
ALARGAMIENTO DE LA VIDA MEDIA DE *Drosophila melanogaster* POR LA ADICION DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES AL MEDIO DE CULTIVO

RODOLFO FÉLIX E.
Departamento de Radiobiología.
Instituto Nacional de Energía Nuclear.

INTRODUCCION

El curso de eventos a partir de la absorción inicial de la energía de la radiación y su manifestación final en forma de daño genético, ya sea ruptura de cromosomas o inducción de mutaciones, es una larga cadena que puede ser modificada por varios factores ambientales. El daño inicial por exposición a radiación ionizante dispersa, como los rayos X y los rayos gama, es modificado en varios grados, por factores como el contenido de humedad, proporción de oxígeno, temperatura y otras condiciones (Konzak *et al.*, 1961) La detección de radicales libres con vida relativamente larga ha proporcionado una nueva orientación al estudio y al entendimiento de los mecanismos del daño inducido por irradiación. La naturaleza, producción, vida y forma de decaimiento de los radicales tiene repercusión sobre la amplitud del daño resultante de la exposición a la radiación (Kirby-Smith y Randolph, 1960; Randolph y Haber, 1961; Ehrenberg, 1961). Los radicales libres producidos por radiaciones ionizantes interactúan con el oxígeno para formar radicales peroxilos altamente reactivos, los que, al aumentar el número de radicales libres, producen daño biológico ulterior. Al decaer, ya sea por interacción entre radical y radical, o por interacción con compuestos sulfhidrilos, causan un daño menor.

La relación entre los radicales libres y los efectos biológicos, ha sido demostrada por la adición de compuestos que capturan radicales como el óxido nítrico y por aplicación de métodos para la detección de la resonancia del spin del electrón (Conger, 1961).

Varios autores han sugerido que las consecuencias del envejecimiento se deben a la pérdida o inactivación espontánea de las células en función del tiempo (Handler, 1961). Esta noción es promovida por los notables progresos de la biología molecular, que relacionan a la muerte celular con las alteraciones en los sistemas de codificación y de la síntesis de las proteínas. Otras hipótesis no implican necesariamente la pérdida celular en el organismo que envejece, sino el daño inducido en las mismas, por el evento principal que se considera como responsable del daño citado, que es la mutación somática (Curtis, 1963; Curtis y Crowley, 1963). El valor de estas hipótesis depende de la medida en que se extiende su demostración experimental, por lo que la resolución del problema requiere del desarrollo futuro de líneas de investigación en organismos diversos, anticipándose que no parece remoto el hallazgo de procesos similares causantes tanto del envejecimiento, como de los efectos de la irradiación en sistemas biológicos diferentes.

El esquema de los mecanismos implicados en el daño inducido por irradiación al nivel molecular es evidentemente incompleto, sin embargo, se asume que dicho daño es debido en su mayor parte a la formación y a las reacciones secundarias consecutivas de los radicales libres, que son los intermediarios entre los productos de vida corta, a saber los iones y las moléculas excitadas, y los productos radioquímicos finales. Los radicales libres tienen una gran reactividad porque contienen un electrón impar, por lo que es evidente la probabilidad de modificación de la estructura química de las moléculas normales, al interactuar con dichos radicales.

La irradiación de los mamíferos puede producir mutaciones, cáncer y envejecimiento prematuro (Hempelmann y Hoffman, 1953). Como estos procesos tienen un origen espontáneo en la naturaleza, se investiga si los eventos originales son similares.

El mayor efecto biológico producido por la irradiación tiene su origen en la disociación del agua, con la consecuente formación de los radicales libres de gran actividad química HO. y HO₂., que también se originan espontáneamente en los organismos, en condiciones normales. En efecto, los estudios *in vivo* sobre la resonancia paramagnética del electrón han demostrado la presencia de los radicales libres en los sistemas vivos, (Commoner *et al.*, 1954, 1957; Ingram, 1958), cuya concentración aumenta con la actividad metabólica debido a su producción en las reacciones biológicas de oxidación y de reducción (Michealis, 1951; Waters, 1946). Como las reacciones en las que intervienen los radicales libres no son específicas, se anticipa que pueden producir efectos laterales al reaccionar con los componentes celulares.

Otra evidencia en favor de que los radicales HO. y HO₂. se producen en la célula procede del estudio de animales con deficiencia de la vitamina E donde las mitocondrias y los microsomas contienen productos de la peroxidación de lípidos (Pritchard y Singh, 1960), proceso en el que interviene probablemente el radical HO. La fragmentación de dichos productos da origen a su vez a radicales libres activos incluyendo al HO., RO. y RO₂., que se acumulan en cantidades potencialmente significativas desde el punto de vista biológico. Otras investigaciones sugieren la producción de radicales libres dentro de la célula durante la acción de la xantina oxidasa, varios sistemas de deshidrogenasas y de la peroxidasa (Commoner *et al.*, 1957). De ésta y otras evidencias experimentales se deduce el origen espontáneo de los radicales libres de la naturaleza del HO. y HO₂. durante el metabolismo normal. Por consiguiente, es posible que una parte de los procesos causativos de la mutación espontánea, del cáncer y del envejecimiento sean similares a los inducidos por irradiación, originándose en el primer caso los radicales HO. y HO₂. en los procesos metabólicos, y en el segundo caso en la disociación del agua (Harman, 1962).

Los radicales libres deben reaccionar, hasta cierto punto con otros constituyentes celulares, incluyendo a los ácidos nucleicos, cuyas modificaciones son especialmente significativas en relación con el envejecimiento. Los radicales orgánicos que tienen origen en el ADN por la pérdida de un átomo de hidrógeno, darían lugar a otras reacciones como la adición de oxígeno con formación de peróxidos y compuestos oxigenados, degradación en unidades más pequeñas y dimerización, tal como se ha demostrado en sistemas sencillos de polímeros y radicales libres (D'Alelio, 1952; Tappel, 1955).

La intervención biológicamente significativa de los radicales se debe a que generalmente intervienen en procesos en cadena, puesto que por su reactividad extrema, existen únicamente en concentraciones muy reducidas. Solamente en los procesos en cadena en los que intervienen repetidamente especies químicas portadoras, se obtienen productos finales en cantidades significativas. No obstante, se debe señalar cierta reserva con respecto a este principio general: en los sistemas vivos, la amplificación biológica puede hacer importantes a reacciones raras que no se realizan en cadena. Por ejemplo, los rayos cósmicos u otras fuentes externas, y los elementos radiactivos en el organismo humano, lo sujetan a una razón de dosis igual a 0.1 rad por año. Esta razón de dosis tan pequeña produce alrededor de 10^{-7} moles de radicales libres por cuerpo humano, por año. Claramente, esta es una cantidad extraordinariamente pequeña de radicales iniciadores, que son en parte responsables del nivel tan bajo de mutaciones naturales.

La amplificación biológica es de importancia primordial, dada la enorme sensibilidad de la célula a las modificaciones en su aparato hereditario, constituido por ADN. Debido a la sensibilidad tan notable del ADN, la alteración por radiación de únicamente una molécula entre 10^6 a 10^7 moléculas en la célula puede ser letal para la misma.

Las alteraciones en el ADN en las células de un organismo multicelular, influyen individualmente sobre su habilidad funcional y colectivamente sobre las interrelaciones armónicas necesarias para la supervivencia de los conjuntos celulares y del individuo. Como ejemplo, las alteraciones en las propiedades de los tejidos conectivos recientemente formados, (Boucek *et al.*, 1958) pueden resultar de las mutaciones acumuladas en función del tiempo en las células que dan origen a los fibroblastos. Ya que las células del organismo dependen del tejido conectivo, los cambios que ocurren en el mismo, debido a las mutaciones en las células responsables de su mantenimiento, deben manifestar efectos nocivos en el organismo. En el caso de las células de vida larga como las del músculo esquelético y las del sistema nervioso, las alteraciones acumuladas en el ADN se traducen en un deterioro gradual de su habilidad funcional.

Los radicales libres producidos en el agua tienen gran reactividad e interactúan con una gran variedad de moléculas. Si se agregan otras sustancias a la solución, competirán en la captura de dichos radicales con las moléculas presentes, por ejemplo, con las enzimas, reduciendo la inactivación de las mismas.

En las reacciones de radicales libres con intervención del oxígeno molecular se manifiesta una acción inhibitoria por adición de sustancias antioxidantes, como el hidroxitolueno butilado (BHT) que captura a los radicales libres intermediarios. Ya que la efectividad de los compuestos como el BHT es independiente en su mayor parte de la composición química de los radicales R. o RO₂., estos compuestos deben reducir extensivamente los efectos deletéreos originados en las reacciones con radicales libres en un organismo, cuando están involucrados compuestos como ácidos nucleicos, mucopolisacáridos, lípidos o proteínas.

Harman (1962, 1968, 1969) y Harman *et al.* (1966) demostraron la acción protectora de varias sustancias

antioxidantes inhibidoras de las reacciones con radicales libres, cuyo efecto se manifiesta en un alargamiento de la vida, cuando dichas sustancias se agregan al alimento normal de ratones machos. La vida media del ratón aumentó en la proporción del 45% cuando se añadió BHT en la proporción de 0.50% en peso a la dieta semisintética de los machos de la línea LAF₁ (Herman, 1968).

Dada la universalidad de algunos de los aspectos metabólicos mencionados, modificables por la intervención de radicales libres, en el presente experimento se investigó el efecto de tres compuestos antioxidantes similares en su estructura química sobre la vida media de *D. melanogaster*.

El hidroxitolueno butilado, 2,6 di-terbutilo p-cresol (BHT), el hidroxianisol butilado, mezcla de 2-terbutilo-4-metoxifenol y 3 terbutilo-4-metoxifenol (BHA), y el galato de propilo, éster propílico del ácido gálico (GP), son tres compuestos antioxidantes fenólicos, cuyos efectos sobre la duración de la vida de *D. melanogaster* se describen a continuación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se empleó la línea y/sc⁸Y, mantenida durante 75 generaciones en un lapso de cinco años en el laboratorio. El fenotipo de los machos y de las hembras facilita el llevar por separado el registro de la mortalidad, ya que las hembras son de color amarillo, contrastando con los machos de color pardo, por el aleomorfo normal de yellow que llevan en el fragmento sc⁸ del cromosoma X adherido al cromosoma Y. Las poblaciones fueron obtenidas mediante el aislamiento de adultos emergidos de la pupa, dentro de un lapso de 10 horas posterior a la eclosión, por lo que la determinación de la edad tiene un error de ± 5 horas. Los cultivos se mantuvieron a la temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante todo el experimento. Dada la influencia que tiene la composición del alimento sobre la vida media de *Drosophila*, así como las condiciones asépticas (Strehler, 1962; Lamb, 1966), se señala a continuación la proporción en porcentaje de los constituyentes empleados en la elaboración del medio de cultivo para el experimento: agua bidestilada (85.47), agar en fibra (1.10), harina de maíz (5.16), sacarosa (2.90), dextrosa (2.07), levadura de cerveza en polvo (2.48), ácido propiónico (0.41), tegosept disuelto al 12.5% en alcohol etílico (0.41). Los antioxidantes se disolvieron en alcohol etílico en una proporción que no afecta a la viabilidad de los adultos de *Drosophila*, agregándolos durante la etapa de agitación del medio, para su homogeneización a una temperatura menor a 40°C .

La aglomeración de los adultos en los cultivos es otro factor que debe considerarse (Strehler, 1962) por su influencia sobre la mortalidad, por lo que se aislaron únicamente 50 hembras y 50 machos en cada cultivo, en frascos lecheros de 1/4 de litro. El registro del efecto de los antioxidantes empleados, sobre la mortalidad de los imagos se hizo a partir de 6 cultivos para cada concentración, registrándose, por consiguiente, la duración de la vida de 600 individuos en cada grupo. Con el propósito de mantener condiciones óptimas en los cultivos, se hicieron transvases de adultos sin anestesiarnos, a nuevos cultivos cada 48 horas, registrándose la mortalidad al contar los muertos que quedan adheridos a la superficie del medio, después del transvase. El registro de mortalidad se continuó hasta la muerte del último imago en todos los cultivos.

Después de la prueba de toxicidad previa al experimento, se añadieron los antioxidantes al medio de cultivo en las siguientes concentraciones en peso: hidroxitolueno butilado (0.100, 0.010 y 0.001%), hidroxianisol butilado (0.100, 0.010 y 0.001%), galato de propilo (1.000, 0.100 y 0.010%). Los antioxidantes se agregaron al medio de cultivo durante la duración total del estado adulto.

Con los datos de mortalidad, se obtuvieron gráficas sigmoides que indican el descenso del porcentaje de supervivencia en relación con la edad. Con los mismos datos, y mediante la transformación Probit y el método de mínimos cuadrados se obtuvo la ecuación de la recta para la relación: Probit del porcentaje de supervivencia/tiempo en días.

RESULTADOS

La vida media normal de machos y hembras es de 40.42 y 41.36 días respectivamente. En la Tabla I están contenidos los datos sobre la vida media de cada grupo tratado, así como el porcentaje de supervivencia obtenido de la relación entre la vida media del grupo tratado y la vida media del grupo testigo.

De los datos contenidos en la Tabla I se deduce que el compuesto que resultó más efectivo para producir un

alargamiento de la vida media fue el B.H.T., a la concentración de 0.001 %. El porcentaje de supervivencia es mayor a 100 en las tres concentraciones empleadas en los dos sexos. El B.H.A. produjo un efecto menos notable, mientras que el G.P. solamente alargó el período de vida media de los machos alimentados con las dos concentraciones menores de este compuesto.

Los machos mostraron mayor sensibilidad que las hembras al compuesto B.H.T. en las tres concentraciones empleadas. El mayor porcentaje de supervivencia en todo el experimento es el de los machos que se alimentaron con B.H.T. a la concentración de 0.001%, produciéndose un alargamiento de la vida media equivalente al 28.95% de la vida media del testigo.

La vida media de los machos aumento en 7 de los 9 grupos, mientras que, la vida media de las hembras aumentó únicamente en 4 de los 9 grupos tratados con los compuestos antioxidantes.

Tabla I. Efecto de los compuestos antioxidantes: hidroxitolueno butilado (B.H.T.), hidroxianisol butilado (B.H.A.) y galato de propilo (G.P.), añadidos al medio de cultivo durante el estado adulto, sobre la vida media de los imagos de *Drosophila melanogaster* (y/sc⁸Y).

Compuesto	% conc.	machos		hembras	
		v.m. en d.	p. de s.	v.m. en d.	p. de s.
Testigo		40.42		41.36	
B.H.T.	0.100	44.55	110.22	43.12	104.22
B.H.T.	0.010	46.97	116.20	43.33	104.76
B.H.T.	0.001	52.12	128.95	47.42	114.65
B.H.A.	0.100	30.06	74.36	34.63	83.73
B.H.A.	0.010	41.13	101.76	43.01	103.99
B.H.A.	0.001	45.18	111.78	41.08	99.32
G.P.	1.000	37.44	92.63	28.46	68.81
G.P.	0.100	42.64	105.49	40.74	98.50
G.P.	0.010	44.60	110.34	37.85	91.51

La vida media en días (v.m. en d.), comprende el período que transcurre entre la emergencia de los imagos y la muerte del 50% de la población. El porcentaje de supervivencia (p. de s.), se obtiene dividiendo la vida media del grupo tratado entre la vida media del grupo testigo. (% conc.), porcentaje de concentración en peso.

Al hacer la comparación entre 11 de los puntos sobre las curvas de supervivencia del grupo testigo con los correspondientes de los grupos tratados, se encontraron diferencias significativas mediante la distribución de X^2 en los machos de los grupos: G.P. a la concentración de 0.100% ($X^2=132.592$, $P<0.001$), G.P. a la concentración de 0.010% ($X^2=80.316$, $P<0.001$), B.H.T. a la concentración de 0.010% ($X^2=93.285$, $P<0.001$), B.H.T. a la concentración de 0.001% ($X^2=178.975$, $P<0.001$), Y B.H.A. a la concentración de 0.001% ($X^2=199.068$, $P<0.001$). En las poblaciones de hembras no se encontró ninguna diferencia significativa al aplicar la distribución de X^2 , al nivel de significación de 0.05.

DISCUSION

Los compuestos antioxidantes del tipo fenólico como el hidroxitolueno butilado producen un alargamiento de la vida media en *D. melanogaster*, según los resultados del presente experimento.

Harman *et al.* (1966) y Harman (1968) demostraron un efecto más notable al agregar B.H.T. en varias

concentraciones a la dieta semisintética en ratones de la línea LAF₁. Las diferencias entre los resultados obtenidos, se deben probablemente al diverso grado de toxicidad que tiene dicho compuesto en las dos especies, ya que la concentración menor (0.001%) es la que produjo un efecto mayor en los machos adultos de *D. melanogaster*.

El daño genético inducido por la irradiación se debe principalmente a la formación y reacciones de los radicales libres a partir de las moléculas del agua. Como la radiación ionizante acelera los procesos que conducen al envejecimiento, se postula el significado de los radicales libres de origen endógeno sobre las células del organismo.

Los compuestos antioxidantes con estructura química similar al B.H.T. tienen una acción inhibitoria en las reacciones de radicales libres con intervención del oxígeno. La efectividad de estos compuestos es independiente en su mayor parte de la composición de los radicales R. o RO., por lo que protegen a varios tipos de moléculas. Se pretende relacionar dicha propiedad protectora con los efectos dañinos que pueden tener los radicales libres que son producidos espontáneamente en los sistemas vivientes. Si el envejecimiento involucra procesos resultantes del ataque de los radicales libres a los componentes celulares, principalmente al ADN, la acción protectora al nivel molecular mediante la captura de dichos radicales puede manifestarse como una disminución en la velocidad característica del envejecimiento al nivel individual, y por consiguiente, en un alargamiento de la vida.

La diferencia en la radiosensibilidad entre los machos y las hembras de *D. melanogaster* está relacionada con la haploidía del cromosoma X en los machos, dada la proporción considerable de la totalidad del genoma contenida en dicho cromosoma. Asimismo, el daño genético producido por los radicales libres de origen endocelular tiene mayor expresión en los machos, en los que los compuestos antioxidantes descritos muestran un efecto protector mayor sobre los procesos celulares de degradación, acelerados por los radicales libres. Si el envejecimiento natural está incluido en tal esquema, la teoría del alargamiento de la vida en función de la captura de radicales libres mediante los compuestos antioxidantes introducidos con la alimentación al organismo, es congruente con los resultados del presente experimento.

LITERATURA CITADA

- BOUCEK, R. J., N. L. NOBLE, K. T. KAO y H. R. ELDEN, 1958. The effects of age sex, and race upon the acetic acid fractions of collagen (human biopsy-connective tissue). *J. Gerontol.* 13: 2-9.
- COMMONER, B., J. J. HEISE, B. B. L-PINCOT, R. E. NORBERG, J. V. PASSONEU y J. TOWNSED, 1957. Biological activity of free radicals. *Science* 126: 57-63.
- COMMONER, B., J TOWNSED y G. E. PAKE, 1954. Free radicals in biological materials. *Nature* 174: 689-691.
- CONGER, A. D, 1961 *In: Recovery of cells from injury*, Oak Ridge National Laboratory. Symposium 27-32.
- CURTIS, H. J., 1963. Biological. Mechanisms Underlying the Aging Process. *Science* 141: 686-694.
- CURTIS, H. J. y C. CROWLEY, 1963. Chromosome aberrations in liver cells in relation to the somatic theory of aging. *Radiation Res.* 19: 337-344.
- D'ALELIO, G. F., 1952. *Fundamental Principles of Polymerization*, John Wiley and Sons, New York.
- EHRENBERG, A., 1961. *Free Radicals in Biological Systems*, Academic Press, N. Y.: 337-350.
- HANDLER, P., 1961. Biochemical considerations of relationships between effects of time and of radiation on living systems. *In: Radiation and Ageing*, P. Handler (Ed.), *Fed. Proc.* 20 No. 2 Suppl. 8: 8-13.
- HARMAN, D., 1962. Role of Free Radicals in Mutation, Cancer, Aging and the Maintenance of Life. *Radiation Res.* 16: 753-763.
- HARMAN, D., 1968. Free Radical Theory of Aging: Effect of Free Radical Reaction Inhibitors on the Mortality Rate of Male LAF₁ Mice. *J. Gerontol.* 23: 476-482.
- HARMAN, D., 1969. Prolongation of Life: Role of Free Radical Reactions in Aging. *T. Amer. Geriat. Soc.* 17: 721-735.
- HARMAN, D. y L. H. PIETTE, 1966. Free Radical Theory of Aging: Free Radical Reactions in Serum. *J. Gerontol.* 21.

560-565.

- HEMPELMANN, L. H. y J. G. HOFFMAN, 1953. Practical aspects of radiation injury *Ann. Rev. Nuclear Sci.* 3: 369-389.
- INGRAM, D. J. E., 1958. *Free Radicals as Studied by Electron Spin Resonance*, Academic Press, New York.
- KIRBY-SMITH, J. S. y M. L. RANDOLPH, 1960: In: *Immediate and low level effects of ionizing radiation*. A. A. Buzzati Traverso (Ed.), Taylor and Francis Ltd. London: 11-24.
- KONZAK, C. F., R. A. NILAN, J. R. HARLE y R. E. HEINER, 1961. In: *Fundamental aspects of radiosensitivity*, Broonkhaven Symposium in Biology 14: 128-157.
- LAMB, M. J., 1966. The relationship between age at irradiation and life shortening in adult *Drosophila*. In: *Radiation and Aging*. P. J. Lindop y G. A. Sacher (Eds.), London: Taylor y Francis.
- MICHEALIS, L., 1951. Theory of oxidation-reduction. In: *The Enzymes*. J. B. Sumner y K. Myrbäck (Eds.). 1st. ed., Vol. II, Parte 1, Cap. 44, Academic Press. New York.
- PRITCHARD, E. T. y H. SINGH, 1960. Lipid peroxidation in tissues of vitamin E deficient rats. *Biochem. Biophys. Research Communs* 2: 184-188.
- RANDOLPH, M. L. y A. A. HABER, 1961. In: *Effects of ionizing radiation on seeds*. IAEA. Vienna: 57-65.
- STREHLER, B. L., 1962. Further Studies on the Thermally Induced Aging of *Drosophila melanogaster*. *J. Gerontol.* 17: 347-352.
- TAPPEL, A. L., 1955. Unsaturated lipid oxidation catalyzed by hematin compounds. *J. Biol. Chem.* 217: 721-733.
- WATERS, W. A., 1946. *The Chemistry of Free Radicals*, Oxford University Press, London.

APENDICE I

Transformación Probit de los porcentajes de supervivencia de los grupos de machos de *D. melanogaster* testigo y tratados con hidroxitolueno butilado (B.H.T.). E.d., edad en días; % superv., porcentaje de supervivencia.

E.d.	% superv.	Probit
9	95.76	6.7235
16	93.64	6.5251
23	87.28	6.1397
30	85.69	6.0665
37	65.06	5.3869
44	42.29	4.8055
51	26.93	4.3851
58	13.17	3.8816
65	5.22	3.3760
72	0.92	2.6423
79	0.62	2.4989

Grupo testigo

$$y=7.64169-0.06535 x$$

E.d.	% superv.	Probit
9	98.65	7.2115
16	97.30	6.9268
23	93.70	6.5301
30	85.55	6.0607
37	75.61	5.6938
44	59.77	5.2474
51	47.10	4.9272
58	24.47	4.3087
65	9.10	3.6654
72	0.51	2.4306
79	0.51	2.4306

B.H.T. (0.100%)

$$y=8.16814 - 0.07111 x$$

r=0.99175
m=40.424

E.d.	% Superv.	Probit
9	98.15	7.0858
16	96.71	6.8481
23	91.22	6.3545
30	87.05	6.1288
37	76.87	5.7346
44	58.36	5.2111
51	44.47	4.8609
58	33.82	4.5826
65	15.30	3.9763
72	5.14	3.3684
79	1.14	2.8136

B.H.T. (0.010%)

$$y=7.82891 - 0.06023 x$$

r=0.99401
m=46.968

r=0.98549
m=44.553

E.d.	% superv.	Probit
9	99.60	7.6521
16	98.80	7.2571
23	98.40	7.1444
30	94.77	6.6231
37	88.71	6.2112
44	73.39	5.6247
51	48.78	4.9694
58	37.50	4.6814
65	23.39	4.2740
72	4.44	3.3009
79	2.43	3.0278
86	0.82	2.5998
93	0.82	2.5998

B.H.T. (0.001%)

$$y=8.47098-0.06660 x$$

r=0.99354
m=52.117

APENDICE II

Transformación Probit de los porcentajes de supervivencia de los grupos de hembras de *D. melanogaster* testigo y tratados con hidroxitolueno butilado (B.H.T.) E.d., edad en días; % superv. porcentaje de supervivencia.

E.d.	% superv.	Probit
9	94.28	6.5782
16	93.40	6.5063
23	91.20	6.3532
30	86.36	6.0967
37	70.51	5.5391
44	52.47	5.0619
51	30.03	4.4765
58	14.19	3.9282
65	4.95	3.3503
72	0.99	2.6698

E.d.	% superv.	Probit
9	98.28	7.1154
16	96.73	6.8425
23	94.15	6.5677
30	88.11	6.1805
37	67.43	5.4518
44	43.29	4.8310
51	24.76	4.3179
58	13.99	3.9193
65	5.37	3.3901
72	1.92	2.9293

Grupo testigo

$y=7.67662-0.06471 x$

$r=0.97974$

$m=41.363$

79

1.06

2.6952

B.H.T. (0.100%)

$y=7.97988-0.06911 x$

$r=0.99449$

$m=43.118$

E.d.	% superv.	Probit
9	97.99	7.0517
16	95.57	6.7028
23	93.56	6.5189
30	91.14	6.3495
37	79.04	5.8078
44	45.98	4.8991
51	26.22	4.3634
58	14.94	3.9611
65	6.88	3.5151
72	2.03	2.9524
79	0.42	2.3632

E.d.	% superv.	Probit
9	99.25	7.4324
16	98.14	7.0836
23	97.02	6.8838
30	94.04	6.5584
37	84.71	6.0241
44	65.32	5.3939
51	32.12	4.5357
58	18.68	4.1102
65	8.23	3.6102
72	1.52	2.8350
79	0.40	2.3479

B.H.T. (0.010%)

$y=8.02042 -0.06971 x$

$r=0.99025$

$m=43.328$

B.H.T. (0.001%)

$y=8.54862 -0.07483 x$

$r=0.97969$

$m=47.422$

APENDICE III

Transformación Probit de los porcentajes de supervivencia de los grupos de machos de *D. melanogaster*, tratados con hidroxianisol butilado (B.H.A.), y con galato de propilo (G.P.). E.d., edad en días; % superv., porcentaje de supervivencia.

E.d.	% superv.	Probit	E.d.	% superv.	Probit	E.d.	Superv.	Probit
9	84.09	5.9982	9	96.27	6.7829	9	98.44	7.1545
16	69.07	5.4978	16	92.07	6.4097	16	96.88	6.8667
23	54.93	5.1239	23	89.74	6.2668	23	93.37	6.5039
30	48.74	4.9684	30	84.60	6.0194	30	90.64	6.3189
37	43.43	4.8344	37	66.83	5.4351	37	81.67	5.9029
44	27.52	4.4028	44	44.86	4.8708	44	48.19	4.9546

51	20.47	4.1750	51	24.76	4.3179	51	30.28	4.4833
58	14.29	3.9327	53	13.09	3.8778	58	19.77	4.1501
65	7.22	3.5402	65	6.09	3.4528	65	9.25	3.6745
<u>B.H.A. (0.100%)</u>			72	1.89	2.9229	72	2.63	3.0618
y=6.21606-0.04045 x			79	0.95	2.6555	79	1.07	2.6988
r=0.99233			<u>B.H.A (0.010%)</u>			86	0.29	2.1088
m=30.063			y=7.58645-0.06289 x			93	0.29	2.1088

r=0.99381
m=41.127

B.H.A. (0.001%)
y=7.98971-0.06618 x
r=0.99408
m=45.175

<u>%</u>		
E.d.	superv.	Probit
9	88.98	6.2254
16	83.76	5.9847
23	82.31	5.9273
30	77.09	5.7418
37	66.07	5.4144
44	36.22	4.6474
51	23.17	4.2667
58	10.70	3.7574
65	1.03	3.2528

G.P. (1.000%)
y=7.04948-0.05474 x
r=0.97280
m=37.440

<u>%</u>		
E.d.	superv.	Probit
9	95.70	6.7169
16	88.82	6.2170
23	83.23	5.9633
30	78.93	5.8040
37	68.18	5.4727
44	40.27	4.7536
51	31.67	4.5231
58	26.51	4.3723
65	20.06	4.1605
72	8.90	3.6531
79	2.45	3.0313
86	0.30	2.2522

G.P. (0.100%)
y=7.25129-0.05280 x
r=0.98671
m=42.638

<u>%</u>		
E.d.	superv.	Probit
9	97.76	7.0066
16	90.16	6.2904
23	87.03	6.1278
30	83.02	5.9550
37	67.84	5.4632
44	51.77	5.0443
51	32.13	4.5359
58	25.44	4.3392
65	18.31	4.0964
72	5.79	3.4273
79	2.67	3.0683

G.P. (0.010%)
y=7.39775-0.05376 x
r=0.99444
m=44.601

APENDICE IV

Transformación Probit de los porcentajes de supervivencia de los grupos de hembras de *D. melanogaster*, tratados con hidroxianisol butilado (B.H.A.) y con galato de propilo (G.P.). E.d., edad en días; % superv., porcentaje de supervivencia.

<u>%</u>		
E.d.	superv.	Probit

<u>%</u>		
E.d.	superv.	Probit

<u>%</u>		
E.d.	Superv.	Probit

9	88.60	6.2055
16	78.46	5.7878
23	72.13	5.5867
30	59.47	5.2394
37	59.47	5.2394
44	39.22	4.7264
51	21.50	4.2108
58	7.57	3.5654
65	5.03	3.3578

B.H.A. (0.100%)

y=6.75833-0.05077 x
r=0.98216
m=34.633

9	100.00	
16	95.74	6.7213
23	91.47	6.3705
30	84.53	6.0165
37	71.71	5.5743
44	42.30	4.8058
51	23.06	4.2631
58	14.52	3.9428
65	7.59	3.5668
72	2.26	2.9971
79	1.20	2.7429

B.H.A. (0.010%)

y=7.78107-0.06676 x
r=0.99593
m=43.006

9	98.01	7.0558
16	95.62	6.7082
23	92.06	6.4090
30	90.46	6.3082
37	75.82	5.7005
44	30.37	4.4862
51	14.16	3.9268
58	8.73	3.6424
65	3.97	3.2458
72	1.97	2.9399

B.H.A. (0.001%)

y=7.96917-0.07227 x
r=0.98202
m=41.084

E.d.	% superv.	Probit
9	75.78	5.6993
16	67.50	5.4538
23	65.30	5.3934
30	59.22	5.2332
37	45.41	4.8847
44	23.32	4.2717
51	11.17	3.7824
58	5.11	3.3657
65	2.91	3.1058

G.P. (1.000%)

y=6.41094-0.04958 x
r=0.97659
m=28.458

E.d.	% superv.	Probit
9	99.40	7.5121
16	91.01	6.3414
23	83.22	5.9629
30	77.22	5.7461
37	72.42	5.5924
44	40.68	4.7642
51	16.12	4.0104
58	9.53	3.6914
65	7.13	3.5337
72	2.33	3.0100

G.P. (0.100%)

y=7.73628-0.06716 x
r=0.98478
m=40.743

E.d.	% Superv.	Probit
9	97.39	6.9415
16	89.54	6.2558
23	84.32	6.0077
30	79.09	5.8095
37	66.00	5.4125
44	31.44	4.5166
51	14.17	3.9273
58	6.84	3.5123
65	3.19	3.1464

G.P. (0.010%)

y=7.60167-0.06873 x
r=0.98925
m=37.853