

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ALELOPÁTICA DE CINCO ESPECIES VEGETALES AMAZÓNICAS

Paolo ORBE¹, Gabriela TUESTA¹, Claudia MERINO¹, Elsa RENGIFO¹, Billy CABANILLAS¹

¹ Laboratorio de Sustancias Naturales Bioactivas. Programa de Investigación en Biodiversidad Amazónica (PIBA). Instituto de Investigaciones de la amazonía peruana-IIAP. Av. Abelardo Quiñones km 4.5, Iquitos, Perú. e-mail:bcabanillas@iiap.org.pe.

RESUMEN

El presente estudio detalla la evaluación de la actividad alelopática de los extractos etanólicos y metanólicos de las hojas de cinco plantas amazónicas: *Miconia cazaletti*, *Iryanthera paraensis*, *Chrysochlamys membranacea*, *Vitex triflora*, y *Theobroma obovatum*, a través de la medida del efecto de estimulación o inhibición sobre el crecimiento de los hipocótilos y radículas de semillas de *Lactuca sativa*. En casi todas las plantas estudiadas se detectaron efectos inhibitorios y superiores al 50% en las radículas. *Chrysochlamys membranacea* presentó la mejor actividad cuando se emplearon extractos metanólicos y etanólicos.

PALABRAS CLAVE: Alelopatía, plantas amazónicas, inhibición del crecimiento.

ALLELOPATHIC ACTIVITY ASSESSMENT OF SIX AMAZONIAN PLANT SPECIES

ABSTRACT

Allelopathic activity of methanol and ethanolic extracts from leaves of five Amazonian plants *Miconia cazaletti*, *Iryanthera paraensis*, *Chrysochlamys membranacea*, *Vitex triflora*, and *Theobroma obovatum* were assess by recording their effect on percentage growth of hypocotyl and radicle. In all cases, only inhibitory activity in radicles was observed with grown inhibition percentages up to 50%. *Chrysochlamys membranacea* showed the best activity when both methanolic and ethanolic extracts were tested.

KEYWORDS: Allelopathy, Amazonian plants, grown inhibition.

INTRODUCCIÓN

El término alelopatía es utilizado para describir los efectos estimulantes o de inhibición de una planta sobre otras, a través de la liberación de compuestos bioquímicos (Rice, 1984). Esta definición incluye también microorganismos como algas, hongos y bacterias. Actualmente, la alelopatía se presenta como una alternativa para la reducción del uso de pesticidas (herbicidas, fungicidas, insecticidas) que afectan la calidad del medio ambiente y de los suelos, debido principalmente a que muchos de ellos no son biodegradables y/o contienen átomos de halógenos (Sampietro *et al.*, 2009).

Los productos biológicamente activos producidos por las plantas reciben el nombre de aleloquímicos y constituyen su mecanismo de defensa. Los aleloquímicos poseen una amplia diversidad estructural que incluye compuestos fenólicos, cumarinas, alcaloides, taninos, terpenoides y esteroides, así como ácidos orgánicos y otros. Estos compuestos son liberados al medio ambiente a través de mecanismos que incluyen la exudación de las raíces, lixiviación de partes aéreas, especialmente hojas, emisión de volátiles y descomposición de hojas (Anaya *et al.*, 1990; Xuan *et al.*, 2005).

El rol de los aleloquímicos en los agro-sistemas ha despertado el interés de muchos investigadores, en especial por su aplicación en el control de malezas. En ese contexto, se han conducido ensayos de campo con buenos resultados en países como Pakistán, China, Irán e India (Cheema *et al.*, 2013). Estos estudios han permitido identificar especies como el sorgo (*Sorghum bicolor*), que se ha posicionado como un potente agente alelopático usado para el control de malezas en campos de trigo (Weston, 2003).

Como parte de nuestra búsqueda de plantas amazónicas que puedan servir en el control de malezas, se analizó la actividad alelopática de unas 70 especies vegetales, de las cuales cinco presentaron la mejor actividad. En el presente trabajo se describen los resultados de la actividad de las cinco plantas empleando diferentes tipos de extractos alcohólicos, así como los ensayos para el aislamiento de los compuestos activos de *Chrysochlamys membranacea*, una planta que no presenta estudios químicos previos.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL.

Las hojas de *Miconia cazaletti* (Melastomataceae), *Iryanthera paraensis* (Myristicaceae), *Chrysochlamys membranacea* (Clusiaceae), *Vitex triflora* (Lamiaceae), y *Theobroma obovatum* (Sterculiaceae), respectivamente identificadas con

los números de registro 24006, 23078, 11037, 23075, 60018, fueron colectadas del Centro de Investigaciones de Allpahuayo (CIA), ubicado en el km 27.5 de la carretera Iquitos-Nauta, provincia de Maynas, departamento de Loreto.

PREPARACIÓN DE EXTRACTOS ETANÓLICOS Y METANÓLICOS

Las muestras vegetales se secaron en estufa a 40 °C durante una semana y se molieron a grano fino. Posteriormente, las muestras se maceraron en etanol al 95%, en una proporción masa/volumen (1:8) por tres días, repitiendo esta operación un total de tres veces consecutivas. El extracto etanólico fue separado mediante filtración y el solvente fue removido a presión reducida en un rotavapor. Los sólidos obtenidos fueron guardados a 4 °C hasta su utilización. Los rendimientos de extractos obtenidos se muestran en la Tabla 1.

ENSAYOS DE ACTIVIDAD ALELOPÁTICA

Las pruebas de actividad alelopática sobre las semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) se realizaron según la metodología descrita por Fujii & Yasuda (1990). Las semillas de lechuga se pusieron a germinar a 20 °C durante 20 horas sobre papeles de filtro humedecidos con agua destilada, colocados en cajas Petri de 10 cm de diámetro. Se aplicaron a las semillas germinadas volúmenes de 100 µL de soluciones etanólicas a diferentes concentraciones (10, 3, 0.3 y 0.1 mg.mL⁻¹) sobre papeles de filtro dispuestos en cajas Petri de 2,7 cm, y se secaron durante 20 horas en un desecador. A continuación, se agregaron 700 µL de agua y se colocaron 5 semillas germinadas sobre cada caja. Después de 52 horas de incubación en la oscuridad, a 20 °C, se midió la longitud de las radículas y se calculó el porcentaje de inhibición en el crecimiento mediante la fórmula mostrada a continuación.

$$\% \text{ Inh} = 100 - [(X_m * 100)/X_c]$$

%Inh = Porcentaje inhibición del crecimiento de las radículas.

X_m = Tamaño promedio de la radícula en contacto con la muestra m.

X_c = Tamaño promedio de la radícula en el control.

Como mecanismo de control se utilizó agua. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS

Los fraccionamientos se realizaron mediante cromatografía en columna. Para ello se utilizó una

columna de vidrio ($d=4.5$ cm, $h=20.5$ cm) que fue empacada con 150 g de silica gel (Kieselgel Merck®, 0.2-0.5 mm). Se disolvió una cantidad del extracto etanólico (4 g) en una pequeña cantidad de diclorometano y se colocó en la parte superior de la columna. La columna se eluyó inicialmente con diclorometano y luego con mezclas de diclorometano y metanol de polaridad creciente. Los productos obtenidos (fracciones) se colectaron en tubos de 16x180 mm. El seguimiento del contenido de las fracciones se realizó mediante cromatografía en capa fina (TLC Silica gel 60F 254, Merck®), utilizando vanilina con revelador y mediante visualización a la luz ultravioleta ($\lambda=254$ y 365 nm).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los extractos alcohólicos de hojas de *Miconia cazaletti* (Melastomataceae), *Iryanthera paraensis* (Myristicaceae), *Chrysochlamys membranacea* (Clusiaceae), *Vitex triflora* (Lamiaceae), y *Theobroma obovatum* (Sterculiaceae) fueron analizados para determinar su actividad alelopática sobre semillas de *L. sativa*.

En la primera etapa se necesita obtener un extracto crudo para la evaluación de la actividad alelopática de las muestras seleccionadas. En la literatura se menciona al metanol como solvente de extracción (Kato-Noguchia, 2002; Ma, 2011) en la preparación de extractos. Sin embargo, este solvente es tóxico para la salud humana y el medio ambiente. Así mismo, si se emplea metanol en organismos vivos, el crecimiento de estos podría verse afectado por la toxicidad de este solvente, resultando en falsos positivos o negativos, según la prueba que se lleve a cabo. Por tal motivo, se utilizaron dos solventes de extracción, etanol y metanol, en las pruebas de actividad alelopática. En ambos casos se observó inhibición en el crecimiento de hipocótilos y radículas cuando se probaron extractos a las concentraciones de 3 y 10 mg.mL⁻¹. Concentraciones inferiores mostraron una ligera estimulación en el crecimiento de los hipocótilos. Los mayores porcentajes de inhibición se obtuvieron cuando se probaron concentraciones de 10 mg.mL⁻¹ (Figura 1). A este nivel de concentración no se observó inhibición del crecimiento de radículas de semillas de *L. sativa*.

Los extractos etanólicos y metanólicos de las cinco plantas estudiadas mostraron resultados similares a excepción de *Vitex triflora* y *Chrysochlamys membranacea* que mostraron diferencias ligeramente superiores al 10%. Al analizar el efecto de los extractos alcohólicos sobre el crecimiento de los hipocótilos se encontraron diferencias entre 25-60%, siendo mayor cuando se emplearon extractos metanólicos, constituyendo una excepción el uso del

extracto metanólico de *M. cazaletti*.

De las plantas analizadas destacan *I. paraensis* y *C. membranacea*, con inhibiciones en el crecimiento de hipocótilos y radículas superiores al 50% y 70% respectivamente, independientemente del tipo de extracto que se emplea en la prueba. Entre estas dos plantas destaca *C. membranacea* con porcentajes de inhibición de crecimiento de radículas 10% mayores que *I. paraensis*.

Con estos resultados se decidió continuar el trabajo utilizando extractos etanólicos que debido a su baja toxicidad permiten trabajar sobre protocolos de futuras pruebas de campo sin riesgo de contaminación al medio ambiente, tal como se ha realizado en otros países (Cheema *et al.*, 2013).

En la literatura hay información acerca del aislamiento de butanolidos (Franca *et al.*, 1975), neolignanós (Motter-Magri *et al.*, 1996) y lignoflavonoides (Conserva *et al.*, 1990) en *I. paraensis*. Los compuestos encontrados en esta planta permitirían explicar la actividad mostrada por los extractos etanólicos en las pruebas efectuadas sobre las semillas de *L. sativa*.

Para identificar los componentes responsables de la actividad alelopática mostrada por los extractos ensayados en las semillas de *L. sativa*, se procedió al fraccionamiento de la especie más activa, *Chrysochlamys membranacea*, debido a que no hay información acerca del efecto de sus compuestos aislados. El extracto etanólico de *C. membranacea* fue fraccionado mediante cromatografía en columna, utilizando silica gel como fase estacionaria y mezclas diclorometano-metanol de polaridad creciente. Las soluciones obtenidas se agruparon en seis fracciones de acuerdo a la polaridad del eluyente empleado (CM-F1, CM-F2, CM-F3, CM-F4, CM-F5 y CM-F6). La diferencia de composición entre las fracciones se obtuvo mediante cromatografía en capa fina. Los resultados del ensayo de actividad alelopática sobre las semillas de *L. sativa* mostraron que hay una completa pérdida de actividad por parte de las fracciones obtenidas. La fuerte actividad exhibida por el extracto etanólico de *C. membranacea* disminuyó después del fraccionamiento, alcanzándose solamente porcentajes de inhibición de crecimiento del 37% y 26% en la radícula e hipocótilo, respectivamente, a la concentración de 10 mg.mL⁻¹. Los valores de inhibición a las otras concentraciones probadas de 0.1, 1 y 5 mg.mL⁻¹ fueron menores.

Los resultados de actividad obtenidos en las fracciones de *C. membranacea* se pueden deber a muchos factores, tales como: una posible sinergia de los compuestos activos, la actividad de compuestos volátiles (aceite esencial) que se perdieron durante el fraccionamiento, la inestabilidad de compuestos

activos sobre la sílica empleada, la presencia de compuestos termosensibles, etc. Por tal motivo, se necesita profundizar el estudio de los principales grupos de compuestos presentes en el extracto etanólico inicial a fin de establecer cuál es el factor determinante en la pérdida de actividad. Sin embargo, esto no resta importancia al uso que pueda tener el extracto etanólico de *C. membranacea* en el control de malezas en pruebas de campo, tal como se efectúa en otros países (Cheema *et al.*, 2013).

CONCLUSIONES

La actividad alelopática de las hojas de *Miconia cazaletti* (Melastomataceae), *Iryanthera paraensis* (Myristicaceae), *Chrysochlamys membranacea* (Clusiaceae), *Vitex triflora* (Lamiaceae) y *Theobroma obovatum* (Sterculiaceae) fue evaluada a través de su potencial para inhibir el crecimiento de

las radículas e hipocótilos de las semillas de *L. sativa*. Los resultados de la evaluación del extracto etanólico de las plantas *Chrysochlamys membranacea* e *Iryanthera paraensis* las posicionaron como las plantas más activas en una concentración de 10 mg.mL⁻¹, con inhibiciones en crecimiento de las radículas superiores al 70% y de hipocótilos superiores al 50%. El extracto etanólico de *C. membranacea* fue fraccionado mediante cromatografía en columna, y las fracciones obtenidas fueron evaluadas para determinar su actividad inhibitoria. La inhibición en el crecimiento de las semillas de *L. sativa* de las fracciones obtenidas fue muy inferior a aquella mostrada por el extracto original, por lo que se necesita profundizar las pruebas de los principales grupos de compuestos presentes en las hojas, a fin de determinar cuáles podrían ser las causas de la pérdida de actividad.

Tabla 1. Masas de muestra seca y rendimientos de las cinco especies vegetales estudiadas.

Código de muestra	Nombre científico	Familia	Masa de material seco (g)	Masa de extracto etanólico (g)	Rendimiento (%)
24006	<i>Miconia cazaletti</i>	Melastomataceae	362.5	36.167	9.98%
23078	<i>Iryanthera paraensis</i>	Myristicaceae	424.6	73.619	17.34%
11037	<i>Chrysochlamys membranacea</i>	Clusiaceae	232.9	13.575	5.82%
23075	<i>Vitex triflora</i>	Lamiaceae	135.0	5.725	4.24%
60018	<i>Theobroma obovatum</i>	Sterculiaceae	271.9	23.077	8.49%

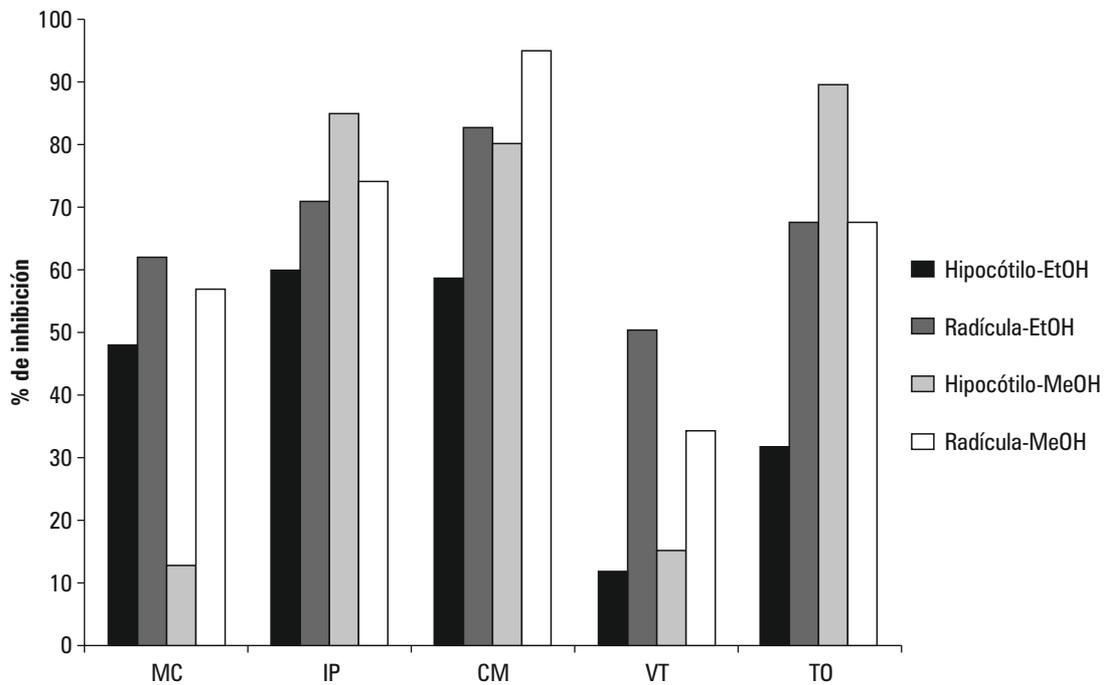


Figura 1. Porcentajes de inhibición de crecimiento de la radícula e hipocótilo de las semillas de *L. sativa* de extractos alcohólicos de cinco especies vegetales a 10 mg/mL (MC: *Miconia cazaletti*, IP: *Iryanthera paraensis*, CM: *Chrysochlamys membranacea*, VT: *Vitex triflora*, TO: *Theobroma obovatum*).

BIBLIOGRAFIA CITADA

- Anaya, A.L.; Calera, M.R.; Mata, R.; Miranda, R.P. 1990. Allelopathic potential of compounds isolated from *Ipomoea tricolor* Cav. (Convolvulaceae). *Journal of Chemical Ecology*, 16: 2145-2152.
- Cheema, Z.A.; Farooq, M.; Wahid, A. 2013. *Allelopathy*. Current Trends and Future Applications, Springer, London.
- Conserva, L.M.; Yoshida, M.; Gottlieb, O.R.; Martinez, J.C.; Goitlieb, H.E. 1990. Iryantherins, lignoflavonoids of novel structural types from the *Myristicaceae*. *Phytochemistry*, 29: 3911-3918.
- 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. *Journal of Weed Science and Technology*. 1990, 35: 353-361.
- Franca, N.C.; Gottliw, O.R.; Rosa B. 1975. Jruenolide: A γ -lactone from *Iryanthera paraensis*. *Phytochemistry*, 14: 590-591.
- Kato-Noguchia H., Tanakaa Y., Murakamib T., Yamamurac S., Fujiharad S. 2002. Isolation and identification of an allelopathic substance from peel of *Citrus junos*. *Phytochemistry*, 61: 849-853.
- Ma, Y.; Chun, J.; Wang, S.; Chen F. 2011. Allelopathic potential of *Jatropha curcas*. *African Journal of Biotechnology*, 10: 11932-11942.
- Motter-Magri, F.M.; Kato, M.J.; Yoshida, M. 1996. Butanolides and a neolignan from the fruits of *Iryanthera paraensis*. *Phytochemistry*, 43: 669-671.
- Rice, E.L. 1984. *Allelopathy*, 2da edición, Academic Press, New York, 422 pp.
- Sampietro, D.A.; Catalan, A.N.; Vattuone, M.A. 2009. *Isolation, Identification and Characterization of Allelochemicals-Natural Products*, Science Publishers, USA. 547pp.
- Weston, L.A.; Duke S.O. 2003. Weed and crop allelopathy. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22: 367-389.
- Xuan, T.D.; Shinkichi, T.; Khanh, T.D.; Min, C.I. 2005. Biological control of weeds and plant pathogens in paddy rice by exploiting plant allelopathy: an overview. *Crop Protection*, 24: 197-206.