

# Ectotoxicidad de *Mentha spicata* sobre *Chlorella vulgaris*

Márquez Ruiz, Jhosse Paul; Ernesto Mangas Ramírez

Escuela de Biología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

## Resumen

*El reemplazo de los insecticidas sintéticos por sustancias vegetales, como la hierbabuena (Mentha spicata) ha sido una alternativa viable y es un recurso que toma relevancia en la actualidad debido al uso irracional de plaguicidas y herbicidas sintéticos que provocan graves daños a los ecosistemas. Sin embargo, no se han realizado estudios que muestren los efectos de toxicidad de la hierbabuena para los ecosistemas acuáticos. en este estudio se evaluaron los efectos tóxicos de un extracto acuoso Mentha spicata a diferentes concentraciones, sobre la microalga Chlorella vulgaris a lo largo del tiempo. Los tratamientos tuvieron efectos significativos, negativos y crecientes sobre la concentración celular, abundancia máxima y tasa de crecimiento poblacional de Chlorella vulgaris ( $P < 0.001$ ). El efecto del extracto acuoso de la hierbabuena sobre Chlorella vulgaris queda demostrado, sin embargo, el de cada uno de sus componentes no.*

## Introducción

En la actualidad el uso de sustancias como plaguicidas o herbicidas en el sector agrícola se ha incrementado, el uso irracional de estos compuestos sintéticos ha provocado serios problemas globales. Por lo que se ha hecho imprescindible el estudio de nuevas vías alternativas para el manejo agrícola. El reemplazo de los insecticidas sintéticos por sustancias vegetales, como la hierbabuena (*Mentha spicata*) ha sido una alternativa viable [1], pero no significa que estos extractos de plantas pueden restablecer por sí mismos el equilibrio ecológico [2]. El control directo con este método no deja de ser una medida de emergencia y debe utilizarse con mucha precaución, ya que existen compuestos químicos dentro de las plantas que tienen reacciones diversas, por lo que no todos los insecticidas vegetales son menos tóxicos que los sintéticos [4].

Organizaciones como la OMS, recomiendan realizar estudios de todos los productos o nuevas sustancias a las cuales existe exposición humana, para el establecimiento de los criterios de seguridad y efectividad. Las investigaciones en microorganismos y en animales son el eslabón más importante en la cadena de evaluaciones toxicológicas de cualquier nuevo compuesto químico antes de ser administrado o utilizado (e.g. alimento, fármaco, agroquímico) [5]. El uso de bioensayos para la evaluación de toxicidad de sustancias liberadas al ambiente ha llevado a la utilización de biomonitores propios de los ambientes evaluados, lo cual favorece indirectamente la preservación de la biodiversidad local. Cuando por medio de éstos bioensayos se puedan describir con precisión en términos químicos y físicos los componentes tóxicos de un contaminante y se disponga de técnicas analíticas pertinentes y de suficiente información acerca de la toxicidad de esos componentes para los organismos acuáticos, se podrán establecer normas para tales contaminantes en valores numéricos para los componentes tóxicos [6].

Varios productos humanos aplicados en la agricultura pueden llegar al ambiente acuático por rutas directas o indirectas; los sedimentos son un componente ecológicamente importante de los ambientes acuáticos, pueden actuar como sumideros de diversos contaminantes y pueden modificar la concentración de contaminantes en la columna de agua, una alta proporción del contaminante que es liberado al medio acuático puede absorberse en la materia orgánica particulada y en las microalgas [7].

Pitter & Ernst [8] reportan que los principales componentes que se encuentra en la hierbabuena son el mentol (33-60%), mentona (15-32%), isomentona (2-8%), 1.8 cineol (5-13%), mentil acetato (2-11%) mentofurano (1-10%), limoneno (1-7%),  $\beta$ -mirceno (0.1-1.7%),  $\beta$ -cariofileno (2-4%), pulegona (0.5-1.6%) y carvona (1%). De los cuales se sabe que principalmente el mentol, la mentona, la carvona, el limoneno y la pulegona tienen efectos tóxicos sobre los organismos [1, 9, 10, 11]. Con respecto a los efectos fitotóxicos se ha observado que produce quemaduras en las hojas y raíces de maíz, clorosis y modificaciones morfológicas considerables en sus hojas; también se ha demostrado que inhibe el crecimiento de plántulas de papa con una aplicación periódica de 3 meses, efectos debidos potencialmente por la carvona y limoneno [1]. El limoneno es uno de los componentes en productos alimenticios, perfumes y jabones debido a su sabor y olor parecido al del limón. De la misma manera, es un ingrediente activo en plaguicidas, pesticidas e insecticidas. Esta sustancia en particular se sabe que es “ligeramente” tóxica para los ambientes acuáticos, incluyendo peces e invertebrados [12]. Se ha demostrado el efecto altamente toxico del limoneno para la caña de azúcar y variable para el trigo, cebada, fresa, col y zanahoria [1].

Debido a que se requiere una mayor información acerca de los efectos fitotóxicos de los compuestos de la hierbabuena sobre los ecosistemas acuáticos [1], en este estudio se evaluaron los efectos tóxicos de un extracto acuoso *Mentha spicata* a diferentes concentraciones, sobre la microalga *Chlorella vulgaris* a lo largo del tiempo.

## Métodos

Se realizaron estudios de fitotoxicidad de *Mentha spicata* sobre *Chlorella vulgaris* en el laboratorio de Ecología y Restauración de Sistemas Acuáticos (E.R.S.A.) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

*Organismos de prueba:* Se cultivó una cepa de *Chlorella vulgaris* bajo condiciones de laboratorio en el fotobiorreactor del laboratorio de Ecología y Restauración de Sistemas Acuáticos de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla con medio Bold basal durante una semana, posteriormente el producto fue precipitado, decantado y refrigerado para obtener una mayor concentración celular, eliminar nutrientes y, evitar el crecimiento y descomposición del recurso.

*Extracto fitotóxico:* Para obtener una solución acuosa de *Mentha spicata* se hirvieron 5 gramos de peso seco de la hoja en un litro de agua destilada. Se mantuvo a punto de hervor durante 1 minuto y posteriormente fue refrigerada.

*Diseño experimental:* Se establecieron tratamientos experimentales con tres diferentes concentraciones (25, 50 y 75%) de la solución de *M. spicata* diluidos con agua destilada, al cual se añadieron 5 ml/L de medio Bold basal con una concentración inicial aproximada de *Chlorella vulgaris* de  $139.75 \times 10^6$  células/ml. Se mantuvieron tres replicas por cada tratamiento. Para asegurar la disponibilidad de CO<sub>2</sub> en el medio se añadieron 2 gr/L de bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>) cada tercer día. Posteriormente a la preparación de las soluciones se llevó a cabo un conteo diario de la concentración celular en cada muestra con cámaras de Neubauer.

Para determinar la tasa de crecimiento poblacional se linealizó la curva de crecimiento poblacional de Malthus (1) y se efectuaron regresiones lineales entre los datos obtenidos.

$$(1) \ln P_t = \ln P_0 + k t$$

Donde,  $P_t$  es la población al tiempo  $t$ ,  $P_0$  es la población inicial y  $k$  es la tasa de crecimiento poblacional.

**Análisis estadístico:** Para la comparación de los efectos del tratamiento sobre la concentración celular se realizó un ANOVA de dos factores con medidas repetidas para uno de ellos. Los datos no superaron la prueba de esfericidad de Mauchly por lo que se realizó un análisis univariado con índice de corrección épsilon Greenhouse-Geisser. Por otro lado, al analizar las tasas de crecimiento poblacional y las abundancias máximas se realizaron ANOVA de diseño completamente aleatorizado. Todos los resultados se contrastaron con una prueba post-hoc de diferencia honestamente significativa de Tukey (Tukey HSD), en el caso del ANOVA de medidas repetidas para determinar efectos entre tratamientos e intraespecíficas. Todos los análisis se realizaron en el paquete estadístico Statistica versión 8.0 con un nivel de significancia de 0.05.

## Resultados

El aumento de la concentración del extracto acuoso de *Mentha spicata* tuvo un efecto negativo creciente sobre la población de *Chlorella vulgaris* ( $F = 9.17$ ,  $P = 0.005$ ), disminuyendo la cantidad total de individuos promedio después de dos días de inicial el cultivo celular ( $F = 29.8$ ,  $G-G = 0.405$ ,  $P = 0.00002$ ). La interacción entre ambos fue significativa ( $F = 6.04318$ ,  $G-G = 0.405$ ,  $P = 0.004$ ) (Figura 1).

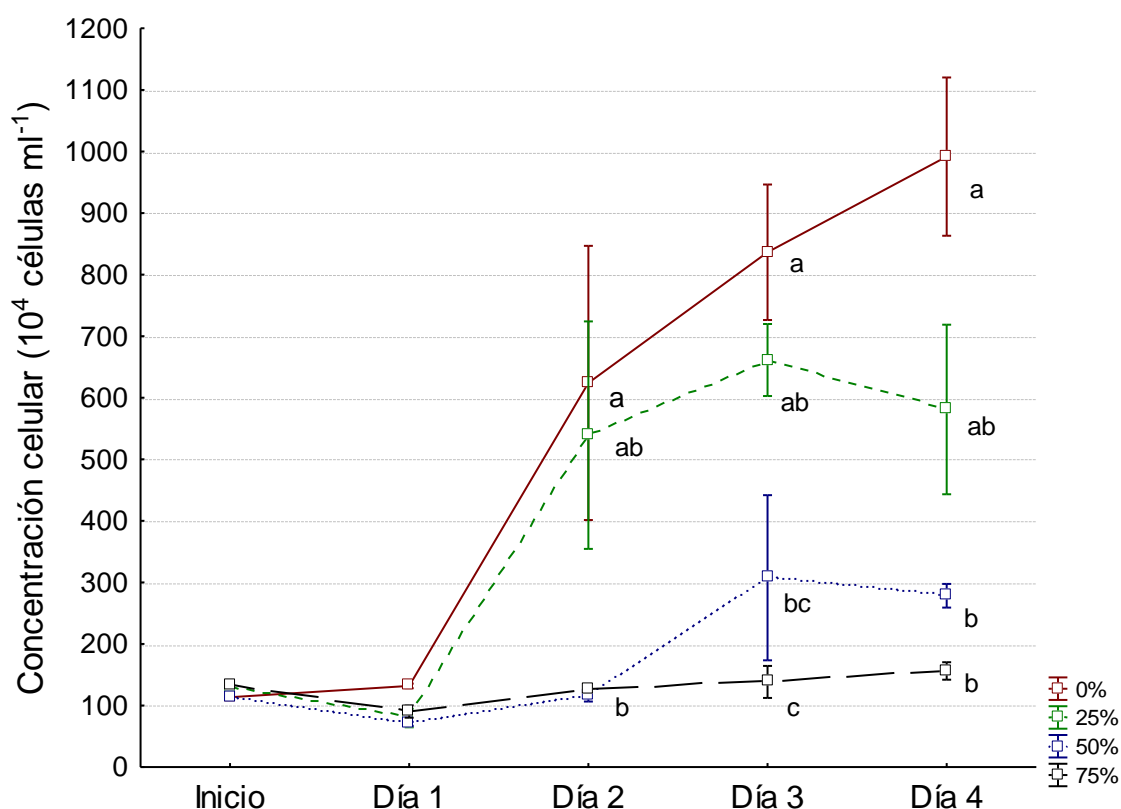


Figura 1. Efectos del extracto acuoso de *Mentha spicata* a diferentes concentraciones sobre poblaciones de *Chlorella vulgaris*. Los valores se expresan como media  $\pm$  error estándar. Letras diferentes indican poblaciones significativamente diferentes ( $P < 0.05$ , prueba Tukey HSD)

Con respecto a la tasa de crecimiento poblacional ( $k$ ), observamos una disminución al aumentar la concentración del extracto (Figura 2). El ANOVA muestra que existen

diferencias significativas entre los tratamientos ( $F = 19.38$ ,  $P = 0.0005$ ). Se obtuvieron resultados similares para la abundancia máxima para cada tratamiento, es decir, que esta disminuye mientras mayor es la concentración del toxico ( $F = 15.04$ ,  $P = 0.001$ ) (Figura 3).

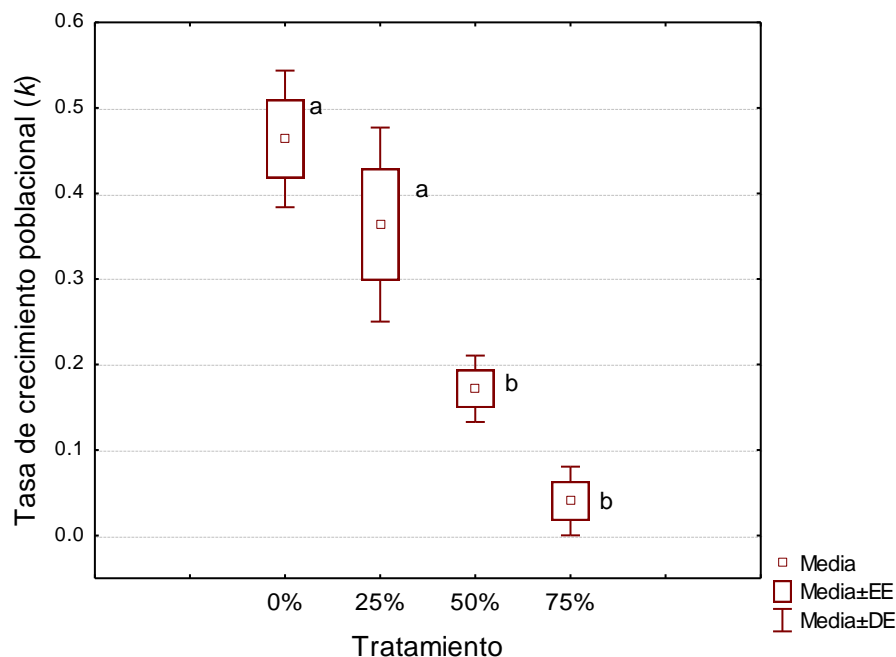


Figura 2. Gráfico de cajas y bigotes de las tasas de crecimiento poblacional ( $k$ ) de cada población de *Chlorella vulgaris* sometidas a diferentes concentraciones de un extracto acuoso de *Mentha spicata*. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ , prueba Tukey HSD). EE = Error estándar, DE = Desviación estándar

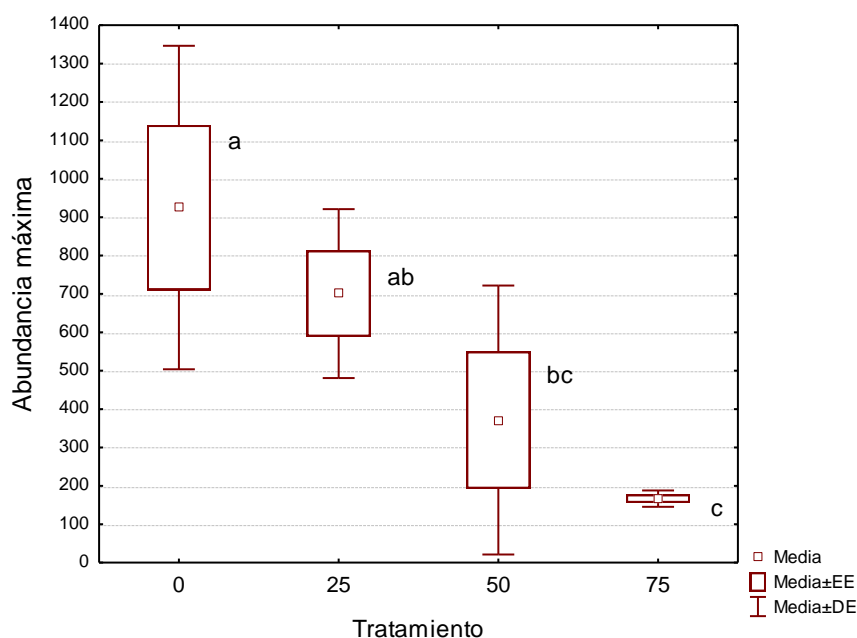


Figura 3. Gráfico de cajas y bigotes de las abundancias máximas de cada población de *Chlorella vulgaris* sometidas a diferentes concentraciones de un extracto acuoso de *Mentha spicata*. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ , prueba Tukey HSD). EE = Error estándar, DE = Desviación estándar

## Discusión y conclusiones

Al comparar el efecto de la concentración y el tiempo de exposición a *Mentha spicata* confirmamos que existen efectos negativos de los componentes del extracto acuoso *Mentha spicata* sobre *Chlorella vulgaris* en todos los tratamientos, por lo que uno de ellos está afectando la fisiología de *Chlorella vulgaris* [4]; así que si las sustancias de los insecticidas elaborados con hierbabuena llegan a los mantos acuíferos afectaría a ciertas algas clorofitas tales como *Chlorella vulgaris* [7] que son entre otros organismos el primer eslabón de la cadena trófica. Con lo que se confirmaría que como aseveró Brechelt [2], la alternativa de reemplazar insecticidas sintéticos por orgánicos no restablece por sí mismos el equilibrio ecológico.

Ya que la fisiología de *Chlorella vulgaris* se ve afectada por *Mentha spicata*, el crecimiento poblacional y la abundancia máxima de ésta alga disminuyen en relación a la concentración de la hierbabuena lo que se corrobora con los estudios realizados por Saénz & Marzio [3] en los que se concluye que la toxicidad depende del efecto de la dilución.

Debido a que el uso de la hierbabuena como insecticida es con extractos de sus hojas, nuestro estudio no incluyo análisis para cada uno de los componentes del extracto. Dentro de la amplia gama de componentes que se encuentran en las hojas de *Mentha spicata*, potencialmente pueden ser la menta, mentona, carvona, pulgona y el limoneno, los responsables de este efecto, sin embargo, para poder afirmar esto, son necesarios más estudios toxicológicos para cada uno de los componentes.

Nuestro estudio confirma que a pesar de que los insecticidas orgánicos podrían representar una alternativa viable para el reemplazo de sustancias sintéticas, el estudio de los efectos adversos al ambiente es necesario, ya que podrían ser incluso aún más dañinos.

## Agradecimientos

Agradezco de todo corazón al Dr. Ernesto Mangas por su colaboración y continua supervisión a lo largo del proyecto, por brindarme el espacio necesario sin restricción ni condición alguna. Al M.C. Ubaldo Quiroz y a la M.C. Carmen Navarro por su tutela, enseñanzas, guía y crítica durante todo el curso. A la Ing. Laura Cecilia Ruiz e Ing. Víctor Márquez Limón por su incondicional hombro y consejos en todo momento, por su paciencia. A Alma Pérez López por ser mi compañera en toda jornada. Finalmente agradezco a la Vicerrectoría de Investigación y docencia por brindar el apoyo para realizar esta estancia de investigación.

## Referencias

- [1] Ibrahim Mohamed A., Kainulainen Pirjo, Aflutini Abbas, Tiilikkala Kari, Holopainen Jarmo K. (2001). Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: A special reference to Limonene and its suitability for control of pests. Agricultural and Food Science in Finland. Volume 10: 243-259
- [2] Brechelt A (1994). Los insecticidas: consecuencias de su práctica abusiva. Ciencia y Sociedad. Volumen XIX. No. 1. pp. 38-58.
- [3] Sáenz ME, Di Marzio WD, J.L. Alberdi y Tortorelli MC, 1992. Estudio de la calidad del agua del río Luján. Parte II. Determinación de nitratos, fosfatos, clorofila "a" y producción primaria para la evaluación del estado trófico del mismo. II Congreso Latinoamericano de Ecología y I Congreso de Ecología de Brasil, Caxambú-Minas Gerais, Brasil.
- [4] Montesino Valdés Mayelín, López Flores Hortensia, Hernández Abreu José, de Zayas Izagüirre Enrique (2009). Insecticidas botánicos como alternativas para el manejo de plagas en sistemas agroforestales. O.B.ACTAF. PP.24-24

- [5] Martínez Silvia, Vela Alexandra, Botero Alejandra, Arandia Franz, Mollinedo Patricia (2009). Potential pharmacological and toxicological basis of the essential oil from *Mentha* spp. Rev Cienc Farm Básica Apl.;30 (3):235-239
- [6] FAO. 1981. Manual de Métodos de Investigación del Medio Ambiente Acuático. Parte 4a. Bases para la Elección de Ensayos Biológicos para Evaluar la Contaminación Marina. FAO, Doc. Tec. Pesca. (164): 34 pp.
- [7] Andreotti C & Gagneten AM (2006). Efectos ecotoxicológicos del sedimento del río Salado Inferior (Argentina) en la supervivencia y reproducción de *Moina micrura*. Rev. Toxicol. 23: 146- 150
- [8] Pittler MH, Ernst E. (1998). Peppermint oil for irritable bowel syndrome: a critical review and metaanalysis. Am J Gastroenterol. 93:113. pp.1-5.
- [9] Sun Jidong (2007). D-Limonene: Safety and Clinical Applications. Alternative Medicine Review Volume 12, Number 3
- [10] Vibeke S.M. Bernson & Bertil Pettersson (1983). THE TOXICITY OF MENTHOL IN SHORT-TERM BIOASSAYS. Chem: Biol. Interactions, 46: 233-246
- [11] Peixoto, I.T.A.; Furlanetti, V.F.; Anibal, P.C.; Duarte, M.C.T. & Höfling, J.F. Potential pharmacological and toxicological basis of the essential oil from *Mentha* spp. Journal of Basis and Applied Pharmaceutical Sciences. 30:3. (2009). pp. 235-239.
- [12] EPA-738-F-94-030. R.E.D. FACTS. United States Environmental Protection Agency. Prevention, Pesticides And Toxic Substances (7508W). Septiembre de 1994.