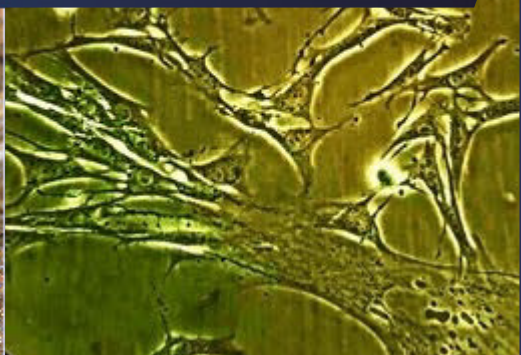




UNIVERSIDAD RICARDO PALMA

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN



FACULTAD DE
CIENCIAS
BIOLÓGICAS

INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS BIOLÓGICAS

Células madre y Ecotoxicología

José Alberto Iannacone Oliver
Hugo Mauricio Gonzales Molfino



SERIE: CUADERNO DE INVESTIGACIÓN
Publicación del Vicerrectorado de Investigación

2018

**INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
BIOLÓGICAS**
Células madre y Ecotoxicología

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN

INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS BIOLÓGICAS
Células madre y Ecotoxicología

Lima

Perú

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN

RECTOR : Dr. Iván Rodríguez Chávez
VICERRECTOR ACADÉMICO : Dr. José Martínez Llaque
VICERRECTOR DE INVESTIGACIÓN : Dr. Héctor Hugo Sánchez Carlessi
DECANO DE LA FACULTAD
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS : Dr. Tomás Agurto Saenz
SECRETARIO GENERAL : Lic. Andrés Maldonado Herrera

EDITORES:

Vicerrectorado de Investigación.
Héctor Hugo Sánchez Carlessi
José Iannacone Oliver
H. Mauricio Gonzales Molfino

AUTORES: Dr. José Iannacone Oliver
Mag. H. Mauricio Gonzales Molfino

INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS BIOLÓGICAS
Células madre y Ecotoxicología

Autores:

José Iannacone Oliver

H. Mauricio Gonzales Molfino

Derechos Reservados

Primera Edición, Julio 2018

500 Ejemplares

Publicado: Julio 2018

Editado por:

©Universidad Ricardo Palma

Vicerrectorado de Investigación

Av. Benavides 5440, Santiago de Surco

Telf.: 708 0000 Anexo: 0012

vice.investigacion@urp.edu.pe

ISBN N°

Hecho el depósito legal en la Biblioteca Nacional del Perú N°

Impreso en julio del 2018 en:

Bussiness Support Aneth S.R.L.

Av. Marginal 259 Ate, Lima-Perú

Telf.: (01) 991 258 218

Email: business.aneth@yahoo.com

Lima, Perú

PRESENTACIÓN

Continuando con la política de difusión de los trabajos de investigación realizados por los docentes investigadores de la Universidad Ricardo Palma, ofrecemos este cuarto número de la serie: Cuaderno de Investigación, en esta oportunidad se presentan investigaciones en el campo de las Ciencias Biológicas.

La publicación contiene tres investigaciones que abordan dos temas vigentes, muy importantes para los trabajos de investigación básica en Ciencias Biológicas: la células madre y la ecotoxicología. Los tres estudios han sido desarrollados por destacados profesores investigadores de la Facultad de Ciencias Biológicas de la URP; el primer estudio realizado por el profesor investigador Hugo Gonzales Molfino y colaboradores, denominado: “Evaluación de las concentraciones del plasma rico en plaquetas sobre el cultivo in vitro de células madre obtenida de tejido adipocitario de equino”; el segundo estudio realizado por el profesor investigador José Ianacone en colaboración con Lorena Alvariño, denominado Toxicidad de sales de amonio sobre la lombriz de tierra (*Eisenia Foetida*) (Savigny, 1826) (Annelida:Oligochaeta); y el tercer estudio ha sido realizado por la profesora investigadora Tatiana E. Robles conjuntamente con José Ianacone, denominado “Toxicidad de *Schinus Molle* L. “Molle” (Anacardiaceae) en *Erosina Hybernata* Guenée 1858 (Lepidoptera: Geometridae) en estado larval, plaga del *Tecoma Stans* (Bignoniaceae) en el distrito de Miraflores, Lima-Perú”.

Felicitemos a los docentes investigadores autores de estos estudios reportados, que desde ya forman parte del esfuerzo de la Facultad de Ciencias Biológicas y del Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Ricardo Palma por poner al alcance de la comunidad científica importantes logros de las investigaciones en ciencias biológicas en nuestro país.

Santiago de Surco, junio del 2018

Héctor Hugo Sánchez Carlessi
Vicerrector de Investigación

CAPÍTULO 1 / CHAPTER 1

EVALUACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DEL PLASMA RICO EN PLAQUETAS SOBRE EL CULTIVO *IN VITRO* DE CÉLULAS MADRE OBTENIDA DE TEJIDO ADIPOCITARIO DE EQUINO

EVALUATION OF PLATELET-RICH PLASMA CONCENTRATIONS ON THE *IN VITRO* CULTURE OF STEM CELLS OBTAINED FROM ADIPOCYTE EQUINE TISSUE

Hugo Mauricio Gonzales Molfino¹; Yat Sen Wong¹; Sofía Avia¹;
Edwart Rivera¹ & Rodobel Olmos Acevedo²

¹ Universidad Ricardo Palma (URP), Facultad de Ciencias Biológicas (FCB), Laboratorio de Biotecnología Animal.
Av. Alfredo Benavides 5440, Santiago de Surco, Lima, Perú.

² Regimiento de Caballería “Glorioso Húsares de Junín”
Ejercito del Perú

Autor para correspondencia: hugo.gonzales@urp.edu.pe

CONTENIDO

ABSTRACT	11
RESUMEN	12
INTRODUCCIÓN	14
MATERIALES Y MÉTODOS	
• Obtención del material biológico	16
• Aislamiento y cultivo celular	16
• Caracterización molecular	17
• Aislamiento de plasma rico en plaquetas	18
• Aspectos éticos	18
RESULTADOS	19
DISCUSIÓN	21
Conflicto de interés	22
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the influence of different concentrations of 0%, 1% and 10% platelet rich plasma lysate on the in vitro culture of stem cells derived from equine adipocytes. As materials and methods were used a total of 20 samples of adipose tissue, which were extracted from equines benefited in the camal Casablanca - Pachacamac – Lima, Peru and transported to the laboratory. The sample was washed 3 times in PBS buffer supplemented with antibiotics, removing surplus blood and other impurities, at the end this tissue was cut into pieces. These pieces were placed in collagenase type I (5mg / ml) in DMEM medium, for 15 minutes in a water bath at 37 ° C. The pieces that were not digested were removed and the supernatant was sieved into 70um. Subsequently a 1: 1 ratio was diluted in DMEM + 10% FBS medium by centrifuging at 1000 rpm for 10 minutes. The obtained pellet was diluted again with 3 ml of DMEM + 10% FBS and centrifuged again, in order to wash it at the end of this process a final volume of 0.5 ml was obtained. In order to observe the viability of the cells, they were placed with 0.04% Tripan Blue and counted in the Neubauer chamber. For the cell culture DMEM medium low in glucose and supplemented with 10% fetal bovine serum was used A concentration of 10,000 cells / cm² in a flask of 25 cm², at 48 hours post culture the medium was removed, discarding the supernatant and thus eliminating the non-adherent cells. The medium changes were performed every 3 days' post culture when it reached 80% growth confluence, with a maximum of 3 passes per sample. Cells were subjected to 0.25% Trypsin-EDTA and subsequently cryopreserved in cryo-vials submerged in liquid nitrogen until further use in 90% FBS supplemented with 10% DMSO in a 1: 1 dilution. For the molecular characterization, those cells that had a typical morphology in fusiform form, of elongated nucleus and adherent to the typical culture plate of mesenchymal stem cells, were taken into account. Two groups of genes were evaluated, the first group of marker genes that were evaluated were the surface of mesenchymal cells with the genes called cluster of differentiation CD29, CD34, CD44, CD90 and major histocompatibility complex type II (MHCII). The second group was pluripotency marker genes called transcription factors (Nanog and Oct4). For the platelet-rich plasma, we used 06 horses from the Veterinary Hospital of the Peruvian Army, which were given 50 ml of blood, extracted from the jugular area and placed in tubes treated with sodium citrate. Results were isolated and

identified stem cells from adipocyte tissue using genetic surface markers and pluripotency (CD29, CD34, CD44, CD90, MHCII, Nanog, Oct4). With respect to the pluripotentiality markers, only 01 samples showed positive results for NANOG and OCT4. With respect to obtaining the platelet-rich plasma, only four horses presented an optimum performance for the experimentation, having a mean value of 60% of platelets with respect to Number of platelets in whole blood that were selected for the enriched the culture medium. In conclusion, it is possible to obtain stem cells from the adipose tissue of animals benefited, in addition to being able to be used in future cellular therapies.

Keywords: adipose Tissue – cell Culture – equine – mesenchymal cells

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar las diferentes concentraciones del plasma rico en plaquetas 0%, 1% y 10% en el cultivo *in vitro* de células madre derivada de adipocitos equinos. Como materiales y métodos se utilizaron un total de 20 muestras de tejido adiposo, las que fueron extraídas de equinos beneficiados en el camal Casablanca - Pachacamac - Lima, Perú y trasportados al laboratorio. La muestra fueron lavadas 3 veces en buffer PBS suplementado con antibióticos, eliminando los excedentes de sangre y otras impurezas, al término este tejido fue cortado en pedazos. Estos pedazos fueron colocados en colágenasa tipo I ($5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) en medio DMEM, por 15 min en baño maría a 37°C . Los pedazos que no fueron digeridos fueron retirados y el sobrenadante fue tamizado en $70\mu\text{m}$. Posteriormente se diluyó una proporción 1:1 en medio DMEM +10% FBS centrifugándolo a 1000 rpm por 10 minutos. El pellet obtenido fue diluido nuevamente con 3 ml de DMEM + 10% FBS y centrifugado nuevamente, con la finalidad de lavarlo al final de este proceso se obtuvo un volumen final de 0,5 mL. Con la finalidad de observar la viabilidad de las células, éstas fueron colocadas con Azul de Tripán al 0,04 % y contadas en cámara de Neubauer. Para el cultivo celular se utilizó el medio DMEM bajo en glucosa y suplementado con 10% de suero fetal bovino a una concentración $10\,000\text{ cel}\cdot\text{cm}^{-2}$ en un flask de 25 cm^2 , a las 48 h pos cultivo se retiró el medio, descartando el sobrenadante y eliminando así a las células no adherentes. Los cambios de medio fueron realizados cada 3 días pos cultivo cuando este alcanzaba un 80% de confluencia de crecimiento, realizándose como máximo de 3 pasajes por muestra. Las células fueron sometidas a Tripsina-EDTA 0.25% y posteriormente criopreservadas en

crio viales sumergidas en nitrógeno líquido hasta su posterior uso en FBS al 90% suplementado con 10% de DMSO en una dilución 1:1. Para la caracterización molecular, se tomaron en cuenta aquellas células que presentaba una morfología típica en forma fusiforme, de núcleo elongado y adherente a la placa de cultivo característica típica de las células madres mesénquimales. Se evaluaron dos grupos de genes, el primer grupo de genes marcadores que se evaluó son los de superficie de las células mesenquimales con los genes denominados clúster de diferenciación CD29, CD34, CD44, CD90 y el complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (MHCII). El segundo grupo fue de genes marcadores de pluripotencia denominados factores de transcripción (Nanog y Oct4). Para el plasma rico en plaquetas, se utilizaron 6 caballos del Hospital Veterinario del Ejército del Perú, a las que se le obtuvo 50 mL sangre, extraído de la zona yugular y colocados en tubos pre tratados en citrato de sodio. Como resultados se aisló e identificó las células madre a partir de tejido adipocitario usando marcadores genéticos de superficies y pluripotencialidad (CD29, CD34, CD44, CD90, MHCII, Nanog, Oct4). Con respecto a los marcadores de pluripotencialidad solo una muestra presentó positividad para NANOG y OCT4. Con respecto a la obtención del plasma rico en plaquetas, solo cuatro caballos, presentaron un rendimiento óptimo para la experimentación, teniendo como valor promedio 60% de plaquetas con respecto al número de plaquetas en sangre total los que fueron seleccionados para el enriquecimiento del medio del cultivo. En conclusión, es posible obtener células madres del tejido adiposo de animales beneficiados, además de poder ser utilizadas en futuras terapias celular.

Palabras clave: células Mesenquimales – cultivo Celular – equino – tejido adiposo

INTRODUCCIÓN

En estos últimos años se han visto avances excepcionales alrededor de la medicina regenerativa, viéndose a esta como una potencial solución a muchos de los problemas que se presentan en la especie equina, que giran alrededor de lesiones que comprometen la locomoción de los ejemplares y conducen a un término prematuro de labor e inclusive comprometen la vida del animal generando costos altos a los criadores.

Normalmente en caballos de carrera la estadística nos indica que existe un riesgo de incidencia de una lesión músculo esquelética catastrófica de 0,83-18/1000 partidas y estas probabilidades varían dependiendo de la raza, siendo los más frecuentes las lesiones en los miembros de la extremidad anterior derecha con un 56%, articulación metacarpofalangeal de 34%, vertebral de 10% y el número no reportado de lesiones catastróficas que se producen solo en los entrenamientos (Sarrafian *et al.*, 2012; Beisser *et al.*, 2014).

En los caballos de salto el panorama no varía demasiado, teniendo como problema principal las lesiones en los tendones flexores y articulaciones debido a la excesiva carga repetitiva en ellos sobretodo en el momento de descenso de los obstáculos (Meershoek *et al.*, 2001).

Otro factor que influye en la aparición de estos problemas locomotores son la misma predisposición genética de los caballos a lesiones de este tipo, se ha observado que existe una prevalencia alta en los caballos a presentar una desmitis degenerativa en los ligamentos suspensorios (Xie *et al.*, 2011), una osteocondritis en la zona plantar y palmar en caballos de raza sueca (Jönsson *et al.*, 2011) y alta heredabilidad en las lesiones del tendón flexor digital superficial en los caballos ingleses de carrera (Welsh *et al.*, 2014). Inclusive se debería incluir en estos datos las lesiones causadas por patadas y por mordidas por la misma interacción entre los caballos que dependiendo de la zona del contacto pueden resultar muy peligrosas como son los radios medios, la tibia, los huesos metacarpales y metatarsales, zonas caracterizadas por estar recubiertas por tejido suave y poco musculo, generando fracturas y fisuras con una prevalencia de más del 21% (Knubben *et al.*, 2008; Schroeder *et al.*, 2013).

Otro detalle a prestar atención es la misma geografía de las zonas afectadas, ya que al estar en lugares muy poco vascularizados presentan un potencial

regenerativo reducido que complica la recuperación motriz y que en zonas como los cartílagos articulares son coadyudados por una mala lubricación del líquido sinovial, que se ve alterado en lesiones de alto impacto, resultando pobre en hialurano y derivando en problemas osteoartríticos (Antonacci *et al.*, 2013) y en caso de los tendones, este impacto produce un cambio en la composición de la matriz extracelular que impide una correcta recuperación y generando un pronóstico de alta recurrencia a la lesión (Birch *et al.*, 1998).

Ante este bajo pronóstico de recuperación, el uso de los beneficios de la terapia de células mesenquimales que mejoren la funcionalidad del tejido dañado aparece como una alternativa adecuada. Desde el trabajo pionero de Smith *et al.* (2003), el cual logró aislar, expandir y luego administrar células madre autólogas equinas de medula ósea en problemas del tendón flexor superficial, revolucionó el panorama. Las células madre procedentes del aspirado de médula ósea presentan una gran capacidad de condrogenesis que favorecen a terapias enfocadas a patologías en tendones y ligamentos, su eficacia ha sido demostrada en más de 100 casos con un porcentaje de retorno de actividades mayor al 85% de los casos administrados (Herthel, 2001; Kisiday *et al.*, 2013). Otra ventaja que presentan estas células son la baja o nula actividad de expresión del factor de histocompatibilidad tipo 2 posibilitando su uso en terapias alógenas (Barberini *et al.*, 2014). Lamentablemente la colección de estas células conlleva a una intervención invasiva en el animal, que compromete la facilidad de la aplicación de la terapia, ante esta situación diferentes tejidos han sido analizados como fuentes de células pluripotenciales dentro los que han destacado las provenientes de tejido adipocitario, ya que han expresado el típico crecimiento *in vitro* y una serie de marcadores de totipotencialidad como Oct4 y Nanog (Raabe *et al.*, 2011). Típicamente estas células expresan CD29 (receptor de integrinas), CD 44 (receptor de hialuronato), CD90 y la falta de expresión de MHC tipo 2, dejando en claro su naturaleza de células útiles en terapia (Alipour *et al.*, 2015). Estas células han mostrado un potencial de diferenciación en los 3 típicos linajes (osteogenico, condrogenico y adipogenico) e inclusive han demostrado tener una capacidad de proliferación superior a las obtenidas de medula, con menores tasas de apoptosis (Ranera *et al.*, 2012). Una característica de relevancia ha sido su capacidad de adecuarse a diferentes sustratos y estructuras tridimensionales diferenciándose a un linaje celular requerido (Kisiday *et al.*, 2008)

Para favorecer su capacidad de proliferación *in vitro*, estas células han sido probadas en presencia de diferentes moléculas que han estimulado su potencial de diferenciación. El ácido ascórbico en combinación con plasma rico en plaquetas

estimulan una marcada diferenciación en linajes condrogénicos y osteogénicos, probablemente regulados por el factor TGF β 1 presente en el PRP que aumenta la expresión del gen RUNX2 relacionado con procesos de mineralización y SOX9 relacionados con factores condrogenos (Castro *et al.*, 2014).

El plasma rico en plaquetas es un conglomerado de proteínas derivadas de la lisis plaquetaria que contiene una serie de factores de crecimiento presentes en la reparación de todo tipo de tejido, dentro de las que destacan un gran cocktail de citoquinas moduladoras de inflamación, TGF β , TNF α y EGF. Este conglomerado ha sido usado también como una nueva estrategia de terapia regenerativa teniendo resultados alentadores de 47% de beneficio en problemas músculo- esqueléticos (Brossi *et al.*, 2015). En combinación con las células madre estas han generado una respuesta complementaria aumentando sus niveles de expresión de genes pluripotenciales y aumentando su tasa de proliferación, y al ser administrados en caballos con problemas de tendón lograron un recuperación del 90% de los caballos después de 8 semana de tratamiento (Del Bue *et al.*, 2008).

El objetivo de la presente investigación fue evaluar las concentraciones del plasma rico en plaquetas sobre el cultivo *in vitro* de células madre obtenida de tejido adipocitario de equino.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del material biológico

Se utilizaron 20 muestras de tejido adiposo de equinos, beneficiados en el Camal Casa Blanca – Pachacamac, Lima, Perú. Estas fueron aisladas de la región subgluteal, utilizando una tijera y bisturí estéril y fueron transportadas en el medio HBBS suplementado con antibióticos hasta la llegada al Laboratorio de Biotecnología Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas (FCB) de la Universidad Ricardo Palma (URP) a una temperatura ambiente. El tiempo de transporte no excedió de 1 h.

Aislamiento y cultivo celular

La muestra fueron lavadas 3 veces en buffer PBS suplementado con antibióticos, eliminando los excedentes de sangre y otras impurezas, al término este tejido fue cortado en pedazos. Estos pedazos fueron colocados en colagenasa tipo I (5mg·mL⁻¹) en medio DMEM, por 15 min en baño maría a 37°C. Los pedazos que no fueron digeridos fueron retirados y el sobrenadante fue tamizado en 70 μ m.

Posteriormente se diluyó una proporción 1:1 en medio DMEM +10% FBS centrifugándolo a 1000 rpm por 10 min. El pellet obtenido fue diluido nuevamente con 3 mL de DMEM + 10% FBS y centrifugado nuevamente, con la finalidad de lavarlo. Al final de este proceso se obtuvo un volumen final de 0,5 mL.

Con la finalidad de observar la viabilidad de las células, éstas fueron colocadas con Azul de Tripan al 0,04 % y contadas en cámara de Neubauer.

Para el cultivo celular se utilizó el medio DMEM bajo en glucosa y suplementado con 10% de suero fetal bovino a una concentración 10 000 cel·cm⁻² en un flask de 25 cm², a las 48 h pos cultivo se retiró el medio, descartando el sobrenadante y eliminando así a las células no adherentes. Los cambios de medio fueron realizados cada 3 días pos cultivo cuando este alcanzaba un 80% de confluencia de crecimiento, realizándose como máximo de 3 pasajes por muestra. Las células fueron sometidas a Tripsina-EDTA 0,25% y posteriormente criopreservadas en crio viales sumergidas en nitrógeno líquido hasta su posterior uso en FBS al 90% suplementado con 10% de DMSO en una dilución 1:1.

Caracterización molecular

Para la caracterización molecular, se tomaron en cuenta aquellas células que presentaba una morfología típica en forma fusiforme, de núcleo elongado y adherente a la placa de cultivo característica típica de las células madres mesenquimales.

Para obtener el ARN total se utilizó el siguiente protocolo de trabajo: Se aspiró el medio y se lavaron las células con PBS. Posteriormente se aspiró el PBS. Se añadió directamente 350 uL de solución de lisis ARN directamente a la placa de cultivo. Se lisaron las células, tapando la placa y agitando el tampón alrededor de la superficie de la placa durante 5 min. Se pasó el lisado a un microtubo. Se añadieron 200 uL de etanol 95-100% al lisado. Se mezclaron utilizando un vortex por 10 seg. Se ensamblaron la columna de ARN con un tubo de recogida que se suministra. Se añadió el lisado + etanol a la columna. Se centrifugó durante 1 min. Se eliminó el microtubo de recogida y se ensambló la columna de ARN con un nuevo tubo de recogida. Se añadió 400 uL de Solución de Lavado ARN a la columna y se centrifugó durante 1 min. Se eliminó el líquido y se ensambló la columna con el tubo de recogida. Se añadió 400 uL de solución de lavado ARN a la columna y se centrifugó durante 1 min. Se realizó un tercer lavado, luego se añadió 400 uL de solución de lavado ARN a la columna y se centrifugó durante 1 min. Se eliminó el líquido del tubo de recogida y se centrifugó durante 2 min

adicionales para eliminar todo el etanol residual. Se colocó la columna en un microtubo nuevo de 1,5 mL para eluir el ARN total. Se añadió 50 uL de tampón de elución ARN a la columna. Se centrifugó durante 2 min a 2000 rpm, seguido de 1 min a 14.000 rpm. Se obtuvo el ARNm.

Una vez obtenido el ARN mensajero (ARNm) se realizó la síntesis del ADN complementario (ADNc), usando como molde de ADN para realizar el análisis de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Se evaluaron dos grupos de genes. El primer grupo de genes marcadores que se evaluó son los de superficie de las células mesenquimales con los genes denominados clúster de diferenciación CD29, CD34, CD44, CD90 y el complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (MHCII). El segundo grupo fue de genes marcadores de pluripotencia denominados factores de transcripción (Nanog y Oct4). Asimismo por su capacidad de poca variabilidad y expresión constante en distintas líneas celulares el gen gliceraldehido-3- fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se usó como un gen de referencia endógeno (Ranera *et al.*, 2012; Alipour *et al.*, 2015).

Aislamiento de plasma rico en plaquetas

Se utilizó 6 caballos del Hospital Veterinario del Ejército del Perú, a las que se le obtuvo 50 mL sangre, extrayéndose de la zona yugular y colocados en tubos pre tratados en citrato de sodio. La muestra de sangre fue llevada hacia el Laboratorio de Biotecnología Animal de la FCB de la URP, Lima, Perú donde fueron centrifugados hasta 3 veces a 1000 rpm por 10 min. Posteriormente se procedió a retirar el plasma pobre en plaquetas encontrada en la primera fase y solo se recolectó un mililitro de la muestra restante realizándose el lisado mediante sucesiones de cambios de temperatura (-4,-20°C).

Aspectos éticos

La investigación relacionada con el uso de animales ha cumplido con todas las regulaciones nacionales relevantes y las políticas institucionales para el cuidado y uso de animales.

RESULTADOS

Del total de muestras de tejido adiposo procesadas, solo se pudo obtener de 5 muestras con número mínimo de células vivas para realizar el cultivo. Se aisló e identificó las células madre a partir de tejido adipocitario usando marcadores genéticos de superficie y de pluripotencialidad (CD29, CD34, CD44, CD90, MHCII y Nanog, Oct4).

El ARN mensajero GAPDH equino, actuó como control positivo interno y éste se amplificó en todas las muestras procesadas. La detección de un fragmento de 183 pares de bases indicó un rendimiento adecuado para el procedimiento rt-PCR. El rt-PCR mostró que solo 3 muestras tuvieron el perfil genotípico esperado. A continuación, se muestra el gel de electroforesis que revela la positividad para CD44, CD90, CD29 y la negatividad hacia CD34 y MHCII, NTC (control negativo) y RT (control negativo) (Fig. 1).

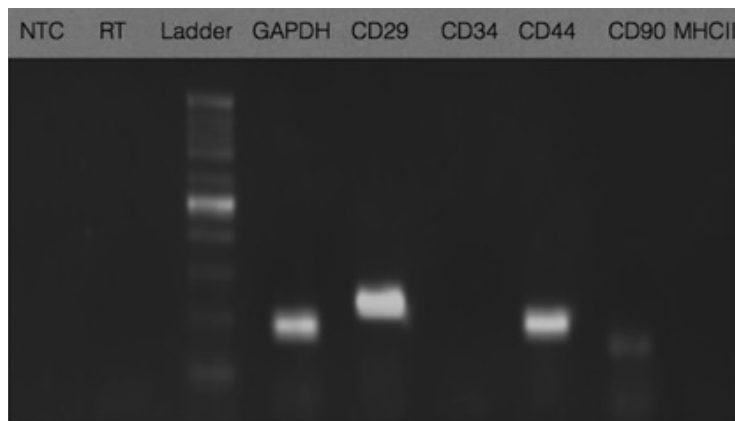


Figura 1. Gel de electroforesis revelado en Bromuro de Etilio.

CD44, CD90, CD29, CD34 = clúster de diferenciación; MHCII = complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II, NTC = control negativo y RT = control negativo.

Con respecto a los marcadores de pluripotencialidad solo una muestra presentó positividad para NANOG y OCT4 (Fig. 2).

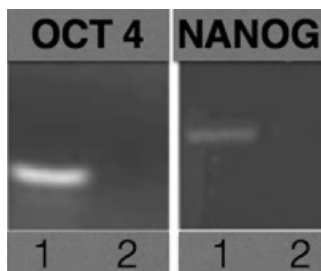


Figura 2. Gel de electroforesis revelado en Bromuro de Etilio.
Nanog y Oct4 = factores de transcripción.

Con respecto a la obtención del plasma rico en plaquetas, solo cuatro caballos, presentaron un rendimiento óptimo para la experimentación, teniendo como valor promedio 60% de plaquetas con respecto al número de plaquetas en sangre total, los que fueron seleccionados para el enriquecimiento del medio del cultivo.

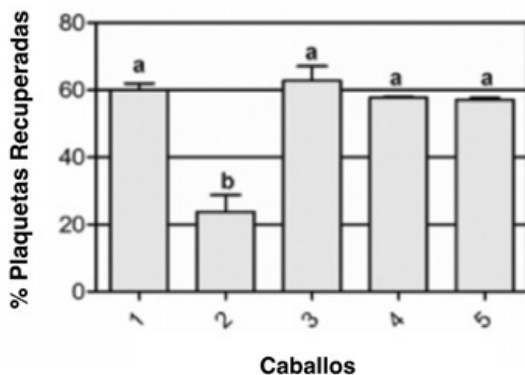


Figura 3. Número de plaquetas recuperadas con respecto a la sangre total.

Se analizó el efecto de diferentes concentraciones 0%, 1% y 10% del lisado de plasma rico en plaquetas en la curva de crecimiento de células madre derivada de adipocitos equinos cultivadas *in vitro*. La curva de crecimiento de las células fue determinada por el número de células viables en ocho días de crecimiento continuo. Todos los tratamientos mostraron un alto nivel de adaptación en los tres primeros días y comenzaron la fase logarítmica entre los días 3 y 6, cabe

resaltar que el crecimiento de la concentración 1% decae en la fase logarítmica en comparación al control y al 10%. La mayor concentración de células observadas fue en la concentración de 10% con un valor de $8,2 \times 10^5$ comparado con $5,6 \times 10^5$ del control. Se observó una rápida entrada a la fase exponencial, una corta duración de la fase logarítmica tanto en la concentración 10 % y control, y un decaimiento de la ratio de división de la concentración 1%. Se observa una diferencia significativa de la concentración celular del 10% respecto al control ($p > 0,05$) en el día ocho correspondiente al “plateau” de la curva (Figs. 3 y 4).

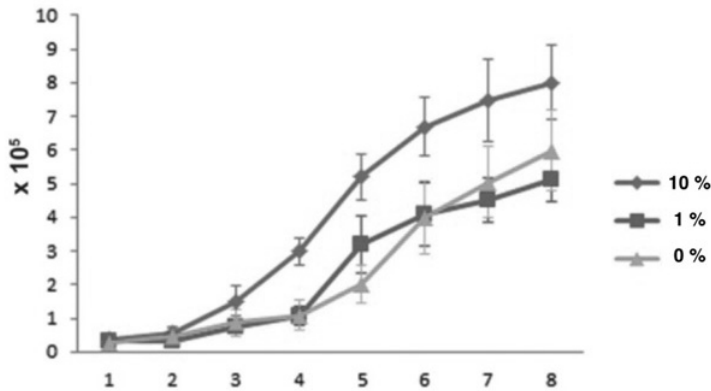


Figura 4. Curva de crecimiento de las células mesenquimales pertenecientes a los tratamientos.

DISCUSIÓN

Nuestras líneas aisladas fueron positivas para los marcadores de superficie CD29, CD34, CD44, CD90, MHCII y pluripotencialidad Nanog, Oct4. Esta característica concuerda con lo demostrando con el genotipo correcto correspondiente a una célula madre mesenquimal equina. Es necesario mencionar que aunque esta línea celular exprese los ARN mensajeros correspondientes, es necesaria la prueba de citometría de flujo para confirmar su fenotipo como también la prueba de diferenciación a linaje adipocitario, ósea y tenal (Knubben *et al.*, 2008; Schroeder *et al.*, 2013).

Con respecto al plasma rico en plaquetas, nuestro valor de recuperación ($n=60$) muestra una correcta performance y es congruente con los obtenido por Barberini

et al. (2014) quienes utilizaron un protocolo modificado, y reportó una cantidad importante de factores de crecimiento.

Por último, nuestros resultados en la dinámica de crecimiento indican un efecto de remplazo total del suero fetal bovino a una concentración de 10% de plasma rico en plaqueta. Estos concuerdan con lo registrado en otras especies animales como porcino y vacunos. Esto podría deberse a la presencia del factor de crecimiento epidérmico, conocido agente mitótico. Hay que denotar que en diferentes registros a exposición *in vitro* de PRP se compromete la multipotencialidad de las células mesenquimales favoreciendo a una diferenciación condrogénica e inhibiendo una diferenciación osteogénica. Esto podría deberse a la presencia del factor TNGFB que participa en la cascada de diferenciación tenal (Castro *et al.*, 2014; Brossi *et al.*, 2015).

El PRP al 1% comparado a los demás tratamientos, mostró un decaimiento en su curva de crecimiento, esto podría atribuirse a que en esta concentración de PRP no existe la misma cantidad de factores de crecimiento comparada a la del suero fetal bovino.

Conflictos de interés: Los autores declaran que no hay conflicto de intereses.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alipour, F.; Parham, A.; Kazemi Mehrjerdi, H. & Dehghani, H. 2015. Equine adipose-derived mesenchymal stem cells: phenotype and growth characteristics, gene expression profile and differentiation potentials. *Cell Journal*, 16: 456–465.
- Antonacci, J. M.; Ph, D.; Schmidt, T. A.; Serventi, L. A.; Matthew, Z.; Shu, Y.L.; Dvm, B. 2013. Articular cartilage by synovial fluid: role of hyaluronan. *Arthritis & Rheumatology*, 64: 2917–2926.
- Barberini, D.J.; Freitas, N.P.; Magnoni, M.S.; Maia, L.; Listoni, A.J.; Heckler, M.C. & Amorim, R.M. 2014. Equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord: immunophenotypic characterization and differentiation potential. *Stem Cell Research & Therapy*, 5: 25.
- Beisser, A.; McClure, S.; Rezabek, G.; Soring, K.H. & Wang, C. 2014. Frequency of and risk factors associated with catastrophic musculoskeletal injuries in quarter horses at two Midwestern racetracks: 67 cases (2000-2011). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 245: 1160–1168.
- Birch, H.L.; Bailey, A.J. & Goodship, A.E. 1998. Macroscopic “degeneration” of equine superficial digital flexor tendon is accompanied by a change in extracellular matrix composition. *Equine Veterinary Journal*, 30: 534–539.
- Brossi, P.M.; Moreira, J.J.; Machado, T.L. & Baccarin, R.Y.A. 2015. Platelet-rich plasma in orthopedic therapy: a comparative systematic review of clinical and experimental data in equine and human musculoskeletal lesions. *BMC Veterinary Research*, 11: 98.
- Castro, F. O.; Torres, A.; Cabezas, J. & Rodríguez-Alvarez, L. 2014. Combined use of platelet rich plasma and vitamin C positively affects differentiation in vitro to mesodermal lineage of adult adipose equine mesenchymal stem cells. *Research in Veterinary Science*, 96: 95–101.
- Del Bue, M.; Ricc, S.; Ramoni, R.; Conti, V.; Gnudi, G. & Grolli, S. 2008. Equine adipose-tissue derived mesenchymal stem cells and platelet concentrates: Their association in vitro and in vivo. *Veterinary Research Communications*, 32 (Suppl 1):S51-S55.
- Herthel, D.J. 2001. Enhanced suspensory ligament healing in 100 horses by

- stem cells and other bone marrow components. *Proceedings of American Association of Equine Practitioners*, 47: 319–321.
- Jönsson, L.; Dalin, G.; Egenvall, A.; Näsholm, A.; Roepstorff, L. & Philipsson, J. 2011. Equine hospital data as a source for study of prevalence and heritability of osteochondrosis and palmar/plantar osseous fragments of Swedish Warmblood horses. *Equine Veterinary Journal*, 43: 695–700.
- Kisiday, J.D.; Goodrich, L.R.; Wayne McIlwraith, C. & Frisbie, D.D. 2013. Effects of equine bone marrow aspirate volume on isolation, proliferation, and differentiation potential of mesenchymal stem cells. *American Journal of Veterinary Research*, 74: 801–807.
- Kisiday, J. D.; Kopesky, P.W.; Evans, C.H.; Grodzinsky, A. J.; McIlwraith, C.W. & Frisbie, D.D. 2008. Evaluation of adult equine bone marrow- and adipose-derived progenitor cell chondrogenesis in hydrogel cultures. *Journal of Orthopaedic Research*, 26: 322–331.
- Knubben, J.M.; Furst, A.; Gygax, L. & Stauffacher, M. 2008. Bite and kick injuries in horses: prevalence, risk factors and prevention. *Equine Veterinary Journal*, 40: 219–223.
- Meershoek, L.S.; Roepstorff, L.; Schamhardt, H.C.; Johnston, C. & Bobbert, M.F. 2001. Joint moments in the distal forelimbs of jumping horses during landing. *Equine Veterinary Journal*, 33: 410–415.
- Raabe, O.; Shell, K.; Würtz, A.; Reich, C.M.; Wenisch, S. & Arnhold, S. 2011. Further insights into the characterization of equine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Veterinary Research Communications*, 35: 355–365.
- Ranera, B.; Ordovs, L.; Lyahyai, J.; Bernal, M.L.; Fernandes, F.; Remacha, A.R. & Rodellar, C. 2012. Comparative study of equine bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Equine Veterinary Journal*, 44: 33–42.
- Ranera, B.; Remacha, A.R.; Álvarez-arguedas, S.; Romero, A.; Vázquez, F.J.; Zaragoza, P. & Rodellar, C. 2012. Effect of hypoxia on equine mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *BMC Veterinary Research*, 8: 2–13.

- Sarrafián, T. L., Case, J. T., Kinde, H., Daft, B. M., Read, D. H., Moore, J. D. & Stover, S.M. 2012. Fatal musculoskeletal injuries of Quarter Horse racehorses: 314 cases (1990–2007). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 241: 935–942.
- Schroeder, O. E., Aceto, H. W. & Boyle, A. G. 2013. A field study of kick injuries to the radius and tibia in 51 horses (2000–2010). *Canadian Veterinary Journal*, 54: 271–275.
- Smith, R.K.W.; Korda, M.; Blunn, G.W. & Goodship, A.E. 2003. Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Equine Veterinary Journal*, 35: 99–102.
- Welsh, C.E.; Lewis, T.W.; Blott, S.C.; Mellor, D.J.; Stirk, A.J. & Parkin, T.D.H. 2014. Estimates of genetic parameters of distal limb fracture and superficial digital flexor tendon injury in UK Thoroughbred racehorses. *Veterinary Journal*, 200: 253–256.
- Xie, L.; Spencer, N.D.; Beadle, R.E.; Gaschen, L.; Buchert, M.R. & Lopez, M.J. 2011. Effects of athletic conditioning on horses with degenerative suspensory ligament desmitis: A preliminary report. *Veterinary Journal*, 189: 49–57.

Received March 31, 2018.

Accepted April 21, 2018.

CAPÍTULO 2 / CHAPTER 2

**TOXICIDAD DE SALES DE AMONIO SOBRE
LA LOMBRIZ DE TIERRA (*EISENIA FOETIDA*)
(SAVIGNY, 1826) (ANNELIDA: OLIGOCHAETA)**

**TOXICITY OF AMMONIUM SALTS ON
EARTHWORM (*EISENIA FOETIDA*) (SAVIGNY, 1826)
(ANNELIDA: OLIGOCHAETA)**

José Iannacone¹ & Lorena Alvarino¹

¹ Universidad Ricardo Palma (URP), Facultad de Ciencias Biológicas
(FCB), Laboratorio de Parasitología.

Av. Alfredo Benavides 5440, Santiago de Surco, Lima, Perú.

Autor para correspondencia. jose.iannacone@urp.edu.pe

CONTENIDO

ABSTRACT	29
RESUMEN	30
INTRODUCCIÓN	31
MATERIALES Y MÉTODOS	
• Material biológico	32
• Selección de lombrices	32
• Aclimatación de lombrices	32
• Material Químico:	33
• Instrumentos de recolección de datos	34
• Técnicas de procesamiento de datos	34
• Procedimientos	35
• Montaje de bioensayos	35
• Prueba de contacto con papel de filtro en placas de Petri (Wang <i>et al.</i> , 2012)	35
• Efecto tóxico letal	36
• Mortalidad	36
• Efecto tóxico subletal	36
• Fragmentación	36
• Oscurecimiento	36
• Adelgazamiento	36
• Aspectos éticos	36
RESULTADOS	
• Sulfato ferroso amoniacal hexahidrato	37
• Metavanadato de amonio	37
• Acetato de amonio	38
• Peroxodisulfato de amonio	39
• Amonio heptamolibdato tetrahidrato	39
• Análisis comparativo	40
DISCUSIÓN	42
• Conflictos de interés	44
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

ABSTRACT

Within organisms used as bioindicators of environmental pollution we find the earthworm, *Eisenia foetida* (Savigny, 1826) (Annelida: Oligochaeta). To date, unfortunately, comparative information is not available regarding the significant lethal and sublethal toxic effect of ammonium salts such as ferrous ammoniacal sulfate hexahydrate (mohr salt); ammonium metavanadate; ammonium acetate; ammonium peroxodisulfate and ammonium heptamolibdate tetrahydrate on this biological model *E. foetida*. The objective of the present work was to evaluate the lethal and sublethal toxicity of the ammonium salts on the earthworm (*E. foetida*). The final point considered as a lethal response was mortality, evaluated through LC_{50} (Lethal Concentration 50), and the sub-lethal response endpoints were three: fragmentation, darkening, thinning, evaluated through EC_{50} (median effective concentration), LOEC (Lowest observed effect concentration) and NOEC (No observed effect concentration). With regard to mortality (LC_{50}) based on the ammonium ion of *E. foetida* at 48 h of exposure, the following sequence of higher to lower toxicity was observed: ammonium peroxodisulfate > ammonium metavanadate > ammonium heptamolybdate tetrahydrate > ferrous sulfate ammoniacal hexahydrate (salt of mohr) > ammonium acetate. Thinning was the sublethal parameter most sensitive to ferrous ammoniacal sulfate hexahydrate. Fragmentation was the parameter most sensitive to ammonium metavanadate. Thinning was the parameter most sensitive to ammonium acetate. Fragmentation was the parameter most sensitive to ammonium peroxodisulfate. Thinning and darkening were the parameters most sensitive to ammonium heptamolybdate tetrahydrate. It is concluded that *E. foetida* is a bioindicator of toxicity for the evaluation of ammonium salts in Peru.

Keywords: agrochemicals – *Eisenia foetida* – ammonium salts – lethal toxicity – sublethal toxicity

RESUMEN

Dentro de organismos usados como bioindicadores de contaminación ambiental encontramos a la lombriz de tierra, *Eisenia foetida* (Savigny, 1826) (Annelida: Oligochaeta). A la fecha, lamentablemente no se cuenta con información comparativa en relación al efecto tóxico letal y subletal significativo de las sales de amonio como sulfato ferroso amoniacal hexahidrato (sal de mohr); metavanadato de amonio; acetato de amonio; peroxodisulfato de amonio y amonio heptamolibdato tetrahidrato sobre este modelo biológico *E. foetida*. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la toxicidad letal y subletal de las sales de amonio sobre la lombriz de tierra (*E. foetida*). El punto final considerado como respuesta letal fue la mortalidad, evaluada a través de CL_{50} (Concentración letal media), y los puntos finales de respuesta sub letal fueron tres: fragmentación, oscurecimiento, adelgazamiento, evaluados a través de CE_{50} (Concentración efectiva media), LOEC (Concentración más baja de efectos observables) y NOEC (Concentración de efectos no observables). Con relación a la mortalidad (CL_{50}) en base al ion amonio de *E. foetida* a las 48 h de exposición se observó la siguiente secuencia de mayor a menor toxicidad: peroxodisulfato de amonio > metavanadato de amonio > amonio heptamolibdato tetrahidrato > sulfato ferroso amoniacal hexahidrato (sal de mohr) > acetato de amonio. El adelgazamiento fue el parámetro subletal más sensible al sulfato ferroso amoniacal hexahidrato. La fragmentación fue el parámetro más sensible al metavanadato de amonio. El adelgazamiento fue el parámetro más sensible al acetato de amonio. La fragmentación fue el parámetro más sensible al peroxodisulfato de amonio. El adelgazamiento y el oscurecimiento fueron los parámetros más sensibles al amonio heptamolibdato tetrahidrato. Se concluye que *E. foetida* es un bioindicador de toxicidad para la evaluación de las sales de amonio en el Perú.

Palabras clave: agroquímicos – *Eisenia foetida* – sales de amonio – toxicidad letal – toxicidad subletal

INTRODUCCIÓN

Dentro de organismos usados como bioindicadores de contaminación del suelo encontramos a la lombriz de tierra, *Eisenia foetida* (Savigny, 1826) (Annelida: Oligochaeta) (Arnold *et al.*, 2003; Palafox *et al.*, 2012; Araneda *et al.*, 2016). Esta especie es importante para la formación del suelo y para la descomposición de la materia orgánica (Angers & Caron, 1988; Doran & Zeiss, 2000; Gabriel *et al.*, 2011; Castellanos-Navarrete *et al.*, 2012). La lombriz de tierra ha sido considerada un indicador apto para evaluar la contaminación debido a su interacción con el suelo (Dureja *et al.*, 1999; Monard *et al.*, 2008; Blouin *et al.*, 2013; Pelosi *et al.*, 2014). Además, la lombriz de tierra se expone a diferentes tóxicos por varias vías de exposición (Capowiez *et al.*, 2003; Capowiez & Bérard, 2006; Lionetto *et al.*, 2012). La primera vía es a través de la pared corporal, dado que ésta es extremadamente permeable y al estar en continuo contacto con los poros y el agua que hay en el suelo, hacen que esta sea la principal ruta de exposición a los contaminantes tóxicos. Otra de las rutas importantes es la ingestión, que la lombriz de tierra la realiza durante el procesamiento del suelo a través de su sistema digestivo, al descomponer la materia orgánica y los agregados del suelo (Brown *et al.*, 2004; Lionetto *et al.*, 2012; Avalos, 2016; Arrazola, 2016).

La mayoría del amonio de los residuos domésticos acuáticos (70-90%) proviene de la orina humana, mientras que el 20% restante proviene de los agentes de limpieza, desinfectantes y otros desechos alimenticios (Hughes *et al.*, 2008). Altos niveles de amonio puede afectar muy fuertemente a la vermicultura, y a los procesos biogeoquímicos (Hughes *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2017). Lamentablemente no se cuenta con información comparativa en relación al efecto tóxico letal y subletal significativo de las sales de amonio como sulfato ferroso amoniacal hexahidrato (sal de mohr); metavanadato de amonio; acetato de amonio; peroxodisulfato de amonio y amonio heptamolibdato tetrahidrato sobre el modelo biológico *E. foetida* (Hughes *et al.*, 2008). ¿Por ende, Cual será la toxicidad de letal y subletal de estas cinco sales de amonio sobre la lombriz de tierra (*E. foetida*)?

El objetivo de la presente investigación fue evaluar la toxicidad letal y subletal de las sales de amonio sobre la lombriz de tierra (*E. foetida*).

MATERIALES Y MÉTODOS

Las pruebas de toxicidad aguda sobre *E. foetida* emplearon cinco sales de amonio: (1) (sulfato ferroso amoniacal hexahidrato [sal de Mohr]); (2) metavanadato de amonio; (3) acetato de amonio; (4) peroxodisulfato de amonio y (5) amonio heptamolibdato tetrahidrato): cinco concentraciones más el control: con tres repeticiones, en un diseño Factorial en bloque completamente aleatorio (DFBCA) de 6 (concentraciones) x 5 (sustancias químicas) x 3 (repeticiones). Los criterios de selección de las concentraciones empleadas siguieron a Iannacone & Lamas (2003), y Iannacone *et al.* (2014).

Se realizó el protocolo experimental en el Laboratorio de Parasitología (LA79) de la Universidad Ricardo Palma (URP), Lima, Perú.

Material biológico:

Selección de lombrices: Se seleccionaron individuos adultos (clitelio visible) de *E. foetida*, por cada contenedor de cultivo (Gardi *et al.*, 2014), con un peso fluctuante entre 200-500 mg. Las lombrices fueron aclimatadas en suelo agrícola durante 48 h. Posteriormente se lavaron con agua, se midieron (longitud total) en cm y se pesaron (mg) individualmente.

Se seleccionó a *E. foetida* por ser una especie sensible a cambios en la calidad del suelo y por ende se le considera una buena indicadora de calidad ambiental (Helling *et al.*, 2000; Sanchez-Hernández, 2006; Cuevas *et al.*, 2008; Hickman & Redi, 2008; Gómez, 2014). La identificación taxonómica a nivel específico se realizó usando los criterios señalados por Pérez-Zaballos & García-Moreno (2009) y Domínguez & Pérez-Lozada (2010).

Para la selección de los individuos se verificó el tamaño y la presencia del anillo clitelar desarrollado y visible, la cual es indicativo de su capacidad reproductiva (Schuldt *et al.*, 2005) e indica que son individuos adultos. Las lombrices adultas se seleccionaron de un mismo sistema de cultivo, con el fin de evitar variaciones en los resultados finales del bioensayo. Se realizaron ensayos con ácido bórico como control positivo con el fin de asegurar el rango adecuado de sensibilidad de las lombrices de tierra (Princz *et al.*, 2017).

Aclimatación de lombrices: Para llevar a cabo la aclimatación de las lombrices de tierra se realizaron las siguientes dos actividades: (1) previo a la aclimatación de las lombrices, se les dieron todas las condiciones necesarias, y su alimentación

consistió en tomates “cherry” descompuestos, (2) posteriormente, las lombrices seleccionadas fueron aclimatadas en suelo agrícola a lo largo de una semana, su régimen de alimentación se mantuvo constante (OECD, 1984; ISO, 1993; EPA, 2012). Los ensayos de aclimatación fueron considerados válidos cuando la mortalidad de *E. foetida* no sobrepasó el 10% (Iannacone & Alvaríño, 2004). La cantidad de agua de riego suministrada permitió mantener la humedad en suelo para mantener en el rango óptimo establecido de 40-80%.

Material Químico:

Se evaluaron las cinco sales de amonio en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en base al amonio según lo señalado en la Tabla 1. Los pesos moleculares (PM), CAS (“Chemical Abstracts Service”), fórmula química y principales usos de las sales son señalados para cada sal.

Tabla 1. Cinco sales de amonio, concentraciones ensayadas, Peso molecular (PM), CAS (“Chemical Abstracts Service”), fórmula química y principales usos.

Sal de amonio	Concentraciones ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	PM ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	CAS	Fórmula química	Principales usos de la sal
Sulfato ferroso amoniacal hexahidrato (Sal de Mohr)	62,5; 125; 250; 500 y 1000	392,14	7783-85-9	$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Preparación de patrones para medidas de ferromagnetismo o como valorante en análisis de suelos y agua en agricultura
Metavanadato de amonio	62,5; 125; 250; 500 y 100	116,98	7803-55-6	NH_4VO_3	Elaboración de catalíticos para síntesis orgánicas e inorgánicas; barnices y pigmentos
Acetato de amonio	62,5; 125; 250; 500 y 100	77,08	631-61-8	$\text{CH}_3\text{COONH}_4$	Análisis químico, en la industria farmacéutica y como conservador de alimentos
Peroxisulfato de amonio	8,25; 16,5; 33; 66 y 132	228,18	7727-54-0	$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	Agente blanqueador e

					inhibidor de la polimerización en la industria química Modificador de almidones Conservantes de alimentos Para la molienda, Tratamiento y limpieza de piezas metálicas y en la oxidación de colorantes en la industria textil Fórmulas de pigmentos o blanqueadores de cabello
Amonio heptamolibdato tetrahidrato	62,5; 125; 250; 500 y 1000	1235,86	12054 -85-2	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Abono o fertilizante, y como catalizador en la industria petroquímica. Determinación de de fosfato, arsénico y plomo

Instrumentos de recolección de datos

Los resultados de los biensayos ecotoxicológicos letales y subletales con *E. foetida* con cada una de las cinco sales de amonio fueron colocados en una base organizada de datos en Excel (Iannacone & Alvariño, 2002, 2005).

Técnicas de procesamiento de datos

Las pruebas de toxicidad aguda para cada sal de amonio se evaluaron en cinco concentraciones, más un control o testigo con tres repeticiones, en un diseño en bloque completamente aleatorio (DBCA) de 6x3.

La eficacia de los tratamientos y las repeticiones se evaluó a través de un análisis de varianza (ANDEVA) DFBCA, previa transformación de los datos a raíz cuadrada

del arcoseno, con el fin de ajustar los datos letales y subletales a la normalidad (Iannacone *et al.*, 2009). En el caso de existir diferencias significativas entre los tratamientos y entre las repeticiones se realizó la prueba de Tukey. Los cálculos de la mortalidad corregida se realizaron mediante la fórmula de Abbott en caso de muerte natural en el grupo testigo cuando sea menor al 20% (Lagarto & Vega, 2000; Macedo *et al.*, 1997). Las $CL(E)_{s_{50}}$ se calcularon usando el programa Excel con plantilla de uso libre generada por Alpha-Raj (2018) disponible en la web, la cual contiene las fórmulas requeridas para el cálculo de la CL_{50} y CE_{50} y de sus respectivos límites de confianza ($CL(E)_{50}$ inf y $CL(E)_{50}$ sup) al 95%, junto a otros estimadores, mediante el uso de la función Probit. El modelo de regresión fue verificado usando el estadístico Chi-cuadrado. Los resultados para los estadísticos descriptivos e inferenciales se analizaron mediante el paquete estadístico SPSS versión 21,0.

Procedimientos

Montaje de bioensayos

Prueba de contacto con papel de filtro en placas de Petri (Wang et al., 2012)

Las lombrices de tierra se colocaron sobre un papel filtro húmedo para eliminar el contenido del intestino por 24 h previas al inicio de la prueba. Las sustancias químicas de prueba (sales de amonio) se disolvieron en agua embotellada (Cielo®) y se tomó un pedazo circular de papel de filtro tipo Whatman, el cual fue colocado en el interior de una placa de petri de 9 cm de diámetro y se adicionó con 2 mL de la solución química a base de las sales de amonio según las concentraciones de cada sal (tabla 1). El papel filtro del control fue humedecido con 2 mL de agua embotellada y una lombriz de tierra fue colocada en cada placa de petri. Las condiciones del bioensayo se mantuvieron a 20°C durante 48 h, y fue registrada la mortalidad. El punto final considerado como respuesta letal fue la mortalidad, evaluada a través de la concentración letal media (CL_{50}) (Leveque *et al.*, 2013), y los puntos finales de respuesta sub letal fueron tres: fragmentación, oscurecimiento, adelgazamiento, evaluados a través de CE_{50} (Concentración efectiva media), LOEC (Concentración más baja de efectos observables) y NOEC (Concentración de efectos no observables) (OECD, 1984; Schaefer, 2003; Schaefer *et al.*, 2005). La vía de administración utilizada en las lombrices de tierra fue por contacto. Durante la aclimatación y el desarrollo del bioensayo, se controlaron las condiciones ambientales: Temperatura (°C) y Humedad Relativa (HR) en %, los cuales se midieron con un termohidrómetro (Coolbox®).

Efecto tóxico letal (OECD, 1984; ISO, 1993; EPA, 2012)

Se midió la mortalidad a través de la CL_{50} , la cual representa la concentración del suelo problema que ocasiona la muerte (daño máximo) en el 50 % de las lombrices de tierra que han sido expuestas (Lukkari *et al.*, 2005; Menezes-Olivera *et al.*, 2011; Lionetto *et al.*, 2012). Las lombrices moribundas se registraron como muertas si no respondieron a un toque mecánico suave con una pinza.

La toxicidad letal de los cinco bioensayos con sales de amonio fue evaluada a las 48 h contadas a partir de la instalación del bioensayo.

Mortalidad: Se consideró efectiva la mortalidad cuando:

- a) No se registran en el conteo de lombrices a las 48 h, debido a que tienden a desintegrarse rápidamente.
- b) Se observa una mancha delgada amarillenta, relacionada con la descomposición y la desintegración.
- c) No hay respuesta ante los estímulos físicos en 15 seg de observación como por ejemplo: escape a la luz, movimientos bruscos, etc.

Efecto tóxico subletal (OECD, 1984; ISO, 1993; EPA, 2012)

Midió el comportamiento y la reacción del organismo vivo ante el tóxico a través de la CE_{50} , LOEC y NOEC, y hace referencia a la fragmentación, oscurecimiento y adelgazamiento en las lombrices de tierra. La observación de los síntomas físicos para los cinco bioensayos con sales de amonio, se llevó a cabo a las 48 h de exposición. Las tres respuestas subletales seleccionadas fueron:

Fragmentación: fueron consideradas afectadas por fragmentación aquellas lombrices que se encontraron divididas por la mitad cuando se realizó la lectura de los bioensayos a las 48 h de exposición.

Oscurecimiento: se consideró significativo cuando se observaron manchas marrones en la lombriz de tierra, así como un cambio de color de rojo a guinda oscuro.

Adelgazamiento: Los efectos fueron representados por la pérdida del grosor del cuerpo de la lombriz de tierra. En algunos casos fueron tan delgados que solo pendían de un hilo que los unía, hasta llegar a partirse en dos.

Aspectos éticos: los protocolos experimentales con *E. foetida* siguieron las pautas de la “Institutional Animal Care and Use Committee” (IACUC) (APA, 2012),

minimizando el número de los organismos empleados, repeticiones y empleando las tres Rs “Rs-reemplazamiento, reducción, y refinamiento (Mukerjee, 1997). La investigación relacionada con el uso de animales ha cumplido con todas las regulaciones nacionales relevantes y las políticas institucionales para el cuidado y uso de animales.

RESULTADOS

Sulfato ferroso amoniacal hexahidrato

El efecto tóxico del Sulfato ferroso amoniacal hexahidrato (sal de mohr) sobre *E. foetida* a 48 h de exposición fue visto en la tabla 2. Se observan los valores letales de CL_{50} para la mortalidad, los CE_{50} para los tres efectos subletales como la fragmentación, oscurecimiento y adelgazamiento, con sus respectivos valores de NOEC y LOEC. De igual forma se señalan los valores promedios de longitud total (cm) y peso (mg) de las lombrices por concentración. El adelgazamiento fue el parámetro más sensible al tóxico.

Tabla 2. Efecto del sulfato ferroso amoniacal hexahidrato (Sal de Mohr) ($mg \cdot L^{-1}$) sobre *Eisenia foetida* a 48 h de exposición. CS = Concentración de la sal. CA = Concentración ión amonio. M = Mortalidad. F = Fragmentación. O = Oscurecimiento. A = Adelgazamiento. LT = longitud total. P = Peso.

CS	CA	M	F	O	A	LT (cm)	P (mg)
0	0	0a	0a	0a	0a	8,56	460
694,44	62,5	13,33a	13,33a	13,33a	13,33a	7,85	410
1388,88	125	16,7a	16,7a	16,7a	20b	8,90	440
2777,77	250	36,7b	43,33a	50b	50c	7,90	350
5555,55	500	90c	90a	100c	93,33d	8,65	310
11111,11	1000	100c	100a	100c	100d	8,80	290
	$CL(E)_{50}$	228,37	217,29	294,15	193,15		
	$CL(E)_{50}$ inferior	156,88	150,02	181,43	135,79		
	$CL(E)_{50}$ superior	332,45	314,72	353,22	274,75		
	NOEC	<62,5	<62,5	<62,5	<62,5		
	LOEC	62,5	62,5	62,5	62,5		

Metavanadato de amonio

La tabla 3 muestra el efecto tóxico del metavanadato de amonio sobre *E. foetida* a 48 h de exposición. Se observan los valores letales de CL_{50} para la mortalidad, los CE_{50} para los tres efectos subletales como la fragmentación, oscurecimiento y adelgazamiento, con sus respectivos valores de NOEC y LOEC. De igual forma se señalan los valores promedios de longitud total (cm) y peso (mg) de las lombrices por concentración. La fragmentación fue el parámetro más sensible al tóxico.

Tabla 3. Efecto del Metavanadato de amonio ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) sobre *Eisenia foetida* a 48 h de exposición. CS = Concentración de la sal. CA = Concentración ión amonio. M = Mortalidad. F = Fragmentación. O = Oscurecimiento. A = Adelgazamiento. LT = longitud total. P = Peso.

CS	CA	M	F	O	A	LT (cm)	P (mg)
0	0	0a	0a	0a	0a	7,87	320
416,66	62,5	83,33b	90b	83,33b	83,33b	7,19	340
833,33	125	86,7b	93,33b	90c	86,67b	8,14	270
1666,66	250	90bc	100b	93,33c	96,7bc	7,12	310
3333,33	500	93,3bc	96,7b	100d	100c	8,14	300
6666,66	1000	96,7c	96,7b	100d	100c	8,19	360
	CL(E) ₅₀	3,15	0,10	4,86	15,82		
	CL(E) ₅₀ inferior	0,64	0,01	1,22	6,29		
	CL(E) ₅₀ superior	15,34	1,62	19,28	39,77		
	NOEC	<62,5	<62,5	<62,5	<62,5		
	LOEC	62,5	62,5	62,5	62,5		

Acetato de amonio

El efecto tóxico del acetato de amonio sobre *E. foetida* a 48 h de exposición es indicado en la tabla 4. Se observan los valores letales de CL_{50} para la mortalidad, los CE_{50} para los tres efectos subletales como la fragmentación, oscurecimiento y adelgazamiento, con sus respectivos valores de NOEC y LOEC. De igual forma se señalan los valores promedios de longitud total (cm) y peso (mg) de las lombrices por concentración. El adelgazamiento fue el parámetro más sensible al amonio.

Tabla 4. Efecto del acetato de amonio ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) sobre *Eisenia foetida* a 48 h de exposición. CS = Concentración de la sal. CA = Concentración ión amonio. M = Mortalidad. F = Fragmentación. O = Oscurecimiento. A = Adelgazamiento. LT = longitud total. P = Peso.

CS	CA	M	F	O	A	LT (cm)	Peso (mg)
0	0	0a	0a	0a	0a	9,90	460
271,74	62,5	6,7a	10a	26,7b	43,33b	9,44	450
543,47	125	10a	16,7ab	33,33b	53,33b	6,55	410
1086,95	250	13,33a	20b	56,7b	56,7b	9,50	430
2173,91	500	77,7b	87,7c	100c	100c	7,70	300
4347,82	1000	100c	100c	100c	100c	6,67	300
	CL(E) ₅₀	381,69	279,67	209,26	111,34		
	CL(E) ₅₀ inferior	252,49	189,83	109,82	25,99		
	CL(E) ₅₀ superior	576,99	412,05	398,73	476,99		
	NOEC	250	125	<6,25	<6,25		
	LOEC	500	250	5,26	6,25		

Peroxodisulfato de amonio

La tabla 5 muestra el efecto tóxico del peroxodisulfato de amonio sobre *E. foetida* a 48 h de exposición. Se presentan los valores letales de CL_{50} para la mortalidad, los CE_{50} para los tres efectos subletales como la fragmentación, oscurecimiento y adelgazamiento, con sus valores de NOEC y LOEC. Los valores promedios de longitud total (cm) y peso (mg) de las lombrices por concentración son indicados para cada caso. La fragmentación fue el parámetro de menor tolerancia al tóxico.

Tabla 5. Efecto del peroxodisulfato de amonio ($mg \cdot L^{-1}$) sobre *Eisenia foetida* a 48 h de exposición. CS = Concentración de la sal. CA = Concentración ión amonio. M = Mortalidad. F = Fragmentación. O = Oscurecimiento. A = Adelgazamiento. LT = longitud total. P = Peso.

CS	CA	M	F	O	A	LT (cm)	P (mg)
0	0	0a	0a	0a	0a	7,60	390
55	8,25	60b	70b	73,33b	76,66b	4,50	270
110	16,5	66,66b	73,33b	90c	83,33b	5,20	220
220	33	100c	100c	100c	100c	5,50	300
440	60	100c	100c	100c	100c	7,60	300
880	132	100c	100c	100c	100c	7,88	280
	$CL(E)_{50}$	3,06	0,20	4,28	0,97		
	$CL(E)_{50}$ inferior	0,70	0,01	2,79	0,25		
	$CL(E)_{50}$ superior	13,28	3,05	8,01	3,17		
	NOEC	<7,5	<7,5	<7,5	<7,5		
	LOEC	7,5	7,5	7,5	7,5		

Amonio heptamolibdato tetrahidrato

El efecto tóxico del amonio heptamolibdato tetrahidrato sobre *E. foetida* a 48 h de exposición es mostrado en la tabla 6. Se muestran los valores de CL_{50} para la mortalidad, los CE_{50} para los tres efectos subletales como la fragmentación, oscurecimiento y adelgazamiento, con sus respectivos valores de NOEC y LOEC. De igual forma se presentan los valores promedios de longitud total (cm) y peso (mg) de las lombrices por cada concentración. El adelgazamiento y el oscurecimiento fueron los parámetros más sensibles al tóxico.

Tabla 6. Efecto del amonio heptamolibdato tetrahidrato ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) sobre *Eisenia foetida* a 48 h de exposición.

CS	CA	M	F	O	A	LT (cm)	P (mg)
0	0	0a	0a	0a	0a	8,20	290
781,25	62,5	66,7b	66,7b	70b	70b	8,15	270
1562,5	125	96,7c	96,7b	96,7c	96,7c	8,25	370
3125	250	100c	100b	100c	100c	8,15	260
6250	500	100c	100b	100c	100c	8,20	360
12500	1000	100c	100b	100c	100c	8,10	270
	CL(E) ₅₀	50,52	50,52	47,39	47,39		
	CL(E) _{50 inferior}	35,69	35,69	32,53	32,53		
	CL(E) _{50 superior}	71,53	71,53	69,04	69,04		
	NOEC	<62,5	<62,5	<62,5	<62,5		
	LOEC	62,5	62,5	62,5	62,5		

Análisis comparativo

Con relación a la mortalidad (CL_{50}) en base al ion amonio de *E. foetida* a las 48 h de exposición se observó la siguiente secuencia de mayor a menor toxicidad: peroxodisulfato de amonio > metavanadato de amonio > amonio heptamolibdato tetrahidrato > sulfato ferroso amoniacal hexahidrato (sal de mohr) > acetato de amonio (tablas 2 al 6); Fig. 1

En el caso de la fragmentación (CE_{50}) en base al ion amonio de *E. foetida* a las 48 h de exposición se observó la siguiente secuencia de mayor a menor toxicidad: peroxodisulfato de amonio > metavanadato de amonio > amonio heptamolibdato tetrahidrato > sulfato ferroso amoniacal hexahidrato (sal de mohr) > acetato de amonio (tablas 2 al 6).

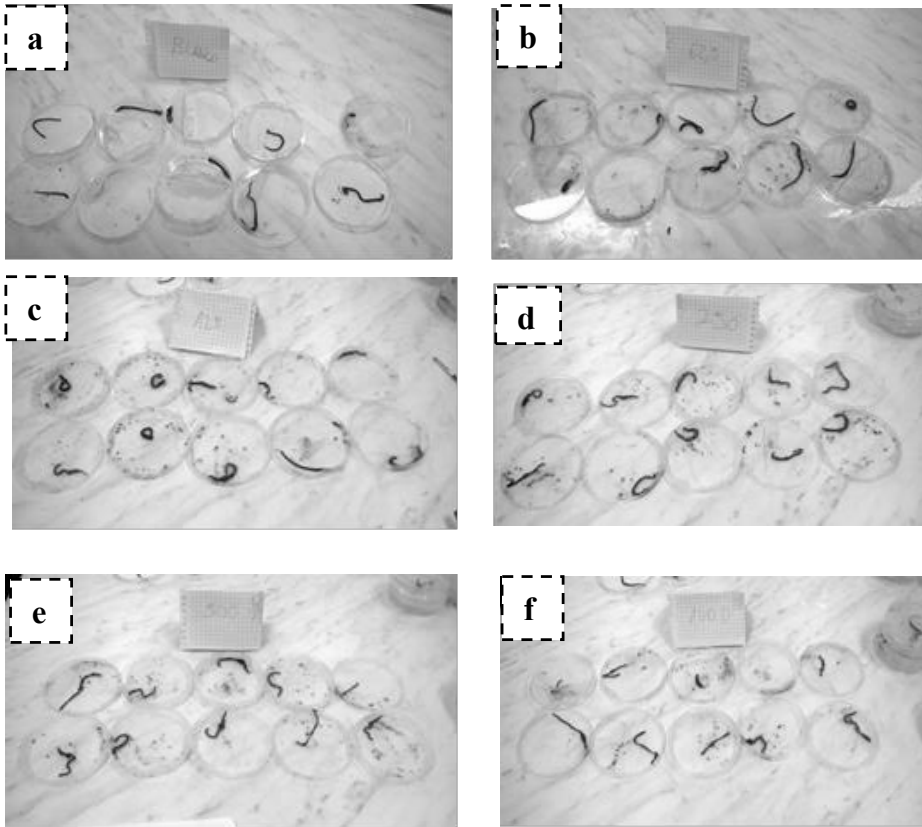


Figura 1. Registros fotográficos de los bioensayos con amonio heptamolibdato tetrahidrato ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) sobre *Eisenia foetida* a 48 h de exposición. a = control. b = 62,5. c = 125. d = 250. e = 500. f = 1000.

El parámetro subletal de adelgazamiento (CE_{50}) en base al ion amonio de *E. foetida* a las 48 h de exposición mostró la siguiente secuencia de mayor a menor toxicidad: peroxodisulfato de amonio > metavanadato de amonio > amonio heptamolibdato tetrahidrato > acetato de amonio > sulfato ferroso amoniacal hexahidrato (sal de mohr) (tablas 2 al 6).

El adelgazamiento fue el parámetro más sensible al sulfato ferroso amoniacal hexahidrato. La fragmentación fue el parámetro más sensible al metavanadato de amonio. El adelgazamiento fue el parámetro más sensible al acetato de amonio. La fragmentación fue el parámetro más sensible al peroxodisulfato de amonio. El adelgazamiento y el oscurecimiento fueron los parámetros más sensibles al amonio heptamolibdato tetrahidrato (tablas 2 al 6).

DISCUSIÓN

Se han observado diferencias en la toxicidad letal y subletal de las cinco sales de amonio sobre *E. foetida* a las 48 h de exposición, observándose una mayor toxicidad por el peroxodisulfato de amonio y por el metavanadato de amonio en comparación al amonio heptamolibdato tetrahidrato, sulfato ferroso amoniacal hexahidrato (sal de mohr) y acetato de amonio. No se ha encontrado información con relación a la toxicidad de estas cinco sales de amonio sobre organismos de suelo, y en especial sobre la lombriz de tierra; sin embargo, Lahive *et al.* (2014) mostraron un reducido efecto en la mortalidad del nitrato cérico de amonio en la lombriz de tierra a 28 días de exposición. Hughes *et al.* (2008) encontraron un bajo efecto del cloruro de amonio y del sulfato de amonio en la mortalidad de *E. foetida*, atribuyendo la toxicidad a la acción sinérgica del cloruro y del amonio. En nuestro estudio, se evaluó comparativamente cinco sales de amonio en *E. foetida*, pudiendo atribuirse las diferencias encontradas a la acción tóxica del amonio en conjunto con los aniones como $S_2O_8^{-2}$, VO_3^{-1} , $(SO_4)_2^{-2}$, $Mo_7O_{24}^{-6}$ y CH_3COO^{-1} (Hughes *et al.*, 2008).

El adelgazamiento y la fragmentación fueron las respuestas subletales más sensibles a las sales de amonio en *E. foetida* a las 48 h de exposición. Yuguda *et al.* (2015) muestran cambios progresivos de las lombrices en los signos y síntomas debido al nivel de toxicidad de las sustancias químicas, que van desde marcas visiblemente indetectables hasta enrollamiento, rizado, extrusión de líquido celómico, constricción segmentaria (“fragmentación”) e hinchazón. En varias lombrices de tierra, la porción “hinchada” causó lesiones sanguinolentas, y finalmente la muerte.

La lombriz de tierra *E. foetida* es altamente sensible al amonio y no puede sobrevivir en residuos orgánicos que presenten elevados niveles de este catión. Las lombrices de tierra pueden morir en desechos con grandes cantidades de amonio. El amonio tienen un punto de corte muy claro entre los niveles tóxicos y los no tóxicos ($<1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de amonio). Los desechos orgánicos que contienen altos niveles de amonio pueden ser aceptables después de la eliminación de esta sustancia al pasar por un período de precompostaje o por lixiviación en agua (Dominguez & Edwards, 2011). En nuestros resultados, la toxicidad letal y subletal al amonio sobre *E. foetida* depende de cada sustancia química evaluada, debido a que presentan diferentes tipos de aniones en cada sal. El amonio puede producir efectos combinados con sus aniones, y pueden afectar muy fuertemente en la vermicultura (Hughes *et al.*, 2008).

Se observaron efectos letales y subletales de las cinco sales de amonio sobre la lombriz de tierra. Con relación a la mortalidad (CL_{50}) en base al ion amonio de *E. foetida* a las 48 h de exposición se observó la siguiente secuencia de mayor a menor toxicidad: peroxodisulfato de amonio > metavanadato de amonio > amonio heptamolibdato tetrahidrato > sulfato ferroso amoniacal hexahidrato (sal de mohr) > acetato de amonio. El adelgazamiento fue el parámetro subletal más sensible al sulfato ferroso amoniacal hexahidrato. La fragmentación fue el parámetro más sensible al metavanadato de amonio. El adelgazamiento fue el parámetro más sensible al acetato de amonio. La fragmentación fue el parámetro más sensible al peroxodisulfato de amonio. El adelgazamiento y el oscurecimiento fueron los parámetros más sensibles al amonio heptamolibdato tetrahidrato. La epidermis de las lombrices *E. foetida* es una primera barrera importante al ambiente externo, que presenta diversas sustancias como las sales de amonio que pueden ocasionar adelgazamiento, fragmentación y oscurecimiento (Lahive *et al.*, 2014).

La prueba de contacto con papel de filtro sobre *E. foetida* se considera un procedimiento de evaluación o tamizaje inicial para evaluar la toxicidad relativa de los plaguicidas sobre las lombrices de tierra. Las pruebas de toxicidad de contacto se usan para estudiar los plaguicidas que se absorben principalmente a través de la pared corporal de las lombrices. Sin embargo una de las limitantes, para la gran mayoría de los tóxicos es que pudieran no representar la situación real de lo que ocurre cuando están en el suelo, debido a que no consideran a la ingestión como un mecanismo importante de ingreso del tóxico a la lombriz y producir toxicidad (Christensen & Mather, 1994; Lewandowski & Zumwinkle, 1999; Want *et al.*, 2012).

La prueba de contacto con papel de filtro no implica la ingesta del tóxico, es decir, la exposición a través de la vía intestinal no es tomada en consideración. Del mismo modo, la simulación de la adsorción de las sales de amonio en los coloides del suelo no es tomada en consideración, y por ende podría tener una disminución en la relevancia ecológica (Christensen & Mather, 1994; Stanley & Preetha, 2016). Además, se ha observado una inadecuada correlación entre la prueba de contacto con el papel de filtro y los ensayos de contaminación con el suelo como sustrato (Heimbach, 1988). Algunos productos químicos que son altamente tóxicos por contacto con las lombrices de tierra pueden no tener el mismo nivel de toxicidad por ingestión, y viceversa. Además en las pruebas de contacto con el papel de filtro, los gusanos de tierra pueden gastar mucha energía en tratar de desprenderse de la sustancia química con moco y, finalmente, morir

(Christensen & Mather, 1994). La prueba de contacto con papel filtro puede ser empleada como una herramienta ecotoxicológica para evaluar la respuesta de *E. foetida* al estrés de las sustancias químicas a base de sales de amonio (Ouina *et al.*, 2017).

Los resultados mostrados en esta investigación señalan los efectos tóxicos agudos (letales) y subletales de una gama de sales de amonio en lombrices de tierra, pero los efectos adversos subcrónicos y crónicos también son importantes en la evaluación del riesgo ecológico, como son los ensayos reproductivos, y las pruebas de evitamiento. Además, también se utilizan puntos finales subletales que involucran varios biomarcadores, que incluyen la estabilidad de la membrana lisosómica medida por el tiempo de retención del rojo neutro, así como efectos genéticos evaluados empleando el ensayo cometa (Hu *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012).

Conflictos de interés: Los autores declaran que no hay conflicto de intereses.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alpha-Raj, M. 2018. *Calculating LD₅₀/LC₅₀ using Probit analysis in Excel. free excel calculator for estimating LD₅₀/LC₅₀*. En: <http://probitanalysis.blogspot.pe/2016/07/free-excel-calculator-for-estimating.html> leído el 25 de enero del 2018.
- Angers, A. & Caron, J. 1998. Plant-induced changes in soil structure: Processes and feedbacks. *Biogeochemistry*, 42: 55-72.
- APA (American Psychological Association). 2012. *Guidelines for ethical conduct in the care and use of nonhuman animals in research*. Washington, 14 pp.
- Araneda, A.D.; Undurraga, P.; López, D.; Saez, K. & Barra, R. 2016. Use of earthworm as a pesticide exposure indicator in soil under conventional and organic management. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 76: 356-362.
- Arnold, R.E.; Hodson, M.E.; Black, S. & Davies, N.A. 2003. The influence of mineral solubility and soil solution concentration on the toxicity of copper to *Eisenia fetida* Savigny. *Pedobiologia*, 47: 622–632.
- Arrazola, E.M. 2016. *Evaluación del riesgo ambiental de la mezcla de alfa-cipermetrina e imidacloprid sobre la lombriz de tierra (Eisenia fetida)*. Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Ambiental. Universidad Científica del Sur. Lima, Perú.
- Avalos, R.S.I. 2016. *Evaluación del riesgo ambiental terrestre de dos gasolinas ecológicas de 90 octanos en lombriz de tierra en el Perú*. Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Ambiental. Universidad Científica del Sur. Lima, Perú.
- Blouin, M.; Hodson, M.; Delgado, E.; Baker, G.; Brussard, L. & Bult, K. 2013. A review of earthworm impact on soil function and ecosystem services. *European Journal of Soil Science*, 64: 161-182.
- Brown. P.J.; Long. S.M.; Spurgeon. D.J.; Svendsen. C. & Hankard. P.K. 2004. Toxicological and biochemical responses of the earthworm to pyrene, a non-carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon. *Chemosphere*, 57: 1675-1681.

- Capowiez, Y. & Bérard, A. 2006. Assessment of the effects of imidacloprid on the behavior of two earthworm species (*Aporrectodea nocturna* and *Allolobophora icterica*) using 2D terraria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64: 198–206.
- Capowiez, Y.; Rault, M.; Mazzia, C. & Belzunces, L. 2003. Earthworm behaviour as a biomarker- a case study in imidacloprid. *Pedobiologia*, 47: 542-547.
- Castellanos- Navarrete, A.; Rodríguez-Aragonés, C.; de Goede, R.G.M.; Kooistra, M.J.; Sayre, K.D.; Brussaard, L. & Pulleman, M.M. 2012. Earthworm activity and soil structural changes under conservation agricultura in central Mexico. *Soil & Tillage Research*, 123: 61-70.
- Christensen, O.M. & Mather, J.C. 1994. Earthworms as Ecotoxicological Test Organisms (Ministry of Environment, Danish Environmental Protection Agency, København), p. 100.
- Cuevas, M.; Ferrera, R.; Roldán, A. & Rodríguez, R. 2008. *Evaluación de la toxicidad de los suelos mediante bioensayos con lombrices*. Métodos Ecotoxicológicos para la evaluación de suelos contaminados con hidrocarburos, pp. 211-223.
- Dominguez, J. & Edwards, C.A. 2011. *Biology and ecology of earthworm species used for vermicomposting*. Chapter 3. pp. 27-40. *Vermiculture technology: earthworms, organic waste and environmental management*. Taylor & Francis Group, LLC.
- Dominguez, J. & Pérez-Lozada, M. 2010. *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) y *Eisenia andrei* Bouché, 1972 son dos especies diferentes de lombrices de tierra. *Acta Zoologica Mexicana* (n.s.) Número Especial, 2: 321-331.
- Doran, J.W. & Zeiss, M.R. 2000. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Applied Soil Ecology*, 15: 3-11.
- Dureja, P.; Dipankar, P.; Johnson, S. & Tomar, S.S. 1999. Effect of agrochemicals on earthworms. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 71: 397-404.
- EPA. 2012. *Ecological Effects Test Guidelines OCSP 850.3100: Earthworm Subchronic Toxicity Test*. EPA 712-C-016. January 2012. 19 p.
- Gabriel, P.; Loza-Murguía, M.; Mamani, F. & Sainz, H. 2011. Efecto de la lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*) durante el composteo y vermicomposteo

- en predios de la Estación Experimental de la Unidad Académica Campesina Carmen Pampa. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 2: 24-39.
- Gardi, C.; Angelini, M.; Barceló, S.; Comerma, J.; Cruz Gaistardo, C.; Encina Rojas, A.; Jones, A.; Krasilnikov, P.; Mendonça Santos Brefin, M.L.; Montanarella, L.; Muñiz Ugarte, O.; Schad, P.; Vara Rodríguez, M.I. & Vargas, R. (eds). 2014. *Atlas de suelos de América Latina y el Caribe*. Comisión Europea – Oficina de Publicaciones de la Unión Europea, L-2995. Luxembourg, 176 pp.
- Gómez, A. 2014. *Evaluación de la Toxicología de suelos mediante un bio-ensayo con la lombriz de tierra Eisenia fetida*. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Helling, B.; Reinecke, S.A. & Reinecke, A.J. 2000. Effects of the fungicide Copper Oxychloride on the growth and reproduction of *Eisenia fetida* (*Oligochaeta*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 46: 108-116.
- Heimbach, F. 1988. *Comparison of laboratory methods for toxicity testing with earthworms*. In: *earthworms in waste and environmental Management* (Edwards, C.A. & Neuhauser, E.F. (Eds.)), pp. 329-335.
- Hickman, Z.A. & Reid, B.J. 2008. Earthworm assisted bioremediation of organic contaminants. *Environmental International*, 34: 1072-1081.
- Hu, C.W.; Lia, M.; Cui, Y.B.; Li, D.S.; Chen, J. & Yang, L.Y. 2010. Toxicological effects of TiO² and ZnO nanoparticles in soil on earthworm *Eisenia fetida*. *Soil Biology & Biochemistry*, 42: 586-591.
- Huang, K.; Xia, H.; Cui, G. & Li, F. 2017. Effects of earthworms on nitrification and ammonia oxidizers in vermicomposting systems for recycling of fruit and vegetable wastes. *Science of The Total Environment*, 578: 337-345.
- Hughes, R.J.; Nair, J. & Ho, G. 2008. The toxicity of ammonia / ammonium to the vermifiltration wastewater treatment process. *Water Science and Technology*, 58: 1215-1220.
- Iannacone, J. & Alvaríño, L. 2002. Evaluación del riesgo ambiental del insecticida Cartap en bioensayos con tres invertebrados. *Agricultura Técnica*, 62: 366-374.
- Iannacone, J. & Lamas, G. 2003. Efecto insecticida de cuatro extractos botánicos

- y del cartap sobre la polilla de la papa *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae), en el Perú. *Entomotropica*, 18: 95-105.
- Iannacone, J. & Alvarino, L. 2004. *Eisenia foetida* (Savigny, 1826) (Annelida: Lumbricidae) como modelo ecotoxicológico para evaluar lindano y clorpirifos. *Acta Zoológica Lilloana*, 48: 5-12.
- Iannacone, J. & Alvarino, L. 2005. Selectividad del insecticida Cartap empleando bioensayos con organismos no destinatario. *Ecología Aplicada*, 4: 1-13.
- Iannacone, J.; Alvarino, L. & Paredes, C. 2009. Evaluación del riesgo ambiental del arseniato de plomo en bioensayos con ocho organismos no destinatarios *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, 4: 73-82.
- Iannacone, J.; Ayala, H., Alvarino, L.; Paredes E.C.; Villegas, W.; Alomia, J.; Santos, S.; Nolzco, N. & Cruces, L. 2014. Riesgo ecotoxicológico acuático y terrestre del bioplaguicida catahua, *Hura crepitans* (Euphorbiaceae). *Revista de Toxicología*, 50: 50-62.
- ISO (International Organization for Standardization). 1993. *Soil quality - Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida). Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil Substrate*. ISO 11268-1. First ed. pp. 12-15.
- Lagarto, A. & Vega, R. 1990. *Manual de ensayos de toxicología alternativa*. CIDEM. Cuba.
- Lahive, E.; Jurkschat, K.; Shaw, B.J.; Handy, R.D.; Spurgeon, D.J. & Svendsen, C. 2014. Toxicity of cerium oxide nanoparticles to the earthworm *Eisenia fetida*: sublethal effects. *Environmental Chemistry*, 11: 268-278.
- Leveque, T.; Capowiez, Y.; Schreck, E.; Mazzia, C.; Auffan, M.; Foucault, Y.; Austruy, A. & Dumat, C. 2013. Assessing ecotoxicity and uptake of metals and metalloids in relation to two different earthworm species (*Eisenia hortensis* and *Lumbricus terrestris*). *Environmental Pollution*, 179: 232-241.
- Lewandowski, A. & Zumwinkle, M. 1999. *Assessing the soil system: A review of soil quality literature*. Energy and Sustainable Agriculture Program. Minnesota Department of Agriculture. URL: www.mda.state.mn.us.
- Lionetto, M.G.; Calisi, A. & Schettino, T. 2012. *Earthworm biomarkers as tools for soil pollution assessment*. En: Hernandez-Soriano, M.C. (Ed.). *Soil health and land use management* (305-332). InTech, Disponible en:

- <http://www.intechopen.com/books/soil-health-and-land-usemanagement/earthworm-biomarkers-as-tools-for-soil-pollution-assessment>.
- Lukkari, T.; Aatsinki, M.; Väisänen, A. & Haimi, J. 2005. Toxicity of copper and zinc assessed with three different earthworms tests. *Applied Soil Ecology*, 30: 133–146.
- Macedo, M.E.; Consoli, R.A.; Grande, T.S.; Dos Anjos, A.M.; De Oliveira, A.B.; Mendes, N.M.; Queiroz, R.O. & Zani, C.L. 1997. Screening of Asteraceae (Compositae) plant extracts for larvicidal activity against *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 92: 565-570.
- Menezes-Oliveira, V.B., Scott-Fordsmand, J.J.; Rocco, A.; Soares, A.M.V.M. & Amorim, M.J.B. 2011. Interaction between density and Cu toxicity for *Enchytraeus crypticus* and *Eisenia fetida* reflecting field scenarios. *Science of the Total Environment*, 409: 3370–3374.
- Monard, C.; Martin-Laurent, F.; Vecchiato, C.; Francez, A.; Vandenkoornhuyse, P. & Binet, F. 2008. Combined effect of bioaugmentation and bioturbation on atrazine degradation in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 2253-2259.
- Mukerjee, M. 1997. Trends in Animal Research. *Scientific American*, pp. 86-93.
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). 1984. *Earthworm, Acute Toxicity Tests*. Guideline for Testing of Chemicals. 207. Adopted 4 april 1984. 9 p.
- Ouina, T.S.; Panoff, J.M.; Koussémon, M. & Gonnety, T.J. 2017. Effect of pesticides and micro-organisms on earthworm *Eisenia fetida* (Savigny, 1826). *African Journal of Agriculture Research*, 12: 706-712.
- Palafox, A.; Hernandez, A.; Lopez, J. & Cuevas, M. 2012. *Evaluación de la toxicidad de los suelos mediante bioensayos con lombrices. En: Métodos ecotoxicológicos para la evaluación de suelos contaminados con hidrocarburos*. México, D.F.
- Pelosi, C.; Barot, S.; Capowiez, Y.; Hedde, M. & Vandebulcke, F. 2014. Pesticides and earthworms. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 34: 199–228.
- Pérez-Zaballos, J. & García-Moreno, A. 2009. Modelos adaptativos en Zoología (Manual de prácticas). 9. Estudio anatómico y funcional de un anélido y un crustáceo. *Reduca (Biología)*. Serie Zoología, 2: 126-141.

- Princz, J.; Becker, L.; Scheffczyk, A.; Stephenson, G.; Scroggins, R.; Moser, T. & Rombke, J. 2017. Ecotoxicity of boric acid in standard laboratory test with plants and soil organisms. *Ecotoxicology*, 26:471-481.
- Sanchez-Hernandez, J.C. 2006. Earthworm biomarkers in ecological risk assessment. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 188: 85–126.
- Schaefer, M. 2003. Behavioural endpoints in Earthworm ecotoxicology. *The Journal of Soils and Sediments*, 3: 79–84.
- Schaefer, M.; Peterson, S.O. & Filser, J. 2005. Effects of *Lumbricus terrestris*, *Allolobophora chlorotica* and *Eisenia fetida* on microbial community dynamics in oil-contaminated soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 37: 2065-2076.
- Schuldt, M., Rumi, A., & Gutierrez, D. 2005. Determinación de “edades“(clases) en poblaciones de *E. fetida* y sus implicancias reprobilógicas. *Revista del Museo de la Plata Zoología*, 17(170):1-10.
- Stanley, J. & Preetha, G. 2016. *Pesticide toxicity to non-target organisms. Exposure, Toxicity and risk assessment methodologies*. Springer.
- Wang, Y.; Cang, T.; Zhao, X.; Yu, R.; Chen, L., Wu, Ch. & Wang, Q. 2012. Comparative acute toxicity of twenty-four insecticides to earthworm, *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 9:122-128.
- Yuguda, A.U.; Abubakar, Z.A.; Jibo, A.U.; AbdulHameed, A. & Nayaya A.J. 2015. Assesment of toxicity of some agricultural pesticides on earthworm (*Lumbricus terrestris*). *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 9: 49-59.

Received March 15, 2018.

Accepted April 21, 2018.

CAPÍTULO 3 / CHAPTER 3

**TOXICIDAD DE *SCHINUS MOLLE* L. "MOLLE"
(ANACARDIACEAE) EN *EROSINA HYBERNIATA*
GUENÉE 1858 (LEPIDOPTERA: GEOMETRIDAE)
EN ESTADO LARVAL, PLAGA DEL *TECOMA*
STANS (BIGNONIACEAE) EN EL DISTRITO DE
MIRAFLORES, LIMA-PERÚ**

**TOXICITY OF *SCHINUS MOLLE* L. "MOLLE"
(ANACARDIACEAE) ON *EROSINA HYBERNIATA*
GUENÉE 1858 (LEPIDOPTERA: GEOMETRIDAE)
IN LARVAL STAGE, PEST OF *TECOMA*
STANS (BIGNONIACEAE) IN THE DISTRICT OF
MIRAFLORES, LIMA-PERÚ**

Tatiana E. Robles¹ & José Iannacone¹

¹Universidad Ricardo Palma (URP), Facultad de Ciencias Biológicas
(FCB), Laboratorio de Parasitología.

Av. Alfredo Benavides 5440, Santiago de Surco, Lima, Perú.

Autor para correspondencia: jose.iannacone@urp.edu.pe

CONTENIDO

ABSTRACT	53
RESUMEN	54
INTRODUCCIÓN	55
MATERIALES Y MÉTODOS	
• Lugar de Ejecución	57
• Muestra de Estudio	57
• Condiciones ambientales	57
• Erosina hyberniata	58
• Schinus molle	58
• Preparación del extracto	59
• Bioensayo de mortalidad larvaria por incorporación a dieta	60
• Análisis de datos	61
• Aspectos éticos	61
RESULTADOS	61
DISCUSIÓN	
• Conflictos de interés	62
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

ABSTRACT

Today, municipalities face great challenges in implementing pest management projects in their green areas, because these areas are a fundamental part of an urban area. The lack of knowledge of the use of botanical extracts as biocides on *Erosina hyberniata* (Lepidoptera: Geometridae) "Worm of the Tecoma", limits the management of this pest that affects the *Tecoma stans* "Yellow trumpet flower" (Bignoniaceae), ornamental species in urban green areas in the district of Miraflores, Lima, Peru. The objective was to determine the toxicity of *Schinus molle* L. (Anacardiaceae) in *E. hyberniata* in a larval stage under environmental conditions in the Biological Control Laboratory of the Municipality of Miraflores, Lima, Peru. Laboratory conditions were $25.5^{\circ}\text{C} \pm 1.6^{\circ}\text{C}$ and HR $65\% \pm 1\%$. The botanical samples were collected from the trees of the Miraflores District. The bioassay of toxicity with the aqueous extract of *S. molle* between 1.25 to 20% on larvae observed that 24 h and 48 h of exposure did not show effectiveness. The 1.25% hexane extract showed no effectiveness; however, 2.5%, 5% and 10% hexane extract at 24 h of exposure showed effects on larval mortality with 20%, 50% and 90% respectively and the LC_{50} was 4.69% and 48 h exposure showed effects with 22.5%, 55% and 100% respectively and the LC_{50} was 40.08%. The botanical extract based on *S. molle* can be used for the control of *E. hyberniata*.

Keywords: *Erosina hyberniata* - larval mortality - *Schinus molle* - *Tecoma stans*

RESUMEN

Hoy en día, las municipalidades enfrentan grandes retos en implementar proyectos de manejo de plagas en sus áreas verdes, debido que estas áreas son parte fundamental de una zona urbana. La falta de conocimiento del uso de extractos botánicos como biocidas sobre *Erosina hyberniata* (Lepidoptera: Geometridae) “Gusano del Tecoma”, limita el manejo de esta plaga que afecta al *Tecoma stans* “Huaranhuay” (Bignoniaceae), especie ornamental en las áreas verdes urbanas en el distrito de Miraflores, Lima, Perú. El objetivo fue determinar la toxicidad de *Schinus molle* L. (Anacardiaceae) en *E. hyberniata* en estado larval bajo condiciones ambientales en el Laboratorio de Control Biológico de la Municipalidad de Miraflores, Lima, Perú. Las condiciones del laboratorio fueron $25,5^{\circ}\text{C} \pm 1,6^{\circ}\text{C}$ y HR $65\% \pm 1\%$. Las muestras botánicas fueron recolectadas de los árboles del Distrito de Miraflores. El bioensayo de toxicidad con el extracto acuoso de *S. molle* entre 1,25 a 20% sobre larvas observó que a 24 h y a 48 h de exposición no mostró efectividad. El extracto hexánico al 1,25% no mostró efectividad; sin embargo, el extracto hexánico al 2,5%, 5% y 10% a 24 h de exposición mostraron efectos en la mortalidad larvaria con 20%, 50% y 90% respectivamente y la CL_{50} fue 4,69% y a 48 h de exposición mostraron efectos con 22,5%, 55% y 100% respectivamente y la CL_{50} fue 40,08%. El extracto botánico a base de *S. molle* puede ser empleado para el control de *E. hyberniata*.

Palabras clave: *Erosina hyberniata* - mortalidad larvaria - *Schinus molle* - *Tecoma stans*

INTRODUCCIÓN

El crecimiento de la población y las altas concentraciones de habitantes pueden causar serios daños en los frágiles recursos ambientales y naturales de una ciudad (Sorensen *et al.*, 1998). Las áreas verdes son parte fundamental de una zona urbana no solo porque hace nuestras ciudades más habitables, placenteras y sostenibles sino por los beneficios ambientales que obtenemos de ellas como la reducción de la contaminación ambiental del aire, la adaptación tanto de macro como de microclimas y el enriquecimiento de la biodiversidad. Por eso, hoy en día, las municipalidades enfrentan grandes retos en implementar proyectos de manejo de plagas de áreas verdes urbanas como el uso de insecticidas ecológicos o controladores biológicos que ayudarían a reducir el uso de productos químicos que ponen en riesgo la salud pública y/o afectan la fauna propia del lugar (Sorensen *et al.*, 1998).

El “Huaranhuay” *Tecoma stans* (L.) C. Juss. ex Kunth, que pertenece a la familia de las Bignoniáceas, es una especie ornamental que se encuentra distribuida en diversos parques urbanos tales como en el distrito de Miraflores, Lima, Perú formando parte de las áreas de esparcimiento y de recreación. *Tecoma stans* es una especie primaria, medianamente heliófila, que se regenera en campos abandonados aún bajo sombra. Esta especie presenta efecto restaurador: conservación de suelo y control de la erosión. Además, es usada como barrera rompe-viento, cerco vivo en los agro-hábitats, proporciona sombra y refugio, siendo muy común en los jardines y avenidas (SNIF, 2000).

Este árbol viene siendo atacado por *Erosina hyberniata* Guenée, 1858 (Lepidoptera: Geometridae) conocido como el “gusano del Tecoma”. Esta plaga afecta al “Huaranhuay” *T. stans* (Bignoniaceae), que es una especie ornamental con valor estético asociada con el paisaje urbano. El Huaranhuay se ve afectado por el daño que genera *E. hyberniata*. La plaga en temporada de verano presenta una mayor población y daño a diferencia de las demás temporadas. Se alimentan de las hojas de este árbol, y como consecuencia se usan productos químicos que ponen en riesgo la salud pública y afectan a la fauna propia del lugar.

Las plantas, en conjunto, producen más de 100.000 sustancias de bajo peso molecular conocidas también como metabolitos secundarios. Éstos poseen propiedades biológicas con importancia contra insectos plagas siendo un

mecanismo de protección natural mediante el cual pueden repeler o defenderse contra las plagas (Iannacone *et al.*, 2017). Su modo de acción es como insecticida (causa la muerte al ingerirlo o en contacto directo), repelente (causa el alejamiento), inhibidor de la alimentación, hormonal (causa cambios en la metamorfosis insectil) y atrayente (Hoss, 1992).

El “molle” *Schinus molle* L. pertenece a la familia Anacardiáceas, es una especie usada tradicionalmente por personas indígenas a lo largo de los trópicos como medicina; analgésico, antiinflamatorios y agentes antitumorales. Poseen actividad antifúngicas, antibacteriales, antiviral, insecticida y propiedades repelentes (Gundidza, 1993; Iannacone & Lamas, 2002; Deveci *et al.*, 2010; Iannacone & Alvaríño, 2010). Además, esta planta tiene importancia etnobotánica, pues se le ha utilizado en el control de plagas agrícolas en varias localidades del Perú (Rodríguez & Eguasquiza, 1996); asimismo, los insecticidas derivados de las plantas superiores tienen la ventaja de ser seguros para el medio ambiente y para los usuarios siendo un detalle esencial para poder ser aplicados en áreas verdes urbanas (Chirino *et al.*, 2001).

Se han desarrollado diferentes protocolos de bioensayos para determinar el efecto de plaguicidas sobre la fauna benéfica (Calow, 1993; Iannacone *et al.*, 2000; Iannacone & Alvaríño, 2005, 2010; Iannacone *et al.*, 2017). Además, el parámetro de toxicidad aguda más comúnmente empleado es la concentración letal media (CL_{50}) (en mg o $\mu\text{g L}^{-1}$) (Throne *et al.*, 1995).

Se ha evaluado la actividad ecotoxicológica del molle teniendo como resultado que la emergencia de los adultos desde larvas momificadas de *Phthorimaea operculella* Zeller, 1873 fue afectada por los extractos hexánicos de molle (Iannacone & Lamas, 2003a). Igualmente, se realizaron bioensayos con los extractos acuosos de molle, a las concentraciones empleadas, y no causaron efectos estadísticamente significativos en la mortalidad de larvas (ensayo de residualidad a 48 h de exposición) y pupas (efectos por inmersión por 5 s) de *Chrysoperla externa* Schneider, 1851. En contraste, los extractos hexánicos (10%) de molle tuvieron efectos ovicidas (efectos por inmersión por 5 s) (Iannacone & Lamas, 2003b).

En *E. hyberniata* hasta la fecha no se conoce los extractos de plantas que lograrían controlar a esta plaga sin usar productos químicos. Este trabajo con *E. hyberniata* (Geometridae) permitirá reducir las áreas afectadas por esta plaga de manera natural con extractos acuosos y con solventes orgánicos de plantas que se usen artesanalmente como insecticidas, evitando que la fauna acompañante

se vea afectada (Iannacone & Alvariano, 2010). En esta investigación se usa al *S. molle*, de fácil acceso en el distrito de Miraflores, Lima, Perú. Por otro lado, en el aspecto ambiental y de salud pública genera una alternativa de reemplazar los productos químicos sintéticos (plaguicidas químicos) por extractos botánicos como el “molle” (Iannacone & Alvariano, 2010).

Por esta razón el objetivo de esta investigación fue determinar el efecto tóxico del *S. molle* para el control de *E. hyberniata* en estado larval, plaga del *T. stans* en el distrito de Miraflores, Lima-Perú.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de Ejecución

Se realizó en el Laboratorio de Control Biológico de la Municipalidad de Miraflores, Lima, Perú ubicado en posición geográfica (12° 06' 45,20" SL, 77° 00' 33,32" W) a una elevación de 122 msnm en el distrito de Miraflores, Lima-Perú, bajo condiciones ambientales (25,5°C ± 1,6°C y HR 65% ± 1%).

Muestra de Estudio

El gusano del *Tecoma* fue recolectado durante el mes de mayo del 2013 en el distrito de Miraflores, Lima-Perú. Posteriormente se envió muestras para la identificación respectiva a la Universidad Estatal de Colorado USA, donde fueron identificadas mediante el análisis de ADN en el mes de junio del 2013 por el Todd Gilligan como *E. hyberniata* perteneciendo a la familia Geometridae, sub-familia Ennominae del género *Erosina*. Para analizar el efecto biocida de *S. molle* se obtuvo las hojas de los jardines del distrito de Miraflores, Lima-Perú, entre los meses de junio a agosto del 2013, debido a que en estos meses la planta se encuentra en etapa de floración. Finalmente, para analizar el efecto biocida de *S. molle*, se determinó la mortalidad larvaria después de la aplicación del extracto botánico a una concentración de 1,25%, 2,5%, 5%, 10%, 20% y el control (agua destilada) con la finalidad de obtener la CL₅₀.

Condiciones ambientales

Durante los meses de marzo a mayo del 2013, se midió diariamente a 08:00h, 12:00h y 17:00h los parámetros de temperatura y humedad relativa ambiental, obteniendo una temperatura (T°) promedio de 25,5°C ± 1,6°C y una humedad relativa (HR) promedio de 65% ± 1%. Además, se midió la temperatura y la humedad relativa máxima y mínima, para luego obtener los promedios de éstos. El promedio mensual de la temperatura de los datos registrados fue: T° Máx

26,7°C ± 1°C y T° Min 23,2°C ± 1°C y de la humedad relativa fue: HR Máx 66% ± 1% y HR Min 64% ± 1%.

Erosina hyberniata

Fueron recolectadas de árboles de *T. stans* de 2m de altura que se encuentran ubicados en diversos lugares del Distrito de Miraflores, Lima, Perú (Fig. 1). No solo se realizó la recolección en áreas verdes sino en las vías públicas como avenidas, calles, etc. Durante la recolección se observó que las larvas de diferentes estadios se encontraban en la copa del árbol a diferencia de las pupas que se encontraban en las fisuras de la corteza del tronco, en las hojas secas y en menor cantidad colgadas de las ramas por medio de sus sedas. La crianza y alimentación de *E. hyberniata* siguió a Robles-Rolando *et al.* (2015).



Figura 1. Árbol del *Tecoma stans* en el distrito de Miraflores, Lima, Perú.

Schinus molle

El espécimen botánico se obtuvo de los jardines del distrito de Miraflores en Lima, Perú, entre julio a agosto 2013 (Fig. 2). La recolección se realizó en la etapa de floración. Las hojas se secaron en una estufa a 40°C durante 48 h hasta obtener un peso seco constante, luego fueron trituradas en un mortero hasta obtener un polvo con 95% de gránulos < 0,5 mm que fueron verificados bajo el microscopio (Iannacone & Lamas, 2003ab). Finalmente, las muestras fueron selladas herméticamente en frascos ámbar de vidrio de borosilicato de 50 mL y se mantuvieron a 6°C por no más de 14 días.

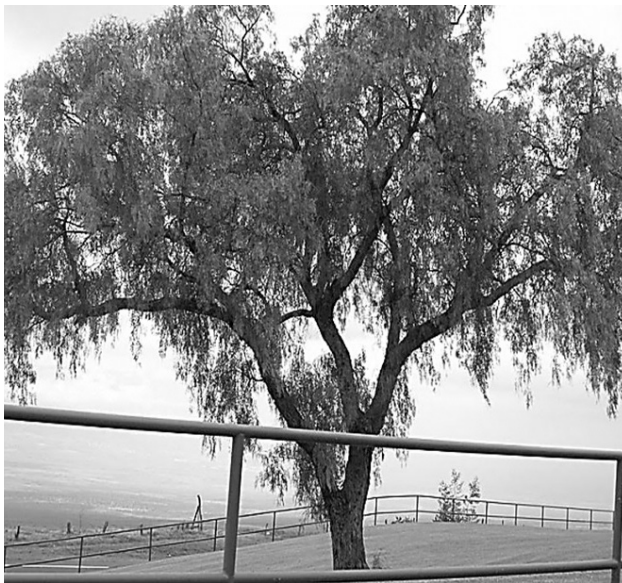


Figura 2. Árbol de *Schinus molle* en el distrito de Miraflores, Lima, Perú.

Preparación del extracto

Para la preparación de los extractos botánicos acuosos crudos, se realizaron con agua destilada (pH = 7,2; dureza = 2,03 mg·L⁻¹ y alcalinidad = 8 mg·L⁻¹). Se prepararon en una proporción de 20 g por 100 mL de agua destilada, luego fueron macerados por 48 h para poder extraer los compuestos hidrosolubles (Thomazini *et al.*, 2000), finalmente se filtraron a través de un papel filtro (Whatman® No.1, USA). Las concentraciones que se utilizaron en el bioensayo fueron al 1,25%, 2,5%, 5%, 10%, 20% y el control (agua destilada).

Al mismo tiempo, se preparó un extracto botánico liposoluble crudo (macerado), con 50 mL de hexano grado analítico y 5 g del polvo botánico. La extracción se efectuó durante 7 días a temperatura ambiente ($24 \pm 3^\circ\text{C}$); posteriormente se filtró con papel fino, para obtener el extracto botánico crudo de hexano al 10%. Las concentraciones que se utilizaron en el bioensayo fueron al 1,25%, 2,5%, 5%, 10%, 20% y el control (agua destilada).

Bioensayo de mortalidad larvaria por incorporación a dieta

El extracto botánico a distintas concentraciones se aplicó al foliolo por inmersión durante cinco s, luego se colocó en una placa petri y se dejó secar en un lugar ventilado durante dos h sobre papel Tissue®. Finalmente se colocó el foliolo en placas petri de 150 x 25 mm con 10 larvas del segundo estadio larval (figs. 3-4). El ensayo se realizó hasta que la mortalidad en el control fue mayor al 30 %. Todos estos ensayos se realizaron bajo condiciones de oscuridad, para evitar el efecto de fotólisis de los extractos botánicos usados (Calow, 1993).

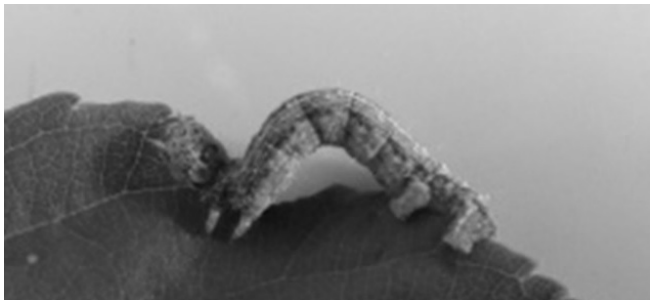


Figura 3. Larva de *Erosina hyberniata* alimentándose de una hoja.

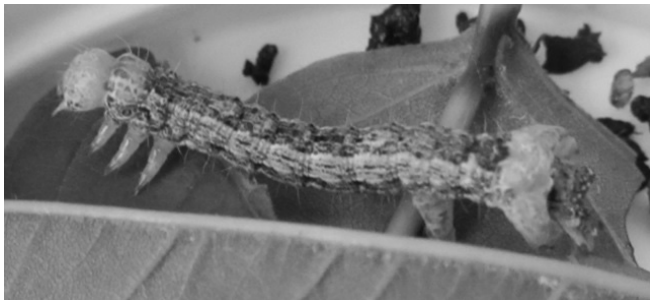


Figura 4. Larva de *Erosina hyberniata* recién mudada.

Análisis de datos

En todos los casos, la eficacia de los tratamientos y las repeticiones se evaluaron a través de un análisis de varianza de dos vías con prueba complementaria de significancia de Tukey ($\alpha = 0,05$). Los datos fueron previamente normalizados mediante la transformación raíz cuadrada del arcoseno. Las CL_{50} o CE_{50} se calcularon usando el programa computarizado Probit versión 1,5 (Weber, 1993). El modelo de regresión fue verificado usando el estadístico X^2 . Se empleó el paquete estadístico SPSS, versión 16,00 para Windows XP (2001) para el cálculo de los estadísticos descriptivos e inferenciales a un nivel de significancia de $p \leq 0,05$.

Aspectos éticos: los protocolos experimentales con *E. hyberniata* siguieron las pautas de la “Institutional Animal Care and Use Committee” (IACUC) (APA, 2012), minimizando el número de los organismos empleados, repeticiones y empleando las tres Rs “Rs-reemplazamiento, reducción, y refinamiento (Mukerjee, 1997). La investigación relacionada con el uso de animales ha cumplido con todas las regulaciones nacionales relevantes y las políticas institucionales para el cuidado y uso de animales.

RESULTADOS

Al evaluar el efecto por incorporación a dieta del extracto acuoso de *S. molle* a las cinco concentraciones entre 1,25 a 20% sobre larvas del segundo estadio de *E. hyberniata* se observó que a 24 h y 48 h de exposición no mostró efectividad el bioinsecticida. Sin embargo, a 24 h de exposición por incorporación a dieta con el extracto hexánico de molle al 2,5%, 5% y 10% mostraron efectos en la mortalidad larvaria de *E. hyberniata* con 20%, 50% y 90% respectivamente y la CL_{50} fue 4,69% (Tabla 1). Mientras que a 48 h de exposición por incorporación a dieta con el extracto hexánico de molle al 2,5%, 5% y 10% mostraron efectos en la mortalidad larvaria de *E. hyberniata* con 22,5%, 55% y 100% respectivamente y la CL_{50} fue 4,08% (Tabla 1). Finalmente, según la prueba de significancia de Turkey se concluye que a partir de la concentración 2,5% mostró diferencias con el control.

Tabla 1. Efecto del extracto hexánico de molle sobre la mortalidad de larvas de *Erosina hyberniata* (Lepidoptera: Geometridae) a 24 h y 48 h de exposición. Sig. = significancia. F = estadístico de Fisher para el análisis de varianza (ANOVA). Porcentajes de mortalidad con letras minúsculas iguales en una misma columna indican que son estadísticamente iguales (Prueba *aposteriori* de Tukey: $p \geq 0,05$).

Tiempo	24h	Sig.	48h	Sig.
Concentración (% extracto)				
Control	0	a	0	a
1,25	0	a	0	a
2,5	20	b	22,5	b
5	50	c	55	c
10	90	d	100	d
F	220,50		619	
Sig.	0,00		0,00	
CL ₅₀	4,69		4,08	
CL ₅₀ inferior	4,01		3,55	
CL ₅₀ superior	5,52		4,70	

DISCUSIÓN

Muchos extractos de plantas y aceites esenciales tienen acción fumigante (Lee *et al.*, 2004; Iannacone *et al.*, 2015; Alegre *et al.*, 2017; Chiffelle *et al.*, 2017; Román-Farje *et al.*, 2017). En el presente trabajo, el bioensayo de mortalidad larvaria realizado con extracto acuoso de *S. molle* no produjo toxicidad en larvas; sin embargo, según Ramírez *et al.* (2001) señalaron que los extractos botánicos obtenidos con disolventes, al extraer distintos metabolitos, pueden causar mortalidades variables sobre insectos evaluados en bioensayos de laboratorio. Esto se pudo observar al realizar el bioensayo con extracto hexánico en las concentraciones de 2,5%, 5% y 10% las cuales mostraron efectos en la mortalidad larvaria de *E. hyberniata*.

Las hojas de *S. molle* contiene taninos, alcaloides, flavonoides, saponinas esféricas, esteroides, terpenos, gomas, resinas y aceites esenciales. Éstos últimos incluyen 20 o más compuestos diferentes (Wimalaratne *et al.*, 1996). Los aceites esenciales se presentan en un 2% en las hojas del *S. molle* y contienen terpenoides, siendo el *cis*-menth-2-en-1-ol y el *trans*-piperitol los que han sido involucrados en actividad insecticida.

Germacreno D, es uno de los dos componentes principales identificados a partir del extracto de la hoja, se ha informado que muestra la actividad repelente contra garrapatas y pulgones de ganado (Bruce *et al.*, 2005; Birkett *et al.*, 2008). Además, el delta-cadineno y alphacadinol, los dos componentes principales identificados a partir del aceite esencial de la hoja, se han reportado como repelentes contra algunos artrópodos (He *et al.*, 1997; Yatagai *et al.*, 2002). Algunos de estos compuestos pudieron estar presentes en el extracto hexánico de *S. molle* que ha sido evaluado en el presente estudio.

Se concluye que el extracto acuoso de *S. molle* entre 1,25 a 20% sobre larvas del segundo estadio de *E. hyberniata* se observó que a 24 h y 48 h de exposición no mostró efectividad el bioinsecticida. El extracto hexánico de molle al 1,25% no mostro efectividad como bioinsecticida demostrando ser inocuo para la plaga. El extracto hexánico de molle al 2,5%, 5% y 10% a 24 h de exposición por incorporación a dieta mostraron efectos en la mortalidad larvaria de *E. hyberniata* con 20%, 50% y 90% respectivamente y la CL_{50} fue 4,69%. El extracto hexánico de molle al 2,5%, 5% y 10% a 48 h de exposición por incorporación a dieta mostraron efectos en la mortalidad larvaria de *E. hyberniata* con 22,5%, 55% y 100% respectivamente y la CL_{50} fue 4,08%.

Conflictos de interés: Los autores declaran que no hay conflicto de intereses.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alegre, A.; Iannacone, J. & Carhuapoma, M. 2017. Toxicidad del extracto acuoso, etanólico y hexánico de *Annona muricata*, *Minthostachys mollis*, *Lupinus mutabilis*, y *Chenopodium quinoa* sobre *Tetranychus urticae* y *Chrysoperla externa*. Chilean journal of agricultural & animal sciences, 33: 273-284.
- APA (American Psychological Association). 2012. *Guidelines for ethical conduct in the care and use of nonhuman animals in research*. Washington, 14 pp.
- Bruce, T.J.A., Birkett, M.A.; Blande, J.; Hooper, A.M.; Martin, J.L.; Khambay, B.; Prosser, I.; Smart, L.E. & Wadhams, L.J. 2005. Response of economically important aphids to components of *Hemizygia petiolata* essential oil. Pest Management Science, 61: 1115-1121.
- Birkett, M.A.; Abassi, S.A.; Kröber, T.; Chamberlain, K.; Hooper, A.M.; Guerin, P.M.; Pettersson, J.; Pickett, J.A.; Slade, R. & Wadhams, L.J. 2008. Antiectoparasitic activity of the gum resin, gum haggard, from the East African plant, *Commiphora holtziana*. Phytochemistry, 69: 1710-1715.
- Calow, P. 1993. *Handbook of ecotoxicology*. Blackwell Science Ltd. Sheffield, UK. Vol. I. 478 pp.
- Chiffelle, Í.; Huerta, A.; Sandoval, C.A. & Araya, J.E. 2017. Insecticide effect of leaf extracts from *Schinus molle* on larvae of *Gonipterus platensis*. Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín, 70: 8263-8270.
- Chirino, M.; Cariac, M. & Ferrero, A. 2001. Actividad insecticida de extractos crudos de drupas de *Schinus molle* L (Anacardiaceae) sobre larvas neonatas de *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae). Boletín de Sanidad Vegetal- Plagas, 27: 305-314.
- Deveci, O.; Sukan A.; Tuzun, N. & Kocabas, E. 2010. Chemical composition, repellent and antimicrobial activity of *Schinus molle* L. Journal of Medicinal Plants Research, 4: 2211-2216.
- Gundidza, M. 1993. Antimicrobial activity of essential oil from *Schinus molle* Linn. The Central African Journal of Medicine, 39: 231-234.

- He, K.; Zeng, L.; Shi, G.; Zhao, G.X.; Kozlowski, J.F. & McLaughlin, J.L. 1997. Bioactive Compounds from *Taiwania cryptomerioides*. Journal of Natural Products, 60: 38-40.
- Hoss, R. 1992. *Guía metodológica*: Uso de extractos vegetales en la Regulación de Plagas. Cuaderno de trabajo N° 01. Red de Acción en Alternativas al Uso de Agroquímicos, Lima, Perú.
- Iannacone, J. & Lamas, G. 2002. Efecto de dos extractos botánicos y de un insecticida convencional sobre el depredador *Chrysoperla externa*. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica), 65: 92-101.
- Iannacone J. & Lamas G. 2003a. Efecto insecticida de cuatro extractos botánicos y del cartap sobre la polilla de la papa *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae), en el Perú. Entomopropica, 18: 95-105.
- Iannacone, J. & Lamas, G. 2003b. Efectos toxicológicos de extractos de Molle (*Schinus molle*) y Lantana (*Lantana camara*) sobre *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae), *Trichogramma pintoi* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) y *Copidosoma koehleri* (Hymenoptera: Encyrtidae) en el Perú. Agricultura Técnica, 63: 347-360.
- Iannacone J. & Alvariano, L. 2005. Selectividad del insecticida cartap empleando bioensayos con organismos no destinatarios. Ecología Aplicada, 4: 91-104.
- Iannacone J. & Alvariano L. 2010. Toxicidad de *Schinus molle* L. (Anacardiaceae) a cuatro controladores biológicos de plagas agrícolas en el Perú. Acta Zoológica Mexicana (n.s.) 26: 603-615.
- Iannacone, J.; Alvariano, L.; Caballero, C. & Sánchez, J. 2000. Cuatro ensayos ecotoxicológicos para evaluar lindano y clorpirifos. Gayana, 64: 139-146.
- Iannacone, J.; Alvariano, L.; La Torre, M.A.; Guabloche, A.; Ventura, K.; Chero, J.; Cruces, C.; Romero, S.; Tuesta, E.; Saez, G.; MacDonald, D.; Tueros, G.; Argota, G.; Fimia, R. & Carhuapoma, M. 2015. Acute and chronic toxicity of *Tagetes elliptica* (Asteraceae) and dimethoate on predators and parasitoids of agricultural pests of importance in Peru. The Biologist (Lima), 13: 329-347.
- Iannacone, J.; Alvariano, L.; Guabloche, A.; Ventura, K.; La Torre, M.A.; Carhuapoma, M. & Castañeda, L. 2017. Acute and chronic toxic effect of *Tagetes minuta* "black mint" (Asteraceae) and carbaril on six important entomophages in biological control. The Biologist (Lima), 15: 85-97.

- Lee, H.; Annis, C.; Tumaali, F. & Choi, S. 2004. Fumigant toxicity of essential oils from the Myrtaceae family and 1,8 -cineole against 3 major stored-grain insects. *Journal of Stored Products Research*, 40: 553-564.
- Mukerjee, M. 1997. Trends in Animal Research. *Scientific American*, pp. 86-93.
- Ramírez, L.A.; García, L.E.; Rodríguez, C. & Castro, A.E. 2001. Evaluación del efecto insecticida de extractos de plantas sobre *Leptophobia aripa elodia*. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*, 60: 50-56.
- Robles-Rolando, T. & Iannacone, J. 2015. Life cycle and behavior of *Erosina hyberniata* (Lepidoptera: Geometridae) in the district of Miraflores, Lima, Peru. *The Biologist (Lima)*, 13: 11-20.
- Rodríguez, A. & Egusquizam R. 1996. *Efecto del molle (Schinus molle) y sus extractos en el control de Phthorimaea operculella en almacenes de papa*. Sociedad Entomológica del Perú. Resúmenes y programa de la 38 Convención Nacional de Entomología. Chíncha (Perú). SEP. FONAGRO, Chíncha. p. 23.
- Roman-Farje, A.; Iannacone, J. & Alvarino, L. 2017. Efecto tóxico del saúco, *Sambucus peruviana* (caprifoliaceae), en *Daphnia magna*, *Sitophilus zeamais* y *Copidosoma koehleri* en Perú. *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, 33: 3-13.
- SNIF (Sistema Nacional de Información Forestal). 2000. *Tecoma stans* (L) Juss. Ex Kunth (1819). *Nova Genera et Species Plantarum* 3: 144-144.
- Sorensen, M.; Barzetti, V.; Keipi, K. & Williams, J. 1998. *Manejo de las áreas urbanas*. División del Medio Ambiente. México, 81p.
- Thomazini, M.; Lino, J.; Costa, A. & Berti, E. 2000. Caragetizacao morfológica das fases imaturas e tempo de desenvolvimento de *Muscidifurax uniraptor* Kogan & Legner (Hymenoptera: Pteromalidae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 29: 691-696.
- Throne, J.; Weaver, D.K.; Chew, V. & Baker, J. 1995. Probit analysis of correlated data: multiple observations over time at one concentration. *Journal of Economic Entomology*, 88: 1510-1512.
- Yatagai, M.; Makihara, H. & Oba, K. 2002. Volatile compenents of Japanese cedar cultivars as repellents related to resistance to *Cryptomeria* bark borer. *Journal of Wood Science*, 48: 51-55.

Wimalaratne, P.D.C.; Slessor, K.N.; Borden, J.H.; Chong, L.J. & Abate, T. 1996.
Isolation and identification of house fly, *Musca domestica* L., repellents from
pepper tree, *Schinus molle* L. *Journal of Chemical Ecology*, 22: 49-59.

Received May 3, 2018.

Accepted June 18, 2018.

Se terminó de imprimir en
Julio 2018
BUSINESS SUPPORT ANETH S.R.L.
Av. Marginal 259 – Urb. Javier Prado – 6ta. Etapa – Salamanca – Ate
Teléfono: 01 434-5101
Celular: 991258218

Continuando con la política de difusión de los trabajos de investigación realizados por los docentes investigadores de la Universidad Ricardo Palma, ofrecemos este cuarto número de la serie: Cuaderno de Investigación, en esta oportunidad se presentan investigaciones en el campo de las Ciencias Biológicas.

La publicación contiene tres investigaciones que abordan dos temas vigentes, muy importantes para los trabajos de investigación básica en Ciencias Biológicas: la células madre y la ecotoxicología.

Felicitemos a los docentes investigadores autores de estos estudios reportados, que desde ya forman parte del esfuerzo de la Facultad de Ciencias Biológicas y del Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Ricardo Palma por poner al alcance de la comunidad científica importantes logros de las investigaciones en ciencias biológicas en nuestro país.

Santiago de Surco, julio del 2018

Héctor Hugo Sánchez Carlessi
Vicerrector de Investigación

