

Evaluación ecotoxicológica de dos derivados del Nim en lombriz de tierra y abejas

Mancebo Rodríguez A^{1*}, Estrada Ortiz J², González Triana C¹, González Torres Y¹, González Navarro B¹ y Bada Barro AM¹

¹Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). Finca Tirabeque, Carretera El Cacahual, Km 2 ½, Bejucal, La Habana, Cuba.

²Instituto de Investigaciones Fundamentales de la Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT). Calle 1 esq. 2. Santiago de las Vegas, Boyeros, Ciudad de la Habana, Cuba.

Resumen: La utilización de productos con bajo o nulo impacto en organismos circundantes y el ambiente, constituye parte del nuevo concepto de protección de cultivos. Los productos NeoNim 60 y OleoNim 80, obtenidos del árbol del Nim, están propuestos para su uso como insecticida, nematocida y acaricida. Con el objetivo de realizar la evaluación ecotoxicológica de estos productos, se realizaron los ensayos de toxicidad aguda en lombriz de tierra *Eisenia andrei* y de toxicidad aguda por contacto en abejas *Apis mellifera*. Cada ensayo contó con un grupo control y dos tratados. El ensayo en lombrices se realizó durante 14 días utilizando suelo artificial, realizando observaciones clínicas, conteo de animales y estudio del comportamiento de la biomasa. La prueba en abejas se prolongó por 48 horas, realizándose observaciones clínicas y conteo de animales. Se obtuvo un 100% de supervivencia en las lombrices de los grupos tratados, obteniendo en el NeoNim 60 valores de disminución de la biomasa significativamente inferiores al grupo control, mientras que el grupo tratado con OleoNim 80 mostró aumento en la biomasa del inicio al final del ensayo. En el ensayo en abejas, la comparación estadística no mostró diferencias entre grupos en cuanto a la mortalidad. Teniendo en cuenta el conjunto de los resultados obtenidos, se pudo concluir que los derivados del Nim NeoNim 60 y OleoNim 80 no producen efecto tóxico sobre las lombrices de tierra y las abejas.

Palabras clave: Nim, ecotoxicología, lombriz de tierra, abejas

Abstract: Ecotoxicological assessment of two Neem derivatives in earthworm and honey bees. The use of products with low or null impact in surrounding organisms and the environment constitutes part of the new concept of crop protection. The products NeoNim 60 and OleoNim 80, obtained from the Neem tree, are proposed for its use as insecticide, nematocide and acaricide. With the objective of perform the ecotoxicological assessment of these products, it were carried out the earthworm acute toxicity and the honey bee acute contact toxicity tests. For each assay two Treated and one Control group were established. The assay in earthworms *Eisenia andrei* was carried out during 14 days using artificial soil, with daily clinical observations, count of animals and study of the changes of the biomass. The test in honey bees *Apis mellifera* was prolonged for 48 hours, with daily clinical observations and count of animals. A survival of 100% was obtained in the earthworms of the Treated groups, obtaining in the NeoNim 60 group significant lower values of biomass when compared to the Control, while the group treated with OleoNim 80 showed an increase in the biomass from the beginning to the end of the assay. In the assay in bees, the statistical

comparison didn't show differences among groups as for the mortality. Taken into account the obtained results, it could be concluded that the Neem derivatives NeoNim 60 and OleoNim 80 don't produce toxic effect on the earthworms and the honeybees.

Keywords: Neem, ecotoxicology, earthworms, honeybees

Introducción

La preocupación sobre los posibles efectos ecológicos de los contaminantes comenzó a expandirse entre los años 1950 y 1960. Es así que surge la ecotoxicología, como ciencia que estudia los efectos ecológicos de los contaminantes, con particular énfasis en la toxicidad directa sobre los organismos y las alteraciones del medio ambiente en el cual viven estos organismos [1].

Referido específicamente al ambiente terrestre, se han identificado los efectos tóxicos más importantes: efectos en las funciones de la tierra; efectos en la producción de biomasa de planta; efectos en invertebrados que representan comida para otros organismos; efectos en los vertebrados terrestres, especies domésticas y salvajes; y acumulación de compuestos tóxicos en la comida y a través de la cadena alimenticia [2,3]. Los organismos terrestres pueden exponerse a través de varios compartimientos medioambientales (tierra, aire, agua y comida).

La actividad de los invertebrados es importante para la dinámica de los ecosistemas terrestres, por lo que las guías de evaluación ecotoxicológica incluyen especies representantes de los más importantes niveles tróficos [4]. Por ejemplo, las lombrices de tierra contribuyen a mantener la porosidad de los suelos, mejoran la fertilización, y son representativos de los invertebrados que viven en los suelos. Por otro lado, las abejas son importantes en los procesos de polinización, además de tener un importante papel en el mantenimiento de la biodiversidad.

Los productos NeoNim 60 (extracto concentrado etanólico) y OleoNim 80 (aceite emulsionable), producidos por el Instituto de Investigaciones Fundamentales de la Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT) de Cuba, son derivados del árbol del Nim, propuestos para su uso como insecticida, nematocida y acaricida [5]. Con el objetivo de realizar la evaluación ecotoxicológica de estos productos, se realizaron los ensayos de toxicidad aguda en lombriz de tierra (*Eisenia andrei*) utilizando suelo artificial y de toxicidad aguda por contacto en abejas (*Apis mellifera*). Los estudios se realizaron sobre la base de protocolos descritos por agencias regulatorias internacionales [6-9].

*e-mail: axelm@cenpalab.inf.cu

Material y métodos

Los ensayos fueron conducidos en concordancia con los Principios de Buenas Prácticas de Laboratorio No Clínico, de Seguridad Sanitaria y Medioambiental [10] y la Guía para el cuidado, uso y reproducción de los animales para experimentación en el CENPALAB [11].

Sustancias de ensayo

NeoNim 60

Principio Activo: Azadirachtina (15000 mg/L)

Composición: Extracto de Nim 60%, Aceite de Nim 5%, Solvente orgánico 20% y Agente Tensoactivo EMULAN ELP 15%

OleoNim 80

Principio Activo: Azadirachtina (1600 mg/L)

Composición: Aceite de Nim 80% y Agente Tensoactivo EMULAN ELP 20%

Ensayo de toxicidad aguda en lombrices

Sistema de ensayo

Se utilizaron lombrices adultas de la especie *Eisenia andrei* con clitelo, obtenidas del Instituto de Suelos, y con un peso promedio de $347,3 \pm 39,8$ mg. Las lombrices se acondicionaron 24 horas antes en el suelo artificial, y se lavaron con agua destilada rápidamente antes de usarse.

Preparación del suelo artificial

El suelo artificial se preparó mediante la mezcla homogénea de 20% de arcilla de caolín, 10% de turba, 69% de arena industrial y 1% de CaCO_3 . El suelo fue humedecido con 500 mL de agua destilada en el grupo Control y 500 mL de la solución de las sustancias en los grupos tratados.

Desarrollo del ensayo

Se realizó la distribución al azar por grupos y réplicas de las lombrices. Las lombrices se colocaron en recipientes cubiertos, los cuales contenían 500 g de suelo artificial cada uno, con un agujero en la tapa de 2 mm. Se estableció un único nivel de concentración y un grupo Control. Cada grupo contó con 4 réplicas de 10 lombrices cada una. Se realizó una prueba límite, tomando la concentración aprobada por las ISO para este tipo de ensayo (1000 mg de producto/Kg de suelo artificial) [6].

- Grupo Control (agua destilada).
- Grupo NeoNim 60: 1000 mg de Extracto de Nim/Kg de suelo artificial
- Grupo OleoNim 80: 1000 mg de Aceite de Nim/Kg de suelo artificial

Condiciones de mantenimiento y alimentación

El ensayo se realizó en un ambiente controlado (Temperatura: $24,5 \pm 1,2^\circ\text{C}$, Humedad Relativa: $52,6 \pm 4,5\%$) e iluminación continua. Las lombrices no recibieron alimento durante el ensayo.

Observaciones y Determinaciones

Al inicio del ensayo se determinó el contenido de humedad y el pH del suelo artificial, y las lombrices se pesaron individualmente. El día 7 después de la aplicación se realizó el conteo y observación de los animales. Al realizar el conteo, se tuvieron en cuenta las posibles alteraciones del comportamiento o cambios morfológicos. Al final del estudio se determinó por cada recipiente el número total y peso de

las lombrices vivas, además del contenido de agua y el pH del suelo.

Análisis estadístico

Se determinó la media (X) y la desviación estándar (DE) del peso corporal para cada grupo y réplica, mediante el programa estadístico SPSS 10.0.5 [12]. Se determinó además el porcentaje de mortalidad y la ganancia de peso para cada grupo y réplica. Para la comparación entre grupos se utilizó el test ANOVA de una vía y el Test de Student para muestras dependientes. Se trabajó para un nivel de significación de $p < 0,05$.

Ensayo de toxicidad aguda por contacto en abejas

Sistema de ensayo

Se emplearon 44 abejas por ensayo, obtenidas de las colmenas de la Universidad Agraria de la Habana. Estas se colocaron en las jaulas desde la tarde anterior al ensayo.

Desarrollo del ensayo

Las abejas se distribuyeron al azar en jaulas de fondo plástico y tapa de cristal, recubiertas con malla metálica. Se estableció un único nivel de dosis, además de un grupo Control. Cada grupo contó con 2 réplicas de 11 abejas cada una. Se realizó una prueba límite, con un único nivel de dosis (100 μg de producto/abeja).

- Grupo Control (agua destilada).
- Grupo NeoNim 60: 100 μg de Extracto de Nim/abeja
- Grupo OleoNim 80: 100 μg de Aceite de Nim/abeja

Las abejas fueron sedadas con 10 dm^3 de CO_2 /minuto durante 10 minutos para la aplicación de las sustancias. Estas se aplicaron en el tórax de cada abeja, utilizando una micropipeta automática de volumen variable, ajustada a 2 μL .

Condiciones de mantenimiento y alimentación

Las jaulas con las abejas se mantuvieron durante el ensayo en la oscuridad en una incubadora, con una temperatura de $24,4 \pm 0,5^\circ\text{C}$ y humedad relativa de $54,2 \pm 0,2\%$. Los procedimientos de manejo se ejecutaron a la luz. Se les proveyó a voluntad una solución acuosa de sacarosa al 50%.

Observaciones y Determinaciones

Las abejas se observaron a las 4, 24 y 48 horas después de la administración de las sustancias. Se recogieron todos los signos de intoxicación, comportamiento anormal y datos de mortalidad.

Análisis estadístico

Se determinó el porcentaje de mortalidad para los tres grupos. Para el análisis estadístico se utilizó el programa estadístico SPSS 10.0.05 [12]. Se realizó la comparación entre grupos mediante el Test de Kruskal-Wallis. Se trabajó para un nivel de significación de $p < 0,05$.

Eutanasia

Al finalizar el ensayo, los animales supervivientes fueron sacrificados mediante una atmósfera de 20 dm^3/min de CO_2 durante 15 minutos.

Resultados

Ensayo de toxicidad aguda en lombrices

El ensayo culminó con un 99,17% de supervivencia, produciéndose la muerte de un animal de la réplica 3 del grupo Control, detectada el día 7 (Tabla 1). Durante el estudio no se detectaron otras alteraciones

Tabla 1. Comportamiento del conteo de lombrices por grupo, réplica y día.

Grupo	Réplica	Día del ensayo		Porcentaje de Mortalidad (Día 14)	
		7	14		
Control	1	10	10	0	2,5%
	2	10	10	0	
	3	9	9	10%	
	4	10	10	0	
NeoNim 60	1	10	10	0	0
	2	10	10	0	
	3	10	10	0	
	4	10	10	0	
OleoNim 80	1	10	10	0	0
	2	10	10	0	
	3	10	10	0	
	4	10	10	0	

clínicas.

El comportamiento del peso corporal de las lombrices durante el ensayo se muestra en la Figura 1. El grupo Control manifestó la mayor pérdida de la biomasa, con una disminución del 31,8%. En cambio, el grupo tratado con NeoNim 60 experimentó una disminución de la biomasa del 0,2%, mientras la biomasa del grupo tratado con OleoNim 80 aumentó un 4,5% (Tabla 2). La comparación estadística de la variación de biomasa entre el día 0 y 14 mostró diferencias significativas entre el grupo control y ambos grupos tratados ($p < 0,05$).

Tabla 2. Comportamiento de la biomasa de las lombrices.

Réplica	Variación de la biomasa					
	Control		NeoNim 60		OleoNim 80	
	mg	%	mg	%	mg	%
1	-127,9	-34,68	22,2	6,35	29,2	8,35
2	-151,7	-40,62	-6,4	-1,97	21,9	6,51
3	-77,688	-22,05	-20,9	-5,96	27,2	7,85
4	-103,1	-29,69	2,4	0,71	-15,3	-4,63
X ± DE	-115,1 ± 31,9	-31,8 ± 7,9	-0,7 ± 18,0*	-0,2 ± 5,2	15,8 ± 20,9*	4,5 ± 6,1

*significativamente diferente del grupo Control

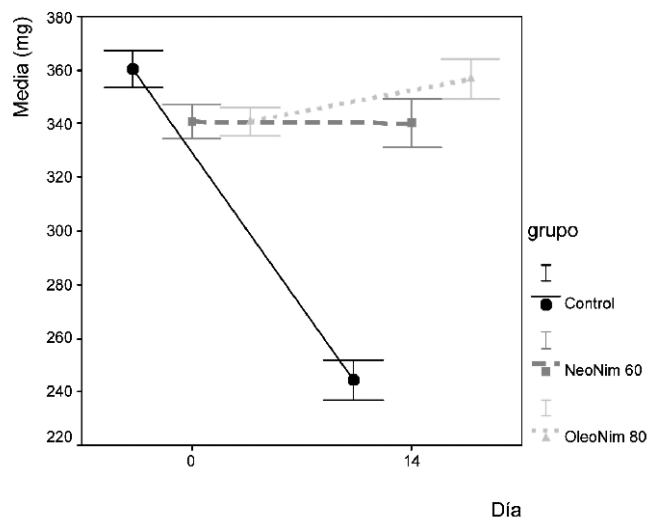
Se observó un ligero aumento en los valores de pH hacia el final del ensayo, con diferencias significativas en los tres grupos entre el valor inicial y el final (Tabla 3). El contenido de humedad mostró diferencias significativas en el grupo tratado con NeoNim 60, con la disminución de este valor del día 0 al 14. No se obtuvieron diferencias significativas de pH o contenido de humedad entre grupos ni el día 0 ni el 14.

Ensayo de toxicidad aguda por contacto en abejas

El ensayo culminó con un 18,18% de mortalidad en los controles

Tabla 3. Resultados del contenido de humedad (CH) y pH del suelo artificial.

Grupo	Día del ensayo			
	0		14	
	pH	CH(%)	pH	CH(%)
Control	6,8	19,2	7,5*	19,5
NeoNim 60	7,0	19,4	7,8*	19,0
OleoNim 80	6,5	19,6	7,8*	18,7

**Figura 1.** Comportamiento de la media del peso corporal de las lombrices durante el ensayo.

(Tabla 4). Ello se debió a la muerte de 4 animales: dos en las primeras 4 horas, uno entre las 4 y las 24 horas, y el cuarto en el intervalo de 24 a 48 horas. En el grupo tratado con NeoNim 60 la mortalidad fue del 13,64%, un 4,54% inferior al grupo Control, ocurriendo 3 muertes en el intervalo de 24 a 48 horas. En el grupo tratado con OleoNim 80 la mortalidad fue del 27,27%, un 9,09% superior al grupo Control,

ocurriendo dos muertes en las primeras 4 horas, tres entre las 4 y las 24 horas, y una en el intervalo de 24 a 48 horas. La comparación estadística no mostró diferencias entre grupos en cuanto a la mortalidad. El resto de los animales no mostró signos de toxicidad.

Discusión

Aunque no deben considerarse suficientes para caracterizar ecotoxicológicamente un producto, los ensayos de toxicidad en lombrices y abejas aportan al menos una indicación del efecto de un producto dado sobre los invertebrados.

En el ensayo de toxicidad aguda en lombrices del NeoNim 60 y del OleoNim 80, la existencia de sólo una muerte, ocurrida en el grupo Control, ofrece un resultado positivo. Esta muerte se halla dentro de las posibilidades aceptables de este ensayo, ya que se considera que puede ocurrir hasta un 10% de mortalidad en los animales del grupo Control, según plantean la Norma 11268 de la ISO [6], la OECD [8] y la Comunidad Europea [13]. Positiva resulta además la ausencia de signos clínicos de toxicidad, dentro de los cuales se consideran para

Tabla 4. Comportamiento de la mortalidad en abejas por grupo y réplica.

Grupo	Réplica	No. animales	Tiempo (horas)			Muertes (48 h)	% Mortalidad (48 h)
			4	24	48		
Control	1	11	11	10	9	4	18,18
	2	11	9	9	9		
NeoNim 60	1	11	11	11	9	3	13,64
	2	11	11	11	10		
OleoNim 80	1	11	9	7	7	6	27,27
	2	11	11	10	9		

esta especie posibles alteraciones del comportamiento (ausencia de excavación, enrollamiento y formación de ovillos entre varios individuos), o cambios morfológicos (reducción, rigidez, alargamiento, ulceración del integumento, inflamación de segmentos medios, encogimiento segmentario y/o pérdida de segmentos) [14].

El comportamiento del peso corporal de los animales resultó interesante. La disminución de la biomasa en el ensayo en lombrices es considerada natural, debido a la ausencia de alimentación durante el experimento, aunque existe discrepancia en cuanto a los límites aceptables, situando la ISO como tope aceptable el 20% del valor inicial. Sin embargo, en nuestro ensayo se produjo la peculiaridad de que el grupo tratado con OleoNim 80 mostró aumento general de la biomasa, con sólo una réplica con valor final disminuido frente el inicial, mientras el grupo tratado con NeoNim 60, aunque tuvo una disminución de la biomasa de forma global (sólo el 0,2%), tuvo 2 réplicas con crecimiento del día 0 al 14. Consideramos que estos resultados deben estar asociados al efecto de los principios activos y componentes de ambos productos, los cuales podrían haberse constituido en sustrato para su transformación por las lombrices.

Este resultado coincide con estudios realizados sobre los efectos del Nim en la mortalidad, crecimiento y reproducción de lombrices en suelos. Un ensayo en condiciones de invernadero mostró efectos positivos en el peso y supervivencia en suelo tratado con hojas y semillas del Nim molidas [15]. La reproducción fue ligeramente favorecida por un período de 13 semanas en un sustrato enriquecido con Nim en cajas de cría. Varios productos del Nim fueron incorporados en la capa superior de parcelas de tomate. Ninguno de los materiales tuvo efectos colaterales negativos en siete especies de lombrices de tierra.

El aumento de pH no puede asociarse a la sustancia de ensayo, ya que ocurrió en todos los grupos. Esta variación parece estar relacionada con la modificación que realizan las lombrices del suelo, durante sus procesos naturales de transformación del medio para su alimentación [14]. Este parámetro resulta de importancia, ya que puede afectar las condiciones que requieren las lombrices, además de influir en la cantidad de producto capaz de solubilizarse en el suelo [16,17].

En lo referente al ensayo en abejas, la existencia de una mortalidad del 20% en el grupo Control es considerada aceptable. El resultado de una menor mortalidad en el grupo tratado con NeoNim 60 con respecto al Control, además de que el análisis estadístico entre grupos no mostró diferencias significativas, permite considerar que las muertes no son atribuibles a la sustancia de ensayo. Aunque la mortalidad en el caso del OleoNim 80 fue ligeramente superior al Control, la ausencia de diferencias significativas impide asociar las muertes a la sustancia de ensayo. En ambos casos, debe tenerse en cuenta además que el nivel de dosis evaluado en nuestro estudio es el

cuádruplo del establecido por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, la cual considera que un producto puede ser considerado ecotóxico sólo si la dosis que mata al 50% de los animales, obtenida por derivación estadística, es inferior o igual a 25 µg/abeja [7]. En ecotoxicología este parámetro puede significar poco o nada sobre los riesgos a las poblaciones, ya que los efectos subletales pueden ocasionar mayores impactos sobre los individuos de una población, pero, no obstante, constituye un referente ampliamente utilizado.

Resultados tomados de la literatura apoyan nuestros hallazgos. El ingrediente insecticida fundamental encontrado en el árbol del Nim es la azadirachtina, una sustancia de origen natural que pertenece a una clase de moléculas orgánicas llamadas tetranortriterpenoides [18]. Es estructuralmente similar a hormonas del insecto llamadas "ecdisonas" que controlan el proceso de metamorfosis cuando los insectos pasan de larva a crisálida y de ésta a adulto, por lo que la azadirachtina parece actuar como "bloqueadora de ecdisona", afectando el ciclo de vida del insecto [19,20]. Se ha demostrado que la azadirachtina es relativamente inofensiva para numerosos insectos, debido a que los productos del Nim deben ingerirse para ser eficaces. Así, los insectos que se alimentan de los tejidos de las plantas sucumben, mientras los que se alimentan de néctar u otros insectos muy raramente están en contacto con concentraciones significativas de productos del Nim. Un estudio encontró que sólo después de rociar repetidas veces productos del Nim altamente concentrados en plantas florecidas, las abejas obreras llevaron el polen o néctar contaminado a las colmenas y se les dio a la cría. Las colmenas pequeñas mostraron efectos reguladores del crecimiento de insectos; sin embargo, las poblaciones medianas y grandes no fueron afectadas [19].

Teniendo en cuenta el conjunto de los resultados obtenidos, se pudo concluir que los derivados del Nim NeoNim 60 y OleoNim 80 no producen efecto tóxico sobre las lombrices de tierra y las abejas.

Bibliografía

1. Truhaut R (1986) Ecotoxicology, a new branch of toxicology: a general survey of its aims, methods and prospects. En: Hodgson E, Reviews on environmental toxicology. Use of laboratory models ecosystems for the evaluation of environmental contaminants. Elsevier Science Publishers B.D., Amsterdam.
2. EC-CSTEE (2000) CSTEE opinion on the available scientific approaches to assess the potential effects and risk of chemicals on terrestrial ecosystems. Reports of the Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment (CSTEE), Brussels, 178 pp.

3. Fairbrother A, Glazebrook PW, Van Straalen, N, Tarazona J (2002) Test Methods for Hazard Determination of Metals and Sparingly Soluble Metal Compounds in Soils. SETAC Press, Pensacola, FL.
4. OECD (2004) Issues to be addressed to develop the classification and labelling for terrestrial environmental hazards. ENV/JM/HCL(2004)3/REV. Task Force on Harmonisation of Classification and Labelling, 2004.
5. INIFAT (2005) Instrucciones a los Proveedores. NeoNim 60 y OleoNim 80. Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt".
6. ISO (1993) International Standard ISO 11268-1:1993 (E) "Soil quality – Effects of pollutants on earthworms. Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate". International Standardization Organization, 1993.
7. U.S Environmental Protection Agency (1996). OPPTS 850.3020 "Honey bee Acute Contact Toxicity". Ecological Effects Test Guidelines. Prevention, Pesticides and Toxic Substances. Disponible en: http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/guidelines/oppts_850_3020.
8. OECD (1984) TG 207 "Earthworm acute toxicity test". Section 2 – Effect on biotic systems. OCDE Guidelines for Testing of Chemicals, Paris, France.
9. OCDE (1998) TG 214 "Honeybees: Acute Contact Toxicity Test". Section 2 – Effect on biotic systems. OCDE Guidelines for Testing of Chemicals, Paris, France.
10. MINSAP (2004) Principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio No Clínico de Seguridad Sanitaria y Medio Ambiental, Regulación 39/2004, Ministerio de Salud Pública, Cuba.
11. CENPALAB (2000) Guía para el cuidado, uso y reproducción de los animales para experimentación en el CENPALAB. CENPALAB, La Habana, Cuba
12. SPSS Inc. (1999) Statistical Package Scientific System para Windows, versión 10.0.5.
13. European Community (1996) Toxicity to earthworms – artificial soil test. Annex V to European Directive 67/548/EEC.
14. Edwards CA, Lofty JR (1996) Biology of earthworms, 3ra edición. Chapman y Hall, London.
15. Rossner J, Zebitz CPW (1986) Effect of soil treatment with neem products on earthworms (Lumbricidae). Proceedings of the 3rd International Neem Conference, Nairobi. pp. 627-632.
16. Norton D, (1996) Earthworm Bioassay protocol for soil toxicity screening. Disponible en: <http://www.ecy.wa.gov/biblio/96327.html>.
17. Spurgeon DJ, Hopkin SP (1996). Effects of variations of the organic matter content and pH of soils on the availability and toxicity of zinc to the earthworm *Eisenia fetida*. *Pedobiol.* 40(1): 80-96.
18. Grace-Sierra Crop Protection Co (1990) Margosan-O technical bulletin. Grace-Sierra Crop Protection Co., Milpitas, CA.
19. National Research Council (1992) Neem: A tree for solving global problems. National Academy Press, Washington, DC.
20. Mulla MS, Su T (1999) Activity and biological effects of Neem products against arthropods of medical and veterinary importance. *J Am Mosq Control Assoc* 15(2):133-52.