

Evaluación ecotoxicológica de extractos acuosos de plantas en semillas de rábano, lechuga y tomate

Ecotoxicology evaluation of watery extracts of plants on seeds of radish, lettuce and tomato

Edisleidy Águila Jiménez¹, Osmany Marrero Chang¹, Yileimys Cárdenas Expósito² y Nancy Bernal Perez².

1 Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central Martha Abreu de las Villas, carretera a Camajuaní Km. 5 1/2, Santa Clara 54830, Villa Clara, Cuba.

2 Departamento de Farmacia. Universidad Central Marta Abreu de las Villas, carretera a Camajuaní Km. 5 1/2, Santa Clara 54830, Villa Clara, Cuba.

E-mail: eaguila@uclv.edu.cu

RESUMEN. Se evaluó el efecto de extractos acuosos de *Nicotiana acuminata*, *Piper aduncum* L. y *Crotalaria juncea* sobre la germinación y la elongación de las raíces de semillas de *Raphanus sativus* (rábano), *Lactuca sativa* L (lechuga) y *Lycopersicon esculentum* (tomate). Los extractos fueron producidos a mediana escala en el laboratorio de formulación de la Facultad de Química- Farmacia de la Universidad Central Marta Abreu de las Villas. Se demostró al concluir el trabajo que la lechuga resultó la especie más sensible para este tipo de estudio. Se concluyó que los extractos pueden ser vertidos al medio a concentraciones menores que 0.01 % con un margen de seguridad que no van a afectar los procesos de germinación y elongación de las raíces. Se determinó que se puede emplear el ensayo solo utilizando las semillas de lechuga como especie de ensayo.

Palabras clave: *Crotalaria juncea*, ecotoxicología, elongación de las raíces, extractos acuosos, germinación, *Nicotiana acuminata*, *Piper aduncum*, *Raphanus sativus*.

ABSTRACT. The effect of watery extracts of *Nicotiana acuminata*, *Piper aduncum* L. and *Crotalaria juncea* was evaluated on the germination and the elongación of the roots of seeds of *Raphanus sativus* (radish), *Lactuca sativa* L (lettuce) and *Lycopersicon esculentum* (tomato). The extracts were produced at medium scale in the laboratory of formulation of the Faculty of Química- Pharmacy of the "Universidad Central Marta Abreu de las Villas". It was demonstrated upon concluding the work that the lettuce was the most sensitive species for this type of study. It was concluded that the extracts could be poured to the means to minor concentrations that 0.01% with a margin of security that they are not going to affect the processes of germination and elongacion of the roots. It was determined that one could use the alone rehearsal using the seeds of lettuce like species of rehearsal.

Key words: *Crotalaria juncea*, ecotoxicology, elongación of the roots, watery extracts, germination, *Nicotiana acuminata*, *Piper aduncum*, *Raphanus sativus*,

INTRODUCCIÓN

En la ecotoxicología se emplean los bioensayos que proporcionan información para la evaluación del riesgo e investigan los efectos y mecanismos de acción de nuevas sustancias químicas. Las alternativas más prometedoras en esta ciencia abarcan la utilización de unos pocos organismos con sensibilidad limitada y/o que no están protegidos por la legislación. Estos bioensayos incluyen bacterias, hongos, algas, plantas y animales invertebrados. Sin embargo, hay autores que indican la necesidad de combinar estos ensayos ecotoxicológicos con los químicos para evaluar

dicha toxicidad potencial y establecer su naturaleza. (Repetto y col., 2001; Bellas y col., 2005)

Entre las determinaciones que se pueden efectuar con los bioensayos encontramos: evaluación de reducción de toxicidad, dosis/concentración letal/efectiva/inhibitoria media (p.ej., DL50, CE50, CI50; en toxicidad aguda y crónica), riesgo ecotoxicológico de aguas naturales, efluentes y otras matrices, potencial de eutroficación de aguas naturales o de efluentes líquidos (Ronco y col. 2000).

La incorporación de manera paulatina de una serie de ensayos ecotoxicológicos por parte del Centro de Bioactivos Químicos, posee el objetivo de la evaluación de productos diversos con incidencia en ecosistemas y en las aguas residuales de los laboratorios de producción, como un indicador de seguridad ecotoxicológica al ser vertidas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se evalúan extractos acuosos de *Nicotiana acuminata*, *Piper aduncum* L y, *Crotalaria juncea* procedentes del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Química-Farmacia de la Universidad Central «Marta Abreu» de Las Villas.

Para realizar la curva dosis-respuesta se preparan 6 diluciones seriadas en escala logarítmica 100; 10; 1; 0,1; 0,01% respectivamente para establecer el intervalo de concentración conveniente para obtener valores de efecto entre 100 y 0% necesarios para calcular la CE_{50} , siempre partiendo de los extractos puros y tomando como control agua destilada.

Se utilizaron las especies (semillas) *Raphanus sativus* L (rábano), *Lactuca sativa* L. (*lechuga*) y *S. lycopersicum* (tomate).

Agua destilada, vehículo para las diluciones de los extractos y como control; Placas de Petri de 100 mm de diámetro; Papel de filtro Whatman núm. 3, 90 mm de diámetro; Matraces aforados de 50 mL. Pipetas volumétricas de 1, 2, 5 y 10 mL.

Obtención, control y conservación de las semillas: Las semillas de *R. sativus*, *L. sativa* y *S. lycopersicum* fueron suministradas por la Empresa Provincial de Semillas Varias, MINAGRI-Villa Clara, con certificado de calidad otorgado por especialistas del Centro Provincial de Sanidad Vegetal. Estas son semillas sin tratamiento con fungicidas o plaguicidas, con buen poder germinativo y baja variabilidad en la elongación de la radícula. Las semillas seleccionadas se almacenan a 4°C, en oscuridad y en ambiente seco.

Procedimiento experimental: Después de preparadas las diluciones a utilizar, se coloca en cada placa de Petri un disco de papel de filtro. Se satura el papel de filtro con 4 ml de la dilución

Por todo ello se propone evaluar ecotoxicológicamente tres extractos acuosos producidos en la Facultad de Química-Farmacia de la Universidad Central Marta Abreu de las Villas utilizando los ensayos de inhibición de la germinación y elongación de la raíz en plantas de *R. sativus*, *L. sativa* y *L. esculentum*.

evitando que se formen bolsas de aire. Con la ayuda de una pinza, se colocan cuidadosamente veinte semillas por placa, dejando espacio suficiente entre ellas para permitir la elongación de las raíces. Se colocan las placas en un mueble tapadas con bolsa plástica (para evitar la evaporación de la sustancia de prueba) y en total oscuridad a una temperatura de 22 +/- 2°C. Se incuban durante 120 horas. Se determina el número de semillas que germinan y longitud de las raíces de las plantas que germinan. (OECD-208, 1984), (DUTKA y col., 1991)

Medida de los puntos finales de evaluación de la fitotoxicidad: Los puntos finales se determinan comparando el efecto generado en los organismos expuestos a la muestra con respecto a la respuesta en los organismos del control negativo sujetos a las mismas condiciones de ensayo, excepto por la ausencia de muestra. Finalizado el periodo de exposición, se procede a cuantificar el efecto en la germinación y en la elongación de la radícula:

- Efecto en la germinación: Se registra el número de semillas que germinan normalmente, considerando como criterio de germinación la aparición visible de la radícula.

- Efecto en la elongación de la radícula. Se utiliza una regla para medir cuidadosamente la longitud de la radícula de cada una de las plántulas correspondientes a cada concentración de tóxico o dilución de muestra y a los controles.

El procesamiento estadístico de toda la información se realiza en Microsoft Excel 2003, y con el complemento XL Fit.

Expresión de los resultados: Se calculan el promedio y desviación estándar de la germinación y la elongación de la radícula de las plántulas de cada

repetición. Porcentaje de inhibición del crecimiento de la radícula, con el promedio de elongación para cada dilución respecto del promedio de elongación del control negativo. Porcentaje de inhibición en la germinación. Con estos datos se elabora la gráfica dosis-respuesta colocando en la ordenada el porcentaje de inhibición y en la abscisa, la concentración. Mediante un método gráfico o el uso

de programas estadísticos, se calcula la concentración que produce el 50% de inhibición (CI_{50}/CE_{50}) para cada punto final evaluado. (EPA, 1989)

Interpretación de los resultados: Los efectos cuantificados sobre la elongación de la radícula se consideran como efectos subletales y la inhibición en la germinación como un efecto letal.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al analizar los efectos letales de los extractos estudiados, medidos a través de la inhibición de la germinación de las semillas, (Tabla 1); se observó la respuesta de los tres extractos respecto a daño agudo. La especie más sensible es la lechuga, pues los valores del porcentaje de inhibición de la germinación en los tres extractos es menor respecto a las otras dos especies, lo cual indica que es la más afectada por los tóxicos disueltos en el agua del medio donde ella se desarrolla. Haciendo un análisis más detallado del efecto de los extractos en las tres especies ensayadas podemos observar que el rábano es la especie menos afectada ya que el valor de concentración letal media es mayor respecto al tomate y la lechuga, los cuales disminuyen respectivamente. Dicha respuesta

indica la mayor sensibilidad en la germinación de las semillas de lechuga. De forma general el respuesta de la inhibición de la germinación de los demás extractos es $R. sativus < S. lycopersicum < L. sativa$.

Estos resultados son coincidentes con estudios realizados donde solo realizan los ensayos para la evaluación de productos y muestras ambientales de diferentes orígenes utilizando la *L. sativa*, lo cual confirma la sensibilidad de dicha especie ante la exposición a tóxicos ambientales y nos permite abordar en evaluaciones futuras de rutina en nuestro laboratorio utilizar la *L. sativa* como especie en ensayo de primera elección. (Wang W., y col.1987) y (Bowers y col., 1997)

Tabla 1. Efecto de los extractos estudiados sobre la germinación y la elongación de las raíces

Extracto	Especie	% inhibición de la germinación (CI_{50})	% Inhibición de la elongación de la raíz (CE_{50})
Extracto 1	Rábano	52.3	3.11
	Lechuga	7.8	0.016
	Tomate	38.0	28.0
Extracto 2	Rábano	64.0	0.61
	Lechuga	1.4	0.053
	Tomate	12.0	1.0
Extracto 3	Rábano	52.8	0.24
	Lechuga	1.7	0.087
	Tomate	5.2	0.51

Leyenda:

Extracto 1: Extracto acuoso de *Nicotiana acuminata* H

Extracto 2: Extracto acuoso de *Piper aduncum* L

Extracto 3: Extracto acuoso de *Crotalaria juncea*

Al analizar los datos de los extractos podemos decir que de forma general el orden de toxicidad sobre la germinación para *R. sativus* es extracto 1 = extracto 3 > extracto 2, para el *L. esculentum* el respuesta de la toxicidad fue extracto 3 > extracto 2 > extracto 1 y para el caso de la *L. sativa* que a nuestra consideración ha sido la especie más sensible el orden resultó extracto 2 < extracto 3 < extracto 1 pues al desconocer la composición de los extractos no podemos compararlos entre si pero tomando como variable una misma especie de planta.

Si analizamos la figura 1 observamos el respuesta de las tres especies de plantas en las diferentes diluciones, el extracto puro produjo una inhibición de la elongación muy marcada respecto al control y se observa que a medida que diluimos el extracto el efecto disminuye, pero siempre en la *L. sativa* el efecto tóxico es mayor lo que nos reafirma la sensibilidad de esta especie ya que en todas las diluciones hay diferencias significativas con respecto al control lo cual no ocurre con las demás especies que a partir de la dilución del 0.01 % no se observan diferencias significativas para $p < 0.05$.

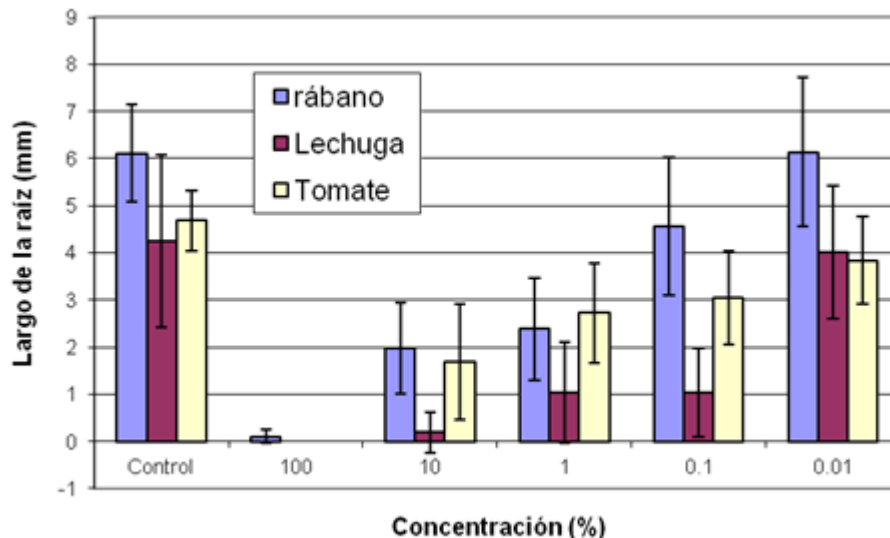


Figura 1. Efecto del extracto 1 sobre la elongación de las raíces de rábano, lechuga y tomate en las diluciones de estudio

El respuesta del extracto 3 fue semejante al extracto anterior (Figura 2), pues en las tres especies utilizadas podemos ver que el extracto puro provocó una inhibición marcada en *L. sativa* y *L. esculentum*

, en el *R. sativus* el efecto no fue muy marcado pues germinó hasta en el producto puro, se observó que aumentó el largo de las raíces a medida que aumentó la dilución del extracto.

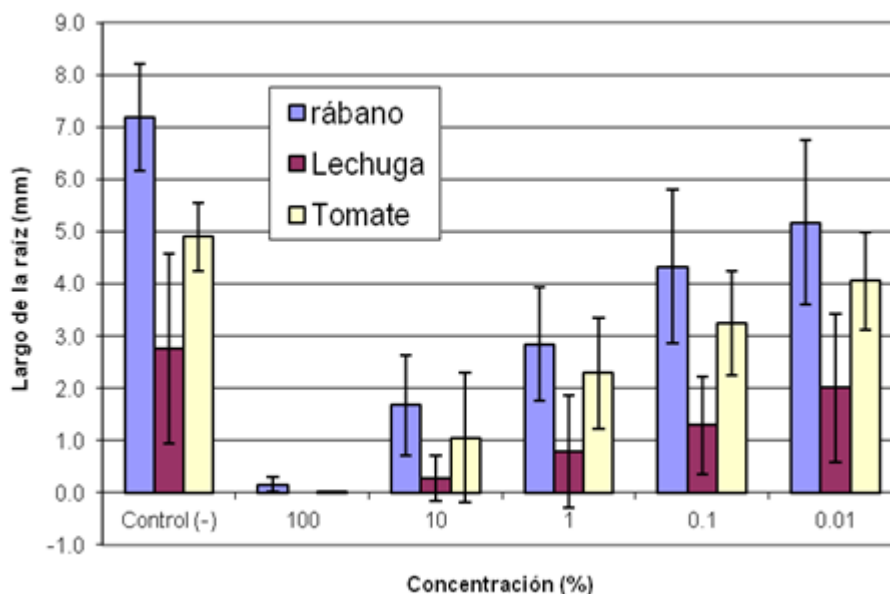


Figura 2. Efecto del extracto 3 sobre la elongación de las raíces de rábano, lechuga y tomate en las diluciones estudiadas

De los resultados obtenidos se puede constatar que a partir de la dilución de 0.01% las aguas residuales de los laboratorios pueden ser vertidas a los cuerpos de agua con un margen de seguridad que no va a

ejercer efecto sobre los procesos de germinación y elongación de las raíces de plantas de las especies estudiadas por lo que podemos concluir que no son tóxicas a estas concentraciones.

CONCLUSIONES

1. Los extractos acuosos de *Nicotiana acuminata Hook*, *Piper aduncum L.* y *Crotalaria juncea* a diluciones mayores o iguales a 0.01 % no muestran signos de toxicidad sobre *Raphanus sativus* (rábano), *Lactuca sativa L.* (lechuga) y *Solanum lycopersicum* (tomate).

2. En el ensayo de inhibición de la germinación para la especie *R. sativus* los extractos de mayor toxicidad fueron el de *Nicotiana acuminata Hook* y *Crotalaria juncea*, con una concentración letal de 52.3% y 52.8% respectivamente, mientras que para el *L. esculentum* el extracto más tóxico fue el de *Crotalaria juncea* con una concentración letal de 5.2% y para la especie *L. sativa* el de mayor toxicidad fue el de *Piper aduncum L.* con una concentración letal de 1.4%.

3. En el ensayo de inhibición de la elongación de la raíz para la especie *R. sativus* el extracto de mayor toxicidad fue el de *Crotalaria juncea*, con una concentración letal de 0.24%, mientras que para el *L. esculentum* el extracto más tóxico fue el de *Crotalaria juncea* con una concentración letal de 0.51% y para la especie *L. sativa* el de mayor toxicidad fue el de *Nicotiana acuminata Hook* con una concentración letal de 0.016%.

4. La especie más sensible en los ensayos realizados fue la lechuga.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bellas, J, R. Beiras, M. Marino-Balsa & N. Fernandez: Toxicity of organic compounds to marine invertebrate embryos and larvae: a comparison between the sea urchin embryogenesis bioassay and alternative test species. *Ecotoxicology* 14:337-353, 2005.

2. Bowers, N., Pratt, J.R., Beeson D. & Lewis M.: Comparative Evaluation of Soil Toxicity using Lettuce Seeds and Soil Ciliates, *Environmental Toxicology and Chemistry* 16 (2):207-213, 1997.

3. Dutka BJ, Kwan KK, Rao SS, Jurkovic A, Mcinnis R: Use of bioassays to evaluate river water and sediment quality, *Environm Toxicol and Water Qual Intern J* 6: 309-32, 1991.

4. EPA/600/3-88/029: Protocols for short term toxicity screening of hazardous waste sites. *US Environmental Protection Agency, Corvallis*: 84-93, 1989.

5. Organization for economic cooperation and development: *Terrestrial Plants: Growth Test. Guideline for Testing of Chemicals* N °208, OECD Publications Service, Paris. 1984.

6. Ronco Alicia, Sobrero Cecilia, Grassi Valeria, kaminski Leticia, Massolo Laura, Min L.: WaterTox bioassay intercalibration network: Results from Argentina. *Environm Toxicol* 15: 287-296, 2000.

7. Wang, W :Root Elongation Method for Toxicity Testing of Organic an Inorganic Pollutants, *Environmental Toxicology & Chemistry*: 409-414, 1987.

Recibido: 12/03/2012

Aceptado: 20/10/2012