

Bioensayos de toxicidad aguda de extractos vegetales con *Daphnia magna*: un camino eficaz hacia el desarrollo sostenible.

Julio Cesar Bracho Pérez¹ , Ignacio Rubén Tacza Valverde¹, Javier A. Vásquez Castro²

¹Universidad Nacional Tecnológica de Lima Sur, Lima, Perú

²Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú

Recibido: 08/01/2022

Revisado: 15/04/2022

Aceptado: 15/05/2022

Publicado: 31/07/2022

Resumen

La revalorización de la biodiversidad peruana utilizando extractos vegetales ricos en metabolitos secundarios para utilizarlos en el control de plagas requiere, en primera instancia, el conocimiento de su toxicidad ambiental para evitar el posible impacto ambiental y sus cadena tróficas que sin duda alguna es el camino requerido hacia el desarrollo sostenible. Por tal motivo, este trabajo de investigación tiene como objetivo evaluar la toxicidad de los extractos acuoso, etanólico y hexánico de tres especies vegetales provenientes de la Amazonía peruana: mucura (*Petiveria alliacea*), huito (*Genipa americana*) y teta de vaca (*Solanum mammosum*); a través de bioensayos de toxicidad aguda con *Daphnia magna* durante 48 h de exposición se determinaron los valores de concentración letal media (CL₅₀). Los resultados obtenidos para cada especie vegetal y sus extractos respectivos fueron: *P. alliacea* (711.18, 255.50, 65.36) mg.L⁻¹, *G. americana* (508.07, 154.35, 20.64) mg.L⁻¹, *S. mammosum* (380.07, 90.59, 3.37) mg.L⁻¹. Estos resultados permiten el empleo de las especies vegetales de manera efectiva para el desarrollo futuro de productos naturales para el control de plagas con el mínimo impacto ambiental.

Palabras clave: Extractos vegetales, *Petiveria alliacea*, *Genipa americana*, *Solanum mammosum*, desarrollo sostenible, bioensayos de toxicidad, *Daphnia magna*.

Abstract

The revaluation of Peruvian biodiversity using plant extracts rich in secondary metabolites to use them for pest control requires, in the first instance, the knowledge of their environmental toxicity to avoid the possible environmental impact and their trophic chains that without no doubt it is the required path towards sustainable development. For this reason, this research work aims to evaluate the toxicity of the aqueous, ethanolic and

hexanic extracts of three plant species from the Peruvian Amazon: mucura (*Petiveria alliacea*), huito (*Genipa americana*) and teta de vaca (*Solanum mammosum*); Through acute toxicity bioassays with *Daphnia magna* during 48 h of exposure, the mean lethal concentration (LC₅₀) values were determined. The results obtained for each plant species and their respective extracts were, *P. alliacea* (711.18, 255.50, 65.36) mg.L⁻¹, *G. americana* (508.07, 154.35, 20.64) mg.L⁻¹, *S. mammosum* (380.07, 90.59, 3.37) mg.L⁻¹. These results allow the use of plant species effectively for the future development of natural products for pest control with minimal environmental impact.

Keywords: Plant extracts, *Petiveria alliacea*, *Genipa americana*, *Solanum mammosum*, sustainable development, toxicity bioassays, *Daphnia magna*.

Introducción

El empleo de los productos naturales para diversos fines como el control de plagas suele estar conectado a la falsa idea de que pueden ser considerados atóxicos por ser de origen natural. La realidad es que la composición de los extractos vegetales y aceites esenciales utilizados en todo el mundo en calidad de biopesticidas botánicos poseen una compleja composición química de metabolitos secundarios utilizados por las plantas como parte de sus mecanismos de defensa, generándose niveles de concentración relativamente elevados en los organelos de las plantas donde son requeridos. Esas funciones químicas producto de complejas rutas biosintéticas del reino vegetal ha sido producto de la evolución y adaptación de las plantas como parte de su sobrevivencia en este planeta que ha derivado en entidades químicas están conectadas a respuestas bioquímicas y fisiológicas especializadas y muy diversas para la sobrevivencias de las plantas tanto para enfrentar herbívoros y microorganismos que la destruyen, como para atraer polinizadores como las abejas u otras especies de animales que diseminan sus semillas o señales que les permiten conectarse a otras especies animales y vegetales en los ecosistemas. Por tal motivo, los productos naturales pueden causar actividades biológicas y toxicológicas muy intensas y diversas que alejaría la humanidad del requerido desarrollo sostenible ya que estaría en peligro la calidad de vida tanto de las generaciones actuales, como de las generaciones futuras de acuerdo a la concepción aceptada y establecida a nivel mundial a partir del informe *Nuestro futuro común* de la Comisión Mundial Sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo de las Naciones Unidas (Brundtland, 1987; Regnault-Roger y cols., 2004; Wink, 2010).

Diversas publicaciones han demostrado la importancia y necesidad de evaluar la posible toxicidad de los productos naturales implementado bioensayos de toxicidad aguda con el empleo de bioindicadores sensibles a los xenobióticos y con ello evitar de manera preventiva los posibles impactos ambientales, siendo uno de los más utilizados la *Daphnia magna*, un microcrustáceo aceptado y establecido oficialmente en las normas internacionales al ser considerados sistemas de detección analítica de toxicidad muy sensible al ser utilizados para el monitoreo de xenobióticos que contribuya al cuidado ambiental y de la salud humana (Olmstead A.W. y LeBlanc G.A., 2000; Kikuchi y cols., 2000; Zhou Q, 2008; USEPA, 2002; ISO 6341, 2012; Robertson, 2017).

Los resultados son preocupantes y demuestran que de acuerdo con el Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Químicos propuesto por las Naciones Unidas que en su mayoría tanto los extractos vegetales y aceites esenciales utilizados a nivel mundial que han sido evaluados a través de bioensayos de toxicidad aguda con *Daphnia magna* poseen valores de la concentración letal media (LC50) o concentración efectiva media (EC50) en el rango de categorización *Aguda 1* ($(L(E)C_{50} \leq 1 \text{ mg.L}^{-1})$) y *Aguda 2* ($(L(E)C_{50} > 1 \leq 1 \text{ mg.L}^{-1})$). La excepción de la regla los constituye aquellos productos naturales que pueden ubicarse en la categoría de *Aguda 3* ($(L(E)C_{50} > 10 \leq 100 \text{ mg.L}^{-1})$) o lo deseado considerarse productos no tóxicos ($(L(E)C_{50} > 100 \text{ mg.L}^{-1})$) y aunque productos naturales como los biopesticidas botánicos poseen una clara tendencia a poseer una toxicidad inferior a los pesticidas de síntesis, debido a su biodegradación; resulta evidente la necesidad de implementar bioensayos para establecer su toxicidad (UN, 2019; Ferraz et. al, 2022).

Por todo ello, el objetivo de este trabajo de investigación consiste en evaluar la toxicidad de los extractos vegetales obtenidos a partir de tres especies vegetales provenientes de la Amazonía peruana: mucura (*Petiveria alliacea*) huito (*Genipa americana*), y teta de vaca (*Solanum mammosum*) aplicando los bioensayos de toxicidad aguda con *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Daphniidae) por exposición de neonatos durante 48 h.

Materiales y Métodos

Material vegetal

La recolección de tres especies vegetales mucura (*Petiveria alliacea* L.), huito (*Genipa americana* L.) y teta de vaca (*Solanum mammosum* L.) fue realizada en la Región Huánuco, Provincia de Leoncio Prado, Ciudad Tingo María en agosto de 2016, teniendo en cuenta la metodología oficial para la recolección, traslado, procesamiento y

conservación de especies vegetales para fines de estudio taxonómico y fitoquímicos. Las especies fueron certificadas en el Herbario MOL (A. Weberbauer) del Departamento Académico de Biología de la Facultad de Ciencias de la UNALM, donde se conserva oficialmente un voucher de las mismas (Bridson & Forman, 2005).

Material biológico

***Daphnia magna* Straus**

Los bioensayos se llevarán a cabo con *D. magna*. Los especímenes fueron mantenidos a una temperatura 20 ± 2 °C en agua con un pH de 7.14, una conductividad eléctrica de $10 \mu\text{S cm}^{-1}$, alcalinidad de $93.5 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ y una dureza total de $45.6 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$. La *D. magna* será alimentada con especies de alga *Pseudokirchneriella subcapitata* de acuerdo con las normas internacionales ISO 6341-2012, OECD 202-2004 y EPA 2021.0.

Metodología

Bioensayo de toxicidad aguda con *Daphnia magna*

Se aplicó la metodología realizada por Bracho y cols. (2019) que consistió en realizar una prueba de referencia con cloruro de sodio (NaCl) para evaluar la sensibilidad de *D. magna* (edad < 24 h). La prueba de toxicidad estática se realizó en recipientes de plástico que contenían 4 mL de los extractos a evaluar a cinco concentraciones. Cinco neonatos serán expuestos a ensayos frente a cinco concentraciones de los extractos acuosos y orgánicos de la especie vegetal de interés en el rango desde 10 mg/L hasta 10000 mg/L sin alimentación durante la prueba a 24 h y 48 h de exposición. Para cada concentración, se realizaron los bioensayos por triplicado. Los vasos de plástico se incubaron en la oscuridad a 20 ± 2 °C. La inmovilización de los organismos tratados o la ausencia de ritmo cardíaco a 15 s bajo estereomicroscopio se utilizó como indicador de mortalidad.

Prueba discriminante

Se tomó la decisión final de empleo de los diferentes extractos botánicos para el desarrollo posterior de biopesticidas botánicos en función de los valores que se obtuvieron de las concentraciones letales medias (LC_{50}), siendo descartados aquellos extractos que posean los valores de LC_{50} más bajos, debido al riesgo de impacto ambiental y daño que pueden causar a las cadenas tróficas (Bracho y cols., 2019).

Procesamiento del material vegetal

El material colectado correspondiente a cada especie vegetal fue sometido a un proceso de selección, el cual consistió en eliminar las partes u órganos dañados, con enfermedades, picaduras de insectos; los que fueron eliminados junto a otros materiales impropios de las plantas. Se realizó la separación de los órganos de interés de cada especie vegetal, específicamente las hojas de *P. alliacea* y los frutos de *G. americana* y *S. mammosum*. Posteriormente, fueron sometidos a un proceso de secado a una temperatura de 48 °C durante 48 h en una estufa de secado. El material vegetal seco fue pulverizado utilizando un molino de cuchillas hasta reducirlo a material particulado que fue tamizado utilizando un tamiz de 100 µm.

Elaboración de extractos vegetales

A partir de biomasa seca, pulverizada y tamizada elaboraron los diferentes extractos de acuerdo con los siguientes procedimientos:

- **Extracto Acuoso**

Solución obtenida (10 g/L definida como 100%) mediante sonicación en baño de ultrasonido por 2 h a temperatura de $48 \pm 2^\circ\text{C}$. Se filtró al vacío y se sometió a liofilización con el empleo de un liofilizador Telstar Modelo Lyo Quest-55 a una temperatura de congelamiento de -20°C y liofilización al vacío a -55°C durante un tiempo de 48 h. El concentrado obtenido fue fuertemente disuelto en propilenglicol.

- **Extracto Etanólico**

Solución obtenida (10 g/L definida como 100%) mediante sonicación en baño de ultrasonido por 2 h a temperatura de $48 \pm 2^\circ\text{C}$. Se filtró al vacío y el extracto orgánico se sometió a rotoevaporación a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ hasta obtener un concentrado que fue disuelto en propilenglicol.

- **Extracto Hexánico**

Solución obtenida (10 g/L definida como 100%) mediante sonicación en baño ultrasónico por 2 h a temperatura de $48 \pm 2^\circ\text{C}$ y filtrada en papel filtro. El extracto orgánico fue rotaevaporado a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ y disuelto en propilenglicol.

Análisis estadístico

Los valores de mortalidad obtenidos en los bioensayos fueron sometidos al estudio de regresión aplicando el análisis Probit del programa SPSS Ver 22.0 para Windows que

permitió determinar los valores de la concentración letal media (LC₅₀) expresada en mg.L⁻¹, para un intervalo de confianza del 95 % ($\alpha=0.05$) (Finney, 1971; Soberon y cols., 2006).

Resultados

El efecto tóxico de los extractos obtenidos a partir de la especie vegetal *Petiveria alliacea* sobre la mortalidad de la *D. magna* durante 24 y 48 h de exposición se puede verificar en la Tabla 1. De acuerdo con esos resultados los extractos orgánicos causaron una mayor toxicidad caracterizado por valores inferiores de la LC₅₀ respecto al extracto acuoso. Ese patrón del bioensayo se intensifica progresivamente haciéndose más notorio en la medida que aumentó el tiempo de exposición desde las 24 h hasta las 48 h al término del ensayo, alcanzándose la LC₅₀ = 65.36 mg.L⁻¹ para el extracto hexánico que resultó ser el de mayor toxicidad. Además, fue muy notorio que el extracto acuoso fue capaz de causar la menor toxicidad avalado por el valor más bajo de la LC₅₀ = 711.18 mg.L⁻¹, causando la muerte del 50% de los neonatos de *D. magna*.

Tabla 1. Efecto tóxico de los extractos de la mucura (*Petiveria alliacea* L.) sobre la *Daphnia magna* durante 24 y 48 h

Extracto	Concentración (mg.L ⁻¹)	Número de individuos <i>D. magna</i>	24 h		48 h		
			Muertes	Mortalidad (%)	Muertes	Mortalidad (%)	
<i>Petiveria alliacea</i> L. (Mucura)	Acuoso	10	15	0	0.00	0	0.00
		100	15	0	0.00	0	0.00
		500	15	0	0.00	5	33.33
		1000	15	8	53.33	10	66.67
		10000	15	15	100.00	15	100.00
		LC ₅₀		973.45		711.18	
	Etanólico	10	15	0	0.00	1	6.67
		100	15	0	0.00	4	26.67
		500	15	9	60.00	10	66.67
		1000	15	14	93.33	15	100.00
		10000	15	15	100.00	15	100.00
	LC ₅₀		446.09		255.50		
	Hexánico	10	15	3	20.00	5	33.33
		100	15	9	60.00	11	73.33
		500	15	13	86.67	13	86.67
		1000	15	15	100.00	15	100.00
		10000	15	15	100.00	15	100.00
		LC ₅₀		104.78		65.36	
Control positivo	NaCl	4,5 g/L	15	8	53	9	60.00

Por otra parte, los resultados obtenidos para los bioensayos de toxicidad de las especies restantes *G. americana* (Tabla 2) y *S. mammosum* (Tabla 3) mantuvieron el mismo patrón, o sea la toxicidad de los extractos de polaridad intermedia (extractos etanólicos) y apolares (extractos hexánicos) presentaron la mayor toxicidad. Ese comportamiento no es casual y se encuentra directamente relacionado con la afinidad fisicoquímica de los metabolitos secundarios con los disolventes de extracción. En ese sentido, diversos investigadores coinciden en la capacidad de los disolventes de mediana a baja polaridad de extraer metabolitos secundarios extremadamente tóxicos causando respuestas fulminantes causando la muertes rápida de las plagas dianas y actuando como insecticidas, mientras que disolventes de elevada polaridad como el agua, permiten la extracción de componentes que actúan como insectistáticos que afectan la biología y fisiología de las plagas (Fu Castillo et al., 2008; Mouden et. al, S., 2017).

Tabla 2. Efecto tóxico de los extractos del huito (*Genipa americana* L.) sobre la *Daphnia magna* durante 24 y 48 h.

Extracto	Concentración (mg L ⁻¹)	Número de individuos <i>D. magna</i>	24 h		48 h		
			Muertes	Mortalidad (%)	Muertes	Mortalidad (%)	
<i>Huito (Genipa americana)</i>	Acuoso	10	15	0	0.00	0	0.00
		100	15	0	0.00	4	26.67
		500	15	1	6.66	5	33.33
		1000	15	8	53.33	10	66.67
		10000	15	15	100.00	15	100.00
		LC ₅₀		964.07		508.07	
	Etanólico	10	15	0	0.00	1	6.67
		100	15	0	0.00	5	33.33
		500	15	9	60.00	10	66.67
		1000	15	14	93.33	15	100.00
		10000	15	15	100.00	15	100.00
	LC ₅₀		425.58		154.35		
	Hexánico	10	15	4	26.66	6	60.00
		100	15	8	53.33	11	73.33
		500	15	11	73.33	13	86.66
		1000	15	15	100.00	15	100.00
		10000	15	15	100.00	15	100.00
	LC ₅₀		57.15		20.64		
Control positivo	NaCl	4,5 g/L	15	8	53	9	60.00

El análisis de los resultados de la Tabla 3 obtenidos a partir de los bioensayos de toxicidad aguda al enfrentar los extractos de la *S. mammosum* frente a los neonatos de *D. magna*

muestra una toxicidad extrema del extracto hexánico llegando a un valor de $LC_{50} = 3.37$ $mg.L^{-1}$, así como la menor toxicidad repetitiva del extracto acuoso lo que podría considerarse un aspecto clave para el futuro desarrollo de biopesticidas botánicos en los que el ingrediente activo lo constituya esa fracción de metabolitos secundarios.

Tabla 3. Efecto tóxico de los extractos de la teta de vaca (*Solanum mammosum* L.) sobre la *Daphnia magna* durante 24 y 48 h

Extracto	Concentración ($mg L^{-1}$)	Número de individuos <i>D. magna</i>	24 h		48 h		
			Muertes	Mortalidad (%)	Muertes	Mortalidad (%)	
Teta de vaca (<i>Solanum mammosum</i>)	Acuoso	10	15	1	6.66	2	13.33
		100	15	3	20.00	5	33.33
		500	15	7	46.66	8	53.33
		1000	15	13	53.33	14	66.67
		10000	15	15	100.00	15	100.00
		LC₅₀		582.31		380.07	
	Etanólico	10	15	0	0.00	2	13.33
		100	15	8	53.00	9	60.00
		500	15	13	86.00	14	93.00
		1000	15	15	100.00	15	100.00
		10000	15	15	100.00	15	100.00
	LC₅₀		85.14		90.59		
	Hexánico	10	15	8	53.00	10	73.00
		100	15	10	60.00	13	86.00
		500	15	15	100.00	15	100.00
		1000	15	15	100.00	15	100.00
		10000	15	15	100.00	15	100.00
		LC₅₀		10.05		3.37	
Control positivo	NaCl	4,5 g/L	15	8	53	9	60.00

En general, analizando los resultados registrados en las Tablas 1, 2 y 3, así como el comportamiento toxicológico de los extractos obtenidos a partir de las tres especies vegetales de la Figura 1, se puede verificar que los extractos acuosos poseen la menor toxicidad, requiriéndose las concentraciones más elevadas para alcanzar la LC_{50} en el rango de 380.05 mg.L^{-1} a 711.18 mg.L^{-1} y por ende el menor riesgo ambiental al ser puestos en contacto con los ecosistemas. Las concentraciones adecuadas de los extractos acuosos se ubican en el rango desde 10 mg.L^{-1} a 100 mg.L^{-1} , ya que puede evidenciarse

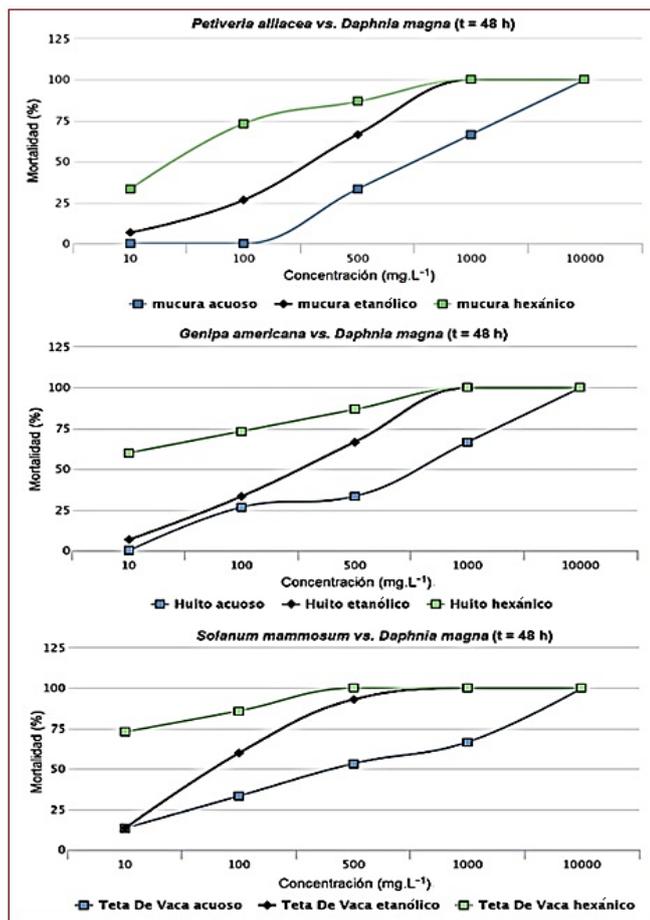


Figura 1. Efecto tóxico de los extractos vegetales sobre la *Daphnia magna* durante 48 h de exposición según al análisis Probit.

que la mortalidad, excepto simbolizada con las cajas celestes se encuentran muy alejadas de la LC_{50} . Además, la curvas demuestran que en la medida que aumenta la dosis la respuesta toxicológica de los extractos acuosos disminuye la intensidad en todos los casos a diferencia de los extractos orgánicos (etanólicos y hexánicos) que para las mismas dosis dan respuestas toxicológicas más intensas reflejadas en los porcentajes de mortalidad que superan ampliamente la causada por los extractos acuosos.

La comprensión global de todo el bioensayo de toxicidad aguda realizado se puede inferir a partir de la Figura 2, pudiéndose observar que los valores de la LC_{50} conectado a la respuesta tóxica de los extractos vegetales evoluciona desde los valores máximos (mínima toxicidad) de los extractos acuosos pasando por valores intermedios (toxicidad intermedia) de los extractos etanólicos hasta llegar a los valores mínimos (máxima toxicidad) de los extractos hexánicos. En ese sentido, al observar el gráfico rápidamente se puede tomar la decisión de descartar los valores mínimos que corresponden a los extractos hexánicos, evitándose con ello los posibles impactos ambientales a los ecosistemas y sus cadenas tróficas al introducirlos en los ecosistemas como parte de un biopesticida botánico para el control de plagas.

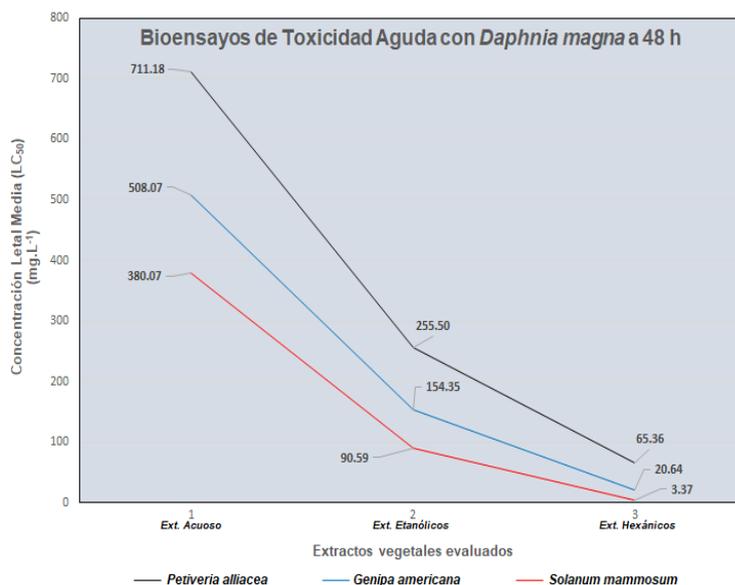


Figura 2. Resultados de los bioensayos de toxicidad aguda a las 48 h.

Conclusiones

Aplicando los bioensayos de toxicidad aguda con *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Daphniidae.) es posible evaluar de manera efectiva la toxicidad de los extractos vegetales a través de la determinación de las concentraciones letales medias (LC_{50}) correspondiente a la inmovilización y mortalidad del 50 % de los neonatos de este microcrustáceo utilizado en calidad de bioindicador.

Los extractos acuosos obtenidos de las especies vegetales evaluadas poseen la menor toxicidad aguda frente la *D. magna*, siendo específicamente el correspondiente a la *P. alliaceae* el de menor toxicidad con un valor de $LC_{50} = 711.18 \text{ mg.L}^{-1}$, mientras que los extractos hexánicos presentaron la mayor toxicidad y en especial el obtenido a partir de la especie vegetal *S. mammosum* que manifestó la mayor toxicidad con un valor de $LC_{50} = 3.37 \text{ mg.L}^{-1}$.

El desarrollo y aplicación de bioensayos de toxicidad aguda con el empleo de bioindicadores como la *Daphnia magna* para evaluar xenobióticos de naturaleza química diversa que incluye, tanto los productos de origen natural, como artificial; constituye una herramienta sencilla y eficaz en el camino del desarrollo sostenible.

Referencias bibliográficas

- Bracho Pérez, J., Tacza Valverde, I., Vásquez Castro, J. (2019). Peruvian Botanical Biopesticides for Sustainable Development and Protection of the Environment. *Peruvian Journal of Agronomy*, 3(3),126-133. <http://dx.doi.org/10.21704/pja.v3i3.1206>.
- Brundtland, G. H. (1987). *Our Common Future*. Oxford University Press.
- Finney, D. J. (1971). *Probit Analysis*, 3rd ed. Cambridge University Press, New York. <https://doi.org/10.1002/jps.2600600940>.
- Fu Castillo, A. A., Lourenção, A. L., Rodríguez Hernández, C., Quevedo Fugí, C. G., García Valente, F., Arredondo Bernal, H. C. et al. (2008). Moscas blancas. Temas selectos sobre su manejo. Mundi-Prensa México, México D. F.
- ISO 6341:2012. Water quality. Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). Acute toxicity test.
- Kikuchi, M., Sasaki, Y., Wakabayashi, M. (2000). Screening of organophosphate insecticide pollution in water by using *Daphnia magna*. *Ecotox Environ Safe*,47, 239-245. <https://doi.org/10.1006/eesa.2000.1958>.
- Mouden, S., Klinkhamer, P.G.L., Choi, Y. H., Leiss, K. A. (2017). Towards eco-friendly crop protection: natural deep eutectic solvents and defensive secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews: Proceedings of the Phytochemical Society of Europe*. 16(5), 935-951. <https://doi.org/10.1007/s11101-017-9502-8>.
- OECD (2004). Test No. 202: *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264069947-en>.
- Olmstead, A. W., LeBlanc, G. A. (2000). Effects of endocrine-active chemicals on the development of sex characteristics of *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.*,19(8), 2107-2113. <https://doi.org/10.1002/etc.5620190821>.
- Regnault-Roger, C., Philogene, B.J., Vincent, C. (2004). *Biopesticidas de Origen Vegetal*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España.
- Robertson, J. L., Jones, M. M., Olguin, E., Alberts, B. (2017). *Bioassays with Arthropods*. 3rd ed. CRC Press. Boca Raton, United State. <https://doi.org/10.1201/9781315373775>.
- Soberón, G. V., Rojas, C., Saavedra, J., Kato, M. J., Guillermo E. Delgado, G. E. (2006). Acción biocida de plantas de *Piper tuberculatum* Jacq. sobre *Diatraea saccharalis*

- (Lepidóptera, Pyralidae). *Rev. peru. biol.* 13(1), 107 – 112. <https://doi.org/10.15381/rpb.v13i1.1770>.
- UN (2019). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). United Nations. <https://doi.org/10.18356/f8fbb7cb-en>.
- USEPA (2002). Method 2021.0: *Daphnia pulex* and *D. magna* Acute Toxicity Tests with Effluents and Receiving Waters in: Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. Fifth ed., EPA Volume 821-R-02-012.
- Wink, M. (2010). Biochemistry of plant secondary metabolism. In: *Annual Plant Reviews* 40. Blackwell Publishing Ltd. 2nd ed., Oxford. <https://doi.org/10.1002/9781444320503.ch1>.
- Zhou, Q., Zhang, J., Fu, J., Shi, J., Jiang, G. (2008). Biomonitoring: an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Anal Chim Acta*, 606, 135-150. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.11.018>.