

# Estandarización de un bioensayo para la búsqueda de compuestos fitotóxicos en extractos vegetales

Alberto de J. Oliveros-Bastidas\*, Diego C. Rodríguez-Hernández  
y María Pía Calcagno-Pissarelli

Grupo de Química Ecológica, Departamento de Química, Facultad de Ciencias,  
Universidad de Los Andes. Mérida 5101 A, Venezuela.

Recibido: 10-03-11 Aceptado: 15-07-11

## Resumen

En esta investigación se realizó la estandarización de un protocolo que permite evaluar la actividad fitotóxica de extractos de origen vegetal. El mismo incluye el empleo de diferentes especies receptoras (*Raphanus sativus* L., *Solanum esculentum* L., *Lactuca sativa* L. y *Allium cepa* L.). Se evaluó el efecto de diferentes disolventes (0,16-6% v/v) como metanol (MeOH), etanol (EtOH), acetona (Ac), acetato de etilo (AcOEt) y dimetil sulfóxido (DMSO), sobre la germinación y crecimiento de las plantas modelos. Se encontró que el AcOEt, EtOH y Ac muestran el mayor efecto inhibitor, siendo el menos fitotóxico DMSO. Se estudiaron siete herbicidas (pre y post emergentes: Metilsulfuron, 2,4-D-Amina, Linuron, Paraquat, Metribuzin, Picloran y Glifosan 747) como referencia interna, se encontró que los herbicidas con principio activo 3(3,4-dicloro-fenil-1-metoxi-1-metil urea y N-[fosforometil] glicina, son los que mejor se adaptaron a los requerimiento de referencia. El procedimiento fue aplicado a extractos de diferentes origen de *Blakiella bartsiiifolia*. El análisis de agrupamiento de los datos de actividad, análisis cluster, es aplicado como criterio para categorizar las actividades observadas.

**Palabras clave:** bioensayos, fitotoxicidad, herbicida, *Blakiella bartsiiifolia*.

## Bioassay standardization looking for phytotoxic compounds in vegetable extracts

### Abstract

This research was conducted to standardize a protocol for assessing the phytotoxic activity of plant extracts. It includes the use of different host species (*Raphanus sativus* L., *Solanum esculentum* L., *Lactuca sativa* L. y *Allium cepa* L.). We evaluated the effect of different solvents (from 0.16 to 6% v / v) and methanol (MeOH), ethanol (EtOH), acetone (Ac), ethyl acetate (AcOEt) and dimethyl sulfoxide (DMSO) on the germination and plant growth models. It was found that the AcOEt, EtOH and Ac show the highest inhibitory effect, being less phytotoxic DMSO. Altogether, seven herbicides (pre and post emergent: Metylsulfuron, 2,4-D-Amine, Linuron, Paraquat, Metribuzin, Picloran y Glyfosan 747) as internal reference, it was found that active herbicide 3 (3,4-dichlorophenyl-1-methoxy-1-methyl urea and N-[fosforometil] glycine, are the best adapted to the requirements of reference. The procedure was applied to extracts of

\* Autor para la correspondencia: aloliver@ula.ve

different origin *Blakiella bartsifolia*. Cluster analysis of activity data, is applied as a criterion for categorizing the observed activities.

**Keywords:** Bioassay, phytotoxicity, herbicide, *Blakiella bartsifolia*.

## Introducción

Los bioensayos de toxicidad, como cualquier instrumento analítico, requieren ser calibrados contra un patrón, el tóxico de referencia. Aunque el instrumento, en este caso los organismos de prueba, no pueden ser ajustados a una respuesta esperada, la calibración permite aceptar o rechazar los organismos de prueba cuando provienen de una población cuya respuesta ante el xenobiótico de referencia está dentro o fuera del rango determinado para ese compuesto químico.

Los bioensayos de toxicidad permiten evaluar el grado de afectación que una sustancia química produce en los organismos de prueba seleccionados y constituyen herramientas ampliamente utilizadas en muchos campos de la biología (1). Estos ensayos permiten evaluar el efecto de agentes químicos o físicos en sistemas biológicos, estableciendo relaciones concentración-respuesta bajo condiciones controladas en el laboratorio, proporcionando así información valiosa para escalar la investigación a nivel de campo.

Al implementar un bioensayo, es necesario efectuar su estandarización, que consiste en establecer la sensibilidad de las especies y la reproducibilidad del experimento frente a un xenobiótico de referencia. La estandarización permite comparar los resultados entre diferentes laboratorios, siguiendo una metodología común. Una vez estandarizadas las metodologías experimentales, los laboratorios que ejecuten el bioensayo deben realizar una calibración de su método. La calibración es un proceso relacionado con los conceptos que rigen el control de calidad, y cuyo objetivo es determinar la precisión y exactitud que puede y debe alcanzarse en los resultados generados por un deter-

minado bioensayo. Lo anterior es útil para asegurarse que la respuesta de la población expuesta a cierto agente fitotóxico se deba al efecto de éste y no a variaciones tanto de la sensibilidad de los organismos como de fallas operacionales en la aplicación del método.

El desarrollo de bioensayos es una práctica común para la evaluación del potencial tóxico de moléculas, tanto de origen sintético como natural. En este sentido, en el estudio de los productos naturales, es frecuente la evaluación de algún efecto biológico de las moléculas novedosas, esto dirigido en la búsqueda de estructuras que sirvan de base para la manipulación química, que permitan maximizar el efecto observado (2). Por ejemplo, la búsqueda de sustancias con propiedades herbicidas (aleloquímicos), implica evaluar el efecto de la sustancia sobre la germinación y el crecimiento de plántulas (3). Los valores de estos parámetros se comparan con el desarrollo normal de plántulas en ausencia de la sustancia prueba (Control), y son las diferencias observadas entre el ensayo y el control las que pueden clasificar los diferentes niveles de actividad para extractos o compuestos puros (2).

El procedimiento normalmente encontrado para estudiar este efecto es el estudio del desarrollo en placas de Petri en presencia del compuesto de prueba (4), de esta manera, en este trabajo se tienen como objetivo el desarrollo y optimización de un bioensayo en placas de Petri, dirigido a evaluar el potencial fitotóxico de extractos de origen vegetal, y su aplicación en el denominado aislamiento biodirigido (5). Se evalúan variables como el efecto de diferentes disolventes y compuestos de referencia (herbicidas) sobre varias especies receptoras de interés agrícola, como *Raphanus sativus* L., *Solanum esculentum* L., *Lactuca sativa* L. y

*Allium cepa* L. Este protocolo de bioensayo será aplicado a diferentes extractos vegetales de partes aéreas de *Blakiella bartsifolia* (S.F. Blake Cuatrec-Asteraceae), una planta que coloniza el páramo desértico altiandino (6), donde se discutirán los criterios de selección de los extractos más activos, usando el análisis de agrupamiento de los datos de actividad, como un criterio estadístico de selección de las sustancias y/o extractos más activos.

## Materiales y métodos

### Bioensayo de fitotoxicidad

#### Semillas

En un intento de contar con modelos representativos de familias de las dos clases taxonómicas de plantas (mono y dicotiledóneas) para el desarrollo de un bioensayo reproducible en condiciones de laboratorio, se opta por el empleo de semillas comerciales de especies cultivadas. Las especies receptoras propuestas como modelos son *Raphanus sativus* L.-rábano (Harris Morann, Rábano Red Silk), *Solanum esculentum* L.-tomate Solanaceae (Dessert's Cal Seed Inc., Tomate Rio Grande), *Lactuca sativa* L.-lechuga, Compositae (The Hand That Seed The World, Lechuga Great Lakes 659 MT), Cucurbitaceae (Ferry-Morse, Pepino Poinsett 76), *Allium cepa* L.-cebolla, Liliaceae (Sementes Topseed®, cebolla Híbrida OPTIMA F1).

#### Medio sólido como soporte de crecimiento

Se prepara utilizando agar (0,7 g agar-HIMEDIA/100 mL de solución). La mezcla se calienta durante el tiempo necesario para que se licue totalmente ( $T < 60^{\circ}\text{C}$ ). A partir de esta mezcla se prepara la solución de mayor concentración para cada una de las sustancias a ensayar (herbicida y extractos), se realizan las correspondientes diluciones en agitación continua y se vierten en placas Petri donde se dejan solidificar. La solución de bioensayo (herbicidas y extractos) consiste en una solución buffer 10 mM de 2-[N-mor-

pholino]etanosulfónico [MES], con pH ajustado a 5,7 con NaOH 1N; a esta se le añade el herbicida o el extracto en DMSO (a una concentración menor a  $5\mu\text{L}/\text{mL}$ ; se usan 10 mL de la solución de tratamiento por placa (10 mL de agua destilada como control). Según resultados preliminares (datos no mostrados) y otros trabajos, se usan concentraciones entre 1 y 0,06 mM para los herbicidas comerciales y 150 a 18 ppm para los extractos (7).

### Estudio del efecto del disolvente

Para la evaluación del efecto que tienen distintos disolventes sobre la germinación y desarrollo de especies modelo se preparan las siguientes diluciones de etanol (EtOH), acetona (Ac), metanol (MeOH), acetato de etilo (AcOEt) y dimetil sulfóxido (DMSO): 6,31; 3,98; 2,51; 1,58; 1; 0,63; 0,4; 0,25 y 0,16 (% v/v), empleando 10 mL en el bioensayo. Con los datos de germinación, longitud del tallo y de la raíz, y mediante la transformación matemática en una función sigmoideal de dosis-respuesta, se realiza el cálculo de los valores de  $\text{EC}_{50}$  para los cinco disolventes y para cada una de las especies ensayadas.

### Compuestos utilizados

Para la optimización se emplean herbicidas comerciales y extractos vegetales de partes aéreas de *Blakiella bartsifolia* S.F. Blake Cuatrec.

**Herbicidas comerciales:** Se ensayan diluciones acuosas de siete de los herbicidas más empleados en ecosistemas cultivados (agro sistemas) de la región Andina de Venezuela, aunque su uso es extensivo a otras regiones de Venezuela (7). Se trata de distintas formulaciones de aplicación en pre-emergencia, post-emergencia o mixta (Metilsulfuron, 2,4-D-Amina, Linuron, Paraquat, Metribuzin, Picloran y Glifosan 747). Las concentraciones de los herbicidas utilizados indicadas en la tabla 1 representan aquellas usadas a nivel de campo, que van desde 3 hasta 80 mM.

Tabla 1  
Descripción de los herbicidas utilizados en la estandarización del bioensayo de fitotoxicidad

Nombre Comercial	Nombre IUPAC	Estructura química	Fórmula Molecular	Clasificación	Modo de empleo y concentración en el campo [mM]
Metil-sulfuron metil (A)	Metil-2-(4-metoxi-6-metil-1,3,5-triazin-2-ilcarbamosilulfamoil) benzoato		$C_{14}H_{15}N_5O_6$	Sulfonilurea	Post-Emergente [3, 45]
2,4-D-amina (B)	Ácido (2,4-diclorofenoxi)-acético		$C_8H_6Cl_2O_3$	Clorofenoxi	Post-Emergente [16]
Linuron (C)	3(3,4-diclorofenil)-1-metoxi-1-metilurea		$C_9H_{10}Cl_2N_2O_2$	Derivado de la urea	Pre y Post-emergente [10, 06]
Paraquat (D)	1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo		$C_{12}H_{14}N_2$	Bipiridilo	Post-Emergente [3, 85]
Metribuzin (E)	4-amino-6-terbutil-4,5-dihidro-3-metil-1,2,4-triazin-5-ona		$C_8H_{14}N_4OS$	Triazina	Pre y Post-Emergente [16, 3]
Picloram (F)	Ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-piridin-2-carboxílico		$C_6H_3Cl_3N_2O_2$	Piridina	Post-Emergente [8, 25]
Glifosan 747 (G)	N-[fosforometil]-glicina		$C_6H_{17}N_2O_5P$	Organo-fosforado	Pre y Post-Emergente [20, 11]

**Extractos vegetales:** Para la prueba del protocolo de bioensayo en el estudio del potencial fitotóxico de planta, se estudiaron diferentes extractos de *Blakiella bartsifolia*.

- Extracto acuoso (EA): Se recolectan 955 g de la parte aérea de *Blakiella bartsifolia*. Para la extracción se sumergen tallos y hojas frescos en agua (H<sub>2</sub>O) (10 mL/g de material vegetal), en un baño de ultrasonido (3 × 30 min). La solución así obtenida se filtra y el agua se elimina utilizando un liofilizador (Labcinco Freeze Dry System/Lyph LOCK 4.5), obteniéndose un sólido de color marrón.
- Exudado foliar (EF): Posteriormente al lavado acuoso, el material vegetal se sumerge en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (DCM) (10 mL/g material vegetal), en un baño de ultrasonido (3 × 30 s). La solución así obtenida se filtra, se elimina el agua presente con MgSO<sub>4</sub> anhidro y se lleva a sequedad eliminando el solvente mediante destilación a presión reducida (T < 30 °C). Se obtiene una goma pegajosa de color verde amarillento.
- Extracto vegetal (EV): El material vegetal anteriormente tratado, se lleva a sequedad (400 g) y se extrae vía maceración utilizando una mezcla de solvente MeOH:CHCl<sub>3</sub> 1:1 (10 mL/g material vegetal, 3 × 4 días). La solución así obtenida se filtra, se elimina el agua presente con MgSO<sub>4</sub> anhidro y se lleva a sequedad eliminando el solvente mediante destilación a presión reducida (T < a 30 °C). Se obtiene una goma pegajosa de color verde.
- Extracto senescente (ES): Se recolectan 1.100 g de material vegetal (tallo, hojas y flor) en estado de senescencia. La extracción se realiza vía maceración y por triplicado utilizando una mezcla de solvente MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:1 (5 mL por gramo de material vegetal); cada réplica tuvo un tiempo de maceración de

cuatro días. La solución así obtenida se filtra y el agua se remueve con MgSO<sub>4</sub> anhidro; posteriormente se lleva a sequedad mediante destilación a presión reducida (T < 30 °C). Se obtiene un sólido gomoso. Los extractos obtenidos, por su misma forma de extracción, representan muestras de diferente naturaleza en cuanto a la polaridad de los compuestos en ellas contenidos, esto representa una oportunidad de evaluar el bioensayo con compuestos (extractos) de diferentes grados de solubilidad.

#### Condiciones de crecimiento en el bioensayo

En un ensayo en placa de *Petri*, los parámetros que influyen principalmente en la reproducibilidad del nivel de germinación y el crecimiento, y del bioensayo, son la temperatura de incubación y el tiempo de crecimiento. Un ensayo de estas características obliga a disponer de semillas capaces de germinar y crecer a una misma temperatura y en un período de tiempo similar para todas las especies, lo cual redundará en la simultaneidad de su ensayo y en la velocidad de obtención de resultados. Los bioensayos de actividad fitotóxica se realizan en discos de *Petri* (90 mm) como cámaras de crecimiento, con agar como sustrato de soporte (0,7 g de agar/100 mL). Las semillas (20 semillas: tomate, rábano, cebolla y lechuga, 5 réplicas por concentración), se colocan en las cápsulas de *Petri* que contienen el agar previamente tratado con el herbicida comercial o extracto sellándose las placas con *parafilm*. En el caso del estudio del efecto de los disolventes, el agar fue sustituido por papel de Whatman® (90 mm) como soporte de crecimiento.

El crecimiento se lleva a cabo a 25°C en oscuridad, durante 10 días para la cebolla; 9 para el tomate y 7 para la lechuga y rábano; donde se observó la mayor diferencia entre tratamiento y control, y por tanto, mayor sensibilidad de bioensayo. Después de este tiempo, las plántulas se congelan a -10 °C

por 24 h, este proceso ayuda a la manipulación de las plántulas en el proceso de medida de la longitud del tallo y la raíz, así como evitar el crecimiento de las plántulas durante el tiempo en que se realizan las medidas.

### Tratamiento de datos

En el diseño experimental de los bioensayos de fitotoxicidad en placas *Petri* se evalúan los valores que toman las variables: porcentaje de germinación (longitud radícula  $\geq 2$  mm) y la longitud de la radícula y del tallo. Los resultados se expresan en forma de incrementos porcentuales respecto del blanco. En las gráficas, el valor cero corresponde a la población control, un valor negativo, representa inhibición del parámetro (germinación o longitud del tallo y de la raíz) respecto al control, y un valor positivo, representa estimulación del parámetro respecto al control. Con los datos de actividad se realiza un análisis de agrupamiento de los datos mediante análisis de cluster, usando para esto *Statistic* 4.0. Con estos datos también se calcula el valor de  $EC_{50}$  mediante la transformación matemática en una función sigmoideal de dosis-respuesta de pendiente variable o constante, definida por la ecuación

$$Y = Y_{\min} + (Y_{\max} - Y_{\min}) / (1 + 10^{\log EC_{50} - X})$$

donde  $X$  indica el logaritmo de la concentración,  $Y$  indica la respuesta (fitotoxicidad) y  $Y_{\max}$  y  $Y_{\min}$  son los valores máximos y mínimos de la respuesta respectivamente. Estos cálculos y la representación de los valores de  $EC_{50}$ , se han llevado a cabo mediante el programa Graphpad Prism 4.0<sup>®</sup>.

## Resultados y discusión

### Efecto de los disolventes

La solubilidad limitada mostrada por algunos compuestos de origen vegetal en agua, hace necesaria la utilización de disolventes orgánicos que aseguren la disolución homogénea de los productos a ensayar. Además de esta limitación, en los procedimientos

de aislamiento de metabolitos secundarios se suelen usar disolventes de diferente polaridad, los cuales pueden estar en los extractos ensayados (8). La utilización de estos solventes pueden llegar a ofrecer resultados engañosos en las pruebas biológica. Así mismo, el disolvente usado en el bioensayo puede llegar a tener por sí mismo un efecto inhibitorio que afecta a la germinación y desarrollo de las especies de prueba, variando su respuesta fisiológica frente a los compuestos ensayados.

Así consideramos para este estudio los disolventes más utilizados en la metodología de extracción y aislamiento de agentes aleloquímicos, tales como Ac, MeOH y AcOEt; así como aquellos usados para bioensayos como DMSO y EtOH (9). El ensayo del efecto de estos cuatro disolventes fue realizado para tres especies receptoras, *Solanum esculentum* (dicotiledónea), *Lactuca sativa* L (dicotiledónea) y *Allium cepa* L (monocotiledónea).

Los perfiles de actividad encontrados para la germinación, longitud del tallo y de la raíz se muestran en las figuras 1 y 2. De forma general, se puede observar cómo la respuesta de cada especie es distinta, no se puede establecer una diferencia tan clara entre la especie monocotiledónea (*Allium cepa*) y las especies dicotiledóneas (*Solanum esculentum* y *Lactuca sativa*), aunque la especie monocotiledónea presenta una mayor tolerancia en la germinación. Para el caso del EtOH, se observa cómo para el parámetro de la germinación, *Allium cepa* es la más resistente a la presencia del disolvente, produciéndose una inhibición mayor sólo a altas concentraciones. En este sentido destaca el tomate el cual muestra una sensibilidad muy grande incluso a pequeñas concentraciones. Los parámetros de crecimiento (longitud de la raíz y del tallo) son más sensibles al efecto de los disolventes y en este caso prácticamente todas las especies muestran un comportamiento similar. Para la acetona la respuesta de las especies es prácticamente similar a la del EtOH, aunque la sensibilidad a ésta es menor. En

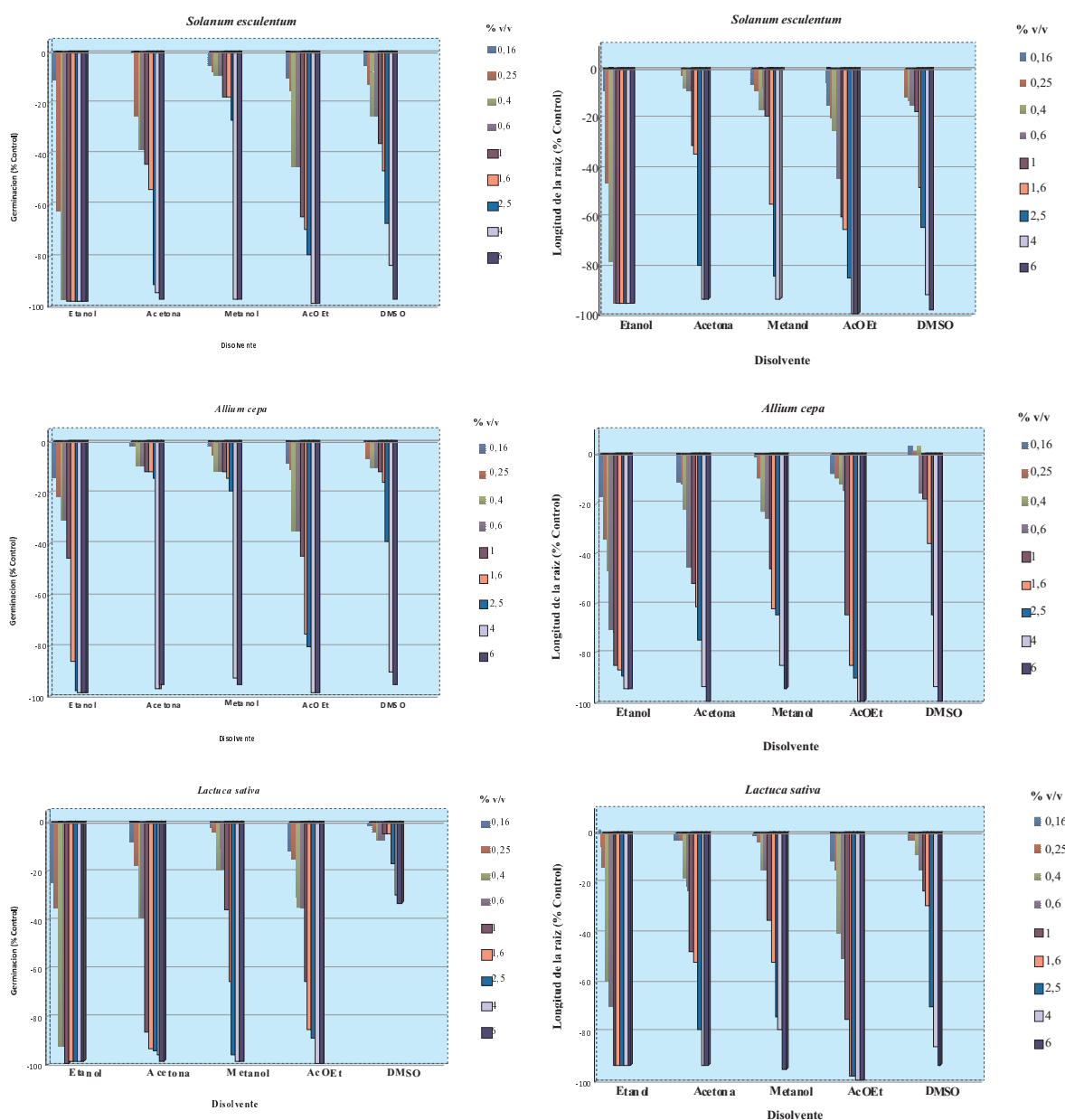


Figura 1. Efecto de los diferentes disolventes sobre la germinación y crecimiento de la raíz de las tres especies receptoras seleccionadas (*Solanum esculentum*, *Allium cepa* y *Lactuca sativa*).

cuanto a la comparación por especies la lechuga surge como la especie más sensible con destacados efectos inhibitorios sobre germinación y primordio de tallo. Para el caso del DMSO, la germinación y el tallo son los parámetros con menor grado de afectación. El AcOEt afecta marcadamente la lon-

gitud del tallo, incluso a bajas concentraciones. Por otra parte, la longitud de raíz muestra un comportamiento muy similar para todas las especies; en general se puede concluir que el disolvente con mayor efecto negativo sobre las semillas es el EtOH>AcOEt>MeOH>DMSO.

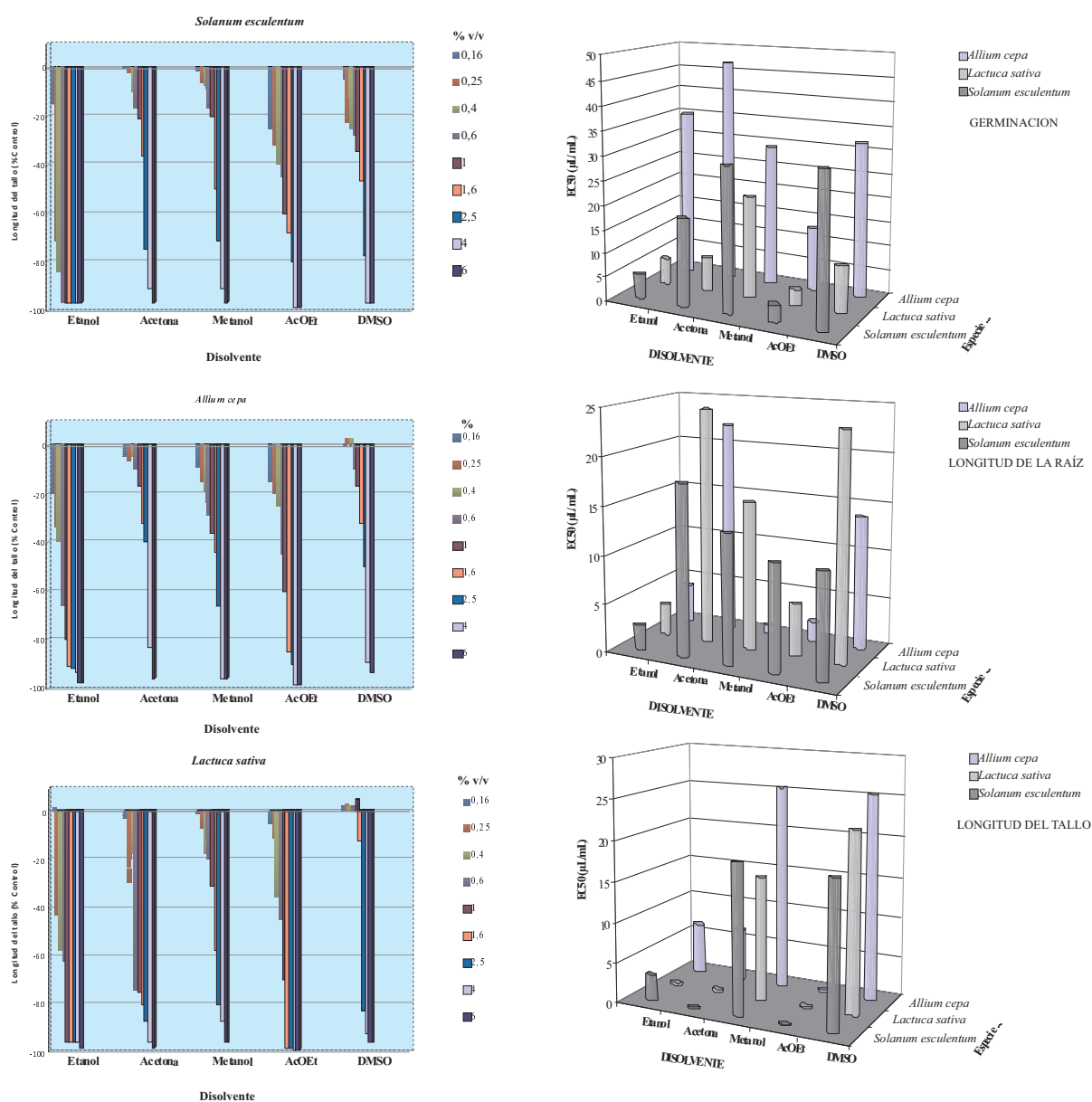


Figura 2. Efecto de los diferentes disolventes sobre la longitud de la raíz en plántulas de las tres especies receptoras seleccionadas (*Solanum esculentum*, *Allium cepa* y *Lactuca sativa*). Derecha: Valores de EC<sub>50</sub> de los cinco disolventes sobre los parámetros de germinación y crecimiento de la raíz y del tallo de las especies modelo estudiadas.

Para tener una estimación con carácter cuantitativo de selección del disolvente más idóneo para la disolución de sustancias de prueba, se han calculado los valores de EC<sub>50</sub> para cada disolvente y especies modelo, donde los valores de estimación para la

ecuación y los resultados del valor de EC<sub>50</sub> son resumidos en la tabla 2. Los valores encontrados para la germinación, crecimiento de la raíz y del tallo, se resumen en la figura 2. En esta se puede observar cómo la especie más afectada es la lechuga, y el disol-



Tabla 2  
Cálculo dosis-respuesta para la determinación del  $EC_{50}$  de los disolventes  
para las diferentes especies modelos estudiadas

Parámetros de Ecuación	Etanol	Acetona	Metanol	AcOEt	DMSO
Germinación					
<i>Solanum esculentum</i>					
$EC_{50}$ (% v/v)	0,5	1,8	2,98	0,35	3,11
$r^2$	0,99	0,99	0,89	0,78	0,99
$p$	0,64	0,5	0,44	0,66	0,66
<i>Allium cepa</i>					
$EC_{50}$ (% v/v)	3,5	4,66	2,95	1,32	3,22
$r^2$	0,94	0,91	0,99	0,78	0,98
$p$	0,66	0,48	0,55	0,66	0,55
<i>Lactuca sativa</i>					
$EC_{50}$ (% v/v)	0,55	0,72	2,13	0,34	0,97
$r^2$	0,97	0,97	0,99	0,95	0,98
$p$	0,76	0,78	0,54	0,66	0,91
Longitud de la raíz					
<i>Solanum esculentum</i>					
$EC_{50}$ (% v/v)	0,26	1,77	1,33	1,1	1,08
$r^2$	0,97	0,87	0,99	0,87	0,99
$p$	0,71	0,91	0,69	0,55	0,5
<i>Allium cepa</i>					
$EC_{50}$ (% v/v)	0,41	2,22	0,10	0,21	1,38
$r^2$	0,89	0,89	0,87	0,67	0,97
$p$	0,71	0,66	0,66	0,45	0,90
<i>Lactuca sativa</i>					
$EC_{50}$ (% v/v)	0,33	2,44	1,53	0,55	2,33
$r^2$	0,99	0,97	0,99	0,97	0,97
$p$	0,54	0,99	0,99	0,6	0,5
Longitud del tallo					
<i>Solanum esculentum</i>					
$EC_{50}$ (% v/v)	0,03	0,02	1,85	0,01	1,8
$r^2$	0,96	0,99	0,99	0,89	0,9
$p$	0,55	0,55	0,95	0,55	0,5

Tabla 2 (Continuación)

		Longitud del tallo			
		<i>Allium cepa</i>			
$EC_{50}$ (% v/v)	0,65	0,66	2,55	0,03	2,55
$r^2$	0,89	0,97	0,97	0,87	0,97
$p$	0,79	0,99	0,60	0,55	0,93
		<i>Lactuca sativa</i>			
$EC_{50}$ (% v/v)	0,04	0,04	1,55	0,02	2,23
$r^2$	0,94	0,94	0,99	0,97	0,96
$p$	0,5	0,51	0,78	0,65	0,74

vente menos perjudicial el DMSO. Con respecto al parámetro de longitud de la raíz y del tallo, se puede concluir que es este último el parámetro más afectado, mostrando los valores de  $EC_{50}$  menores. Como disolventes, el uso de EtOH queda descartado por su gran efecto inhibitor en ambos parámetros, especialmente en el crecimiento del tallo. Al usar DMSO la comparación por especies permite concluir que no existe una diferencia de respuesta entre ellas, por lo que de forma general puede considerarse como el disolvente más adecuado para todos los ensayos, lo cual permite simplificar de forma considerable la preparación de las muestras a evaluar, principalmente aquellas de baja solubilidad en agua.

Para el caso de la longitud del tallo, se observan valores muy bajos de  $EC_{50}$  para los disolventes EtOH y Ac, siendo el que más afecta a este parámetro de crecimiento, el AcOEt. Esto es indicativo de una mayor sensibilidad por parte de las especies a estos disolventes, si bien de forma selectiva, ya que para el caso de MeOH y DMSO estos valores son mayores que para la raíz. Es de resaltar cómo el DMSO muestra los valores más altos en todos los casos, lo cual al igual que en el caso de raíz permite evaluar este parámetro de forma mucho más simple, ya que no se hace necesario un ensayo específico para evaluar el efecto de las muestras en cada parámetro. De la comparación de los valores

de  $EC_{50}$  de los disolventes ensayados y de sus efectos sobre tres parámetros de las tres especies receptoras modelo, se puede concluir que el disolvente más idóneo es el DMSO, seguido del MeOH; y el menos adecuado el AcOEt. La concentración de DMSO empleada debe ser igual o inferior a 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$  para no reducir el desarrollo de las poblaciones de plántulas durante el bioensayo, que dificultaría las medidas e interpretación de los datos así obtenidos.

#### Estudio de herbicidas comerciales

Las semillas de origen comercial sufren pretratamientos que previenen contra la contaminación de microorganismos durante su almacenamiento lo cual puede provocar su insensibilidad a la actividad tanto inhibitora como estimuladora de los productos ensayados. Se comprueba de esta manera la sensibilidad de las semillas comerciales de las variedades de especies agrícolas elegidas como modelo, mediante la utilización de productos de actividad contrastada, como son los herbicidas, que permitan evaluar la sensibilidad de las especies modelo, y establecer una correlación entre la actividad mostrada y el tipo de tratamiento donde se aplican las formulaciones herbicidas. Con el fin de simular las condiciones en las que se aplican a nivel de campo, se preparan diluciones que van desde 3 a los 80 mM. En este caso, solo se estudia como

variable los parámetros macroscópicos de crecimiento (longitud del tallo y de la raíz). De los resultados preliminares, solo a concentraciones menores a 1 mM se logra obtener una relación entre la dosis u concentración de herbicida aplicado y la respuesta observada. Para concentraciones mayores se

observa un 100% de inhibición del crecimiento para todos los herbicidas estudiados (Datos no mostrados). Los resultados del estudio del efecto de los diferentes herbicidas ensayados se resumen en la figura 3 para las especies *Solanum esculentum*, *Raphanus sativus*, *Allium cepa* y *Lactuca sativa*. En el

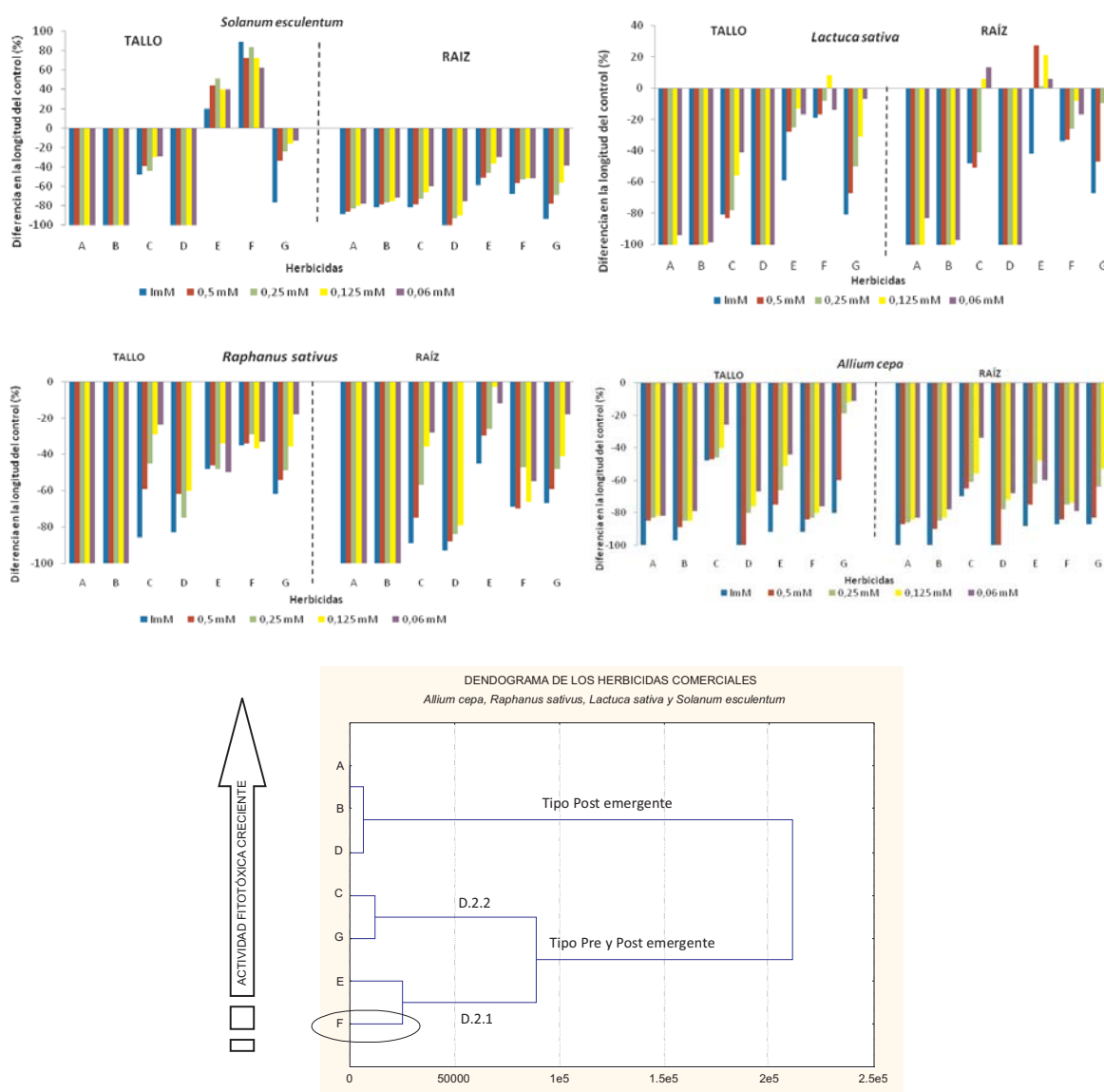


Figura 3. Superior: Actividad fitotóxica de diferentes herbicidas comerciales frente a *Allium cepa* (cebolla), *Raphanus sativus* (rábano) *Lactuca sativa* (lechuga) y *Solanum esculentum* (tomate). Inferior: Análisis de agrupamiento o cluster de los herbicidas comerciales; en función de su actividad fitotóxica en el desarrollo de las especies receptoras. Eje X representa similitud o distancia entre grupos (Actividad).

caso de *Solanum esculentum* y *Lactuca sativa*, los herbicidas post emergentes (A, B, y D), son los que muestran un 100% de inhibición del crecimiento del tallo y raíz a las concentraciones ensayadas. En términos generales, como era de esperar, todos los herbicidas muestran un marcado efecto inhibitor del crecimiento de las plantas seleccionadas. Por otra parte, los herbicidas con modos de acción pre y post emergentes son menos activos, e incluso en algunos casos, como en *Solanum esculentum* y *Lactuca sativa*, muestran estimulación a las más bajas concentraciones, comprobado para varios herbicidas (9, 10).

Es posible recalcar, de forma general, que para todas las especies, los efectos mostrados por los herbicidas de post-emergencia no difieren de los mostrados por los herbicidas mixtos (pre y post emergentes). Así, no es posible establecer mediante esta metodología, un perfil característico que diferencie a unos de otros. En cualquier caso, la sensibilidad y viabilidad para el bioensayo de las semillas comerciales de las especies queda demostrada, tanto para efectos inhibidores como estimuladores. Tomando en consideración todas las especies evaluadas y los parámetros medidos (longitud tallo y radícula), se realizó un análisis Cluster con el fin de observar cuales herbicidas se agrupaban según los perfiles de actividad observados (figura 3). De este análisis, se establecieron dos clasificaciones. Del agrupamiento encontrado, surgen dos clasificaciones. Un primer grupo, denominado  $D_1$ , lo representan los herbicidas A, B y D, que coincidentalmente son clasificados como post emergentes, y son los que registraron el mayor efecto fitotóxico (figura 3). Un segundo grupo, denominado  $D_2$ , incluyen a los herbicidas catalogados como de función mixta, es decir pre y post emergente, siendo la excepción el herbicida Picloram (F, mostrado en un óvalo en la figura 3). De estos dos grupos obtenidos, es evidente que los herbicidas post emergente son los que muestran la mayor actividad, como es de suponer, teniendo

en cuenta que son herbicidas utilizados para malas hierbas ya desarrolladas, necesitando contacto para ejercer su acción. Analizando los perfiles de actividad y el análisis de agrupamiento en la búsqueda de un herbicida que funcione como control y contraste en el bioensayo, es evidente que aquellos herbicidas agrupados en  $D_1$ , son descartados por el fuerte efecto fitotóxico observado; los cuales, podran servir de comparación con compuestos y/o extractos con propiedades inhibitoras del crecimiento; todo esto a los niveles de concentración usados.

Por otro lado, el grupo de herbicidas  $D_2$  (de acción mixta), puede ser dividido en dos sub grupos ( $D_2.1$  y  $D_2.2$ ), donde el sub grupo  $D_2.1$  lo representa los herbicidas E y F (Metribuzin y picloram respectivamente), que son aquellos que mostraron los niveles de actividad más bajos (figura 3). Estos herbicidas mostraran un mayor efecto fitotóxico solo a concentraciones mayores a las empleadas aquí, incluso llegando a niveles de concentración mayores a aquellas usadas a nivel de campo, perdiendo su funcionalidad para contrastar el potencial herbicida de extractos y compuestos naturales (9). De esta manera, aquellos herbicidas agrupados en el sub grupo  $D_2.2$  (C y G), pueden ser candidatos para su selección como patrón de referencia en el diseño del bioensayo. En la búsqueda de un criterio de selección de estos dos herbicidas para ser incluidos en el protocolo final del bioensayo, se calcularon los valores de  $EC_{50}$ , usando las especies modelos *Lactuca sativa* y *Raphanus sativus* (tabla 3). A partir de los valores de  $EC_{50}$  y los parámetros de valoración del ajuste ( $r^2$  y  $p$ ), no es posible discriminar entre los dos herbicidas para su uso como control y contraste en el bioensayo, pudiendose usar indistintamente cualquiera de los dos, siendo el único criterio de elección el modo de acción a contrastar en los extractos o productos a ensayar. Así, se selecciona Glifosan 747, inhibidor principalmente del crecimiento de plantas, si el bioensayo está dirigido a la búsqueda de com-

Tabla 3  
Parámetros de la curva dosis-respuesta sigmoideal para los resultados de fitotoxicidad de los herbicidas Linuron y Glifosan 747 frente a diferentes especies receptoras

Herbicida	Tallo		Raíz	
	<i>Lactuca sativa</i>	<i>Raphanus sativus</i>	<i>Lactuca sativa</i>	<i>Raphanus sativus</i>
Glifosan 747				
EC50 [mM]	0,04974	0,1361	0,0534	0,3308
r <sup>2</sup>	0,9941	0,9983	0,9810	0,9888
p	0,9000	0,9000	0,9000	1,000
Linuron				
EC <sub>50</sub> [mM]	0,0304	1,312	0,0897	0,3303
r <sup>2</sup>	0,9958	0,9980	0,9923	0,9953
p	0,9000	1,000	1,0000	1,000

puestos capaces de inhibir el crecimiento como principal afectación, éste sería el herbicida de control y referencia interna. Si el bioensayo está dirigido a la búsqueda de compuestos que intervengan principalmente ruta fotosintética, el herbicida a usar sería el Linuron (11). Esta comparación, proporcionaría, de una manera indirecta, indicios del modo de acción que pueda estar ejerciendo un conjunto de metabolitos (extractos de origen vegetal) o un compuesto en particular (metabolito secundario).

#### Aplicación del bioensayo para la selección del tipo de material vegetal en la búsqueda de compuestos activos

En la figura 4 se muestran los perfiles de actividad obtenidos para los extractos, donde se incluye el herbicida Linuron como patrón de referencia, que como es de esperar, muestra mayor efecto fitotóxico que los extractos estudiados. Sin embargo, es difícil detectar mediante una simple inspección de los perfiles de actividad, cuál de los extractos resulta más activo, siendo esta decisión más fácil de tomar si se agrupan los datos de crecimiento (longitud del tallo y de la raíz) de todas las especies y concentraciones usa-

das, de la misma manera al realizado para la selección del herbicida de referencia. En la figura 4 se muestra el resultado de este análisis de agrupamiento, donde el herbicida además de servir como referencia de comparación y control en la reproducibilidad del bioensayo, aquí es útil para dar una escala de actividad en el agrupamiento. Así, se encuentra que el extracto obtenido del material senescente (no activo fotosintéticamente) es el que muestra la más baja actividad fitotóxica, quizás por carecer de concentración significativa de productos secundarios debido a esta carencia de actividad fotosintética. Éste se encuentra agrupado con el extracto acuoso, representando el grupo menos activo, debido quizás al proceso de extracción con agua, considerado poco agresivo y de bajo poder extractor de fitotóxicos (12, 13).

El extracto vegetal y el exudado foliar, agrupados en un segundo grupo, representan los extractos más activos, en la búsqueda de las sustancias activas estos serían los dos extractos a considerar en los siguientes procesos de aislamiento, como su fraccionamiento mediante cromatografía, extracción líquido-líquido, extracción con fluido supercrítico, entre otros. De esta manera, este tipo de estudio permite la selección del ma-

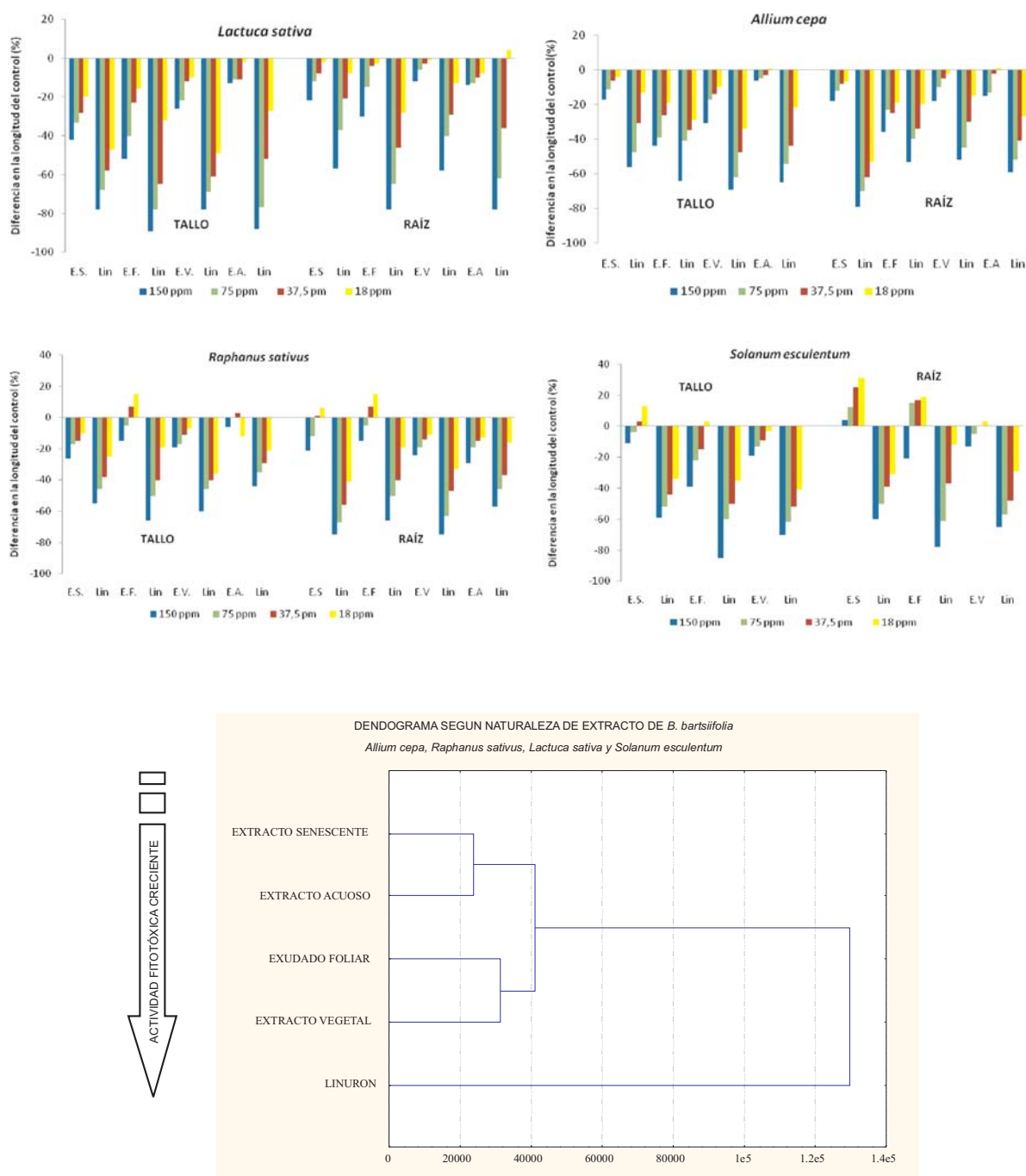


Figura 4. Superior: Actividad fitotóxica de diferentes extracto de la parte aérea de *Blakiella bartsiifolia* frente a *Allium cepa*, *Raphanus sativus*, *Lactuca sativa* y *Solanum esculentum* (tomate). Inferior: Análisis de agrupamiento o cluster según la naturaleza del extracto de las partes aéreas de *Blakiella bartsiifolia*. Eje X representa similitud o distancia entre grupos (Actividad).

terial vegetal a estudiar en cuanto a su constitución metabólica secundaria, para la búsqueda de compuestos fitotóxicos en *Blakiel-la bartsiiifolia*. Esta planta muestra como característica resaltante, la presencia de tricomas de tipo glandulares en la superficie de sus hojas y tallos, los cuales son citados como reservorios importantes de metabolitos secundarios (10), lo cual puede justificar la actividad encontrada para este extracto.

## Conclusión

### Sensibilidad de las especies receptoras

Los datos indican que todas las especies receptoras modelo muestran altos niveles de germinación (> 80%), lo que permite en efecto ser usadas para evaluar propiedades inhibitorias o estimuladoras de la germinación de compuestos y/o extractos naturales. La longitud promedio encontrada para la raíz y el tallo permite evaluar claramente el efecto sobre el crecimiento de la planta, siendo la *Lactuca sativa* L. (lechuga), la especie que muestra mayor sensibilidad debido a la sincronización de la germinación y homogeneidad en el crecimiento; mientras que *Solanum esculentum* L. resulta la especie más resistente al tratamiento, tanto en herbicidas como en los extractos ensayados. En conclusión, todas las especies evaluadas muestran una sensibilidad adecuada para que puedan ser empleadas en los análisis de dosis-respuesta en el estudio de los efectos inhibidores o estimuladores de compuestos y extractos de origen vegetal, emergiendo como la más sensible *Lactuca sativa* L. Así mismo, el bioensayo permite evaluar parámetros de las semillas, tales como vitalidad, vigor de germinación y crecimiento de las plántulas. También, permite el estudio de la efectividad de los herbicidas comerciales, así como abordar estudios del efecto de mezclas de formulaciones, normalmente estudiadas para atacar varios modos de acción de manera simultánea, especialmente para enfrentar los fenómenos de resistencia de las malas hierbas.

### Efecto del disolvente

Del estudio de la optimización del bioensayo se ha encontrado que los solventes usados en los procesos de extracción del material vegetal de compuestos secundarios, pueden tener un efecto fitotóxico importante, sobre todo, si en el extracto a ensayar permanecen cantidades de estos solventes, siendo el menos tóxico y propuesto para disolver muestras de escasa solubilidad el DMSO.

El AcOEt, a pesar de que es frecuentemente utilizado como solvente extractor, resultó el más tóxico en el presente estudio.

### Selección del estándar interno

Del estudio comparativo de los siete herbicidas estudiados, el Linuron (interfiere en la fotosíntesis) y el Glifosam (interfiere en el crecimiento y desarrollo), con actividad fitotóxica demostrada, resultan elegibles para ser usados como patrones en la validación del método de bioensayo. Estos herbicidas muestran actividad aun a muy bajas concentraciones, lo que permite contrastar el efecto fitotóxico de aleloquímicos, normalmente aislados en muy pequeñas cantidades, donde se hace necesario emplear bajas concentraciones.

### Aplicación del método

Se ha aplicado el bioensayo en el estudio de diferentes extractos de partes aéreas de *Blakiel-la bartsiiifolia*, permitiendo diferenciar de manera clara, aquellos extractos más activos, que en principio están en concordancia con la naturaleza química del extracto según su historia de obtención. De igual manera, se propone el análisis de agrupamiento o cluster, como una herramienta estadística fundamental a implementar en el protocolo de bioensayo para la selección de las fracciones y/o compuestos más activos durante el procedimiento de aislamiento biodirigido.

### Agradecimientos

Los autores agradecen el soporte financiero al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico y del Arte (CDCHTA, proyecto CDCHT-C-1453-07-08-B), de la Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Investigación (FONACIT), Misión Ciencia, por el financiamiento otorgado al Lic. Diego Rodríguez para sus estudios de Maestría bajo el proyecto N° 200801483. También se agradece Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais-FAPEMIG, Brasil, por la bolsa dada a AJOB.

### Referencias bibliográficas

1. KAPANEN A, ITAVAARA M. *Ecotox Environ Safe* 49(1):1-16. 2001.
2. OLIVEROS A. *Química Viva* 7(1):2-343. 2008.
3. HAUGLAND E., BRANDSAETER L.O. *J Chem Ecol* 22:1845-1859. 1996.
4. RASMUSSEN J., EINHELLIG F. *Plant Sci Lett.* 14:69-74. 1979.
5. LIU D.L., LOVETT J. *J Chem Ecol* 10:2217-2244. 1993.
6. CUATRECASA J. PRIMA. *Webbia* 24: 39-42. 1969.
7. BENEJAM L. X Seminario de Pastos y Forrajes. 99-108. Maracaibo (Venezuela). 2006.
8. LELAND. J. CSEKE; ARA KIRAKOSYAN; PETER B. KAUFMAN; SARA WARBER; JAMES DUKE; HARRY BRIELMANN. *Natural Products from Plants*. Boca Raton, Florida. 2006, pp. 551.
9. VELINE E., TTRINDADE M., BARBERIS L., DUKE S. *Weed Sci* 58(3):351-354. 2010.
10. REINHARD C., KHALISL S., VEZUIDENHOUT S. Recent Advances in Allelopathy. Vol. I. *A Science for the Future*. (Eds. Macías F., Galindo J., Molinillo, J., Cutler, H.) Servicio Publicaciones Universidad de Cádiz. Cádiz (España). 1999.
11. DEVINE M., DUKE S., FEDTKE C. *Physiology of herbicide action*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ., EE.UU. 1993. 441 pp.
12. a) RODRÍGUEZ D. Contribución al estudio de los compuestos terpénicos ubicados en el exudado foliar de *Blakiella Bartsifolia* S.F. Blake Cuatrec. (Para obtener el título de Licenciado en Química). Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes Mérida-Venezuela. 150 pp. 2007. b) M. KRINGS, T.N. TAYLOR; D.W. KELLOGG. *Evol Ecol Res* 4: 779-786. 2002.
13. CHOU C. Recent Advances in Allelopathy. Vol. I. *A Science for the Future*. (Eds. Macías F., Galindo J., Molinillo, J., Cutler, H.) Servicio Publicaciones Universidad de Cádiz. Cádiz (España). 1999.