



UNIVERSIDAD DE CHILE- FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE POSTGRADO

**ESTUDIO DE ALCALOIDES INDÓLICOS Y SUS DERIVADOS EN  
UN SUELO AGRÍCOLA Y SU RELACIÓN CON PROPIEDADES  
ALELOPÁTICAS.**

Proyecto de Magister entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento de los  
requisitos para optar al grado de:

**Magister en Ciencias Químicas**

**MARÍA LOURDES LÓPEZ SERRANO**

Director de tesis: M.Cs. Sylvia V. Copaja C.

Co-Director de tesis: M.Cs. Héctor R. Bravo.

Septiembre 2019

Santiago - Chile

## RESEÑA



María Lourdes López Serrano, nacida el 09 de octubre de 1992 en Bogotá, Colombia. Realizó sus estudios de primaria en el Centro de enseñanza Precoz la Alegría de Aprender – CEPAP y sus estudios de bachillerato en el colegio María Goretti. Ingresó a la Universidad Mariana en el año 2007, donde cursó sus estudios en Ingeniería Ambiental, obteniendo el título de Ingeniera Ambiental en el año 2013. Ejerció su profesión en variados proyectos de infraestructura vial hasta el año 2017, su gusto por la ciencia la motiva a emprender su viaje a Chile, donde inicia sus estudios de posgrado de Magister en Ciencias Químicas, en la Universidad de Chile en el año 2017, la cual ha sido una experiencia de crecimiento personal y profesional.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco principalmente a la profesora Sylvia Copaja y al profesor Héctor Bravo por brindarme la oportunidad de trabajar en el laboratorio de Química Orgánica y Ambiental, por sus enseñanzas y dedicación durante todo el desarrollo de esta tesis.

A mi familia, por su apoyo incondicional, especialmente a mis papás Edgar López y Clara Serrano, por siempre creer en mí y ser mi motivación para emprender este camino.

A Alejandro Muñoz, que con su amor incondicional, paciencia y comprensión me acompañó en este proceso.

## INDICE DE CONTENIDO

<b>INDICE DE TABLAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>INDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>xi</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xiii</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1    Antecedentes generales.....	1
1.2    Antecedentes específicos. ....	2
1.2.1    Pesticidas.....	2
1.2.2    Herbicidas. ....	3
1.2.3    Alelopatía. ....	5
1.3    Suelo agrícola.....	7
1.4    Dinámica de herbicidas en el suelo. ....	8
1.5    Procesos de acumulación. Adsorción – Desorción. ....	10
1.6    Parámetros de adsorción Kd y Koc. ....	14
1.7    Modelos de adsorción. ....	15
•        Modelo Cinético de Elovich. ....	16
•        Modelo de Langmuir. ....	17
•        Modelo de Freundlich. ....	17
1.8    Persistencia.....	18
1.9    Lixiviación. ....	20
1.10    Biodisponibilidad.....	20
1.11    Lipofilia. ....	22

1.12	Alcaloides indólicos. ....	23
1.13	Hipótesis. ....	24
1.14	Objetivo general. ....	25
1.15	Objetivos específicos. ....	25
<b>II.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
2.1	Preparación de soluciones de compuestos en estudio. ....	26
2.2	Suelo Agrícola. ....	26
2.3	Actividad fitotóxica de los compuestos. ....	27
2.3.1	Prueba Antialga.....	27
2.3.2	Bioensayos de germinación.....	28
2.4	Determinación del tiempo de equilibrio.....	31
2.5	Adsorción – Desorción. ....	31
2.6	Persistencia. ....	33
2.7	Lixiviación. ....	34
2.8	Determinación lipofilia. ....	35
2.9	Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).....	36
2.10	Validación del método analítico. ....	37
2.10.1	Rango lineal. ....	37
2.10.2	Sensibilidad.....	38
2.10.3	Precisión.....	38
2.10.4	Exactitud.....	38
2.10.5	Límite de Detección .....	39
2.10.6	Límite de cuantificación .....	39

<b>III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>40</b>
3.1 Validación del método analítico. ....	40
3.2 Identificación de los compuestos. ....	41
3.3 Actividad fitotóxica de los compuestos. ....	45
3.3.1 Prueba antialga. ....	46
3.3.2 Bioensayos de germinación de semillas y crecimiento de plántulas. ....	47
3.3.3 Efecto de la matriz suelo en la germinación de semillas y crecimiento de plántulas. ....	52
3.3.4 Determinación de la lipofilia. ....	56
3.4 Estudio de la dinámica de índoles en el suelo Alhué. ....	59
3.5 Determinación del tiempo de equilibrio. ....	60
3.5.1 Modelo cinético de Elovich. ....	61
3.6 Isotermas de adsorción. ....	62
3.6.1 Parámetros $K_d$ y $K_{oc}$ . ....	64
3.6.2 Modelo de Langmuir. ....	65
3.6.3 Modelo de Freundlich. ....	67
3.7 Desorción. ....	70
3.8 Persistencia. ....	71
3.9 Lixiviación. ....	74
3.10 Relación fitotoxicidad - agro dinámica. ....	80
<b>IV. CONCLUSIONES.....</b>	<b>83</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>85</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>93</b>

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Propiedades fisicoquímicas de los alcaloides indólicos en estudio. ....	26
<b>Tabla 2.</b> Características fisicoquímicas del suelo Alhué. ....	27
<b>Tabla 3.</b> Semillas usadas para bioensayo por placa petri. ....	30
<b>Tabla 4.</b> Figuras de mérito para cada compuesto. ....	40
<b>Tabla 5.</b> Porcentaje de inhibición del crecimiento de <i>C. vulgaris</i> . ....	46
<b>Tabla 6.</b> Porcentaje de inhibición de la germinación de semillas (%) en matriz estéril. ....	48
<b>Tabla 7.</b> Porcentaje de inhibición del desarrollo de las plántulas en matriz estéril. ....	51
<b>Tabla 8.</b> Porcentaje de inhibición de la germinación de semillas en suelo. ....	53
<b>Tabla 9.</b> Porcentaje de inhibición del desarrollo de las plántulas en suelo. ....	54
<b>Tabla 10.</b> Factor de capacidad ( $K'$ ) y coeficiente de repartición octanol-agua para compuestos derivados indólicos. ....	57
<b>Tabla 11.</b> Valores de $K_{ow}$ obtenidos para cada compuesto. ....	57
<b>Tabla 12.</b> Valores de $\text{Log}P_{\text{HPLC}}$ y promedios del %I de germinación y desarrollo. ....	58
<b>Tabla 13.</b> Modelo de Elovich, valores de $R^2$ y ARE. ....	61
<b>Tabla 14.</b> Parámetros $K_d$ y $K_{oc}$ para cada compuesto. ....	64
<b>Tabla 15.</b> Parámetros de Langmuir para cada compuesto. ....	67
<b>Tabla 16.</b> Parámetros de Freundlich para cada compuesto. ....	69
<b>Tabla 17.</b> Estudio de la desorción para cada compuesto. ....	70
<b>Tabla 18.</b> Valores de tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) para cada compuesto. ....	73
<b>Tabla 19.</b> Índice de GUS para cada compuesto. ....	74
<b>Tabla 20.</b> Cuadro resumen dinámica de los compuestos en el suelo Alhué. ....	79

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Dinámica de los pesticidas en el suelo. ....	9
<b>Figura 2.</b> Proceso de adsorción de los solutos.....	11
<b>Figura 3.</b> Representación de las isothermas de adsorción. ....	13
<b>Figura 4.</b> Cinética de degradación de los plaguicidas en el suelo. ....	18
<b>Figura 5.</b> Estructuras de alcaloides indólicos presentes en cereales e indoles sustituidos en el anillo aromático y anillo heterocíclico.....	23
<b>Figura 6.</b> Muestra de bioensayo test antialga.....	28
<b>Figura 7.</b> Esquema bioensayo de germinación en suelo. ....	29
<b>Figura 8.</b> Muestra de semillas colocadas en placa petri y en la cámara de cultivo.....	30
<b>Figura 9.</b> Muestra de corte de plántulas, para la determinación de la biomasa. ....	30
<b>Figura 10.</b> Esquema determinación tiempo de equilibrio. ....	31
<b>Figura 11.</b> Esquema set de frascos para estudio de adsorción.....	32
<b>Figura 12.</b> Esquema estudio de adsorción y desorción. ....	32
<b>Figura 13.</b> Esquema preparación para estudio de persistencia.....	33
<b>Figura 14.</b> Esquema estudio de persistencia. ....	34
<b>Figura 15.</b> Esquema estudio de lixiviación. ....	34
<b>Figura 16.</b> Columnas para estudio de lixiviación.....	35
<b>Figura 17.</b> Lixiviados de las columnas.....	35
<b>Figura 18.</b> Indolina; <b>A)</b> Cromatograma estándar. <b>B)</b> Espectro UV estándar. (Condiciones: $\lambda=240$ nm; ACN/Agua ácida = 60/40). ....	42
<b>Figura 19.</b> Ácido indol 2-carboxílico; <b>A)</b> Cromatograma estándar. <b>B)</b> Espectro UV estándar. (Condiciones: $\lambda=290$ nm; ACN/Agua ácida = 60/40). ....	42
<b>Figura 20.</b> Indol 3-carbaldehído; <b>A)</b> Cromatograma estándar. <b>B)</b> Espectro UV estándar. (Condiciones: $\lambda=296$ nm; ACN/Agua ácida = 60/40). ....	43



<b>Figura 21.</b> Ac. Indol 3-carboxílico; <b>A)</b> Cromatograma estándar. <b>B)</b> Espectro UV estándar. (Condiciones: $\lambda=280$ nm; ACN/Agua ácida = 60/40). .....	43
<b>Figura 22.</b> Ac. Indol 3-acético; <b>A)</b> Cromatograma estándar. <b>B)</b> Espectro UV estándar. (Condiciones: $\lambda=280$ nm; ACN/Agua ácida = 60/40). .....	44
<b>Figura 23.</b> Indol 5-carbaldehído; <b>A)</b> Cromatograma estándar. <b>B)</b> Espectro UV estándar. (Condiciones: $\lambda=250$ nm; ACN/Agua ácida = 60/40). .....	44
<b>Figura 24.</b> Ac. Indol 5-carboxílico; <b>A)</b> Cromatograma estándar. <b>B)</b> Espectro UV estándar. (Condiciones: $\lambda=240$ nm; ACN/Agua ácida = 60/40). .....	45
<b>Figura 25.</b> Ensayo de germinación con Indolina y control. ....	50
<b>Figura 26.</b> Relación entre $\text{LogP}_{\text{HPLC}}$ vs % Inhibición promedio.....	58
<b>Figura 27.</b> Curvas de concentración adsorbida vs tiempo de agitación. ....	60
<b>Figura 28.</b> Isotermas de adsorción. ....	63
<b>Figura 29.</b> Isotermas de adsorción, usando el modelo de Langmuir. ....	66
<b>Figura 30.</b> Isotermas de adsorción, usando el modelo de Freundlich. ....	68
<b>Figura 31.</b> Variación en el tiempo de la concentración de cada compuesto en estudio. ....	72
<b>Figura 32.</b> Porcentaje de concentración en líquido lixiviado de cada compuesto. ....	76
<b>Figura 33.</b> Porcentaje de concentración vs profundidad en columnas de lixiviación de cada compuesto.....	78
<b>Figura 34.</b> Relación entre los valores de $K_d$ y la actividad fitotóxica promedio, determinadas en el suelo Alhué. ....	81

## RESUMEN

La alelopatía es una de las alternativas utilizadas para el manejo integrado de malezas (MIM), con el fin de minimizar el uso de herbicidas sintéticos. La alelopatía, se define como el efecto que produce un químico liberado por una planta donante sobre el desarrollo de otra planta receptora competitiva. La investigación sobre interacciones alelopáticas ha sido enfocada en cultivos agrícolas, y se ha informado sobre la actividad alelopática de alcaloides indólicos en cereales como la cebada (*Hordeum vulgare L.*), cuyo metabolito secundario natural es Gramina.

Los productos de degradación de este metabolito en suelos agrícolas no han sido investigados, por lo que aún no está claro el rol del suelo en el comportamiento alelopático de estos compuestos. Estudios de adsorción - desorción, persistencia y lixiviación podrían ayudar a establecer su dinámica en el suelo y su posible biodisponibilidad.

En este trabajo, se estudia la fitotoxicidad y la dinámica en el suelo Alhué, del alcaloide natural Gramina, los derivados indolina, indol y una serie modelo de índoles sustituidos en la posición 2 y 3 del anillo heterocíclico y en la posición 5 del anillo aromático, con el objeto de determinar su uso como potenciales aleloquímicos.

Para el estudio de la fitotoxicidad, se realizan bioensayos con la microalga *C. Vulgaris*, donde los derivados indol 3-carbaldehído; indol 5-carbaldehído y el ácido Indol 2-carboxílico muestran una moderada actividad antialga. Por otro lado, se determina la actividad fitotóxica frente a cereales competitivos y malezas, con bioensayos en matriz estéril y matriz suelo, para los cuales se calcula el porcentaje de inhibición (% I) de la germinación de semillas y el crecimiento de plántulas, donde se observa que la actividad fitotóxica obtenida en la matriz estéril fue mayor que en la matriz suelo para la

mayoría de los compuestos, excepto en el alcaloide natural Gramina y el derivado no sustituido Indol.

En el estudio de la adsorción, según los valores obtenidos del coeficiente de adsorción (Kd), toda la serie de alcaloides indólicos muestran una adsorción moderada en el suelo Alhué, con excepción del ácido indol 3-acético. En el estudio de la desorción, este compuesto presenta un porcentaje de desorción de 81 %, acorde con los valores de Kd obtenidos. Los estudios de persistencia indican un tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) con un intervalo de valores entre 7 h y 18 días para la serie de alcaloides indólicos estudiada, en donde el mayor valor de  $t_{1/2}$  fue para el ácido indol 2-carboxílico y el menor para indol 5-carbaldehído.

La dinámica de los compuestos en el suelo Alhué, afecta la actividad fitotóxica, así como la biodisponibilidad, por lo que el suelo es relevante en el efecto alelopático de los compuestos. El Indol y el ácido Indol 2-carboxílico, presentan el mayor efecto fitotóxico, este comportamiento se puede atribuir a su mayor persistencia y baja adsorción, es decir, están más biodisponibles en el suelo Alhué, por lo que su uso como aleloquímico sería favorable.

## ABSTRACT

Allelopathy is one of the alternatives used for integrated weed management (IWM), in order to minimize the use of synthetic herbicides. Allelopathy is defined as the effect produced by a chemical released by a donor plant on the development of another competitive recipient plant. Research on allelopathic interactions has been focused on agricultural crops, and allelopathic activity of indole alkaloids has been reported in cereals such as barley (*Hordeum vulgare L.*), whose natural secondary metabolite is Gramine.

The degradation products of this metabolite in agricultural soils have not been investigated, so the role of soil in the allelopathic behavior of these compounds is not yet clear. Studies of adsorption - desorption, persistence and leaching could help establish its dynamics in the soil and its possible bioavailability.

In this work, phytotoxicity and dynamics in Alhué soil were studied, with the natural alkaloid Gramine, indoline and indol derivatives and a model series of substituted indols in positions 2 and 3 of the heterocyclic ring and in position 5 of the aromatic ring, in order to determine their use as allelochemical potentials.

Phytotoxicity's study, bioassays were performed with the microalgae *C. Vulgaris*, where the derivative indole 3-carbaldehyde; indole 5-carbaldehyde and Indole 2-carboxylic acid showed moderate anti-algae activity. Moreover, the phytotoxic activity against competitive cereals and weeds was determined, with bioassays on a sterile matrix and soil matrix, for which the percent inhibition (% I) of seed germination and seedling growth was calculated. where it is observed that the phytotoxic activity obtained in the

sterile matrix was higher than in the soil matrix for most of the compounds, except in the natural alkaloid Gramine and the unsubstituted derivative Indole.

In adsorption's study, according to the values obtained from the adsorption coefficient (Kd), it was obtained that all the series of indole alkaloids shows a moderate adsorption in Alhué soil, with the exception of indole 3-acetic acid. In the study of desorption, this compound obtained a desorption percentage of 81%, according to the Kd values obtained. The persistence studies indicated a half-life ( $t_{1/2}$ ) with a range of values between 7h and 18 days for the series of indole alkaloids studied, where the highest value of  $t_{1/2}$  was for indole 2-carboxylic acid and the minor one for indole 5-carbaldehyde.

The dynamics of the compounds in Alhué soil affect phytotoxic activity, as well as bioavailability, so that soil plays an essential role in the allelopathic effect of the compounds. Indole and Indole 2-carboxylic acid had the greatest phytotoxic effect, this behavior can be attributed to its greater persistence and low adsorption, that is, they are more bioavailable in Alhué soil, so its use as an allelochemical would be favorable.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Antecedentes generales.

Debido al aumento mundial de la población, surge la necesidad de aumentar el rendimiento de los cultivos, así como el cuidado del estado fitosanitario de estos, por lo que el uso de pesticidas sintéticos se hace necesario. El control de malezas requiere el uso masivo y permanente de herbicidas puesto que estas afectan significativamente los rendimientos agrícolas, sin embargo, el uso excesivo y el mal manejo de estos produce efectos adversos que afectan la flora, fauna, el suelo y napas freáticas del agro ecosistema, así como la salud de las personas. Por esto, se han sugerido diversas alternativas para incluirlas en el manejo integrado de malezas (MIM), con el fin de disminuir el uso de herbicidas sintéticos. La alelopatía es una alternativa que ha despertado particular interés en las últimas décadas, como potencial vía para reducir efectos ambientales negativos y el costo de la protección de los cultivos (Fomsgaard, 2006).

El termino alelopatía, se utiliza para definir el efecto que produce un químico liberado por una planta donante (aleloquímico) sobre el desarrollo de otra planta receptora competitiva. La similitud entre un aleloquímico natural y herbicidas sintéticos en la supresión de malezas, sugiere que la alelopatía tendría un rol importante en el MIM.

Por esto, la investigación sobre interacciones alelopáticas ha sido enfocada principalmente en cultivos agrícolas. Se ha informado sobre la actividad alelopática en cereales de alta importancia agrícola como el maíz (*Zea may L.*), el trigo (*Triticum aestivun L.*), el centeno (*Secale cereale L.*), la cebada (*Hordeum vulgare L.*), el arroz

(*Oryza sativa L.*) y el sorgo (*Sorghum bicolor*), sobre malezas competitivas (Bhowmik y col., 2003; Burgos y col., 2000).

Desde el punto de vista agronómico, se ha observado que rastrojos de cereales son efectivos inhibidores del desarrollo de malezas de hoja ancha (Liebl y col., 1983). También se ha observado que rastrojos de un cereal pueden inhibir, en parte, el desarrollo de otro cereal competitivo (Dias, 1991; Roth y col., 2000). Estas observaciones se han asociado a la presencia de metabolitos secundarios producidos por las plantas que son liberados al suelo por descomposición del tejido vegetal.

En consecuencia, entender en profundidad el rol de los aleloquímicos, así como su dinámica en los suelos agrícolas es fundamental para contribuir al mejor manejo de las estrategias agrícolas como la rotación de cultivos o la cero labranza.

## **1.2 Antecedentes específicos.**

### **1.2.1 Pesticidas.**

Los pesticidas, según la organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) son compuestos naturales o sintéticos destinados a prevenir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga. Pueden eliminar directamente a organismos no deseados o bien controlarlos interfiriendo en su desarrollo y proceso reproductivo (Baird, 2001). Los plaguicidas se clasifican de acuerdo a una gran variedad de criterios (Ramírez y col., 2001):

- Según el organismo que controlan: Insecticidas, Fungicidas, Herbicidas, Acaricidas y Rodenticidas
- Según su composición química: pueden ser inorgánicos (derivados de cobre y de mercurio) u orgánicos, entre los cuales se encuentran los organoclorados, organofosforados, carbamatos, triazinas, piretroides, entre otros.

- Según su toxicidad: La toxicidad se mide a través de la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) o de la concentración letal media (CL<sub>50</sub>).
- Según su modo de acción: existen 3 principales modos, los cuales indican como el plaguicida llega al organismo, estos son: por contacto en donde el plaguicida ingresa al organismo por la superficie de este, por inhalación, donde el plaguicida ingresa por las vías respiratorias del organismo o por ingestión donde el organismo debe ingerir el plaguicida.

### 1.2.2 Herbicidas.

Son pesticidas con una acción específica para el control de malezas, los que en contacto con las plantas, le producen la muerte, inhiben la germinación, impiden su crecimiento o desarrollo normal o producen deformaciones. Los herbicidas se clasifican:

a) Según su **modo de acción**:

- **Residuales**: Son aquellos que permanecen en el suelo, el tiempo suficiente como para ir eliminando las malezas en el momento de su germinación; estos productos no son tóxicos para la planta cultivada o se descomponen en productos no tóxicos antes de que nazca ésta. Se aplican después de la siembra del cultivo y antes de su germinación.
- **De Contacto**: Aquellos que eliminan las plantas sobre las que caen, pero su acción tóxica es de muy poca duración y se descomponen rápidamente en sustancias no fitotóxicas o se evaporan. En este tipo de herbicidas hay que tener en cuenta el factor humedad, ya que solamente ataca las partes húmedas de las plantas.
- **Sistémicos**: Penetran en el interior de la planta, mezclándose con la savia y repartiéndose por toda ella. Actúan por translocación.



b) Según el **momento de aplicación**:

- **Pre siembra o pre plantación:** Son los que se aplican después de la preparación del suelo, pero antes de la siembra o plantación.
- **Pre emergencia:** Son los productos que se aplican después de la siembra de la planta cultivada.
- **Post emergencia:** Son aquellos que se aplican después del nacimiento de las malezas y de la planta cultivada.

c) Según su **finalidad**:

- **Total:** es aquel que destruye toda la vegetación sobre la que se aplica. Puede ser selectivo si se aplica en dosis menores.
- **Selectivo:** En condiciones normales destruyen las malezas y no el cultivo.

La constante búsqueda de elevados rendimientos en los cultivos agrícolas y la idea de mejorar el estado fitosanitario de los productos, promueve el uso de estos, ya que las malezas representan un gran problema para la agricultura por su interferencia con el crecimiento de los cultivos, generalmente compiten por agua, luz, espacio y nutrientes, produciendo disminución en los rendimientos agrícolas y pérdidas económicas, lo que hace que sea necesario su control permanente. Además, las malezas desarrollan resistencia a los herbicidas lo que obliga al uso de mayores dosis o el uso de nuevos compuestos.

El uso indiscriminado de los pesticidas se han asociado tanto con problemas ambientales como de la salud de las personas. La exposición a pesticidas puede ser por contacto con la piel, ingestión o inhalación, los pesticidas pueden metabolizarse, excretarse, almacenarse o bioacumularse en la grasa corporal (Alewu, 2011; Hayes y col., 2006; World Health Organization, 1990; Zheng y col., 2016). Los numerosos

efectos negativos para la salud que se han asociado con pesticidas sintéticos incluyen, entre otros, efectos dermatológicos, gastrointestinales, neurológicos, carcinogénicos, respiratorios, reproductivos y endocrinos (Khot y col., 2015; Mnif y col., 2011; Sanborn y col., 2007).

Los residuos de pesticidas se pueden encontrar en una gran variedad de alimentos y bebidas de uso diario, que incluyen, por ejemplo, comidas, agua, vino, jugos de frutas, refrescos y alimentos para animales (Chourasiya y col., 2015). Los residuos de pesticidas también se han detectado en muestras de leche materna humana, y existe preocupación por la exposición prenatal y los efectos en la salud de los niños (Lu y col., 2015; Pirsahab y col., 2015).

### 1.2.3 Alelopatía.

El término alelopatía, se define como una interacción química entre plantas, donde una de ellas (planta donante) libera al agro ecosistema una sustancia (aleloquímico) que altera el normal desarrollo de una planta receptora, si el aleloquímico es liberado por un cereal de importancia agrícola y es tóxico para una maleza receptora, entonces, el fenómeno alelopático se transforma en un proceso beneficioso para el control de malezas, sin embargo, si el proceso es inverso sería perjudicial (Batish y col., 2001; Bhowmik y col., 2003).

El primer congreso mundial de alelopatía (Cádiz, España 1996) la define como “cualquier proceso que involucre metabolitos secundarios producidos por plantas, algas, bacterias y hongos, que influya sobre el crecimiento y desarrollo de sistemas biológicos.

Estos metabolitos secundarios, no son utilizados por las plantas en su metabolismo normal o principal y están presentes en prácticamente todos los tejidos de las plantas: hojas, tallos, raíces, rizomas, flores, frutos y semillas (Bravo y col., 2013; Copaja y col.,

2006), por lo tanto, los fenómenos alelopáticos se pueden estudiar desde las plantas vivas, donde son exudados al medio por las raíces, o desde el material descompuesto (rastrojo).

El fenómeno alelopático es considerado un proceso altamente complejo, puesto que involucra diversos aspectos como: dosis, selectividad, estructuras, estabilidad, propiedades del suelo, entre otros. Hay tres factores esenciales que requieren ser investigados para entender el fenómeno alelopático:

- Determinar la selectividad del aleloquímico respecto a su toxicidad en cultivares y malezas competitivas.
- Caracterizar el rol de las propiedades fisicoquímicas del suelo y de la biota, cuando el aleloquímico es liberado a la rizosfera.
- Caracterizar la estabilidad química del aleloquímico en el suelo y el rol de los posibles productos de descomposición en el fenómeno alelopático.

En cereales de alta importancia agrícola como: maíz, trigo, cebada, centeno, arroz, sorgo, avena, se han caracterizado una variedad de estructuras con propiedades alelopáticas como: cumarinas, alcaloides, flavonoides, ácidos hidroxámicos y derivados fenólicos (Olofsdotter, 2001). Estos metabolitos derivan de dos rutas biosintéticas generales, la ruta del acetato - mevalonato y la ruta del ácido shikímico.

Se conocen numerosos estudios que relacionan la alelopatía de cereales con la presencia de estos aleloquímicos en las plantas. Así por ejemplo, ácidos hidroxámicos y sus productos de descomposición serían responsables de la alelopatía de maíz, trigo y centeno (Copaja y col., 2006; Schulz y col., 2013; Sicker y col., 2000; Wu y col., 2001). La alelopatía de arroz y sorgo se atribuye a la presencia de ácidos fenólicos

(Ahn y col., 2000; Baghestani y col., 1999; Guenzi y col., 1966). Alcaloides indólicos serían responsables de la alelopatía de cebada (Bravo y col., 2010; Overland, 1966).

### **1.3 Suelo agrícola.**

El suelo puede ser definido como la parte más externa de la litosfera, que es resultado de la meteorización del material parental. Es una matriz ambiental de gran complejidad por estar en constante interacción debido a procesos físicos, químicos y biológicos (Sposito, 2008).

El suelo está compuesto principalmente por una fracción orgánica y una inorgánica. La fracción inorgánica del suelo se compone de los minerales de arcillas, por otro lado, la fracción orgánica del suelo se compone a su vez por una parte biótica y una parte abiótica. La parte biótica es aquella que está constituida por organismos vivos, donde se encuentran bacterias y hongos; la parte abiótica, se compone de humus y residuos naturales, entre ellos aminoácidos, hidratos de carbono, lípidos, entre otros. Los hidratos de carbono componen entre un 5 y 25% de la materia orgánica del suelo, los cuales provienen de residuos en descomposición, siendo el resultado de equilibrio entre su síntesis y degradación (Stevenson, 1994). El humus, por su parte, compone entre un 50 y 85% de la materia orgánica del suelo, siendo una buena fuente de carbono, nitrógeno y fósforo, regulador del dióxido de carbono atmosférico y aporta una elevada capacidad de intercambio catiónico (Aguilera y col., 1977).

El humus se compone principalmente de sustancias húmicas: ácido húmico, ácido fúlvico, humina, entre otros, los cuales, son producto de descomposición microbiológica de animales y plantas, además por resíntesis biológica o vía radicales libres forman nuevos polímeros orgánicos complejos y estables. Estas macromoléculas polielectrolíticas son fundamentalmente ácidas, forman complejos metálicos y quelatos que participan en importantes reacciones en la formación y desarrollo del suelo,

regulando el movimiento de los nutrientes en el suelo y la biodisponibilidad para las plantas.

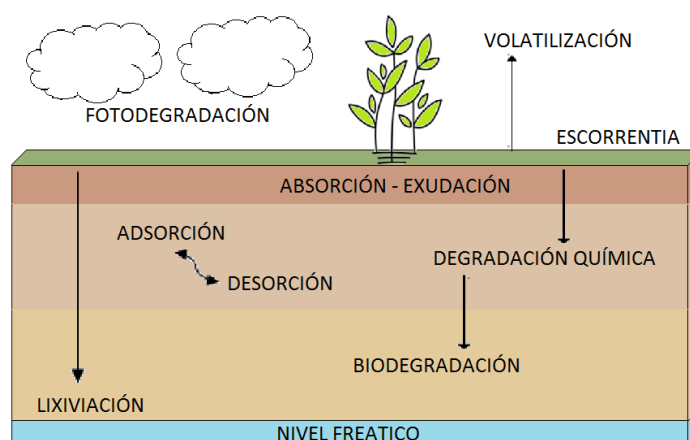
El suelo agrícola hace referencia a un determinado tipo de suelo que es apto para cultivos, este debe contar con ciertos elementos que lo conviertan en suelo apto para la agricultura, como la cantidad de materia orgánica (aproximadamente 5%), macro nutrientes primarios (N, P, K), macro nutrientes secundarios (S, Mg, Ca) y micronutrientes (Zn, Fe, Mn, Cu, Cl, B, Mo), necesarios para el crecimiento y normal desarrollo de las plantas.

Así mismo, para que un suelo sea fértil y se considere un suelo apto para la actividad agrícola, se deben considerar características como pH, textura, estructura, conductividad eléctrica y capacidad de intercambio catiónico (CIC).

#### **1.4 Dinámica de herbicidas en el suelo.**

El comportamiento o dinámica de los plaguicidas en el suelo, está relacionado con diversos aspectos, los cuales se pueden dividir en tres grandes grupos: procesos de transferencia, procesos de acumulación y procesos de transformación (Zhang y col., 1993).

Los procesos de transferencia son aquellos en los que la naturaleza química del plaguicida no se ve afectada e implican mecanismos fisicoquímicos o biológicos que dan lugar a transferencias entre diferentes sistemas, como suelo-agua, suelo-aire, suelo-planta. Entre los mecanismos de transferencia se pueden destacar: lixiviación, escorrentía, volatilización. Los procesos de acumulación corresponden a: adsorción – desorción, absorción y persistencia. Los procesos de transformación implican cambios en la estructura del plaguicida (degradación química y/o biológica y foto degradación) (Sánchez y col., 1984).



**Figura 1.** Dinámica de los pesticidas en el suelo.

Por otro lado, entre las características más relevantes del suelo, que pueden afectar la dinámica de los herbicidas se encuentran:

- **Textura:** Específicamente el tamaño de las partículas minerales, entre las cuales se encuentran las arcillas (coloides del suelo), siendo muy importante en los procesos de adsorción el contenido y tipo de estas, por su alta capacidad de adsorción.
- **Materia Orgánica:** Factor determinante en la adsorción de solutos orgánicos en el suelo. El estado en que se encuentre la materia orgánica y su cantidad impactan fuertemente en el destino de los herbicidas.
- **pH del suelo:** Modifica la solubilidad de los solutos. En suelos con valores altos de pH se promueve la solubilización de la materia orgánica, con lo cual aumenta el área superficial para las interacciones con los herbicidas.
- **CIC** (capacidad de intercambio catiónico): Determina el papel del suelo como depurador natural al permitir la retención de elementos contaminantes presentes en el mismo, entre ellos los herbicidas, los cuales pueden ser intercambiados con los iones retenidos en los coloides del suelo.

En consecuencia, todos los parámetros que regulan la dinámica de un herbicida sintético cuando entra en contacto con el suelo, también podrían regular la dinámica de un aleloquímico cuando es liberado por una planta.

Para incluir la alelopatía como una práctica para el manejo de malezas, se necesita un amplio conocimiento y monitoreo de la dinámica del aleloquímico en el suelo, puesto que los aleloquímicos deben acumularse y persistir a niveles fitotóxicos en este, sin embargo, la dinámica de los compuestos en el suelo están también influenciadas por los microorganismos presentes en el (Jilani y col., 2008). Mientras estén en el suelo, los aleloquímicos están expuestos a diversos procesos fisicoquímicos y biológicos, y pueden desintoxicarse, hacerse más tóxicos o pueden servir como esqueleto de carbono para la producción de nuevas toxinas por organismos del suelo (Blum y col., 1999).

Se ha estudiado el comportamiento de alcaloides indólicos, como Gramina e Indol, en suelos de importancia agrícola, suelo Alhué (Muñoz, 2015), donde se encontró que la Gramina tiene una persistencia casi nula, lo cual imposibilitó la determinación de su tiempo de vida media. Los valores de las constantes de distribución sólido – líquido (Kd) sugieren que la biodisponibilidad de la Gramina es muy baja, mientras que para el Indol la biodisponibilidad podría ser mayor, ya que el Indol se encontraría menos adsorbido por el suelo estudiado.

### **1.5 Procesos de acumulación. Adsorción – Desorción.**

Es un proceso de separación en el que se transfieren ciertos componentes de una fase líquida (adsorbato) a una superficie sólida (adsorbente), por afinidad de las moléculas o iones del fluido con dicha superficie (González, 2013).

Estudios de adsorción - desorción son utilizados para obtener información esencial sobre la movilidad de los compuestos y su distribución en el ecosistema. Puede ser

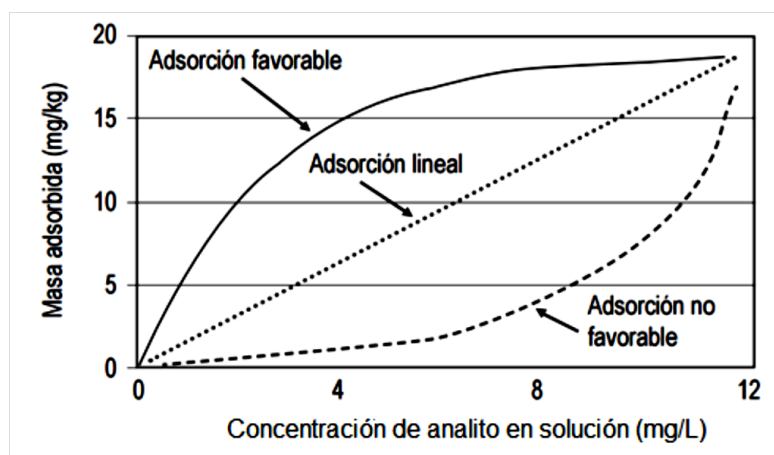
usado para la predicción o estimación, por ejemplo, de la estabilidad de un agroquímico para degradación, transformación y disponibilidad de absorción por un organismo; lixiviación a través del perfil del suelo; volatilidad desde el suelo; escorrentía de las superficies terrestres a través de agua freática (OECD, 2000).

Existen 2 tipos de adsorción:

- **Adsorción física o fisisorción:** se lleva a cabo por consecuencia de las fuerzas electrostáticas entre las moléculas o iones del adsorbente y el adsorbato.
- **Adsorción Química o quimisorción:** es resultado de la interacción química entre el sólido y la sustancia adsorbida.

En la adsorción de plaguicidas, al tratarse fundamentalmente de compuestos orgánicos, se podrán encontrar interacciones de tipo fuerzas de Van der Waals, interacciones por puente hidrógeno, interacciones de tipo iónico, dipolo, dipolo inducido que se dan en plaguicidas, polares o de polaridad intermedia con los coloides del suelo.

El proceso de adsorción de los solutos puede ser favorable o no, descrito de manera general en la siguiente figura.



**Figura 2.** Proceso de adsorción de los solutos.



Un proceso contrario a la adsorción corresponde a la desorción, que es definido como el paso del soluto adsorbido por la fase sólida, hacia la fase líquida o gaseosa. El mecanismo de desorción del compuesto dependerá principalmente de la energía de adsorción, cuanto mayor sea esta energía, más difícil será la desorción del plaguicida de nuevo a la solución del suelo (Sánchez y col., 1984). Es importante determinar la desorción de los compuestos por la fase sólida del suelo, ya que da a conocer la distribución del compuesto en el ambiente, llegando a ser especialmente importante para predecir su comportamiento y movilidad. Sin embargo, no siempre la desorción sugiere el mismo comportamiento que la adsorción, esto corresponde a un proceso llamado *histéresis*, la cual ocurre cuando la desorción no depende únicamente de la cantidad adsorbida, sino que también de cómo se produjo la adsorción, es decir, la historia del sistema. Esto implica la inexistencia de un estado de equilibrio global (Naumov, 2009).

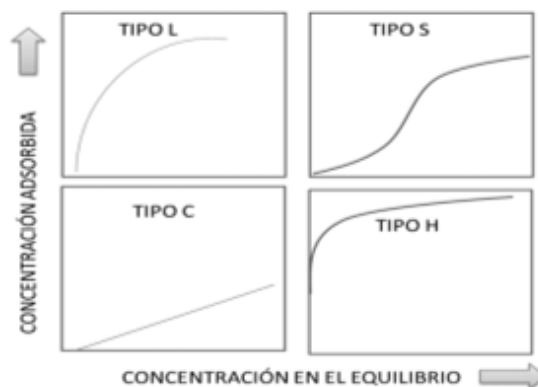
El fenómeno de adsorción suele describirse mediante curvas denominadas isotermas de adsorción que representan la cantidad de compuesto adsorbido por gramo de suelo en función de la concentración en el equilibrio del adsorbato a una temperatura constante (Rodríguez y col., 2011). Para esto se hacen interaccionar cantidades conocidas de sólido y disoluciones de plaguicida con diferentes concentraciones iniciales. Una vez alcanzado el equilibrio, se determina la cantidad de plaguicida en disolución  $C_e$ , así como la cantidad adsorbida,  $C_s$ , para las distintas concentraciones iniciales (Rodríguez y col., 2009).

$$C_s \text{ (}\mu\text{g/g)} = \frac{(C_i - C_e) * V}{g \text{ Suelo}}$$

Ec. 1.

En donde,  $C_i$ , es la concentración inicial ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ),  $C_e$ , es la concentración encontrada ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) y  $V$ , es el volumen agregado (mL).

Según Giles y col (1974) las isothermas de adsorción pueden ser clasificadas en cuatro tipos distintos, dependiendo de la pendiente del tramo inicial de la curva. En la Figura 3 Se muestran los cuatro tipos de isothermas de adsorción que a continuación se describen:



**Figura 3.** Representación de las isothermas de adsorción.

- **Isotherma tipo L.** Son la más conocidas y muchas veces se les llaman isothermas normal o de Langmuir, esta última por seguir su ecuación de adsorción. Representan una alta afinidad relativa entre el soluto y el adsorbente en la fase inicial de la curva. Mientras los sitios específicos de adsorción van siendo ocupados, le resulta más difícil al soluto encontrar un lugar libre para adsorberse. Estas isothermas indican: múltiples interacciones entre el soluto y el adsorbente; fuerte atracción molecular entre las moléculas de soluto y poca competencia entre el soluto y el disolvente por los sitios de adsorción.
- **Isotherma tipo S.** Estas isothermas son típicas de adsorbentes con una alta afinidad por el disolvente. La dirección inicial de la curvatura indica que la adsorción se

ve facilitada a medida que aumenta la concentración del plaguicida. Estas isothermas indican: una interacción específica entre el soluto y el adsorbente; una atracción intermolecular moderada y competencia entre el soluto, el disolvente y las moléculas adsorbidas por los sitios específicos de adsorción.

- **Isoterma tipo C.** Estas isothermas resultan de los casos en que el soluto penetra en la fase sólida más rápidamente que el disolvente. Se caracterizan por un reparto constante del soluto entre la disolución y el adsorbente, hasta el máximo valor que se pueda llegar.
- **Isoterma tipo H.** Son isothermas muy poco comunes y representan un caso especial de las isothermas tipo L. Se observan cuando hay una afinidad muy elevada entre el soluto y la superficie adsorbente que, a bajas concentraciones de soluto, todo o prácticamente todo, queda adsorbido en la superficie. La parte inicial de la isoterma es por esta razón vertical. Es poco habitual y suele darse para adsorbato de elevado peso molecular como micelas iónicas o especies poliméricas.

### 1.6 Parámetros de adsorción $K_d$ y $K_{oc}$ .

El proceso de adsorción generalmente es caracterizado mediante la constante de distribución ( $K_d$ ), la cual relaciona la cantidad de compuesto adsorbido con el que se encuentra en equilibrio. Para determinar la constante de distribución se utiliza la siguiente ecuación:

$$K_d = \frac{C_s}{C_e}$$

Ec. 2.

La constante de distribución es la relación entre la concentración analítica del compuesto adsorbido en la fase sólida ( $C_s$ ) y la concentración analítica del adsorbato en la solución ( $C_e$ ). Un  $K_d$  alto indica que hay una alta adsorción y baja concentración del compuesto disuelto en la solución del suelo, por otro lado, un  $K_d$  bajo indica que

hay mucho compuesto presente en la solución del suelo y poco adsorbido (Alfaro, 2013).

Como el valor del  $K_d$  no es constante y varía considerablemente en función de las propiedades del suelo estudiado (Beltrán y col., 1995), el coeficiente de distribución  $K_d$  se normaliza en relación al contenido de carbono orgánico ( $K_{oc}$ ) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$K_{oc} = \frac{(K_d \times 100)}{\% CO}$$

Ec. 3.

Los valores de  $K_{oc}$  oscilan entre 1 y 10.000.000. Un  $K_{oc}$  elevado indica que el compuesto se fija con firmeza al material sólido, por lo que su movilidad y por lo tanto biodisponibilidad será escasa.

### **1.7 Modelos de adsorción.**

En las separaciones sólido-líquido, cuando un adsorbato (analito en solución) se pone en contacto con un adsorbente, se establece un equilibrio, entre la cantidad adsorbida de analito por el sólido con el analito que quedó en solución (Kumar y col., 2007). Los parámetros fisicoquímicos junto con las suposiciones termodinámicas, dan una idea del mecanismo de adsorción, de las propiedades de la superficie, así como el grado de afinidad de los adsorbentes. Así, se han desarrollado una gran variedad de modelos que dan cuenta del proceso, sin embargo, no todos los modelos son aplicables en todos los procesos de adsorción, estos se han formulado en función de tres criterios fundamentales, que incluyen la consideración cinética (estado dinámico de equilibrio), la termodinámica y el potencial teórico (transmite la idea principal en la generación de la curva característica) (González, 2013).

Para estudiar el proceso de adsorción, así como también la cinética que conlleva, es necesario aplicar algunos modelos fisicoquímicos que responden y describen lo que sucede con el adsorbato en el suelo. Los modelos de interés son tres: Elovich que es un modelo cinético de adsorción, Langmuir, y Freundlich, modelos termodinámicos que describen el proceso de adsorción.

- **Modelo Cinético de Elovich.**

Se aplica a cinéticas de quimisorción, en sistemas en los que la superficie de adsorción es heterogénea. Este proceso permite determinar la cantidad de adsorbato que se recupera en un tiempo establecido (Mancheno y col., 2009). Este modelo supone un mecanismo de reacción de segundo orden y la ecuación de Elovich viene dada por la siguiente expresión:

$$r = \frac{dC_s}{dt} = a e^{-b C_s(t)}$$

Ec. 4.

Donde, **r** es la velocidad de adsorción, **C<sub>s</sub>** es la cantidad de adsorbato adsorbido, **t** es el tiempo en horas, **a** es la velocidad de adsorción inicial y **b** es la constante de desorción. Aplicando las condiciones de borde, cuando el adsorbato está en fase líquida, para  $t = 0$  cuando  $C_s = 0$  y  $t = t$  cuando  $C_s = C_s$ , e integrando se obtiene la forma simplificada que relaciona la cantidad total del soluto en el tiempo  $t$  ( $C_s$ ) en función del logaritmo Neperiano del tiempo  $t$  ( $\ln(t)$ ).

$$C_s = \frac{1}{b} \ln(ab) + \frac{1}{b} \ln(t)$$

Ec. 5.

Para determinar si el ajuste realizado mediante el modelo cinético es bueno, se analizan dos parámetros experimentales:  $R^2 > 0,8$  y ARE (Average Relative Error)  $< 10\%$ , que diferencia entre los valores experimentales y los obtenidos a partir del modelo (Isen y col., 2011).

- **Modelo de Langmuir.**

El modelo de Langmuir se basa en consideraciones fundamentales de una superficie homogénea y una adsorción limitada a una monocapa. La energía de adsorción es constante, la superficie es homogénea y la afinidad de cada lugar de interacción por las moléculas de soluto es la misma (Sánchez, 2014). No se tienen en cuenta las interacciones entre las moléculas adsorbidas y está dado por la siguiente ecuación:

$$\text{Ec. 6.} \quad \frac{C_e}{C_s} = \frac{1}{bxm} + \frac{C_e}{xm}$$

Donde **C<sub>s</sub>** es la cantidad de compuesto adsorbido por unidad de masa de adsorbente, **C<sub>e</sub>** es la concentración en solución en equilibrio, **X<sub>m</sub>** es la capacidad de adsorción y **b** es una constante relacionada con la energía de enlace entre el adsorbente y el adsorbato (Dada, 2012).

Las características esenciales del modelo se expresan a través del parámetro de equilibrio o factor de separación ( $R_L$ ), a partir de este parámetro la adsorción puede clasificarse como irreversible ( $R_L = 0$ ), favorable ( $0 < R_L < 1$ ), lineal ( $R_L = 1$ ) y desfavorable ( $R_L > 1$ ) (Porta y col., 2014), el cual se obtiene por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{Ec. 7.} \quad R_L = \frac{1}{(1 + bC)}$$

En donde, **b**, corresponde a 1/intercepto y **C**, es la concentración inicial.

- **Modelo de Freundlich.**

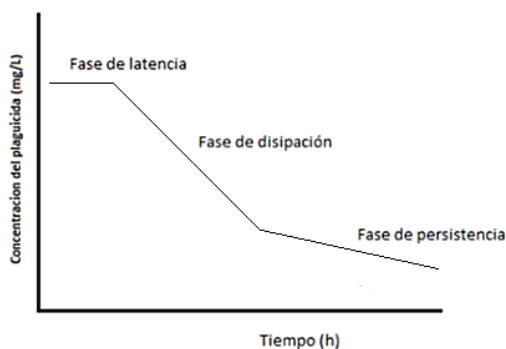
Es la primera relación que describe la adsorción no ideal, reversible y no se limita a la formación de monocapa. Este modelo empírico tiene una distribución no uniforme de adsorción de calor y presenta afinidad heterogénea sobre la superficie. De acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Ec. 8.} \quad \text{Log}(Cs) = \frac{1}{n_f} \text{Log}(Ce) + \text{Log}(K_f)$$

Donde **Cs** es el cociente entre la masa de adsorbato/masa de adsorbente, **Ce** es la concentración de equilibrio de adsorbato en solución, **K<sub>f</sub>** es un factor de capacidad que se relaciona con la capacidad de adsorción y **n<sub>f</sub>** es indicador de la intensidad con que se produce la adsorción. Por un lado, valores de n<sub>f</sub> mayores a la unidad indican que la adsorción es favorable y, por otro, cuanto más cercano son estos valores a cero, más heterogeneidad presenta el sistema (Chantawong y col., 2003).

### 1.8 Persistencia.

La desaparición o degradación de un plaguicida suele ocurrir en 3 fases (Figura 4). La primera fase es latencia, de corta duración y en la que el plaguicida mantiene una concentración constante; una segunda, relativamente rápida en lo que respecta a su desaparición del suelo, denominada de disipación; y finalmente la tercera, más lenta, conocida como persistencia (dependiendo de su extensión se hablará de horas, días, semanas, meses e incluso años).



**Figura 4.** Cinética de degradación de los plaguicidas en el suelo.

El grado de persistencia que presentan diversos compuestos en el suelo depende de diversos factores, como por ejemplo las características del compuesto (estabilidad,

propiedades físico-químicas, solubilidad) y la naturaleza del suelo (textura, pH, conductividad eléctrica, carbono orgánico total, CIC).

Para caracterizar la persistencia de un compuesto en la matriz donde se encuentra, se realiza la determinación del tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ), que es el tiempo necesario para la disipación de la mitad de la cantidad del compuesto inicialmente presente en la matriz. El tiempo de vida media se puede calcular mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Ec. 9.} \quad t_{1/2} = \frac{(\text{Ln } 2)}{k}$$

Donde  $k$  es la constante de desaparición, la cual puede ser calculada mediante la ecuación de regresión lineal de  $\text{Ln } C_e$  frente al tiempo de incubación.

$$\text{Ec. 10.} \quad \text{Ln } (C_e) = \text{Ln } (C_o) - kt$$

El tiempo que pueda permanecer un compuesto en el suelo es dependiente de diversos factores, entre ellos el contenido de materia orgánica, la porosidad, la capacidad de intercambio iónico del suelo, éstas influyen en la movilidad y transferencia entre compartimientos ambientales.

Otras constantes que ayudan a predecir la persistencia de los compuestos son la constante  $K_{oc}$ , un valor alto indica una alta adsorción y potencial acumulación; también la constante de partición octanol/agua puede influenciar la persistencia de los compuestos, ya que es una propiedad fisicoquímica relacionada con la afinidad lipídica de los compuestos, altos valores de  $\log K_{ow}$  indican alta afinidad por la fracción lipídica, lo que facilita su transporte a través de las membranas biológicas y por lo tanto provoca un alto potencial de bioacumulación, ya que puede tener un papel fundamental en la tasa de penetración y la dinámica del sistema fisiológico (Narváez y col., 2012).



### 1.9 Lixiviación.

La lixiviación puede ser definida como el proceso por el cual el agua, procedente de lluvia o de riego, arrastra o disuelve moléculas de los diversos compuestos presentes en el suelo dando lugar a un movimiento vertical a través del perfil del suelo, lo cual incide en la efectividad al aplicar el plaguicida y en la contaminación de aguas subterráneas (Bowman, 1989).

Este comportamiento está ligado a la estructura del suelo y a características propias del plaguicida, siendo las más relevantes, la solubilidad en agua y la constante de distribución ( $K_d$ ). La posible lixiviación de los plaguicidas puede ser determinada mediante el índice de GUS (*Groundwater Ubiquity Score*), que es un indicador de contaminación potencial basado en una aproximación empírica.

$$GUS = (4 - \log K_{oc}) (\log t_{1/2})$$

Ec. 11.

Este índice permite clasificar a los plaguicidas en lixiviables ( $GUS > 2,8$ ), no lixiviables ( $GUS < 1,8$ ) y de transición ( $1,8 < GUS < 2,8$ ) (Garrido y col., 1998).

Las principales características del compuesto que van a influir en el fenómeno de lixiviación a través del perfil del suelo son aquellas que determinan el grado de retención del compuesto por los coloides del suelo, solubilidad en agua, presión de vapor y carácter hidrofóbico (Weber y col., 1980).

### 1.10 Biodisponibilidad.

Según la norma ISO 11074 se define como el grado en el cual los compuestos químicos presentes en el suelo, pueden ser adsorbidos o metabolizados por diversos receptores, o quedan disponibles para interactuar con sistemas biológicos (Brack y col., 2009).

La biodisponibilidad se utiliza a menudo como un indicador clave del riesgo parcial que las sustancias químicas representan para el medio ambiente y la salud humana. En términos de evaluación del riesgo ambiental, la biodisponibilidad de los contaminantes tiene un impacto significativo en una amplia variedad de receptores ecológicos incluyendo bacterias, hongos, algas, invertebrados terrestres, vertebrados y humanos (Juhasz y col., 2000).

En cuanto a la biodisponibilidad en términos de absorción de la planta, se dice que un compuesto químico está biodisponible si está presente o si puede moverse a las raíces de la planta en una escala de tiempo que sea relevante para el crecimiento y desarrollo de la planta, o si una vez absorbida por la raíz, afecta el ciclo de vida de la planta (Sposito, 2008).

En términos de biodegradación, la medida en que un contaminante está disponible para la conversión biológica se ve afectado por las propiedades fisicoquímicas del contaminante y los factores ambientales (Juhasz y col., 2000).

Los procesos de adsorción/desorción de compuestos en los suelos y su persistencia determinan la biodisponibilidad y su posterior degradación, es así como las sustancias adsorbidas deben desorberse hacia la solución del suelo para poder estar biodisponibles para las plantas y microorganismos del suelo.

La biodisponibilidad se puede estimar utilizando bioensayos, los cuales requieren una respuesta tóxica, ya sea, mediante la inhibición de una función metabólica, cambios en la estructura de la población microbiana, por mortalidad o malformaciones o por la acumulación de especies químicas en los órganos o en el torrente sanguíneo.

Las pruebas de toxicidad o los bioensayos se utilizan para realizar determinaciones específicas del sitio de la toxicidad de un medio contaminado, e indirectamente la biodisponibilidad del contaminante. Estas pruebas se pueden usar para mostrar que la

fracción del contaminante que está biodisponible se encuentra dentro de un nivel de impacto aceptable o tolerable. Por lo general, las pruebas de toxicidad se realizan para proporcionar información cualitativa complementaria en cuanto a la biodisponibilidad de contaminantes (Alexander, 2000).

### **1.11 Lipofilia.**

Una etapa básica para entender las propiedades alelopáticas de los aleloquímicos naturales es evaluar sus propiedades fitotóxicas. La fitotoxicidad en plantas puede tener algunos de los siguientes efectos:

- Toxicidad en el desarrollo de la radícula de monocotiledóneas.
- Efecto inhibitorio en el metabolismo de la energía en cloroplastos y mitocondrias.
- Alteraciones en la afinidad del compuesto con el sitio receptor de membranas.

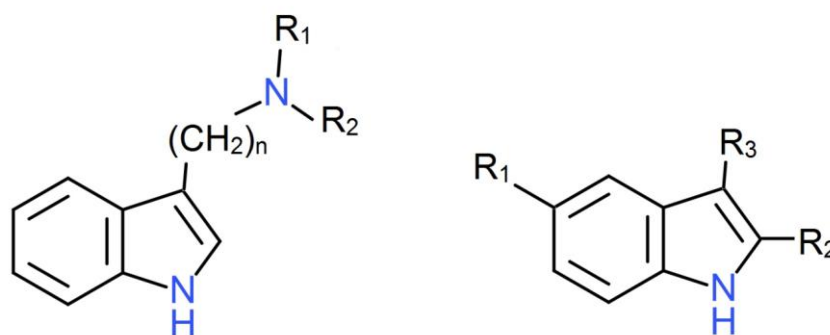
Parámetros fisicoquímicos como la estabilidad química, lipofilia, interacciones ácido-base o nucleófilo - electófilo pueden estar involucrados en el mecanismo de acción molecular o la dinámica del aleloquímico en el ecosistema. La lipofilia molecular es un parámetro esencial para establecer relaciones cuantitativas estructura - actividad fitotóxica. El balance hidrofilia – lipofilia puede tener un rol fundamental en la penetración del aleloquímico a las semillas y la dinámica en el sistema fisiológico (Finizio y col., 1997; Hansch y col., 1964; Leo y col., 1971).

El coeficiente de partición n-octanol/agua ( $K_{ow}$ ), determinado por el método tradicional de agitación es el parámetro que se informa con más frecuencia como una medida de la lipofilia de los productos químicos, aunque con frecuencia datos de  $K_{ow}$  insuficiente es un problema en estudios de relación estructura – actividad.

Numerosos autores demuestran que los Kow se correlacionan con el factor de capacidad ( $K'$ ) medido por HPLC cuando se utiliza como fase estacionaria una columna C<sub>18</sub>, la correlación permite derivar una expresión a partir de la cual se pueden obtener valores de lipofilia molecular ( $\log P_{\text{HPLC}}$ ) más precisos y con mayor facilidad (Guo y col., 2002; Han y col., 2011; Hollósy y col., 2002).

### 1.12 Alcaloides indólicos.

Alcaloides indólicos simples, como Gramina, triptamina y derivados sustituidos en el anillo aromático (Figura 5) están presentes en distintas especies de gramíneas, leguminosas y otras familias. Ellos causan efectos deletéreos en mamíferos, insectos, hongos y bacterias (Ishikawa y col., 2000; Pastuszewska y col., 2001). También se han descrito propiedades fitotóxicas de estos compuestos en cereales y malezas competitivas (Bravo y col., 2001; Baghestani y col., 1999; Hagin, 1989; Matsuo y col., 2001; Overland, 1966). Gramina el principal alcaloide indólico presente en cebada muestra la mayor fitotoxicidad.



**GRAMINA:** R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=CH<sub>3</sub>, n = 1  
**TRIPTAMINA:** R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=H; n = 2

**INDOLES**  
 R<sub>1</sub>= COOH, CHO  
 R<sub>2</sub>= COOH  
 R<sub>3</sub>= COOH, CHO, CH<sub>2</sub>-COOH  
 R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> = H

**Figura 5.** Estructuras de alcaloides indólicos presentes en cereales e índoles sustituidos en el anillo aromático y anillo heterocíclico.

Cuando un aleloquímico es liberado al suelo, puede ser degradado por efectos bióticos como abióticos, por lo que su acumulación y concentración puede cambiar rápidamente. Por esto, la evaluación de la actividad fitotóxica en condiciones controladas de laboratorio es a menudo cuestionada como evidencia para explicar los fenómenos alelopáticos. La necesidad de entender aspectos como la estabilidad química, persistencia y biodisponibilidad son esenciales para racionalizar estos fenómenos.

El efecto de la rizosfera en la dinámica de los alcaloides indólicos naturales no es conocido. Sin embargo, es razonable esperar que la transformación de estos compuestos genere residuos indólicos sustituidos en el anillo aromático y anillo heterocíclico (Figura 5) como estructuras más cercanas a los alcaloides originales.

La actividad fitotóxica de una serie de índoles sustituidos en la posición 5 del anillo aromático con grupos electro dadores y electro aceptores ha sido recientemente estudiada en condiciones controladas de laboratorio. Las diferencias significativas de fitotoxicidad observadas fueron racionalizadas en términos de efecto electrónico y el carácter lipofílico de los compuestos (Bravo y col., 2018).

Cálculos derivados de la teoría del orbital molecular (HOMO – LUMO) sugieren que el mecanismo molecular estaría asociado al efecto electrónico del sustituyente en la polarización del enlace N-H del anillo heterocíclico (Bravo y col., 2016).

### **1.13 Hipótesis.**

La fitotoxicidad, dinámica en un suelo y biodisponibilidad de alcaloides indólicos y sus derivados, determinarían el efecto alelopático que presentan algunas plantas que liberan estos compuestos.

#### 1.14 **Objetivo general.**

Evaluar la actividad fitotóxica de compuestos indólicos con diferente estructura y estudiar su comportamiento (adsorción – desorción; persistencia; biodisponibilidad y lixiviación) en un suelo agrícola representativo.

#### 1.15 **Objetivos específicos.**

El alcaloide natural Gramina, los derivados indolina, indol y una serie modelo de indoles sustituidos en la posición 5 del anillo aromático y las posiciones 2 y 3 del anillo heterocíclico serán utilizados para:

- Evaluar la actividad fitotóxica, a partir de la actividad anti alga con el uso de la micro alga *Chlorella vulgaris*; bioensayos de germinación y desarrollo, utilizando semillas de cereales y una maleza, en una matriz estéril (algodón) y en un suelo agrícola (Alhué).
- Determinar el parámetro lipofilia molecular a partir de un método HPLC ( $\log P_{\text{HPLC}}$ ) alternativo al método tradicional Octanol-Agua ( $K_{ow}$ ).
- Evaluar los procesos de adsorción – desorción, persistencia y lixiviación de los compuestos indólicos en un suelo agrícola.
- Analizar los resultados a partir de la fitotoxicidad, la agro dinámica y su relación con el efecto alelopático de los alcaloides indólicos naturales.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Preparación de soluciones de compuestos en estudio.

Se utilizó soluciones de Indolina (Aldrich, 99%), Ácido indol 2 - carboxílico (Aldrich, 98%), Ácido indol 3 - carboxílico (Aldrich, 99%), Ácido indol 5 - carboxílico (Merck, 98%), Indol 3 - carbaldehído (Aldrich, 97%), Indol 5 - carbaldehído (Aldrich, 98%), Ácido indol 3 – acético (Merck, 98%) de concentración  $250 \text{ mgL}^{-1}$  y  $100 \text{ mgL}^{-1}$  en agua desionizada grado Mili-Q. algunas propiedades fisicoquímicas de estos compuestos se presentan en la siguiente tabla.

**Tabla 1.** Propiedades fisicoquímicas de los alcaloides indólicos en estudio.

Compuesto	P. vapor mmHg	Densidad g/cm <sup>3</sup>	Solubilidad g/L	Acidez pKa
Indolina	3.19 E-2	1.063	5.00	5.2
Ac. Indol 2- Carboxílico	4.29 E-7	1.408	1.78	3.6
Indol 3- carbaldehído	4.32 E-4	1.340	2.46	13.54
Ac. Indol 3- Carboxílico	1.21 E-5	1.410	2.42	3.5
Ac. Indol 3-acético	4.10 E-7	1.340	1.38	4.6
Indol 5- carbaldehído	8.75 E-5	1.300	1.47	-
Ac. Indol 5- Carboxílico	1.32 E-6	1.410	1.03	4.4

### 2.2 Suelo Agrícola.

En este trabajo se utilizará suelo Alhué, debido a que es un suelo agrícola chileno, proveniente de la VI región del General Libertador Bernardo O'Higgins. 16 Km. al norte de Las Cabras, Provincia del Cachapoal, pertenece a la Serie ALHUÉ y se extiende desde la provincia de Santiago hasta O'Higgins. Este suelo ha sido caracterizado previamente en el laboratorio de Química Orgánica y Ambiental de la Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, considerando parámetros fisicoquímicos como: textura,

pH, conductividad eléctrica, carbono orgánico total y capacidad de intercambio catiónico (CIC).

**Tabla 2.** Características fisicoquímicas del suelo Alhué.

Características	Suelo ALHUÉ
pH	6,90 ± 0,01
CE (dS m <sup>-1</sup> )	0,17 ± 0,01
MO (%)	3,47 ± 0,08
CO total (%)	6,80 ± 0,18
CIC (cmol(+) Kg <sup>-1</sup> )	6,27 ± 0,43
Textura	Franco arenoso
Arena (%)	60,2
Limo (%)	29,2
Arcilla (%)	10,6

El suelo Alhué posee un pH “neutro” (Rioja, 2002) la conductividad eléctrica lo clasifica como un suelo “no salino”, lo que indica que es apto para cualquier cultivo (Pérez, 2014; Rioja, 2002), el contenido de materia orgánica (Carbono orgánico fácilmente oxidable) es considerado “muy bajo” (Pérez, 2014) y la CIC posee clase “baja”, lo que coincide con la baja cantidad de arcilla que posee el suelo. Según el estudio Agrológico para la VI Región (CIREN, 2002), el tipo de arcilla predominante en suelo Alhué es Haloisita.

### 2.3 Actividad fitotóxica de los compuestos.

#### 2.3.1 Prueba Antialga.

Los compuestos se disolvieron en medios nutritivos con la ayuda de un equipo de ultrasonido (Branson, modelo 2510) y calentamiento suave. Se preparó diluciones seriadas *in vitro* en un rango de concentración de 25 -250 µg mL<sup>-1</sup>. El alga *C. vulgaris* se cultivó en medio nutritivo (Mueller- Hinton, Merck). Las muestras se incubaron en la cámara de flujo laminar (LabTech, modelo LCB-901V) a 25°C durante 10 días en tubos



de ensayo con  $4.0 \times 10^4$  unidades de formación de colonias (UFC) con continua luz fluorescente blanca fría.

El crecimiento de *C. Vulgaris* se evaluó por medida de la turbidez mediante espectrofotometría a 550 nm. (Shimadzu, modelo UV-1700) Se calculó el porcentaje de inhibición, por medio de la siguiente ecuación.

$$\% I = 100 \frac{(T_s - T_c)}{(100 - T_c)}$$

Ec. 12.

Donde **Ts** es la transmitancia de la muestra y **Tc** es la transmitancia de control.



**Figura 6.** Muestra de bioensayo test antialga.

### 2.3.2 Bioensayos de germinación.

La fitotoxicidad de los compuestos implicados en efectos alelopáticos depende de la especie, dosis y destino. Por esta razón, se evaluó la actividad fitotóxica en la germinación de semilla de cereales (Avena - *Avena sativa*, Trigo - *Triticum aestivum*, Cebada - *Hordeum vulgare*, Maíz - *Zea mays*,) y una maleza (Ballica - *Lolium multiflorum*). Este bioensayo se realizó en una matriz estéril y en suelo.

Para la determinación en matriz estéril, las semillas (Tabla 3) se colocaron uniformemente en placas Petri cubierto con algodón (cinco placas Petri para cada ensayo) y se irrigan una sola vez con 10 mL de la solución preparada concentración  $250 \text{ mgL}^{-1}$  o  $100 \text{ mgL}^{-1}$ . Cinco placas controles fueron irrigadas con 10 mL de agua desionizada grado Mili-Q. Las placas petri se ubicaron en una cámara de cultivo

(Legrandtherm, modelo VISI COOLER LG-250) a  $25 \pm 2$  °C, humedad relativa 50-65% con fotoperiodo de luz oscuridad 10:14 h por seis días.

Para los ensayos en suelo, se masó  $20 \pm 0.1$  g de suelo Alhué en placas petri (cinco placas petri para cada ensayo y cinco placas petri de control), estas se irrigaron con 10 mL de la solución concentración  $250 \text{ mgL}^{-1}$  o  $100 \text{ mgL}^{-1}$  y el control con 10 mL de Agua desionizada grado Mili-Q., se procedió a colocar uniformemente las semillas y luego se cubren con  $5 \pm 0.1$  g de suelo Alhué. Finalmente, se rocía con 2,5 mL de agua desionizada grado Mili-Q. y se ubican las placas petri en una cámara de cultivo por seis días, en las mismas condiciones del bioensayo en matriz estéril.



**Figura 7.** Esquema bioensayo de germinación en suelo.

Al finalizar el tiempo del bioensayo se determinó el número de semillas germinadas y la biomasa de la radícula de estas, los porcentajes de inhibición se obtiene respecto a los controles.

$$\%I = \frac{S_{control} - S_{ensayo}}{S_{control}} * 100$$

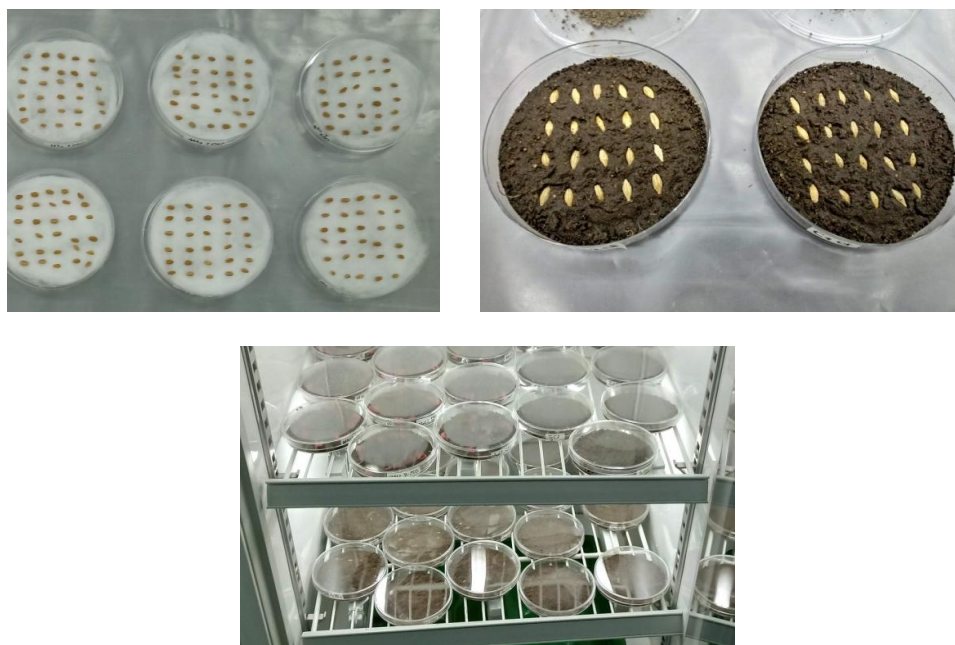
Ec. 13.

Donde %I, es el porcentaje de inhibición y **S**, es el número de semillas germinadas, o la biomasa de las plántulas.

**Tabla 3.** Semillas usadas para bioensayo por placa petri.

SEMILLA	CANTIDAD
Ballica ( <i>Lolium multiflorum</i> )	30
Avena ( <i>Avena sativa</i> )	20
Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> )	30
Cebada ( <i>Hordeum vulgare</i> )	20
Maíz ( <i>Zea mays</i> )	15

El número de semillas varía en cada especie, dependiendo del tamaño de cada semilla.



**Figura 8.** Muestra de semillas colocadas en placa petri y en la cámara de cultivo.



**Figura 9.** Muestra de corte de plántulas, para la determinación de la biomasa.

#### 2.4 Determinación del tiempo de equilibrio.

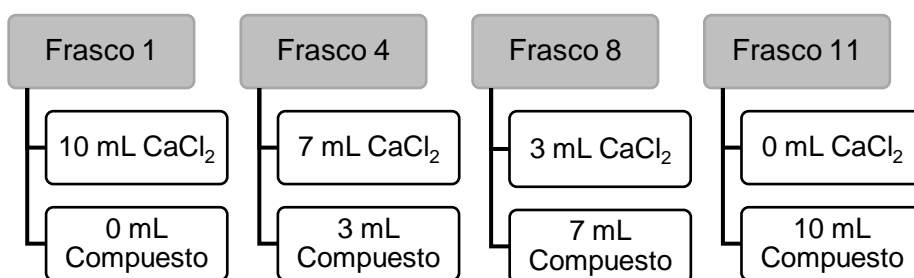
Se masó  $1 \pm 0,0001$  g en balanza analítica (Shimadzu modelo AUX 220) del suelo Alhué en frascos de polietileno, se les adicionó 10 mL de solución de uno de los compuestos y se agitó a 100 rpm con un agitador orbital (Already Enterprise Inc. Modelo DSR- 2800A) a diferentes tiempos (3, 6, 12, 24, 48 y 72 horas). Cada ensayo se realizó por duplicado por cada compuesto. Luego de la agitación, se traspasó todo el contenido del frasco a tubos de centrifuga de 15 mL, los cuales se centrifugaron (centrifuga Boeco Germany modelo U-320) a 3500 rpm por 30 min. El sobrenadante se filtró con filtros PVDF de  $0,22 \mu\text{m}$  de poro y se guardó refrigerado para su posterior análisis por HPLC.



**Figura 10.** Esquema determinación tiempo de equilibrio.

#### 2.5 Adsorción – Desorción.

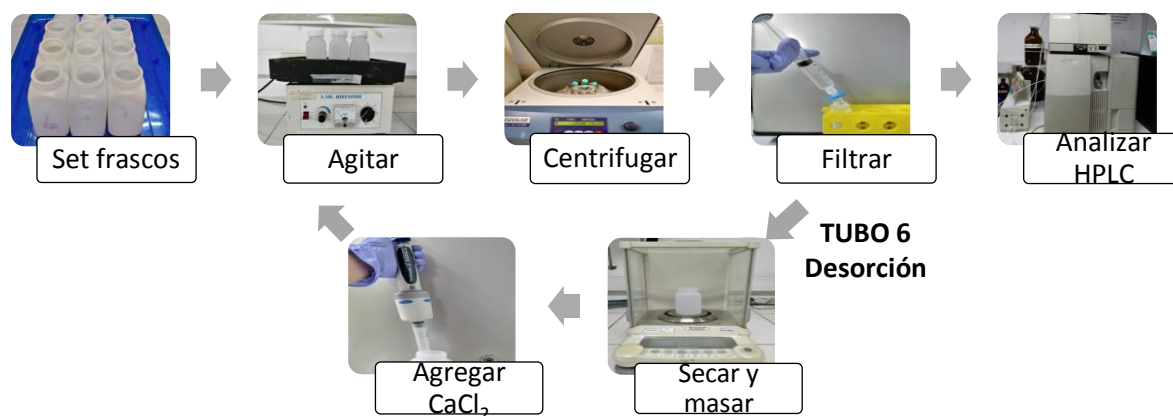
Para el estudio de la Adsorción, se preparó un set de 11 frascos de polietileno, por cada compuesto y se le adiciono  $1 \pm 0,0001$  g del suelo Alhué, estos fueron irrigados gradualmente con solución de  $\text{CaCl}_2$  0,01M (Merck, 99%) y los compuestos en estudio de la siguiente manera:



**Figura 11.** Esquema set de frascos para estudio de adsorción.

Se agitó a 100 rpm con un agitador orbital, el tiempo de equilibrio determinado con anterioridad. Luego de la agitación, se traspasó todo el sobrenadante a tubos de centrifuga de 15 mL, los cuales se centrifugaron a 3500 rpm por 30 min. Transcurrido el tiempo, el sobrenadante se filtra con filtros PVDF de 0,22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro y se guarda refrigerado para su posterior análisis por HPLC.

La desorción se realizó después de la adsorción, en donde el suelo residual del estudio de la adsorción, se seca a temperatura ambiente en los tubos de centrifuga durante un día, luego se masa y se traspasa cuantitativamente a los frascos de polietileno, en donde se agrega 6 mL de Cloruro de Calcio 0,01M, se agitó durante una hora y posteriormente se centrifuga durante 30 min a 3500 RPM, se filtra el sobrenadante con una membrana de PDVF de 0,22  $\mu\text{m}$  de poro y se guarda refrigerado para su análisis.

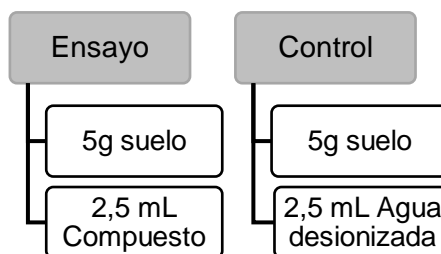


**Figura 12.** Esquema estudio de adsorción y desorción.

## 2.6 Persistencia.

El estudio de la persistencia consiste en determinar la concentración del compuesto en función del tiempo transcurrido. Los tiempos de persistencia estudiados son: 0 - 3 - 6 y 18 horas - 1 - 2 - 3 - 7 - 15 - 21 - 28 - 35 - 48 - 56 y 64 días, en duplicado y control por cada tiempo.

Para la incubación del suelo con los compuestos, se prepararon vasos plásticos, se masaron 5 g de suelo Alhué y se les adicionó 2,5 mL de cada solución de compuesto preparada de 250 mgL<sup>-1</sup> y a los controles 2,5 mL de agua desionizada grado Mili-Q., realizado por duplicado. Estas muestras permanecieron durante los respectivos tiempos en la cámara de cultivo, a condiciones de temperatura y humedad constantes.



**Figura 13.** Esquema preparación para estudio de persistencia.

Las extracciones se realizaron según los tiempos indicados, en donde el suelo se extrae cuantitativamente de los vasos hacia frascos cuadrados, utilizando 10 mL de agua/acetonitrilo (50/50). Los frascos se agitaron en agitador orbital a 100 rpm durante una hora, posteriormente se vierte todo el contenido a tubos de centrifuga de 15 mL, se centrifugan a 3500 rpm por 15 min y finalmente se extrajo el sobrenadante con una jeringa de 5 mL y se traspasa a un tubo de centrifuga nuevo de 15 mL utilizando un filtro de PDVF 0,22 µm. Los tubos fueron guardados para su análisis.



**Figura 14.** Esquema estudio de persistencia.

## 2.7 Lixiviación.

El estudio de la lixiviación de los compuestos en el suelo se realizó a partir de tubos de PVC de 3 cm de diámetro y 20 cm de longitud, los cuales fueron rellenos con 100 g de suelo Alhué, estos se ubicaron en soportes universales y en la parte superior de cada columna, se dispuso un embudo de decantación con 400 mL de solución a una concentración de  $100 \text{ mgL}^{-1}$  para cada compuesto, se mantuvo un flujo constante y los lixiviados de cada columna fueron recogidos en matraces de aforo de 100 mL para luego ser filtrados con filtros PVDF  $0.22 \mu\text{m}$  y posteriormente ser analizados por HPLC. Al finalizar la recolección de lixiviado, se realizaron 4 cortes en las columnas de PVC, cada 5 cm, para extraer el suelo, este fue secado a temperatura ambiente en placas petri, una vez seco el suelo se masó 1 g de cada corte en frascos cuadrados donde se extrajo el compuesto utilizando 10 mL de agua/acetonitrilo. Se agitaron a 100 rpm durante 30 min, se centrifugó a 3500 rpm por 15 min, donde posteriormente se filtró el sobrenadante utilizando un filtro de PDVF  $0,22 \mu\text{m}$ , para su posterior análisis en HPLC.



**Figura 15.** Esquema estudio de lixiviación.



**Figura 16.** Columnas para estudio de lixiviación.



**Figura 17.** Lixiviados de las columnas.

## 2.8 Determinación lipofilia.

Para la determinación de la lipofilia, se realizó un método HPLC alternativo al método tradicional octanol – agua ( $K_{ow}$ ). Se determinó el factor de capacidad ( $K'$ ) mediante el método RP-HPLC, ya que frecuentemente se encuentra una buena correlación entre los valores de  $K'$  y  $K_{ow}$  de los compuestos orgánicos.

Los análisis de RP-HPLC se realizan en columnas  $C_{18}$  con fase móvil agua (pH= 3,0 ácido fosfórico) / acetonitrilo 40:60 v/v.



El factor de capacidad para los compuestos de este estudio se determinó a partir de la siguiente ecuación:

$$k' = \frac{(t_R - t_M)}{t_M}$$

Ec. 14.

Donde  $t_R$  es el tiempo de retención del compuesto y  $t_M$  es el tiempo de retención del compuesto no retenido, correspondiente a Tiourea.

La correlación entre los valores de  $K'$  obtenidos y valores de  $K_{ow}$  informados para algunos de los compuestos permite derivar una expresión para obtener valores de  $\log P_{HPLC}$  de los compuestos utilizados.

## 2.9 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

La cromatografía es una técnica de separación en la que los componentes de una muestra se distribuyen entre dos fases de diferente naturaleza, como consecuencia de la variación de velocidad que se establece al ser arrastrados por una fase móvil, líquida o gaseosa, a través de una fase estacionaria, sólida o líquida. La identificación por tiempo de retención ( $t_R$ ) no es segura en un 100%, por lo tanto, para obtener mayor seguridad es necesario comparar no solo los  $t_R$  de un estándar con la muestra sino también sus espectros UV, usando un detector de arreglo de diodos.

La cromatografía es actualmente el principal método utilizado para la identificación cualitativa y determinación cuantitativa de especies, las razones son la sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, es ideal para la separación de especies no volátiles o termolábiles y por su gran aplicabilidad a sustancias que son de interés en la industria. Uno de los tantos usos que se le da a la cromatografía es el estudio e identificación de pesticidas en matrices ambientales, como por ejemplo en suelos.

Para la determinación de los compuestos se usará la cromatografía líquida de alta resolución con las siguientes condiciones

- Fase móvil: acetonitrilo / agua ácida.
- Volumen de inyección: 20  $\mu\text{L}$ .
- Flujo Fase móvil: 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .
- Columna: Atlantis C<sub>18</sub> 5,0  $\mu\text{m}$  (Waters).
- Detector: Arreglo de Fotodiodo, PDA (Waters 2996).
- Bomba: Binaria (Waters 1525).
- Desgasificador: Waters in- Line Degasser AF.

#### **2.10 Validación del método analítico.**

A través de determinadas propiedades de estadística, se verificó que el método usado para la determinación de compuestos indólicos, es adecuado. En este caso se realizó una validación prospectiva, donde los datos se obtienen a través de análisis experimentales en el laboratorio (Sandoval, 2010), por lo que las propiedades analíticas a evaluar experimentalmente son:

##### **2.10.1 Rango lineal.**

Se determinó el rango lineal a través de blancos y patrones de trabajo con valor teórico conocido. Se prepararon soluciones que van en un rango de concentraciones de 2.5  $\text{mgL}^{-1}$  – 250  $\text{mgL}^{-1}$  de las soluciones de compuestos estándar. Se determinó la función de calibración que describe la respuesta del instrumento frente a la concentración de los compuestos utilizando como modelo una regresión lineal.

$$y = a + bx$$

Ec. 15.

### 2.10.2 Sensibilidad.

La sensibilidad corresponde al cociente entre la variación en la respuesta y la variación en la concentración, es asociada al valor de la pendiente en una curva de regresión lineal.

### 2.10.3 Precisión

La precisión establece el grado de concordancia entre los distintos resultados de un ensayo a partir de una muestra homogénea, obtenidos en condiciones establecidas, depende solo de la distribución de los errores aleatorios.

Para su determinación, se realizaron tres repeticiones de las inyecciones de concentraciones de 250, 100 y 2,5 mgL<sup>-1</sup> en diferentes días, para ver la dispersión de los datos, se calculó promedio, desviación estándar y coeficiente de variación.

$$CV\% = \frac{DesvEst\ Ce}{Promedio\ Ce} * 100$$

Ec. 16.

### 2.10.4 Exactitud

Este parámetro expresa la concordancia entre el valor aceptado como verdadero y el valor de referencia, se determinó por recuperación, mediante la preparación de muestras fortificadas de concentración conocida, a partir de estándares comerciales, se analizó el porcentaje de recuperación entre la concentración real y la concentración medida.

La recuperación esperada depende directamente de la concentración del analito en la cual es fortificada una muestra. Los valores aceptados de la AOAC de recuperación según el rango de concentración utilizado se encuentran entre un 80 y 120%.

$$\% Recuperación = \frac{Conc. medida * 100}{Conc. real}$$

Ec. 17.

### 2.10.5 Límite de Detección

El límite de detección es la cantidad mínima de analito en una muestra que se puede examinar y determinar, pero no necesariamente ser cuantificada con un valor exacto, es un término cualitativo.

Se determinó a través de la curva de calibración y la desviación estándar de las áreas de la curva de la zona baja. Usando la siguiente ecuación:

$$LD = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b}$$

Ec. 18.

Donde, **LD** es el límite de detección, **Y<sub>bl</sub>** es el Intercepto de la curva en la zona baja, **S<sub>bl</sub>** es el Intercepto de la curva de desviación estándar de los puntos de la zona baja y **b** es la pendiente de la curva.

### 2.10.6 Límite de cuantificación

El límite de cuantificación corresponde a la concentración mínima de analito presente en una muestra que se puede determinar bajo las condiciones experimentales descritas en el método y con un nivel aceptable de precisión y exactitud.

Se determinó a través de la curva de calibración y la desviación estándar de las áreas de la curva de la zona baja ocupando la siguiente ecuación:

$$LC = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{b}$$

Ec. 19.

**LC** es el Límite de cuantificación, **Y<sub>bl</sub>** es el intercepto de la curva en la zona baja, **S<sub>bl</sub>** es el intercepto de la curva de desviación estándar de los puntos de la zona baja y **b** es la pendiente de la curva.

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Validación del método analítico.

Con el fin de verificar que el método usado para la determinación de los compuestos indólicos, Cromatografía Líquida de alta Resolución (HPLC) es adecuado; asegurando la calidad y confiabilidad de los resultados, se determinaron las figuras de mérito:

**Tabla 4.** Figuras de mérito para cada compuesto.

Compuesto	Pendiente	R <sup>2</sup>	% CV			% rec.	LD mgmL <sup>-1</sup>	LC mgmL <sup>-1</sup>
Gramina	2,4E+06	0,99	1,60	1,55	1,40	105,00	0,061	0,181
Indol	7,6E+05	0,99	0,34	0,20	0,28	102,00	0,009	0,110
Indolina	475,609	0,99	1,32	2,14	2,09	101,73	0,018	0,052
Ac. Indol 2- carboxílico	1,1E+06	0,99	2,42	2,22	2,11	110,47	0,006	0,039
Indol 3- carbaldehído	453,153	0,99	3,32	0,52	2,44	102,00	0,009	0,032
Ac. Indol 3- carboxílico	541,810	0,99	2,15	3,43	2,37	97,33	0,082	0,058
Ac. Indol 3- acético	141,906	0,99	3,10	2,91	4,35	102,73	0,042	0,085
Indol 5- carbaldehído	2,4E+06	0,99	1,77	4,85	3,85	100,40	0,088	0,306
Ac. Indol 5- carboxílico	2,8E+06	0,99	1,41	4,76	4,00	101,47	0,018	0,080

El coeficiente de correlación describe el grado de relación entre la variable x y la respuesta y, si el valor obtenido es cercano a 1 existe relación entre x e y con una elevada probabilidad. El criterio de aceptación de la linealidad está determinado por el coeficiente de determinación R<sup>2</sup>, el cual debe ser mayor a 0,98. En este caso, todos los compuestos analizados cumplen con esta condición, lo que indica que el modelo entrega una respuesta lineal en el rango estudiado.

La sensibilidad se asocia al valor de la pendiente de la curva de calibración de cada compuesto (Tabla 4), donde se encuentra un mayor valor de sensibilidad para el Ácido indol 5-carboxílico.

La precisión establece el grado de concordancia entre los resultados de un ensayo, obtenidos a partir del análisis de muestras estándar de concentración conocida a diferentes intervalos de tiempo, usando las mismas condiciones, el grado de precisión se expresa como imprecisión y se determina como la desviación estándar de los resultados obtenidos. Se observa que los valores para coeficiente de variación son todos menores al 5 % permitido, con esto, se puede considerar que el método utilizado presenta una precisión adecuada.

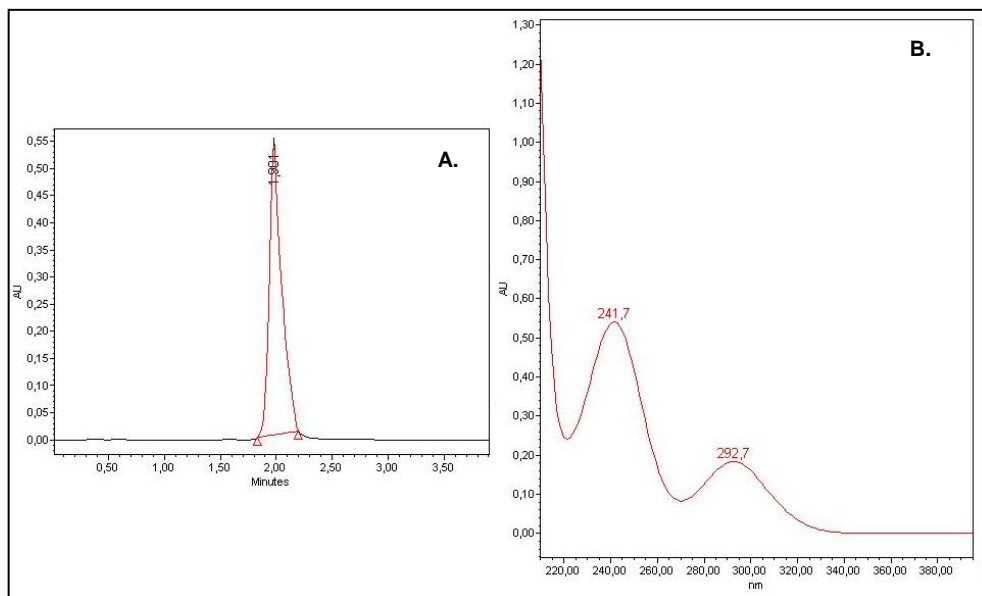
La exactitud expresa la concordancia entre el valor aceptado como verdadero y el valor de referencia, este se determinó mediante la preparación de muestras fortificadas de concentración conocida y se analizó el porcentaje de recuperación entre la concentración real y la concentración medida. En la Tabla 4 se observa que los valores obtenidos fluctúan dentro del rango aceptado para exactitud, entre 80 % y 120 %.

Los límites de detección y cuantificación entregan un valor confiable de concentración mínima de cierto analito, que puede ser detectado y cuantificado por el método utilizado, para esto se utilizaron las curvas de desviación estándar (ANEXO 2), utilizando las ecuaciones básicas de la química analítica obteniendo los valores indicados en la Tabla 4. Por esto, los valores obtenidos en las figuras de mérito sugieren que el método sería adecuado para realizar la cuantificación de los compuestos propuestos en este estudio.

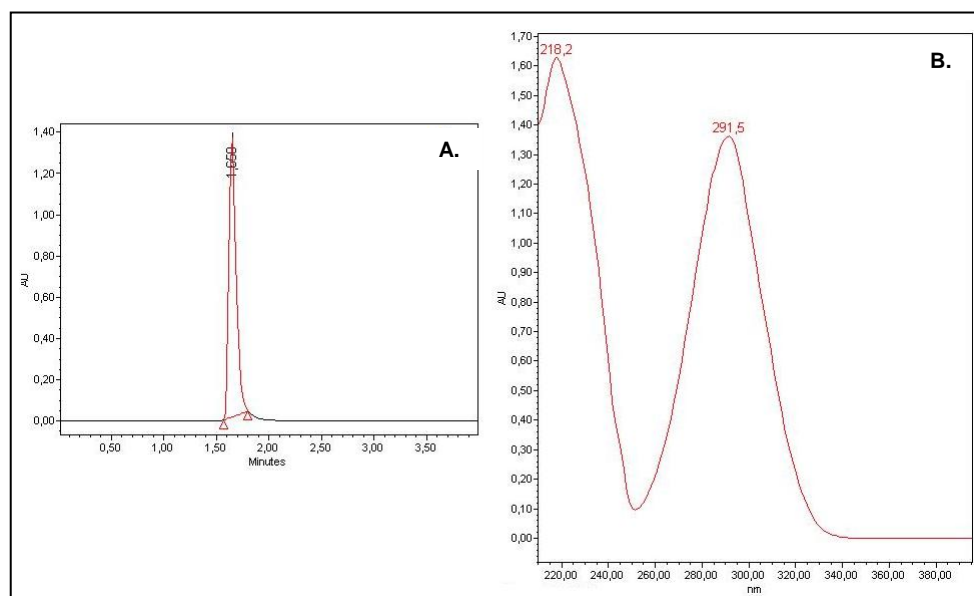
### **3.2 Identificación de los compuestos.**

A continuación, se muestran los cromatogramas y el espectro UV de los compuestos en estudio. Las señales se identificaron por comparación de los tiempos de retención

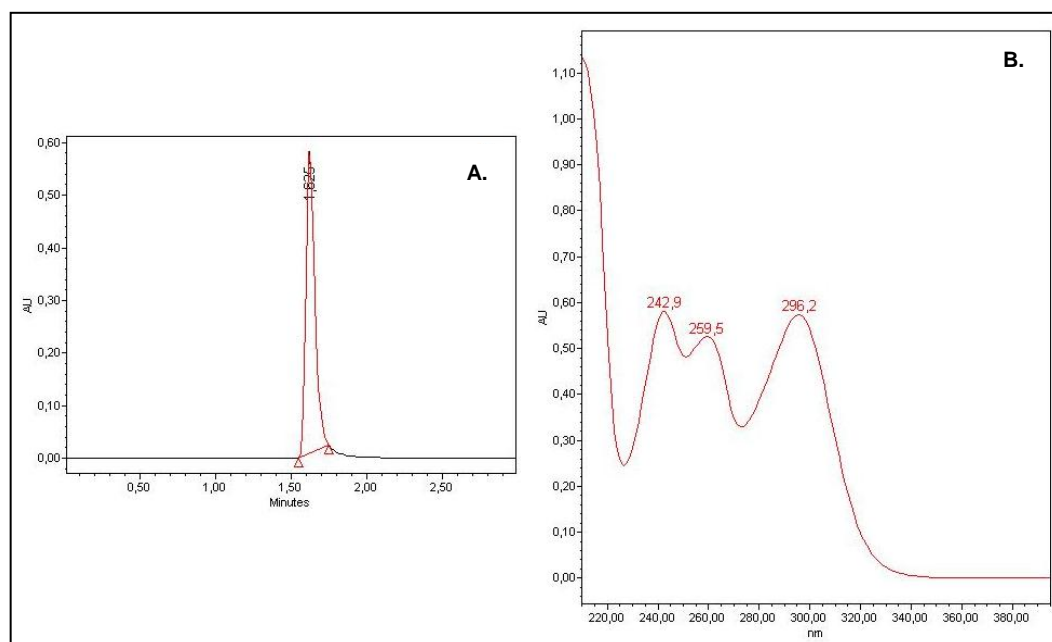
( $t_R$ ) y espectros UV, con las soluciones estándar, las señales cromatográficas de los compuestos, son claras y bien definidas.



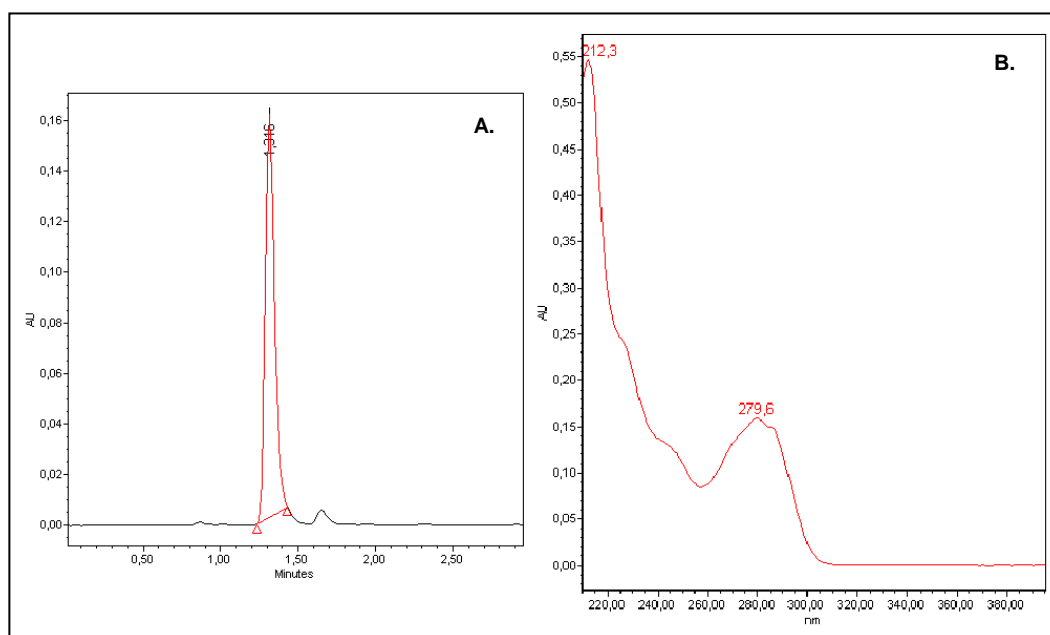
**Figura 18.** Indolina; **A)** Cromatograma estándar. **B)** Espectro UV estándar. (Condiciones:  $\lambda=240$  nm; ACN/Agua ácida = 60/40).



**Figura 19.** Ácido indol 2-carboxílico; **A)** Cromatograma estándar. **B)** Espectro UV estándar. (Condiciones:  $\lambda=290$  nm; ACN/Agua ácida = 60/40).

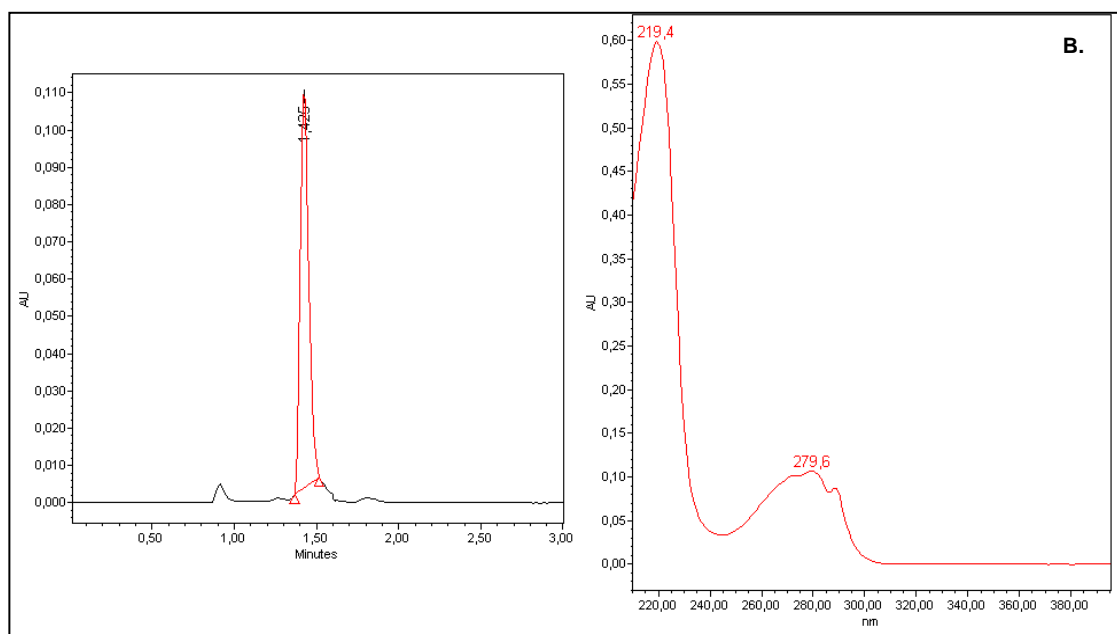


**Figura 20.** Indol 3-carbaldehído; **A)** Cromatograma estándar. **B)** Espectro UV estándar.  
(Condiciones:  $\lambda=296$  nm; ACN/Agua ácida = 60/40).

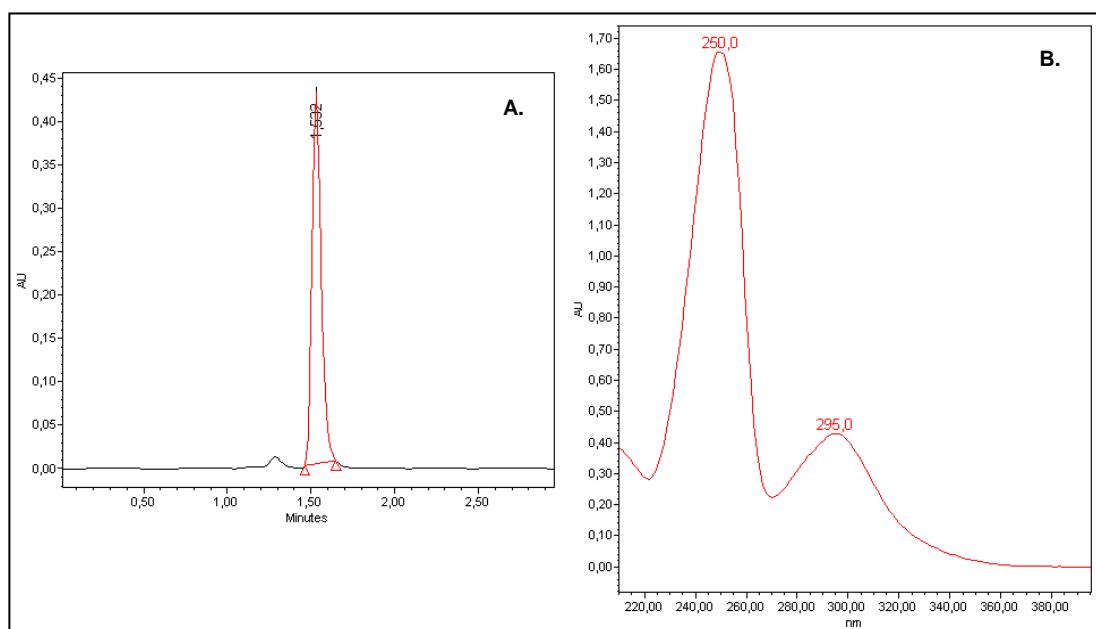


**Figura 21.** Ac. Indol 3-carboxílico; **A)** Cromatograma estándar. **B)** Espectro UV estándar.  
(Condiciones:  $\lambda=280$  nm; ACN/Agua ácida = 60/40).

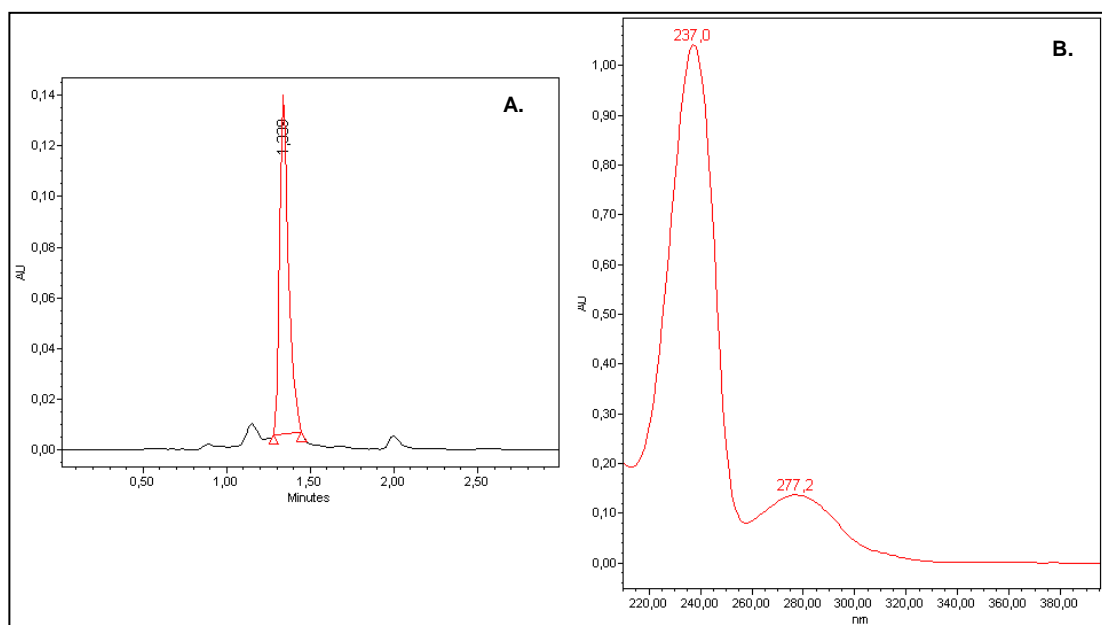




**Figura 22.** Ac. Indol 3-acético; **A)** Cromatograma estándar. **B)** Espectro UV estándar.  
(Condiciones:  $\lambda=280$  nm; ACN/Agua ácida = 60/40).



**Figura 23.** Indol 5-carbaldehído; **A)** Cromatograma estándar. **B)** Espectro UV estándar.  
(Condiciones:  $\lambda=250$  nm; ACN/Agua ácida = 60/40).



**Figura 24.** Ac. Indol 5-carboxílico; **A)** Cromatograma estándar. **B)** Espectro UV estándar. (Condiciones:  $\lambda=240$  nm; ACN/Agua ácida = 60/40).

### 3.3 Actividad fitotóxica de los compuestos.

La fitotoxicidad de un químico depende, entre otros, de la especie, dosis, destino, estructura, estabilidad, propiedades físico-químicas, condiciones medio ambientales. La toxicidad de un herbicida puede tener alguno de los siguientes efectos: Toxicidad en la germinación de semillas y desarrollo de la radícula de monocotiledóneas o dicotiledóneas; efecto inhibitorio en el metabolismo de la energía de cloroplastos y mitocondrias; modificaciones de la afinidad enlazante del sitio receptor en membranas. Por todos estos factores, la evaluación de la actividad fitotóxica de un químico se considera un proceso altamente complejo (Anaya, 2003).

La fitotoxicidad de los compuestos de este estudio fue evaluada a partir de los siguientes bioindicadores: Actividad algucida, toxicidad en la germinación de semillas y desarrollo de plántulas. Además, se evaluó el efecto de la rizosfera de un suelo

agrícola representativo, previamente caracterizado, en la actividad toxica de los compuestos.

### 3.3.1 Prueba antialga.

La actividad alguicida es un bioindicador utilizado frecuentemente para evaluar los potenciales propiedades herbicidas de un químico puesto que, las micro algas presentan un proceso de desarrollo taxonómico similar a una planta superior y son altamente sensibles al efecto de químicos.

En este trabajo se utilizó la microalga verde *C. vulgaris* para evaluar la actividad anti alga. En la Tabla 5 se muestran los porcentajes de actividad antialga respecto del control obtenidos en bioensayos *in vitro* de la serie estudiada (0).

**Tabla 5.** Porcentaje de inhibición del crecimiento de *C. vulgaris*.

COMPUESTO	25 (µg/mL)	50 (µg/mL)	100 (µg/mL)	250 (µg/mL)
Gramina	0,00	7,20	100,00	ND
Indol	10,00	100,00	100,00	ND
Ac. Indol 2-carboxílico	17,23	24,65	22,93	21,03
Indol 3-carbaldehido	35,26	20,01	11,08	16,12
Ac. Indol 3-carboxílico	+0,10	+0,09	+0,06	0,03
Ac. Indol 3-acético	+0,28	+0,28	+0,24	+0,13
Indol 5-carbaldehído	3,02	13,33	16,50	20,52
Ac. Indol 5-carboxílico	0,00	0,00	0,00	ND

ND: No determinado; (+) Efecto estimulante. Valores de Gramina e Indol informados previamente (Bravo y col., 2018).

En el rango de concentración estudiado, el efecto fue variado. Los ácidos indol 3-carboxílico e Indol 3-acético no mostraron actividad antialga, sino una débil actividad estimulante del crecimiento de la microalga respecto al control. Indol fue el compuesto que presentó mayor actividad fitotóxica.

Las fitohormonas como las auxinas, son promotores del crecimiento de las plantas, que se agregan mediante diferentes microorganismos en los sistemas agrícolas (Figueiredo y col., 2010; Gamalero y col., 2011; Muhammad y col., 2013), el ácido indol 3-acético es una reconocida hormona estimulante del crecimiento de plantas por lo tanto la actividad alguicida observada para este compuesto está de acuerdo con esta propiedad y en consecuencia el ácido 3-carboxílico también podría considerarse como hormona del crecimiento de plantas.

Los derivados indol 3-carbaldehído; indol 5-carbaldehído y el ácido Indol 2-carboxílico mostraron una moderada actividad antialga, aunque si se considera la actividad a las concentraciones más bajas ( $25-50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), ellos muestran mayor actividad que el alcaloide natural Gramina.

Parte de la fitotoxicidad de los alcaloides indólicos se ha relacionado con los cambios estructurales de la cadena lateral unida en la posición 3 (Bravo y col., 2010). Así mismo, hay estudios cuyos resultados sugieren fuertemente que el sustituyente en el anillo aromático podría jugar un papel importante en la actividad anti-algal (Bravo y col., 2018) lo que coincide con los resultados obtenidos en el bioensayo antialgal.

### **3.3.2 Bioensayos de germinación de semillas y crecimiento de plántulas.**

Una de las etapas más importantes y críticas en el crecimiento de las plantas es la germinación. El porcentaje de germinación, el poder de germinación, el índice de germinación, la longitud de la plántula y el peso fresco se ven muy afectados por los aleloquímicos dependiendo de su concentración (Maqbool y col., 2013; Muhammad y col., 2013), por esto, se realizaron los bioensayos de germinación de semillas y crecimiento de plántulas con los compuestos en estudio.

Por otra parte, la fitotoxicidad de compuestos involucrados en efectos alelopáticos depende de la dosis y especie objetivo. La selectividad de la serie de compuestos de

este estudio fue evaluada a partir de los bioindicadores: Germinación de semillas y desarrollo de plántulas para lo cual, se utilizaron 4 especies de cereales y una maleza competitiva (ANEXO 4).

En la Tabla 6 se muestra el efecto de una solución acuosa con dos concentraciones diferentes de compuestos en la germinación de las semillas: Trigo (*Triticum durum*), Avena (*Avena sativa*), Cebada (*Hordeum vulgare L.*), Maiz (*Zea mays L.*) y la maleza, Ballica (*Lolium Rigidum L.*).

**Tabla 6.** Porcentaje de inhibición de la germinación de semillas (%) en matriz estéril.

COMPUESTO	Conc. $\mu\text{g mL}^{-1}$	BALLICA <i>Lolium rigidum L.</i>	CEBADA <i>Hordeum vulgare L.</i>	AVENA <i>Avena sativa</i>	TRIGO <i>Triticum durum</i>	MAIZ <i>Zea Mays L.</i>
Gramina	250	18,00	0,00	63,10	23,40	ND
	100	10,00	0,00	52,60	22,90	ND
Indol	250	74,30	80,50	12,60	34,10	31,10
	100	17,30	39,70	0,00	5,00	0,00
Indolina	250	100,00	100,00	85,71	66,67	28,57
	100	3,57	40,00	27,78	25,93	20,00
Ac. Indol 2-carboxílico	250	69,23	7,14	33,33	11,11	15,38
	100	+10,00	0,00	+13,33	0,00	0,00
Indol 3-carbaldehído	250	10,71	28,57	30,77	24,24	7,14
	100	+13,04	0,00	0,00	3,57	+8,33
Ac. Indol 3-carboxílico	250	8,00	0,00	0,00	3,57	0,00
	100	0,00	22,22	+6,25	0,00	12,50
Ac. Indol 3-acético	250	69,23	60,00	56,25	+19,05	+9,09
	100	30,77	+37,50	41,67	7,69	16,67
Indol 5-carbaldehído	250	12,41	0,00	5,03	26,94	13,75
	100	0,00	0,00	0,00	0,00	ND
Ac. Indol 5-carboxílico	250	11,54	15,71	5,00	14,29	6,67
	100	0,00	5,33	0,00	0,00	0,00

ND: No determinado; (+) Efecto estimulante. Cada valor corresponde a la media de cinco muestras, con una desviación estándar menor a 5% en todos los casos.

El bioindicador inhibición de la germinación (% I) mostró diversos valores para las diferentes especies respecto al alcaloide natural, Gramina y la estructura indólica no sustituida, el Indol.

El uso de una matriz estéril y condiciones controladas de concentración, luz y tiempo permitió analizar la selectividad de los compuestos en la germinación, en relación con su estructura molecular.

En general, las semillas de la maleza Ballica, caracterizadas como semillas pequeñas, fueron las más sensibles al efecto fitotóxico y las semillas de maíz, caracterizadas como semillas grandes, fueron las menos sensibles al efecto de los compuestos. El nivel de selectividad de los compuestos fue variado y dependiente de la dosis utilizada. En algunos casos se observó efectos fitotóxicos o estimulantes en la germinación de semillas según la concentración de la solución, como fue el caso del ácido Indol 2-carboxílico inhibió la germinación de las semillas de Ballica y Avena a la concentración más alta ( $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y estimuló la germinación a la concentración más baja ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) respecto al control. El indol 3-carbaldehído inhibió la germinación de Ballica y Maíz a la concentración más alta y estimulo la germinación a la concentración más baja.

El ácido indol 3-acético inhibió la germinación de las semillas de cebada a la concentración más alta y estimuló la germinación a la concentración más baja; un efecto inverso de este compuesto se observó en la germinación de semillas de trigo. El ácido indol 3-carboxílico estimuló la germinación de semillas de avena a la concentración más baja. Por otra parte, Indol y el ácido indol 3-acético fueron los compuestos que presentaron una mayor inhibición en la germinación de semillas de la maleza Ballica. Estos resultados son relevantes desde el punto de vista del fenómeno alelopático, puesto que, estos compuestos podrían surgir de la descomposición de los

alcaloides indólicos naturales presentes en cereales como la cebada o de otras fuentes naturales en el ecosistema.

Los compuestos con sustituyentes en la posición 5 del anillo aromático, Indol 5-carbaldehído y Ac. Indol 5-carboxílico, mostraron los valores más bajos de inhibición en la germinación de todas las semillas en estudio, a ambas concentraciones.

Otro resultado interesante desde el punto de vista estructural, es la actividad inhibitoria presentada por el compuesto indolina, un derivado del indol con el enlace 2, 3 del anillo heterocíclico saturado, la actividad fue mayor que la del indol, lo que sugiere un rol relevante de la estructura del anillo heterocíclico en la actividad fitotóxica, sin embargo, esto no está del todo claro, puesto que el bioensayo mostró una coloración rojiza, atribuible a una posible descomposición fotoquímica de este compuesto. (Figura 25), lo cual no permitió continuar con los estudios correspondientes utilizando este compuesto.



**Figura 25.** Ensayo de germinación con Indolina y control.

El efecto fitotóxico asociado a la alelopatía a menudo es más pronunciado en el desarrollo de las plantas que en la germinación de las semillas y depende de la dosis y el centro receptor de la planta. Así, el peso de plántulas frescas puede también ser un bioindicador para evaluar la actividad fitotóxica de químicos. En la Tabla 7 se muestran los porcentajes de inhibición del crecimiento de plántulas respecto al control de las soluciones de concentración 250 y 100 ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de aquellas semillas que germinaron.

**Tabla 7.** Porcentaje de inhibición del desarrollo de las plántulas en matriz estéril.

COMPUESTO	Conc. $\mu\text{g mL}^{-1}$	BALLICA <i>Lolium rigidum L.</i>	CEBADA <i>Hordeum vulgare L.</i>	AVENA <i>Avena sativa</i>	TRIGO <i>Triticum durum</i>	MAIZ <i>Zea. Mays L.</i>
Gramina	250	22,00	14,90	10,90	21,60	ND
	100	ND	ND	ND	ND	ND
Indol	250	58,30	87,90	14,00	53,70	32,00
	100	ND	ND	ND	ND	ND
Indolina	250	NG	NG	NG	85,81	31,44
	100	40,68	55,87	34,97	10,05	30,92
Ac. Indol 2- carboxílico	250	99,84	49,47	52,01	47,09	22,98
	100	24,39	40,97	19,20	35,47	11,01
Indol 3- carbaldehído	250	47,63	58,08	60,01	36,16	6,38
	100	35,58	18,17	28,50	23,51	15,65
Ac. Indol 3- carboxílico	250	30,50	15,08	19,44	16,45	9,91
	100	10,85	+10,15	+12,44	+36,82	28,52
Ac. Indol 3- acético	250	59,56	28,71	37,90	5,61	17,48
	100	59,60	17,66	40,91	33,69	23,93
Indol 5- carbaldehído	250	50,00	6,42	22,44	44,26	12,96
	100	ND	ND	ND	ND	ND
Ac. Indol 5- carboxílico	250	47,17	25,36	26,38	16,53	7,41
	100	ND	ND	ND	ND	ND

NG: Semillas no germinadas; ND: No determinado; (+) Efecto estimulante. Cada valor corresponde a la media de cinco muestras, con una desviación estándar menor a 5% en todos los casos.

Como se observa todos los compuestos mostraron efecto inhibitorio del crecimiento de las plántulas a las dos concentraciones, solo el ácido indol 3-carboxílico mostró un efecto estimulante a la concentración más baja de las plántulas de cebada, avena y trigo.

En general, al igual que en la germinación de semillas, la maleza Ballica fue la más sensible y el maíz el menos sensible al efecto fitotóxico de los compuestos. A la concentración más alta la mayoría de los compuestos mostraron mayor actividad



inhibitoria que Gramina, siendo el ácido indol 3-acético el que mostró la mayor actividad inhibitoria en la maleza Ballica a ambas concentraciones.

Un hecho relevante es que los compuestos que mostraron actividad estimulante en la germinación de semillas mostraron efecto inhibitorio en el crecimiento de las plantas respectivas. Por lo tanto, este bioindicador sugiere que el efecto fitotóxico de los compuestos indólicos también se expresa en el crecimiento de las plántulas, lo cual, podría tener importancia en la expresión del fenómeno alelopático.

Estos resultados demuestran que el efecto fitotóxico depende de la especie receptora, la dosis y la posición del sustituyente en el anillo, dicha fitotoxicidad se puede relacionar con la alelopatía de los alcaloides indólicos al estar en contacto con las semillas competitivas en el agroecosistema.

### **3.3.3 Efecto de la matriz suelo en la germinación de semillas y crecimiento de plántulas.**

Como se indicó anteriormente, el suelo puede tener un rol esencial en la actividad fitotóxica de un aleloquímico. Cuando el compuesto es liberado al suelo por una planta donante su primer contacto es con la rizosfera cuyas propiedades bióticas y abióticas pueden ser determinantes en su dinámica para acceder a la especie receptora y ser absorbida por los tejidos biológicos de esta.

El efecto del suelo en la actividad fitotóxica de la serie de compuestos de este estudio fue evaluada a partir de la germinación de semillas y el desarrollo de las plántulas utilizando el suelo Alhué tratado con dos soluciones de concentración (250 y 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) de compuesto, en condiciones controladas de laboratorio. En la Tabla 8 se muestran los porcentajes de inhibición de la germinación de semillas respecto al control.

El efecto del suelo en la actividad inhibitoria fue diverso según la estructura de los compuestos. En general, todos los compuestos indólicos sustituidos en el anillo aromático y heterocíclico presentaron actividad inhibitoria inferior a la observada utilizando la matriz estéril.

**Tabla 8.** Porcentaje de inhibición de la germinación de semillas en suelo.

COMPUESTO	Conc. $\mu\text{g mL}^{-1}$	BALLICA <i>Lolium rigidum L.</i>	CEBADA <i>Hordeum vulgare L.</i>	AVENA <i>Avena sativa</i>	TRIGO <i>Triticum durum</i>	MAIZ <i>Zea Mays L.</i>
Gramina	250	50,00	0,00	46,67	17,39	ND
	100	12,50	0,00	20,00	13,04	ND
Indol	250	71,43	57,14	29,41	11,11	ND
	100	57,14	50,00	11,76	5,356	ND
Ac. Indol 2-carboxílico	250	17,65	6,67	5,56	40,00	46,15
	100	+9,09	6,15	5,56	39,13	33,33
Indol 3-carbaldehído	250	0,00	4,67	0,00	0,00	0,00
	100	+3,7	+13,33	+5,56	+4,00	+7,69
Ac. Indol 3-carboxílico	250	+7,69	9,09	10,53	5,56	+8,33
	100	+13,64	20,00	0,00	0,00	12,50
Ac. Indol 3-acético	250	+12,5	+9,09	0,00	0,00	11,11
	100	+25,00	+17,65	+6,25	+17,65	25,00
Indol 5-carbaldehído	250	+6,25	30,77	11,76	16,00	18,18
	100	+45,45	+42,86	5,56	3,70	+7,69
Ac. Indol 5-carboxílico	250	+20,00	+20,00	11,76	16,00	0,00
	100	+10,00	0,00	23,53	3,70	0,00

ND: No determinado. (+) Efecto estimulante. Cada valor corresponde a la media de cinco muestras, con una desviación estándar menor a 5% en todos los casos.

Un resultado relevante fue también el observado en la germinación de semillas de la maleza Ballica, donde todos los compuestos mostraron un efecto estimulante de la germinación, lo cual, contrasta con lo observado anteriormente en la matriz estéril, donde esta especie fue la más sensible al efecto fitotóxico de todos los compuestos. Por otra parte, el ácido indol 3-acético y el indol 3-carbaldehído también mostraron un

efecto estimulante a la concentración más baja, en todas las especies de semillas, excepto para las semillas de maíz, donde el ácido indol 3-acético mostró un efecto inhibitorio del 25 %.

Sin embargo, se puede observar que el porcentaje de inhibición en la germinación de la maleza lo presenta el Indol, seguido de la Gramina, es decir, que el compuesto natural y su potencial producto de degradación presentaron la mayor actividad fitotóxica contra esta semilla.

El efecto en el crecimiento de las plántulas, se puede observar en la Tabla 9, donde se muestran los porcentajes de inhibición del desarrollo de las plántulas germinadas obtenido por diferencias de peso fresco respecto al control.

**Tabla 9.** Porcentaje de inhibición del desarrollo de las plántulas en suelo.

COMPUESTO	Conc. $\mu\text{g mL}^{-1}$	BALLICA <i>Lolium rigidum L.</i>	CEBADA <i>Hordeum vulgare L.</i>	AVENA <i>Avena sativa</i>	TRIGO <i>Triticum durum</i>	MAIZ <i>Zea Mays L.</i>
Gramina	250	33,92	11,94	38,99	+18,30	ND
	100	8,00	11,54	9,42	10,98	ND
Indol	250	76,12	43,11	41,73	23,98	ND
	100	64,25	29,62	26,13	7,08	ND
Ac. Indol 2-carboxílico	250	48,86	1,05	18,08	48,95	57,89
	100	31,71	+16,81	7,27	47,79	31,26
Indol 3-carbaldehído	250	5,75	7,92	4,38	14,15	+50,23
	100	0,73	+17,04	+5,66	13,27	+4,34
Ac. Indol 3-carboxílico	250	2,77	10,20	7,83	5,56	+66,22
	100	+16,76	0,00	7,51	+36,82	27,88
Ac. Indol 3-acético	250	3,29	+23,24	+1,45	12,28	+21,99
	100	8,02	+53,48	+21,58	+61,34	38,46
Indol 5-carbaldehído	250	17,02	4,68	30,96	8,75	38,23
	100	13,10	+13,35	13,06	6,93	+30,27
Ac. Indol 5-carboxílico	250	9,30	+61,46	63,30	8,74	13,27
	100	13,50	+77,56	49,22	6,93	43,09

ND: No determinado; (+) Efecto estimulante. Cada valor corresponde a la media de cinco muestras, con una desviación estándar menor a 5% en todos los casos.

Al igual que el efecto inhibitorio en la germinación de las semillas, el efecto inhibitorio del crecimiento de las plántulas fue inferior al observado en la matriz estéril, del mismo modo, el ácido indol 3-acético mantuvo un efecto estimulante del crecimiento para cebada, avena y trigo. El indol presentó la mayor actividad inhibitoria en todas las especies.

Los compuestos Gramina e indol presentaron actividad inhibitoria similar y en algunos casos, mayor a la obtenida en la matriz estéril. Este es un resultado importante puesto que como se mencionó anteriormente, Gramina es el principal alcaloide indólico natural presente en el cereal cebada, por lo tanto, la fitotoxicidad observada podría tener un rol relevante en la actividad alelopática descrita para este cereal. Por otra parte, al no presentar toxicidad en la germinación de semillas de cebada, sugiere que no habría auto toxicidad desde este compuesto, aunque esta podría surgir principalmente desde el residuo indol si es liberado por degradación de los metabolitos indólicos naturales.

En la mayoría de los casos, la actividad fue menor en la matriz suelo que en la matriz estéril, confirmando así, el efecto de la rizosfera en la actividad fitotóxica de los compuestos en estudio. Por otro lado, se puede observar una inversión de la actividad fitotóxica, produciéndose una actividad estimulante en el suelo, como ocurre con los compuestos indol 3-carboxílico, indol 3-acético, indol 3-carbaldehído y el ácido indol 5-carboxílico.

Se ha encontrado, que sustancias con actividad alelopática tienen efectos benéficos a bajas concentraciones y superado un determinado umbral, actúan negativamente sobre la planta receptora (Sampietro, 2003), considerando esto, se puede inferir que el suelo al tener la capacidad de adsorber el compuesto, podría disminuir la concentración del compuesto y modificar su efecto alelopático. Así mismo, los

microorganismos del suelo pueden disminuir la toxicidad de los compuestos al entrar a la rizosfera (Inderjit, 2001).

#### 3.3.4 Determinación de la lipofilia

Como se estableció anteriormente, el parámetro lipofilia es esencial en la dinámica de un químico en el medio fisiológico y medio ambiental, puesto que, el equilibrio hidrofilia –lipofilia es fundamental en la distribución de las especies bioactivas en medios con distintas características fisicoquímicas (Finizio y col., 1997; Hansch y col., 1964; Leo y col., 1971).

El papel de la lipofilia para los compuestos orgánicos es de gran importancia en los estudios ambientales. Este parámetro físico-químico se usa para la predicción de la distribución entre compartimentos ambientales, para estimar la bioacumulación en animales y plantas y en la predicción de los efectos tóxicos de una sustancia en los estudios de relación cuantitativa estructura - actividad (QSAR, por sus siglas en inglés) (Finizio y col., 1997).

La lipofilia de un compuesto proporciona información directa sobre la hidrofobicidad que describe la tendencia de la distribución de un soluto de la fase acuosa a los componentes orgánicos de los compartimentos ambientales e incluso en membranas biológicas (Han y col., 2011; Platts y col., 2006). Por lo tanto, la lipofilia podría determinar la distribución del aleloquímico en la planta.

En este estudio se determinó la lipofilia de los compuestos a partir del método HPLC, alternativo al método tradicional octanol/agua. La relación entre el factor de capacidad  $K'$  y valores de  $K_{ow}$  fue establecida por una regresión entre los valores de  $K'$  y valores de  $\text{Log}K_{ow}$  informados en la literatura para algunos de los compuestos. Para esto se utilizaron los siguientes valores de  $K'$ , obtenidos en la literatura.

**Tabla 10.** Factor de capacidad (K') y coeficiente de repartición octanol-agua para compuestos derivados indólicos.

Compuesto	K'	LogK'	LogKow
Gramina	0,21	-0,67	1,45
Indol	0,89	-0,05	2,10
5-Metanol indol	0,18	-0,74	1,40
Hidroxi-5-indol	0,64	-0,19	2,00

A partir de estos datos se realizó una regresión lineal  $R^2=0.996$ , del cual se deriva una expresión predictiva de los valores de  $\text{LogP}_{\text{HPLC}}$  para los compuestos indólicos.

$$\text{Ec. 20. } y = 1.0571 x + 2.1744$$

Donde  $y$ , equivale al  $\text{LogP}_{\text{HPLC}}$ ;  $x$ , equivale a  $\text{LogK}'$ .

Con los valores de  $K'$  encontrados para cada compuesto (Ec. 14, pag. 36) se calculo los valores de  $\text{LogP}_{\text{HPLC}}$ , los cuales se muestran en la Tabla 11, además, se incluyen los valores para Gramina e Indol determinados previamente (Bravo y col., 2018).

**Tabla 11.** Valores de Kow obtenidos para cada compuesto.

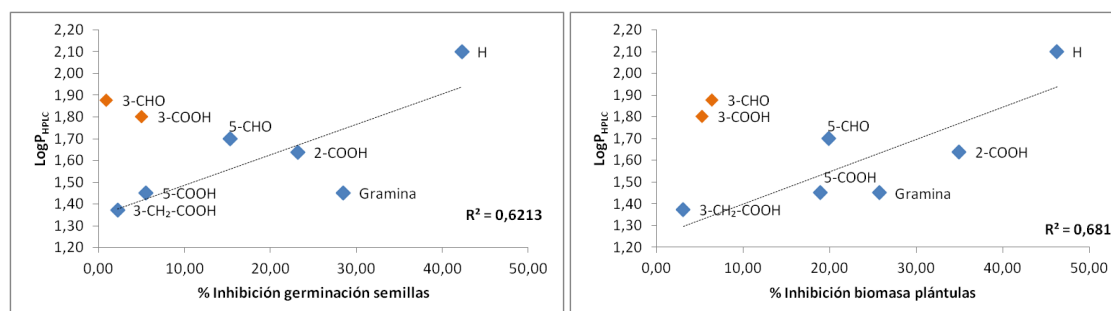
Compuesto	$\text{LogP}_{\text{HPLC}}$
Gramina	1,45
Indol	2,10
Indolina	1,91
Ac. Indol 2-carboxílico	1,64
Indol 3-carbaldehído	1,88
Ac. Indol 3-carboxílico	1,80
Ac. Indol 3-acético	1,37
Indol 5-carbaldehído	1,70
Ac. Indol 5-carboxílico	1,45

Los valores de lipofilia fluctuaron entre 1,3 y 2,1. Estos valores están entre el rango de lipofilia considerado como “moderados”. Los compuestos Indol e Indolina, mostraron los valores más altos y el ácido Indol 3-acético presento el menor valor de lipofilia.

Algunos de los herbicidas más usados en Chile (SAG, 2012), tienen valores de lipofilia moderados, como son: 2,4 – D (Log Kow = 2,81); Atrazina (Log Kow = 2,61) y Metribuzin (Log Kow = 1,70), por otro lado, algunos tienen un alto carácter lipofílico, como Pendimetalina (Log Kow = 5,18) y el Oxifluorfen (Log Kow = 4,46) (Alfaro, 2013). Más claridad acerca del rol de la lipofilia en la actividad fitotóxica de los compuestos en condiciones de campo, fue obtenida a partir de la relación entre los valores de  $\text{LogP}_{\text{HPLC}}$  y los porcentajes promedio de la actividad inhibitoria de la germinación y el crecimiento de las plántulas para las distintas especies determinadas desde la matriz suelo (Tabla 12).

**Tabla 12.** Valores de  $\text{LogP}_{\text{HPLC}}$  y promedios del %I de germinación y desarrollo.

Compuesto	$\text{LogP}_{\text{HPLC}}$	%I Promedio Germinación	%I Promedio Biomasa
Gramina	1,45	28,52	25,79
Indol	2,10	42,27	46,24
Ac. Indol 2-carboxílico	1,64	23,21	34,96
Indol 3-carbaldehído	1,88	0,93	6,44
Ac. Indol 3-carboxílico	1,80	5,04	5,27
Ac. Indol 3-acético	1,37	2,22	3,11
Indol 5-carbaldehído	1,70	15,34	19,93
Ac. Indol 5-carboxílico	1,45	5,55	18,92



**Figura 26.** Relación entre  $\text{LogP}_{\text{HPLC}}$  vs % Inhibición promedio.

### **3.4 Estudio de la dinámica de índoles en el suelo Alhué.**

La actividad del aleloquímico en el suelo estaría alterada o influenciada por factores del suelo tales como materia orgánica, iones inorgánicos, superficies de minerales reactivos, capacidad de intercambio iónico y barreras bióticas (Inderjit, 2005; Jilani y col., 2008), así mismo, podría estar expuesto a diversos procesos fisicoquímicos y biológicos, donde puede desintoxicarse, hacerse más tóxico o puede servir como esqueleto de carbono para la producción de nuevas toxinas por organismos del suelo (Blum y col., 1999; Jilani y col., 2008).

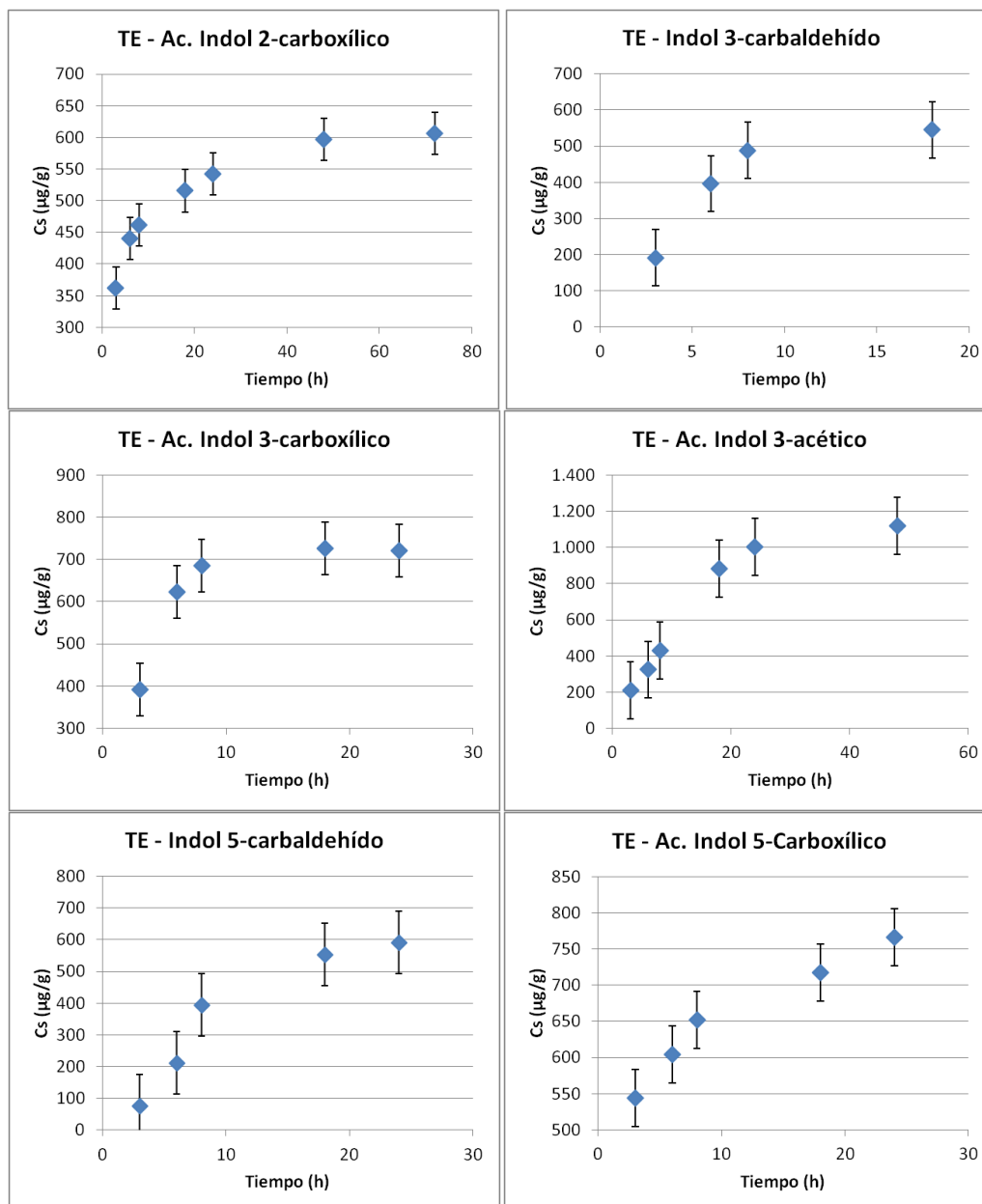
La dinámica poblacional de los microorganismos en la rizosfera está en gran medida influenciada por los recursos de carbono disponible, así como de, nitrógeno, agua temperatura, pH del suelo, entre otros. Los compuestos en estudio al ser liberados en la rizosfera, podrían constituirse en una fuente de carbono y nitrógeno para muchos microorganismos y podrían provocar la inducción selectiva y/o reproducción de microbios capaces de utilizarlos (Blum y col., 1999; Flint y col., 2012).

Con el fin de dificultar el crecimiento de las plantas, los aleloquímicos deben acumularse y persistir a niveles fitotóxicos en el suelo, sin embargo, después de su entrada en el medio ambiente, la persistencia, la disponibilidad y las actividades biológicas de los aleloquímicos están influenciadas por microorganismos (Jilani y col., 2008) y por las características específicas del suelo, por esto, existe la necesidad de considerar los procesos del suelo explícitamente para hacer que la investigación de alelopatía sea relevante para los sistemas agrícolas (Inderjit, 2005). Es por esto que se realizaron estudios de la dinámica de los compuestos en el suelo, los cuales se describen a continuación.



### 3.5 Determinación del tiempo de equilibrio.

Previo al estudio de algunos parámetros de la dinámica de los compuestos en el suelo, es necesario conocer el tiempo de contacto en el cual se logra el equilibrio. La variación de concentración adsorbida de los compuestos en función del tiempo se presenta a continuación.



**Figura 27.** Curvas de concentración adsorbida vs tiempo de agitación.

El tiempo de equilibrio encontrado para Ac. Indol 2-carboxílico fue de 48 horas; para el Indol 3-carbaldehído y el Ac. Indol 3-carboxílico fue de 12 horas y para el Ácido Indol 3-acético, Indol 5-carbaldehído y Ac. Indol 5-carboxílico fue de 24 horas.

### 3.5.1 Modelo cinético de Elovich.

Existen diversos modelos para determinar el proceso cinético de adsorción, uno de ellos es el modelo cinético de Elovich que se aplica a los sistemas de adsorción heterogéneos sólido-líquido, este modelo es adecuado para aplicaciones generales que tienen una cinética de quimisorción.

Para aplicar el modelo, se grafica la concentración adsorbida ( $C_{S_{Exp.}}$ ) en función de  $\ln$  del tiempo de agitación ( $\ln(t)$ ), a partir de ésta se obtuvo una ecuación logarítmica de la cual se obtuvo el valor de  $C_{S_{Cal.}}$ . Mediante este modelo es posible establecer si los datos experimentales y teóricos obtenidos tienen correlación.

Para determinar si el proceso en estudio puede ser analizado mediante el modelo de Elovich, se consideran dos parámetros:  $R^2$  (coeficiente de correlación) y ARE (error relativo) que diferencia entre los valores experimentales y los obtenidos a partir del modelo. Si se cumple que  $R^2 > 0,8$  y  $ARE < 10\%$ , se indicaría un buen ajuste del modelo. En la Tabla 13 se muestran los valores de  $R^2$  y % ARE obtenidos.

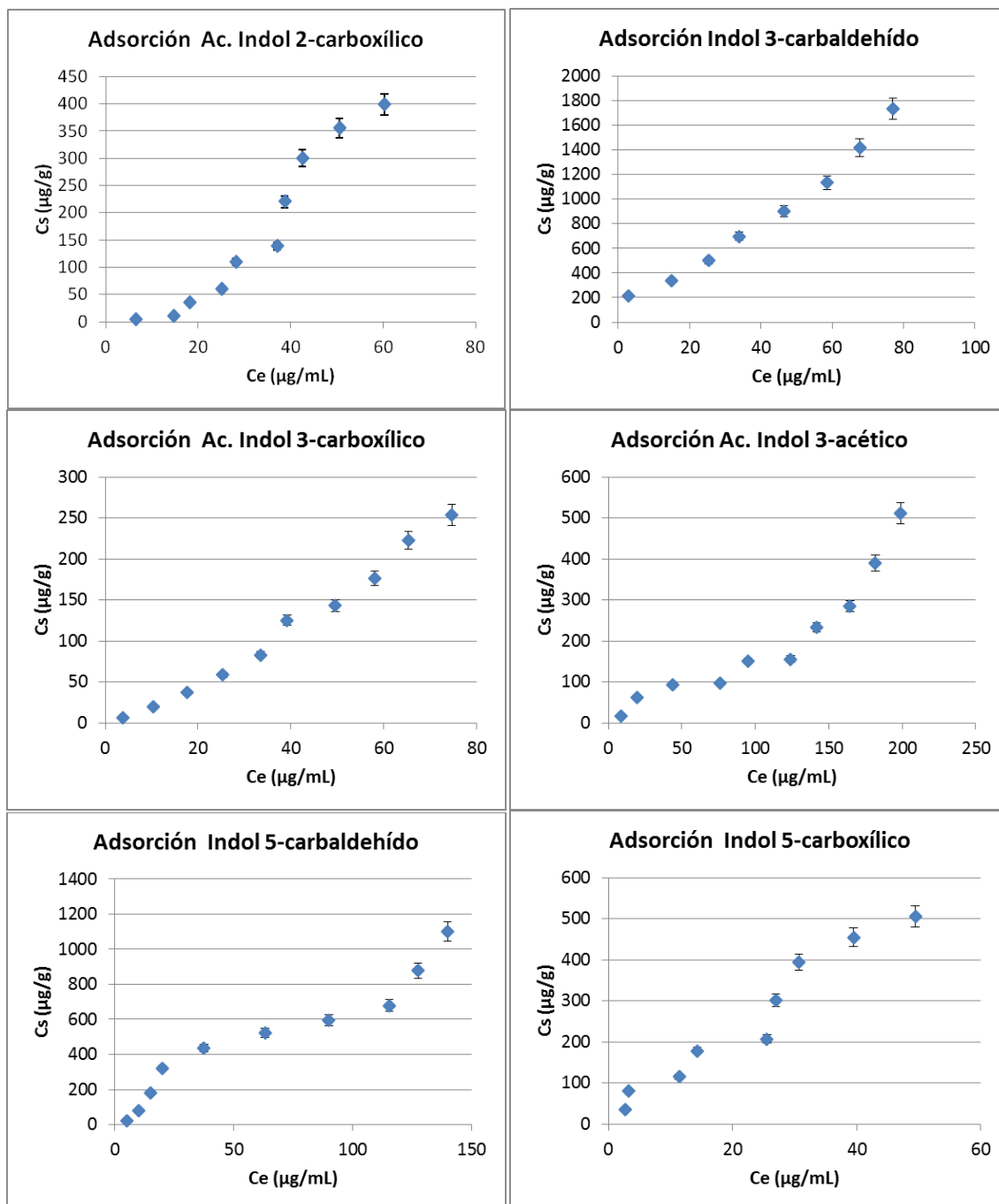
**Tabla 13.** Modelo de Elovich, valores de  $R^2$  y ARE.

Compuesto	$R^2$	% ARE
Ac. Indol 2 carboxílico	0.987	2.72
Indol 3-carbaldehído	0.963	2.27
Ac. Indol 3 carboxílico	0.897	2.10
Ac. Indol 3-acético	0.905	4.14
Indol 5-carbaldehído	0.955	3.51
Ac. Indol 5 carboxílico	0.956	1.56

En general al observar la Tabla 13, se encuentra un buen ajuste del modelo para todos los compuestos en estudio, cumpliendo que  $R^2 > 0,8$  y  $ARE < 10\%$ , por lo cual se puede indicar que el comportamiento de todos los compuestos en el suelo Alhué sigue una cinética correspondiente al modelo de Elovich.

### **3.6 Isotermas de adsorción.**

El proceso de adsorción del adsorbato por el adsorbente puede ser descrito a través de isotermas de adsorción como favorable, lineal o desfavorable, lo que permite predecir la movilidad de los compuestos en el suelo (Figura 3, en la página 13), las cuales relacionan la masa adsorbida y la concentración detectada en la solución. Las isotermas de adsorción para los compuestos en estudio se muestran en la Figura 28.



**Figura 28.** Isothermas de adsorción.

En todos los compuestos en estudio se obtuvo isoterma del tipo S, estas isothermas son típicas de adsorbentes con una alta afinidad por el disolvente. La dirección inicial de la curvatura indica que la adsorción se ve facilitada a medida que aumenta la

concentración del plaguicida. Estas isothermas indican: una interacción específica entre el soluto y el adsorbente; una atracción intermolecular moderada y competencia entre el soluto, el disolvente y las moléculas adsorbidas por los sitios específicos de adsorción, excepto para el Indol 3-carbaldehído y el Ácido Indol 3-carboxílico los cuales obtuvieron una adsorción lineal.

### 3.6.1 Parámetros Kd y Koc.

Estos parámetros entregan información respecto de la interacción entre adsorbato y adsorbente. El coeficiente de distribución (Kd) representa la movilidad de los compuestos en el suelo, es decir, la capacidad del suelo para retener un compuesto. Por otro lado, el coeficiente de adsorción (Koc) indica la afinidad del compuesto con la fracción orgánica del suelo.

Para la determinación de estos parámetros, se usó los valores de las mediciones del frasco 6, de la adsorción (Figura 12, página 32), el cual corresponde a la proporción 50/50 de CaCl<sub>2</sub> y los compuestos en estudio, así como la Ec. 2, página 14 y la Ec. 3, página 15.

**Tabla 14.** Parámetros Kd y Koc para cada compuesto.

Compuesto	Kd	Koc
Gramina	20,98	1676,00
Indol	0,58	47,40
Ac. Indol 2 carboxílico	3,92	194,73
Indol 3-carbaldehído	19,66	976,65
Ac. Indol 3 carboxílico	2,47	122,70
Ac. Indol 3-acético	1,86	92,40
Indol 5-carbaldehído	11,69	580,72
Ac. Indol 5 carboxílico	12,43	617,50

El parámetro  $K_d$  relaciona la concentración adsorbida versus la encontrada en solución, el Indol 3-carbaldehído presentó el valor más alto de  $K_d$ , seguido del Ac. Indol 5-carboxílico y el Indol 5-carbaldehído, los cuales presentan mayor concentración adsorbida en sólido que en solución. El valor más bajo fue el del Ac. Indol 3-acético donde el compuesto se encontraría más en solución que adsorbido.

Según la clasificación para  $K_{oc}$  (INECC, 2011), los valores de  $K_{oc}$  menores a 1000, son considerados **bajos**, en donde, todos los compuestos presentan una adsorción moderada, con excepción del Ac. Indol 3-acético que es considerado débil según esta clasificación.

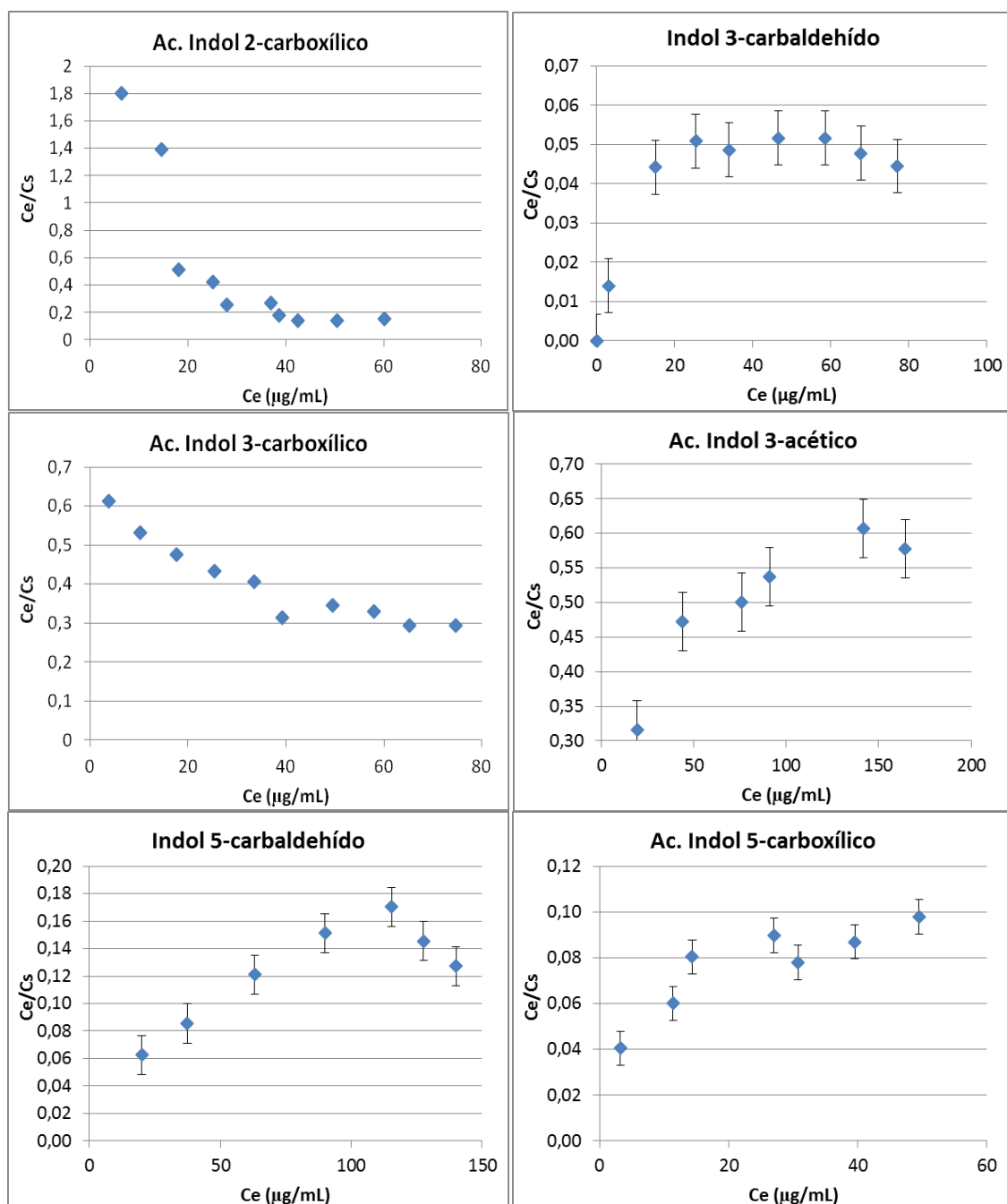
Así entonces, se podría sugerir que aquellos compuestos con adsorción débil, podrían ser fijados solo débilmente por los componentes del suelo (INECC, 2011), por lo que, podrían distribuirse mejor en la solución suelo.

Al relacionar estos valores con los valores del bioensayo en la matriz suelo, se puede inferir que los compuestos con valores de  $K_d$  y  $K_{oc}$  altos, al ser adsorbidos por el suelo, presentan un porcentaje de inhibición bajo, tanto de la germinación como del desarrollo de las plántulas, ya que no se encuentran biodisponibles en el suelo.

Si estos resultados de  $K_{oc}$  se comparan con los valores informados de la Gramina (1676) y el Indol (47.4), se observa que la adsorción de los compuestos en estudio es más baja que Gramina, en todos los casos, sin embargo, superan ampliamente al valor del Indol.

### 3.6.2 Modelo de Langmuir.

Una mejor comprensión de los procesos de adsorción se obtiene mediante la aplicación de modelos. Para la determinación de las isothermas según el modelo de Langmuir, se utilizó la Ec. 6, página 17, en donde se obtuvo las siguientes isothermas (Figura 29).



**Figura 29.** Isotermas de adsorción, usando el modelo de Langmuir.

El modelo de Langmuir no ajusta para el Ac. Indol 2-carboxílico y el Ac. Indol 3-carboxílico, lo cual sugiere que otro modelo debería ser aplicado.

Al realizar una linealización de las curvas obtenidas (Figura 29), se obtiene los parámetros de Langmuir, expresados en la siguiente tabla.

**Tabla 15.** Parámetros de Langmuir para cada compuesto.

Compuesto	$Q_0(\text{mg/g})$	$b(\text{mg/L})$	$R_L$	$R^2$
Ac. Indol 2 carboxílico	ND	ND	ND	ND
Indol 3-carbaldehído	0,006	0,062	0,060	0,98
Ac. Indol 3 carboxílico	ND	ND	ND	ND
Ac. Indol 3-acético	0,031	0,670	0,006	0,98
Indol 5-carbaldehído	0,004	0,203	0,019	0,95
Ac. Indol 5 carboxílico	0,021	0,098	0,039	0,95

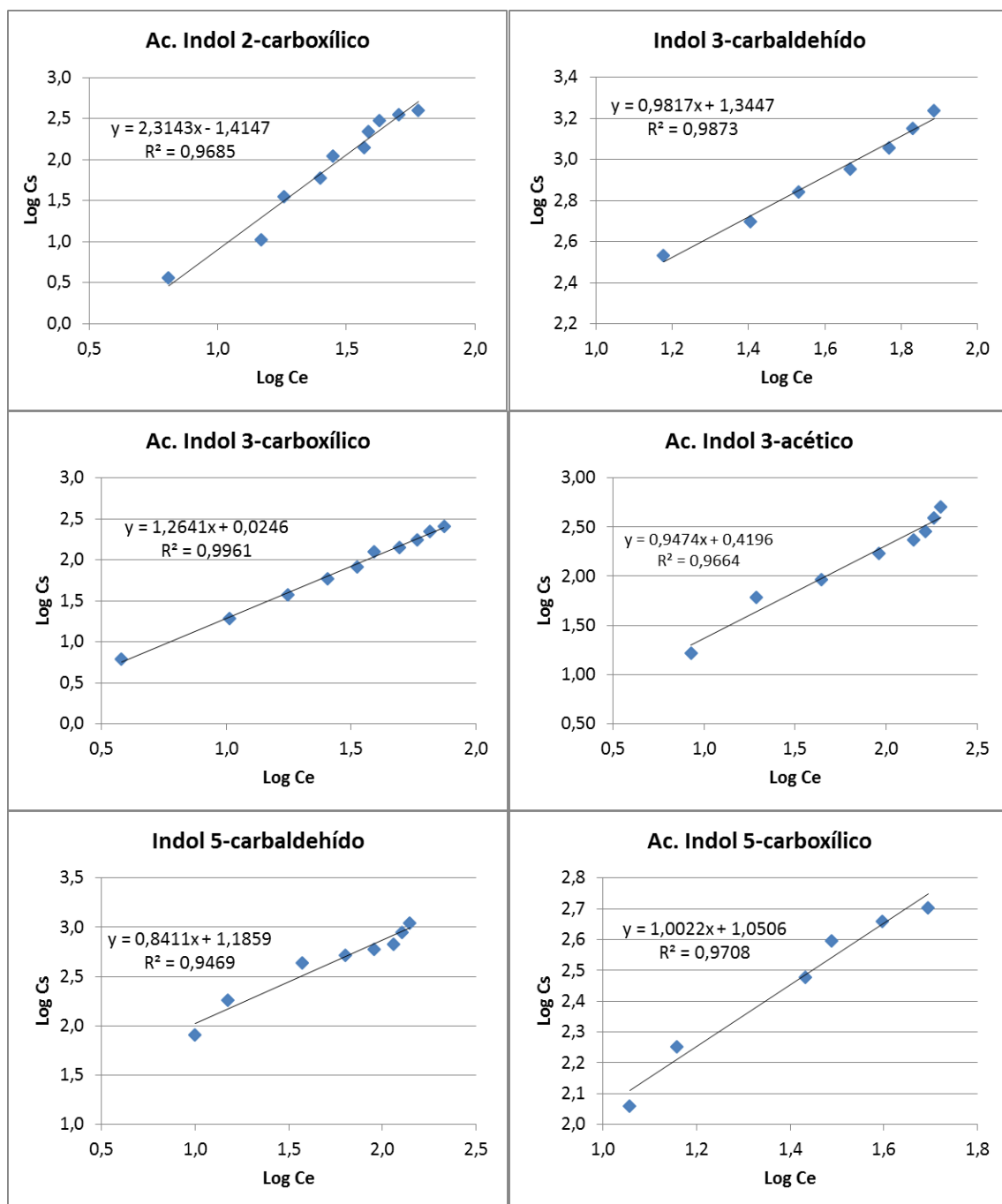
ND: No determinado.

El parámetro de Langmuir ( $R_L$ ), fue calculado a través de la constante de afinidad ( $b$ ), (Ec. 7, página 17), en donde en función del valor de este parámetro, la adsorción se clasifica como favorable para todos los casos, debido a que el parámetro de Langmuir  $R_L$  varía entre 0-1, y se obtuvo un  $R^2$  mayor o igual a 0,95. El área de la capa mono molecular disminuye, obteniéndose:  $Q_0$  Indol 5-cabaldehído <  $Q_0$  Indol 3-carbaldehído <  $Q_0$  Ac. Indol 5-carboxílico < Ac. Indol 3-acético.

### 3.6.3 Modelo de Freundlich.

El modelo empírico Freundlich considera, que la superficie sobre la cual se produce la adsorción, es heterogénea, permite conocer la capacidad de cada suelo para adsorber los compuestos agregados. En la Figura 30 se muestran las isotermas obtenidas para cada compuesto.





**Figura 30.** Isotermas de adsorción, usando el modelo de Freundlich.

Al aplicar este modelo matemático es posible definir la constante de capacidad de adsorción ( $K_f$ ) y la constante de intensidad de adsorción ( $n_f$ ) que corresponden al intercepto y pendiente de la ecuación de la recta (Figura 30).

$K_f$  establece la afinidad entre analito –adsorbente, mientras mayor sea  $K_f$  mayor será esta afinidad, por otro lado, valores de  $n_f$  mayores a la unidad indican que la adsorción es favorable y, por otro lado, cuanto más cercano son estos valores a cero, más heterogeneidad presenta el sistema (Chantawong y col., 2003). Además de analizar los parámetros  $n_f$  y  $K_f$  para determinar si el estudio de los pesticidas ajusta o no al modelo, se debe considerar  $R^2$  el cual debe ser superior a 0,95 ya que se aplicó la ecuación linealizada correspondiente al modelo.

**Tabla 16.** Parámetros de Freundlich para cada compuesto.

Compuesto	$K_f$	$n_f$	$R^2$
Ac. Indol 2 carboxílico	25,98	0,43	0,97
Indol 3-carbaldehído	22,12	1,02	0,99
Ac. Indol 3 carboxílico	1,06	0,79	0,99
Ac. Indol 3-acético	2,63	1,06	0,97
Indol 5-carbaldehído	15,34	1,19	0,95
Ac. Indol 5 carboxílico	11,24	0,99	0,97

Los valores de  $R^2$  son todos mayores que 0,95 (0,95 –0,99). Los valores más altos de  $K_f$  son para el Ac. Indol 2-carboxílico, Indol 3-carbaldehído, Indol 5-carbaldehído y Ac. Indol 5-carboxílico, quienes tienen mayor capacidad de adsorción. Al tomar como referencia los valores de la Gramina ( $K_f = 170$ ) y el Indol ( $K_f = 2$ ), se obtiene que todos los compuestos en estudio presentan menor capacidad de adsorción, con respecto a la Gramina, sin embargo, con respecto al indol, se observa mayor capacidad de adsorción de los índoles sustituidos, a excepción del Ac. Indol 3-carboxílico.

La intensidad de adsorción  $n_f$ , resultó ser favorable para Indol 3-carbaldehído, Ac. Indol 3-acético e Indol 5-carbaldehído, debido a que son valores  $>1$ , al igual que la Gramina y el Indol, con valores de  $n_f$  3,12 y 1,30 respectivamente.

### 3.7 Desorción.

El estudio de la desorción se realizó a partir del frasco 6 de la adsorción, el cual contenía una proporción 50/50 de  $\text{CaCl}_2$  y los compuestos en estudio (Figura 12, en la página 32). Se usó como extractante, solución de  $\text{CaCl}_2$ , la cual, permite mantener la fuerza iónica de la solución, estabilizar la carga de las partículas sólidas, y conseguir el mismo nivel de agregados en el medio poroso (Rodríguez y col., 2009). En la Tabla 17 se presentan los valores obtenidos para el estudio de la desorción de cada compuesto.

**Tabla 17.** Estudio de la desorción para cada compuesto.

Compuesto	Conc. Agregada (mg/L)	Conc. Encontrada (mg/L)	Desorción (%)
Gramina	500,90	3,46	0,69
Indol	250,50	26,60	10,64
Ac. Indol 2 carboxílico	50,00	7,33	14,67
Indol 3-carbaldehído	125,00	1,13	2,26
Ac. Indol 3 carboxílico	50,00	34,30	68,60
Ac. Indol 3-acético	125,00	40,58	81,17
Indol 5-carbaldehído	125,00	1,00	2,00
Ac. Indol 5 carboxílico	50,00	ND	ND

ND: No determinado

El Ac. Indol 3-acético presenta el porcentaje de desorción más alto (81 %), lo que concuerda con los valores de  $K_d$  (1,8) y  $K_{oc}$  (92,4) sugiriendo que este compuesto es débilmente retenido por el suelo, así como el Ac. Indol 3-carboxílico con valores de  $K_d$  (2,5) y  $K_{oc}$  (122,7) y el Ac. Indol 2-carboxílico con valores de  $K_d$  (3,9) y  $K_{oc}$  (194,7).

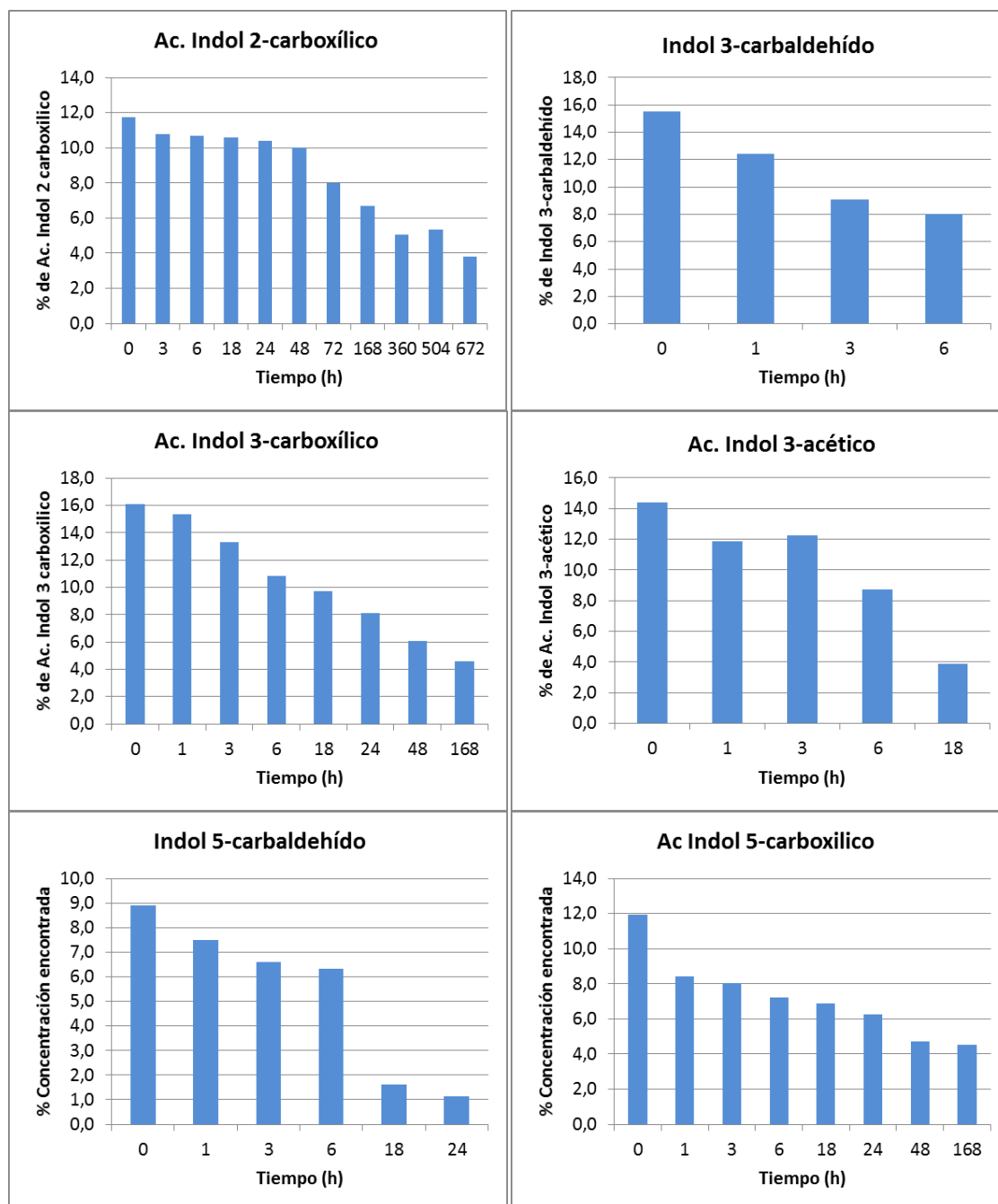
Por otro lado, para el Ac. Indol 5-carboxílico no se obtuvo un porcentaje detectado de desorción, en el cual el valor de  $K_d$  (12,4) y  $K_{oc}$  (617,5) indica que este compuesto es fuertemente retenido por este suelo, por lo cual no desorbe. Los compuestos en estudio presentan valores de desorción más altos que la Gramina (0,69 %), e Indol

(10,64 %), con excepción de los compuestos con sustituyente CHO en el anillo aromático y heterocíclico.

La desorción cumple un papel importante en el fenómeno alelopático, ya que los compuestos adsorbidos deben desorberse hacia la solución del suelo para poder estar biodisponibles. Con los resultados obtenidos se podría inferir que aquellos compuestos con un bajo porcentaje de desorción estarán menos biodisponibles en el suelo, por lo que la actividad alelopática se vería afectada, como es el caso del Indol 3-carbaldehído, Indol, 5-carbaldehído y ácido Indol 5-carboxílico.

### **3.8 Persistencia.**

Es importante para entender la dinámica de un compuesto en el suelo determinar la persistencia o tiempo de permanencia, que podría tener en él, ya que este parámetro podría indicar el periodo en el que el compuesto estará biodisponible. A continuación, en la Figura 31 se muestra el estudio de la persistencia de los compuestos.



**Figura 31.** Variación en el tiempo de la concentración de cada compuesto en estudio.

Se puede observar que para el tiempo cero, las concentraciones encontradas son bajas, lo que indicaría que no se presenta el periodo de latencia (Figura 4, página 18), es decir, inmediatamente en el suelo el compuesto podría degradar o ser adsorbido por el suelo. El Ac. Indol 3-carboxílico y el Ac. Indol 5-carboxílico, presentan un

decaimiento similar de un 8% aproximadamente en 168 horas (7 días), asimismo el Ac. Indol 2-carboxílico, presenta un decaimiento de 8% en 672 horas (28 días).

Por otro lado, el Indol 3-carbaldehído presentó un decaimiento de 20% en 6 horas, obteniendo resultados similares a la Gramina, en suelo Alhué, el cual no se detectó más allá de las 6 horas por la fuerte interacción que presentaría con el suelo, imposibilitando su detección y cuantificación (Muñoz, 2015). El Ac. Indol 3-acético tuvo un decaimiento de 10% en 18 horas, similar al Indol el cual decayó a un 10% en 24h (Muñoz, 2015). A partir de estos resultados, se calculó el tiempo de vida media (ANEXO 7), obteniendo los datos presentados a continuación.

**Tabla 18.** Valores de tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) para cada compuesto.

Compuesto	$t_{1/2}$	
	Horas	Días
Gramina	2,00	0,08
Indol	6,74	0,28
Ac. Indol 2-carboxílico	433,22	18,05
Indol 3-carbaldehído	6,47	0,27
Ac. Indol 3-carboxílico	103,45	4,31
Ac. Indol 3-acético	9,82	0,41
Indol 5-carbaldehído	7,82	0,33
Ac. Indol 5-carboxílico	169,06	7,04

Tomando como referencia los valores de tiempo de vida media para Gramina (2,00 h) e Indol (6,74 h), informados en bibliografía (Muñoz, 2015), se puede observar que la mayoría de los compuestos en estudio superan estos valores, a excepción de la Indolina (1,3 h) y del Indol 3-carbaldehído (6,5 h).

Los compuestos con sustituyentes COOH en su estructura, presentaron los valores más altos de persistencia en el suelo (>100 h), lo que indicaría que su biodisponibilidad podría ser mayor, por otro lado, los compuestos con sustituyentes CHO en su

estructura, presentaron valores bajos de persistencia (entre 6 h y 7 h), por lo que su biodisponibilidad sería menor.

Debido a que los ácidos Indol 2-carboxílico e Indol 3-carboxílico son ácidos débiles, con valores de pKa 3,6 y 3,5 respectivamente, estos pierden un protón y por lo tanto, existen predominantemente como aniones, principalmente en los suelos cuyo pH está entre 5 y 8, en general, los aniones son rechazados por la superficie del suelo, por lo tanto la adsorción suele ser débil, haciéndolos más persistentes (Islam, 2017).

### 3.9 Lixiviación.

Estudios de lixiviación permiten inferir la posibilidad de traslado de los compuestos a través del perfil del suelo, pudiendo llegar al agua subterránea. Una forma de determinar este comportamiento es mediante el índice de GUS (Ec. 11, página 20), para los compuestos en estudio se obtuvo los siguientes resultados.

**Tabla 19.** Índice de GUS para cada compuesto.

Compuesto	Índice de GUS
Gramina	0,23
Indol	1,93
Ac. Indol 2 carboxílico	4,51
Indol 3-carbaldehído	0,82
Ac. Indol 3 carboxílico	3,85
Ac. Indol 3-acético	2,02
Indol 5-carbaldehído	1,10
Ac. Indol 5 carboxílico	2,89

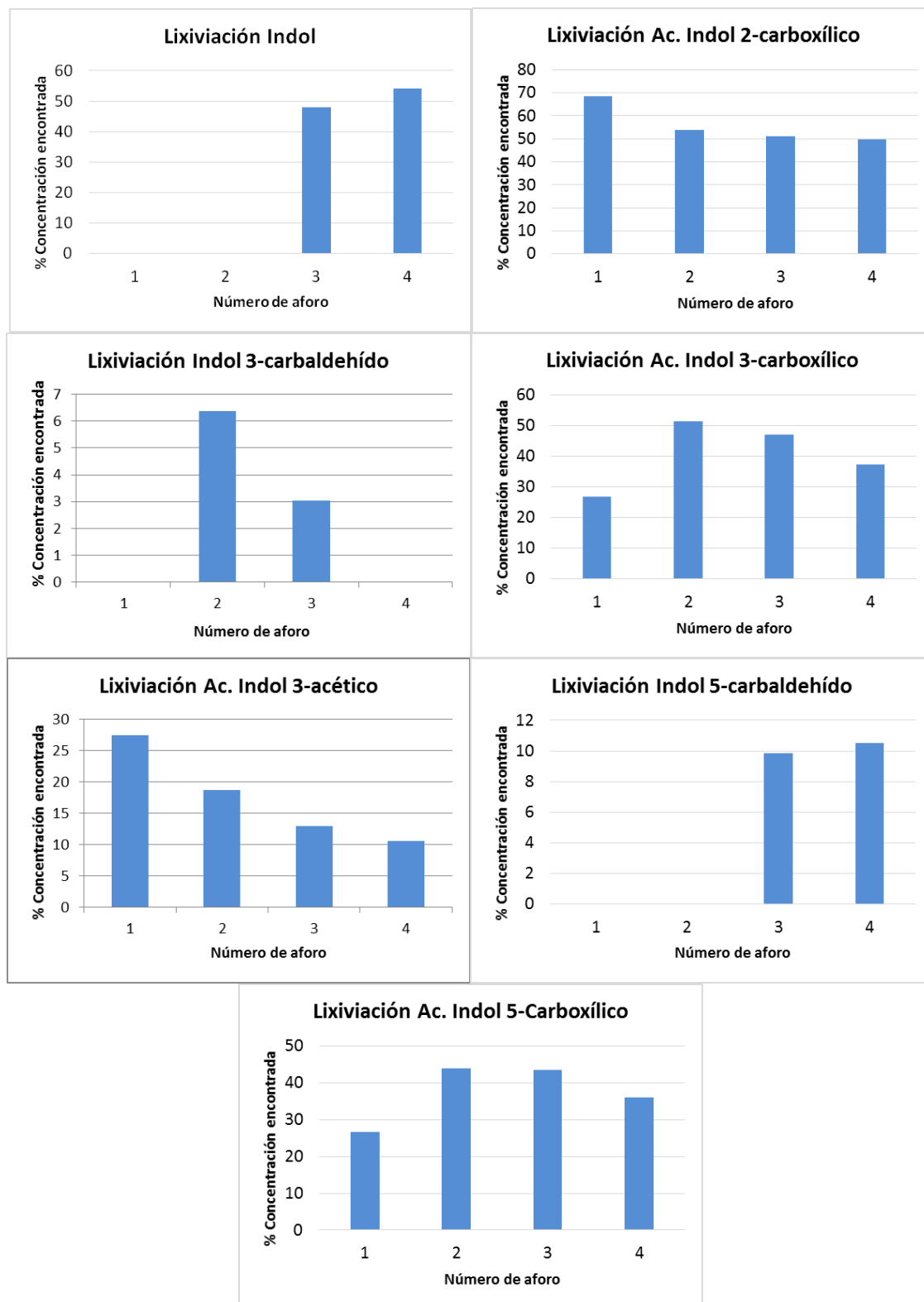
Este índice permite clasificar a los compuestos en lixiviables ( $GUS > 2,8$ ), no lixiviables ( $GUS < 1,8$ ) y de transición ( $1,8 < GUS < 2,8$ ) (Garrido y col., 1998), teniendo en cuenta los valores obtenidos, se pueden clasificar como compuestos lixiviables los compuestos con sustituyente COOH en su estructura, los cuales presentan valores

mayores a 2,8 superando los valores de Gramina e Indol. Por otro lado, los compuestos con sustituyente CHO en su estructura, presentaron valores bajos, lo que los clasificaría como compuestos no lixiviables, al igual que Gramina.

Al relacionar estos datos con lo obtenido en el estudio de la adsorción, se puede observar que el Indol 3-carbaldehído, clasificado como no lixiviable, con el valor de GUS más bajo (0,82), presenta un  $K_d$  alto (19,66), así como el  $K_f$  (22,12), lo que confirma que este compuesto es fuertemente adsorbido por el suelo, por lo cual su lixiviación es muy baja. Por otro lado, el Ac. Indol 3 carboxílico, clasificado como lixiviable, con un valor de GUS alto (3,85), presenta un  $K_d$  bajo (2,47) al igual que el  $K_f$  (1,06), confirmando que al presentar poca adsorción en el suelo, la lixiviación es mayor.

Por otro lado, la lixiviación de los compuestos, se determinó a partir del lixiviado recibido de cada columna, además se determinó la cantidad de compuesto adsorbido por el suelo del relleno de cada columna (ver parte experimental página 34).



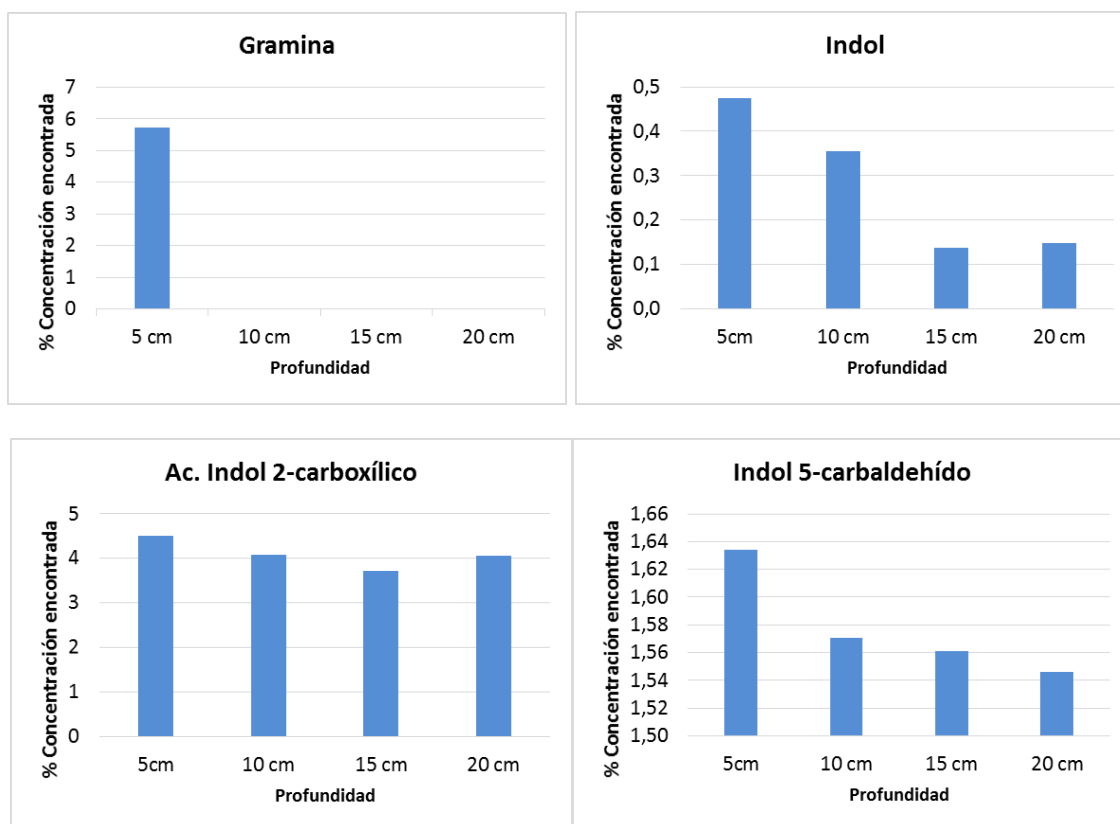


**Figura 32.** Porcentaje de concentración en líquido lixiviado de cada compuesto.

En la Figura 32 se representa el porcentaje de concentración encontrada en los matraces de aforo del producto de la lixiviación de los compuestos en estudio, así como la Gramina y el Indol, los cuales también fueron determinados con el fin de referenciar los valores obtenidos.

Para los compuestos clasificados como lixiviables según el índice de GUS, es decir, los compuestos con sustituyente COOH en su estructura, se obtuvo una concentración alta en los matraces de aforo del estudio de la lixiviación (45 % - 70%), Los compuestos con sustituyente CHO en su estructura, se clasificaron como no lixiviables y en los matraces de aforo se encontró una concentración menor al 10%. La Gramina no se encontró en ninguno de los cuatro aforos, siendo consistente con el índice de GUS determinado (0,23).

Por otro lado, con el objeto de determinar la cantidad de compuesto retenido en el suelo, se dividió la columna en 4 secciones, para analizar el suelo de cada una de ellas. En la Figura 33 se presenta el gráfico del porcentaje de concentración de los compuestos encontrado a las diferentes profundidades de la columna de lixiviación.



**Figura 33.** Porcentaje de concentración vs profundidad en columnas de lixiviación de cada compuesto.

En las fracciones de la columna, no se pudo detectar Indol 3-carbaldehído, Ac. Indol 3 carboxílico, Ac. Indol 3-acético y Ac. Indol 5 carboxílico.

Las concentraciones encontradas en las columnas de lixiviación, son menores al 5% en todos los casos. En el caso de la Gramina, únicamente se encontró en la primera fracción de la columna, lo cual podría deberse a la gran adsorción que tiene en el suelo.

La lixiviación de un compuesto es determinada por factores como propiedades de unión herbicida – suelo, características físicas del suelo, concentración del herbicida. En general los herbicidas menos solubles en agua y fuertemente atraídos por el suelo

presentan menos lixiviación (García y col., 2012), por esto se debe tener en cuenta los datos obtenidos en el estudio de adsorción-desorción.

Estos datos son concordantes con los resultados obtenidos en el estudio de la adsorción-desorción de los compuestos en el suelo, donde para el Ac. Indol 2-carboxílico, se obtuvo una baja adsorción y un porcentaje de desorción alto, lo cual coincide con los porcentajes de este compuesto encontrados tanto en las fracciones del suelo, como en el lixiviado líquido. El Indol 3-carbaldehído y el Indol 5-carbaldehído, presentaron una fuerte adsorción por el suelo y bajo porcentaje de desorción, por esta razón su concentración en el lixiviado líquido es baja.

Por otro lado, el Ac. Indol 3-carbaldehído y el Ac. Indol 3-acético, tienen una baja adsorción y alto porcentaje de desorción, por lo cual se encontró mayor concentración de los compuestos en el lixiviado líquido mientras que en las diferentes fracciones del suelo no fue detectado.

Un resumen de los parámetros determinados, así como los valores de  $\text{LogP}_{\text{HPLC}}$  para la serie de compuestos estudiados se muestran en la Tabla 20.

**Tabla 20.** Cuadro resumen dinámica de los compuestos en el suelo Alhué.

Compuesto	$\text{LogP}_{\text{HPLC}}$	$t_{1/2}$ (h)	Kd	Desorción	GUS
Gramina	1,45	2,00	20,98	0,69	0,23
Indol	2,10	6,74	0,58	10,64	1,93
Ac. Indol 2 carboxílico	1,64	433,22	3,92	14,67	4,51
Indol 3-carbaldehído	1,88	6,47	19,66	2,26	0,82
Ac. Indol 3 carboxílico	1,80	103,45	2,47	68,60	3,85
Ac. Indol 3-acético	1,37	9,82	1,86	81,17	2,02
Indol 5-carbaldehído	1,70	7,82	11,69	2,00	1,10
Ac. Indol 5 carboxílico	1,45	169,06	12,43	0,00	2,89

### 3.10 Relación fitotoxicidad - agro dinámica.

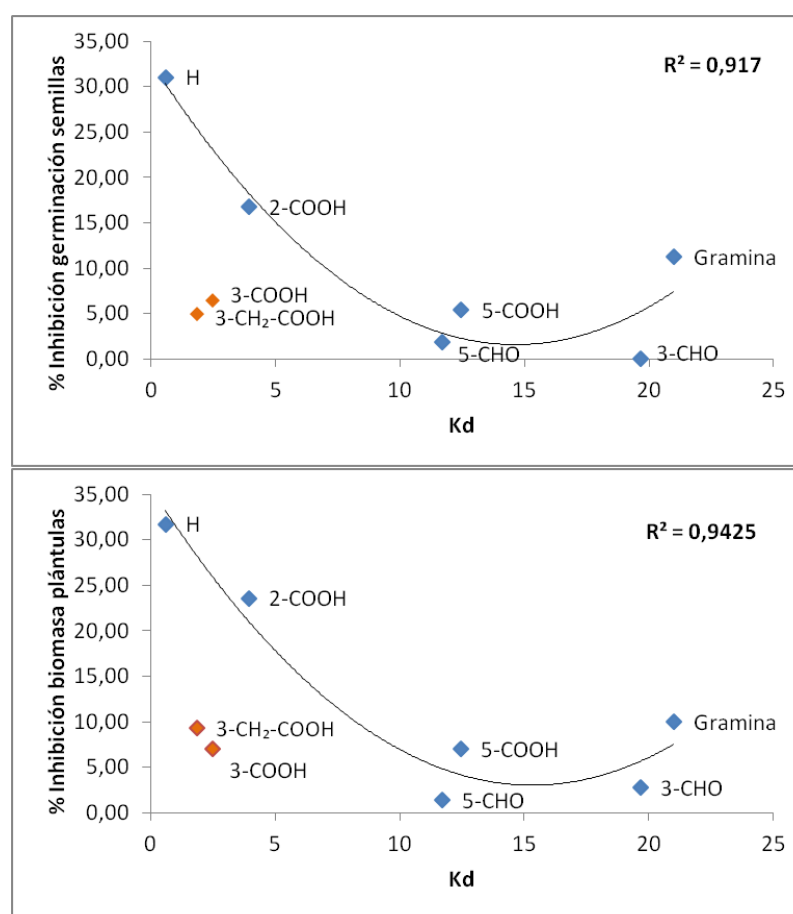
Para determinar el potencial impacto en el fenómeno alelopático, se racionalizaron los resultados obtenidos a partir de relaciones estructura – fitotoxicidad – agro dinámica. Esta relación se basa principalmente en el efecto tóxico que causa una sustancia, dependiendo de su composición y la estructura del compuesto, a través de evaluaciones cuantitativas, relacionando datos fitotóxicos y propiedades fisicoquímicas (Castillo, 2004) y la agrodinámica permite establecer la biodisponibilidad de los compuestos para favorecer su uso como alelopático.

En este estudio los resultados obtenidos desde la actividad alguicida *in vitro* (Tabla 5, página 46) y la germinación de semillas y desarrollo de plántulas en la matriz estéril discutidos anteriormente sugieren que la fitotoxicidad de los índoles estaría relacionada con los cambios estructurales producidos por los sustituyentes en la posición 2 y 3 del anillo heterocíclico y la posición 5 del anillo aromático. El Ac. Indol 2-carboxílico mostró mayor efectividad fitotóxica que la Gramina y estos compuestos mostraron mayor actividad que los derivados sustituidos. Además, se observó cierto grado de selectividad, la especie Ballica fue más sensible y la especie Maíz fue la menos sensible a los efectos fitotóxicos. En algunos casos, según la concentración, se observó un efecto estimulante respecto al control.

Por otra parte, los resultados obtenidos desde la matriz suelo mostraron que la actividad fitotóxica fue relativamente menor que la observada en la matriz estéril. Varios compuestos mostraron efecto estimulante en el suelo, en contraste con el efecto tóxico observado en la matriz estéril, solo Indol y Gramina mantuvieron su efecto fitotóxico en ambas matrices.

Con los resultados obtenidos en el estudio de la adsorción – desorción, en general se puede inferir que los compuestos con  $K_d$  altos y una desorción baja, como Gramina y

los derivados Indol 3-carbaldehído, Indol 5 -carbaldehído y el ácido Indol 5-carboxílico, estarían menos biodisponibles y en consecuencia serían menos fitotóxicos que aquellos con Kd bajo y desorción alta como Indol y el ácido Indol 2-carboxílico. Los derivados ácido Indol 3-carboxílico y ácido Indol 3-acético escapan a esta generalidad. La relación de la biodisponibilidad en la actividad fitotóxica de los compuestos en el suelo Alhué se puede observar con más claridad, a partir de la relación entre Kd y la actividad fitotóxica promedio que se muestra en la Figura 34.



**Figura 34.** Relación entre los valores de Kd y la actividad fitotóxica promedio, determinadas en el suelo Alhué.

De esta relación se puede extrapolar el efecto de los sustituyentes en la actividad fitotóxica, obteniendo un orden de fitotoxicidad para el grupo carboxilo: ácido Indol 2-

carboxílico > ácido Indol 5-carboxílico > ácido Indol 3-carboxílico. Por otro lado, el grupo aldehído presentó mayor actividad fitotóxica al estar en la posición 5 del anillo aromático que en la posición 3 del anillo heterocíclico. En general, el alcaloide no sustituido, Indol, presentó la mayor actividad fitotóxica, superando los valores del alcaloide natural Gramina.

Dado que la fitotoxicidad observada, así como la dinámica en el suelo Alhué de los compuestos estudiados serían cercanos a los esperados en condiciones de campo, estos resultados son relevantes para entender el potencial rol relativo de las estructuras indólicas naturales en los fenómenos alelopáticos entre plantas competitivas.

Una forma de determinar la influencia de las características del suelo en el comportamiento de estos compuestos, podría ser mediante el estudio de suelos con diferentes características especialmente pH, % CO, contenido y tipo de arcillas, etc., por ejemplo suelos volcánicos, comunes en el sur de Chile.

#### IV. CONCLUSIONES

- El método analítico utilizado, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), validado, permite identificar y estudiar el comportamiento de la serie de compuestos indólicos en suelo Alhué.
- La actividad fitotóxica de los compuestos se evalúa a partir de tres bioindicadores, en donde, la prueba antialga permite estudiar el efecto de varias concentraciones, ya sea en la inhibición o estimulación del desarrollo del alga. Por otro lado, los bioensayos de germinación y desarrollo realizados en diferentes matrices, proporcionan información del rol del suelo en el efecto fitotóxico de los compuestos, en donde se observa que la actividad fitotóxica obtenida en la matriz estéril fue mayor que en la matriz suelo para la mayoría de los compuestos, excepto en el alcaloide natural Gramina y el derivado no sustituido Indol.
- La determinación de la lipofilia indica que a mayores valores de  $\text{LogP}_{\text{HPLC}}$  el efecto sobre la inhibición en la germinación de semillas y el desarrollo de las plántulas, es mayor (Figura 26).
- El comportamiento de los compuestos en un suelo, se determina mediante estudios de persistencia, adsorción/desorción y lixiviación. En la determinación de la persistencia, la serie de los compuestos en estudio obtienen valores de tiempo de vida media más altos que la Gramina y el Indol. En cuanto a la adsorción, se concluye que los compuestos con valores de  $K_d$  altos, al ser adsorbidos fuertemente por el suelo, están menos biodisponibles, lo cual afecta su actividad fitotóxica. Los resultados del estudio de la desorción, concuerdan con esto, ya que aquellos compuestos con  $K_d$  altos, presentan valores bajos de desorción.



- Una forma de comprender de forma cuantitativa los procesos de adsorción se obtiene mediante la aplicación de diversos modelos. El comportamiento cinético de adsorción se evalúa mediante el modelo cinético de Elovich, el cual permite un ajuste entre los datos experimentales y teóricos, determinando un tiempo de contacto entre las 12 y 48 h, para los diferentes compuestos, con el cual se llevó a cabo el estudio de adsorción. La aplicación del modelo matemático de Langmuir ajusta para todos los compuestos, sin embargo, el modelo de Freundlich, no ajusta para los ácidos Indol 2-carboxílico e Indol 3-carboxílico, lo cual sugiere que otro modelo debería ser aplicado para dichos compuestos.
- La dinámica de los compuestos en el suelo afecta la actividad fitotóxica y su biodisponibilidad, es por esto que se deben considerar para comprender con mayor claridad los fenómenos alelopáticos de los compuestos indólicos.
- Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este estudio: Efecto fitotóxico – Persistencia - Adsorción, se puede inferir, que el Indol y el ácido Indol 2-carboxílico, presentarían un potencial efecto alelopático.

## REFERENCIAS

- Aguilera, S., Borie, G., Galindo, G., Peirano, P., 1977. «Organic matter in volcanic soils in Chile: Chemical and biochemical characterization». *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 28 (11-12): 899-912.
- Ahn, J., y Chung, M., 2000. «Allelopathic Potential of Rice Hulls on Germination and Seedling Growth of Barnyardgrass». *Agronomy Journal* 92 (6): 1162 - 1167.
- Alewu B. 2011. «Pesticides and Human Health». *Pesticides in the Modern World*, ed. Nosiri C. 1 ed - Margarita Stoytcheva. Rijeka: IntechOpen, Ch. 12. <https://doi.org/10.5772/18734> (17 de junio de 2019).
- Alexander, M. 2000. «Aging, Bioavailability, and Overestimation of Risk from Environmental Pollutants». *Environmental Science and Technology* 34 (20): 4259-4265.
- Alfaro, R. 2013. «Herbicidas asociados al caña de azúcar y su Potencial de Contaminación en el medio Ambiente». *Liga agrícola industrial de la caña de azúcar LAICA*: 1-63.
- Anaya, A. 2000 «*Ecología Química*». Ed. Plaza y Valdés. México, D.F. 1 ed. 255-292.
- Baghestani, A., Lemieux, C., Leroux, G, Baziramakenga, R. y Simard, R.. 1999. «Determination of Allelochemicals in Spring Cereal Cultivars of Different Competitiveness». *Weed Science* 47 (5): 498-504.
- Baird, C. 2001. «*Química ambiental*». Ed. Reverté. Barcelona. 2 ed. 547-558.
- Batish, D., Singh, H. y Kaur, S., 2001. «Crop Allelopathy and its Role in Ecological Agriculture». *Journal of Crop Production* 4 (2): 121-161.
- Beltran, J., Hernandez, F. y Morell, I. 1995. «Estudios de adsorción de plaguicidas en suelos mediante experiencias en Batch.» *Avances en la investigación en Zona no saturada*: Ed. J. M. Gonzalo, I. Antigüedad. 257-268.
- Bhowmik, P. y Inderjit. 2003. «Challenges and opportunities in implementing allelopathy for natural weed management». *Crop Protection* 22 (4): 661-671.
- Blum, U., Shafer, S. y Lehman, M. 1999. «Evidence for inhibitory allelopathic interactions involving phenolic acids in field soils: Concepts vs. an experimental model». *Critical Reviews in Plant Sciences* 18 (5): 673-93.

Bowman, B. 1989. «Mobility and Persistence of the Herbicides Atrazine, Metolachlor and Terbutylazine in Plainfield Sand Determined Using Field Lysimeters». *Journal of Environment Quality* 8: 485-491.

Brack, W., Bandow, N., Schwab, K., Schulze, T. y Streck, G. 2009. «Bioavailability in Effect-Directed Analysis of Organic Toxicants in Sediments». *Trends in Analytical Chemistry* 28 (5): 543-549.

Bravo, H., Copaja, S. y Lamborot, M. 2013. «Phytotoxicity of Phenolic Acids From Cereals». En *Herbicides - Advances in Research*, ed. Andrew Price. InTech. <http://www.intechopen.com/books/herbicides-advances-in-research/phytotoxicity-of-phenolic-acids-from-cereals> (17 de junio de 2019).

Bravo, H., Iglesias, M., Copaja, S. y Argandoña, V. 2010. «Phytotoxicity of Indole Alkaloids from Cereals». *Revista latinoamericana de Química* 38 (2): 123-129.

Bravo, H., y Copaja, S. 2018. «Chemical Basis for the Phytotoxicity of Indoles in Relation to the Allelopathy of Cereals». *Agricultural Sciences* 09 (11): 1457-1469.

Bravo, H., Clavijo, E. y Weiss, B. 2001 «Frontier orbitals and ir frequencies of cyclic hydroxamic acids related to antimicrobial activity» *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*, 46 (3), 257-260.

Bravo, H., Weiss, B., Valdebenito, J. y Gómez, J. 2016. «A Theoretical Analysis of the Relationship between the Electronic Structure of Indole Derivatives and Their Phytotoxicity against *Lactuca Sativa* Seeds.» *Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences* 7 (2): 792-98.

Burgos, N., y Talbert, R. 2000. «Differential activity of allelochemicals from *Secale cereale* in seedling bioassays». *Weed Science* 48 (3): 302-10.

Castillo, G., ed. 2004. «Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas. Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones». México: Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. 100-189.

Chantawong, V., Harvey, N. y Bashkin V. 2003. «Comparison of Heavy Metal Adsorptions by Thai Kaolin and Ballclay». *Water, air and soil pollution* 148: 111-125.

Chourasiya, S., Khillare, P. y Saurav, D. 2015. «Health risk assessment of organochlorine pesticide exposure through dietary intake of vegetables grown in the periurban sites of Delhi, India». *Environmental Science and Pollution Research* 22 (8): 5793-5806.

Copaja, S., Villaroel, E., Bravo, H., Pizarro, L. y Argandoña, V. 2006. «Hydroxamic acids in *Secale cereale* L. and the relationship with their antifeedant and allelopathic properties». *Section C Journal of Biosciences* 61 (9): 670-676.

Dada, A., Olalekan, A., Olatunya, A. 2012. «Langmuir, Freundlich, Temkin and Dubinin–Radushkevich Isotherms Studies of Equilibrium Sorption of Zn <sup>2+</sup> Unto Phosphoric Acid Modified Rice Husk». *Journal of Applied Chemistry* 3 (1): 38-45.

Dias, L. 1991. «Allelopathic activity of decomposing straw of wheat and oat and associated soil on some crop species». *Soil and Tillage Research* 21 (1-2): 113-120.

Figueiredo, M., Seldin, L., De Araujo, F. y Mariano, R. 2010. «Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Fundamentals and Applications». *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*, ed. Dinesh K. Maheshwari. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 21-43. [http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-13612-2\\_2](http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-13612-2_2) (17 de junio de 2019).

Finizio, A., Vighi, M., y Sandroni D. 1997. «Determination of N-Octanol/Water Partition Coefficient (K<sub>ow</sub>) of Pesticide Critical Review and Comparison of Methods». *Chemosphere* 34(1): 131-161.

Flint, H., Scott, K., Duncan, S., Louis, P., Forano, E. 2012. «Microbial Degradation of Complex Carbohydrates in the Gut». *Gut Microbes* 3 (4): 289-306.

Fomsgaard, I. 2006. «Chemical Ecology in Wheat Plant–Pest Interactions. How the Use of Modern Techniques and a Multidisciplinary Approach Can Throw New Light on a Well-Known Phenomenon: Allelopathy». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (4): 987-990.

Gamalero, E. y Glick, B. 2011. «Mechanisms Used by Plant Growth-Promoting Bacteria». *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Nutrient Management*, ed. Dinesh K. Maheshwari. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 17-46. [http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-21061-7\\_2](http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-21061-7_2) (17 de junio de 2019).

Garcia, F., Domingues, E. y Batista, A. 2012. «Persistence of Herbicide Sulfentrazone in Soil Cultivated with Sugarcane and Soy and Effect on Crop Rotation». *Herbicides - Properties, Synthesis and Control of Weeds*, ed. Mohammed Nagib Hasaneen. InTech. <http://www.intechopen.com/books/herbicides-properties-synthesis-and-control-of-weeds/persistence-of-herbicide-sulfentrazone-in-soil-cultivated-with-sugarcane-and-soy-and-effect-on-crop-> (17 de junio de 2019).

Garrido T., Costa C., Fraile J., Orejudo E., Niñerola M., Ginebreda A., Olivella L. y Figueras M. 1998. «Análisis de la presencia de plaguicidas en diversos acuíferos de Cataluña». *Jornadas sobre la contaminación de las aguas subterráneas: un problema pendiente*. *Marine Pollution Bulletin*, 26: 11, 613-619.

Giles, C., Smith, D. y Huitson, A. 1974. «A General Treatment and Classification of the Solute Adsorption Isotherm. I. Theoretical». *Journal of Colloid and Interface Science* 47 (3): 755-65.

Gonzalez, J. 2013. «Estudios de equilibrios de adsorción en la remoción de trazas metálicas en agua empleando lodos rojos y su determinación por espectroscopia de absorción atómica.» Tesis de grado, Ing. Química. Universidad Central de Venezuela.

- Guenzi, W., y McCalla, T. 1966. «Phenolic Acids in Oats, Wheat, Sorghum, and Corn Residues and Their Phytotoxicity1». *Agronomy Journal* 58 (3): 303-304.
- Guo, R., Liang, X., Chen, J., Zhang, Q., Kettrup, A. 2002. «Prediction of Soil Adsorption Coefficients from Retention Parameters on Three Reversed-Phase Liquid Chromatographic Columns». *Analytical Chemistry* 74 (3): 655-660.
- Hagin, R. 1989. «Isolation and Identification of 5-Hydroxyindole-3-Acetic Acid and 5-Hydroxytryptophan, Major Allelopathic Aglycons in Quackgrass (*Agropyron Repens* L. Beauv.)». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 37 (4): 1143-49.
- Han, S., Qiao, J., Zhang, Y., Yang, L., Lian, H., Ge, X. Chen, H. 2011. «Determination of N-Octanol/Water Partition Coefficient for DDT-Related Compounds by RP-HPLC with a Novel Dual-Point Retention Time Correction». *Chemosphere* 83 (2): 131-136.
- Hansch, C. y Fujita, T. 1964. «A Method for the Correlation of Biological Activity and Chemical Structure». *J. Am. Chem.* 86: 1616-1626.
- Hayes, T., Case, P., Chui, S., Chung, D., Haeffele, C., Haston, K., Lee, M., Mai, V., Marjua, Y., Parker, J., Tsui, M. 2006. «Pesticide Mixtures, Endocrine Disruption, and Amphibian Declines: Are We Underestimating the Impact?». *Environmental Health Perspectives* 114 (Suppl 1): 40-50.
- Hollósy, F., Seprodi, J., Orfi, L., Eros, D., Kéri, G., Idei, M.. 2002. «Evaluation of Lipophilicity and Antitumour Activity of Parallel Carboxamide Libraries». *Journal of Chromatography B* 780 (2): 355-363.
- Inderjit. 2001. « Soil: Environmental Effects on allelochemical Activity». *Agronomy Journal* 93: 70-84.
- Inderjit. 2005. «Soil Microorganisms: An Important Determinant of Allelopathic Activity». *Plant and Soil* 274 (1-2): 227-236.
- INECC – Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. 2011. «Características físico-químicas de los plaguicidas y su transporte en el ambiente». México. 12.
- Isen, R., y Martínez, P. 2011. «Estudio experimental de la movilidad de metales pesados en sedimentos de la cuenca del Jequetepeque, Perú». Tesis de grado, Universidad politécnica de Cataluña.
- Islam, F., Wang, J., Farooq, M., Khan, M., Xu, L., Zhu, J., Muños, S., Li, Q., Zhou, W. 2017. «Potencial impact of the herbicide 2,4-D on human an ecosystems». *Environment international*. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.10.020>
- Ishikawa, Y. y Kanke, T. 2000. «Role of gramine in the feeding detrence of barley against the migratory locust, *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae)». *Applied Entomology and Zoology* 35 (2): 251-56.

Jilani, G., Mahmood, S., Chaudhry, A., Hassan, I., Akram, M. 2008. «Allelochemicals: Sources, toxicity and microbial transformation in soil - A review». *Annals of Microbiology* 58 (3): 351-57.

Juhasz, A. y Naidu, R. 2000. «Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: A review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene». *International Biodeterioration and Biodegradation* 45 (1-2): 57-88.

Khot, R., Thakur, D., Joshi, P., Pandharipande, M., Nagpure, K. 2015. «Glyphosate poisoning with acute pulmonary edema». *Toxicology International* 21 (3): 328-30.

Kumar, K. y Sivanesan, S. 2007. «Isotherms for Malachite Green onto Rubber Wood (*Hevea Brasiliensis*) Sawdust: Comparison of Linear and Non-Linear Methods». *Dyes and Pigments* 72 (1): 124-29.

Leo, A., Hansch, C. y Elkins, D. 1971. «Partition Coefficients and Their Uses». *Chemical Reviews* 71 (6): 525-616.

Liebl, R. y Worsham, D. 1983. «Inhibition of pitted morning glory (*Ipomoea lacunosa* L.) and certain other weed species by phytotoxic components of wheat (*Triticum aestivum* L.) straw». *Journal of Chemical Ecology* 9 (8): 1027-43.

Lu, D., Wang, D., Ni, R., Lin, Y., Feng, C., Xu, Q., Jia, X., Wang, G., Zhou, Z.. 2015. «Organochlorine pesticides and their metabolites in human breast milk from Shanghai, China». *Environmental Science and Pollution Research* 22 (12): 9293-9306.

Mancheno, P. y Muñoz, A. 2009. «Recuperación de oro de soluciones post-lixiviación con cianuro de sodio mediante cementación con Zinc y adsorción en carbon activado.» Tesis de grado. Universidad San Francisco, Quito.

Maqbool, N., Wahid, A., Farooq, M., Cheema, Z., Siddique, K. 2013. «Allelopathy and Abiotic Stress Interaction in Crop Plants». En *Allelopathy*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 451-68. [http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-30595-5\\_19](http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-30595-5_19) (17 de junio de 2019).

Matsuo, H., Taniguchi, K., Hiramoto, T., Yamada, T., Ichinose, Y., Toyoda, K., Takeda, K., Shiraishi, T. 2001. «Gramine Increase Associated with Rapid and Transient Systemic Resistance in Barley Seedlings Induced by Mechanical and Biological Stresses». *Plant and Cell Physiology* 42 (10): 1103-1111.

Mnif, W., Hassine, A., Bouaziz, A., Bartegi, A., Thomas, O., Roig, B. 2011. «Effect of endocrine disruptor pesticides: A review». *International Journal of Environmental Research and Public Health* 8 (6): 2265-2303.

Muhammad, F., Bajwa, A., Cheema, S. y Cheema, Z. 2013. «Application of Allelopathy in Crop Production». *Int. J. Agric. Biol.* 15 (6): 1367-1378.

Muñoz, G. 2015. «Comportamiento en suelos agrícolas de alcaloides indólicos, de origen natural, con propiedades herbicidas». Tesis de Grado, Universidad de Chile.

- Narváez, J., Palacio, J. y Molina, F. 2012. «Persistencia de plaguicidas en el ambiente y su ecotoxicidad: Una revisión de los procesos de degradación natural». *Gestión y Ambiente* 15 (3): 27-38.
- Naumov, V. 2009. «145 years to forest experimental station of RSAU-MTAA». 1 ed. Moscú.
- OECD. 2000. «OECD Guideline for the testing of chemicals. Adsorption - Desorption Using a Batch Equilibrium Method» Section 1. Test No. 106: 1-45.
- Olofsdotter, M. 2001. «Rice - A step toward use of allelopathy». *Agronomy Journal* 93: 3-8.
- Overland, L. 1966. «The Role of Allelopathic Substances in the "Smother Crop" Barley». *American Journal of Botany* 53 (5): 423-432.
- Pastuszewska, B., Smulikowska, S., Wasilewko, J., Buraczewska, L., Ochtabinska, A., Mieczkowska, A., Lechowski, R., Bielecki, W. 2001. «Response of Animals to Dietary Gramine. I. Performance and Selected Hematological, Biochemical and Histological Parameters in Growing Chicken, Rats and Pigs». *Archiv für Tierernaehrung* 55 (1): 1-16.
- Pérez, P. 2014. «Puesta en riego por aspersión con cobertura total enterrada en una parcela de 19 hectáreas en el término municipal de Huerto (Huesca)». Tesis de grado. Universidad de Zaragoza.
- Pirsaheb, M., Limoe, M., Namdari, F. y Khamutian, R. 2015. «Organochlorine pesticides residue in breast milk: a systematic review.» *Medical journal of the Islamic Republic of Iran* 29: 228-238.
- Platts, J., Oldfield, S., Reif, M., Palmucci, A., Gabano, E., Osella, D. 2006. «The RP-HPLC Measurement and QSPR Analysis of LogPo/w Values of Several Pt(II) Complexes». *Journal of Inorganic Biochemistry* 100 (7): 1199-1207.
- Porta, J., López – Acevedo, M. y Porch, R. 2014. *Edafología: uso y protección de suelos*. 3 ed. 272 - 280.
- Ramírez, J. y Lacasaña, M. 2001. Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Arch Prev Riesgos Labor* 4: 67-75.
- Rioja, A. 2002. «Apuntes de fitotecnia general». E.U.I.T.A. Ciudad Real.
- Rodríguez, R., Linares, R. y Guadalupe, E. 2009. «Adsorción y desorción de cromo hexavalente en relaves mineros.» *Revista del Instituto de investigaciones FIGMMG* 12 (24): 108-117.
- Rodríguez, P., Giraldo, L. y Moreno, J. 2011. «Nickel(II) Ion Adsorption onto Activated Carbon. Relationship between Physicochemical Properties and Adsorption Capacity». *Adsorption Science & Technology* 29 (6): 541-551.

Roth, C., James, P. y Gary M. 2000. «Allelopathy of Sorghum on Wheat under Several Tillage Systems». *Agronomy Journal* 92 (5): 855-860.

SAG - Servicio agrícola y ganadero de Chile. 2012. Informe de ventas de plaguicidas de uso agrícola en Chile, año 2012. [http://www.sag.cl/sites/default/files/declaracion\\_de\\_venta\\_de\\_plaguicidas\\_ano\\_2012.pdf](http://www.sag.cl/sites/default/files/declaracion_de_venta_de_plaguicidas_ano_2012.pdf)

Sampietro, D. 2003. «Alelopatía: concepto, características, metodología de estudio e importancia» Instituto de Estudios Vegetales. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán. Argentina. 1-14.

Sanborn, M., Kerr, K., Sanin, L., Cole, D., Bassil, K., Vakil, C. 2007. «Non-Cancer Health Effects of Pesticides. Systematic Review and Implications for Family Doctors». *Canadian Family Physician* 53: 1712-1720.

Sánchez, J. 2014. «Eliminación de metales pesados de efluentes líquidos por adsorción en materiales naturales residuales de bajo coste (Acículas de pino)». Universidad de Murcia. Departamento de Ingeniería Química.

Sánchez M, y Sánchez C. 1984. «Los plaguicidas. Adsorción y evolución en el suelo». Ed. Ceresnet. I.O.A.T.O. Centro de Edafología y Biología Aplicada, Diputación Provincial. Salamanca. 1-59.

Sandoval, S. 2010. «Validación de Métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: Aspectos generales sobre la validación de métodos». Chile: Instituto de salud pública. Guía Técnica No. 1.

Schulz, M., Marocco, A., Tabaglio, V., Macias, F., Molinillo, J. 2013. «Benzoxazinoids in Rye Allelopathy - From Discovery to Application in Sustainable Weed Control and Organic Farming». *Journal of Chemical Ecology* 39 (2): 154-174.

Sicker, D., Frey, M., Schulz M., y Gierl, A. 2000. «Role of natural Benzoxazinones in the survival strategy of plants». *International review of cytology* 198: 319-346.

Sposito, G. 2008. «The Chemistry of Soils». Oxford ; New York: Oxford University Press. 2 ed. 3-86.

Stevenson, F. 1994. «Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions». John Wiley and Sons, New York, 3 ed: 443-445.

Weber, F. y Leclerc, J. 1980. «Geology and genesis of the Moanda manganese deposits, Republic of Gabon». *Geology and geochemistry of Manganese* 2: 89-112.

World health organization. 1990. «Public health impact of pesticides used in agriculture» *England*. 33-77.



Wu, H., Haig, T., Pratley, J., Lemerle, D., An, M. 2001. «Allelochemicals in wheat (*Triticum aestivum* L.): Variation of phenolic acids in shoot tissues». *Journal of Chemical Ecology* 27 (1): 125-135.

Zhang, Z., Sparks, D. y Scrivner, N. 1993. «Sorption and Desorption of Quaternary Amine Cations on Clays». *Environmental Science and Technology* 27 (8): 1625-1631.

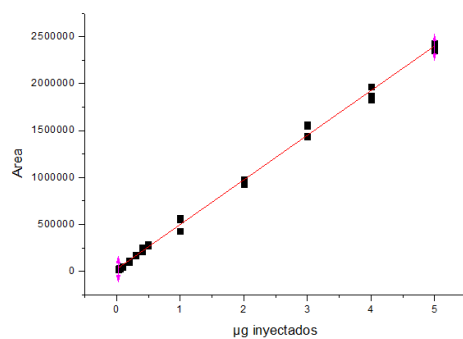
Zheng, S., Chen, B., Qiu, X., Chen, M., Ma, Z., Yu, X. 2016. «Distribution and Risk Assessment of 82 Pesticides in Jiulong River and Estuary in South China». *Chemosphere* 144: 1177-1192.

## **ANEXOS**

## ANEXO 1.

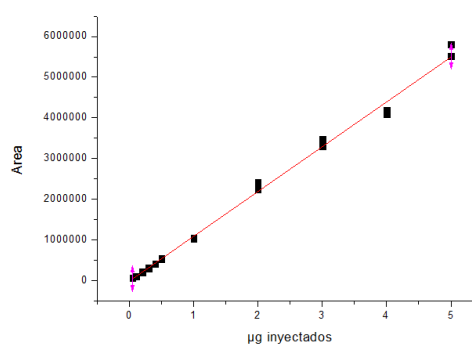
### CURVAS DE CALIBRACIÓN.

#### INDOLINA



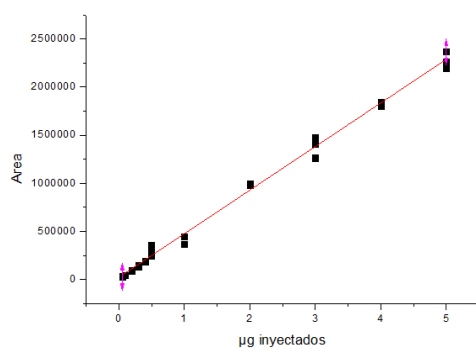
Equation	$y = a + b \cdot x$	
Adj. R-Square	0,99718	
		Value
Area	Intercept	23213,59348
Area	Slope	475609,36732

#### ÁCIDO INDOL 2 CARBOXÍLICO



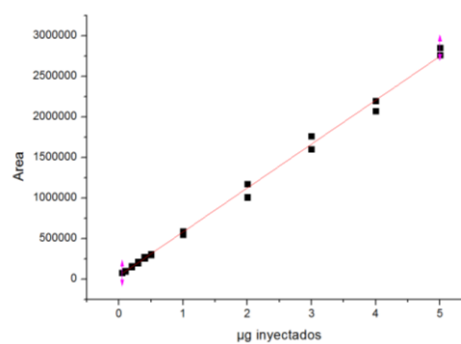
Equation	$y = a + b \cdot x$	
Adj. R-Square	0,99572	
		Value
Area	Intercept	-10248,29503
Area	Slope	1,10066E6

#### INDOL 3 CARBALDEHÍDO

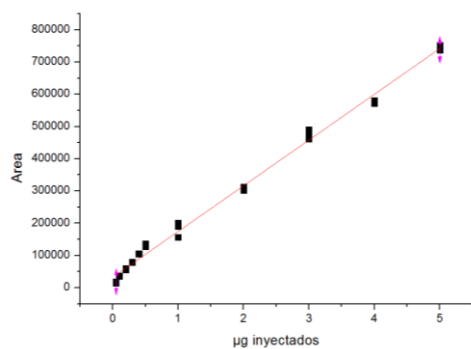


Equation	$y = a + b \cdot x$	
Adj. R-Square	0,9949	
		Value
Area	Intercept	22220,3519
Area	Slope	453152,94889

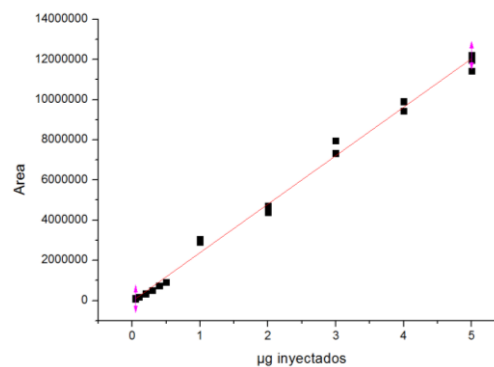
#### ÁCIDO INDOL 3 CARBOXILÍCO



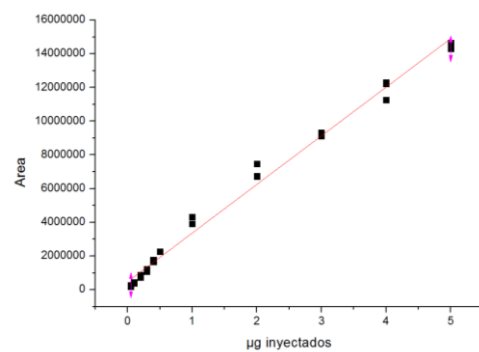
Equation	$y = a + b \cdot x$	
Adj. R-Square	0,99655	
		Value
Area	Intercept	39380,38453
Area	Slope	541809,7957

**ÁCIDO INDOL 3-ACÉTICO**

Equation	$y = a + b \cdot x$	
Adj. R-Square	0,9944	
		Value
Area	Intercept	32559,74181
Area	Slope	141906,25598

**INDOL 5 CARBALDEHÍDO**

Equation	$y = a + b \cdot x$	
Adj. R-Square	0,99375	
		Value
Area	Intercept	-29531,69277
Area	Slope	2,41522E6

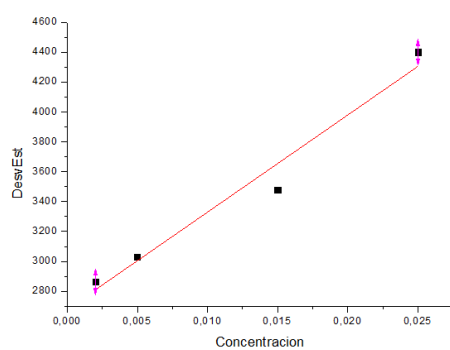
**ÁCIDO INDOL 5 CARBOXILÍCO**

Equation	$y = a + b \cdot x$	
Adj. R-Square	0,99056	
		Value
Area	Intercept	476116,25474
Area	Slope	2,88642E6

## ANEXO 2.

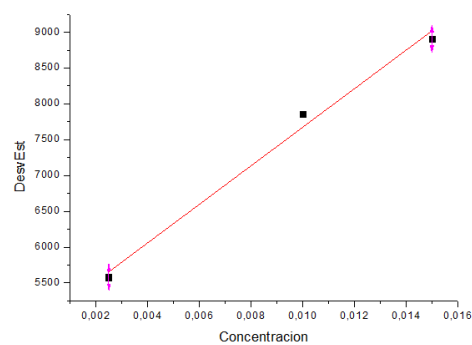
## CURVAS DE DESVIACIÓN ESTANDAR

## INDOLINA



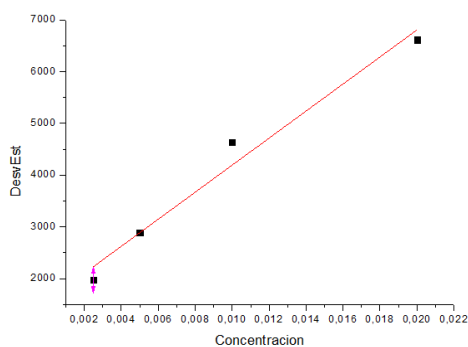
Equation	$y = a + b \cdot x$	
Adj. R-Square	0,95385	
		Value
DesvEst	Intercept	2679,8766
DesvEst	Slope	64973,83802

## ÁCIDO INDOL 2 CARBOXÍLICO



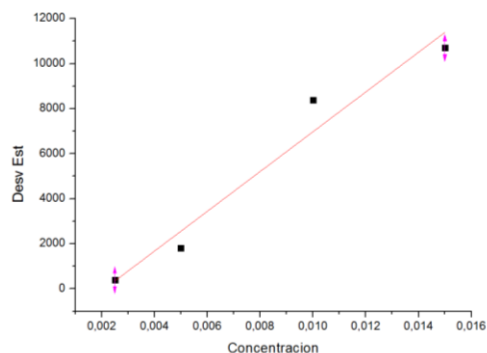
Equation	$y = a + b \cdot x$	
Adj. R-Square	0,98155	
		Value
DesvEst	Intercept	4981,01954
DesvEst	Slope	269238,19898

## INDOL 3 CARBALDEHÍDO

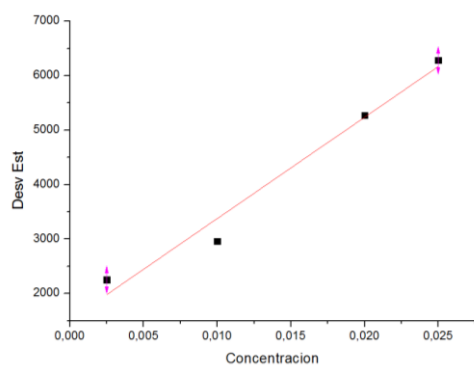


Equation	$y = a + b \cdot x$	
Adj. R-Square	0,96388	
		Value
DesvEst	Intercept	1580,34783
DesvEst	Slope	261269,56522

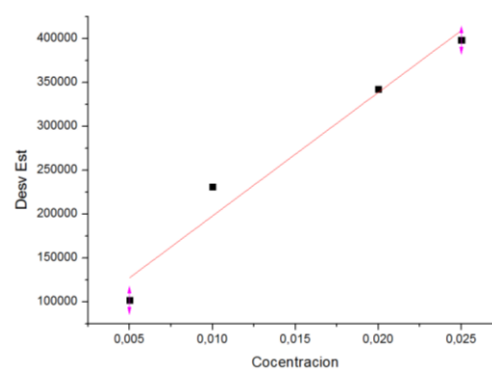
## ÁCIDO INDOL 3 CARBOXILÍCO



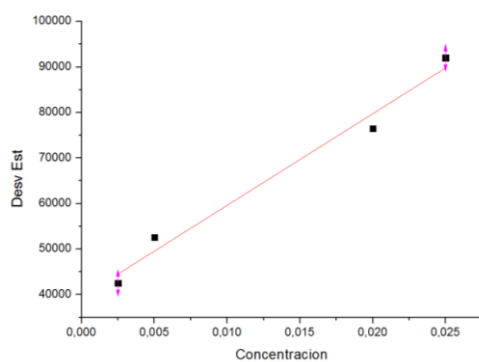
Equation	$y = a + b \cdot x$	
Adj. R-Square	0,93947	
		Value
Desv Est	Intercept	-1857,08322
Desv Est	Slope	883093,62712

**ÁCIDO INDOL 3-ACÉTICO**

Equation	$y = a + b \cdot x$	
Adj. R-Square	0,96382	
		Value
Desv Est	Intercept	1515,37151
Desv Est	Slope	186072,93473

**INDOL 5 CARBALDEHÍDO**

Equation	$y = a + b \cdot x$	
Adj. R-Square	0,94537	
		Value
Desv Est	Intercept	56765,735
Desv Est	Slope	1,41021E7

**ÁCIDO INDOL 5 CARBOXILÍCO**

Equation	$y = a + b \cdot x$	
Adj. R-Square	0,97113	
		Value
Desv Est	Intercept	39490,17072
Desv Est	Slope	2,0127E6

## ANEXO 3.

## FIGURAS DE MERITO PARA VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Compuesto	Conc. Agregada ( $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )	PRECISIÓN				EXACTITUD		
		Conc. Encontrada ( $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )			CV (%)	Conc. Medida ( $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )	% Rec.	Promedio % Rec.
		Día 1	Día 2	Día 3				
Indolina	0,250	0,242	0,243	0,248	1,316	0,248	99,20	101,73
	0,100	0,095	0,099	0,098	2,139	0,098	98,00	
	0,025	0,027	0,028	0,028	2,087	0,027	108,00	
Ac. Indol 2-carboxílico	0,250	0,304	0,303	0,291	2,417	0,276	110,40	110,47
	0,100	0,111	0,113	0,116	2,221	0,113	113,00	
	0,025	0,028	0,027	0,027	2,112	0,027	108,00	
Indol 3-carbaldehído	0,250	0,245	0,230	0,242	3,321	0,245	98,00	102,00
	0,100	0,111	0,112	0,112	0,517	0,112	112,00	
	0,025	0,023	0,024	0,024	2,440	0,024	96,00	
Ac. Indol 3-carboxílico	0,250	0,250	0,240	0,248	2,151	0,250	100,00	97,33
	0,100	0,095	0,090	0,096	3,432	0,096	96,00	
	0,025	0,025	0,024	0,024	2,373	0,024	96,00	
Ac. Indol 3-acético	0,250	0,221	0,230	0,235	3,103	0,293	117,20	102,73
	0,100	0,100	0,103	0,106	2,913	0,103	103,00	
	0,025	0,024	0,022	0,023	4,348	0,022	88,00	
Indol 5-carbaldehído	0,250	0,266	0,258	0,258	1,772	0,258	103,20	100,40
	0,100	0,103	0,108	0,098	4,854	0,098	98,00	
	0,025	0,027	0,026	0,025	3,846	0,025	100,00	
Ac. Indol 5-carboxílico	0,250	0,251	0,256	0,258	1,414	0,256	102,40	101,47
	0,100	0,107	0,098	0,106	4,758	0,106	106,00	
	0,025	0,025	0,026	0,024	4,000	0,024	96,00	

## ANEXO 4.

## BIOENSAYO DE GERMINACIÓN

## • INDOLINA

	MATRIZ ESTÉRIL			
SEMILLA	Control		250 µg/mL	
	Germ.	Biomasa	Germ.	Biomasa
Ballica	28	ND	0	ND
Avena	14	ND	2	ND
Trigo	27	1,031	9	0,146
Cebada	15	ND	0	ND
Maíz	7	0,1661	5	0,114
SEMILLA	Control		100 µg/mL	
	Germ.	Biomasa	Germ.	Biomasa
Ballica	28	0,105	27	0,062
Avena	18	0,696	13	0,452
Trigo	27	0,877	20	0,788
Cebada	15	1,017	9	0,449
Maíz	5	0,256	4	0,177

## • ÁCIDO INDOL 2-CARBOXÍLICO

	MATRIZ ESTÉRIL				MATRIZ SUELO			
SEMILLA	Control		250 µg/mL		Control		250 µg/mL	
	Germ.	Biomasa	Germ.	Biomasa	Germ.	Biomasa	Germ.	Biomasa
Ballica	13	0,026	4	0,000	17	0,128	14	0,065
Avena	15	0,557	10	0,267	18	0,982	17	0,805
Trigo	27	1,131	24	0,598	20	0,427	12	0,218
Cebada	14	1,009	13	0,510	15	0,492	14	0,487
Maíz	13	1,158	11	0,892	13	0,760	7	0,320
SEMILLA	Control		100 µg/mL		Control		100 µg/mL	
	Germ.	Biomasa	Germ.	Biomasa	Germ.	Biomasa	Germ.	Biomasa
Ballica	10	0,026	11	0,019	11	0,041	12	0,028
Avena	15	0,630	17	0,509	18	1,100	17	1,020
Trigo	26	1,169	26	0,754	23	0,226	14	0,118
Cebada	13	0,870	13	0,513	13	0,079	12	0,092
Maíz	13	1,226	13	1,091	12	0,423	8	0,291



• **INDOL 3-CARBALDEHÍDO**

SEMILLA	MATRIZ ESTÉRIL				MATRIZ SUELO			
	Control		250 µg/mL		Control		250 µg/mL	
	Germ.	Biomasa	Germ.	Biomasa	Germ.	Biomasa	Germ.	Biomasa
Ballica	28	0,075	25	0,039	26	0,154	26	0,145
Avena	13	0,592	9	0,237	19	1,172	19	1,121
Trigo	33	1,453	25	0,927	24	0,866	24	0,743
Cebada	14	0,952	10	0,399	15	1,036	14	0,954
Maíz	14	1,275	13	1,194	12	1,401	12	2,105

SEMILLA	Control		100 µg/mL		Control		100 µg/mL	
	Germ.	Biomasa	Germ.	Biomasa	Germ.	Biomasa	Germ.	Biomasa
	Ballica	23	0,081	26	0,052	27	0,128	28
Avena	16	0,689	16	0,493	18	1,211	19	1,279
Trigo	28	1,271	27	0,972	25	1,252	26	1,086
Cebada	15	1,035	15	0,847	15	0,853	17	0,998
Maíz	12	1,168	13	0,985	13	1,588	14	1,657

• **ÁCIDO INDOL 3-CARBOXÍLICO**

SEMILLA	MATRIZ ESTÉRIL				MATRIZ SUELO			
	Control		250 µg/mL		Control		250 µg/mL	
	Germ.	Biomasa	Germ.	Biomasa	Germ.	Biomasa	Germ.	Biomasa
Ballica	25	0,051	23	0,035	13	0,042	14	0,041
Avena	16	0,363	16	0,292	19	0,945	17	0,871
Trigo	28	1,098	27	0,918	18	0,423	17	0,399
Cebada	9	0,300	9	0,255	11	0,245	10	0,220
Maíz	14	1,658	14	1,494	12	0,585	13	0,972

SEMILLA	Control		100 µg/mL		Control		100 µg/mL	
	Germ.	Biomasa	Germ.	Biomasa	Germ.	Biomasa	Germ.	Biomasa
	Ballica	23	0,044	23	0,039	22	0,092	25
Avena	16	0,266	17	0,300	18	1,126	18	1,042
Trigo	25	0,576	25	0,788	25	0,576	25	0,788
Cebada	9	0,281	7	0,309	12	0,256	10	0,256
Maíz	8	0,228	7	0,163	8	0,226	7	0,163

• **ÁCIDO INDOL 3-ACÉTICO**

SEMILLA	MATRIZ ESTÉRIL				MATRIZ SUELO			
	Control		250 µg/mL		Control		250 µg/mL	
	Germ.	Biomasa	Germ.	Biomasa	Germ.	Biomasa	Germ.	Biomasa
Ballica	26	0,008	8	0,003	8	0,013	9	0,012
Avena	16	0,144	7	0,089	16	0,488	16	0,495
Trigo	21	0,391	25	0,369	22	0,392	22	0,344
Cebada	10	0,137	4	0,098	11	0,142	12	0,175
Maíz	11	0,614	12	0,507	9	0,222	8	0,271

SEMILLA	Control		100 µg/mL		Control		100 µg/mL	
	Germ.	Biomasa	Germ.	Biomasa	Germ.	Biomasa	Germ.	Biomasa
	Ballica	26	0,041	18	0,016	4	0,010	5
Avena	12	0,089	7	0,053	16	0,582	17	0,708
Trigo	26	0,617	24	0,409	17	0,144	20	0,233
Cebada	8	0,235	11	0,194	12	0,092	10	0,141
Maíz	12	0,635	10	0,483	8	0,075	6	0,046

• **INDOL 5-CARBALDEHÍDO**

SEMILLA	MATRIZ ESTÉRIL				MATRIZ SUELO			
	Control		250 µg/mL		Control		250 µg/mL	
	Germ.	Biomasa	Germ.	Biomasa	Germ.	Biomasa	Germ.	Biomasa
Ballica	25	0,090	22	0,045	16	0,094	17	0,078
Avena	18	1,154	17	0,895	17	0,769	15	0,531
Trigo	22	1,168	16	0,651	25	1,215	21	1,109
Cebada	18	0,187	18	0,175	13	0,100	9	0,095
Maíz	8	1,952	7	1,699	11	0,667	9	0,412

SEMILLA	Control		100 µg/mL		Control		100 µg/mL	
	Germ.	Biomasa	Germ.	Biomasa	Germ.	Biomasa	Germ.	Biomasa
	Ballica	25	-	25	-	11	0,052	16
Avena	17	-	17	-	18	1,194	17	1,038
Trigo	24	-	24	-	27	0,988	26	0,920
Cebada	14	-	14	-	7	0,156	10	0,176
Maíz	-	-	-	-	13	1,716	14	2,236



**ANEXO 5.**  
PRUEBA ANTIALGAL

En la tabla se observan los valores de transmitancia de la prueba antialgal de los compuestos en estudio.

Compuesto	25 (µg/mL)	50 (µg/mL)	100 (µg/mL)	250 (µg/mL)	Control
<b>Ac. Indol 2 carboxílico</b>	17,93	25,29	23,58	21,69	0,84
<b>Indol 3-carbaldehído</b>	35,74	20,60	11,74	16,74	0,74
<b>Ac. Indol 3 carboxílico</b>	0,50	0,51	0,54	0,63	0,60
<b>Ac. Indol 3-acético</b>	0,34	0,34	0,38	0,49	0,62
<b>Indol 5-carbaldehído</b>	3,60	13,85	17,00	21,00	0,60
<b>Ac. Indol 5 carboxílico</b>	ND	92,60	0,78	0,78	0,78

Ejemplo cálculo % Inhibición algal – **Ac. Indol 2-carboxílico (50 µg/mL)**.

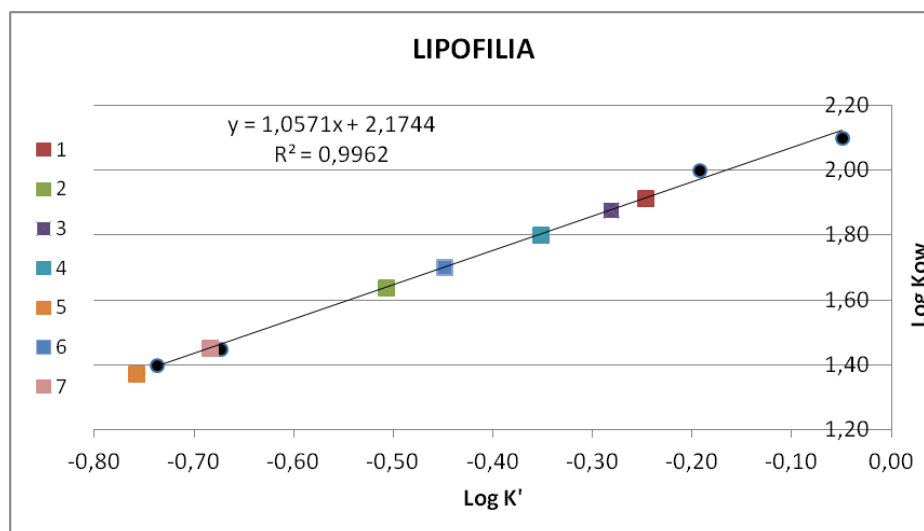
$$\%I = 100 \frac{(T_s - T_c)}{(100 - T_c)}$$

$$\%I = 100 \frac{(25,29 - 0,84)}{(100 - 0,84)} = 24,65$$

## ANEXO 6.

## DETERMINACIÓN LIPOFILIA

	Compuesto	t <sub>R</sub> Compuesto	t <sub>R</sub> Tiourea	K'	Log K'	Log P <sub>HPLC</sub>
1	Indolina	2,11	1,35	0,57	-0,25	1,91
2	Ac. Indol 2 carboxílico	1,97	1,50	0,31	-0,51	1,64
3	Indol 3-carbaldehído	1,92	1,26	0,52	-0,28	1,88
4	Ac. Indol 3 carboxílico	2,02	1,40	0,44	-0,35	1,80
5	Ac. Indol 3-acético	1,48	1,26	0,17	-0,76	1,37
6	Indol 5-carbaldehído	1,60	1,18	0,36	-0,45	1,70
7	Ac. Indol 5 carboxílico	1,43	1,18	0,21	-0,68	1,45



Ejemplo cálculo lipofilia – **Ac. Indol 2-carboxílico**.

$$K' = \frac{(1,97 - 1,50)}{1,50} = 0,311$$

De aquí se obtiene el Log K' = - 0,5071 ≈ - 0,51

A partir de la ecuación de la recta (Y = 1,0571 X + 2,1744), se obtiene el Log P<sub>HPLC</sub>.

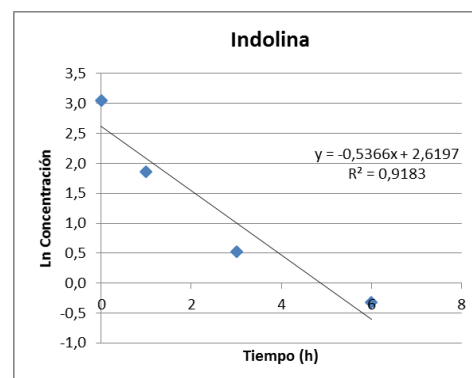
$$\text{LogP}_{HPLC} = (1,0571 * -0,5071) + 2,1744 = 1,6383 \approx 1,64$$

## ANEXO 7.

## DETERMINACIÓN PERSISTENCIA

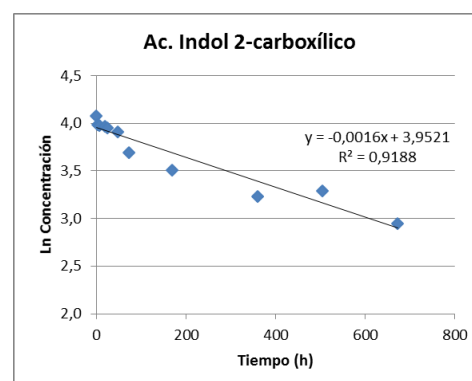
## • INDOLINA

Tiempo (h)	Ln Conc.	% Liberación
0	3,046	4,205
1	1,860	1,284
3	0,530	0,340
6	-0,323	0,145



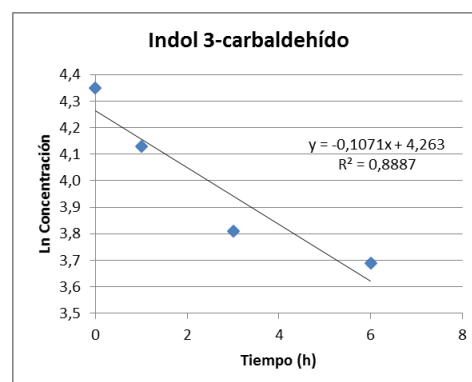
## • ÁCIDO INDOL 2-CARBOXÍLICO

Tiempo (h)	Ln Conc	% Liberación
0	4,075	11,764
3	3,988	10,794
6	3,978	10,679
18	3,969	10,587
24	3,951	10,403
48	3,913	10,011
72	3,689	8,004
168	3,509	6,684
360	3,232	5,064
504	3,287	5,350
672	2,947	3,811



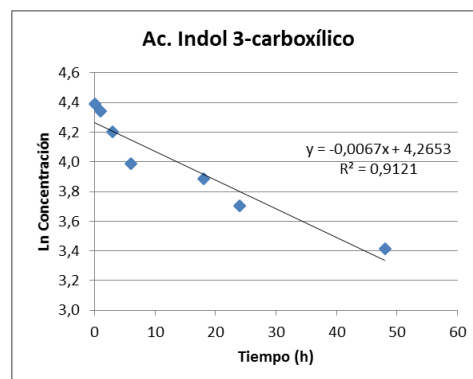
## • INDOL 3-CARBALDEHÍDO

Tiempo (h)	Ln Conc.	% Liberación
0	4,350	15,490
1	4,130	12,442
3	3,811	9,067
6	3,690	8,009



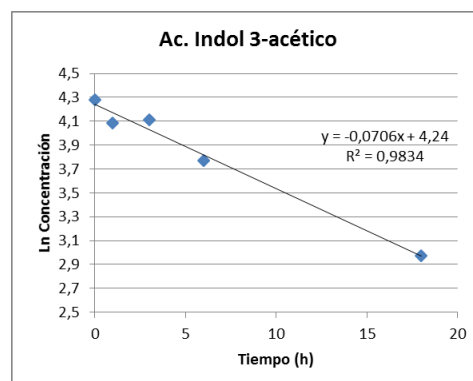
### • ÁCIDO INDOL 3 CARBOXÍLICO

Tiempo (h)	Ln Conc..	% Liberación
0	4,387	16,086
3	4,340	15,346
6	4,200	13,334
18	3,990	10,814
24	3,886	9,740
48	3,706	8,136
168	3,416	6,092



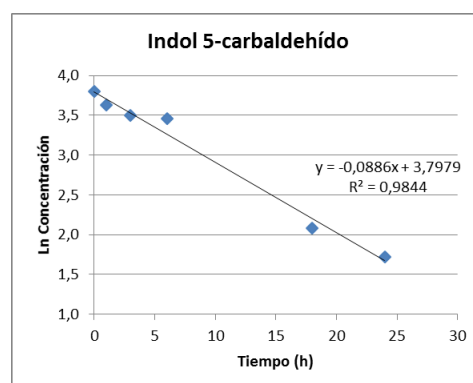
### • ÁCIDO INDOL 3-ACÉTICO

Tiempo (h)	Ln Conc.	% Liberación
0	4,278	14,418
1	4,084	11,878
3	4,114	12,235
6	3,773	8,705
18	2,974	3,913



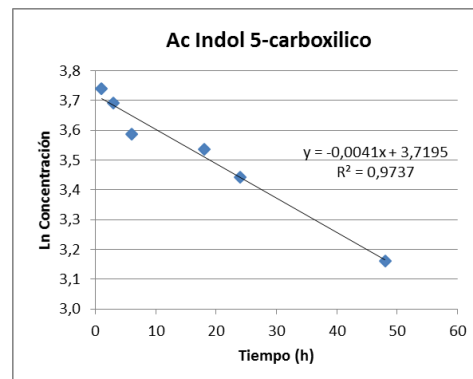
### • INDOL 5-CARBALDEHÍDO

Tiempo (h)	Ln Conc.	% Liberación
0	3,796	8,908
1	3,625	7,508
3	3,498	6,612
6	3,455	6,334
18	2,079	1,600
24	1,723	1,120



• **ÁCIDO INDOL 5-CARBOXÍLICO**

Tiempo (h)	Ln Conc..	% Liberación
0	4,089	11,940
1	3,741	8,428
3	3,691	8,020
6	3,588	7,230
18	3,537	6,873
24	3,444	6,259
48	3,162	4,724
168	3,118	4,522



Ejemplo cálculo Persistencia – **Ac. Indol 2-carboxílico (3h)**.

Área determinada HPLC = 583.796, según la ecuación de la recta en la curva de calibración, se obtiene que:

$$C_e \text{ (mg/L)} = \frac{\left(\frac{583796 + 10248,3}{1100660}\right)}{0,02} = 26,98$$

$$C_e \text{ (mg)} = 26,98 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times 10 \text{ mL} = 0,269$$

Teniendo en cuenta los 5 g de suelo usados para este ensayo, se tiene que:

$$C_e \text{ (mg/Kg)} = \frac{0,269 \text{ mg}}{5,00 \text{ g}} \times \frac{1000 \text{ g}}{1 \text{ Kg}} = 53,97$$

$$\text{Ln } C_e = \text{Ln} (53,97) = 3,98$$

Por otro lado, el porcentaje de compuesto obtenido en la muestra es:

$$\% \text{ liberación} = \frac{100 \times C_e \text{ (mg/L)}}{C_a \text{ (mg/L)}}$$

$$\% \text{ liberación} = \frac{100 \times 26,98}{250} = 10,79$$



## ANEXO 8.

## DETERMINACIÓN TIEMPO DE EQUILIBRIO

Tiempo (h)	Ác. indol 2-carboxílico	Indol 3-carbaldehído	Ác. indol 3-carboxílico	Ác. indol 3-acético	Indol 5-carbaldehído	Ác. indol 5-carboxílico
-	Cs (µg/g)	Cs (µg/g)	Cs (µg/g)	Cs (µg/g)	Cs (µg/g)	Cs (µg/g)
3	362,02	191,83	391,99	210,29	77,61	543,91
6	439,93	396,54	622,79	323,87	212,32	604,24
8	461,35	489,45	726,45	430,52	394,28	651,79
18	515,79	545,73	719,97	881,13	553,57	717,45
24	542,48	-	-	1001,30	592,34	765,89
48	597,09	-	-	1117,77	-	-
72	606,00	-	-	-	-	-

Ejemplo cálculo Tiempo de equilibrio – **Ac. Indol 2-carboxílico (3h)**.

Área determinada HPLC = 1.391.753, según la ecuación de la recta en la curva de calibración, se obtiene que:

$$C_e (\mu g/mL) = \frac{\left(\frac{1391753 + 10248,3}{1100660}\right)}{0,02} = 63,689$$

La concentración inicial fue 100 µg/mL, por lo tanto se tiene que:

$$C_s (\mu g/mL) = C_i - C_e$$

$$C_s (\mu g/mL) = 100 - 63,689 = 36,31$$

$$C_s (\mu g) = 36,31 \frac{\mu g}{mL} \times 10 mL = 363,1$$

Teniendo en cuenta la masa de suelo usado para este ensayo, se tiene que:

$$C_s (\mu g/g) = \frac{363,1 \mu g}{1,003 g}$$

$$C_s (\mu g/g) = 362,02$$

**ANEXO 9.****MODELO CINÉTICO DE ELOVICH****• ÁCIDO INDOL 2-CARBOXÍLICO**

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Ln tiempo</b>	<b>Cs experimental. (µg/g)</b>	<b>Cs teórico. (µg/g)</b>	<b>ARE</b>
3	1,10	361,642	536,097	2,278
6	1,79	439,592	663,019	2,359
<b>8</b>	2,08	461,027	715,697	2,491
18	2,89	515,497	864,186	2,824
24	3,18	542,211	916,863	2,860
48	3,87	596,850	1043,786	2,997
72	4,28	605,762	1118,030	3,207

**• INDOL 3-CARBALDEHÍDO**

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Ln tiempo</b>	<b>Cs experimental. (µg/g)</b>	<b>Cs teórico. (µg/g)</b>	<b>ARE</b>
3	1,10	191,832	588,229	2,696
6	1,79	396,537	851,036	2,136
<b>8</b>	2,08	489,449	960,110	1,961
18	2,89	545,733	1267,574	2,278

**• ÁCIDO INDOL 3 CARBOXÍLICO**

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Ln tiempo</b>	<b>Cs experimental. (µg/g)</b>	<b>Cs teórico. (µg/g)</b>	<b>ARE</b>
3	1,10	391,994	745,290	2,370
6	1,79	622,792	960,588	1,758
<b>8</b>	2,08	685,622	1049,945	1,735
18	2,89	726,450	1301,828	2,210
24	3,18	719,972	1391,185	2,412

• **ÁCIDO INDOL 3-ACÉTICO**

Tiempo (h)	Ln tiempo	Cs experimental. (µg/g)	Cs teórico. (µg/g)	ARE
3	1,10	210,295	876,036	4,560
6	1,79	323,868	1431,607	4,643
<b>8</b>	<b>2,08</b>	<b>430,524</b>	<b>1662,190</b>	<b>4,446</b>
18	2,89	881,128	2312,167	3,714
24	3,18	1001,299	2542,750	3,637
48	3,87	1117,766	3098,321	3,835

• **INDOL 5-CARBALDEHÍDO**

Tiempo (h)	Ln tiempo	Cs experimental. (µg/g)	Cs teórico. (µg/g)	ARE
3	1,10	77,610	555,734	4,302
6	1,79	212,324	908,067	3,831
<b>8</b>	<b>2,08</b>	<b>394,276</b>	<b>1054,299</b>	<b>3,130</b>
18	2,89	553,570	1466,503	3,113
24	3,18	592,343	1612,734	3,164

• **ÁCIDO INDOL 5-CARBOXÍLICO**

Tiempo (h)	Ln tiempo	Cs experimental. (µg/g)	Cs teórico. (µg/g)	ARE
3	1,10	543,914	742,661	1,338
6	1,79	604,240	878,469	1,561
<b>8</b>	<b>2,08</b>	<b>651,790</b>	<b>934,835</b>	<b>1,514</b>
18	2,89	717,449	1093,721	1,720
24	3,18	765,892	1150,086	1,670

**ANEXO 10.****ISOTERMAS DE ADSORCIÓN****• ÁCIDO INDOL 2-CARBOXÍLICO**

	<b>Ca.</b> <b>(µg/mL)</b>	<b>Ce</b> <b>(µg/mL)</b>	<b>Cs</b> <b>(µg/g)</b>	<b>Langmuir</b> <b>Ce/Cs</b>	<b>Freundlich</b> <b>Log Ce</b>	<b>Freundlich</b> <b>Log Cs</b>
1	0	0	0	0	0	0
2	10	6,431	3,573	1,800	0,808	0,553
3	20	14,705	10,601	1,387	1,167	1,025
4	30	18,126	35,657	0,508	1,258	1,552
5	40	25,093	59,686	0,420	1,400	1,776
6	50	28,051	109,854	0,255	1,448	2,041
7	60	36,966	138,343	0,267	1,568	2,141
8	70	38,608	219,961	0,176	1,587	2,342
9	80	42,511	300,212	0,142	1,629	2,477
10	90	50,529	355,593	0,142	1,704	2,551
11	100	60,221	398,191	0,151	1,780	2,600

**• INDOL 3-CARBALDEHÍDO**

	<b>Ca.</b> <b>(µg/mL)</b>	<b>Ce</b> <b>(µg/mL)</b>	<b>Cs</b> <b>(µg/g)</b>	<b>Langmuir</b> <b>Ce/Cs</b>	<b>Freundlich</b> <b>Log Ce</b>	<b>Freundlich</b> <b>Log Cs</b>
1	0	0	0	0	0	0
2	25	0	25,025	0	0	1,398
3	50	0	100,100	0	0	2,000
4	75	3,025	216,141	0,014	0,481	2,335
5	100	15,045	340,161	0,044	1,177	2,532
6	125	25,366	498,668	0,051	1,404	2,698
7	150	33,902	697,283	0,049	1,530	2,843
8	175	46,492	900,456	0,052	1,667	2,954
9	200	58,543	1132,793	0,052	1,767	3,054
10	225	67,713	1417,003	0,048	1,831	3,151
11	250	77,043	1731,299	0,045	1,887	3,238

• **ÁCIDO INDOL 3 CARBOXÍLICO**

	<b>Ca.</b> <b>(µg/mL)</b>	<b>Ce</b> <b>(µg/mL)</b>	<b>Cs</b> <b>(µg/g)</b>	<b>Langmuir</b> <b>Ce/Cs</b>	<b>Freundlich</b> <b>Log Ce</b>	<b>Freundlich</b> <b>Log Cs</b>
1	0	0	0	0	0	0
2	10	3,797	6,209	0,612	0,579	0,793
3	20	10,303	19,413	0,531	1,013	1,288
4	30	17,655	37,072	0,476	1,247	1,569
5	40	25,355	58,640	0,432	1,404	1,768
6	50	33,494	82,614	0,405	1,525	1,917
7	60	39,197	124,944	0,314	1,593	2,097
8	70	49,564	143,197	0,346	1,695	2,156
9	80	58,009	176,107	0,329	1,763	2,246
10	90	65,288	222,633	0,293	1,815	2,348
11	100	74,645	253,801	0,294	1,873	2,404

• **ÁCIDO INDOL 3-ACÉTICO**

	<b>Ca.</b> <b>(µg/mL)</b>	<b>Ce</b> <b>(µg/mL)</b>	<b>Cs</b> <b>(µg/g)</b>	<b>Langmuir</b> <b>Ce/Cs</b>	<b>Freundlich</b> <b>Log Ce</b>	<b>Freundlich</b> <b>Log Cs</b>
1	0	0	0	0	0	0
2	25	8,493	16,524	0,514	0,929	1,218
3	50	19,376	61,310	0,316	1,287	1,788
4	75	44,000	93,093	0,473	1,643	1,969
5	100	76,005	96,078	0,500	1,881	1,983
6	125	91,120	169,570	0,537	1,960	2,229
7	150	124,128	155,385	0,799	2,094	2,191
8	175	141,693	233,379	0,607	2,151	2,368
9	200	164,448	284,704	0,578	2,216	2,454
10	225	181,731	389,810	0,466	2,259	2,591
11	250	198,911	511,401	0,389	2,299	2,709

• **INDOL 5-CARBALDEHÍDO**

	<b>Ca.</b> <b>(µg/mL)</b>	<b>Ce</b> <b>(µg/mL)</b>	<b>Cs</b> <b>(µg/g)</b>	<b>Langmuir</b> <b>Ce/Cs</b>	<b>Freundlich</b> <b>Log Ce</b>	<b>Freundlich</b> <b>Log Cs</b>
1	0	0	0	0	0	0
2	25	5,000	20,020	0,250	0,699	1,301
3	50	10,000	80,080	0,125	1,000	1,904
4	75	15,000	180,180	0,083	1,176	2,256
5	100	20,000	320,320	0,062	1,301	2,506
6	125	37,459	438,142	0,085	1,574	2,642
7	150	63,127	521,762	0,121	1,800	2,717
8	175	90,000	595,596	0,151	1,954	2,775
9	200	115,384	677,604	0,170	2,062	2,831
10	225	127,607	877,417	0,145	2,106	2,943
11	250	140,000	1101,101	0,127	2,146	3,042

• **ÁCIDO INDOL 5-CARBOXÍLICO**

	<b>Ca.</b> <b>(µg/mL)</b>	<b>Ce</b> <b>(µg/mL)</b>	<b>Cs</b> <b>(µg/g)</b>	<b>Langmuir</b> <b>Ce/Cs</b>	<b>Freundlich</b> <b>Log Ce</b>	<b>Freundlich</b> <b>Log Cs</b>
1	0	0	0	0	0	0
2	10	0	10,010	0	0	1,000
3	20	2,748	34,538	0,080	0,439	1,538
4	30	3,250	80,330	0,040	0,512	1,905
5	40	11,395	114,534	0,060	1,057	2,059
6	50	14,352	178,418	0,080	1,157	2,251
7	60	25,568	206,798	0,124	1,408	2,316
8	70	27,028	301,106	0,090	1,432	2,479
9	80	30,729	394,563	0,078	1,488	2,596
10	90	39,526	454,722	0,087	1,597	2,658
11	100	49,485	505,659	0,098	1,694	2,704

Ejemplo cálculo ISOTERMAS DE ADSORCIÓN – **Ac. Indol 2-carboxílico (3)**.

Área determinada HPLC = 313.255, según la ecuación de la recta en la curva de calibración, se obtiene que:

$$C_e (\mu g/mL) = \frac{\left(\frac{313255 + 10248,3}{1100660}\right)}{0,02} = 14,70$$

La concentración inicial fue 20  $\mu g/mL$ , por lo tanto se tiene que:

$$C_s (\mu g/mL) = C_i - C_e$$

$$C_s (\mu g/mL) = 20 - 14,70 = 5,30$$

$$C_s (\mu g) = 5,30 \frac{\mu g}{mL} \times 2 mL = 10,61$$

Teniendo en cuenta la masa de suelo usado para este ensayo, se tiene que:

$$C_s (\mu g/g) = \frac{10,61 \mu g}{0,999 g} = 10,601$$

Ejemplo cálculo MODELO DE LANGMUIR.

A partir de los datos obtenidos en las isotermas de adsorción, se obtiene  $C_e/C_s$ , para el modelo de Langmuir y se realiza la linealización del modelo, graficando  $1/C_e$  vs  $1/C_e/C_s$

Ejemplo cálculo MODELO DE LANGMUIR – **Indol 3-carbaldehído**.

$$Q_o = \frac{1}{\text{Pendiente}} = \frac{1}{164.37} = 0.0061$$

$$b = \frac{1}{\text{Intercepto}} = \frac{1}{16.113} = 0.0621$$

Para el cálculo del parámetro de Langmuir  $R_L$ , se toma la concentración  $C = 250mg/L$ , la cual es la mayor concentración agregada en la adsorción (Vega y col., 2011, Medina y col., 2014).

$$R_L = \frac{1}{(1 + bC)} = \frac{1}{(1 + (0.0621 \times 250))} = 0.0605$$

Ejemplo cálculo MODELO DE FREUNDLICH.

A partir de los datos obtenidos en las isotermas de adsorción, se obtiene  $\text{Log } C_e$  y  $\text{Log } C_s$ .

**ANEXO 11.**  
**DETERMINACIÓN LIXIVIACIÓN**

Concentración encontrada de los compuestos en el lixiviado. ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

<b>Aforo</b>	<b>Ác. indol 2-carboxílico</b>	<b>Indol 3-carbaldehído</b>	<b>Ác. indol 3-carboxílico</b>	<b>Ác. indol 3-acético</b>	<b>Indol 5-carbaldehído</b>	<b>Ác. indol 5-carboxílico</b>	<b>Gramina</b>	<b>Indol</b>
<b>1</b>	68,427	-	27,611	27,485	-	26,620	-	-
<b>2</b>	53,749	6,376	51,409	18,737	-	43,917	-	-
<b>3</b>	51,116	3,036	46,977	13,005	9,824	43,580	-	47,879
<b>4</b>	49,715	-	37,262	10,547	10,533	35,998	-	53,975

Concentración encontrada de los compuestos en las fracciones de la columna.

<b>Profundidad cm</b>	<b>Ác. indol 2-carboxílico</b>	<b>Indol 3-carbaldehído</b>	<b>Ác. indol 3-carboxílico</b>	<b>Ác. indol 3-acético</b>	<b>Indol 5-carbaldehído</b>	<b>Ác. indol 5-carboxílico</b>	<b>Gramina</b>	<b>Indol</b>
<b>0 - 5</b>	4,508	-	-	-	1,634	-	5,732	0,475
<b>5 - 10</b>	4,088	-	-	-	1,571	-	-	0,355
<b>10 - 15</b>	3,708	-	-	-	1,561	-	-	0,136
<b>15 - 20</b>	4,057	-	-	-	1,546	-	-	0,907