup>, indicó que *Piper aduncum* posee flavonoides, con cuatro catequiles en el grupo del anillo beta, los cuales denotarían una potente actividad en el arrastre de radicales libres.

**LEI et al.**, (2003)<sup>18</sup>, sostiene que el extracto metanólico de *Piper betle* posee excelente poder en arrastre de peróxido de hidrogeno y además de su sub radical superóxido; además que el extracto reprime la lucigenina enhancina del peróxido de hidrogeno química-luminiscencia.

**CAMPOS et al** (2004) demostraron que la especie *Piper amalago* L., presentan en su extracto etanólico las sustancias vitexina y lupeol, lo que explicaría su actividad antioxidante, además debido a que encontraron la presencia de alcaloides, taninos condensados, flavonoides y triterpenos.

**DI MASCIO et al.**, (2006)<sup>19</sup>, el potencial antioxidante in vitro de la hidroquinona prenilada y del ácido benzoico 4-hidroxi prenilada de la fruta de *Piper crassinervium* ha sido investigado y evaluado por su capacidad de

suprimir e inhibir en ambos casos al 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) y al radical químico-luminiscencia producido por el luminol.

**CARDONA** et al (2007) demostraron que *Piper daniel-gonzalezii* presenta propiedades tanto leishmanicida como reductora, por lo cual tiene un alto potencial como fuente de compuestos para el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas contra la leishmaniasis, o como una fuente natural de antioxidantes con un alto uso potencial en la industria farmacéutica y de alimentos.

**STASHENKO** et al (2007)<sup>12</sup> determinaron que el aceite esencial de *Piper auritum* Kunth, presentó una baja actividad atrapadora del radical DPPH· (0.0029 mg/L), en comparación con la presentada por la vitamina E (3.69 mg/L), sustancia antioxidante usada como referencia.

**CHITNIS** et al (2007) determinaron que los extractos de n-hexano, diclorometano (DCM) y metanol (MeOH), de *Piper cubeba* mostraron actividad antioxidante en el ensayo cualitativo, la actividad antioxidante más destacada se observó con el extracto de MeOH en el ensayo cuantitativo con un valor de RC50 de  $2,71 \times 10^{-1}$  mg/mL. La potencia antioxidante del extracto de DCM fue aproximadamente 3 veces menor (RC50 =  $6,50 \times 10^{-1}$  mg/mL) que la del extracto de MeOH.

**REGASINI y col** (2008) estudiaron la actividad antioxidante de las especies *Piper arboreum* Aublet y *Piper tuberculatum* Jacq, por el método colorimétrico de DPPH, encontrando la mayor actividad antioxidante en la fracción de acetato de etilo de las hojas de *P. arboreum* (IC<sub>50</sub> = 5.70 µg/mL) y *P. tuberculatum* (IC<sub>50</sub> = 8.40 µg/mL). Las fracciones hidrometanólicas de las hojas de *P. tuberculatum* y *P. arboreum* mostraron moderada actividad antioxidante, cuyos valores de IC<sub>50</sub> (µg/mL) fueron 11.9 y 19.2, respectivamente. Adicionalmente, un breve estudio fitoquímico de la fracción de acetato de etilo de las hojas de *P. arboreum* mostraron la presencia de quercetina y quercitrin, dos flavonoides con actividad antioxidante descritas previamente en las diversas literaturas.



**TAMAYO et al.** (2008), determinó que la especie *Piper subpedale* TREL. & YUNCK presenta los mejores valores y potencial en el extracto de acetato de etilo que fue determinada por el ensayo ORAC el cual presentó valores de capacidad antioxidante equivalentes al de trolox.

**ROJANO et al.**, (2009) indicó que *Piper peltatum* presenta extractos con carácter lipofílico que pueden ser considerados como potenciales fuentes de sustancias antioxidantes, lo cual permite asumir que en un extracto no alcohólico el principal componente es el 4-nerolidilcatecol, que presenta diversas propiedades biológicas y antioxidantes.

**PUERTAS-MEJÍA et al** (2009)<sup>11</sup> determinaron que la capacidad antioxidante in vitro de fracciones de hojas de *Piper peltatum* L. poseen excelentes propiedades antioxidantes, lo cual soporta el uso tradicional de *P. peltatum* para el tratamiento de diferentes afecciones de la piel y otras enfermedades.

**ROJANO y col** (2011)<sup>5</sup> demostraron la actividad antioxidante de extractos de hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol obtenidos a partir de las hojas de *Piper piedecuestanum* TREL y *Piper subpedale* TREL & YUNCK por diferentes métodos espectrofotométricos: ABTS, DPPH, FRAP y en algunas muestras seleccionadas ORAC. Los extractos de las dos especies de *Piper* presentaron una buena actividad antioxidante en las metodologías evaluadas. La especie más activa *Piper subpedale* TREL. & YUNCK presentó los mejores valores por las técnicas evaluadas y la potencia del extracto de acetato de etilo fue determinada por el ensayo ORAC que presentó valores de capacidad antioxidante de equivalentes de trolox (TEAC)= 2195.91µmol Trolox /gramos de extracto.

### 2.1.1.2. ANTECEDENTES EN ALELOPATÍA

**PLINIO** (Plinius Secundus, 1 A.D.) La percepción de Plinio de la liberación de sustancias por las plantas es clara cuando escribe que “la naturaleza de algunas plantas a pesar de no ser exactamente mortal es nociva debido a sus mezclas de fragancias o a sus jugos, por ejemplo, el rábano y el laurel son dañinos para la vid; puede inferirse que la vid posee un sentido del olfato y es afectada por las fragancias en un grado prodigioso. Plinio sostuvo además que “el cytismus y la planta llamada Halimon por los griegos mata árboles”. El afirma más tarde que la mejor manera para matar el helecho (*Pteridium aquilinum*) es romper a golpes el tallo con un palo cuando está en gemación ya que “el jugo que se desliza hacia abajo por el helecho y mata por sí mismo las raíces”.

**CULPEPER** (1633) declaró que la albahaca (*Ocimum*) y la ruda (*ruta*) nunca crecen juntas ni cerca una de otra. El afirmó también que hay tal antipatía entre la planta de repollo y la vid que una moriría en el lugar donde crece la otra. Browne en su “Jardín de Cyrus” publicado en 1658, informa que “los malos y buenos efluvios de las verduras promueven o debilitan unos a otros”.

**YOUNG** (1804) sostuvo que el trébol (*Trifolium pratense*) tenía dificultades para crecer en distritos donde se había cultivado la planta constantemente porque el suelo adquiere la enfermedad del trébol. También puntualizó que la enfermedad del trébol puede ser prevenida dejándose un intervalo de 7 a 8 años entre cultivos de trébol.

**DE CANDOLLE** (1832) sugirió que los suelos enfermos en agricultura podrían deberse a exudados de plantas de cultivo y que la rotación de cultivos podría ayudar a aliviar el problema. El observó en el campo que la presencia de cardos es nociva para la avena. Igualmente se dio cuenta que la Euforbia es nociva para el lino y que las plantas de centeno lo eran para las de trigo (*Triticum aestivum*).

Los antecedentes señalados anteriormente indican que desde muy antiguo se han observado casos de alelopatía, pero no fue sino después del 1900 que se condujeron experimentos científicos para estudiar este fenómeno. Es importante destacar que muchas plantas que son conocidas por sus propiedades medicinales presentan también efectos alelopáticos.

**SCHREINER Y COL.** (1907-1911) descubrieron estudiando suelos fatigados la presencia de productos químicos también presentes en plantas en cultivo y que tenían efectos deletéreos sobre muchas plantas cultivadas.

**KELLER et al.** (1963) destaca que especies del género *Piper* son utilizadas como condimento por sus frutos aromáticos y picantes (*P. nigrum*)

**MORTON** (1981) destacó que especies del género *Piper* se han empleado por lo general como fuente de insecticidas y en la medicina natural.

**LOVETT Y RYUNTYU** (1992) establecieron una manera de examinar las propiedades alelopáticas de una especie mediante bioensayos en los que se cuantifica la germinación o emergencia de plántulas y se mide la radícula o hipocótilo.

**RIZVI et al.** (1992) determinó que una ventaja de los compuestos aleloquímicos en el desarrollo de pesticidas naturales es que son fácilmente biodegradables y muchos de ellos son seguros y limpios desde el punto de vista ambiental.

**SENGUPTA Y RAY** (1987); **PARMAR et al.** (1997); **ARNASON et al.** (2005); **DELGADO et al.** (2007) en diversos estudios demostraron que los constituyentes químicos más comunes de este género son alcaloides amidas como isobutilamina, piperidina y pirrolidina; propenilfenoles, lignanos, neolignanos, terpenos, flavonoides, kawalactonas, butenólidos y epóxidos del ciclohexano, entre otros.

**SILVA et al** (2002), en un estudio sobre plantas de la familia *Piperaceae* separaron amidas, con un alto contenido de isobutyl, pyrrolidina, dihydropyridona y piperidina. Al realizar una separación de bioactivos por fraccionamiento, *Piper arboreum* presentó dos nuevas amidas: N-(10-(13,14-methylenedioxyphenyl)-7(E),9(Z)-pentadienoyl)-pyrrolidina y arboreumina y otros compuestos conocidos N-(10-(13,14-methylenedioxyphenyl)-7(E)-pentaenoyl)-pyrrolidina y N-(10-(13,14-methylenedioxyphenyl)-7(E),9(E)-pentadienoyl)-pyrrolidina. También se separaron seis amidas y dos derivados antifungosos cinnamoyl derivados de semillas y hojas de *Piper tuberculatum*. La mayoría de estos compuestos mostraron actividad antifungosa contra *Cladosporium sphaerospermum*.

**GRANADOS et al** (2002) Determinó que los extractos de *Piper grande* Vahl presentan una actividad insecticida en la interrupción del ciclo de vida del modelo biológico *Drosophila melanogaster*, en los estados larvarios y/o en la oviposición, dada las importantes reducciones en las poblaciones promedio de pupas.

**FAJARDO et al** (2005) sostienen que, debido a la situación existente en la producción agrícola, se han encontrado nuevas vías para obtener una agricultura sostenible basada en recursos naturales y renovables. Una de las soluciones a esta situación ha sido la alelopatía. Estos autores realizaron un ensayo donde evaluaron el efecto de extractos acuosos de girasol (*Helianthus annuum*) al 50% v/v. Se encontraron diferencias significativas en la germinación de las malezas en comparación con el testigo, al mostrar un mayor efecto inhibitorio en la germinación y en el retardo del crecimiento.

**MIQUILENA Y LAZO** (2005) estudiaron el potencial alelopático de exudados radicales, quienes encontraron que las malezas *Amaranthus dubius*, *Echinochloa colona* y *Trianthema portulacastrum* influían sobre el porcentaje de germinación y la longitud radical de las especies cultivadas cebolla, pepino, lechuga, tomate y arroz. Los resultados permitieron concluir que los extractos metanólicos de las plantas donadoras ejercieron efectos potencialmente alelopáticos, estimulatorios e inhibitorios sobre la

longitud radical de las especies indicadoras, según el tratamiento aplicado, el sustrato utilizado y la especie receptora.

**VALERINO et al.** (2005) estudiaron la actividad alelopática y tipos de metabolitos presentes en el follaje de *Lantana trifolia* L., con el fin de obtener compuestos puros potencialmente activos, a partir de extractos de plantas con actividad alelopática contra malezas. Se determinó la actividad alelopática en condiciones de laboratorio de extractos de n-hexano y etanol, al evaluarse los índices de vigor y reducción de plántulas de pepino, tomate y trigo frente a dichos extractos. Se observó que ambas fracciones redujeron el crecimiento de la raíz y el coleóptilo, estando más marcado este efecto en el extracto etanólico. En *L. trifolia* se detectó la presencia de triterpenos/esteroides y flavonoides en el extracto clorofórmico y triterpenos/esteroides, flavonoides y glicósidos en el extracto de n-butanol. En ambos extractos se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias frente a las plántulas estudiadas.

**BLANCO et al.** (2005) evaluaron el efecto de extractos acuosos de malezas sobre el desarrollo radical temprano del plátano (*Musa AAB*). Para ello, se sembraron cormos de 'Plátano Hartón', con eliminación previa de raíces, los cuales fueron tratados cada tres días con extractos acuosos provenientes de tres malezas: *Cyperus rotundus*, *Rottboellia cochinchinensis* y *Commelina diffusa* y agua como testigo. Se midió número, longitud, peso fresco y peso seco de raíces de plátano. Adicionalmente, los extractos fueron aplicados sobre semillas de maíz, frijol y guandul para verificar el poder alelopático de los extractos, al determinarse la longitud radical. Se obtuvieron diferencias significativas a los 21 días después de la siembra, donde las especies *C. rotundus* y *R. cochinchinensis* favorecieron el desarrollo radical del plátano, mientras que la *C. diffusa* ocasionó una reducción del 70, 50 y 61% en el número, longitud total y peso fresco de raíces, respectivamente, comparado con el testigo. También hubo efecto alelopático de los extractos sobre maíz, frijol y guandul, observado en el incremento ocasionado en la longitud total de raíces. Estos resultados indicaron un potencial alelopático de estas malezas sobre el cultivo del plátano.

**ALFONSO et al.** (2005) mediante análisis fitoquímicos en laboratorio y campo, estudiaron el efecto alelopático de extractos acuosos de *Nerium oleander*, *Aleuritis fordii*, *Ocimum sanctum*, *Gliricidia sepium* y *Thevetia peruviana* sobre la germinación de semillas y desarrollo del eje radículo-hipocotilar en cinco especies de malezas. Todos los extractos evidenciaron efectos inhibitorios, los metabolitos secundarios más frecuentes fueron triterpenos, fenoles y flavonoides.

**ZAMORANO Y FUENTES** (2005) evaluaron el potencial alelopático de extractos de nabo silvestre y raigrás sobre las arvenses de la sabana de Bogotá, cenizo, malva blanca y bleado, se determinó que no se puede generalizar el efecto herbicida de los extractos, debido a una posible selectividad. Por esta razón se sugiere realizar estudios específicos con extractos vegetales para cada especie de arvense a controlar.

**ROBAYO y RODRÍGUEZ** (2006) evaluaron el efecto alelopático de extractos etanólicos de *Swinglia glutinosa* y *Piper aduncum*, en tres dosis diferentes, sobre semillas de cinco arvenses asociadas a cultivos de clima cálido. Se presentó inhibición de germinación para todas las especies estudiadas en las diferentes concentraciones. Así mismo, al evaluar el efecto de los extractos sobre plántulas germinadas de las mismas especies de arvenses, se observó fitotoxicidad en un alto grado.

**HERNÁNDEZ y VÁSQUEZ** (2007) determinaron que la aplicación de extractos vegetales de hojas de *Piper aduncum* y *Thymus vulgaris* y de flores de *Matricharia chamomilla* permite controlar, bajo condiciones in vitro y en plántulas, el desarrollo del hongo *Colletotrichum gloeosporoides*, causante de la antracnosis en el tomate de árbol. Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que el mayor control del hongo se obtuvo con el extracto floral de *M. chamomilla*. Debido a la actividad biológica de la familia *Piperaceae*, los autores sugieren realizar estudios para determinar si existe una mayor inhibición de *C. gloeosporoides* con extractos de inflorescencias de *P. aduncum*, debida a la presencia de lignanos y flavonoides.

**DELGADO et al.** (2007) en el estudio realizado, los principales resultados indican que los diferentes extractos en las diferentes concentraciones inhiben germinación en las arvenses y en los cultivos indicadores de fitotoxicidad sobresalen los extractos de madera de *P. aduncum* y raíz *P. hispidium*. Igualmente, los extractos mencionados produjeron reducciones fuertes en el desarrollo radicular y en la parte aérea de las arvenses y las plantas de cultivo. Estos resultados se atribuyeron a la presencia de metabolitos secundarios en los extractos de *Piper sp.*, los cuales contienen terpenos, compuestos precursores del ácido abscísico (ABA).

**CUEVAS** (2007) evaluó los extractos etanólicos de *Swinglia glutinosa* Murray y *Lantana camara* en ensayos de pre-emergencia y post-emergencia, con aplicaciones de siete concentraciones (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 y 5,0% V/V) a cinco especies de arvenses (chilinchil, bleo, lengüevaca, gualola y nabo) y cinco de cultivos comerciales (arroz, maíz, zanahoria, lechuga y tomate). En los ensayos de pre-emergencia se observó que el extracto de *S. glutinosa* inhibió la germinación y disminuyó la longitud radicular de las arvenses, cuando se aplicó a las semillas con la concentración más baja (0,5%). Para los extractos de *L. camara*, se requirió de una dosis media de 2,0% para observar el efecto de control en las variables evaluadas.

**CHÁVEZ Y PÉREZ** (2008) evaluaron el efecto de seis extractos: fruto y madera de *Piper aduncum*, hojas y raíz de *Piper hispidium*, parte aérea de *Piper holtonii* y madera de *Piper eriopodon*, sobre germinación y desarrollo de plántulas de caminadora (*Rotboellia cochichinensis*), sorguillo (*Sorghum halepense*), nabo (*Brassica rapa*), frijolillo (*Phaseolus lathyroides*), bleo (*Amaranthus dubius*) y lengüevaca (*Rumex crispus*). También se evaluaron estos extractos en semillas de cultivos que pueden indicar fitotoxicidad como maíz, arroz, lechuga, tomate y zanahoria.

### **2.1.2. FAMILIA PIPERACEAE**

Las *Piperaceas* crecen en climas tropicales, subtropicales y templados; son hierbas o arbustos. Esta familia comprende 10 géneros, siendo los principales: *Piper* y *Peperomia*. Estas plantas pueden ser erguidas o postradas, tienen hojas alternadas, opuestas o verticiladas pueden o no tener glándulas aromáticas; de hojas enteras con nervadura pinnada o palmatinnada, venulada en cruz, no presenta meristemo basal persistente; con hidatodes comúnmente presentes y estomas anisocíticos o ciclocíticos. Los tallos tienen nudos, pueden ser articulados aéreos y subterráneos, presentan el tejido vascular primario en dos o más anillos, o en anillos pequeños esparcidos; el xilema sin fibras traqueidas pero con fibras libriformes. El tipo de reproducción es por polinización (son plantas hermafroditas); y por esquejes de los tallos, las flores se encuentran agrupadas en inflorescencias tipo espada o espádices, son flores diminutas con brácteas suculentas sin perianto. El fruto es una dropa o baya y consta de una semilla.

#### **2.1.2.1. Taxonomía de la Familia Piperaceae**

**Reino:** Plantae

**Subreino:** Tracheobionta

**División:** Angiospermae

**Clase:** Magnoliopsida

**Orden:** Piperales

**Familia:** Piperaceae

### **2.1.3. GÉNERO PIPER**

Está constituido por más de 700 especies, presenta tallos con nudos engrosados y las inflorescencias son espigas solitarias opuestas a las hojas que están dispuestas en forma alternada. Estas plantas se encuentran en una gran variedad de hábitats, las partes vegetativas a menudo presentan aromas cuando son estrujadas. Algunas especies del género *Piper* son utilizadas como condimento, en especial por sus frutos aromáticos y picantes (*P. nigrum*), y muchas de ellas se emplean en la medicina natural.

Las especies del género *Piper* han sido ampliamente investigadas y los estudios fitoquímicos han conducido al aislamiento de una amplia variedad de metabolitos secundarios, destacando los alcaloides, lignanos, neolignanos, terpenoides, kavapironas,



piperolidas, chalconas y dihidrochalconas, flavonas y flavanonas, los cuales presentan una amplia gama de actividades biológicas.

#### **2.1.4. *Piper lagenaebaccum***

**2.1.4.1. Nombre Común:** No determinado.

**2.1.4.2. Hábitat:** Arbusto endémico. Crece en bosques amazónicos y andinos de 500 a 1000 msnm.

**2.1.4.3. Distribución:** Junín, Loreto, Cerro de Pasco y Ucayali.

**2.1.4.4. Descripción Botánica:** Arbustos hasta 2m de altura, pilosos; prófilos glabros o con una costa pubescente. Hojas estrechamente ovadas, ovado-elípticas o lanceoladas, ápice longiacuminado acuspidado, base inequilátera, frecuentemente lobada; venas secundarias de 3-5 pares, arquedadas hacia el ápice, recorriendo la lámina más de 2/3 de su largo, peciolos de 3-10mm de largo, vaginados. Espigas reflexas, brácteas crasas, laxamente fimbriadas, estigmas alargados.

#### **2.1.5. *Piper tenuistylum* C.DC.**

**2.1.5.1. Nombre Común:** No determinado.

**2.1.5.2. Hábitat:** Arbusto no endémico. Crece en bosques amazónicos de 0 a 1000 msnm.

**2.1.5.3. Distribución:** Junín, Loreto y Ucayali.

**2.1.5.4. Descripción Botánica:** Arbustos hasta 3m de altura, no pilosos. Hojas lustrosas, ovadas y alargadas. Venas de crecimiento paralelo. Inflorescencia pequeña, de crecimiento horizontal inferior. Crece en suelos arcillosos y varillales.

#### **2.1.6. TAMIZAJE FITOQUÍMICO**

El tamizaje fitoquímico o “screening” fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una planta y, a partir de allí, orientar la extracción o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. El tamizaje fitoquímico consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacciones de coloración. Debe permitir la evaluación rápida con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Los resultados del tamizaje fitoquímico

constituyen únicamente una orientación y deben interpretarse en conjunto con los resultados del “screening” farmacológico.

## **2.1.7. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

### **2.1.7.1. INTRODUCCIÓN**

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado o libre por lo que son muy reactivos ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una verdadera reacción en cadena que destruye nuestras células. La vida media biológica del radical libre es de microsegundos, pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando un gran daño a moléculas, membranas celulares y tejidos. Los radicales libres no son intrínsecamente deletéreos; de hecho, nuestro propio cuerpo los produce en cantidades moderadas para luchar contra bacterias y virus.

Estas acciones se dan constantemente en las células de nuestro cuerpo, proceso que debe ser controlado con una adecuada protección antioxidante. Un antioxidante es una sustancia capaz de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres mediante la liberación de electrones en nuestra sangre, los que son captados por los radicales libres. El problema para la salud se produce cuando nuestro organismo tiene que soportar un exceso de radicales libres durante años, producidos mayormente por contaminantes externos, que provienen principalmente de la contaminación atmosférica y el humo de cigarrillos, los que producen distintos tipos de radicales libres en nuestro organismo. El consumo de aceites vegetales hidrogenados tales como la margarina y el consumo de ácidos grasos trans como los de las grasas de la carne y de la leche también contribuyen al aumento de los radicales libres (Finkel y Holbrook, 2000).

### **2.1.7.2. ESTRES OXIDATIVO**

Especies reactivas del oxígeno (ERO) es el término que se aplica colectivamente a las moléculas radicales y no radicales que son agentes oxidantes y/o son fácilmente convertidos a radicales. En la última década se han acumulado evidencias que permiten afirmar que los radicales libres y el conjunto de especies reactivas que se les asocian juegan un papel central en nuestro equilibrio homeostático, que es el normal funcionamiento de los mecanismos de regulación que conservan el estado normal fisiológico de los organismos. En mamíferos son muchos los procesos fisiopatológicos causados por estas especies tales como los mecanismos patogénicos asociados a virus, bacterias, parásitos y células anormales, constituyendo un mecanismo de defensa del organismo frente a estos agresores. Cuando el aumento del contenido intracelular de ERO sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula se produce el estrés oxidativo, a través del cual se induce daño a moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. El estrés oxidativo se presenta en diversos estados patológicos en los cuales se altera la funcionalidad celular, contribuyendo o retroalimentando el desarrollo de enfermedades degenerativas como la aterosclerosis, cardiomiopatías, enfermedades neurológicas y cáncer (Gutteridge y Halliwell, 1999).

### **2.1.7.3. ERO**

El oxígeno es una molécula básicamente oxidante, hasta el punto que en las células que lo utilizan para su metabolismo es el principal responsable de la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO). Sin embargo, no todas las especies oxidantes tienen un origen endógeno; la existencia de factores exógenos, como la radiación solar, toxinas fúngicas, pesticidas o xenobióticos, pueden incrementar su nivel. En condiciones normales, las células metabolizan la mayor parte del oxígeno ( $O_2$ ) con la formación de agua sin formación de intermediarios tóxicos, mientras que un pequeño porcentaje (en torno al 5%) forman tres intermediarios altamente tóxicos, dos de los cuales son literalmente radicales libres (el anión superóxido y el hidroxilo). En situaciones en las que exista una mayor actividad metabólica (etapas del crecimiento, desarrollos activos o procesos inflamatorios) ocurre

una mayor demanda tisular de O<sub>2</sub> y parte de él se metaboliza, generándose un alto número de sustancias oxidantes.

La segunda gran fuente de ERO también es endógena y está constituida por el metabolismo de las células defensivas tales como los polimorfonucleares, los monocitos sensibilizados, los macrófagos y los eosinófilos. Para que éstas puedan cumplir su misión, están dotadas de diversas proteínas así como de vías metabólicas que generan varias especies químicamente agresivas como peróxido de hidrógeno, radicales superóxido e hidroxilo, cuyo fin último es lesionar y destruir elementos extraños. En condiciones normales estas especies reactivas son producidas y utilizadas en compartimentos celulares como los lisosomas que, aunque en el interior de los fagocitos, no tienen por qué dañar a las células siempre y cuando los mecanismos antioxidantes de éstas funcionen adecuadamente.

Los oxidantes pueden también proceder del exterior, bien sea directamente o como consecuencia del metabolismo de ciertas sustancias. Algunos ejemplos lo constituyen la contaminación ambiental, la luz solar, las radiaciones ionizantes, una concentración de oxígeno demasiado elevado, los pesticidas, metales pesados, la acción de ciertos xenobióticos (cloroformo, paracetamol, etanol, tetracloruro de carbono, violeta de genciana) o el humo de tabaco. Sin embargo el papel de los radicales libres no ha de ser abordado sólo desde una perspectiva negativa o patológica. Estos compuestos cumplen también una función fisiológica al participar, en condiciones normales, en la defensa frente a las infecciones, en el metabolismo normal, en la fagocitosis e inflamación.

#### **2.1.7.4. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA**

Todas las células están rodeadas por una membrana que las separa del medio extracelular. La membrana celular contiene proteínas que juegan papeles vitales en la interacción de la célula con otras células, hormonas y agentes reguladores del líquido extracelular. La estructura básica de todas las membranas biológicas es la bicapa lipídica, la que funciona como una barrera de permeabilidad selectiva (Goodam, 1998). Éstas son ricas en

ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) y por lo tanto vulnerables al ataque de radicales libres que traen como consecuencia la peroxidación lipídica. Esta es generalmente inducida por un radical hidroxilo que sustrae un hidrógeno a la cadena lateral de un ácido graso formando un radical carbonado, lo que genera una cadena de reacciones oxidativas. Los antioxidantes, pueden formar complejos estables impidiendo la acción catabólica de los radicales libres en la membrana celular (Halliwell, 1990).

Los mecanismos homeostáticos con que el organismo enfrenta el daño oxidativo que habitualmente causan estas especies son numerosos y diversos, reflejando la multiplicidad de formas de radicales libres y especies reactivas, como también los numerosos compartimientos donde actúan en el organismo y las propiedades físicas de éstos (Kinsella et al., 1993).

#### **2.1.7.5. SISTEMAS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE CELULAR**

La capacidad antioxidante celular está dada por mecanismos a través de los cuales la célula anula la reactividad y/o inhibe la generación de radicales libres (Thornalley y Vasak, 1985; Greenwald, 1990; Palamanda y Kehrer, 1992). Estos mecanismos son adecuados a la muy corta vida media de los radicales libres y comprenden moléculas pequeñas, endógenas y exógenas con capacidad antioxidante. Los antioxidantes exógenos provienen de la dieta, y dentro de este grupo se incluyen la vitamina E, la vitamina C y los carotenoides. La vitamina C constituye el antioxidante hidrosoluble más abundante en la sangre, mientras que la vitamina E es el antioxidante lipofílico mayoritario. El selenio, el más tóxico de los minerales incluidos en nuestra dieta, actúa junto con la vitamina E como antioxidante (KINSELLA *et al.*, 1993). La vitamina E se encuentra presente en aceites vegetales, aceites de semilla, germen de trigo, maní, carnes, pollo, pescados y algunas verduras y frutas, en tanto la vitamina C se puede encontrar en frutas y verduras. Los carotenoides son compuestos coloreados tales como los betacarotenos, presentes en verduras y frutas amarillas y anaranjadas, y en verduras verdes oscuras, los alfacarotenos en la zanahoria, los licopenos en el tomate, las luteínas y xantinas en verduras de hojas verdes como el brócoli, y las beta criptoxantinas en frutas cítricas.

Recientemente se han descubierto en algunos alimentos otros antioxidantes no nutrientes, los compuestos fenólicos. Algunas fuentes son los frijoles (isoflavonas), cítricos (flavonoides), cebolla (quercetina) y polifenoles (aceitunas). También se han encontrado algunos antioxidantes fenólicos en el café, vino tinto y té. Por esta razón, la forma de suplir los antioxidantes para proteger al organismo del efecto oxidativo producido por los radicales libres es el consumo de alimentos ricos en vitamina E, vitamina C, carotenoides y otras sustancias que tienen función antioxidante.

#### **2.1.7.6. ANTIOXIDANTES PLASMÁTICOS**

Existen evidencias epidemiológicas que sustentan el papel patogénico de los radicales libres en procesos biológicos (MAXWELL, 1995). Los principales antecedentes surgen de estudios que muestran la correlación entre la incidencia de enfermedades inflamatorias y degenerativas y las bajas concentraciones de antioxidantes en la sangre (SOHAL y WEINDRUCH, 1996). La relación entre la presencia de algunas enfermedades, como las cardiovasculares y cáncer entre otras, se puede establecer con la elevación de marcadores de daño oxidativo y disminución de los niveles plasmáticos de antioxidantes, los que pueden ser modificados al aumentar la ingesta de antioxidantes (MEYDANI, 2001; LAURIN *et al.*, 2004). El plasma puede estabilizar especies reactivas del oxígeno de vida media mayor, como el anión superóxido o el peróxido de hidrógeno, previniendo reacciones con iones metálicos catalíticos que pueden generar especies aún más nocivas (HALLIWELL y GUTTERIDGE, 1989). Debido a esto, el estatus antioxidante del plasma es el resultado concomitante de muchos compuestos e interacciones metabólicas sistémicas. La medición de esta capacidad antioxidante combinada puede ser más relevante que la determinación individual de los antioxidantes presentes en la sangre. A lo anterior se suma el hecho que la capacidad antioxidante celular está principalmente determinada por sistemas enzimáticos, mientras que las plasmáticas están asociadas a la concentración de antioxidantes de bajo peso molecular suplementados por la dieta. Estos compuestos son rápidamente consumidos y necesitan ser recambiados para mantener el balance frente a las especies

oxidantes. Generalmente se investiga su efecto en el estatus antioxidante plasmático de voluntarios sanos sometidos a la ingestión de éstos.

Es posible concluir que la complejidad de los productos naturales con capacidad antioxidante constituye uno de los más grandes desafíos para los fitoquímicos, tanto en el aislamiento y elucidación estructural de principios activos como en el estudio de éstos en medios biológicos.

## **2.1.8. ACTIVIDAD ALELOPÁTICA**

### **2.1.8.1. CONCEPTO Y GENERALIDADES**

En la naturaleza, las plantas están expuestas a factores bióticos y abióticos con los cuales han co-evolucionado. La presión de selección ejercida por estos a lo largo del proceso evolutivo provocó el desarrollo en los vegetales de numerosas rutas de biosíntesis a través de las cuales sintetizan y acumulan en sus órganos una gran variedad de metabolitos secundarios. Se sabe que muchos de los mismos juegan un importante rol en interacciones complejas entre organismos vivos en el entorno natural. Entre ellos existen sustancias que producidas por una planta le proporcionan beneficios al provocar determinados efectos sobre otras plantas o animales. Estas sustancias se denominan aleloquímicos y el fenómeno en el cual están involucradas se designa con el nombre de aleloquimia.

El término alelopatía (del griego allelon = uno al otro, del griego pathos = sufrir; efecto injurioso de uno sobre otro) fue utilizado por primera vez por MOLISCH (1937) para referirse a efectos perjudiciales o benéficos que son el resultado de la acción de compuestos químicos que, liberados por una planta, ejercen su acción en otra. Siguiendo esta definición en todo fenómeno alelopático existe una planta (donor) que libera al medio ambiente por una determinada vía (por ej. lixiviación, descomposición de residuos, etc.) compuestos químicos los cuales al ser incorporados por otra planta (receptora) provocan un efecto perjudicial o benéfico sobre germinación, crecimiento o desarrollo de esta última. Los compuestos

citados que desencadenan el proceso se denominan compuestos, agentes o sustancias alelopáticas. La definición abarca tanto los efectos perjudiciales como benéficos. Es necesario puntualizar que muchas sustancias con actividad alelopática tienen efectos benéficos a muy bajas concentraciones y, superado un determinado umbral, actúan negativamente sobre la planta receptora. Aun así, predomina en la literatura especializada la descripción de efectos negativos. Por otra parte, el término definido por MOLISCH incluye a hongos y otros microorganismos además de las plantas superiores, puesto que en su tiempo todos ellos se consideraban miembros del reino vegetal. La confusión aumenta si se tiene en cuenta que muchos agentes alelopáticos además de tener un efecto sobre plantas, también lo tienen sobre otros tipos de organismos distantes a éstas tales como herbívoros e insectos fitófagos. Evolutivamente es lógico esperar por selección natural la preferencia por modelos de defensa basados en sustancias que presentan actividad biológica sobre un amplio espectro de organismos, lo cual implica para la planta una mayor eficiencia en el uso de su energía. Esto condujo a ciertos autores a ampliar el alcance de la alelopatía.

#### **2.1.8.2. NATURALEZA QUÍMICA DE LOS AGENTES ALELOPÁTICOS**

Los agentes alelopáticos son metabolitos secundarios y los compuestos conocidos fueron aislados de las plantas y el suelo. La naturaleza química de los agentes alelopáticos es muy variada.

**Compuestos alifáticos:** Entre ellos diversos ácidos (oxálico, crotónico, fórmico, butírico, acético, láctico y succínico) y alcoholes (como metanol, etanol, n-propanol y butanol) solubles en agua, que son componentes comunes presentes en plantas y suelo. Pocos de estos compuestos son conocidos por su actividad inhibitoria en la germinación de semillas y el crecimiento de las plantas. En condiciones aeróbicas los ácidos alifáticos son rápidamente metabolizados en el suelo, por lo cual no pueden considerarse una importante fuente de actividad alelopática.

**Lactonas no saturadas:** Especies como *Psilotum nudum* y *Twesiperis tannensis*, producen psilotina y psilotinina. La protoanemonina es producida



por varias ranunculáceas. La poderosa acción inhibitoria de estas va a influir en la disminución del crecimiento de la planta, sin embargo la relación de estos compuestos en alelopatía no se conoce plenamente.

**Lípidos y ácidos grasos:** Se encuentran muchos ácidos grasos tanto en plantas terrestres como acuáticas que son inhibitorios de crecimiento vegetal. Se pueden citar entre otros los ácidos linoleico, mirístico, palmítico, láurico e hidroxiesteárico. Su relación en alelopatía no está plenamente investigada.

**Terpenoides:** Gran número de terpenoides son producidos por plantas superiores, aunque de ellos sólo unos pocos parecen estar involucrados en alelopatía. Por lo general estas sustancias se aislaron de plantas que crecen en zonas áridas y semiáridas. Los principales componentes de los aceites esenciales en los vegetales son los monoterpenos y son estos los terpenoides inhibidores de crecimiento más abundantes que han sido identificados en las plantas superiores. Son conocidos por su potencial alelopático contra malezas y plantas de cultivo. Los más frecuentes con actividad alelopática se pueden citar el alcanfor, a y b pineno, 1,8-cineol, y dipenteno. Algunas de las plantas que los producen son los géneros *Salvia* spp., *Amaranthus*, *Eucalyptus*, *Artemisia*, y *Pinus*. Podemos citar como importante hormona vegetal y agente alelopático al ácido abscísico perteneciente a los sesquiterpenos.

**Glicósidos cianogénicos:** Entre ellos se encuentran la durrina y amigdalina (o su forma reducida prunasina) de reconocida actividad alelopática. La hidrólisis de estos compuestos da lugar no sólo a cianhídrico sino también a hidroxibenzaldehído que al oxidarse origina el ácido p-hidroxibenzoico, el cual posee por sí mismo actividad alelopática. La durrina es frecuente entre especies tanto cultivadas como silvestres del género *Sorghum*. Amigdalina y prunasina son frecuentes en semillas de *Prunaceae* y *Pomaceae* actuando como inhibidores de germinación. La mayoría de los miembros de la familia *Brassicaceae* producen grandes cantidades de estos glicósidos, los que por hidrólisis producen isotiocianato con igual actividad biológica.

**Compuestos aromáticos:** Alcanza la más extensa cantidad de agentes alelopáticos. Incluye fenoles, derivados del ácido benzoico, derivados del ácido cinámico, quinonas, cumarinas, flavonoides y taninos.

**Fenoles simples:** Entre ellos las hidroxiquinonas y la arbutina, se aislaron de lixiviados de *Arctostaphylos* e inhiben el crecimiento de varias plantas.

**Ácido benzoico y sus derivados:** Derivados del ácido benzoico tales como los ácidos hidroxibenzoico y vainílico, están comúnmente involucrados en fenómenos alelopáticos. Dentro de las especies que los contienen se pueden citar el pepino, la avena (*Avena sativa*) y el sorgo. También se detectó la presencia de estos frecuentemente en el suelo.

**Ácido cinámico y sus derivados:** La mayoría de estos compuestos son derivados de la ruta metabólica del ácido shikímico y están ampliamente distribuidos en las plantas. Se identificó la presencia de los mismos en pepino, girasol (*Helianthus annuus*) y guayule (*Parthenium argentatum*). Otros derivados de los ácidos cinámicos tales como clorogénico, cafeico, p-cumárico, y ferúlico están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y son inhibitorios de una gran variedad de cultivos y malezas. Los efectos tóxicos de estos compuestos son pronunciados debido a su larga persistencia en el suelo y muchos derivados del ácido cinámico han sido identificados como inhibidores de la germinación.

**Quinonas y derivados:** Muchas de las quinonas y sus derivados provienen de la ruta metabólica del ácido shikímico. Compuestos como la juglona y naftoquinonas están relacionadas de las que se aislaron del nogal.

**Cumarinas:** Las cumarinas están presentes en muchas plantas. La metil esculina fue identificada en Ruta, Avena e Imperata. Compuestos tales como escopolina, escopoletina y furanocumarinas tienen capacidad inhibitoria del crecimiento vegetal.

**Flavonoides:** Flavonoides como floridzina (producida por *Malus* y algunas ericáceas) y sus productos de degradación como glicósidos de quempferol, quercetina y myrcetina son agentes alelopáticos bien conocidos.

**Taninos:** Taninos hidrolizables como los ácidos gálico, elágico, trigálico, tetragálico y quebúlico están considerablemente distribuidos en el reino vegetal. Muchos de ellos están presentes en suelos de bosques en concentraciones suficientes para inhibir la nitrificación. Los taninos condensados, que se producen de la polimerización oxidativa de las catequinas, inhiben las bacterias nitrificantes en suelos forestales y disminuyen el ritmo de descomposición de la materia orgánica el cual es importante para los ciclos de circulación de minerales en el suelo. Los taninos, tanto los hidrolizables como los condensados, tienen efectos inhibitorios debido a su capacidad para unirse a proteínas.

**Alcaloides:** Un reducido número de alcaloides se conocen con actividad alelopática. Algunos como la cocaína, cafeína, cinconina, fisostigmina, quinina, cinconidina, estricnina son reconocidos inhibidores de la germinación. La cebada exuda por sus raíces la gramina que inhibe el crecimiento de *Stellaria media*. La cafeína mata ciertas hierbas sin afectar algunas especies sembradas.

### 2.1.8.3. BIOSÍNTESIS DE LOS AGENTES ALELOPÁTICOS

La mayoría de los agentes alelopáticos son metabolitos secundarios derivados de las rutas del acetato-mevalonato o del ácido shikímico. Proviene de la ruta metabólica del acetato-mevalonato terpenos, esteroides, ácidos orgánicos solubles en agua, alcoholes de cadena lineal, aldehídos alifáticos, cetonas, ácidos grasos insaturados simples, ácidos grasos de cadena larga, poliacetilenos, naftoquinonas, antroquinonas, quinonas complejas y floroglucinol. Proviene de la vía metabólica del shikímico fenoles simples, el ácido benzoico y sus derivados, el ácido cinámico y sus derivados, cumarinas, sulfuros, glicósidos, alcaloides, cianhidrinas, algunos de los derivados de quinonas y taninos hidrolizables y condensados. Existen también compuestos (p. ej. los flavonoides) en cuya síntesis participan

metabolitos de las dos rutas. Como es previsible, las concentraciones de estos compuestos en los tejidos varían según el ritmo de biosíntesis, almacenamiento y degradación. También son afectados por los balances internos de reguladores de crecimiento vegetal y otros factores bióticos y abióticos.

#### **2.1.8.4. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS AGENTES ALELOPÁTICOS**

##### **2.1.8.4.1. LIMITACIONES EN EL ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE ACCIÓN**

Debido a la diversidad de naturalezas químicas de los diferentes agentes alelopáticos, no existe un mecanismo de acción único que explique la manera en que éstos afectan a la planta receptora. La comprensión del mecanismo de acción de un compuesto alelopático determinado tiene varios inconvenientes. En condiciones naturales las cantidades en que se encuentran disponibles muchas de estas sustancias son inferiores a las que presentan actividad en bioensayos en laboratorio. Esto se debe a que frecuentemente existen interacciones sinérgicas y aditivas, lo cual dificulta determinar la actuación de cada compuesto. Esa presencia mínima de sustancia también dificulta su recuperación para ser utilizados en estudios de efectos fisiológicos y a nivel subcelular. Estudiando un agente alelopático en particular, muchas veces es difícil diferenciar efectos secundarios de la causa primaria de acción. La importancia del estudio de cómo actúan estas sustancias es evidente si se tiene en cuenta que son aproximadamente sólo doce los sitios moleculares de acción conocidos de los herbicidas actualmente utilizados en agricultura y entre las malezas es logarítmico el ritmo de aparición de resistencias a los productos comerciales en uso. Se deduce fácilmente que la utilización de sustancias con nuevos sitios de acción diferentes a los explotados hasta el momento permitiría reducir el impacto de éste problema.

La literatura nos brinda alguna comprensión de los mecanismos de acción de agentes alelopáticos pero, por todo lo señalado anteriormente, falta todavía más claridad respecto a cómo afectan el crecimiento de las plantas receptoras. Los más estudiados hasta el presente en este aspecto son los compuestos fenólicos. Es una aproximación interesante seguir la trayectoria de estas sustancias a través de la planta mediante moléculas de las mismas marcadas con C14. Esto permite entender a qué partes son predominantemente transportados y en qué tejidos es factible que ejerzan su acción. Los primeros estudios de este tipo mostraron que semillas en germinación de lechuga (*Lactuca sativa*) y cebada son capaces de incorporar cumarina y los ácidos cinámico, cafeico y ferúlico. Otros trabajos con plantines indican que los ácidos salicílicos, ferúlico y p-hidroxibenzoico son rápidamente extraídos de medios nutritivos y trasladados a través de la planta. Desgraciadamente, no se han utilizado moléculas marcadas con radioisótopos para la mayoría de los agentes alelopáticos. A continuación se analizarán diferentes aproximaciones destinadas a comprender los mecanismos de acción de estas sustancias.

#### **2.1.8.4.2. EFECTOS SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA**

Existen muchos compuestos alelopáticos con capacidad de modificar ya sea la síntesis o la actividad de enzimas tanto in vivo como in vitro. La mayoría de estas sustancias han demostrado un efecto dual sobre la regulación de la actividad enzimática. Provocan un incremento en ésta última cuando se encuentran en bajas concentraciones. En la situación opuesta se observa una reducción de actividad. Por ejemplo, plántulas de maíz tratadas con ácido ferúlico mostraron un incremento en los niveles de enzimas oxidativas (peroxidasas, catalasa y ácido indol acético oxidasa) junto con una elevación de enzimas de la ruta del ácido shikímico tales como fenil alanina amonio liasa y la cinamil alcohol deshidrogenasa involucrada en la síntesis de compuestos fenilpropanoides. También al ácido ferúlico se le atribuye la inhibición de enzimas hidrolíticas

tales como amilasa, maltasa, invertasa, proteasa y fosfatasa ácida involucradas en la movilización de material de alimento.

#### **2.1.8.4.3. EFECTOS SOBRE LA FOTOSÍNTESIS**

Se han realizado experimentos con plantas enteras, suspensiones de células y cloroplastos para averiguar si los agentes alelopáticos eran capaces de inhibir el proceso fotosintético. Bioensayos con *Abutilon theophrasti* y *Lemna minor* demostraron que varios ácidos derivados del benzoico y el cinámico (p. ej. el ácido ferúlico), escopoletina y clorogénico en bajas concentraciones eran capaces de inhibir la fotosíntesis de plantas enteras. Experimentos con suspensiones de células foliares de *Abutilon theophrasti*, mostraron que el ácido ferúlico, p-cumárico, clorogénico y vainílico son capaces de inhibir la fotosíntesis con concentraciones de los aleloquímicos menores a las requeridas para planta entera. Es necesario aclarar que el efecto inhibitorio del agente alelopático sobre la fotosíntesis no necesariamente acontece en los eventos primarios del proceso, sino como resultado de una modificación en los niveles de clorofila o por cierre de los estomas y la subsecuente reducción en la provisión de CO<sub>2</sub> vital para la producción de fotosintatos. En soja los ácidos ferúlico, vainílico y p-cumárico reducen el contenido de clorofila. En sorgo, las mismas sustancias no provocan esa disminución. Los ácidos ferúlico, p-cumárico y otros cinámicos a bajas concentraciones revierten el cierre de estomas mediado por ABA y estimulan la fotosíntesis. A concentraciones altas, sin embargo, provocan el cierre de los estomas e inhibición del proceso fotosintético. La experimentación con cloroplastos permite eliminar la interferencia de los factores indicados. Los ácidos fenólicos actúan en concentraciones relativamente altas inhibiendo el transporte de electrones lo que sugeriría según Einhellig que el sitio blanco de acción de estas sustancias es otro. Ciertos flavonoides parecen interferir en la organización funcional o estructural del cloroplasto. El quempferol, por ejemplo, aparentemente actúa como un inhibidor de transferencia de energía, impidiendo la síntesis de ATP. Un caso

especial son las quinonas. Existen compuestos sintéticos de esta naturaleza que son empleados como herbicidas. Algunas de origen natural son reconocidos agentes alelopáticos como el sorgoleone y la juglona. El sorgoleone, una benzoquinona presente en los exudados radiculares de sorgo, a concentraciones similares a las empleadas con el herbicida atrazina, es capaz de desacoplar el transporte de electrones en el fotosistema II. La juglona afecta también la evolución del oxígeno en el cloroplasto, sin aparentemente desacoplar la fotofosforilación. Compuestos de otro tipo como el alcaloide gramina también provocan desacople en el transporte de electrones.

#### **2.1.8.4.4. EFECTOS SOBRE LA RESPIRACIÓN**

Para estudiar el efecto de los aleloquímicos sobre la respiración, normalmente se ensayan los mismos sobre suspensiones mitocondriales. Entre los compuestos fenólicos el orden de mayor a menor actividad es quinonas > flavonoides > cumarinas > ácidos fenólicos. Las quinonas sorgoleone y juglona son efectivos inhibidores a muy baja concentración. Nuevamente el sorgoleone afecta el transporte de electrones, mientras que la juglona afecta la incorporación mitocondrial de oxígeno.

Flavonoides tales como la quercetina, naringenina y umbeliferona inhiben la producción de ATP en la mitocondria.

#### **2.1.8.5. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN EN ALELOPATÍA**

La investigación de un fenómeno alelopático es compleja. Esto se debe fundamentalmente a que el metabolito luego de su liberación al entorno puede sufrir transformaciones que aumenten o disminuyan su actividad antes de tomar contacto con la especie receptora. Por ejemplo, si el aleloquímico es una sustancia presente en el suelo, la microflora puede transformarlo. A su vez, la actividad de la misma dependerá de su composición cuali y cuantitativa la cual está sujeta a la acción de factores abióticos (p. ej. humedad y temperatura) o bióticos (p. ej. exudados microbianos).

En forma general la investigación en alelopatía comprende 2 etapas:

1. Fase biológica – ecológica.
2. Fase química – analítica.

Fase biológica – ecológica:

Se observa si en condiciones de campo existe una aparente interacción negativa severa entre plantas. Esta puede visualizarse, entre otros, como zonas de suelo desnudo alrededor de vegetación arbustiva, cobertura vegetal escasa, bajo un grupo de árboles, persistencia de un estado particular dentro de la sucesión vegetal o impedimento del desarrollo o reducción del rendimiento en un cultivo infestado con una maleza agresiva en particular.

El siguiente paso es determinar su competencia, alelopatía u otro proceso (un patógeno vegetal, una plaga, etc.) es responsable de la reducción de crecimiento observada en la especie afectada. Normalmente si el efecto observado no puede atribuirse a variables físicas ambientales (pH, temperatura, nutrientes minerales y contenido de agua), ni a los procesos indicados anteriormente, se considera que la alelopatía es la causa.

A continuación, debe determinarse el mecanismo de liberación y el camino por el cual se mueve el supuesto aleloquímico en el medio. Los métodos de extracción deben tratar de simular las rutas de entrada de las sustancias tóxicas al entorno natural.

Procedimientos drásticos como los que involucran el uso de solventes orgánicos o agua en ebullición no son recomendables. Estos pueden llevar a la detección de fitotoxinas que en condiciones naturales están física o químicamente unidas de tal forma que no podrían actuar en la inhibición de crecimiento vegetal.

Para el estudio de una alelopatía en particular debe establecerse un bioensayo standard seleccionando especies blanco convenientes y se bioensayan los compuestos colectados anteriormente evaluado cambios en



tamaño y peso en los órganos de éstas. Son frecuentes los bioensayos de germinación de semillas y crecimiento de plántulas. También se han diseñado bioensayos con plantas enteras (por ejemplo: *Lemna minor*). Las especies blanco se seleccionan de acuerdo al objetivo que se persigue (por ejemplo: corroborar la sensibilidad a un aleloquímico de una supuesta especie receptora que se observó en campo). Es aconsejable seleccionar especies que presenten germinación uniforme, sensibilidad a gran variedad de aleloquímicos especialmente a bajas concentraciones de los mismos y crecimiento rápido. De esta manera en el análisis estadístico de la información se pueden obtener bajos coeficientes de variación y la más alta significación para los parámetros de crecimiento mensurables (por ejemplo: longitud de raíz y vástago).

#### **Fase química-analítica:**

Si un efecto fitotóxico puede demostrarse a través de los bioensayos, se procede al aislamiento e identificación de los aleloquímicos responsables. Métodos de concentración y aislamiento se dirigen de acuerdo a la actividad biológica observada en bioensayos acoplados a ellos. La disponibilidad de técnicas tales como la cromatografía en capa fina, cromatografía en papel, cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y cromatografía gaseosa acoplada a espectrómetro de masas, permiten la identificación de la mayoría de los compuestos aislados.

Por último, una vez identificado el agente alelopático, debe detectarse su presencia en la parte del entorno (aire, suelo, solución del suelo) a través de la cual estaría ejerciendo su acción en la concentración adecuada para causar la inhibición de la planta receptora. Esto es especialmente problemático, ya que los compuestos biológicamente activos frecuentemente se encuentran en concentraciones muy bajas en el suelo, lo cual dificulta la extracción y detección de los mismos.

Muchos autores enfatizan que no se puede emplear una sola técnica para probar la presencia o no de un fenómeno alelopático. Los criterios expresados anteriormente, considerados en conjunto, pueden ser muy útiles

en la evaluación de la naturaleza de un fenómeno de interferencia en particular.

#### **2.1.8.6. IMPORTANCIA DEL CONOCIMIENTO DE LOS PROCESOS ALELOPÁTICOS**

La agricultura moderna utiliza extensivamente agroquímicos, los cuales tienen un fuerte impacto ambiental y en muchos casos constituyen un serio riesgo a la salud humana. Las investigaciones en alelopatía en algunos casos permiten plantear estrategias orientadas a una mayor sustentabilidad de los sistemas de producción agrícola, con un menor consumo en insumos contaminantes. Para lograr un mejor aprovechamiento de los agentes alelopáticos es necesario ampliar el conocimiento de los mismos en relación a la rotación de cultivos, manejo de residuos, prácticas de labranza y la implementación de control biológico de malezas.

En condiciones de campo se ha observado que el sorgo, el girasol y otros cultivos reducen el uso de herbicidas tanto durante el desarrollo de los mismos como en años siguientes. Cultivos de cobertura y sus residuos, tales como centeno, avena, cebada, trigo, sorgo granífero y sudangrass son efectivos en la reducción del crecimiento de malezas. Se han ensayado diferentes modos para su empleo:

1. Cultivada el año anterior.
2. Supresión directa de la población de malezas cuando ellos son el cultivo.
3. Como cultivo de cobertura de suelo en quintas o huertos con subsecuente desecación utilizando herbicidas o por heladas.
4. En secuencias de cultivos (p.ej.: sembrar como cultivo invernal trigo y maíz como cultivo estival sobre los rastrojos dejados por el primero).
5. Rotación de cultivos con siembra directa del cultivo del segundo año sobre rastrojos dejados por la especie.

Otra aproximación es el de intercalar 2 o más cultivos cosechables, donde alguno de ellos tiene actividad alelopática sobre malezas. El cultivo intercalado de maíz con zapallo ha demostrado ser efectivo en el control de

malezas del primero. Se detectaron aleloquímicos liberados por esa cucurbitácea que afectan malezas normalmente perjudiciales al maíz.

Debido a la importancia del control de malezas, los enfoques indicados pueden ser empleados sin una comprensión completa de los mecanismos de interferencia involucrados. El uso de plantas superiores como herbicidas biológicos, incluidas especies no cultivadas para controlar malezas ha recibido escasa atención. Sin embargo se conoce, por ejemplo, que *Euphorbia esula*, una de las peores malas hierbas de las llanuras del norte de Estados Unidos, no invade zonas ocupadas por *Artennaria microphylla*. Se cree que esto es debido a la sensibilidad a sustancias producidas por esta última. En plantaciones de citrus en Florida *Lantana camara* y *Morrenia odorata* son malezas importantes. Se observó que en campos ocupadas por Lantana no crece Morrenia. Bioensayos indicaron que *L. Camara* tendría efecto alelopático sobre Morrenia. Tal vez en el futuro se puedan emplear malezas con actividad alelopática de poca incidencia sobre determinados cultivos contra otras más graves que se presentan normalmente en los mismos.

Por último, debe señalarse nuevamente que el conocimiento de los modos de acción de los agentes alelopáticos es clave para la exploración del uso de los mismos como herbicidas. Esto usualmente ofrece herramientas para combatir la evolución de resistencias a biocidas de malezas actualmente utilizados y alternativas para aquellos para los cuales la resistencia ya existe.

## **2.2.DEFINICIONES OPERACIONALES**

### **2.2.1. VARIABLE INDEPENDIENTE**

- a) Extractos etanólicos de las hojas de *Piper tenuistylum* C.DC. y *Piper lagenaebaccum* Trel.

### **2.2.2. VARIABLE DEPENDIENTE**

- a) Actividad antioxidante de los extractos de las hojas de *Piper tenuistylum* C.DC. y *Piper lagenaebaccum* Trel.
  
- b) Actividad alelopática de los extractos etanólicos de las hojas de *Piper tenuistylum* C.DC. y *Piper lagenaebaccum* Trel.

### 2.3. HIPÓTESIS

- Las hojas de las especies *Piper tenuistylum* C.DC. y *Piper lagenaebaccum* Trel. presentan actividad antioxidante y acción alelopática.

# CAPÍTULO III

### **3.1. METODOLOGÍA**

El presente trabajo de investigación se realizó dentro de las instalaciones del Laboratorio de Sustancias Naturales Bioactivas (LSNB) del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP), ubicado en el Km 4.5 de la carretera Iquitos – Nauta.

### **3.2. MÉTODO DE INVESTIGACIÓN**

#### **3.2.1. MARCHA FITOQUÍMICA PRELIMINAR**

(De acuerdo al procedimiento de Rondina & Coussio–1969)

##### **A. OBTENCIÓN DE LAS FRACCIONES**

###### **1. Fracción (a)**

- i. En un balón de 100 mL se colocó en maceración 5g de muestra seca y pulverizada con 50 mL de metanol, durante 20 horas a temperatura ambiente.
  
- ii. Luego, la mezcla se sometió a reflujo durante 4 horas; se filtró en caliente, a través de un papel de filtro “rápido”, lavando el residuo sobre el papel de filtro con metanol. El extracto metanólico se colocó en una fiola de 50 mL y se completó a la marca.
  
- iii. Se separaron 5 mL del extracto, lo que constituye la fracción (a). Se descartó el residuo sólido.

###### **2. Fracción (b)**

- i. El resto (45 mL) de la solución anterior se llevó a sequedad en el rotavapor.
  
- ii. El residuo obtenido se extrajo con 10mL de ácido clorhídrico HCl (ac) al 1%, calentando ligeramente (50°C), y se filtró sobre papel de filtro lento. Esta operación se repitió en las mismas condiciones con 5mL de ácido clorhídrico HCl (ac) al 1%, a 50° C. Las soluciones ácidas se recibieron en un erlenmeyer de 50mL y se guardaron para ser utilizados posteriormente (ver Sec.3.i).

iii. El residuo sólido se disolvió con 5mL de cloroformo, con ayuda de calor (50°C) y fuerte agitación, y luego se filtró a través de un embudo pequeño utilizando papel de filtro “lento”. El líquido filtrado se secó con sulfato de sodio anhidro, obteniéndose la fracción (b). El residuo sólido se descartó.

### **3. Fracción (c)**

i. La solución ácida obtenida en 2.ii, se basificó con amoníaco  $\text{NH}_3$  (ác) 7,5N hasta pH 9-10.

ii. Luego, se extrajo con cloroformo (2x25 mL). La parte acuosa se guardó para tratamiento posterior (ver Sec. 4.i).

iii. La fase clorofórmica se lavó con 10 mL de agua destilada. Se reúne el agua del lavado con la fase acuosa obtenida en la etapa anterior (ii).

iv. La fase clorofórmica se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró (con papel filtro “rápido”). El filtrado constituye la fracción (c).

### **4. Fracción (d)**

i. La fase acuosa básica obtenida en la Sección anterior (ii y iii) se semisaturó con sulfato de sodio (0,1g de sal anhidra por mL de solución) y se filtró (con papel filtro “rápido”). Se extrajo con cloroformo:etanol (3:2) (2x25mL). Se guardó la fase acuosa (ver Sec.5).

ii. La fase orgánica (50mL) se lavó con una solución semisaturada de sulfato de sodio (1g de sal anhidra en 10mL de agua destilada). El lavado acuoso se guardó junto con la obtenida en la etapa anterior.

iii. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtra (con papel filtro “rápido”), obteniéndose la fracción (d).

### **5. Fracción (e)**

i. Las fases acuosas obtenidas en la sección precedente (i y ii) constituyen la fracción (e).



## 6. Fracción (f)

- i. En un tubo de ensayo limpio y seco (de 18x100mm), se colocó 1g de muestra seca y pulverizada y 10 mL de agua destilada; se agitó la mezcla y se calentó en baño de aceite durante 10-15 minutos.
  
- ii. Se filtró en caliente a través de papel de filtro rápido y se completó a 10 mL, dejando enfriar a temperatura ambiente. Esto constituye la fracción (f).

## B. PRUEBAS DE IDENTIFICACION DE METABOLITOS SECUNDARIOS

### 1. Aminogrupos primarios o secundarios (Prueba de Ninhidrina) Nota.-Se realiza sobre las fracciones (a) y (f).

- i. Tomando cuidado de no tocar la parte central con los dedos, se prepararon tres trozos de papel de filtro “lento” de 2x3cm de longitud, y se los dispone sobre una placa de vidrio. Luego con ayuda de una pipeta Pasteur se colocó, en el centro de cada uno, una gota de las siguientes muestras: fracción (a), la fracción (f) y agua destilada (sirve como referencia). Los tres papeles con sus respectivas muestras se dejaron secar a temperatura ambiente.
  
- ii. Luego se agregó 1 gota de la solución de Ninhidrina al 0,2% en etanol sobre la parte central de cada uno de los tres papeles anteriores.
  
- iii. Los tres papeles se colocaron durante 30 minutos dentro de una estufa a 110- 120°C.

**Observación e interpretación de resultados:** La presencia de un color violeta sobre el papel indica prueba positiva.

### 2. Grupos fenólicos libres (Pruebas con reactivo Férrico)

Nota.- Se realiza sobre la fracción (a).

- i. El resto de la fracción (a) (aproximadamente 5 mL) se llevó a sequedad en el rotavapor en un balón de 200mL.

ii. El residuo se disuelve en 0,5mL de agua destilada y se filtró (si es necesario) a través de un embudo pequeño utilizando papel de filtro “lento”; se reciben los filtrados (“solución a”), en un tubo de ensayo (13x100mm).

iii. Se colocaron dos gotas de la “solución a” en una luna de reloj ( $\varphi = 75\text{mm}$ ); luego, se adicionaron 1 gota de la solución acuosa de cloruro férrico al 1% y se mezclaron.

**Observación e interpretación de resultados:** En caso de prueba positiva se observa un color azul o verde.

### 3. Taninos (Prueba de la Gelatina)

Nota.- Se realizó sobre la “solución a” obtenida en la sección precedente (2.ii). Se colocaron 4 gotas de “solución a” en una luna de reloj ( $\varphi = 75\text{mm}$ ); y se adicionaron dos gotas de la solución de gelatina al 0,5%. Se realizó la misma operación con dos gotas de agua destilada como referencia. Conviene realizar esta prueba sobre un fondo negro u oscuro para una mejor observación del resultado esperado.

**Observación e interpretación de resultados:** La presencia de un precipitado blanco nos indica que la prueba es positiva.

### 4. Flavonoides (Reacción de Shinoda) (excepto chalconas, dihidrochalconas, auronas, catequinas e isoflavonas)

Nota.- Se realiza sobre la fracción (d) y (e).

#### a) Tratamiento de la fracción (d)

i. La fracción (d) se colocó en un balón de 100 mL y se llevó a sequedad.

ii. Sobre el residuo se agregó 2,5 mL de etanol agitándose hasta disolución, dentro de un “baño maría” a 50°C. Luego se filtró a través de un embudo pequeño y papel de filtro “lento”, recibiendo el filtrado en un tubo de ensayo (13x100mm). Esto constituye la “solución d”.

iii. En un tubo de ensayo (13x100mm) limpio y seco se colocaron 3 gotas de la “solución d”, 2mL de agua destilada, 1mL de HCl(ac) 12N y limaduras de Magnesio. Se agitó y luego se dejó en reposo durante 5 minutos.

iv. Se adicionaron 6 gotas de alcohol amílico y se agitó; luego, se dejó en reposo y se observó la coloración de la fase amílica.

**b) Tratamiento de la fracción (e)**

v. Se empleó directamente 2 mL de la fracción (e) y se siguió lo indicado en las etapas iii y iv precedentes.

**Observación e interpretación de resultados:** La presencia de un color rojo o rosado en la fase amílica nos indica prueba positiva.

**5. Triterpenoides y esteroides (Reacción de Liebermann-Burchard)**

Observación.- El color y su intensidad varían de acuerdo a la estructura del compuesto, y hay algunos compuestos que no desarrollan color.

Nota.- Se realiza sobre las fracciones (b), (c) y la “solución d” (corresponde a la fracción (d), ver 4.a.ii)

**a) Tratamiento de las fracciones (b) y (c)**

i. Se separaron 4 mL de la fracción (c) y se llevó hasta sequedad. Luego se disolvió con cloroformo (0,2 mL). Esta solución la denominamos “solución c”.

ii. En una placa de toque se colocaron en posiciones diferentes, 2 gotas de la fracción (b) y de la “solución c”, respectivamente. Luego, se agregaron 2 gotas de anhídrido acético sobre ellas y se mezcló bien.

iii. Seguidamente se adicionaron 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado.

**b) Tratamiento de la “solución d”**

iv. Se colocaron 5 gotas de la “solución d” (ver Sec 4.a.ii) en un tubo de ensayo (7x60mm) y se llevó a sequedad en el rotavapor. El residuo se disolvió en 2 gotas de cloroformo. Luego se siguieron las etapas ii y iii precedentes.

**Observación e interpretación de resultados:** La formación de anillos de color naranja, azul o verde nos indica prueba positiva.

## 6. Naftaquinonas y antraquinonas, antronas o antranoles (Reacción de Bornträger)

Nota.- Se realiza sobre la fracción (b).

El resto de la fracción (b) se dispone en un tubo de ensayo (13x100mm), se añadió 5mL de hidróxido de sodio al 5% y se agita.

**Observación e interpretación de resultados:** La presencia de un color rosado nos indica prueba positiva.

## 7. Alcaloides (Test de Dragendorff y Mayer)

Nota.- Se realizó sobre la fracción (c) y la “solución d” (correspondiente a la fracción (d), ver 4.a.ii).

### a) Tratamiento de la fracción (c)

i. El resto de la fracción (c) se llevó a sequedad.

ii. Luego se extrajo con 2,5mL de ácido clorhídrico HCl(ác) al 1%, calentando ligeramente (50°C). Se filtra si fuera necesario.

iii. De la solución ácida obtenida, se disponen 3 gotas por separado, en dos lunas de reloj ( $\varphi = 75\text{mm}$ ) y se adicionaron en cada caso 2 gotas de los reactivos de Dragendorff y de Mayer, respectivamente.

### b) Tratamiento de la “solución d”

i. Se dispone 5 gotas de la “solución d” en un tubo de ensayo (7x60mm) y se llevó a sequedad. El residuo se disolvió en 4 gotas de ácido clorhídrico HCl(ac) al 1%.

ii. Se filtró a través de papel de filtro “lento”; se reparte el filtrado en dos lunas de reloj y se adicionaron los reactivos de Dragendorff y Mayer, respectivamente.

**Observación e interpretación de resultados:** La formación de un precipitado naranja y crema, respectivamente nos indica prueba positiva.

## 8. Leucoantocianidinas y catequinas (Reacción de Rosenbeim)

Nota.- Se realizó sobre la fracción (e) y la “solución d” (correspondiente a la fracción (d), ver 4.a.ii).

### a) Tratamiento de la “solución d”

- i. En un tubo de ensayo (13x100mm) se colocaron 3 gotas de la “solución d” y 2mL de agua destilada.
- ii. Luego se adicionaron 1mL de ácido clorhídrico concentrado HCl (ac) 12N.
- iii. Se agitó y se calentó en “baño maría” durante 10 minutos,.
- iv. Se dejó enfriar la mezcla; luego se adicionaron 6 gotas de alcohol amílico y se agitó.
- v. Después de dejar reposar la mezcla se observa la fase amílica.

### b) Tratamiento de la fracción (e)

Para el caso de la fracción (e) se emplea 2mL y se siguieron los pasos ii, iii, iv y v.

**Observación e interpretación de resultados:** La presencia de color rojo (leucoantocianidinas) o marrón (catequinas) en la fase amílica nos indica prueba positiva.

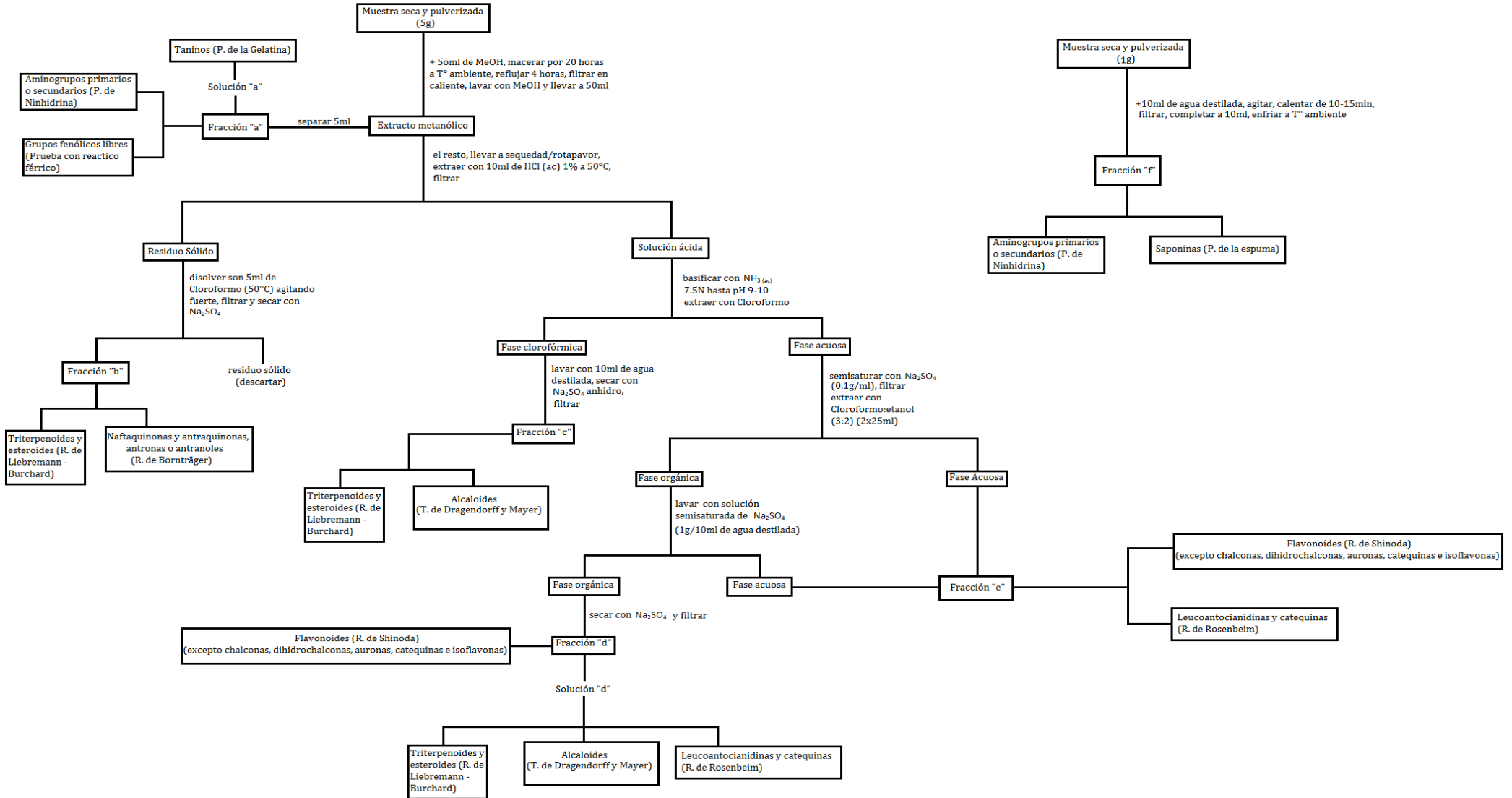
## 9. Saponinas (Prueba de la Espuma)

Nota.- Se realiza sobre la fracción (f).

- i. Se colocó 1ml de la fracción (f) en un tubo de ensayo (13x100mm) y se agitó durante 15 segundos. Luego se dejó en reposo por 15 minutos, al cabo de lo cual se midió la altura de la espuma.

**Observación e interpretación de resultados:** Si después de los 15 minutos de reposo la altura de la espuma es mayor o igual a 5mm, nos indica prueba positiva.

# GRÁFICO N°1: DIAGRAMA DE FLUJO – MARCHA FITOQUÍMICA PRELIMINAR



### 3.2.2. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

#### EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE EL MÉTODO 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZIL (DPPH)

##### Consideraciones:

- ✓ El agua utilizada siempre fue de calidad HPLC.
- ✓ Se terminó la preparación de las soluciones de la curva de calibración en el menor tiempo posible, de esta manera se evitó la degradación del ácido ascórbico y del DPPH.

##### **I. Reactivos**

###### **a) Solución stock de ácido ascórbico 500 $\mu$ M [25 mL]**

Se pesó exactamente 2.2 mg de ácido ascórbico ( $M = 176.12$  g/mol) y se llevó a 25 mL con Metanol grado HPLC en una fiola. Se agitó entre 2 y 3 minutos con ayuda del vórtex hasta lograr su completa disolución.

###### **b) Solución stock de quercetina 500 $\mu$ M [25 mL]**

Se pesó exactamente 4.22 mg de quercetina hidratada ( $M = 338.26$  g/mol) y se disolvió en Metanol grado HPLC; se llevó a 25 mL en una fiola.

###### **c) Solución stock de Trolox 1 mM (1mg/mL) [100 mL]**

Se pesó exactamente 25 mg de Trolox ( $M = 250.29$  g/mol) y se aforó a 100 mL con Metanol grado HPLC.

*Nota: Debe protegerse de la luz y será estable durante 6 meses a  $-20^{\circ}$  C.*

###### **d) Solución stock de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) 1mM [10 mL]**

Se pesó exactamente 3.94 mg de DPPH ( $M = 394.3$  g/mol) y se disolvió en Metanol grado HPLC, se llevó a 10mL en una fiola oscura. Se utilizó el vórtex para lograr su completa disolución.

###### **e) Solución stock de DPPH 100 $\mu$ M [25 mL]**

Se tomó 5000  $\mu$ L de la solución stock de DPPH 1mM y se llevó a 25 mL con Metanol grado HPLC en una fiola oscura.

###### **f) Solución de Metanol 80% [25 mL]**

En fiola se colocó 5 mL de agua y luego se llevó a 25 mL con Metanol grado HPLC.

## II. Procedimiento

### 1. Preparación de la curva estándar de Ácido Ascórbico y Quercetina.

- Se preparó una serie de seis (06) fiolas de 5mL, y se agregó a cada uno de ellos la cantidad de reactivos que aparecen en la Tabla N°1.
- Se comenzó adicionando la solución de ácido ascórbico, y luego en  $t = 0$  min se agregó la solución de DPPH al control, en  $t = 1$  min se agregó el DPPH al patrón 1, en  $t = 2$  min para el patrón 2, y se continuó hasta completar la serie ( $t = 5$  min, patrón 5).
- En  $t = 30$  min se realizó la lectura de la absorbancia del control a 515nm. Luego, en  $t = 31$  min se realizó la lectura del patrón 1, en  $t = 32$  min para el patrón 2 y se continuó hasta terminar la serie ( $t = 5$  min, patrón 5).

**TABLA N°1: Curva Estándar de Ácido Ascórbico (DPPH)**

Muestra	[ ] Ac. As. ( $\mu\text{M}$ )	Vol. sol. stock Ac. As. ( $\mu\text{L}$ )	Vol. sol DPPH 100 $\mu\text{M}$	Vol. de metanol ( $\mu\text{L}$ )	Homogenizar y dejar en reposo durante 30 min al abrigo de la luz
Blanco	0	0	0	4000	
Control	0	0	2500	2500	
Patrón 1	10	100		2400	
Patrón 2	15	150		2350	
Patrón 3	20	200		2300	
Patrón 4	25	250		2250	
Patrón 5	30	300		2200	



**TABLA N°2: Curva Estándar de Quercetina (DPPH)**

Muestra	[ ] Quercetina (μM)	Vol. sol. stock Querc. (μL)	Vol. sol DPPH 100 μM	Vol. de metanol (μL)	Homogenizar y dejar en reposo durante 30 min al abrigo de la luz
Blanco	0	0	0	4000	
Control	0	0	2500	2500	
Patrón 1	5	50		2450	
Patrón 2	10	100		2400	
Patrón 3	15	150		2350	
Patrón 4	20	200		2300	

**2. Preparación de la curva estándar de Trolox**

- a) Se preparó una serie de seis (06) fiolas con las soluciones que se muestran en la Tabla N°3. Se tuvo las mismas consideraciones de tiempo como en el caso anterior.
- b) La lectura se realizó a una absorbancia de 515 nm.

**TABLA N°3: Curva Estándar de Trolox (DPPH)**

Muestra	[ ] Trolox (μM)	Vol. stock Trolox 1mM (μL)	Vol. sol. DPPH 100 μM	Vol. sol. metanol (μL)	Homogenizar y dejar en reposo durante 30 min al abrigo de la luz
Blanco	0	0	0	4000	
Control	0	0	2500	2500	
Patrón 1	10	50		2450	
Patrón 2	20	100		2400	
Patrón 3	25	125		2375	
Patrón 4	30	150		2350	
Patrón 5	35	175		2325	

### 3. Análisis de las muestras

#### 3.1 Extractos

- Se pesó 5 mg del extracto metanólico a analizar y se disolvió en 5 mL de Metanol grado HPLC, esta fue la solución stock del extracto (1 mg/mL).
- Se preparó una serie de seis (06) tubos de hemólisis y se preparó las soluciones como se indica en la Tabla N°4. Se vigiló los tiempos de preparación como en los casos anteriores. La absorbancia se leyó a 515 nm.

**TABLA N°4: Análisis de Extractos (DPPH) – *Piper tenuistylum* C. DC.**

Tubos	[ ] extracto metanólicos (µg/mL)	Vol. Extracto (µL)	Vol. sol. DPPH 100 µM	Vol. MeOH (µL)	
Control	0	0	1000	2000	Homogenizar y dejar en reposo durante 30 min al abrigo de la luz, antes de realizar la lectura volver a homogenizar
1	25	75		1925	
2	50	150		1850	
3	100	300		1700	
4	135	405		1595	
5	175	525		1475	
Blanco	0	525	0	2475	

**TABLA N°5: Análisis de Extractos (DPPH) – *Piper lagenaebaccum* Trel.**

Tubos	[ ] extracto metanólicos (µg/mL)	Vol. Extracto (µL)	Vol. sol. DPPH 100 µM	Vol. MeOH (µL)	
Control	0	0	1000	2000	Homogenizar y dejar en reposo durante 30 min al abrigo de la luz, antes de realizar la lectura volver a homogenizar
1	10	30		1970	
2	25	75		1925	
3	50	150		1850	
4	100	300		1700	
5	200	600		1400	
Blanco	0	600	0	2400	

*Nota: En caso se obtenga una inhibición superior al 90% en varios de los puntos de la recta, o una inhibición inferior al 50%, realizar diluciones de la solución (1 mg/mL) o utilizar una solución más concentrada, según sea necesario.*

#### **4. Cálculos**

La inhibición del radical DPPH por los extractos, es determinada por la siguiente expresión:

$$\% \text{ Inhibición DPPH} = 100 - \{[(A_{\text{muestra}(t)} - A_{\text{blanco}}) \times 100] / A_{\text{control}}\} \times 100$$

Donde:  $A_{\text{muestra}(t)}$  = absorbancia de la muestra (en 30 min).

$A_{\text{control}}$  = absorbancia del control (DPPH 100  $\mu\text{M}$  + metanol)

$A_{\text{blanco}}$  = absorbancia del blanco (extracto + metanol)

Se construyó la gráfica de porcentaje de Inhibición versus la concentración del extracto y se determinó el valor de la concentración eficaz media  $EC_{50}$  para cada una de las muestras.

**DETERMINACIÓN ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE EL MÉTODO**  
**2,2'-AZINOBIS-(3-ETILBENZOTIAZOLIN-6-ÁCIDO SULFÓNICO, SAL**  
**DIAMÓNICA (ABTS)**

***Atención:*** En todas las etapas del experimento el agua a utilizar debe ser de calidad ultrapura (miliQ)

**I. Materiales**

- Espectrofotómetro UV/Vis
- Cubetas de cuarzo o metacrilato
- Tubos de 13x100 mm y gradilla
- Micropipetas de 100 µL, 200 uL y 1000 uL
- Papel de filtro

**II. Reactivos**

**a) Buffer PBS 0.01M (pH 7.4) [500 mL]**

Pesar NaCl (4.0 g), KCl (0.1 g), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.72g) y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.12 g) y disolver en 400 mL de agua. Ajustar el pH a 7.4 con solución de HCl o NaOH, según sea necesario. Aforar a 500 mL con agua.

**b) Stock Trolox 4 mM (1mg/mL) [100 mL]**

Pesar 100 mg de Trolox y aforar a 100 mL con metanol PA o HPLC.

*Nota:* Debe protegerse de la luz y será estable durante 6 meses a -20° C.

**c) ABTS 7 mM con persulfato de potasio 2.45 mM [5 mL]**

Pesar por separado 19.2 mg de ABTS [2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico, sal diamónica)] y 3.31 mg de persulfato de potasio, aforar a 5 mL con agua e incubar a temperatura ambiente en la oscuridad por 16 horas.

*Nota:* El radical ABTS es estable durante 3 días.

**d) Metanol al 80 % v/v [250 mL]**

Medir 50 mL de agua y colocarlos dentro de una fiola de 250 mL. Enrasar a con metanol PA o HPLC.

### III. Procedimiento

#### 1. Tratamiento de la muestra

- a) Se pesó 250 mg de pulpa del fruto en un micro tubo para centrifuga, luego se agregó 1 mL de metanol al 80% y se agitó en el vórtex durante 1 min.
- b) Se centrifugó la mezcla 10 000 rpm durante 15 min. Se recuperó el sobrenadante y se transfirió a otro micro tubo.
- c) Se agregó al residuo 500  $\mu$ L de metanol al 100%, se agitó en el vórtex durante 1 min y se centrifugó a 10 000 rpm durante 15 min a 5°C.
- d) Se recuperó el sobrenadante y fue transferido al micro tubo que contiene el sobrenadante obtenido de la primera centrifugación (paso b).
- e) Se ajustó el volumen a 2 mL con agua. Se protegió de la luz el micro tubo con el extracto y mantenerlo a -20° C, hasta su uso.

#### 2. Preparación de la curva estándar o patrón

- a) Se preparó una dilución del radical coloreado ABTS en el buffer PBS, para ello se agregó 2 mL de la solución ABTS 7mM a 200 mL de buffer PBS 0.01 M. La solución se tornara verde-azul.
- b) Medimos la absorbancia de ABTS diluido en buffer PBS a 734 nm. Esta debe ser de 0.7000 +/- 0.02.
- c) Se preparó las soluciones del antioxidante Trolox a distintas concentraciones a tal como se indica en la tabla a continuación. Para ello, se utilizó la solución stock de Trolox 4mM (1 mg/mL)

**TABLA N°6: Curva Estándar de Ácido Ascórbico (ABTS)**

N° de tubo	[ ] Trolox ( $\mu$ M)	Vol. stock Ác. Asc. ( $\mu$ L)	Vol. metanol 80% ( $\mu$ L)
Blanco	0	0	0
1	180	22.5	477.5
2	240	30.0	470.0
3	300	37.5	462.5
4	400	50.0	450.0
5	500	62.5	437.5
6	600	75.0	425.0

**TABLA N°7: Curva Estándar de Quercetina (ABTS)**

N° de tubo	[ ] Trolox (µM)	Vol. stock Quercetina (µL)	Vol. metanol 80% (µL)
Blanco	0	0	0
1	60	7.5	492.5
2	120	15.0	485.0
3	180	22.5	477.5
4	240	30.0	470.0
5	300	37.5	462.5
6	400	50.0	450.0

**TABLA N°8: Curva Estándar de Trolox (ABTS)**

N° de tubo	[ ] Trolox (µM)	Vol. stock Trolox (µL)	Vol. metanol 80% (µL)
Blanco	0	0	0
1	60	7.5	492.5
2	120	15.0	485.0
3	180	22.5	477.5
4	240	30.0	470.0
5	300	37.5	462.5
6	400	50.0	450.0

- d) Inmediatamente se tomó 100 µl de cada tubo y se adicionó a 1900 µL de solución de ABTS, previamente colocados en cubetas de cuarzo o metacrilato. En el caso del blanco se tomó 100 µL solución de metanol 80% y 1900 µL de buffer PBS. Se preparó 3 series de cubetas para cada concentración.
- e) Se homogenizó las soluciones, e inmediatamente se realizó la lectura en el espectrofotómetro a 734 nm. La lectura de la absorbancia se realizó en intervalos de 1 min hasta obtener un valor constante (~ 6-10 min).
- f) El (los) extracto(s) a analizar se sometieron al mismo proceso que la curva.

**TABLA N°9: Análisis de Extractos (ABTS) – *Piper tenuistylum* C.DC. y *Piper lagenaebaccum* Trel.**

N° de tubo	[ ] Extracto (µM)	Vol. stock Extracto (µL)	Vol. metanol 80% (µL)
Blanco	0	0	0
1	60	7.5	492.5
2	120	15.0	485.0
3	180	22.5	477.5
4	240	30.0	470.0
5	300	37.5	462.5
6	400	50.0	450.0

*Nota:* En caso de que el contenido de antioxidantes dentro de la muestra sea mucho mayor al cuantificable por el método, realizar diluciones para lograr la lectura, y tomarlas en cuenta en el cálculo.

#### IV. CÁLCULOS

##### 1. Para la curva patrón

- a) Calcular el porcentaje de inhibición del ABTS<sup>+</sup> para cada solución estándar de Trolox según (1). Construir la gráfica % Inhibición vs [ ] Trolox (µM). Hacer un ajuste lineal.

$$\% \text{ Inhibición} = (1 - A_i/A_0) \times 100$$

Donde:  $A_i$  = Absorbancia final de la solución de  $i$  ( $i = 1,2,3,4,5$ ).

$A_0$  = Absorbancia del blanco.

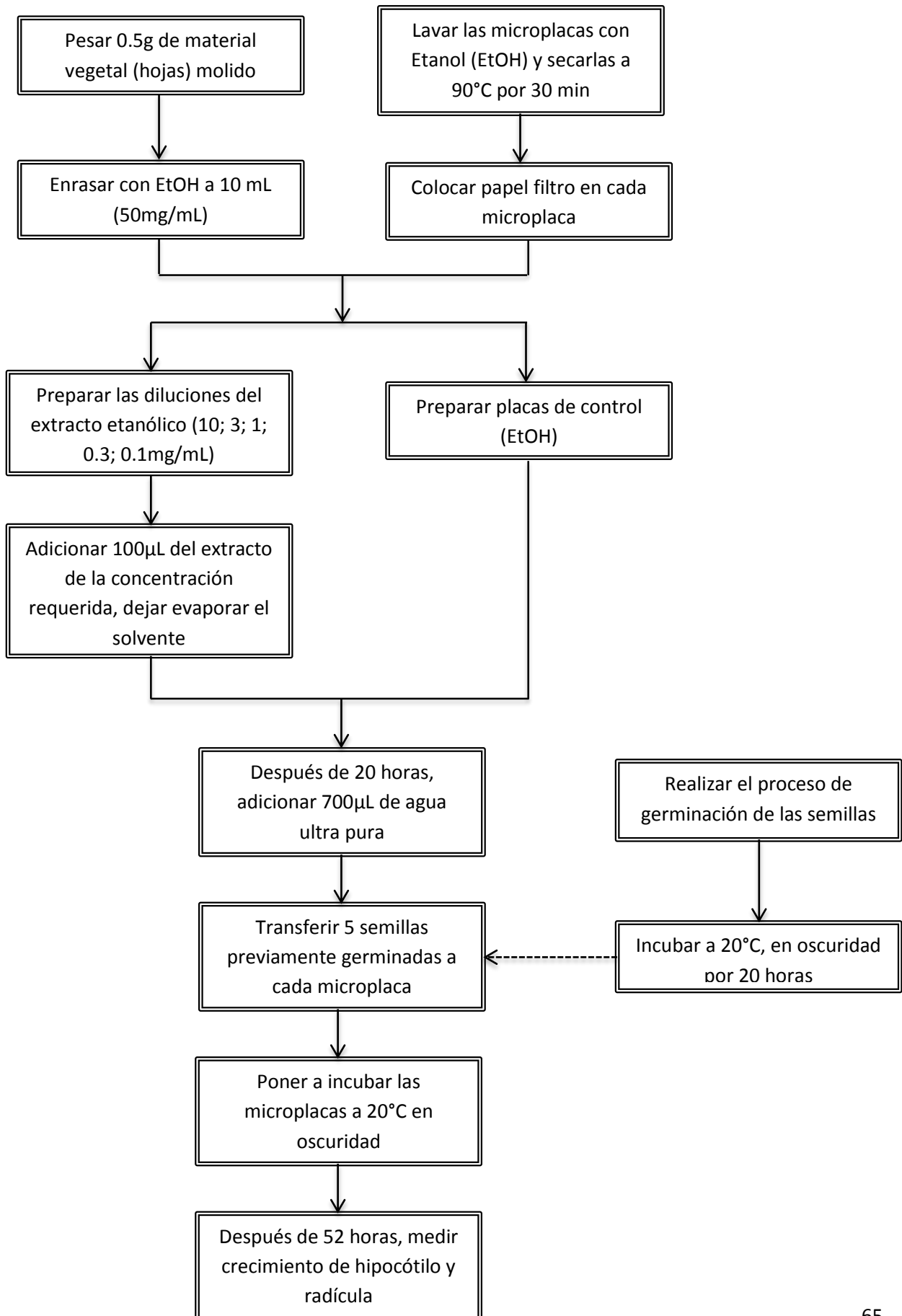
### 3.2.3. ACTIVIDAD ALELOPÁTICA

#### **PRUEBA DE ACTIVIDAD INHIBITORIA EN EL CRECIMIENTO DE SEMILLAS DE *Lactuca sativa* L. (LECHUGA)**

1. Se pesó 0.5g de muestra vegetal seca y pulverizada.
2. Se traspasó a una fiola de 10mL y luego se enrasó con el solvente (Etanol)
3. Con esta operación se obtuvo un extracto a una concentración de 50mg/mL.
4. En seguida, se preparó las diluciones correspondientes a las siguientes concentraciones:
  - a. [50mg/mL] = Concentración inicial.
  - b. [10mg/mL] = 200 uL de extracto + 800 uL de Etanol.
  - c. [3mg/mL] = 60 uL de extracto + 940 uL de Etanol.
  - d. [1mg/mL] = 20 uL de extracto + 980 uL de Etanol.
  - e. [0.3mg/mL] = 6 uL de extracto + 994 uL de Etanol.
  - f. [0.1mg/mL] = 200 uL de extracto + 998 uL de Etanol.
5. Se usó mini-placas Petri, previamente rotuladas, en las cuales se aplicó 100 uL de extracto por muestra, además se realizaron 3 repeticiones por cada dilución. Las mini-placas Petri se dejó destapando para evaporar el solvente. Con esta operación se obtiene el extracto puro. Adicionalmente, se preparó un grupo control, en el que se adicionó 100 uL de solvente (Etanol)
6. Además se dejó germinando las semillas de lechuga; en una placa Petri grande se colocó papel de filtro y 10 mL de agua destilada, se esparció las semillas de lechuga de manera uniforme (una cantidad mayor a la cantidad a utilizar). Se tapó la placa petri y se colocó en la incubadora a 20°C, en oscuridad, por aproximadamente 20 horas.
7. Luego de transcurridas las 20 horas, se adicionó 700 uL de agua destilada a cada placa y colocar 5 semillas germinadas, se escogieron las que tengan el mismo tamaño.
8. Después de 72 horas de iniciada la prueba, se determinó el Porcentaje Inhibitorio para cada extracto y concentración, el cual se calculó a partir de las mediciones de las longitudes de la radícula e hipocótilo de cada plántula, utilizando papel milimetrado como escala de medición; luego se procedió a calcular el promedio por cada placa petri.



## GRÁFICO N°2: DIAGRAMA DE FLUJO – ACTIVIDAD ALELOPÁTICA



### **3.3. POBLACIÓN Y MUESTRA**

#### **3.3.1. POBLACIÓN VEGETAL**

Especie vegetal de *Piper tenuistylum* C.DC. y *Piper lagenaebaccum* Trel.

#### **3.3.2. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA**

El material vegetal utilizado se colectó en el mes de setiembre del año 2013, en el Jardín Botánico de Plantas Medicinales del Centro de Investigaciones Allpahuayo (CIA-IIAP) ubicado en la Reserva Nacional de Allpahuayo–Mishana, Km 26.5 de la carretera Iquitos–Nauta. Luego fueron trasladadas a las instalaciones del Laboratorio de Sustancias Naturales Bioactivas (LSNB), Estación IIAP–Quistococha para su tratamiento respectivo.

Las hojas se separaron de las ramas, para su tratamiento posterior. Para el secado de las muestras, en primer lugar se dejó a temperatura ambiente por una semana, luego se colocó en estufa a 35°C por 2 semanas más, hasta que el material vegetal estuvo listo para su molienda.

La molienda de las muestras se realizó en molino manual, marca CORONA, y luego fueron almacenados en bolsas Ziploc debidamente selladas y puestos a refrigeración, para las diferentes actividades programadas.

#### **3.3.3. MUESTRA VEGETAL**

Hojas de *Piper tenuistylum* C.DC. y *Piper lagenaebaccum* Trel. en buenas condiciones que alcanzaron la madurez vegetativa.

#### **3.3.4. CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

- Hojas pertenecientes a las especies *Piper tenuistylum* C.DC. y *Piper lagenaebaccum* Trel., seleccionadas para el estudio.
- Hojas en buen estado.
- Hojas en periodo vegetativo.

#### **3.3.5. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

- Hojas deterioradas por: hongos, mohos, insectos, etc.
- Hojas tiernas, que se encuentran en su fase inicial de crecimiento.

### 3.4.INSTRUMENTOS

#### 3.4.1. Materiales y Reactivos, Instrumentos y Equipos.

##### 3.4.1.1. Material Biológico

- Semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.)
- Muestra de hojas de de *Piper tenuistylum* C.DC. y *Piper lagenaeabaccum* Trel.

##### 3.4.1.2. Materiales de Laboratorio

- Aro de soporte sin nuez.
- Balón fondo redondo 100mL y 500mL.
- Cubetas de plástico para UV
- Desecadores de vidrio
- Embudo de decantación de 100mL y 1000mL.
- Embudo de vidrio 45mm, vástago corto.
- Espátulas de acero quirúrgico.
- Fiolas transparentes y ambar de 5mL, 10mL, 25mL, 50mL, 100 mL y 250mL.
- Filtros de membrana Nylon 0.45  $\mu\text{m}$ . x 47 mm.
- Frascos de vidrio transparente y ambar con tapa de 10mL y 100 mL.
- Gradilla para tubos de ensayo.
- Guantes de exploración talla S y M.
- Lunas de reloj.
- Magnesio en cinta.
- Matraz de 50mL, 125mL, 150mL, 250mL y 500mL.
- Micropipetas de 0.5-10uL.
- Micropipetas de 10-100uL.
- Micropipetas de 20-200uL.
- Micropipetas de 100-1000uL.
- Micropipetas de 500-5000uL.
- Microplacas de cultivo Biossay.
- Microtubos de 1.5mL y 2mL.
- Nuez doble 90.

- Nuez doble 16mm.
- Papel filtro rápido.
- Papel filtro ADVANTEC grado 1 / 27 mm.
- Papel parafilm.
- Piceta 500mL
- Pinzas con punta de cerámica.
- Pinza de soporte.
- Pipetas pasteur.
- Pipetas de vidrio de 1mL, 5mL y 10 mL.
- Placa de porcelana.
- Placa petri de 250 mm.
- Probetas de 5mL, 10mL, 25mL, 50mL y 100mL.
- Refrigerante serpentín.
- Soporte universal.
- Termómetro.
- Tetina de goma para pipeta pasteur.
- Tips para Micropipetas.
- Tira reactiva para pH.
- Tubos de ensayo de 13x100 y 18x100.
- Tubos de ensayo para hemólisis.
- Varilla agitadora de vidrio.
- Vaso de Precipitado de 25mL, 50mL, 125mL, 150mL, 250mL y 500mL.

#### **3.4.1..3. Reactivos**

- 2,2' - azinobis - (3 - etilbenzotiazolin - 6 - ácido sulfónico), sal diamónica (ABTS)
- 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)
- Ácido ascórbico.
- Ácido clorhídrico.
- Ácido Nítrico.
- Ácido sulfúrico.
- Agua destilada.

- Agua millipore.
- Alcohol amílico.
- Amoniacó
- Anhídrido acético.
- Cloroformo.
- Cloruro de Potasio.
- Cloruro de Sodio.
- Cloruro férrico.
- Etanol.
- Éter de petróleo.
- Hidróxido de Sodio.
- Metanol
- Ninhidrina.
- Persulfato de potasio.
- Quercetina.
- Sulfato de sodio anhidro.
- Trolox.

#### **3.4.1..4. Equipos**

- Campana extractora LABCONCO.
- Destilador para agua destilada MONODEST 3000E BRAND.
- Destilador Synergy UV MILLIPORE.
- Espectrofotómetro UV-Vis Cary 60 Agilent Technologies.
- Estufa VENTICELL.
- Hot plate THERMOCAT.
- Incubadora BIONET S.A.
- Rotavapor BUCHI.
- Sonicador HEIDOLF.
- Vórtex HEIDOLF.

#### **3.4.1..5. Materiales varios**

- Bolsa Ziploc.
- Borrador de goma.
- Cámara fotográfica.
- Cinta adhesiva.
- Cuaderno A4 x 100 hojas
- Colapís.
- Corrector líquido.
- Jeringa 1mL.
- Lápiz 2B.
- Lapiceros color azul y negro.
- Marcador Indeleble punta fina
- Papel absorbente.
- Papel aluminio.
- Papel bond A4 x 80g.
- Papel milimetrado
- Mica.
- Regla de 30 cm.
- Stickers plastificado
- Tijera de acero quirúrgico.

### **3.5. PROCEDIMIENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS**

#### **3.5.1. RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL**

El material vegetal utilizado se colectó en la Reserva Nacional de Allpahuayo – Mishana ubicado en el Km 26.5 de la carretera Iquitos – Nauta. Luego fueron trasladadas a las Estación IIAP – QUISTOCOCHA para los estudios respectivos.

- **Reserva Nacional de Allpahuayo - Mishana**

Ubicada en la provincia de Maynas, a 20 Km de la ciudad de Iquitos, se encuentra la Zona Reservada Allpahuayo-Mishana, que fuera establecida un 2 de marzo de 1999 (Decreto Supremo N° 006-99-AG), con una extensión de 57 667.43 ha.

El clima allí es tropical lluvioso, parecido al de Iquitos. Las precipitaciones pluviales llegan hasta los 3000 mm y la temperatura media es de 26°C., propia de nuestra Selva Baja.

Allpahuayo-Mishana es una de las zonas más investigadas en el país, pues contiene gran diversidad biológica y ecológica propia de la cuenca del río Nanay. Ejemplos de esto son los bosques de 'varillal' y de 'chamizal', que crecen sobre arena blanca, poco aptas para fines agropecuarios y forestales, y que albergan flora y fauna endémica, es decir, especies que se encuentran sólo en esta región. Además de estos bosques, dentro de Allpahuayo-Mishana encontramos terrenos inundables, comúnmente llamados 'tahuampas' por la población local.

### 3.5.2. TOMA DE DATOS

Los experimentos se realizaron con tres repeticiones efectuadas el mismo día.

Se prepararon los extractos de *Piper tenuistylum* C.DC. y *Piper lagenaebaccum* Trel. a diferentes concentraciones y luego, las absorbancias de la **Actividad Antioxidante**, fueron analizadas en el espectrofotómetro UV-visible; a una absorbancia de 515nm, luego de 30 minutos (Método DPPH) y a 734nm, luego de 10 minutos (Método ABTS)

Con respecto a la **Actividad Alelopática**, los datos del crecimiento de las semillas de *Lactuca sativa* L. tratadas con los extractos de *Piper tenuistylum* C.DC. y *Piper lagenaebaccum* Trel., fueron tomados a las 72 horas de iniciada la prueba; se determinó el Porcentaje Inhibitorio de cada extracto a diferentes concentraciones calculando la longitud de los hipocótilos y las radículas de cada semilla, utilizando papel milimetrado como escala de medición.

### 3.6. PLAN DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

Los resultados se organizaran en el programa Excel, cada ensayo se realizará por triplicado.

#### 3.6.1. Marcha Fitoquímica Preliminar

A los resultados cualitativos obtenidos en los ensayos se les asignó de la siguiente manera: (+++) abundante; (++) regular; (+) poco; (-) nada.

#### 3.6.2. Actividad Antioxidante

Los resultados obtenidos en los ensayos, se expresan de la siguiente manera:

- Se realizaron las lecturas de las absorbancias de los extractos de *Piper tenuistylum* C.DC. y *Piper lagenaebaccum* Trel. a diferentes concentraciones.
- Se calculó el Porcentaje de Inhibición y se analizó en el Programa Excel.
- Se calculó el Ec50 (Concentración capaz de neutralizar el 50% de radicales libres)

#### 3.6.3. Actividad Alelopática

Los resultados obtenidos en los ensayos, se expresan de la siguiente manera:

- Se realizó la medida de los hipocótilos y las radículas de *Lactuca sativa* L. expuestas a los extractos de *Piper tenuistylum* C.DC. y *Piper lagenaebaccum* Trel. y las del grupo control.
- Se calculó el Porcentaje de Inhibición y se analizó en el Programa Excel.



# CAPÍTULO IV

## 4.1. RESULTADOS

### 4.1.1. EVALUACIÓN DE LA MARCHA FITOQUÍMICA PRELIMINAR DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE LAS HOJAS DE *Piper tenuistylum* C.DC. Y *Piper lagenaebaccum* Trel.

La marcha fitoquímica, permitió identificar los metabolitos secundarios presentes en los extractos etanólicos tal como se muestra en la Tabla N°1.

En el análisis de *Piper tenuistylum* C.DC. se observó abundante (+++) presencia de triterpenos y/o esteroides, abundante (+++) presencia de alcaloides, regular (++) presencia de aminogrupos primarios o secundarios y regular (++) presencia de leucoantocianidinas y catequinas.

En el análisis de *Piper lagenaebaccum* Trel. se observó abundante (+++) presencia de grupos fenólicos libres, abundante (+++) presencia de triterpenos y/o esteroides, regular (++) presencia de leucoantocianidinas y catequinas y regular (++) presencia de aminogrupos primarios o secundarios .

**TABLA N° 10: EVALUACIÓN DE LA MARCHA FITOQUÍMICA PRELIMINAR DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE LAS HOJAS DE *Piper tenuistylum* C.DC. Y *Piper lagenaebaccum* Trel.**

Clase de Producto Natural	Pruebas de Coloración o Precipitación	<i>Piper tenuistylum</i> C.DC.			<i>Piper lagenaebaccum</i> Trel.		
		Fracción	Resultados	Observaciones	Fracción	Resultados	Observaciones
Aminogrupos primarios o secundarios	Ninhidrina	A	+	Mancha lila.	a	+	Mancha lila.
		F	++	Mancha violeta.	f	++	Mancha violeta.
Grupos fenólicos libres	Cloruro férrico	A	+	Cambio de coloración a verde amarillo. Formación de precipitado verde.	a	+++	Coloración verde oscuro.
Taninos	Gelatina	A	+	Cambio de coloración al instante. Diluye la muestra.	a	+	Presenta precipitado blanco.
Flavonoides*	Reacción de Shinoda	D	-	No presenta cambio.	d	-	Fase amflica y acuosa incolora.
		E	-	Ligeramente amarillo.	e	-	Anillo marrón, fase acuosa color amarillo.
Triterpenos y/o Esteroides	Reacción de Liebermann Burchard	B	+++	Solución verde azul.	b	+++	Verde oscuro.
		C	-	No reacciona. Permanece incolora.	c	+	Formación de anillo color anaranjado-pardo.
		D	+	No reacciona. Solución amarilla.	d	++	Formación de anillo color anaranjado medio.
Quinonas, antranas o antranoles.	Reacción de Bornstager	B	-	Solución pardo - amarillo. Precipitado pardo.	b	-	Precipitado marrón oscuro, fase acuosa amarillo oscuro.
Alcaloides	Reactivo de Dragendorff	C	-	Precipitado crema.	c	+	Precipitado anaranjado.
		D	-	Turbiedad crema.	d	+	Precipitado anaranjado.
	Reactivo de Mayer	C	+++	Precipitado crema.	c	+	Solución incolora.
		D	-	Solución transparente.	d	+	Solución incolora.
Leucoantocianidinas (rojo) Catequinas (marrón)	Reacción de Rosenheim	D	-	Fase amflica incolora. Fase acuosa turbia.	d	-	Fase acuosa y amflica incolora.
		E	++	Fase amflica marrón claro. Fase acuosa pardo, precipitado blanco.	e	++	Presencia de anillo marrón en fase amflica.
Saponinas	Prueba de espuma.	F	-	Espuma 4mm.	f	-	4mm de espuma.

Leyenda: (+++) abundante; (++) regular; (+) poco; (-) nada.

#### 4.1.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS HOJAS DE *Piper tenuistylum* C.DC. Y *Piper lagenaebaccum* Trel.

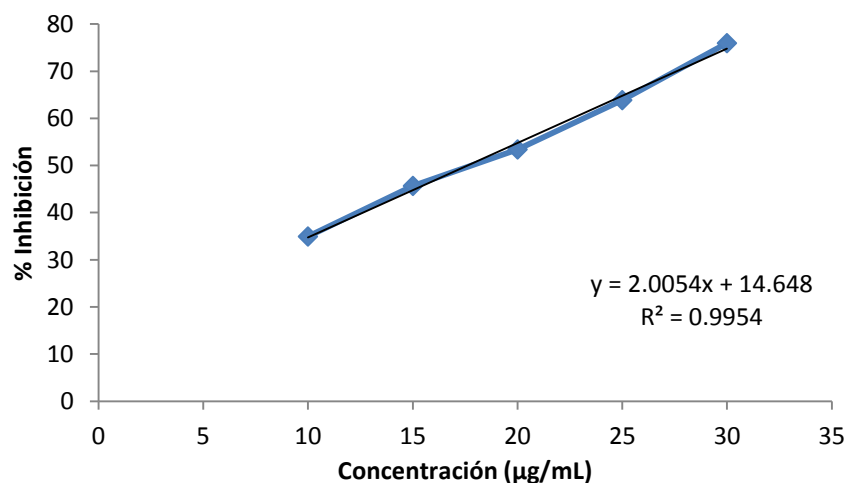
##### EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE EL MÉTODO 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZIL (DPPH)

Se realizaron y analizaron las curvas de calibración de Quercetina, Ácido Ascórbico y Trolox; como estándares de comparación de la actividad antioxidante con los extractos etanólicos de las hojas de *Piper tenuistylum* C.DC. Y *Piper lagenaebaccum* Trel.

**TABLA N°11: RESULTADOS DE LA CURVA ESTÁNDAR DE ÁCIDO ASCÓRBICO (DPPH)**

Concentración (µg/mL)	% Inhibición
10	34.91
15	45.64
20	53.42
25	63.89
30	75.92

**GRÁFICO N°3: PORCENTAJE DE INHIBICIÓN VS CONCENTRACIÓN (ÁCIDO ASCÓRBICO - DPPH)**



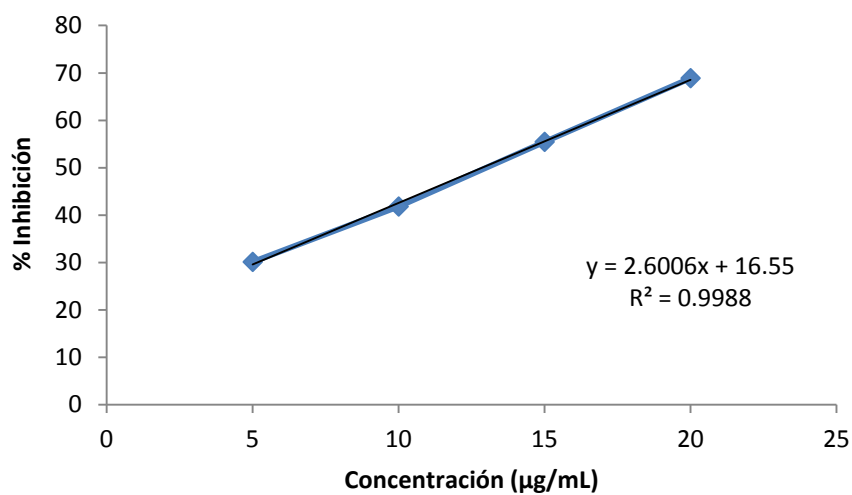
$$y = m x + b$$
$$x = (y - b)/m$$
$$x = (50 - 14.648) / 2.0054$$
$$x = 17.6284$$
$$Ec50 = 17.6284 \mu\text{g/mL}$$

- Se observa que el Ácido Ascórbico, a una concentración media de 17.6284 µg/mL es capaz de neutralizar el 50% de radicales libres.

**TABLA N°12: RESULTADOS DE LA CURVA ESTÁNDAR DE QUERCETINA (DPPH)**

Concentración (µg/mL)	% Inhibición
5	30.11
10	41.77
15	55.46
20	68.89

**GRÁFICO N°4: PORCENTAJE DE INHIBICIÓN VS CONCENTRACIÓN (QUECETINA - DPPH)**



$$y = m x + b$$
$$x = (y - b)/m$$
$$x = (50 - 16.55) / 2.6006$$
$$x = 12.8624$$

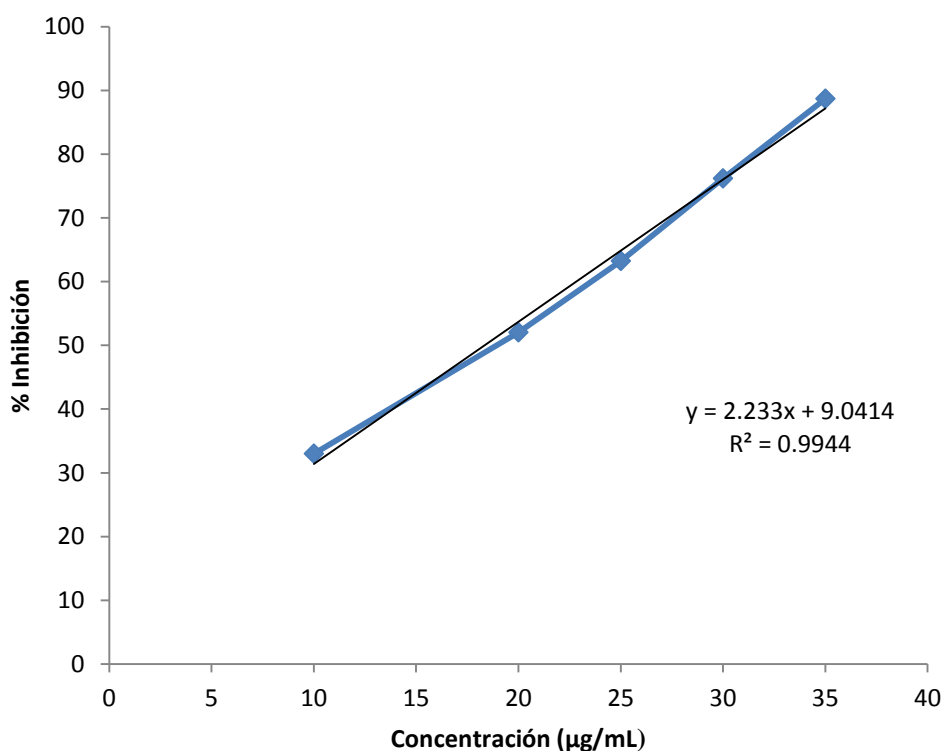
$$Ec_{50} = 12.8624 \mu\text{g/mL}$$

- Se observa que la Quercetina, a una concentración media de 12.8624 µg/mL es capaz de neutralizar el 50% de radicales libres.

**TABLA N°13: RESULTADOS DE LA CURVA ESTÁNDAR DE TROLOX (DPPH)**

Concentración (µg/mL)	% Inhibición
10	32.99
20	52.03
25	63.24
30	76.21
35	88.7

**GRÁFICO N°5: PORCENTAJE DE INHIBICIÓN VS CONCENTRACIÓN (TROLOX - DPPH)**



$$y = m x + b$$
$$x = (y - b)/m$$
$$x = (50 - 9.0414) / 2.233$$
$$x = 17.8389$$

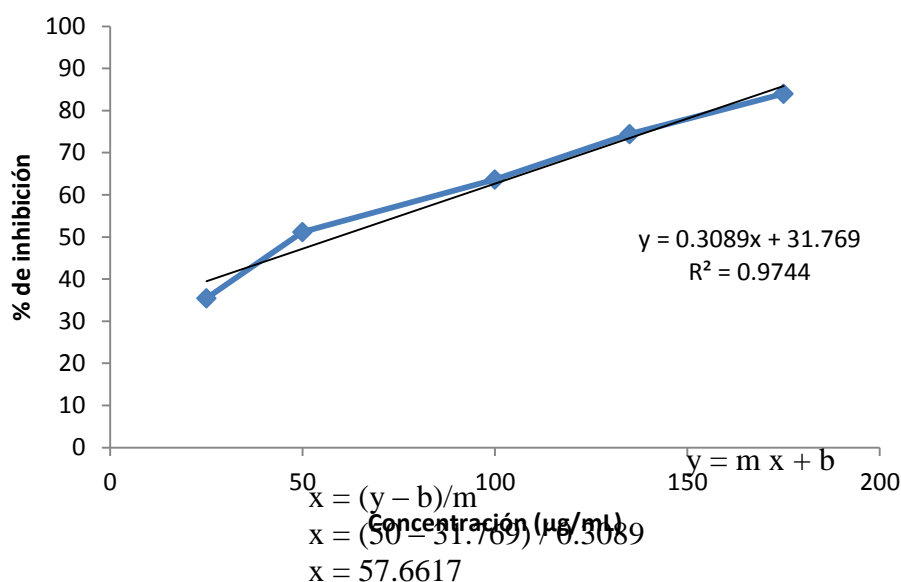
$$Ec_{50} = 17.8389 \mu\text{g/mL}$$

- Se observa que el Trolox, a una concentración media de 17.8389 µg/mL es capaz de neutralizar el 50% de radicales libres.

**TABLA N°14: ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS HOJAS DE *Piper tenuistylum* C.DC. (DPPH)**

Concentración (µg/mL)	% Inhibición
25	35.44
50	51.19
100	63.64
135	74.41
175	83.99

**GRÁFICO N°6: PORCENTAJE DE INHIBICIÓN VS CONCENTRACIÓN (*Piper tenuistylum* C.DC.) (DPPH)**



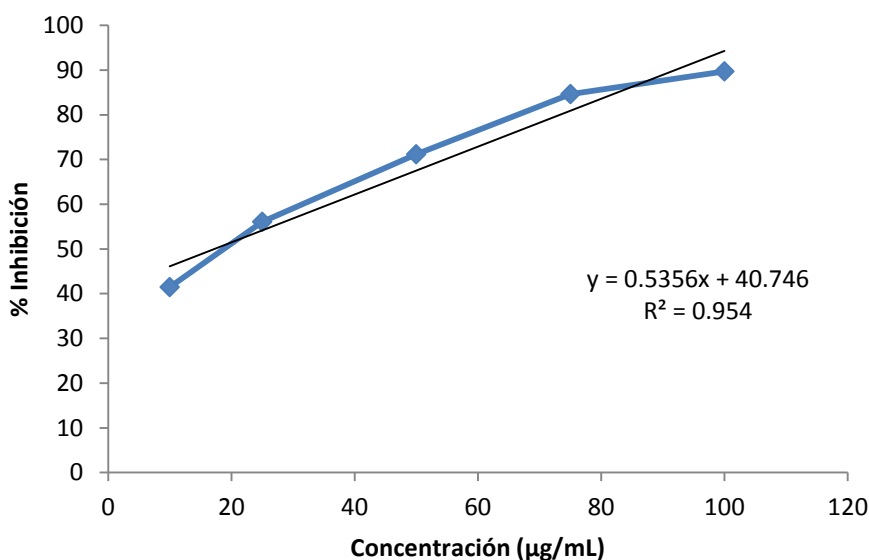
$EC_{50} = 57.6617 \mu\text{g/mL}$

- Se observa que el extracto etanólico de las hojas de *Piper tenuistylum* C.DC., a una concentración media de 57.6617 µg/mL es capaz de neutralizar el 50% de radicales libres, lo que demuestra su óptima capacidad antioxidante.
- A diferencia de los estándares (compuestos químicamente puros), los cuales presentaron valores de EC50 entre 12 y 17 µg/mL, este extracto muestra un valor de EC50 de 57.6617 µg/mL, lo que indica que debido a la combinación de metabolitos secundarios que contiene, alcanza este valor.

**TABLA N°15: ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS HOJAS DE *Piper lagenaebaccum* Trel. (DPPH)**

Concentración (µg/mL)	% Inhibición
10	41.43
25	56.09
50	71.16
75	84.61
100	89.7

**GRÁFICO N°7: PORCENTAJE DE INHIBICIÓN VS CONCENTRACIÓN (*Piper lagenaebaccum* Trel.) (DPPH)**



$$y = m x + b$$

$$x = (y - b)/m$$

$$x = (50 - 40.746) / 0.5356$$

$$x = 23.2560$$

$$Ec50 = 23.2560 \mu\text{g/mL}$$

- Se observa que el extracto etanólico de las hojas de *Piper lagenaebaccum* Trel., a una concentración media de 23.2560 µg/mL es capaz de neutralizar el 50% de radicales libres, lo que demuestra su excelente capacidad antioxidante, que comparando con los estándares, tiene un valor muy próximo.

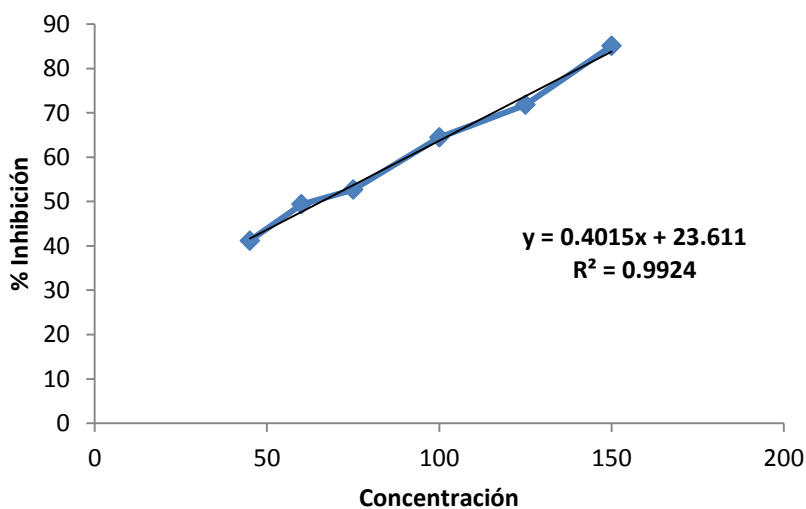


**DETERMINACIÓN ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE EL MÉTODO  
2,2'-AZINOBIS-(3-ETILBENZOTIAZOLIN-6-ÁCIDO SULFÓNICO, SAL  
DIAMÓNICA (ABTS)**

**TABLA N°16: RESULTADOS DE LA CURVA ESTÁNDAR DE ÁCIDO  
ASCÓRBICO (ABTS)**

Concentración	% Inhibición
45	41.1781
60	49.3399
75	52.6756
100	64.4287
125	71.8098
150	85.0674

**GRÁFICO N°8: PORCENTAJE DE INHIBICIÓN VS CONCENTRACIÓN (ÁCIDO  
ASCÓRBICO - ABTS)**



$$y = m x + b$$

$$x = (y - b)/m$$

$$x = (50 - 23.611) / 0.4015$$

$$x = 65.7260$$

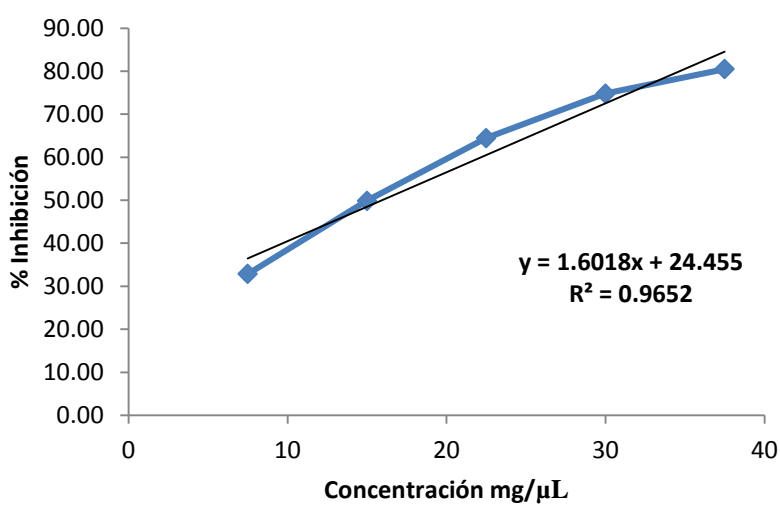
$$Ec50 = 65.7260 \mu\text{g/mL}$$

- Se observa que el Ácido Ascórbico, a una concentración media de 65.7260mg/μL es capaz de neutralizar el 50% de radicales libres.

**TABLA N°17: RESULTADOS DE LA CURVA ESTÁNDAR DE QUERCETINA (ABTS)**

Concentración	% Inhibición
7.5	32.88
15	49.88
22.5	64.45
30	74.79
37.5	80.49

**GRÁFICO N°9: PORCENTAJE DE INHIBICIÓN VS CONCENTRACIÓN (QUERCETINA - ABTS)**



$$y = m x + b$$
$$x = (y - b)/m$$
$$x = (50 - 24.4550) / 1.6018$$
$$x = 15.9477$$

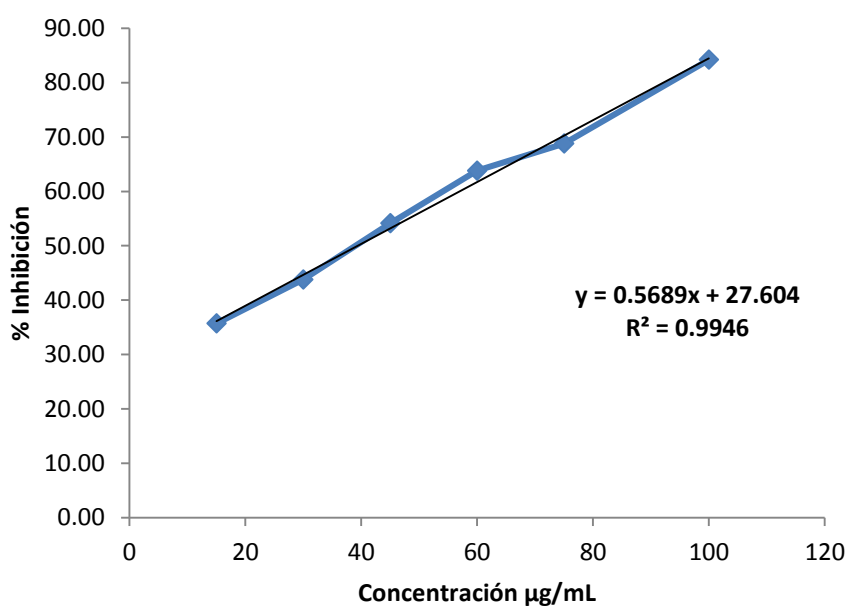
$$Ec_{50} = 15.9477 \mu\text{g/mL}$$

- Se observa que la Quercetina, a una concentración media de 15.9477mg/μL es capaz de neutralizar el 50% de radicales libres.

**TABLA N°18: RESULTADOS DE LA CURVA ESTÁNDAR DE TROLOX (ABTS)**

Concentración	% INHIBICIÓN
15	35.69
30	43.80
45	54.15
60	63.83
75	68.81
100	84.24

**GRÁFICO N°10: PORCENTAJE DE INHIBICIÓN VS CONCENTRACIÓN (TROLOX - ABTS)**



$$y = m x + b$$
$$x = (y - b)/m$$
$$x = (50 - 27.640) / 0.5689$$
$$x = 39.3672$$

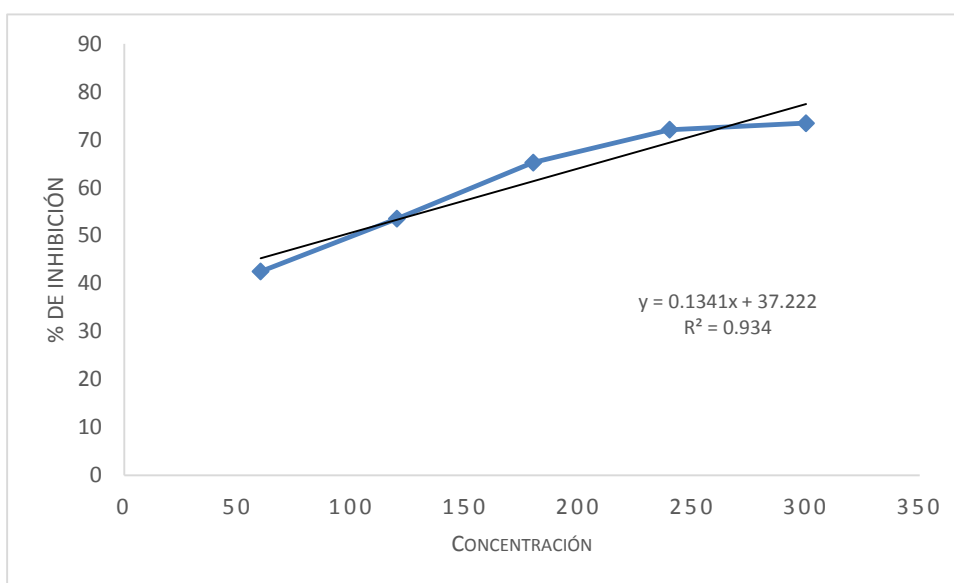
$$Ec50 = 39.3672 \mu\text{g/mL}$$

- Se observa que el Trolox, a una concentración media de 39.3672 µg/mL es capaz de neutralizar el 50% de radicales libres.

**TABLA N°19: ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS HOJAS DE *Piper tenuistylum* C.DC. (ABTS)**

Concentración (µg/mL)	% Inhibición
60	42.5071
120	53.5185
180	65.2422
240	72.0655
300	73.4615

**GRÁFICO N°11: PORCENTAJE DE INHIBICIÓN VS CONCENTRACIÓN (*Piper tenuistylum* C.DC.) (ABTS)**



$$y = m x + b$$

$$x = (y - b)/m$$

$$x = (50 - 37.222) / 0.1341$$

$$x = 95.2871$$

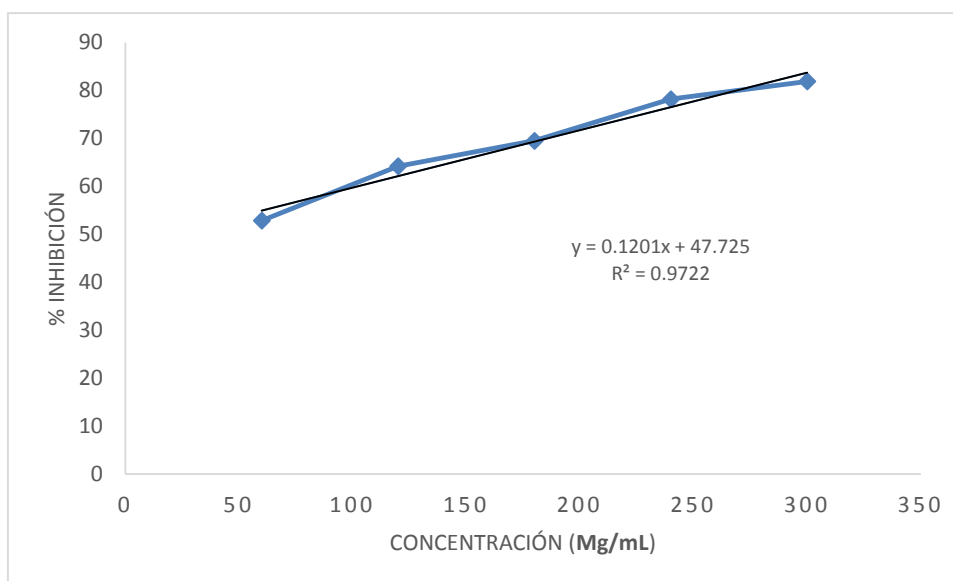
$$Ec50 = 95.2871 \mu\text{g/mL}$$

- Se observa que el extracto etanólico de las hojas de *Piper tenuistylum* C.DC., a una concentración media de 95.2871 µg/mL es capaz de neutralizar el 50% de radicales libres, lo que demuestra su óptima capacidad antioxidante.
- A diferencia de los estándares (compuestos químicamente puros), los cuales presentaron valores de EC50 entre 15 y 65 mg/µL, este extracto muestra un valor de EC50 de 95.2871 µg/mL, lo que indica que debido a la combinación de metabolitos secundarios que contiene, alcanza este valor.

**TABLA N°20: ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS HOJAS DE *Piper lagenaebaccum* Trel. (ABTS)**

Concentración (µg/mL)	% Inhibición
60	52.8634
120	64.2177
180	69.5183
240	78.2010
300	81.8957

**GRÁFICO N°12: PORCENTAJE DE INHIBICIÓN VS CONCENTRACIÓN (*Piper lagenaebaccum* Trel.) (ABTS)**



$$y = m x + b$$

$$x = (y - b)/m$$

$$x = (50 - 47.725) / 0.1201$$

$$x = 18.9425 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Ec50} = 18.9425 \mu\text{g/mL}$$

- Se observa que el extracto etanólico de las hojas de *Piper lagenaebaccum* Trel., a una concentración media de 18.9425 µg/mL es capaz de neutralizar el 50% de radicales libres, lo que demuestra su excelente capacidad antioxidante, que comparando con los estándares, tiene un valor muy próximo.

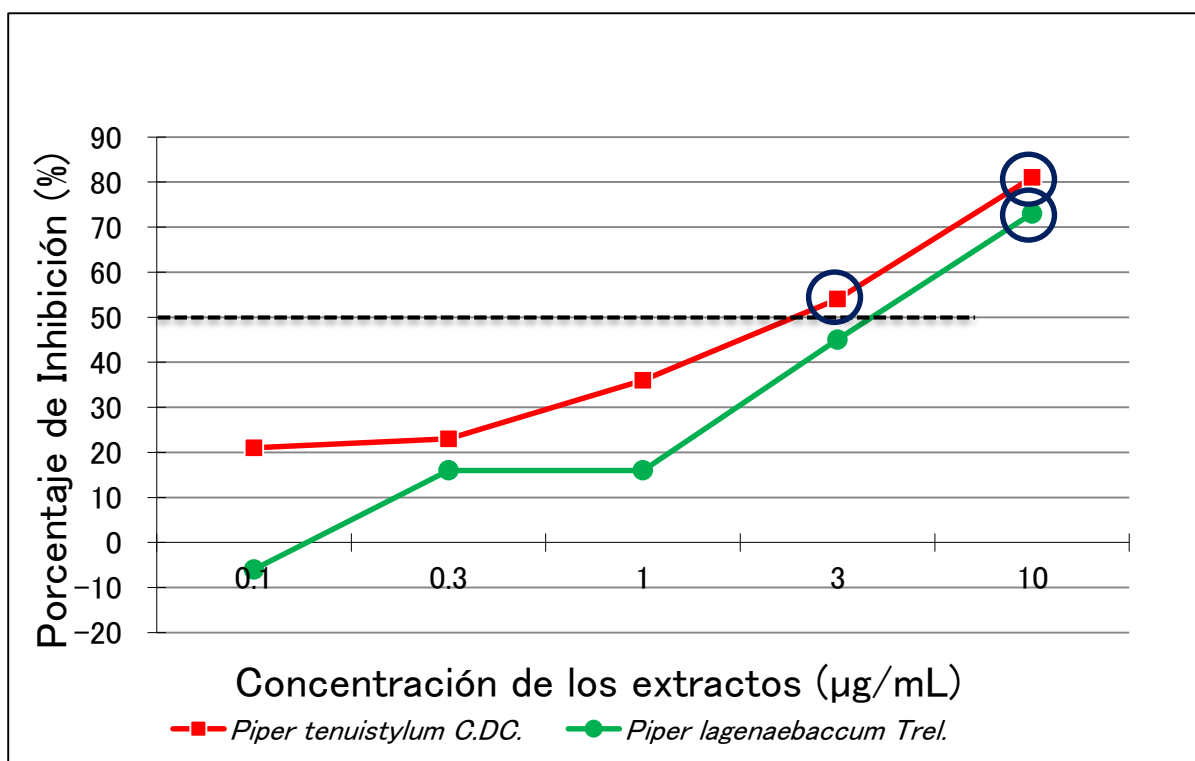
#### 4.1.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ALELOPÁTICA DE LAS HOJAS DE *Piper tenuistylum* C.DC. Y *Piper lagenaebaccum* Trel.

La actividad alelopática de las hojas de *Piper tenuistylum* C.DC. Y *Piper lagenaebaccum* Trel. se muestra en los siguientes gráficos:

**TABLA N° 21: PORCENTAJE DE INHIBICIÓN VS CONCENTRACIONES (ACTIVIDAD ALELOPÁTICA)**

Concentraciones (µg/mL)	% Inhibición	
	<i>Piper tenuistylum</i> C.DC.	<i>Piper lagenaebaccum</i> Trel.
0.1	21	-6
0.3	23	16
1	36	16
3	54	45
10	81	73

**GRÁFICO N°13: ACTIVIDAD ALELOPÁTICA DE LAS HOJAS DE *Piper tenuistylum* C.DC. Y *Piper lagenaebaccum* Trel.**



- Se observa que el extracto etanólico de *Piper tenuistylum* C.DC. a una concentración de 3 µg/mL logra inhibir el crecimiento de *L. sativa* L. en un 54%, y a una concentración de 10 µg/mL logra inhibir en un 81%.
- Se observa que el extracto etanólico de *Piper lagenaebaccum* Trel. alcanza el porcentaje inhibitorio de 74% a una concentración de 10 µg/mL.

## DISCUSIONES

- Del extracto etanólico de *P. tenuistylum* Trel. y *P. lagenaeabaccum* C.DC. evaluados en el presente estudio, se enfatiza la alta presencia de grupos fenólicos libres, alcaloides, triterpenos y/o esteroides; lo que estaría demostrando lo mencionado por Campos (2004) el cual menciona que dichos compuestos poseen propiedades antioxidantes.
- Al realizar curvas de calibración con Quercetina, Ac. Ascórbico y Trolox (estándares ideales para la determinación antioxidante) se pretende demostrar que las especies *P. tenuistylum* Trel. y *P. lagenaeabaccum* C.DC. tienen un alcance similar a estas con respecto a dicha actividad, lo cual es propuesto por Masuoka (1997)<sup>16</sup> mencionando que estos son ideales en ensayos por el método de DPPH.
- Al utilizar el extracto etanólico de las hojas de *P. tenuistylum* Trel. y *P. lagenaeabaccum* C.DC. se obtuvieron óptimos y excelentes resultados; además se plantea (Rojano 2011) el uso de extracto de hexano, diclorometano y metanol apropiados para desarrollar la actividad antioxidante, del género en mención, por el método de DPPH y ABTS.
- La selección de la familia y género de estudio, responde a una serie de criterios de inclusión que además de las ya mencionadas corresponde a lo dicho por otros autores (Morton 1981 y Yoshikawa 1994) que le atribuyen a estas, diversas propiedades medicinales y agrícolas.
- Al comparar los resultados obtenidos de las hojas de *P. tenuistylum* Trel. y *P. lagenaeabaccum* C.DC. observamos que ambas especies poseen grupos fenólicos libres, triterpenos y taninos, los cuales serían los responsables de la actividad alelopática; así mismo Alfonso (2005) menciona que estos metabolitos secundarios poseen efecto inhibitorio con actividad alelopática.
- Al utilizar la metodología de Rondina y Cussio (1969), en la cual proponen que la especie a trabajar sea tratada a diferentes concentraciones y posteriormente cuantificar la germinación de la radícula e hipocótilo se corrobora lo descrito años después por Lovett y Ryuntyu (1992) quienes también plantean un procedimiento similar.



## CONCLUSIONES

Del estudio realizado se concluye lo siguiente:

- Por el Método de DPPH, se observó que las hojas *Piper lagenaebaccum* Trel. presento una mayor actividad antioxidante a diferencia de las hojas *Piper tenuistylum* C.DC. con respecto al porcentaje de inhibición EC50; esto probablemente debido a la alta concentración de grupos fenólicos libres reportados.
- Por el Método de ABTS, se observó que las hojas *Piper lagenaebaccum* Trel. presento una mayor actividad antioxidante a diferencia de las hojas *Piper tenuistylum* C.DC. con respecto al porcentaje de inhibición EC50; esto probablemente debido a la alta concentración de grupos fenólicos libres reportados.
- Con respecto a la Actividad Alelopática se observó que las hojas *Piper tenuistylum* C.DC. exhibieron un mayor porcentaje de inhibición que las hojas de *Piper lagenaebaccum* Trel; esto podría deberse a que presentan un alto contenido de alcaloides, triterpenos y/o esteroides.
- Se observó que las hojas de *Piper lagenaebaccum* Trel. presentan un elevado contenido de grupos fenólicos libres, triterpenos y/o esteroides.
- Se observó la presencia de aminogrupos primarios o secundarios, taninos, leucoantocianidinas y catequinas.

## RECOMENDACIONES

- En otras investigaciones se debe emplear cromatografía en capa fina, con el fin de obtener fracciones del extracto etanólico, que puedan dar alternativas y facilidades para un posible aislamiento de los metabolitos secundarios.
- Se debe realizar un perfil cromatográfico por HPLC con el objetivo de conocer la composición química de los metabolitos secundarios presentes en las especies a investigar.
- Crear una base de datos con la información generada en esta y otras investigaciones, relacionadas con estas especies, con el propósito de organizar y detallar los estudios realizados.

## BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS

1. BRAKO L., ZARUCCHI J. (1993). Catálogo de las Angiospermas y Gimnospermas del Perú. Editorial Missouri Botanical Garden. Volumen 45. USA. 1286p.
2. VÁSQUEZ R. (1997). Flórmula de las Reservas Biológicas de Iquitos – Perú. Editorial Missouri Botanical Garden. Volumen 63. USA. 1046p.
3. VÁSQUEZ R. (1989) Plantas útiles de la Amazonía Peruana I. Editorial Missouri Botanical Garden. PERÚ. 195p.
4. ULLOA C., ZARUCCHI J., LEÓN B. (2004) Diez años de adiciones a la flora del Perú: 1993-2003. Editorial Arnaldoa. PERÚ. 242P.
5. MOSTACERO J., CASTILLO F., MEJÍA F., GAMARRA O., CHARCAPE J., RAMIREZ R. (2011) Plantas Medicinales del Perú: Taxonomía, Ecogeografía, Fenología y Etnobotánica. Editado por la Asamblea Nacional de Rectores. PERÚ. 909p.
6. SHARMA, OP. (2009) Food Chemistry, 113, 1202–1205.
7. MENSOR, L.L. et al. (2001) Phytother. Res., 127–130.
8. CAN BASER K. HÜSNÜ, BUCHBAUER G. (2010) Handbook of Essential Oils Science, Technology, and Applications. EE.UU. 994pp.
9. ADAMS R. (2007) Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/ Mass Spectrometry, 4th edición, EE.UU. 407pp.
10. AVELLO M, SUWALSKY M, (2006) Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. Revista Atenea (Concepc.) N°494. Concepción – Chile.  
<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-04622006000200010>

11. PUERTAS-MEJÍA M., GÓMEZ-CHABALA L., ROJANO B., SÁEZ-VEGA J. (2009) Capacidad antioxidante *in vitro* de fracciones de hojas de *Piper peltatum* L., Rev Cubana Plant Med V.14 N.2 Ciudad de la Habana-Cuba.
12. STASHENKO E., MARTÍNEZ J., LEYVA M., GARCÍA A. (2007) Determinación de la Composición Química y Actividad Antioxidante *in vitro* del Aceite Esencial de *Piper auritum* Kunth (Piperaceae) difundida en la costa colombiana. Revista Scientia et Technica Año XIII, No 33. UTP. ISSN 0122-1701.
13. MAIA DE MORAIS S., ALVES FACUNDO V., MEDEIROS BERTINI L., SOLON B., CAVALCANTI E., DOS ANJOS J., FERREIRA S., SOUSA DE BRITO E., ALVES DE SOUZA N. (2007) Chemical Composition and Larvicidal Activity of Essential Oils from *Piper* species. Biochemical Systematics and Ecology 35 (2007) 670-675. [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
14. KATO M., FURLAN M., (2007) Chemistry and evolution of the *Piperaceae*, Pure Appl. Chem., Vol. 79, No. 4, pp. 529–538, 2007.
15. VAGHASIYA Y., NAIR R., CHANDA S. (2007), Investigation of Some *Piper* Species for Anti-Bacterial and Anti-Inflammatory Property. International Journal of Pharmacology 3(5): 400-405, 2007. ISSN 1811-7775. Asian Network for Scientific Information.
16. ETO M., MASUOKA CH., YAMASASKI T., HARANO K., ONO M., (2008) Molecular Orbital Analysis of Antioxidative Activity of Phenolics from *Tessaria integrifolia* and *Piper elongatum*. Food Sci. Technol. Res., 14 (4), 415–420, 2008.
17. GUERRINI A., SACCHETTI G., ROSSI D., PAGANETTO G., MUZZOLI M., ANDREOTTI E., TOGNOLINI M., MALDONADO M., BRUNI R. (2009) Environmental Toxicology and Pharmacology 27 39–48. [www.elsevier.com/locate/etap](http://www.elsevier.com/locate/etap)
18. LEI D., CHIU-PO CHAN, YING-JAN WANG, TONG-MEI WANG, BOR-RU LIN, CHUN-HSUN HUANG, JANG-JAER LEE, HSIN-MING CHEN, JIANG-

- HUEI JENG, MEI-CHI CHANG (2003) Antioxidative and Antiplatelet Effects of Aqueous Inflorescence *Piper betle* Extract; J. Agric. Food Chem. 2003, 51, 2083–2088.
19. YAMAGUCHI L., LAGO J., TANIZAKI T., DI MASCIO P., KATO M. (2006) Antioxidant Activity of Prenylated Hydroquinone and Benzoic Acid Derivatives from *Piper crassinervium* Kunth; Phytochemistry Vol. 67 pp. 1838–1843
20. OYEDEJI O., ADENIYI B., AJAYI O., KÖNIG W. (2005) Essential Oil Composition of *Piper guineense* and its Antimicrobial Activity. Another Chemotype from Nigeria; Phytother. Res. 19, 362–364. Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/ptr.1679.
21. CARPER J. (1993) Los alimentos: medicina milagrosa. Grupo Editorial Panamericana. ISBN 84-9835347-1.
22. GIL FERNÁNDEZ A. (2010) Tratado de Nutrición. Composición y calidad nutritiva de los alimentos. Editorial Panamericana. ISBN 84-9835-437-1.
23. FUJII Y., YASUDA T. (1990) Methods for screening allelopathic activities by using the logistic function (Richards' function) fitted to lettuce seed germination and growth curves Weedd Res. 35:353-361.
24. SARMIENTO A. (2003) ALELOPATIA: Concepto, características, metodología de estudio e importancia. Instituto de Estudios Vegetales, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán. San Miguel de Tucumán, Argentina.  
<http://www.ual.es/personal/edana/bot/mh/complemento/docufijosrevalelo.html>
25. LOCK O. (1988). Investigaciones Fitoquímicas, Método en el Estudio de Productos Naturales, Lima. Fondo Editorial. Pontificia Universidad Católica del Perú, 213p.
26. MACIAS F., GALINDO J., TORRES A., SIMONET A. (1999). Terpenoids with potencial use as natural herbicide templates. Biologically Active Natural Products: Agrochemical, 1:15-31.

27. D' ABROSCA B., DELLA GRECA M., FIORENTINO A., MONACO P., ZARRELLI A. (2001). Potencial allelochemicals from *Sambucus nigra*. *Phytochemistry*; 2001. 58: 1073-1081.
28. RIZVI H., HAQUE H. (1992). A discipline called allelopathy. En Rizvi, V. (eds.) *Allelopathy: Basic and applied aspects*. CHAPMAN & HALL, Londres. P.1-10.
29. PUENTE M. *et al* (2003). Efecto alelopático de extractos acuosos de girasol (*Helianthus annuus* L.), sobre la germinación y desarrollo de malezas bajo diferentes condiciones climáticas. *Rev. Centro Agrícola*, año 30, N°1, enero-marzo.
30. RICE E. (1984). *Allelopathy*; 2nd ed; Academic: New York, pp 266-291.
31. CICCIO N. *et al*. (2009) "A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts". *Microchemical Journal*. 91, 107-110.
32. SINGLETON V.L., ROSSI J. (1965) "Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents". *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 144-158.
33. RE R., PELLEGRINI N., PROTEGGENTE A., PANNALA A., YANG M., RICE-EVANS C. (1999) "Antioxidant Activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay". *Free Radical Biology & Medicine*, Vol 26, Nos 9/10, pp 1231-1237.
34. ROVANI G., DOS SANTOS V., GOMES O., BUDEL J., CAMPOS R. (2011) "Antioxidant and phytochemical investigation of the aerial vegetative *Piper amalago* L." *Cadernos da Escola de Saúde, Curitiba*, Vol. 2: 164-177.
35. REGASINI L., COTINGUIBA F., SIQUEIRA J., BOLZANI V., SILVA D., FURLAN M., KATTO M. (2008) Radical scavenging capacity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (*Piperaceae*). *Latin American Journal of Pharmacy*. Vol. 27, No. 06.

36. CHANG-YIHD H., YANGCHANG W. (1999) Cytotoxic pyridone alkaloids from the leaves of *Piper aborescens*. Journal of natural products. Vol. 53, No. 6, pp. 1575-1577.
37. DE ALMEIDA R., SOUTO B., BASTOS C., DA SILVA M., MAIA J. (2009) Chemical Variation in *Piper aduncum* and Biological Properties of Its Dillapiole-Rich Essential Oil. Chemistry & Biodiversity – Vol. 6.
38. DE ARAÚJO MORANDIM A., CAVALHEIRO A., FURLAN M. (2009) Intraspecific variability of dihydrochalcone, chromenes and benzoic acid derivatives in leaves of *Piper aduncum* L. (*Piperaceae*). African Journal of Biotechnology Vol. 8 (10), pp. 2157-2162.
39. ORJALA C., WRIGHT R., STICHER O. (1993) Five New Prenylated p-Hydroxybenzoic Acid Derivatives with Antimicrobial and Molluscicidal Activity from *Piper aduncum* Leaves. Planta Med. Vol. 5, pp. 546-551.
40. ORJALA C., WRIGHT R., ERDELMEIER C, STICHER O. (1993) New Monoterpene-Substituted Dihydrochalcones from *Piper aduncum*. Helvetica Chimica Acta Vol. 76, pp. 1481-1488.
41. VASQUES DA SILVA R., NAVICKIENE H., KATOB M., BOLZANIA V., ME'DAC C., YOUNG M. (2002) Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. Phytochemistry Vol. 59, pp. 521–527.
42. SANJAY K., PRASAD A., OLSEN C., JHA H., SUBHASH C., VIRINDER S. WENGEL G. (1996) Neolignans And Alkaloids From *Piper argyrophylum*. Phytochemistry Vol. 43, pp. 1355-1360.
43. GREEN T., TREADWELL E., WIEMER D. (1999) Arieianal, a Prenylated Benzoic Acid from *Piper arieianum*. J. Nat. Prod Vol. 62, pp. 367-368.
44. RAMJI N., RAMJI N., IYER R., CHANDRASEKARAN S. (2002) Phenolic antibacterials from *Piper betle* in the prevention of halitosis. Journal of Ethnopharmacology Vol. 83, pp. 149-152.

45. ABANERJIA A., SARKARA M., DATTA R., SENGUPTA P. (2002) Amides from *Piper brachystachyum* and *Piper retrofractum*. *Phytochemistry* Vol. 59, pp. 897-901.
46. FREITAS G., KITAMURA R., LAGO J. (2009) Caldensinic acid, a prenylated benzoic acid from *Piper caldense*. *Phytochemistry Letters* Vol. 2, pp. 119–122.
47. LI X., FERREIRA D., JACOB M. (2004) Antifungal Cyclopentenediones from *Piper coruscans*. *J. AM. CHEM. SOC.* Vol. 126, pp. 6872-6873.
48. CHAURET D., BERNARD C., ARNASON J., DURST T. (1996) Insecticidal Neolignans from *Piper decurrens*. *J. Nat. Prod.* Vol. 59, pp. 152-155.
49. VILA R., MILO B., TOMI R., CASANOVA J., FERRO E., IGUERAL S. (2001) Chemical composition of the essential oil from the leaves of *Piper fulvescens*, a plant traditionally used in Paraguay. *Journal of Ethnopharmacology* Vol. 76, pp. 105–107.
50. ALECIO A., VANDERLAN B., MARX M., KATO M. (1998) Antifungal Amide from Leaves of *Piper hispidum*. *J. Nat. Prod.* Vol. 61, pp. 637-639.
51. LOPEZ A., MING D., TOWERS N. (2002) Antifungal Activity of Benzoic Acid Derivatives from *Piper lanceaefolium*. *J. Nat. Prod.* Vol. 65, pp. 62-64.
52. DE OLIVEIRA M., DE OLIVEIRA V. (2002) Constituents from *Piper marginatum* fruits. *Fitoterapia* Vol. 73, pp. 547–549.
53. DRAGULLA K., YOSHIDAB W., TANGA C. (2003) Piperidine alkaloids from *Piper methysticum*. *Phytochemistry* Vol. 63, pp. 193–198.
54. VALDIVIA C., MARQUEZ N., ERIKSSON J., VILASECA D. (2008) Bioactive alkenylphenols from *Piper obliquum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* Vol. 16, pp. 4120–4126.



55. MCFERREN M., RODRIGUEZ E. (1998) Piscicidal properties of piperovatine from *Piper piscatorum* (*Piperaceae*). *Journal of Ethnopharmacology* Vol. 60, pp. 183–187.
56. RUKACHAISIRIKUL T., SIRIWATTANAKIT P., SUKCHAROENPHOL K., WONGVEIN C. (2004) Chemical constituents and bioactivity of *Piper sarmentosum*. *Journal of Ethnopharmacology* Vol. 93, pp. 173–176.
57. PARMAR V., JAIN S., BISHT K., JAIN R, TANEJA P. (1997) Phytochemistry of the Genus *Piper*. *Phytochemistry*, Vol. 46, pp. 591-673.
58. SCOTT I., JENSEN H., PHILOGENE B., ARNASON J. (2008) A review of *Piper spp.* (*Piperaceae*) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. *Phytochemistry* Vol. 7, pp. 65–75.
59. YÁÑEZ C., RIOS N., MORA F., ROJAS L., DIAZ T. (2011) Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Ambrosia peruviana* Willd. de los llanos venezolanos. *Rev. Peru. Biol.* 18(2): 149-151.
60. CASTRO A., JUÁREZ J., RAMOS N., SUÁREZ S. (2011) Elucidación estructural del aceite esencial de *Ruta graveolens* L. (ruda) actividad antioxidante y bioensayo de citotoxicidad. *Rev. Ciencia e Investigación* 14(1): 25-28.
61. ALBARRACÍN G., GALLO S. (2003) Comparación de dos métodos de extracción de aceite esencial utilizando *Piper aduncum* (cordoncillo) procedente de la zona cafetera. *Rev. Inv. Univ. Col.* 2(1): 67-85.

## ANEXOS



**FOTO N°1:** *Piper tenuistylum* C. DC. - HOJAS



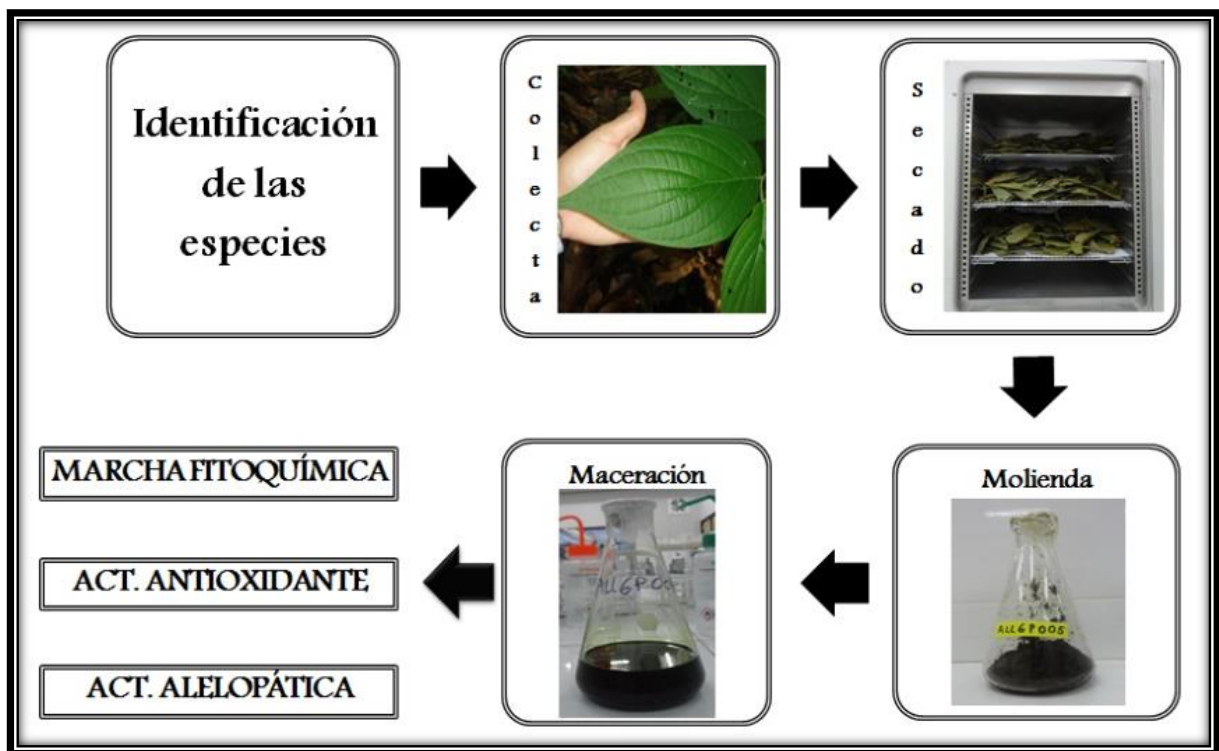
**FOTO N°2:** *Piper tenuistylum* C. DC. – INFLORESCENCIA



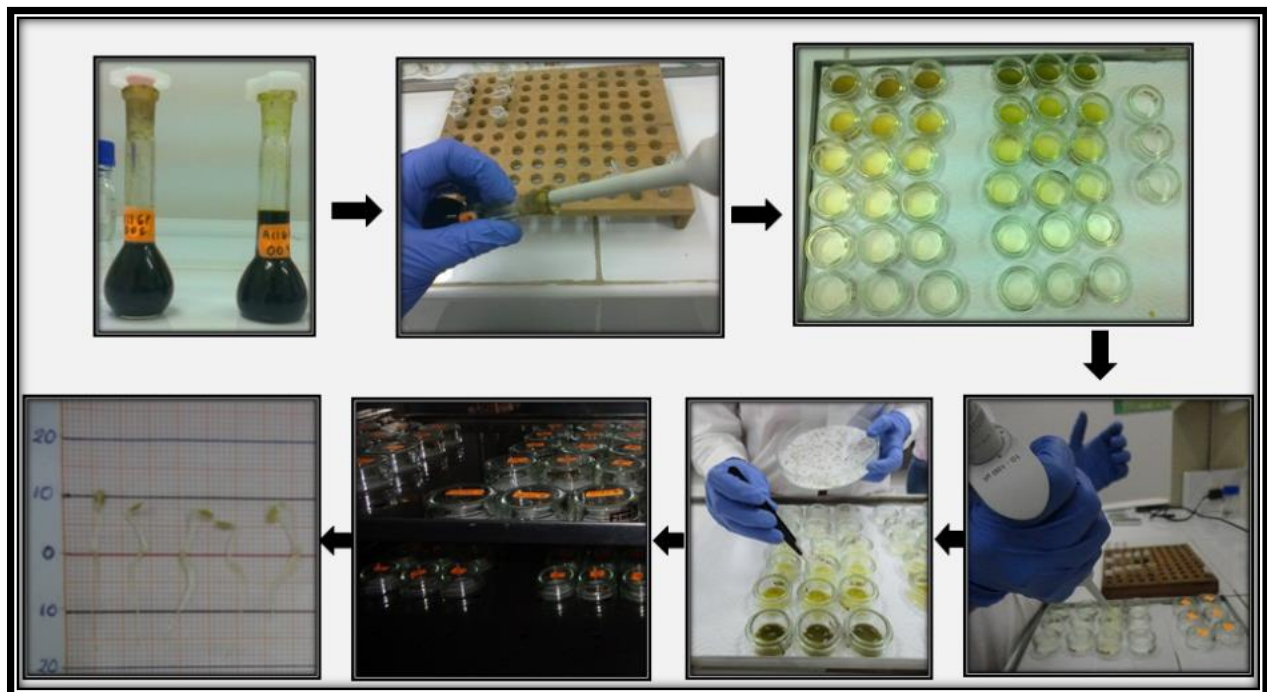
**FOTO N°3:** *Piper lagenaebaccum* Trel. – HOJAS E INFLORESCENCIA



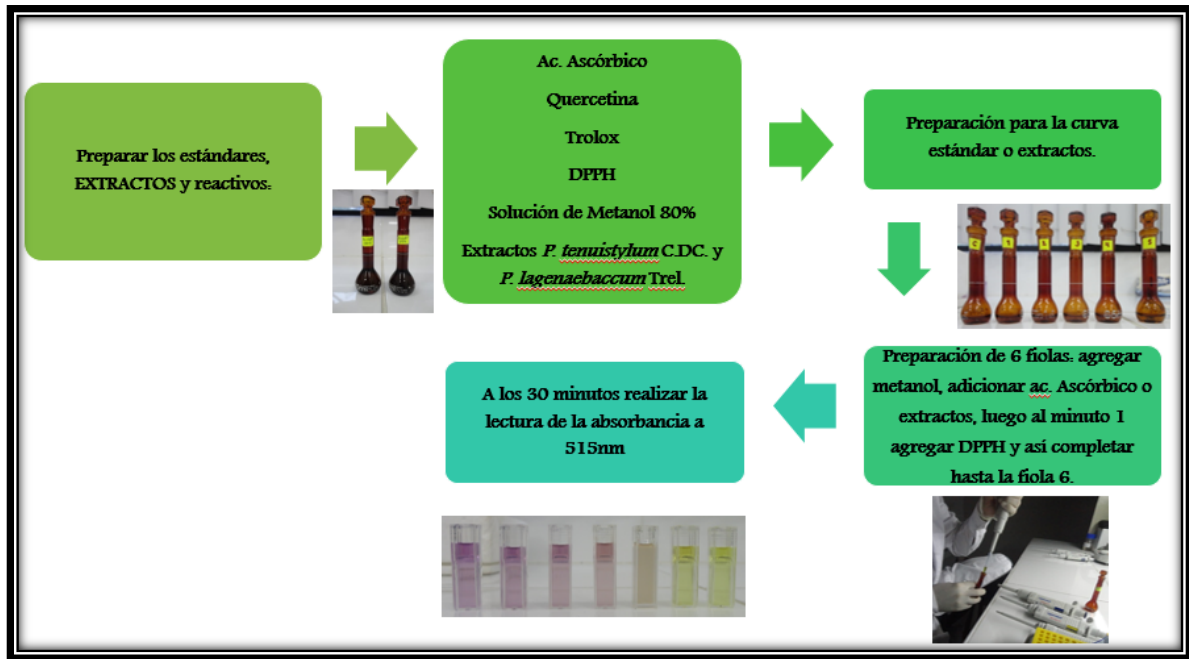
**FOTO N°4:** *Piper lagenaebaccum* Trel. –INFLORESCENCIA



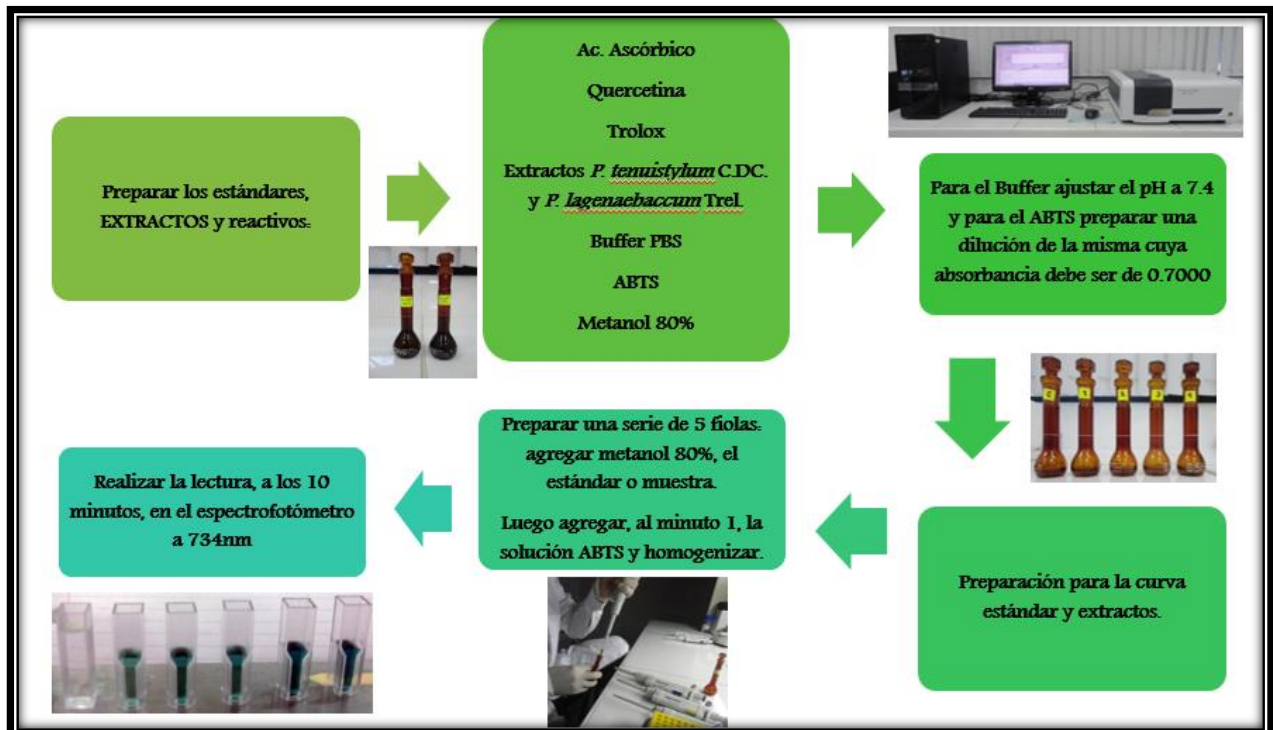
ESQUEMA N°1: Tratamiento de la muestra.



ESQUEMA N°2: Procedimiento en Alelopatía



ESQUEMA N°3: Procedimiento en Antioxidantes – MÉTODO DPPH



ESQUEMA N°4: Procedimiento en Antioxidantes – MÉTODO ABTS