

Efecto tóxico de cafeína, dicromato de potasio y metomilo en la germinación de *Vicia faba*

Toxic effect of caffeine, potassium dichromate and methomyl on the germination of *Vicia faba*

Karen Jessica Jordán–Quispe^{1*} & Julia Griselda Muñiz–Duran¹

¹Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Av. La Cultura 733, Cusco, Perú.

*Autor correspondiente: Karen Jessica Jordán–Quispe, karen.jordan@unsaac.edu.pe

RESUMEN

El uso creciente y la inadecuada manipulación de sustancias tóxicas en la agricultura podrían afectar en la economía, el ambiente y la salud pública. La presente investigación desarrollada en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas- UNSAAC, tuvo por objetivo evaluar efectos tóxicos y genotóxico en la germinación de *Vicia faba* a través de pruebas toxicológicas (bioensayos) en el crecimiento del sistema radicular y del coleóptilo para medir toxicidad germinativa y el ensayo de micronúcleos para determinar la genotoxicidad a nivel del material genético, para tal fin los compuestos tóxicos seleccionados fueron, metomilo, dicromato de potasio y como control positivo la cafeína, compuestos de uso frecuente en la agricultura e industria textil, actividades propias de las zonas andinas en Perú. Las concentraciones fueron determinadas a través de un apueba piloto 500, 1000, 2000, 4000 y 8000 ppm, los datos obtenidos permitieron determinar la CL₅₀ mediante el programa EPA PROBIT-1.5. Para la elongación del sistema radicular y coleóptilo se consideró la relación dosis–efecto en la germinación a las diferentes concentraciones establecidas y para la genotoxicidad se observó la presencia o ausencia de micronúcleos, obteniéndose una CL₅₀ en cafeína, dicromato de potasio, metomilo de 2172, 8 ppm, 3286,9 ppm y 5174, 6 ppm respectivamente. En cuanto a la genotoxicidad el recuento de micronúcleos realizado en las radículas de *Vicia faba* determinó una prevalencia porcentual entre 3% y 9.75% en las tres primeras concentraciones 1000, 2000 y 4000 ppm, a 8000 ppm las células presentaron lisis. Por lo tanto, los resultados obtenidos evidenciaron efectos tóxicos y genotóxicos en *Vicia faba* causado por metomilo, dicromato de potasio y cafeína.

Palabras clave: *Vicia faba*, toxicidad, genotoxicidad, CL₅₀.

ABSTRACT

The increasing use and inadequate handling of toxic substances in agriculture could affect the economy, the environment and public health. The present research developed in the Molecular Biology laboratory of The Faculty of Biological Sciences - UNSAAC, The objective in this research was to evaluate toxic and genotoxic effects on the germination of *Vicia faba*, l. through toxicological tests (bioassays) of root and shoot growth to measure germinative toxicity and the micronucleus assay to determine genotoxicity at the level of genetic material, for this purpose the toxic compounds selected were methomyl, potassium dichromate and as a positive control caffeine, compounds Frequently used in agriculture and the textile industry, activities typical of the Andean areas in Peru. The concentrations were determined through a pilot test of 500, 1000, 2000, 4000 and 8000 ppm. The data obtained allowed the LC₅₀ to be determined through the EPA PROBIT-1.5 program. For root and stem elongation, the dose-effect relationship on germination was considered at the different established concentrations and for genotoxicity, the presence or absence of micronuclei was observed, obtaining an LC₅₀ in caffeine, potassium dichromate, methomyl of 2172.8 ppm, 3286.9 ppm and 5174.6 ppm respectively. Regarding genotoxicity, the micronucleus count carried out in the radicles of *Vicia faba* determined a percentage prevalence between 3% and 9.75% in the first three concentrations 1000, 2000 and 4000 ppm, at 8000 ppm the cells showed lysis. Therefore, the results obtained showed toxic and genotoxic effects in *Vicia faba* caused by methomyl, potassium dichromate and caffeine.

Key words: *Vicia faba*, toxicity, genotoxicity, LC₅₀.

INTRODUCCIÓN

La toxicidad es la capacidad intrínseca que posee un agente químico de producir efectos adversos sobre un organismo, dependiendo de las propiedades químicas del compuesto como de su concentración, según sea la duración y frecuencia de la exposición al tóxico y su relación con el ciclo de vida del organismo (Giannuzzi et al., 2018).

Un daño toxico puede medirse teniendo en cuenta cambios visibles, como clorosis, esterilidad, disminución en el número de semillas germinadas, tamaño de la raíz, sin embargo, también se evidencian cambios a nivel genético (Rey et al., 2017).

La genotoxicidad es la capacidad relativa de un agente de ocasionar daño en el material genético, originando efectos biológicos adversos, El daño inducido en el “material genético” incluye no sólo al ADN, sino también a todos aquellos componentes celulares que se encuentran relacionados con la funcionalidad y comportamiento de los cromosomas dentro de la célula (Padilla, 2007).

Los ensayos biológicos de toxicidad son eficaces para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos bajo condiciones experimentales específicas

manipulables y controladas (Padilla, 2007). Estos efectos pueden ser tanto de inhibición como de magnificación, evaluados por la reacción de los organismos, tales como muerte, crecimiento, proliferación, multiplicación, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos. Por lo que la presente investigación busca determinar el nivel de toxicidad y genotoxicidad que sustancias como cafeína, dicromato de potasio y metomilo puedan ejercer en *V. faba* a diferentes concentraciones.

METODOLOGÍA

La investigación se desarrolló en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas, UNSAAC, utilizando semillas de *Vicia faba* como organismo modelo del estudio, materiales de vidrio, reactivos y equipos de laboratorio, así como un microscopio óptico compuesto de campo claro.

La metodología consistió en desarrollar una prueba piloto (Diaz et al., 2004), para identificar el intervalo de concentraciones de cafeína, dicromato de potasio y metomilo, correspondientes a tres concentraciones en serie logarítmica de 100, 1000 y 10000 ppm., utilizando 30 semillas seleccionadas

previamente desinfectas en solución hipoclorito de sodio al 0.5 % durante 15 minutos y enjuagada con agua de caño, en cada una de las concentraciones preestablecidas durante 7 días, incluida la muestra control negativo, al cabo del tiempo establecido se registró el número de semillas germinadas y no germinadas.

Posterior a la prueba piloto se llevó a cabo las pruebas definitivas utilizando un intervalo de concentraciones más reducidas de 500, 1000, 2000, 4000 y 8000 ppm; posterior a los 7 días de instalado el experimento se procedió al registro de semillas germinadas y no germinadas. Para la evaluación de elongación radicular las semillas se mantuvieron hasta el día 14 y se registró con un vernier la longitud de la radícula de cada semilla en todos los tratamientos. Con los resultados obtenidos se determinó la CL₅₀ mediante el programa EPA PROBIT-1,5. Para evaluar la genotoxicidad se efectuó la Prueba de micronúcleos (Valencia et al., 2005), utilizando 30 semillas de *V. faba* en las concentraciones de 500, 1000, 2000, 4000 y 8000 ppm de cafeína, dicromato de potasio y metomilo, después de 14 días se obtuvieron las radículas, previo tratamiento con orceína acética clorhídrica 2% según el método de Tjio & Levan, citado por (Orbegoso & Casana, 2016), se aplicó la técnica del Squash y se procedió al recuento de micronúcleos en 200 células en las láminas porta objetos y se lectura con el objetivo de inmersión, finalmente se evaluó el porcentaje de micronúcleos presentes por concentración en cada una de las sustancias.

RESULTADOS

Efecto tóxico de Cafeína, Dicromato de Potasio y Metomilo en la Germinación de *V. faba*

El efecto de la Cafeína en la germinación de *V. faba*, a 500 ppm no tiene efecto inhibitorio, es a partir de 1000 ppm que se evidencia un 10% de inhibición en la germinación alcanzando un 100% de inhibición a 8000 ppm (Fig. 1).

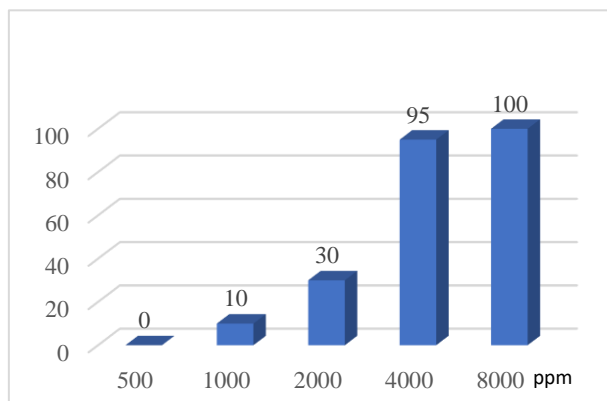


Figura 1. Efecto inhibitorio de cafeína en la germinación de *V. faba*.

No se observa efecto inhibitorio en la germinación de semillas de *V. faba* para dicromato y metomilo a 500 ppm, probablemente debido a un incremento en la capacidad biotransformadora de *V. faba* para modificar estos compuestos en metabolitos fácilmente excretables (Menéndez & Martín, 2006). En concentraciones de 1000 ppm y 2000 ppm se registran un comportamiento similar, donde un 5% de las semillas en tratamiento no logra germinar. Sin embargo, a 4000 ppm se observa un 65% y 20% de inhibición en la germinación para dicromato de potasio y metomilo respectivamente, a 8000 ppm dicromato de potasio evidencia 100% de inhibición en la germinación en comparación a 85% de metomilo (Fig. 2 y 3).

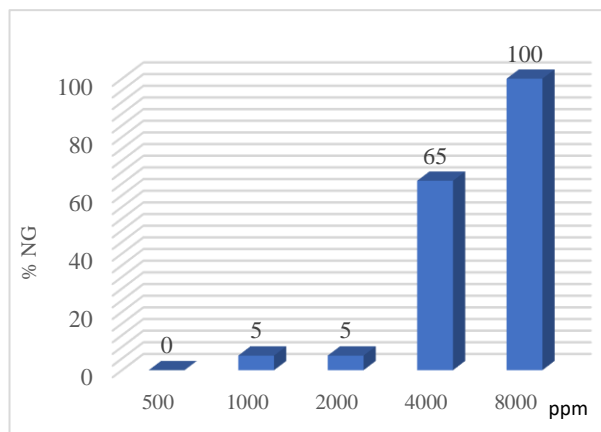


Figura 2. Efecto inhibitorio de dicromato de potasio en la germinación de *V. faba*.

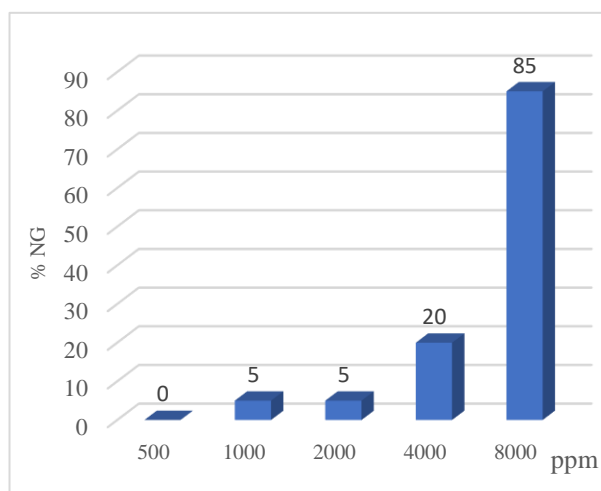


Figura 3. Efecto inhibitorio de metomilo en la germinación de *V. faba*.

CL₅₀ y análisis PROBIT

La Tabla 1 muestra los valores de la CL₅₀, evidenciando que Cafeína es más tóxico que dicromato de potasio ya que se necesita menor concentración de Cafeína 2172.7 ppm para inhibir la germinación del 50% de la muestra tratada, por el contrario, metomilo es menos tóxico, ya que necesito 5174.5 ppm para inhibir la germinación del 50% de semillas tratadas.

Tabla 1. CL₅₀ para cafeína, dicromato de potasio y metomilo.

Toxico	LC/EC 50	Límite de confianza del 95%	
		Límite superior	Límite inferior
Cafeína	2 172.787	2 651.071	1 780.771
Dicromato de potasio	3 286.976	5 013 445.504	2. 589
Metomilo	5 174.568	2 691. 091	1 780.771

En la Fig. 4 se observa las pendientes de las líneas dosis-Probit, de acuerdo con (Repetto & Repetto, 2009) se tiene que a mayor pendiente mayor es la toxicidad de una sustancia por consiguiente se puede establecer que la cafeína es más toxica que el dicromato de potasio y el dicromato de potasio más toxico que metomilo.

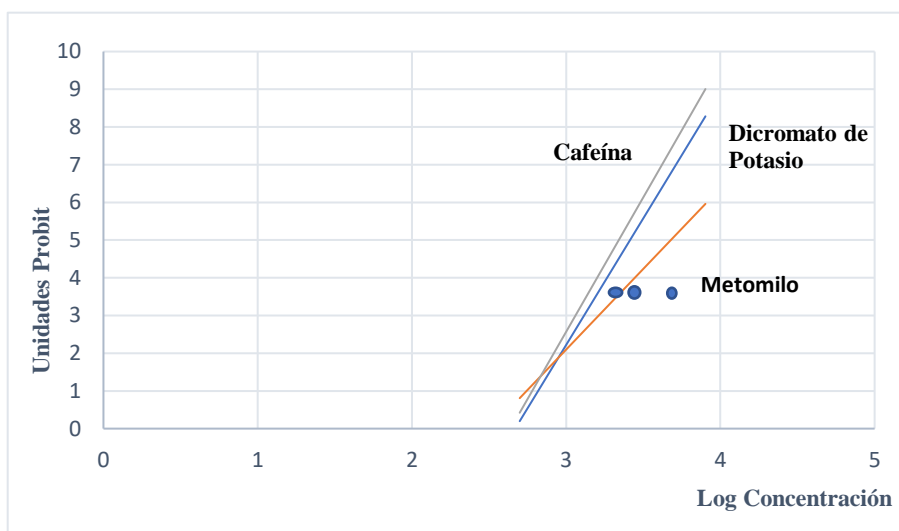


Figura 4. Comparación dosis-respuesta de cafeína, dicromato de potasio y metomilo en *V. faba*.

Efecto citotóxico de cafeína, dicromato de potasio y metomilo en la inhibición del crecimiento radicular (ICR) de *V. faba*.

El porcentaje de inhibición del crecimiento radicular (ICR) por cafeína a 500 ppm es de 58.77 %, a 1000 ppm se incrementa a 67.69%, y a 8000 ppm alcanza a 100 % tal como se muestra en la Fig. 5; por lo que el crecimiento en función de la dosis se hace asintótico, que idealmente está determinada por una hipérbola (Mencías & Mayero, 2000). Experimentalmente las curvas Dosis-Respuesta suelen mostrar una distribución normal, representada por una campana de Gauss, donde una dosis máxima lleva a un efecto máximo (Gutiérrez & Salsamendi, 2001).

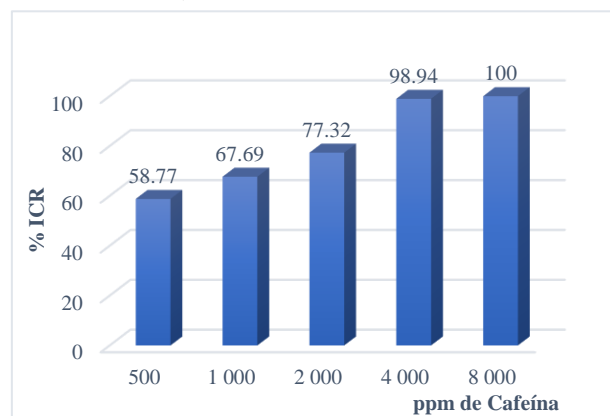


Figura 5. Porcentaje del efecto de la cafeína en el crecimiento radicular de *V. faba*

El efecto de dicromato de potasio y metomilo en el crecimiento radicular de *V. faba*. a 500 ppm es de 36.57% y 25.18% respectivamente, ambos menores al porcentaje de ICR de cafeína, también se registra el 100% de ICR para dicromato de potasio a 8000 ppm y 98.79% en metomilo a 8000 ppm (Figs. 6 y 7).

Tomando en cuenta que la elongación radicular es un parámetro para determinar la fitotoxicidad de sustancias tóxicas (Leos et al., 2016) se puede concluir que metomilo es menos tóxico en comparación a dicromato y cafeína.

El Índice de crecimiento radicular (ICR) en todos los tratamientos en semillas de *V. faba* fue superior para cafeína en comparación a dicromato de potasio y metomilo, siendo

metomilo el registro más bajo para todas las concentraciones, por lo que esta inhibición podría involucrar mecanismos relacionados con posibles alteraciones asociadas a la elongación radicular, vinculados con el ordenamiento de las microfibrillas de celulosa a lo largo del eje de crecimiento radicular, impidiendo una adecuada expansión celular (Fig. 8).

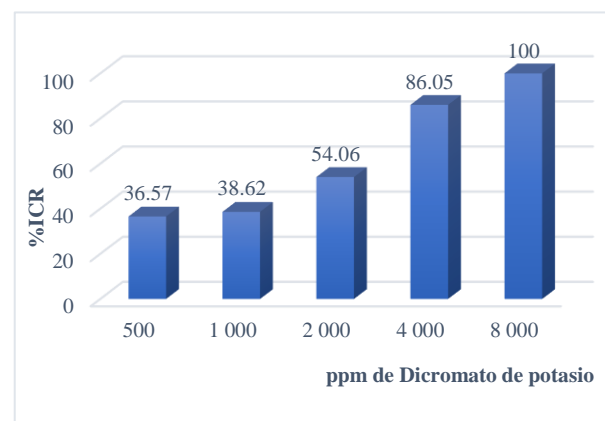


Figura 6. Porcentaje del efecto del dicromato de potasio en el crecimiento radicular de *V. faba*.

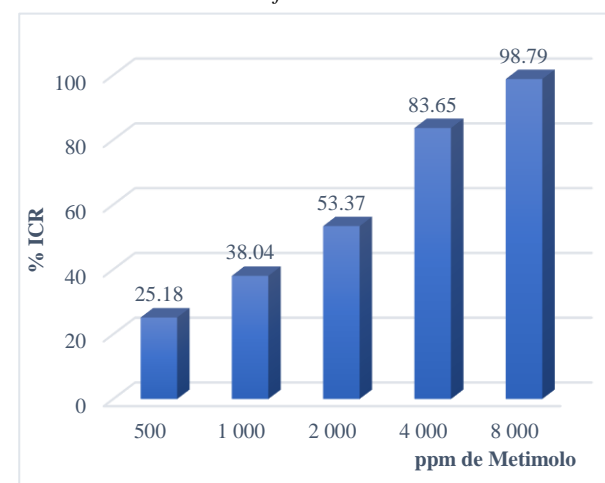


Figura 7. Porcentaje del efecto del metomilo en el crecimiento radicular de *V. faba*.

Tabla 2. Efecto genotóxico mediante la prueba de micronúcleos *V. faba* sometida a Cafeína, Dicromato de potasio y Metomilo.

Concentraciones	MN/200	%MN	%MN
Cafeína			
1 000	7	3.5	3
	5	2.5	
2 000	12	6	5.25
	9	4.5	
4 000	21	10.5	9.75
	18	9	
8 000	0	0	0
	0	0	
Dicromato de potasio			
1 000	6	3	3
	9	4.5	
2 000	10	5	4.25
	7	3.5	
4 000	18	9	8.5
	16	8	
8 000	0	0	0
	0	0	
Metomilo			
1 000	4	2	2.5
	6	3	
2 000	9	4.5	4.75
	7	5	
4 000	9	4.5	4
	10	3.5	
8 000	0	0	0
	0	0	

Efecto genotóxico mediante la prueba de micronúcleos

En la Tabla 2 se pueden observar los resultados del conteo por duplicado de micronúcleos observados en 200 células de meristemas apicales de la raíz de *V. faba* en las concentraciones de 1000 ppm, 2000 ppm y 4000 ppm de cafeína, dicromato de potasio y metomilo el porcentaje de micronúcleos varía de 3 a 9.75, mientras que a una concentración de 8000 ppm la célula presenta lisis probablemente por la dosis alta.

CONCLUSIONES

1. La cafeína y dicromato de potasio en una concentración a 8 000 ppm tienen efecto tóxico en la germinación de *V. faba* en un 100%, mientras que metomilo a la misma concentración ejerce un 85% de germinación.
2. El efecto citotóxico de cafeína, dicromato de potasio y metomilo en el crecimiento radicular de *V. faba*, se da a partir de 500 ppm y se incrementa conforme aumenta la concentración así a 8000 ppm metomilo afecta en un 98, 79%, mientras que cafeína y dicromato de potasio afectan en un 100%.
3. La CL₅₀ para Cafeína es de 2172.7 ppm, para dicromato de potasio 3286.9 ppm y para Metomilo 5174. 5 ppm, por lo que Cafeína es más tóxico que dicromato de potasio y dicromato de potasio más tóxico que metomilo.
4. La cafeína, dicromato de potasio y metomilo tienen efectos genotóxicos en *V. faba* en 4,7 a 9,7% a 4000 ppm.

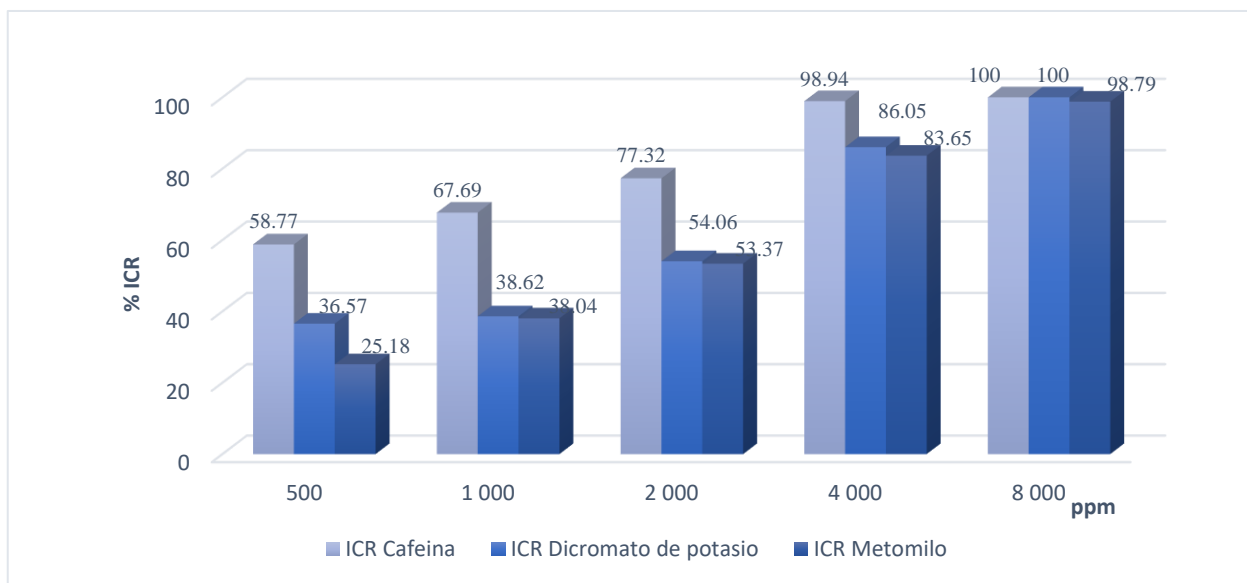


Figura 8. ICR por efecto de cafeína, dicromato de potasio y metomilo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Díaz, M. C., Bustos, M. C., y Espinosa, A. J. (2004). Pruebas de toxicidad acuática: fundamentos y métodos. Universidad Nacional de Colombia. UNIBIBLOS.

Giannuzzi, L., Ortega, F., & Ventosi, E. G. (2018). Principios generales de la toxicología. En Toxicología General y Aplicada. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Exactas. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/112476>

Gutiérrez, J. B., & Salsamendi, A. L. de C. (2001). Fundamentos de Ciencia Toxicológica. Ediciones Díaz de Santos.

Leos Rivas, C., Rivas-Morales, C., & García, D. G. (2016). Capítulo actividad antioxidante y toxicidad (pp. 41-76). <https://doi.org/10.3926/oms.333>

Mencías, R. E., & Mayero, F. L. M. (2000). Manual de toxicología básica. Ediciones Díaz de Santos.

- Menéndez, M. D. Á., & Martín, J. M. (2006). Vicia Faba L.: Capacidad bioindicadora de contaminación de agua por metilmercurio. Observatorio Medioambiental.
- Orbegoso, B. R. A., & Casana, B. P. M. (2016). Regulación del ciclo celular (CC) de Vicia faba L por el extracto alcohólico de *Annona cherimola* Mill "chirimoya. *Scientia Agropecuaria*, 7(SPE), 245-251. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2016.03.12>
- Padilla, A. E. S. (2007). Ensayo de toxicidad aguda al efluente de la ptar del municipio de chía mediante la utilización de semillas de lactuca sativa l y propuesta para su utilización como agua de riego para hortalizas.
- Repetto, J. M., & Repetto, K. G. (2009). Toxicología fundamental. Ediciones Díaz de Santos.
- Rey, A. R., Luna, L. C., Cantillo, G. M., & Espinosa, M. E. S. (2017). Efectos nocivos del plomo para la salud del hombre. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 35(3), 251-271.
- Valencia R, Sánchez J, Gómez JL, Juárez L, García E, Montiel J, Garcia, E., Montiel, J. M., y Waliszewski. S. M. (2005). Vydate L-24, un plaguicida carbámico que induce aberraciones cromosómicas en células meristemáticas de Vicia faba.

Presentado: 20/03/2024

Aceptado: 25/04/2024

Publicado: 08/07/2024