



FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS Y BIOLOGICAS
"DR. IGNACIO CHAVEZ"

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**"EFECTO ANTIALIMENTARIO DEL EXTRACTO VEGETAL DE
Enterolobium cyclocarpum (Jacq) Griseb SOBRE LA TERMITA DE
MADERA SECA *Incisitermes marginipennis* (LATREILLE)
(ISOPTERA:KALOTERMITIDAE)"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN FARMACOLOGÍA BÁSICA

PRESENTA

**SARA ELIET URRUTIA HERNÁNDEZ
QUIMICO FARMACOBIOLOGO**

**TUTOR: MAURO M. MARTÍNEZ PACHECO
DOCTOR EN CIENCIAS**

**COTUTOR: VICTOR MANUEL FARIAS RODRIGUEZ
MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS**

**MORELIA, MICHOACÁN
MEXICO
2007**

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Al Gobierno del Estado de Michoacán de Ocampo

FOMIX

Proyecto 2005- C01-009

Por el apoyo para la realización de este proyecto

DEDICATORIA

A DIOS
POR SU AMOR Y BENDICIONES.

A MIS PADRES[†]
POR EL DON DE LA VIDA.

A MIS HERMANOS
POR SER MI FUERZA PARA SEGUIR ADELANTE.

A JUDITH Y MARU
POR APOYARME A REALIZAR ESTE SUEÑO
POR SU AMISTAD
UN 4.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Doctor Mauro Manuel Martínez Pacheco por la oportunidad de realizar este proyecto, por su tiempo, sus conocimientos y paciencia para la realización del mismo.

Al MCM. Víctor Manuel Rodríguez Farias, por su apoyo y observaciones.

MC. David Raya González, por no dejarme claudicar, por su apoyo, conocimientos, fotos y paciencia.

Al MC. Alberto Flores García, por su apoyo en estadística, gracias por compartir tus conocimientos y amistad.

MFB. Maria Eugenia Morales López, por enseñarme que hay más caminos por los que uno puede lograr lo que desea, por el tiempo dedicado a la realización de este proyecto y por contagiarme de energía y entusiasmo.

A mis compañeros de laboratorio César y Edgar por su apoyo y divertidos momentos, Moni por tus enseñanzas, Rosy por tu amistad.

Al Instituto de Investigaciones Químico Biológicas por su coparticipación con la Facultad de Ciencias Medicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” para la realización de este proyecto.

INDICE GENERAL

	Pagina
ÍNDICE DE CUADROS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Variabilidad biológica	6
2.2 Las plantas en el efecto farmacológico y biocida	7
2.3 Control de plagas	9
2.4 Termitas de madera seca	12
2.4.1 Biología de las termitas	
2.4.2 Microbiota Intestinal	17
2.4.3 Pesticidas que controlan organismos degradadores de madera seca	19
2.5 Parota, Caro-caro, Guanacastle, Nacaste, Cascabel, Orejón, Chorejas (<i>Enterolobium cyclocarpum</i>) (Jacq) Griseb	21
2.5.1. Ubicación taxonómica de <i>Enterolobium cyclocarpum</i>	23
III. JUSTIFICACIÓN	25
IV. HIPÓTESIS	27
V. OBJETIVOS	27
VI. MATERIAL Y METODOS	28
Estrategia Experimental	28
6.1 Materiales, reactivos y equipo utilizado en el presente estudio	29
6.2 Material biológico	30
6.2.1 Obtención del extracto	30
6.2.2 Determinación de la concentración de <i>Enterolobium cyclocarpum</i> (Jacq) Griseb	31
6.2.3 Colecta de termitas.	32
6.2.4 Condiciones de mantenimiento de material biológico	32
6.2.5 Obtención del consorcio intestinal de la termita	33
6.3 Medios de Cultivo	33

6.3.1	Condiciones de Cultivo	35
6.4	Ensayo para determinar la actividad antibacteriana del extracto acuoso de <i>E. cyclocarpum</i> sobre bacterias de interés clínico	35
6.5	Ensayo para determinar la actividad antibacteriana en aislado enterobacterianos de la termita	36
6.5.1.	Determinación del efecto tóxico del extracto vegetal de <i>E. cyclocarpum</i> en la microbiota intestinal de la termita <i>I. marginipennis</i> .	37
6.5.2	Determinación del efecto tóxico <i>in vitro</i> del extracto de <i>Enterolobium cyclocarpum</i> (Jacq) Griseb sobre la microbiota intestinal de la termita de madera seca <i>Incisitermes marginipennis</i> (Latreille).	38
6.6.	Determinación del efecto tóxico <i>in situ</i> del extracto acuoso de <i>E. cyclocarpum</i> (Jacq) Griseb sobre la microbiota intestinal de <i>Incisitermes marginipennis</i> (Latreille)	40
6.7.	Cuantificación de la actividad celulolítica en la microbiota intestinal de <i>Incisitermes marginipennis</i> (Latreille).	41
6.7.1	Cuantificación de β –glucosidasa en intestino de termitas	41
6.7.2	Cuantificación de la Endocelulasa en intestino de termitas	42

6.7.3	Determinación de proteína por el método reportado de Lowry y col en 1951	43
6.8.	Análisis estadístico	45
VII.	RESULTADOS	46
7.1	Determinación del efecto antibacteriano del extracto acuoso de <i>E. cyclocarpum</i> (Jacq) Griseb sobre bacterias de interés clínico	46
7.2	Determinación <i>in vitro</i> del efecto tóxico del extracto vegetal de <i>E. cyclocarpum</i> (Jacq) Griseb en la microbiota intestinal de la termita <i>Incisitermes marginipennis</i> (Latreille)	46
7.2.1	Obtención del Primocultivo	46
7.2.2	Determinación <i>in vitro</i> del efecto antibacteriano del extracto de <i>E. cyclocarpum</i> .	50
7.2.3	Determinación <i>in vitro</i> del efecto antifúngico del extracto de <i>E. cyclocarpum</i> .	50
7.3	Determinación del efecto tóxico <i>in situ</i> del extracto acuoso de <i>E. cyclocarpum</i> (Jacq) Griseb sobre la microbiota intestinal de <i>Incisitermes marginipennis</i> (Latreille).	57
7.3.1	Determinación del efecto tóxico en pruebas de difusión de Agar	57
7.3.2	Recuento y clasificación de la Microbiota Intestinal	58
7.4	Cuantificación de la actividad celulolítica en	61

la microbiota intestinal de <i>Incisitermes marginipennis</i> (Latreille).	
7.4.1. Determinación de la actividad celulolítica de β -glucosidasa sobre Intestino de <i>Incisitermes marginipennis</i> (Latreille)	61
7.4.2. Determinación de la actividad celulolítica de la endocelulosa sobre intestino de <i>Incisitermes marginipennis</i> (Latreille)	61
7.5 Estudio fitoquímico de <i>Enterolobium cyclocarpum</i> (Jacq) Griseb	62
VIII. DISCUSIÓN	65
Perspectivas	72
IX. CONCLUSION	73
X. BIBLIOGRAFIA	74
Anexo 1	80

INDICE DE FIGURAS.

Figura	Título	Pagina
1	Esquema filogenético de las termitas Abe y col., 2000.	15
2	Estadios biológicos de <i>Incisitermes marginipennis</i> (Latreille)	17
3	Anatomía del aparato digestivo de la termita de madera seca.	18
4	Esquema de oxigenación del intestino de la termita.	19
5	<i>Enterolobium cyclocarpum</i> (Jacq). Griseb. A) Árbol, B) Hoja y fruto, C) Distribución en América.	24
6	Condiciones de aclimatación y mantenimiento de la termita de madera seca <i>Incisitermes marginipennis</i> (Latreille).	32
7	Obtención del consorcio intestinal de la termita de madera seca por punción con aguja fina.	33
8	Ensayo de difusión en agar.	36
9	Determinación del efecto tóxico del extracto de <i>Enterolobium cyclocarpum</i> sobre el crecimiento de la microbiota intestinal de <i>Incisitermes marginipennis</i> .	37
10	Tratamientos para determinar el efecto <i>in vitro</i> de extracto acuoso de <i>E. cyclocarpum</i> sobre la microbiota intestinal de <i>I. marginipennis</i> .	39
11	Recuento del contenido Intestinal de la termita de madera seca.	41
12	Efecto antibacteriano del extracto acuoso del duramen de <i>E. cyclocarpum</i> ejercido en aislados bacterianos de interes clínico.	47
13	Efecto antibacteriano del extracto acuoso de <i>E. cyclocarpum</i> sobre bacterias de interés clínico.	48
14	Efecto de los extractos vegetales de <i>Enterolobium cyclocarpum</i> sobre las enterobacterias anaerobias facultativas de <i>Incisitermes marginipennis</i> .	52
15	Efecto antibacteriano de los extractos vegetales de <i>Enterolobium cyclocarpum</i> sobre las enterobacterias anaerobias estrictas de <i>Incisitermes marginipennis</i> .	54
16	Efecto de los extractos vegetales de <i>Enterolobium cyclocarpum</i> sobre el aislado fúngico de <i>Incisitermes marginipennis</i> .	56
17	Crecimiento de la microbiota intestinal de <i>Incisitermes</i>	57

marginipennis (Latreille) en presencia de cuatro diferentes tratamientos.

18	Termitas de madera seca <i>Incisitermes marginipennis</i> (Latreille) en ensayos de alimentación forzada.	58
19	Microbiota Intestinal de <i>Incisitermes marginipennis</i> (Latreille)	59
20	Efecto del extracto acuoso de <i>E. cyclocarpum</i> sobre la actividad celulolítica intestinal de la termita <i>I. marginipennis</i>	63

INDICE DE CUADROS.

Cuadro	Título	Pagina
1	Clasificación de los tóxicos.	6
2	Ejemplos de plantas con propiedades insecticidas, el principio activo(s), uso y modo de acción.	10
3	Insecticidas de origen natural.	13
4	Termitas de madera seca del género <i>Incisitermes</i> encontradas en la República Mexicana y algunos de sus microorganismos intestinales identificados.	20
5	Toxicidad y efectividad de compuestos químicos contra degradadores de madera seca.	21
6	Estrategia Experimental	28
7	Material, reactivos y equipo utilizado en este estudio.	29
8	Microorganismos, insectos y plantas utilizadas en el presente estudio.	30
9	Especificación de las diluciones para realizar las lecturas en el espectrofotómetro.	31
10	Tratamientos del ensayo de alimentación forzada.	40
11	Distribución de los reactivos para la determinación de β -glucosidasa.	43
12	Distribución de los reactivos para la determinación de endocelulasas.	44
13	Estudio bacterioscópico de los organismos aislados de intestino de la termita <i>Incisitermes marginipennis</i> (Latreille).	49
14	Efecto tóxico de los extractos de <i>Enterolobium cyclocarpum</i> (Jacq) Griseb sobre los aislados microbianos anaerobios facultativos de <i>Incisitermes marginipennis</i> (Latreille).	51
15	Efecto tóxico de los extractos de <i>Enterolobium cyclocarpum</i> (Jacq) Griseb sobre los aislados bacterianos intestinales anaerobios estrictos de <i>Incisitermes marginipennis</i> (Latreille).	53
16	Efecto tóxico de los extractos de <i>Enterolobium cyclocarpum</i> (Jacq) Griseb sobre el aislado fúngico de <i>Incisitermes marginipennis</i> (Latreille).	55
17	Comparación entre el contenido intestinal de <i>I. marginipennis</i> (Latreille) en los diferentes tratamientos a los que fueron expuestas.	60
18	Análisis fitoquímico de <i>Enterolobium cyclocarpum</i> (Jacq) Griseb.	64

RESUMEN

Se determinó el efecto antimicrobiano del extracto acuoso de duramen *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq) Griseb sobre bacterias de interés clínico, las bacterias utilizadas en el estudio son causantes de infecciones intrahospitalarias. Los resultados obtenidos muestran que siete de las trece bacterias utilizadas presentaron un efecto bacteriostático en presencia del extracto acuoso.

Se realizaron ensayos *in vitro* e *in situ* utilizando el contenido intestinal de la termita de madera seca *Incisitermes marginipennis* (Latreille) sobre los cuales se determinó el efecto tóxico del extracto acuoso del duramen de *E. cyclocarpum*.

El contenido intestinal de la termita fue cultivado en placas de Agar Mueller Hinton, Agar Sabouraud y Agar Base Sangre, en condiciones de anaerobiosis y aerobiosis, en todos los medios se obtuvo crecimiento bacteriano. Se obtuvieron por primera vez ocho aislados bacterianos intestinales de la termita de madera seca *I. marginipennis*. Cinco de los aislados bacterianos presentan un efecto bacteriostático en presencia del extracto acuoso, dos de ellos presentan un efecto bactericida con el extracto acuoso y tres presentan un efecto bacteriostático con el extracto etanólico.

En la determinación del efecto tóxico *in situ* de la termita de madera seca, se realizaron ensayos de alimentación forzada y el contenido intestinal de la termita fue observado en una primera prueba al microscopio a objetivo de inmersión y se clasificaron y contabilizaron las formas encontradas. Nosotros encontramos formas circulares y espiroquetas y al realizar el análisis estadístico no encontramos diferencias significativas entre los tratamientos.

En una segunda prueba se cultivó el contenido intestinal sobre placas de Agar Mueller Hinton con ayuda de una asa calibrada (0.001ml) y se incubaron las placas a temperatura ambiente por 24 h. Los resultados obtenidos nos indicaron que las bacterias expuestas al extracto acuoso tuvieron un crecimiento cercano al comportamiento de las termitas en ayuno. Un último ensayo consistió en determinar la actividad enzimática de dos de las tres enzimas que conforman la actividad celulolítica de la termita, puesto que la termita de madera seca *I. marginipennis* se alimenta exclusivamente de madera, quisimos observar si este parámetro se encontraba afectado por el extracto acuoso de *E. cyclocarpum*. Encontramos que la actividad celulolítica no se afectó en ninguno de los indicadores evaluados (β - glucosidasa y la Endocelulasa).

Se realizó una búsqueda bibliográfica para tratar de encontrar al compuesto responsable del efecto encontrado en los ensayos realizados, encontramos que Raya y col., 2007 reportaron al Pinitol como el compuesto mayoritario encontrado en el extracto acuoso, un ciclitol que tiene propiedades promotoras del crecimiento microbiano, por lo que nosotros suponemos que el o los responsables del efecto antitermita encontrado sean los compuestos minoritarios.

Estudios anteriores de Raya y col., 2006, observaron que las termitas que se encontraban en el extracto ingerían alimento en una primera etapa pero posteriormente dejaban de hacerlo, esto lo observamos nosotros también al realizar el experimento.

De acuerdo a los resultados obtenidos concluimos que el extracto acuoso de *E. cyclocarpum* tiene un efecto disuasivo-antialimentario sobre la termita de madera seca *I. marginipennis*.

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas han sido utilizadas desde los inicios de la humanidad, para mejorar su salud y medio ambiente, son una fuente inagotable de principios activos, los cuales son utilizados para el desarrollo de nuevos fármacos y controladores de plagas nocivas, en una planta existen tanto efectos benéficos para la salud, como un efecto tóxico aprovechable para el desarrollo de controladores de plagas nocivas como los barrenadores de madera seca.

La resistencia natural de la madera contra organismos xilófagos, es solo un ejemplo que demuestra la incuestionable necesidad que existe para encontrar y diseñar nuevos insecticidas o fungicidas naturales, que tengan baja persistencia en el medio ambiente, que sean específicos contra ciertos organismos, de reducida o nula toxicidad en mamíferos y que permita la conservación de organismos benéficos.

Las termitas son importantes en el reciclaje de materiales muertos de madera y contribuyen a la formación del suelo. Sin embargo las termitas son consideradas una plaga principal en edificios de madera, muebles y plásticos. También ocasionan daños a la madera y productos de madera, plantas forestales y cultivos agrícolas.

El control de las termitas se ha hecho por impregnación de la madera con sales metálicas, de boro y derivados fenólicos sintéticos, los cuales han causado daño al hombre, al medio ambiente y ha seleccionado insectos resistentes.

Por lo que una alternativa que merece mayor atención para desplazar los efectos antitermita convencionales, es la posibilidad de utilizar extractos naturales, elaborados principalmente de madera de duramen de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq) Griseb la cual ha demostrado tener una gran efectividad contra el ataque de termitas de madera seca *Incisitermes marginipennis* (Latreille) Isóptera:Kalotermitidae, debido a que presenta compuestos con potencialidad biocida.

El contenido microbiano intestinal de la termita es un ambiente fisiológico que puede ser blanco para sustancias antitermita de madera seca. En estudios anteriores se ha observado que el extracto acuoso de *E. cyclocarpum* tiene un efecto tóxico sobre la termita *Incisitermes marginipennis*, pero el nivel fisiológico en el cual se ejerce su efecto se desconoce. En el presente estudio se demuestra el

comportamiento que tiene el extracto de *E. cyclocarpum* (Jacq) Griseb sobre la microbiota intestinal de *I. marginipennis* (Latreille).

Se han hecho estudios con extracto acuoso del duramen de *E. cyclocarpum*, sometido al ataque de termitas de madera seca *I. marginipennis* en ensayos de alimentación forzada, se ha sospechado sin llegar a probarlo que tiene propiedades antialimentarias (Raya *et al.*, 2005). El extracto acuoso de *E. cyclocarpum* es una alternativa que tiene posibilidad de uso contra organismos xilófagos que atacan a la madera seca, el cual ha demostrado actividad contra el ataque de termitas de madera seca *I. marginipennis* y contra *Lyctus spp* debido a que presenta compuestos con potencial biocida (Raya *et al.*, 2006). Sin embargo se carecen de reportes publicados sobre el efecto de *E. cyclocarpum* sobre la microbiota intestinal de termitas de madera seca *I. marginipennis* (Latreille)

II. ANTECEDENTES

La búsqueda de remedios para aliviar la salud, protegerse de las plagas nocivas y mejorar el medio ambiente está presente en el hombre desde sus orígenes, junto con el instinto de alimentarse y de sobrevivir. Puede decirse entonces que la farmacología es tan vieja como el ser humano, ya que éste, mediante la observación en los animales, y a la casualidad, muchas veces supo de plantas o sustancias de origen animal e incluso mineral que aliviaban su malestar. Estos pequeños y primitivos conocimientos básicos pasaban de generación en generación de manera verbal y escrita.

Así, se tienen pruebas de que hace 35,000 años el hombre ya cultivaba plantas como la manzanilla y la valeriana con fines curativos.

La civilización china es la primera en constatar determinados tratamientos. En el 5,000 A.C. se conocían las propiedades beneficiosas de las infusiones de diferentes plantas medicinales, en la actualidad se ha confirmado que la presencia de la soja en la alimentación china no es en vano: hace milenios que utilizan un extracto de soja fermentada que puede considerarse como precursor del antibiótico.

Es bien conocido el hecho de que los egipcios lograron grandes avances en áreas como la fisiología, la patología y la cirugía, fundamentalmente por el arte de embalsamar a sus muertos. Su saber también se extendió para favorecer el bienestar de los vivos. Muchas de sus drogas de origen vegetal o animal siguen vigentes en la actualidad. Entre los documentos de historia farmacológica más importantes se encuentra el *Papiro de Ebers*, donde dejaron constatados en jeroglíficos estos conocimientos.

Pero fueron los griegos los que realmente aportaron grandes avances a una ciencia que aún no estaba dissociada de la medicina. Hipócrates fue quien asentó la base ética de la medicina y fue un gran conocedor tanto de la teoría médica como de su práctica, a través de sus estudios sobre las plantas medicinales.

En el imperio romano destaca el médico Pedacio Dioscórides y fundamentalmente su obra "*De Materia Medica*", donde estudió sustancias tanto de origen vegetal como animal y mineral. Es un tratado en el que se recogen 600 plantas medicinales, con descripción de sus virtudes y su forma de administrar con fines curativos

Durante la Edad Media todo el saber recopilado hasta entonces se estancó en un oscurantismo generalizado, donde sólo cónclaves concretos como las instituciones religiosas se encargaban de mantener y transcribir los conocimientos de épocas pasadas, la mayoría de las veces bajo rigurosa censura.

Los árabes, en cambio, se ocuparon no sólo por hacer recopilación de todo lo conquistado por el estudio del hombre en el pasado, sino que además siguieron aportando y desarrollando conocimientos en las varias ciencias en las que por entonces se clasificaba el saber. Crearon las boticas e incluso una escuela de farmacia. Entre los médicos más famosos del mundo islámico están Avicena. Otro árabe hispano, Ibn Al Baitar, escribió un tratado en el que se describían aproximadamente 1,500 sustancias bajo criterios médicos: empleo, usos, dosis e incluso reacciones adversas.

Ya en el siglo XVI otro gran hombre vino a enriquecer la ciencia de la farmacología, el filósofo suizo Paracelso, basándose en su experiencia e investigación descubrió las propiedades de numerosas sustancias, aplicándolas a la terapia de varias enfermedades. Él buscaba lo que denominó "la quinta esencia" y que bien podría entenderse en términos farmacológicos como el "principio activo" de un medicamento.

Durante los siglos XVIII y XIX el mundo sufrió numerosos y revolucionarios cambios sociales, políticos e ideológicos. El farmacéutico alemán Sertürner, en 1803, es el primero en aislar un principio activo, la morfina, de una planta medicinal, el opio. Este hallazgo fue el catalizador para posteriores descubrimientos de lo que ya sería la Farmacología Moderna.

Con frecuencia se utilizan los nombres de tóxicos y veneno, denominando como **veneno** a aquellas sustancias que ha sido suministrada con fines lesivos premeditados y dejando el nombre de **tóxico** a la sustancia que aunque pueda ocasionar daño no se suministra con esta intención. Normalmente veneno es concebido como aquello que tiene naturaleza intrínsecamente peligrosa aun en pequeñas dosis, tales como el cianuro, el arsénico, plomo, etc. y tóxico (del latín *toxicum* y del griego *toxikón*) a aquello que puede ocasionar daño pero no por la naturaleza misma de la sustancia, ejemplo de ello sería el agua, oxígeno, etc. Los tóxicos por su origen se pueden clasificar en: minerales, botánicos, de origen animal y mineral (Cuadro 1).

"Toxicología es el estudio científico de estos elementos, su comportamiento, su metabolismo, sus mecanismos de acción, las lesiones que ellos ocasionan, su forma de acumulación, excreción y el tratamiento adecuado para proteger el organismo afectado".

Cuadro 1. Clasificación de los tóxicos.

CLASIFICACION DE LOS TOXICOS	
POR SU ORIGEN	MINERALES
	BOTANICOS
	ORIGEN ANIMAL
	ORIGEN SINTETICO
POR EL ORGANO BLANCO	HEPATOTÓXICO
	NEFROTOTOXICO
	HEMATOTOXICO

2.1 Variabilidad Biológica.

Se refiere al hecho de que no todos los individuos reaccionan del mismo modo ante la misma droga, por lo tanto, una curva dosis-respuesta de un individuo sólo puede aplicarse al mismo.

Respecto a este parámetro, cabe destacar los términos siguientes:

Hipo e Hiperreactividad

Se refieren a la dificultad o facilidad (mayores o menores dosis requeridas) para el logro del efecto deseado.

Tolerancia:

Requerimiento ulterior de mayores dosis para lograr un efecto que antes se lograba con dosis menores.

Idiosincracia:

Efectos inusuales de la droga, dados en un pequeño porcentaje de la población.

Un ejemplo de sustancia tóxica y veneno a la vez lo encontramos en las sustancias que controlan el crecimiento y el daño causado por insectos. Los insecticidas son agentes de origen químico o biológico que controlan la población de insectos. El control puede resultar de matar el insecto o de alguna manera impedir que tenga un comportamiento considerado como destructivo.

Los insecticidas pueden ser naturales o hechos por humanos y son aplicados a las especies objetivo en multitud de formulaciones y sistemas de aplicación (aspersiones, cebos, difusión de liberación lenta, etc.).

En años recientes, la ciencia de la biotecnología inclusive ha incorporado códigos para genes bacteriales de proteínas insecticidas en varias plantas de cultivo que causan la muerte a insectos que sin sospecharlo se alimentan de ellas.

Los productos sintéticos destinados a controlar plagas han tenido un rol muy marcado en el incremento de la producción agrícola, protección de objetos de madera de importancia económica y en el inadecuado control de plagas dañinas a la salud humana.

El uso continuo e indiscriminado de estas sustancias, no sólo ha causado enfermedades (Waterhouse, 1996) y muertes por envenenamiento a corto y largo plazo, sino también ha afectado al medio ambiente, acumulándose en los distintos eslabones de la cadena alimenticia, en el suelo y en el agua.

Son responsables además de la resistencia (Bourguet, 2000) a insecticidas por parte de los insectos, sin restar importancia a la destrucción de parásitos, predadores naturales y polinizadores, entre los otros tantos integrantes del ecosistema (Freemark, 1995), que han visto alterado su ciclo de vida a causa de estos productos.

2.2 Las plantas en el efecto farmacológico y biocida.

Las plantas han sido una rica fuente para la obtención de moléculas que son exploradas terapéuticamente. Muchas sustancias aisladas de plantas siguen siendo fuentes de medicamentos y controladores de plagas, por ejemplo, los glicósidos cardiotónicos obtenidos de la *Digitalis purpurea*, usados para insuficiencia cardíaca, pero si no es usada a la dosis adecuada tiene efectos extremadamente peligrosos para la salud.

Las plantas tienen efectos farmacológicos aprovechables, un efecto benéfico para la salud, y un efecto tóxico para la salud pero potencialmente aprovechable para el control de insectos y plagas nocivas, que son difíciles de eliminar por los métodos convencionales o que las sustancias utilizadas para su adecuado control tienen un impacto negativo para el medio ambiente y la salud humana.

Con este enfoque se han obtenido inicialmente productos naturales provenientes de una gran variedad de plantas de los cuales se observó que pueden actuar inhibiendo, repeliendo, disuadiendo o eliminando insectos y plagas de distinto tipo (rastreros, voladores, chupadores, desfoliadores, etc.). Algunas de estas plantas han sido estudiadas científicamente y otras siguen vigentes por leyenda popular (Sánchez, 2002; Stoll, 1989)

Las plantas, en conjunto, producen más de 100,000 sustancias de bajo peso molecular conocidas también como metabolitos secundarios. Estos son, normalmente no-esenciales para el proceso metabólico básico de la planta.

Entre ellos se encuentran terpenos, lignanas, alcaloides, azúcares, esteroides, ácidos grasos, etc.

Semejante diversidad química es consecuencia del proceso evolutivo que ha llevado a la selección de especies con mejores defensas contra el ataque microbiano o la predación de insectos y animales (Dixon, 2001).

Por lo tanto en los últimos años se está retornando al uso de las plantas como fuente de pesticidas más seguros para el medio ambiente y la salud humana (Ottaway, 2001; Mansaray, 2000).

Los pesticidas pueden ser clasificados de acuerdo con el tipo de organismo frente a los cuales son eficaces: *funguicidas*, *herbicidas*, *insecticidas*, *moluscicidas*, *nematicidas*, *rodenticidas* (Evans, 1991).

Sin lugar a dudas los insecticidas naturales a partir de extractos vegetales constituyen una muy interesante alternativa de control de insectos además de que sólo se han evaluado muy pocas plantas en relación a la fuente natural que ofrece el

planeta, por lo que las perspectivas futuras en cuanto a investigación, son aun mayores.

Graige & Ahmed (2000) señalan que más de dos mil especies botánicas poseen propiedades que permiten su empleo como plaguicidas naturales en la agricultura.

Muchos metabolitos son característicos de un género y hasta de una sola especie, por lo cual es posible que aún numerosos compuestos potenciales útiles sean desconocidos hasta la fecha.

Dentro de las especies vegetales de uso reconocido en el control de plagas nocivas se encuentran ejemplificadas en el (Cuadro 2).

2.3 Control de plagas.

Las sustancias utilizadas para el control de plagas tienen estructuras químicas diversas con diferentes mecanismos de acción, que aniquilan al organismo blanco o pueden afectar su crecimiento, ser desagradables al gusto, al olfato o la vista, por ejemplo son de gran utilidad en la área de la protección y cuidado de la madera y subproductos, contra bacterias, hongos, insectos y condiciones ambientales.

Sin embargo, al paso de algunos años de uso y abuso se han hecho evidentes los efectos indeseables de los plaguicidas sobre la salud del ser humano y sobre el medio ambiente. Independientemente de sus beneficios, es evidente que los plaguicidas son sustancias químicas y biológicas deliberadamente tóxicas, creadas para interferir algún sistema biológico en particular y que carecen de selectividad real. Afectan simultáneamente, en mayor o menor grado, tanto a la «especie blanco» como a otras categorías de seres vivos.

Cuadro No. 2. Ejemplos de plantas con propiedades insecticidas, el principio activo, uso y modo de acción.

Especie	Nombre	Principio activo	Familia química	Uso	Modo de acción
<i>Anabasis aphylla</i>		Anabasina o neonicotina ²	Chenopodiaceae	Insecticida de contacto no persistente	Causa parálisis muscular
<i>Artemisia annua</i>	Ajenjo dulce	Artemisina ⁴	Aceites esenciales	Insecticida y antialimentario	
<i>Azadirachta indica</i>	Neem	Azadirachtina ³	Triterpenoide	Antialimentario, regulador del crecimiento, inhibidor de la ovoposición y esterilizante	
<i>Chrysanthemum cinaerifolium</i>	Piretro	Ac. Crisantemico, Ac. Pirétrico, Piretronolona, Cinerolona y Jasmonolona ¹	Piretrinas	Insecticida de contacto	Inhibidores del transporte membranal de iones de las membranas neuronales
<i>Derris elliptica</i>	Derris	Rotenona ¹	Flavonoide	Insecticida de contacto, ingestión y repelente	Inhibidor del transporte de electrones y fosforilación a nivel sustrato
<i>Lonchocarpus utilis</i>		Rotenona ¹	Flavonoide	Insecticida de contacto, ingestión y repelente	Inhibidor del transporte de electrones y fosforilación a nivel sustrato
<i>Melia azedarach</i>	Paraíso	Meliartenina ¹	Limonoide	Insecticida, antialimentario	Efecto antialimentario y toxicidad digestiva
<i>Nicotiana tabacum</i>	Tabaco	Nicotina ²	Alcaloide	Insecticida de contacto no persistente	Inhibidor de los receptores acertilcolinérgicos, provoca convulsiones
<i>Polygonum hydropiper</i>	_____	Poliglodial ⁵	Sesquiterpeno		Inhibidor de la alimentación
<i>Riania speciosa</i>	_____	Rianodina ²	Alcaloide	Insecticida de contacto e ingestión	Causa parálisis muscular
<i>Schoenocaulon officinale</i>	_____	Cebadilla ²	Alcaloide	Insecticida	

¹Silva y col., 2002, ²Duke, 1990, ³Heiden, 1991, ⁴ Rao, 1999, Tripathi, 2000, 2001, ⁵ Menjivar, 2001.

En los últimos diez años nace un interés renovado en muchos países, para desarrollar medidas alternativas de control, entre ellas el uso de extractos provenientes de plantas y árboles con propiedades insecticidas.

Los historiadores han seguido el uso de pesticidas hasta la época de Homero, alrededor de 1,000 años A.C., pero los primeros registros de insecticidas corresponden a la quema de azufre como fumigante. Plinio el Viejo (A.D. 23-79) registró la mayoría de los primeros usos de insecticidas en su *Historia Natural*. Entre ellos incluyó el uso de una agalla de una lagartija verde para proteger las manzanas de gusanos y pudriciones. Más tarde, encontramos una cantidad de materiales usados con resultados cuestionables: extractos de pimiento y tabaco, agua jabonosa, aguacal, vinagre, trementina, aceite de pescado, salmuera y lejía entre otras.

Al comienzo de la II Guerra Mundial (1940), la selección de insecticidas se limitaba a varios arsenicales, aceites de petróleo, nicotina, piretro, rotenona, azufre, gas de cianuro de hidrógeno y criolita.

Podemos imaginar que entre los primeros intentos usados por nuestros primitivos antepasados para reducir las molestias causadas por los insectos estuvieron: hacer hogueras que produjeran humo o aplicar barro o polvo sobre su piel para repeler los insectos que los picaban o les causaban irritación, una práctica parecida a los hábitos de los elefantes, cerdos y búfalos de agua. Hoy, tales prácticas se clasificarían como *repelentes*, una categoría de los *insecticidas*.

Numerosos químicos se producen naturalmente y funcionan en algún grado como insecticidas. Están presentes en la mayoría de los organismos vivos, desde las algas azul-verdes, hongos y las angiospermas.

Los compuestos son tan variados como las plantas de las cuales han sido aislados y el efecto protector va desde repelencia, disuasión de la alimentación y oviposición hasta toxicidad aguda e interferencia con el crecimiento y el desarrollo de los insectos.

Los insecticidas vegetales presentan la gran ventaja de ser compatibles con otras opciones de bajo riesgo aceptables en el control de insectos, tales como feromonas, aceites, jabones, hongos entomopatógenos, depredadores y parasitoides, entre otros. Lo que aumenta enormemente sus posibilidades de integración a un programa de Manejo Integrado de Plagas.

La actividad biológica de un compuesto natural está en función de su estructura y en la dosis usada para tales fines. Los principales compuestos aislados de plantas están indicados en el Cuadro 3.

Existen plagas nocivas difíciles de controlar entre ellas se encuentran los barrenadores de madera, los cuales causan grandes pérdidas materiales ya que se alimentan de objetos de madera de impacto económico importante para el hombre, causan estragos a nivel agrícola.

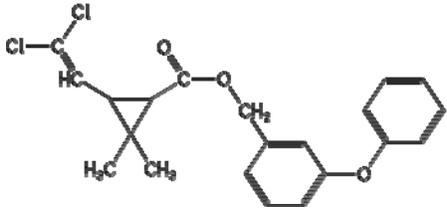
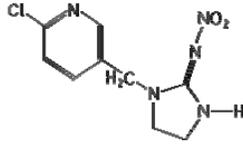
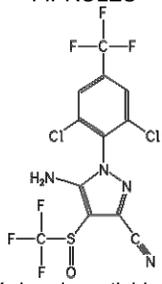
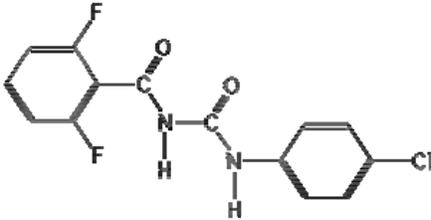
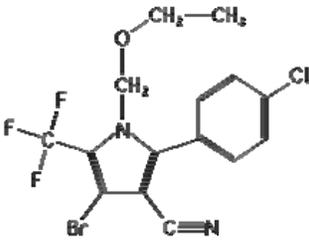
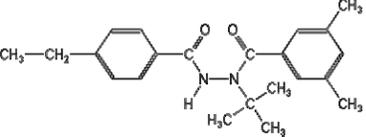
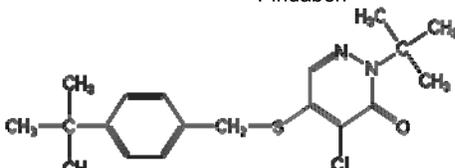
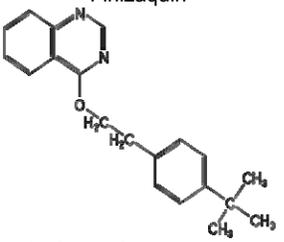
2.4 Termitas de madera seca.

Las termitas (Insecta, Isoptera) son, conjuntamente con los Himenópteros (hormigas y abejas), el único grupo de insectos que presentan una organización social en sus comunidades. Esta organización social determina que las termitas presenten una biología compleja y fascinante.

La estructura social de sus comunidades conjuntamente con el hábitat (madera) sin una elevada competencia y críptico, que ocupan y explota algunos recursos hace posible que este grupo de insectos presente un elevado potencial biológico, ecológico y económico.

La celulosa es el componente principal en la dieta de las termitas, la que a su vez es un elemento extensamente utilizado y de gran valor económico en las viviendas. El hallazgo de una infestación de termitas en un edificio o vivienda es destructivo y a lo menos perturbador, razón por la cual es suficiente para mantenerlas fuera de estructuras y edificaciones.

Cuadro 3. Insecticidas de origen natural.

<p style="text-align: center;">PIRETROIDES</p>  <p>Son estables en presencia de luz solar y generalmente son efectivos contra la mayoría de los insectos plagas de la agricultura y se usan a dosis muy bajas de 0.01 a 0.1 kilogramos por hectárea.</p> <p>Los piretroides han tenido una evolución interesante, que ha sido dividida convenientemente en cuatro generaciones.</p>	<p style="text-align: center;">NICOTINOIDES</p>  <p>Los nicotinoides son una de las más nuevas clases de insecticidas con un nuevo modo de acción. anteriormente se los ha denominado <i>nitro-quantidinas</i>, <i>neonicotinilos</i>, <i>neonicotinoides</i>, <i>cloronicotinas</i>, y más recientemente como <i>cloronicotinilos</i>. el imidacloprid fue introducido en europa y japon en 1990, y fue registrado por primera vez en la eeuu en 1992.</p>	<p style="text-align: center;">FIPROLES</p>  <p>Fipronil es el único insecticida de esta nueva clase, y fue introducido en 1990 y registrado en los eeuu en 1996. es un material sistémico con actividad de contacto y estomacal. fipronil se usa para el control de muchos insectos foliares y del suelo, (por ejemplo, el gusano de las raíces del maíz, el escarabajo de las papas de colorado, y el picudo acuático del arroz) en diversos cultivos, principalmente maíz, prados, y para control de insectos de salud pública.</p>
<p style="text-align: center;">Diflubenzurón</p>  <p>Las benzoiúreas fueron introducidas en 1978 por Bayer de Alemania, y triflumurón (Alsystin®) fue el primero. Las benzoiúreas son una clase de insecticidas enteramente diferente que funciona como regulador del crecimiento de los insectos (RCIs). En lugar de ser un veneno típico que ataca el sistema nervioso de los insectos, interfieren con la síntesis de la quitina y entran al insecto más por ingestión que por contacto. Su máximo valor está en el control de orugas y larvas de escarabajos.</p>	<p style="text-align: center;">Pirroles</p>  <p>Clorfenapir es el primero y único miembro de este grupo químico único, que es un insecticida y acaricida tanto de contacto como estomacal.</p>	<p style="text-align: center;">Pirazoles</p>  <p>Los pirazoles originales fueron tebufenpirad y fenpiroximato (no ilustrados). Éstos fueron designados principalmente como acaricidas de contacto y estomacales no sistémicos, pero tienen una efectividad limitada en psylla, áfidos, mosca blanca, y thrips.</p>
<p style="text-align: center;">PIRIDAZINONAS</p> <p style="text-align: center;">Piridabén</p>  <p>Piridabén es el único miembro de esta clase. Es un insecticida y acaricida selectivo de contacto, también es efectivo contra thrips, áfidos, moscas blancas y saltahojas. Está registrado para frutales pomáceos, almendros, cítricos, ornamentales y ornamentales de invernadero. Piridabén ofrece un control residual excepcionalmente largo y acción inmediata en un amplio rango de temperaturas.</p>		<p style="text-align: center;">QUINAZOLINAS</p> <p style="text-align: center;">Finizaquin</p>  <p>Es un acaricida de contacto y estomacal. Tiene actividad ovicida, acción inmediata, y controla todos los estados de los ácaros. Aún no está registrado en los EEUU, y se usa en algodón, frutales pomáceos y de hueso, cítricos, uvas y ornamentales.</p>

El daño económico que causan las termitas sobrepasa los dos billones de dólares anuales en Estados Unidos (Wiseman y Eggleton, 1994)

Las termitas afectan cinco veces más casas que los incendios y provocan un daño económico mayor que los tornados, huracanes y tormentas en conjunto, al dañar guardapolvos, pisos, muebles, marcos, puertas, ventanas, vigas, pilares estructurales y decorativos, alfombras, papel mural, libros, ropa, polietileno expandido, yeso y pinturas.

En Francia el daño más el costo de control alcanza los 325 millones de dólares al año (Clement, 2000). El costo promedio asciende a 4,700 dólares por tratamiento de 100 m² de construcción.

En Australia el daño alcanza entre los 40 y 50 millones de dólares, un país de tan solo 18 millones de habitantes. (Wiseman y Eggleton, 1994) En nuestro país cálculos efectuados indican que el daño por la termita alcanza a los 28.5 millones de dólares solo en la Región Metropolitana. (Wiseman y Eggleton, 1994)

Las características más importantes de las termitas de madera seca, es que sus colonias permanecen durante toda la vida en las estructuras de la madera y no tienen contacto con el suelo.

2.4.1 Biología de las termitas.

Las termitas que se alimentan de la madera y dependen de microorganismos que viven en su aparato digestivo pertenecen a las llamadas termitas “inferiores”. El resto de termitas, que son la mayoría, se consideran “superiores” porque han desarrollado otras estrategias para la obtención de alimentos y aparentemente han prescindido de sus simbiontes internos. Las cuales ya no se alimentan únicamente de celulosa sino de una variada dieta que incluye hojas, fruta fresca, fruta seca, y bacterias del suelo, pese a que carecen de simbiontes bacterianos; también se nutren de productos a base de lignina y celulosa, los principales componentes de la madera. Estas termitas se alimentan de hongos que ellas mismas cultivan, los cuales

contienen nitrógeno, carbono y otros nutrientes, el hongo contiene enzimas que permiten a la termita superior digerir la madera.

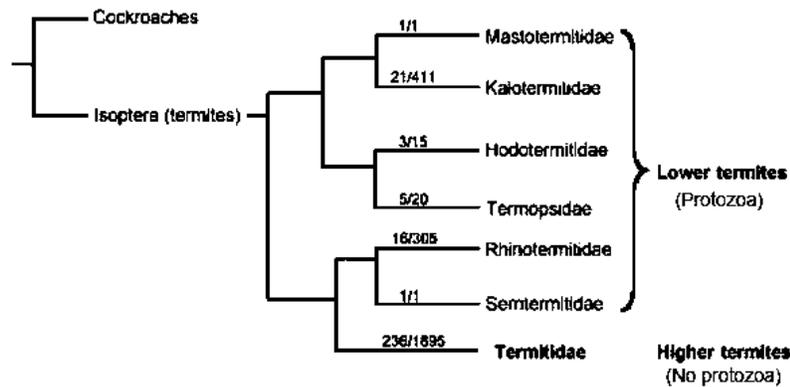


Figura 1. Esquema filogenético de las termitas Abe y col., 2000.

Las comunidades de termitas viven en nidos (termiteros) constituidos por cuatro tipos morfológicos de individuos (castas); los reproductores primarios, los reproductores suplementarios, los soldados y las obreras. Una colonia de termitas está compuesta por la pareja real, algunos reproductores suplementarios, un gran número de obreras y soldados y los individuos inmaduros en diversas fases de desarrollo (ninfas). Las ninfas que emergen del huevo son equipotentes, y la casta a la que pertenecerán vendrá determinada por factores sociales y ambientales.

Los reproductores primarios, son individuos alados con el sistema reproductor completamente desarrollado, poseen una coloración más oscura que las demás castas ya que su tegumento está más endurecido. Cuando las condiciones ambientales son las adecuadas, los nuevos alados producidos abandonan el nido, formando enjambres, para dispersar y formar nuevas parejas reproductoras.

Los reproductores primarios son los responsables de la fundación de la colonia, lo que implica un complejo repertorio conductual exclusivo de esta casta. La

pareja real controla la estructura social de la comunidad, mediante feromonas que inhiben la formación de nuevos reproductores suplementarios, soldados u obreras.

Los reproductores suplementarios son individuos con alas reducidas o sin alas, con el tegumento no tan endurecido ni pigmentado como el de los reproductores primarios. Su aparición se da cuando la población de las obreras y soldados es muy alta. Se transforman en reproductores primario.

Las termitas inmaduras blancas son los más jóvenes o primeros estadios, no muestran esclerotización en el cuerpo y dependen de sus compañeras obreras que las alimentan con una dieta líquida.

Los soldados están especializados en la defensa de la colonia. Poseen la cabeza fuertemente pigmentada y esclerotizada con grandes mandíbulas. Los soldados son dependientes de las obreras para su alimentación y no poseen sistema reproductor desarrollado.

Las obreras son individuos estériles, machos o hembras, en los cuales no se ha desarrollado el aparato reproductor. Su apariencia es similar a las ninfas pero las obreras trabajan para la colonia en la alimentación y el cuidado de la descendencia y en la construcción del nido.

Expelen las heces desde las galerías, las que se acumulan en el suelo en pequeños montones. Pueden presentarse varias colonias en una viga o puerta. Atacan preferentemente en el interior de las viviendas y edificios.

Al iniciar una colonia una pareja de alados, requiere de cinco años para producir los primeros alados reproductivos. Las colonias se incrementan lentamente a partir de una pareja.

El grupo de las termitas inferiores tal como las pertenecientes al género de las *Incisitermes* no tienen un nido centralizado. Al parecer las colonias funcionan como una sociedad interrelacionada pero descentralizada. Es probable que formen unidades satélite con reproductores neoténicos junto a una fuente de alimento,

distante de la zona central de la colonia, las que luego se pueden aislar de la colonia madre. Una colonia de las *Incisitermes* puede considerarse como una red de poblaciones de varios tamaños, localizadas generalmente dentro o alrededor de fuentes de alimento, conectadas por un sistema de caminos o galerías a otros centros de actividad variable. Las termitas del género *Incisitermes* presentes en México se encuentran en el Cuadro 4.

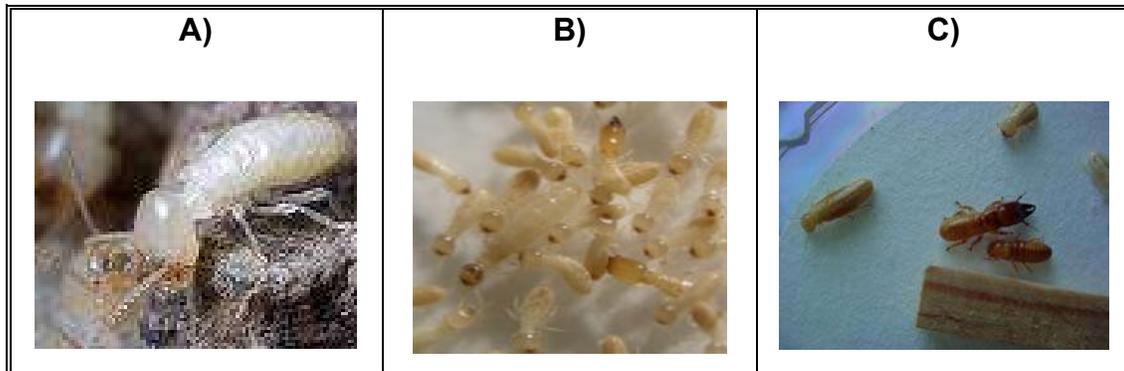


Figura 2. Estadios biológicos de *Incisitermes marginipennis* (Latreille) A) Ninfas B) Obreras, C) Soldado, Obreras.

2.4.2 Microbiota Intestinal.

Los protozoarios flagelados y otros microorganismos de las termitas inferiores viven en asociación simbiótica con estos, es decir, ninguno puede vivir en ausencia del otro. De lo contrario mueren. Esto significa que una termita desfaunada no puede sobrevivir y que los microorganismos que viven asociados con las termitas no se encuentran en ningún otro medio ambiente que no sea el líquido del tubo digestivo que les proporciona la termita.

Estudios recientes muestran, que la microbiota intestinal, en especial los protozoarios de la termita son críticos para la supervivencia de la termita así como una dieta rica en madera o celulosa (Breznak y Brune, 1994).

La población de los protozoarios, corresponden a la tercera parte del peso total de la termita. Los flagelados viven en la denominada cámara de fermentación o intestino ciego que es una bolsa o dilatación intestinal de la termita. El líquido es viscoso anaeróbico y los flagelados coexisten con bacterias y hongos.

La termita come la madera con las mandíbulas quitinizadas, ingiere las partículas y realiza una segunda trituración al nivel de la molleja. Enseguida la madera pasa al estómago o intestino medio, donde sufre la acción de enzimas proteolíticas y amilolíticas, de aquí pasa a la cámara de fermentación donde la ingieren los protozoos por su extremo corporal posterior (Figura 3)

En el jugo gástrico de las termitas, las celulasas secretadas por el protozooario y otros microorganismos ejercen su acción lítica, llevándose a cabo un proceso de fermentación anaeróbico que desdobla, la celulosa a glucosa, la que es aprovechada por los protozoarios y termitas para su nutrición, finalmente es reducida a ácido acético, anhídrido carbónico e hidrógeno (Figura 4). Tanto el ácido como la glucosa son absorbidos por la termita y le proporcionan energía.

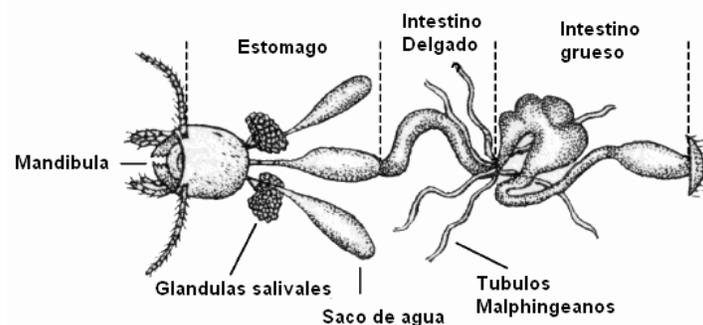


Figura 3. Anatomía del aparato digestivo de la termita de madera seca.

En general existen escasos estudios acerca de la microbiota intestinal de las termitas. Debido principalmente a la dificultad de diseñar medios específicos y condiciones de laboratorio que se asemejen a las encontradas en el intestino de la

termita. Sin embargo de algunas especies de *Incisitermes* se conoce la microbiota intestinal (Cuadro 4).

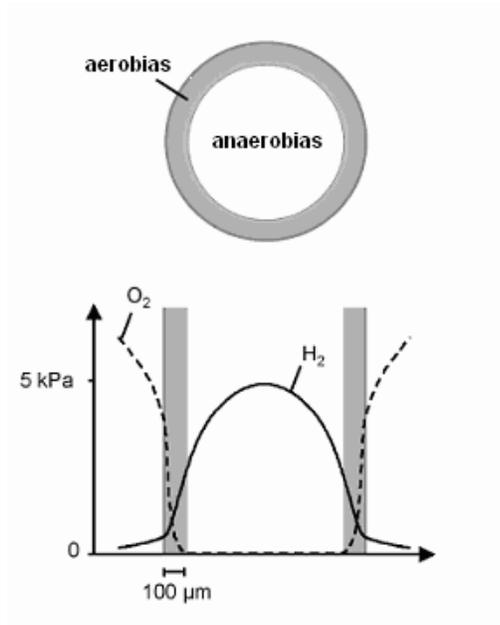


Figura 4. Esquema de oxigenación del intestino de la termita. (A) sección radial del intestino, (B) gradientes de Oxígeno e Hidrógeno en la sección radial. Modificado de Brune y Friedrich (2000)

2.4.3 Pesticidas que controlan organismos degradadores de madera seca.

Las termitas son controladas principalmente con insecticidas son formulados a base de sales metálicas, compuestos de Boro y concentrados de fenólicos sintéticos (Cuadro 5). Los cuales producen un gran impacto negativo en el medio ambiente, intoxicaciones agudas y crónicas sobre la salud humana, llegando a producir plagas resistentes, por lo que es importante contar con propuestas nuevas de insecticidas para desplazar estos insecticidas convencionales por otros amigables con el medio ambiente, selectivos sobre la plaga “ blanco”, que no dañen a otros insectos, tengan una rápida degradación y tengan una nula toxicidad sobre la salud humana.

Cuadro 4. Termitas de madera seca del género *Incisitermes* encontradas en la República Mexicana y algunos de sus microorganismos intestinales identificados.

TERMITAS DE MADERA SECA *	MICROBIOTA INTESTINAL
<i>Incisicitermes banksi</i> (Snyder)	<i>Coronynpha octonaria</i> , <i>Metacoronympha senta</i> , <i>Tricercomitus divergens</i>
<i>Incisitermes milleri</i> (Emerson)	<i>Tichonynpha chattani</i>
<i>Incisitermes minor</i> (Hagen)	<i>Metadesvescovina cuspidata</i> , <i>Monocercomonas sp.</i> , <i>Oxymonas minor</i> , <i>Staurojoenia assimilis</i> , <i>Tricercomitus divergens</i>
<i>Incisitermes nigrinus</i> (Snyder)	Sin información
<i>Incisitermes marginipennis</i> (Jacq) Griseb	Sin información
<i>Incisitermes arizonensis</i> (Snyder)	Sin información
<i>Incisitermes emersoni</i> (Light)	Sin información
<i>Incisitermes inmigrans</i> (Snyder)	<i>Coronynpha octonaria</i> , <i>Metacoronympha senta</i> , <i>Tricercomitus divergens</i>
<i>Incisitermes platycephalus</i> (Ligth)	Sin información
<i>Incisitermes schwarzi</i> (Banks)	<i>Trichonynpha chattani</i>
<i>Incisitermes seeversi</i> (Snyder y Emerson)	Sin información
<i>Incisitermes snyder</i> (Ligth)	Sin información

* Otras especies del género *Incisitermes*. Ver anexo 1. (Yamin, 1979)

Cuadro 5. Toxicidad y efectividad de compuestos químicos contra degradadores de madera seca

PRESERVADOR	TERMITAS	ESCARABAJOS	TALADRADORES MARINOS	TOXICIDAD AL SER HUMANO
Creosota	+	+	+	MT
Penta clorofenol	+	+	-	AT
Naftanato de cobre	-	-	-	LT
Quinolinolanato 8 de cobre	-	-	-	LT
Oxido de terbutil de estaño	+	+	+	MT
Sales ACC	+	+	-	LT
Sales CCA	+	+	-	ND
Sales ACA	+	-	-	MT
Sales CZC	-	-	-	ND
Sales FCAP	-	-	-	AT
Compuestos de boro	+	-	-	LT

Anónimo, 1994b

AT= Altamente tóxico, MT= Moderadamente tóxico, LT= Ligeramente tóxico, ND = No determinada. OMS.

2.5 Parota, Caro-Caro, Guanacastle, Nacaste, Cascabel, Orejón, Chorejas (*Enterolobium cyclocarpum*) (Jacq) Griseb (1860).

Se han hecho estudios con extracto acuoso del duramen de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb, en papel filtro sometido al ataque de termitas de madera seca *Incisitermes marginipennis* (Latreille) y se detectató que tiene un efecto antitermita (Raya y col., 2005). El extracto acuoso de *E. cyclocarpum* es una alternativa que tiene posibilidad de uso contra organismos xilófagos que atacan a la madera seca, el cual ha protegido a la madera seca de encino de *Lyctus spp* debido

a que presenta compuestos con potencial como biocidas (Raya y col., 2006). Este árbol es grande y llamativo, caducifolio, de 20 a 30 m de altura, con un diámetro a la altura del pecho de hasta 3 m. Su copa es hemisférica y su follaje es abundante, presenta hojas bipinnadas con 4 a 5 pares de pinnas opuestas, miden de 15 a 30 cm de largo; foliolos numerosos (15-30 pares por pinna) de color verde brillante que se pliegan durante la noche.

Su tronco es derecho y a veces con pequeños contrafuertes en la base, sus ramas son ascendentes, su corteza es de lisa a granulosa en ocasiones ligeramente fisurada, gris parda a gris pardusca, con abundantes lenticelas alargadas, suberificadas, dispuestas longitudinalmente, su corteza interna es de color crema rosado, granulosa con exudado pegajoso y dulzón. Grosor de 2-3 cm. Sus flores en pequeñas cabezuelas pedunculadas axilares de 1.5 a 2 cm de diámetro, sobre pedúnculos de 1.5 a 3.5 cm de largo. Flores actinomorfas, cáliz verde y tubular, corola verde clara de 5 a 6 mm de largo. Su fruto es característico de la especie. Consistente en un vaina circular indehiscente, de 7 a 15 cm de diámetro, aplanada y enroscada, leñosa, moreno oscura, brillante de sabor dulce. Contiene de 5 a 10 semillas.

Las semillas son grandes, ovoides y aplanadas, de 2.3 por 1.5 cm, morenas y brillantes con una línea pálida con la forma del contorno de la semilla, rodeadas por una pulpa esponjosa y fibrosa de olor y sabor dulce. Presenta una testa extremadamente dura que impide la germinación hasta que una modificación estructural permita la hidratación del embrión (Figura 5).

Se encuentra ampliamente distribuida en la vertiente del golfo desde el sur de Tamaulipas hasta la península de Yucatán y en la vertiente del Pacífico desde Sinaloa hasta Chiapas (Figura 5).

La Parota es una especie dominante en todas las asociaciones en las que se encuentra. Es el árbol más grande en los bosques tropicales caducifolios y semi-caducifolios.

2.5.1. Ubicación Taxonómica de *Enterolobium cyclocarpum*:

Nombre botánico: *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq). Griseb.

Orden: Fabales.

Familia: Mimosaceae.

Género: *Enterolobium*

Especie: *E. cyclocarpum*.

Este árbol tiene un efecto restaurador en terrenos degradados, controlando la erosión, fijando nitrógeno, presenta además un efecto ornamental por sus enormes copas y hermoso follaje, es una especie maderable de gran valor artesanal por su dureza y resistencia al daño por las termitas, los frutos maduros contienen un jugo gomo-resinoso que mezclado con la pulpa del mismo previamente macerada sirve para fabricar aglomerados del carbón, la leña obtenida de este árbol, tiene un poder calórico de 18,556 kj/kg , lo que la ubica como una especie recomendada como fuente energética.

Las semillas son ricas en proteínas (32-41%), contienen hierro, calcio, fósforo y 234 mg de ácido ascórbico. El tanino obtenido de su corteza, semilla y fruto es excelente para curtir pieles. Es excelente como forraje para el alimento del ganado. Su madera aserrada, lambrín, chapa y triplay es utilizada en la fabricación de canoas, paneles, ruedas, carpintería y ebanistería, Muebles y acabados de interiores. La corteza se utiliza en infusiones o en vainas para curar el salpullido, teniendo efecto depurativo; la goma que exuda el tronco (goma de caro) es empleada como remedio para la bronquitis y el resfriado. Los frutos verdes son astringentes y se utilizan en caso de diarrea. La pulpa de las vainas verdes se usa como sustituto del jabón para lavar ropa ya que contiene saponinas.

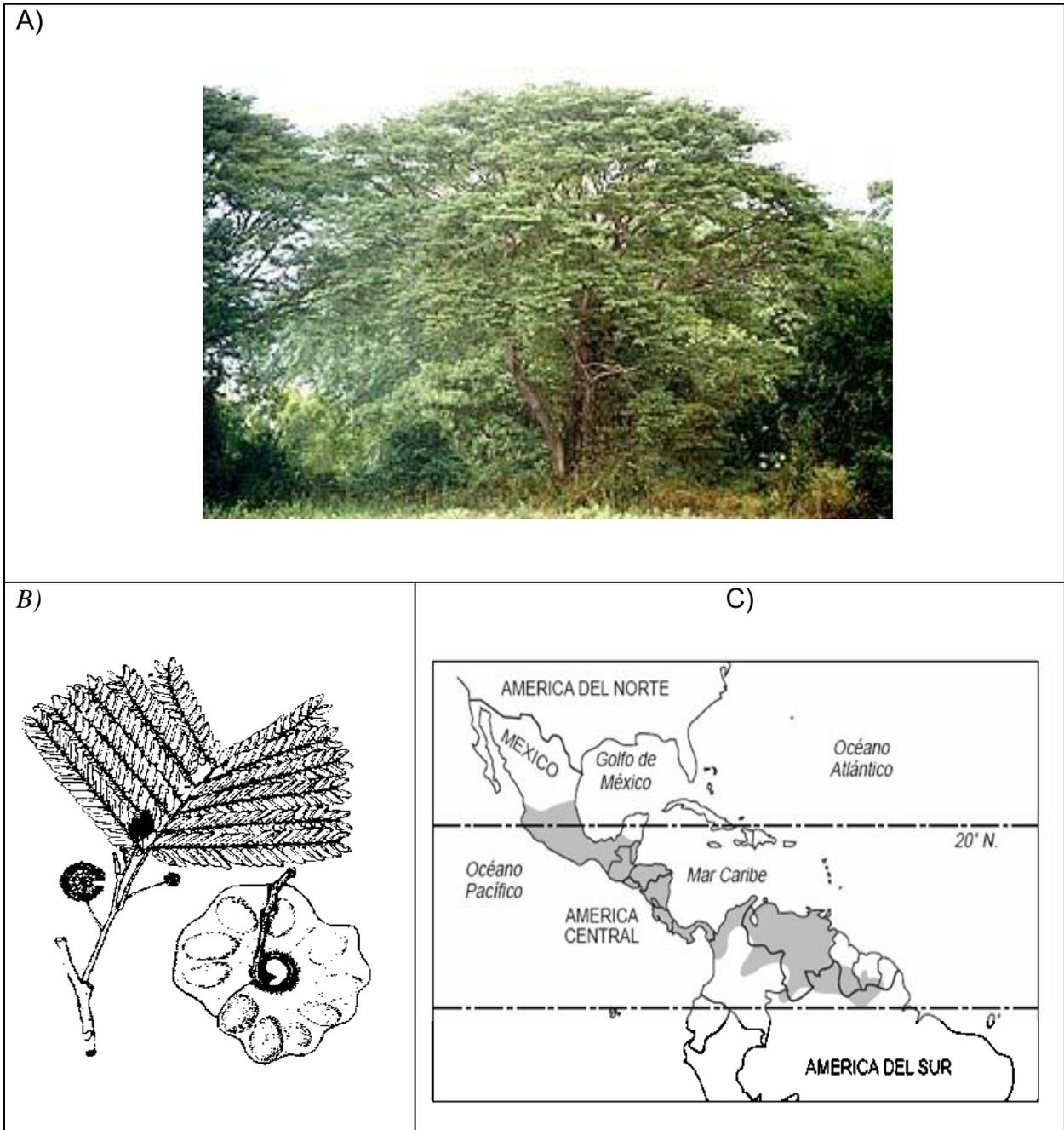


Figura 5. *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. A) Árbol, B) Hoja y fruto, C) Distribución en América.

III. JUSTIFICACION

Las sustancias químicas, sintéticas o de origen biológico utilizadas para el control de plagas se clasifican en función de sus características principales. Sin embargo uno de los criterios ampliamente aceptados, es por su forma de acción, ejemplo de esto son los insecticidas de contacto, entre los que se encuentran tóxicos superficiales (DDT) que rápidamente causan la muerte, repelentes (Citronelol y Citronelal, moléculas persistente en el ambiente de difícil degradación) y morfógenos (hormonas como la icdicsona y análogos, que también pueden causar daño en insectos benéficos) (Ware y Whitacre, 2006)

De particular interés son aquellos químicos controladores de plagas que afectan la función intestinal del insecto, los denominados sustancias anti alimentarias. Cuya acción es disuadir al insecto de alimentarse de plantas y/o diversos materiales económicamente importantes, ya sea porque no le agrada el alimento o porque el plaguicida daña componentes de la función intestinal tales como, la absorción, el epitelio intestinal, el jugo gástrico del insecto o la microbiota intestinal.

Los parámetros utilizados para medir las variables que indiquen el potencial antialimentario de una sustancia son dependientes de las características específicas del insecto y la temporalidad del ciclo biológico. En insectos grandes que llevan al cabo su ciclo de vida en ecosistemas abiertos se pueden medir fácilmente variables tales como; la ganancia o la pérdida de peso y de talla, la temporalidad de los estadios morfológicos o la reproducción (Rodríguez y Vendramin, 1998).

A diferencia de insectos grandes y de ciclos vitales cortos, en las termitas de madera seca *Incisitermes marginipennis* un integrante de las denominadas termitas inferiores y considerado a nivel mundial como el principal devastador de madera seca, es difícil medir las variables de peso, talla, la afectación en los estadios morfológicos o la reproducción.

Debido principalmente a que es un insecto que tiene un ciclo de vida extremadamente largo que lo lleva a cabo dentro de la madera y solo en la época de reproducción sale para infestar nueva madera seca.

La termita *I. marginipennis* se alimenta exclusivamente de celulosa y de otros componentes de la madera seca, de tal forma que la microbiota intestinal de la termita, es un ambiente microbiano único y específico, con el que establece una delicada relación simbiótica, crucial para que la termita obtenga nutrientes como carbono, nitrógeno, fósforo, azufre y algunos otros elementos necesarios para que cumpla exitosamente su ciclo vital.

La cual es una oportunidad única para plantear la siguiente hipótesis: La microbiota intestinal es un blanco potencial para controlar algunas plagas de forma específica, por medio de metabolitos secundarios vegetales con propiedades antitermitas, como el extracto acuoso de *E. cyclocarpum* (Jacq) Griseb del que se ha observado que tiene un efecto letal sobre la termita *I. marginipennis* (Latreille) y el nivel fisiológico en el cual ejerce su efecto tóxico se desconoce y del que se sospecha ejerza un efecto anti alimentario (Raya y col., 2006).

IV HIPOTESIS

El extracto vegetal de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq) Griseb, tiene efecto antialimentario en la termita de madera seca *Incisitermes marginipennis* (Latreille) Isóptera:Kalotermitidae.

VI OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto antialimentario del extracto vegetal del duramen de *E. cyclocarpum* (Jacq) Griseb, en la termita de madera seca *Incisitermes marginipennis* (Latreille).

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar el efecto tóxico *in vitro* del extracto vegetal de *E. cyclocarpum* en aislados bacterianos.
2. Determinar el efecto in situ del extracto vegetal sobre la microbiota intestinal de la termita de madera seca *I. marginipennis*.

VI. MATERIALES Y METODOS.

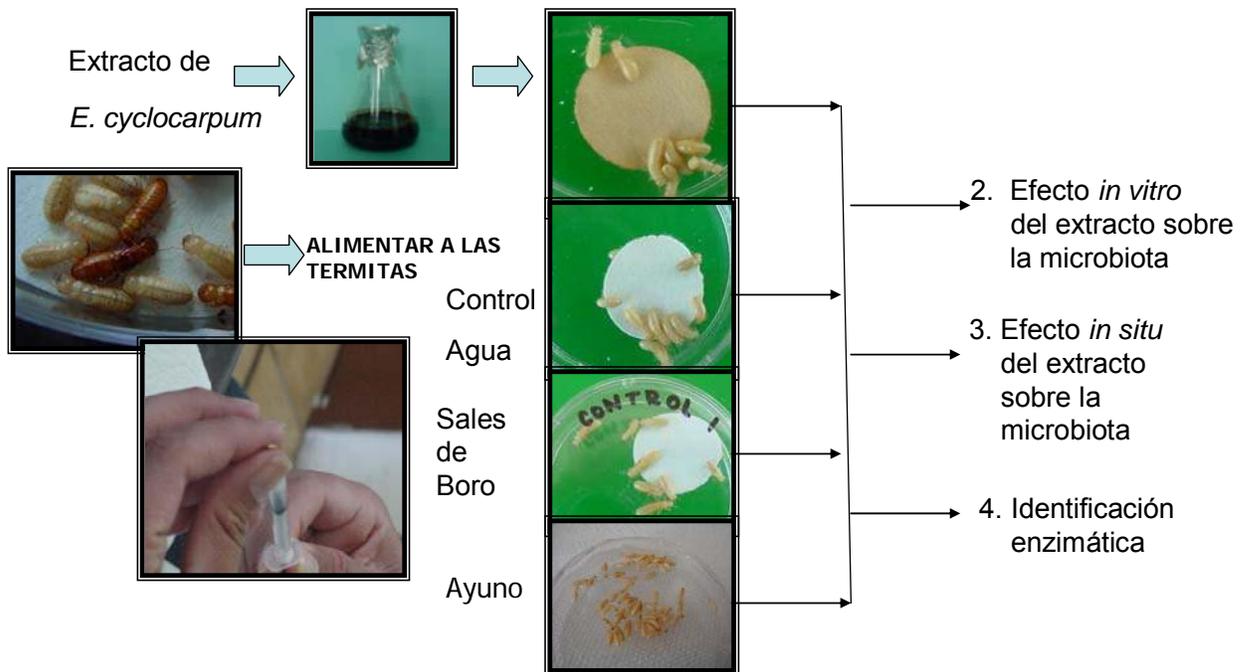
6.1 Materiales, reactivos y equipo utilizado en el presente estudio.

Cuadro 7. Material, reactivos y equipo utilizado en este estudio.

REACTIVOS	MATERIAL	EQUIPO
Agua desionizada	Cajas de petri (100x 15)	Espectrofotómetro CARY 50 BIOVARIAN
Alcohol etílico 96%	Matraz erlen Meyer 50, 100, 250, 500 y 1000 ml.	Microscopio óptico
Alcohol Etílico 70%	Pipetas Pasteur	Balanza analítica Denver Instrument XE-100
Solución Salina 0.9%	Micropipetas	Autoclave Felisa
Sol. de Boro	Puntas para micropipeta	Vortex
Aceite de inmersión	Discos de papel filtro Whatman 3	Analizador de imágenes
Agar Mueller Hinton	Gasas, algodón.	pH- metro Termo Orión Mod. 420.
Agar Base sangre	Guantes desechables, cubrebocas.	Agitador magnético Thermolyne
Caldo nutritivo	Tubos de ensayo con rosca de 10 x 1 cm. de diámetro.	Centrifuga para tubos Eppendorf Mod. 5415-D
Benzal	Laminillas	Autoclave
Agar Dextrosa Sabouraud	Cubreobjetos	Termo Baño Felisa
para-nitrofenil β-D glucopiránosido	Lámpara de escritorio	
Buffer acetato de sodio (0.2M) a un pH de 4.5.	Lupa	
Na ₂ CO ₃ 1M	Asa bacteriológica	
CMC 1%	Asa calibrada 0.001mL	
Acetato de sodio 0.1M a un pH de 5.0.		
Ca ₂ CO ₃ 1M		
Acido dinitrosalicílico		
Safranina		
Lugol		
Cristal Violeta		
Alcohol - acetona		

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

1. Efecto biocida contra aislados enterobacterianos de la termita



6.2 Material biológico.

Cuadro 8 . Microorganismos, insectos y plantas utilizadas en el presente estudio.

Reino	Organismo	Fuente
Plantae	<i>Enterolobium cyclocarpum</i> (Jacq). Griseb.	Obtenido de talleres de Cuanajo y Morelia, Mich.
Insecto	<i>Incisitermis marginipennis</i> (Latreille) (ninfas, soldados y reproductores)	Recolectadas de vigas de madera seca en la población de Cuanajo, Mich.
Bacteria	Gram -	Ceparío del I.I.Q.B.
	<i>Salmonella sp</i>	Ceparío del I.I.Q.B.
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ceparío del I.I.Q.B.
	<i>Proteus vulgaris</i>	Ceparío del I.I.Q.B.
	<i>Shigella sonnei</i>	Ceparío del I.I.Q.B.
	<i>Citrobacter freundii</i>	Ceparío del I.I.Q.B.
	<i>Escherichia coli</i>	Ceparío del I.I.Q.B.
	<i>Pseudomonas auriginosa</i>	Ceparío del I.I.Q.B.
	<i>Proteus mirabilis</i>	Ceparío del I.I.Q.B.
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Ceparío del I.I.Q.B.
	Gram +	Ceparío del I.I.Q.B.
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Ceparío del I.I.Q.B.
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Ceparío del I.I.Q.B.
	<i>Staphylococcus epidermis</i>	Ceparío del I.I.Q.B.
	<i>Bacillus subtilis</i>	Ceparío del I.I.Q.B.

6.2.1 Obtención del extracto.

Los extractos vegetales de *E. cyclocarpum* se obtuvieron con madera de duramen de *E. cyclocarpum*, triturada en molino de cuchillas Thomas Scientific, el resultado de la molida fue tamizado en malla de acero del número 20. Se colocaron 100 gr de madera molida en un vaso de precipitado con capacidad de 2 litros, se adicionaron 500 ml del solvente y se calentó hasta ebullición por 20 min. Se realizó el primer filtrado de la solución con ayuda de una manta previamente esterilizada, los sólidos recuperados se volvieron a extraer en las mismas condiciones, se obtuvo 1 litro del extracto acuoso y del extracto etanólico. El filtrado se centrifugó por 10 min/10,000 rpm se concentró por medio de vacío en alícuotas de 250 ml y se almacenó en refrigeración. Al extracto concentrado se le determinó la cantidad de

fenólicos totales equivalentes en espectrofotómetro VARIAN modelo CARY 50 BIO VARIAN, por el método reportado por Swain y Hillis en 1995.

6.2.2 Determinación de la concentración de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq) Griseb.

Los equivalentes fenólicos totales se determinaron por el método de Swain y Hills (1995). Para este ensayo se realizaron seis diluciones para determinar la concentración de equivalentes fenólicos totales presentes en los extractos vegetales de *E. cyclocarpum*. En cada dilución de los extractos se tomaron lecturas en el espectrofotómetro (CARY-50 Bio. VARIAN UV visible) a una longitud de onda de 725 nm para determinar la cantidad de fenólicos totales equivalentes y mediante una curva estándar con ácido cinámico. Los valores de las concentraciones de equivalentes fenólicos totales obtenidos, son con los que se trabajaron en todas las pruebas posteriores.

Cuadro 9. Especificación de las diluciones para realizar las lecturas en el espectrofotómetro.

DILUCIÓN	EXTRACTO (µl)	AGUA (µl)	TOTAL (ml)
1	1000	---	1
1:1	500	500	1
1:10	100*	900	1
1:100	100**	900	1
1:1000	100***	900	1
1:10000	100	900	1

* Se toman 100 µl de la dilución 1:10 para hacer la dilución 1:100

** Se toman 100 µl de la dilución 1:100 para hacer la dilución 1:1 000

***Se toman 100 µl de la dilución 1:1000 para hacer la dilución 1:10 000

Para la determinación de los equivalentes fenólicos la mezcla de reacción (1 ml) se preparó con 65 µl de los extractos vegetales de *E. cyclocarpum*, se adicionaron 435 µl de metanol, 125 µl del reactivo de Folin-Ciocalteu 2.1 M al 50 %, se agitó y se incubó por tres minutos a temperatura ambiente, se le adicionó 0.25 ml de Na₂SO₄ y se incubó por 1 h, después se determinó la absorbencia a 725 nm.

6.2.3 Colecta de termitas.

Para esta investigación la colecta de termitas se realizó en las poblaciones de Huandacareo (19°59′54′ latitud norte, 101°19′12′ latitud oeste), Uruapan (19° 09′ latitud norte, 102° 13′ latitud oeste). Santa Ana Maya (20°00′ latitud norte, 101° 01′ latitud oeste) y Morelia (19° 38′28.14″ latitud norte, 100° 59′52.16″ latitud oeste) en el Estado de Michoacán, México. Se obtuvieron varias colonias de termitas con representantes de todas las castas (ninfas, soldados y reproductores).

6.2.4 Condiciones de mantenimiento de material biológico.

Las termitas se mantuvieron en una cámara cerrada y oscura a una temperatura promedio de 25°C y una humedad relativa ambiental durante un mes para su aclimatación antes y durante el desarrollo de los ensayos biológicos.

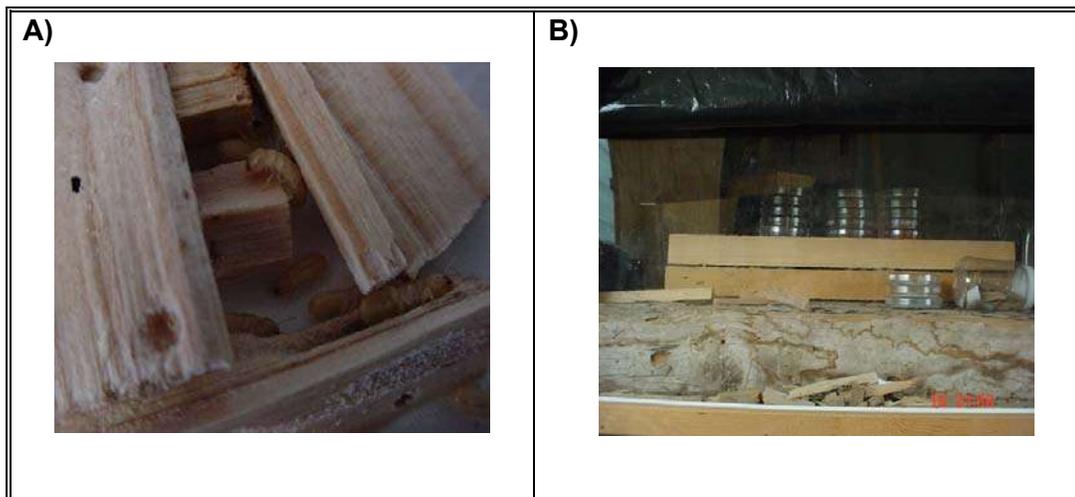


Figura 6. Condiciones de aclimatación y mantenimiento de la termita de madera seca *Incisitermes marginipennis* (Latreille). A) Termitas con madera de pino. B) Interior de la cámara oscura.

6.2.5 Obtención del consorcio intestinal de la termita.

El consorcio intestinal se obtuvo por punción con jeringa de insulina por la parte del pronoto hasta el abdomen por medio de succión del contenido intestinal de la termita (Figura 7)

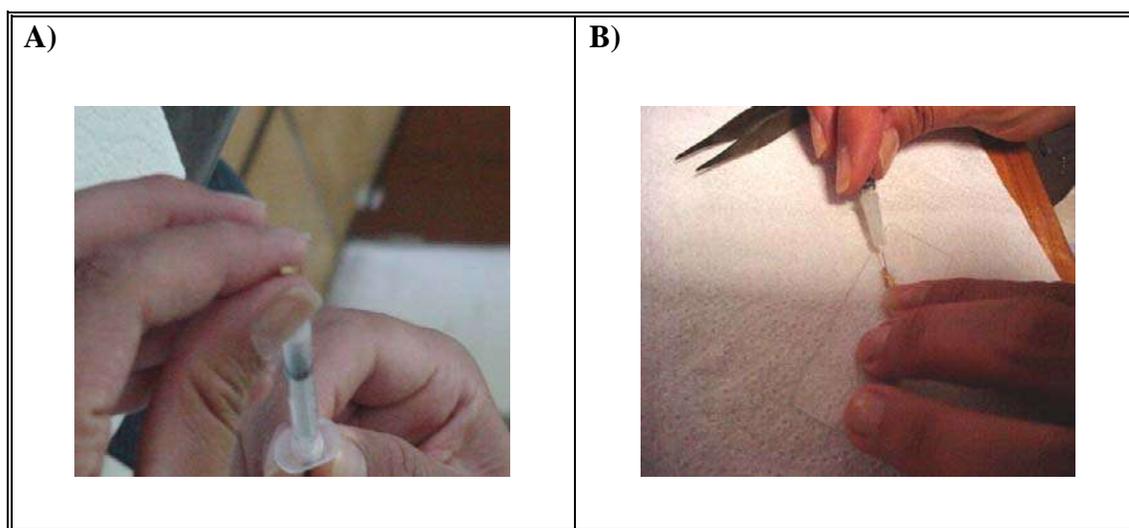


Figura 7. Obtención del consorcio intestinal de la termita de madera seca por punción con aguja fina. A) Extracción de la microbiota intestinal de la termita para determinación *in vitro* del efecto tóxico del extracto. B) Extracción de la microbiota intestinal de la termita para su recuento y clasificación.

6.3 Medios de Cultivo.

El contenido intestinal de *I. marginipennis*, se cultivó, aisló y propagó en los siguientes medios de cultivo.

- a) Caldo nutritivo (Becton Dickinson)
- | | |
|---------------------|-------|
| Peptona de gelatina | 5.0 g |
| Extracto de carne | 3.0 g |

pH final 6.9 ± 0.2 .

Suspender 8 g del polvo en 1000 ml de agua.

Si es necesario calentar ligeramente hasta disolución.

Distribuir y esterilizar a 121 °C por 15 min.

b) Agar Base Sangre (BD Bioxon)

Extracto de levadura	5.0 g
Infusión de músculo cardíaco	2.0 g
Peptona de caseína	13.0 g
Cloruro de Sodio	5.0 g
Agar	15.0 g

pH final 7.3 ±0.2

Suspender 40 g del polvo en 1000 ml de agua.

Mezclar perfectamente, calentar con agitación frecuente

Hervir por 1 min hasta disolución completa.

Distribuir y esterilizar a 121 °C por 15 min.

c) Agar Mueller Hinton (BD Bioxon)

Extracto de carne	2.0 g
Peptona de caseína ácida	175 g
Almidón	1.5 g
Agar	17.0 g

pH final 7.4±0.2

Suspender 38 g del Agar en 1000mL de agua.

Mezclar perfectamente, calentar agitando frecuentemente

Hervir por 1 min. hasta disolución completa.

Esterilizar a 121 °C por 15 min. Enfriar a 40-45 ° C y distribuir.

d) Agar Dextrosa Sabouraud. (BD Bioxon).

Agar	15.0 g
Dextrosa	40.0 g

Peptona de Carne	5.0 g
Peptona de caseína	5.0 g

pH final 5.6±0.2

Suspender 65 g del agar en 1000 ml de agua.

Mezclar perfectamente, calentar con agitación frecuente y hervir durante un minuto hasta disolución. Esterilizar a 121°C durante 15 min.

6.3.1 Condiciones de Cultivo.

El método de aislamiento, cultivo y purificación de los microorganismos de la flora intestinal de *I. marginipennis*. Se realizó en medios de cultivo sintéticos. Para su identificación, la técnica utilizada fue estría en placa, promoviendo el crecimiento de los microorganismos, estableciendo las condiciones ambientales adecuadas nutrimento, pH, temperatura y aireación. En este caso todos los medios de cultivo utilizados se incubaron en aerobiosis y anaerobiosis a una temperatura de 25 °C/ 24-48 h.

6.4 Ensayo para determinar la actividad antibacteriana del extracto acuoso de *E. cyclocarpum* sobre bacterias de interés clínico.

Se cultivaron placas de agar Mueller Hinton (AMH) con inóculos de las 13 bacterias de interés clínico por medio de la técnica de cultivo en estría. Se dejaron crecer a 25°C por 24 h una vez que se obtuvo el crecimiento bacteriano, se inocularon en tubos con caldo nutritivo y se sembraron sobre placas de AMH con la ayuda de un hisopo estéril (Figura 8A), se colocaron cuatro discos de papel filtro en las cajas AMH y sobre cada uno de los discos se depositó 6 µl (0.0637mg/µl) del extracto acuoso y 6 µl (0.0336 mg/µl) de extracto etanólico a probar y la misma cantidad para el control (etanol 96 %) (Figura 8B), las cajas se incubaron a 37 °C por 24 h y finalmente se determinó el efecto de la siguiente manera:

$$HI = DT - DP$$

Donde:

HI = Halo de inhibición del extracto (mm).
DT = Diámetro total de inhibición (mm).
DP = Diámetro del disco de papel utilizado fue 7mm.



Figura 8. Ensayo de difusión en agar. A) Inoculación de las bacterias en medio estéril. B) Aplicación de los extractos a los discos de papel filtro.

6.5 Ensayo para determinar la actividad antibacteriana en aislados enterobacterianos de la termita.

A) El estudio bacteriológico consistió en realizar un primocultivo por estría en placa para aislar los posibles microorganismos y purificarlos. Se incubaron a 25 °C por 24-48 h en condiciones de anaerobiosis y aerobiosis.

B) Subcultivo. Se tomaron las diferentes colonias aisladas del primocultivo describiendo su morfología colonial y todas las diferentes colonias que crecieron se aislaron para realizar un subcultivo por estría cerrada. Se incubaron a 25 °C por 24-48 h en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis.

C) Se realizó un estudio bacterioscópico para la identificación de la morfología del microorganismo aislado, para esto se realizó un frotis con una gota de solución salina y se llevó a cabo la técnica de coloración de Gram observando los frotis al microscopio en el objetivo 100X.

6.5.1. Determinación del efecto tóxico del extracto vegetal de *E. cyclocarpum* en la microbiota intestinal de la termita *I. marginipennis*.

El intestino de las termitas fue removido por punción con aguja fina suspendido y homogenizado en 30 μ l solución salina al 0.9%, posteriormente se tomó una alícuota de 6 μ l del homogenizado y se depositó en placas de agar Mueller Hinton y fue extendida con asa bacteriológica, se colocaron cuatro discos de papel filtro Whatman 3 (7mm de diámetro) los cuales se impregnaron con 6 μ l (0.0637mg/ μ l) del extracto vegetal acuoso y 6 μ l (0.0336 mg/ μ l) del extracto vegetal etanólico, el control fue un microbicida comercial (cefatoxima).

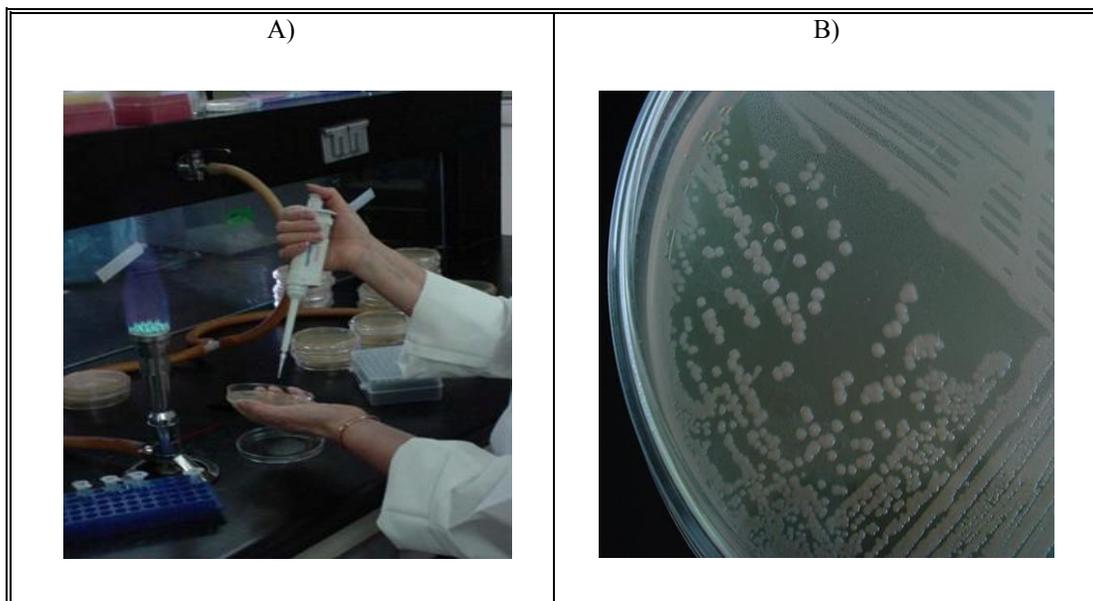


Figura 9. Determinación del efecto tóxico del extracto de *Enterolobium cyclocarpum* sobre el crecimiento de la microbiota intestinal de *Incisitermes marginipennis*. A) Descarga de la alícuota del homogenizado del consorcio intestinal de la termita de madera seca. B) Crecimiento bacteriano a las 24 hrs.

Los medios se incubaron a temperatura ambiente en condiciones adecuadas para su crecimiento por 24 h posteriormente se midió el halo de inhibición del crecimiento bacteriano.

La toxicidad del extracto de *E. cyclocarpum* se evaluó con base en la capacidad de inhibición de cada uno de los microorganismos.

6.5.2 Determinación del efecto tóxico *in vitro* del extracto de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq) Griseb sobre la microbiota intestinal de la termita de madera seca *Incisitermes marginipennis* (Latreille).

Previo al tratamiento todos los grupos de termitas se mantuvieron en ayuno por 24 h, transcurrido el tiempo se mantuvieron con cada uno de los tratamientos por 5 h en condiciones adecuadas para su mantenimiento (temperatura, humedad relativa y oscuridad absoluta). Se formaron cuatro grupos de cinco termitas con los siguientes tratamientos (Figura. 10)

Posteriormente se procedió a obtener el consorcio intestinal por succión con aguja fina, resuspendiendo el contenido intestinal en 30 µl de solución salina al 0.9 % utilizando un asa bacteriológica calibrada de 0.001 ml, se descargó la asada en el centro de la placa de AMH y se sometió por cultivo en estría masiva en forma cruzada a la descarga. Se incubó por 24 - 48 h en condiciones anaerobias y aerobias, después se evaluó el crecimiento a las 24 h.

Las colonias formadas se contaron con ayuda de una lámpara de escritorio y lupa, el resultado obtenido se multiplicó por 1000 y se reportó como unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ ml).

$$UFC = No. de colonias \times 1000.$$

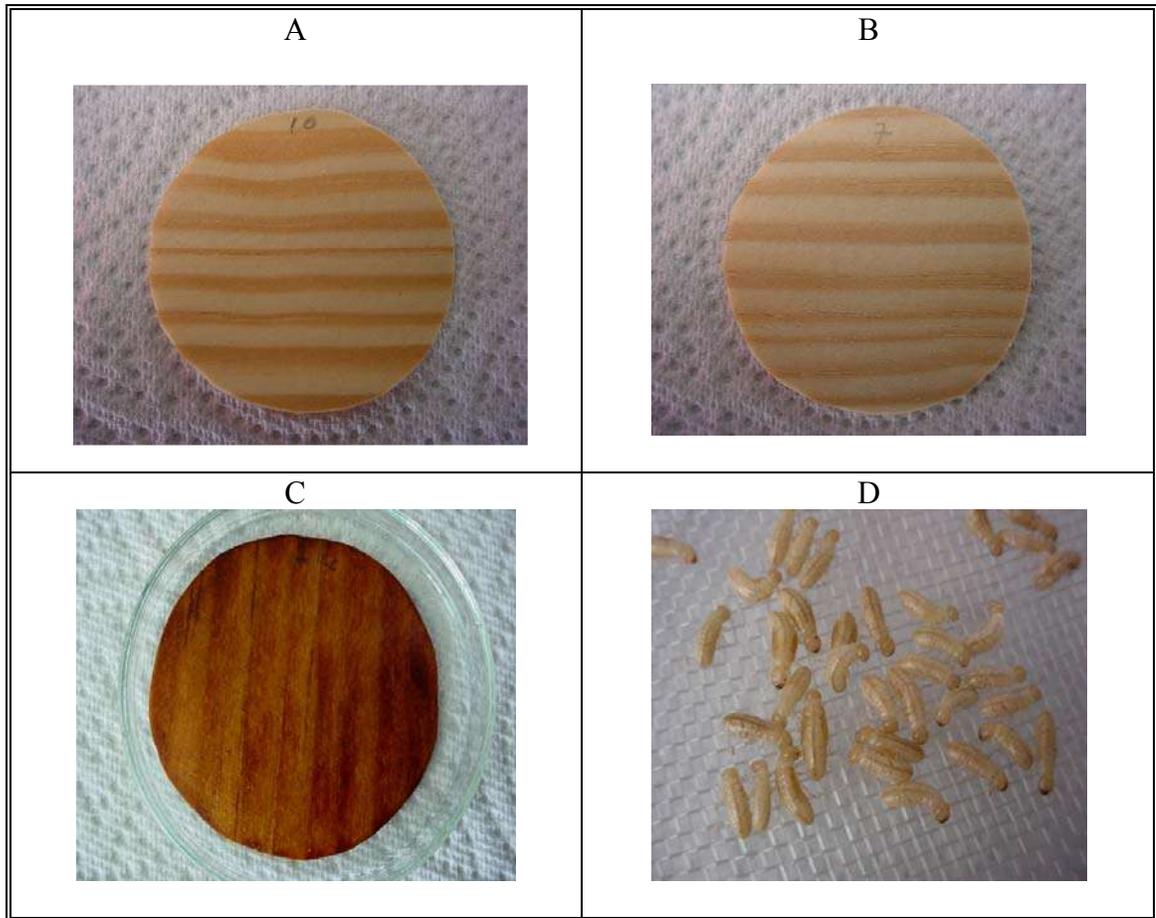


Figura 10. Tratamientos para determinar el efecto *in vitro* de extracto acuoso de *E. cyclocarpum* sobre la microbiota intestinal de *I. marginipennis*. A) Madera de pino impregnada con agua desionizada, B) Madera de pino impregnada con sales de Boro, C) Madera de pino impregnada con extracto acuoso de *E. cyclocarpum*, D) Sin alimento (ayuno).

6.6 Determinación del efecto tóxico *in situ* del extracto acuoso de *E. cyclocarpum* (Jacq) Griseb sobre la microbiota intestinal de *Incisitermes marginipennis* (Latreille)

El efecto tóxico *in situ* del extracto se evaluó por medio de ensayos de alimentación forzada se impregnaron discos de papel filtro Whatman 3 (2.2 cm de diámetro) con 1 ml de cada uno de los tratamientos a evaluar (Cuadro10). Los discos impregnados fueron secados a temperatura ambiente y pesados para su posterior uso. Grupos de diez termitas de madera seca fueron colocados en cajas de petri con papel impregnado con cada uno de los tratamientos a evaluar, las termitas que correspondían al tratamiento de ayuno fueron colocadas en cajas de petri con una malla plástica. Todos los tratamientos se mantuvieron en las condiciones experimentales por un periodo de ocho días.

Cuadro 10. Tratamientos del ensayo de alimentación forzada.

TRATAMIENTO	CONDICION
UNO	EXTRACTO ACUOSO DE <i>E. cyclocarpum</i> (CONCENTRACION DE EQUIVALENTES FENOLICOS DE 10.63 mg/ml).
DOS	SIN COMIDA
TRES	CONTROL NEGATIVO (Agua desionizada)
CUATRO	CONTROL POSITIVO (Solución de boro)

El intestino de cada una de las termitas utilizadas fue succionado y removido por punción con aguja fina, resuspendido y homogenizado en 10 µl de solución salina al 0.9 % el cual fue depositado posteriormente sobre un portaobjetos

para el recuento de la microbiota intestinal, esto se hizo con ayuda de un analizador de imágenes, se clasificaron y contabilizaron por separado las formas encontradas.

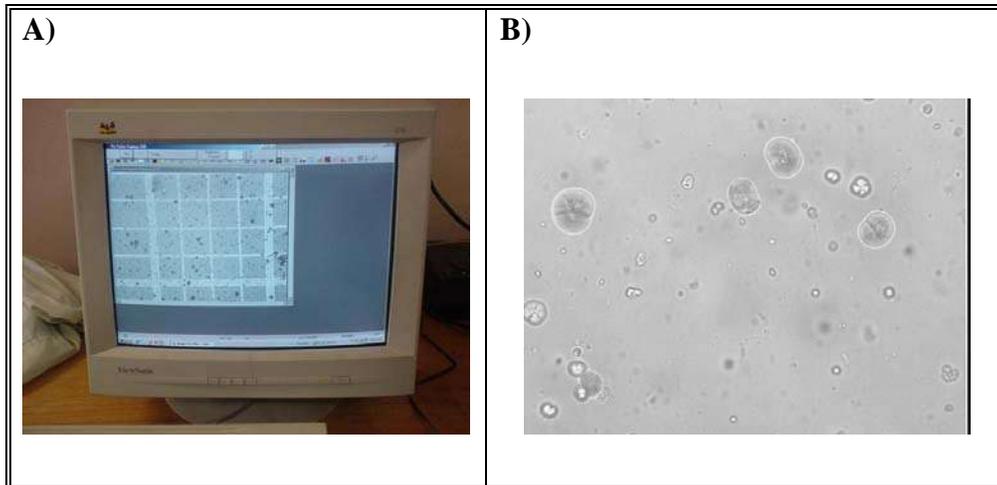


Figura 11. Recuento del contenido Intestinal de la termita de madera seca. A) Captura de la imagen, B) Observación de las diferentes formas al microscopio.

6.7. Cuantificación de la actividad celulolítica en la microbiota intestinal de *Incisitermes marginipennis* (Latreille).

Para la determinación de la actividad celulolítica presente en la microbiota intestinal de la termita de madera seca se hizo como lo reporta Flores García (2003). Se formaron tres grupos de diez termitas cada uno y se mantuvieron en ayuno por 48 h previo al tratamiento.

Transcurrido el tiempo se mantuvieron en las condiciones de ayuno, control negativo, en presencia del extracto y en solución de boro (Cuadro 10) por un periodo de 24 h.

6.7.1 CUANTIFICACION DE β -GLUCOSIDASA EN INTESTINO DE TERMITAS

Se utilizó la siguiente mezcla de reacción para determinar la actividad de β -Glucosidasa: 100 μ l de la enzima cruda obtenida del intestino de *I. marginipennis* 100

μl de *p*-nitrofenil β-D glucopiránosido 5 mM (PNPG Sigma St. Louis Mo), en 800 μl de buffer de acetato de sodio (0.2M) a un pH de 4.5.

Se Incubaron 2 h en un baño térmico (Felisa) a 60 °C y transcurrido el tiempo se detuvo la reacción con 700 μl de Na₂CO₃ 1M, finalmente se midió la absorbencia de la muestra en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 400 nm. En el cuadro 11 se muestra la distribución de los reactivos en cada uno de los tratamientos.

6.7.2 CUANTIFICACION DE LA ENDOCELULASA EN INTESTINO DE TERMITAS

La mezcla de reacción para determinar la actividad de la endocelulasa estuvo compuesta por 100 μl del extracto enzimático (microbiota intestinal de termita), 400 μl de carboximetil celulosa (CMC) al 1% en regulador de acetato de sodio 0.1M a un pH de 5.0. Se incubaron en un baño térmico (Felisa) a 45 °C por 1.5 h. Transcurrido el tiempo se adicionaron 600 μl del reactivo ácido dinitrosalicílico (DNS Sigma St. Louis Mo). Los tubos se incubaron a ebullición durante 15 min, se dejaron enfriar y se midió la absorbencia a una longitud de onda de 640 nm. Se cuantificó la cantidad de azúcares reductores presentes por el método de DNS, reportado por Noato-Habu y col. (1997). En el cuadro 12 se muestra la distribución de cada uno de los tratamientos.

6.7.3 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO REPORTADO POR LOWRY Y COL. EN 1951

Este método se basa en la formación de un complejo azul-púrpura, el cual se forma mediante la unión del enlace peptídico de la proteína con el reactivo de Folin - Ciocalteu's, en presencia del ión cúprico en medio alcalino, se observó el desarrollo del color y la absorbencia se midió a una longitud de onda de 640 nm. Se utilizó una curva estándar de albúmina sérica de bovino BSA (1-100 μg). Para la determinación de la proteína se utilizaron los reactivos siguientes ver cuadro 6.

Cuadro 11. Distribución de los reactivos para la determinación de β -glucosidasa

TRATAMIENTO	N	CELULASAS DEL INTESTINO	PNPG	REGULADOR 1M
Blanco	1	100 μ l agua	-----	800 μ l
Blanco	2	100 μ l agua	-----	800 μ l
Termita c/a	1	100 μ l	100 μ l	800 μ l
Termita c/a	2	100 μ l	100 μ l	800 μ l
Termita c/a	3	100 μ l	100 μ l	800 μ l
Termita c/a	4	100 μ l	100 μ l	800 μ l
Termita c/a	5	100 μ l	100 μ l	800 μ l
Termita Ext	1	100 μ l	100 μ l	800 μ l
Termita Ext	2	100 μ l	100 μ l	800 μ l
Termita Ext	3	100 μ l	100 μ l	800 μ l
Termita Ext	4	100 μ l	100 μ l	800 μ l
Termita Ext	5	100 μ l	100 μ l	800 μ l
Termita s/a	1	100 μ l	100 μ l	800 μ l
Termita s/a	2	100 μ l	100 μ l	800 μ l
Termita s/a	3	100 μ l	100 μ l	800 μ l
Termita s/a	4	100 μ l	100 μ l	800 μ l
Termita s/a	5	100 μ l	100 μ l	800 μ l

Cuadro 12. Distribución de los reactivos para la determinación de Endocelulasas

TRATAMIENTO		N	CELULASAS DEL INTESTINO	CMC 1%	REGULADOR	DNS
Blanco	-----	1	100 µl	400 µl	500 µl	600 µl
Blanco	-----	2	100 µl	400 µl	500 µl	600 µl
Termita c/a	0	1	100 µl	400 µl	500 µl	600 µl
Termita c/a	0	2	100 µl	400 µl	500 µl	600 µl
Termita c/a	0	3	100 µl	400 µl	500 µl	600 µl
Termita c/a	0	4	100 µl	400 µl	500 µl	600 µl
Termita c/a	0	5	100 µl	400 µl	500 µl	600 µl
Termita Ext.	+	1	100 µl	400 µl	500 µl	600 µl
Termita Ext.	+	2	100 µl	400 µl	500 µl	600 µl
Termita Ext.	+	3	100 µl	400 µl	500 µl	600 µl
Termita Ext.	+	4	100 µl	400 µl	500 µl	600 µl
Termita Ext.	+	5	100 µl	400 µl	500 µl	600 µl
Termita s/a	0	1	100 µl	400 µl	500 µl	600 µl
Termita s/a	0	2	100 µl	400 µl	500 µl	600 µl
Termita s/a	0	3	100 µl	400 µl	500 µl	600 µl
Termita s/a	0	4	100 µl	400 µl	500 µl	600 µl
Termita s/a	0	5	100 µl	400 µl	500 µl	600 µl

Soluciones empleadas para determinar Proteina. (Metodo de Lowry)

SOLUCIONES	CONCENTRACIONES
(a) Carbonato de Sodio en hidróxido de sodio 0.2M	3% (w/v)
(b) Citrato de Sodio en agua destilada	4% (w/v)
(c) Sulfato de Cobre penta hidratado en agua destilada.	2% (w/v)
Para 50 ml: 48 ml de solución (a). 1 ml de solución (b), 1 ml de solución (c).	
(d) Reactivo de Folin y Ciocalteu's.	

6.8 Análisis Estadístico.

Todos los experimentos se repitieron tres veces con tres réplicas cada uno. Los datos obtenidos se expresan como la media \pm Error Estándar (EE), se compararon las medias por la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) se hizo un análisis de varianza de una vía con el paquete estadístico Statistica versión 7.0.

VII. RESULTADOS

7.1 Determinación del efecto antibacteriano del extracto acuoso de *E. cyclocarpum* (Jacq) Griseb sobre bacterias de interés clínico.

El extracto acuoso de *E. cyclocarpum* (Jacq) Griseb, tuvo un efecto bacteriostático sobre bacterias de interés clínico, siendo *K. pneumoniae* la bacteria más sensible a los extractos. En la figura se muestran los halos de inhibición (mm) provocados en las bacterias por el extracto de *E. cyclocarpum* (Figura 12).

Obteniendo que siete aislados bacterianos fueron sensibles al extracto de *E. cyclocarpum* de las trece bacterias utilizadas en la prueba (cuatro bacterias Gram positivos y tres Gram negativos). *K. pneumoniae* presentó un halo de inhibición de 29 mm, de seis mm tanto en *P. mirabilis* y en *P. auroginosa*, seguido por *S. epidermis* y *S. aureus* con un efecto menor de 3.33 mm, y por último los halos significativos de *P. vulgaris* y *P. saprophyticus* con 1.33 y 1 mm respectivamente (Figura 13), mientras que seis bacterias (*Bacillus subtilis*, *Salmonella sp*, *Shigella sonnei*, *Citrobacter freundii*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae*) no presentaron inhibición alguna en presencia del extracto de *E. cyclocarpum*.

7.2 Determinación *in vitro* del efecto tóxico del extracto vegetal de *E. cyclocarpum* (Jacq) Griseb en la microbiota intestinal de la termita *Incisitermes marginipennis* (Latreille).

7.2.1 Obtención del Primocultivo.

El método de aislamiento cultivo y purificación de los microorganismos de la flora intestinal de *I. marginipennis*, se realizó en medios de cultivo sintéticos para su identificación. La técnica utilizada fue estría en placa, promoviendo el crecimiento de los microorganismos, estableciendo las condiciones ambientales adecuadas nutrimento, pH, temperatura y aireación. En este caso todos los medios de cultivo utilizados se incubaron en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis a una temperatura de 25 °C/24 - 48 h.

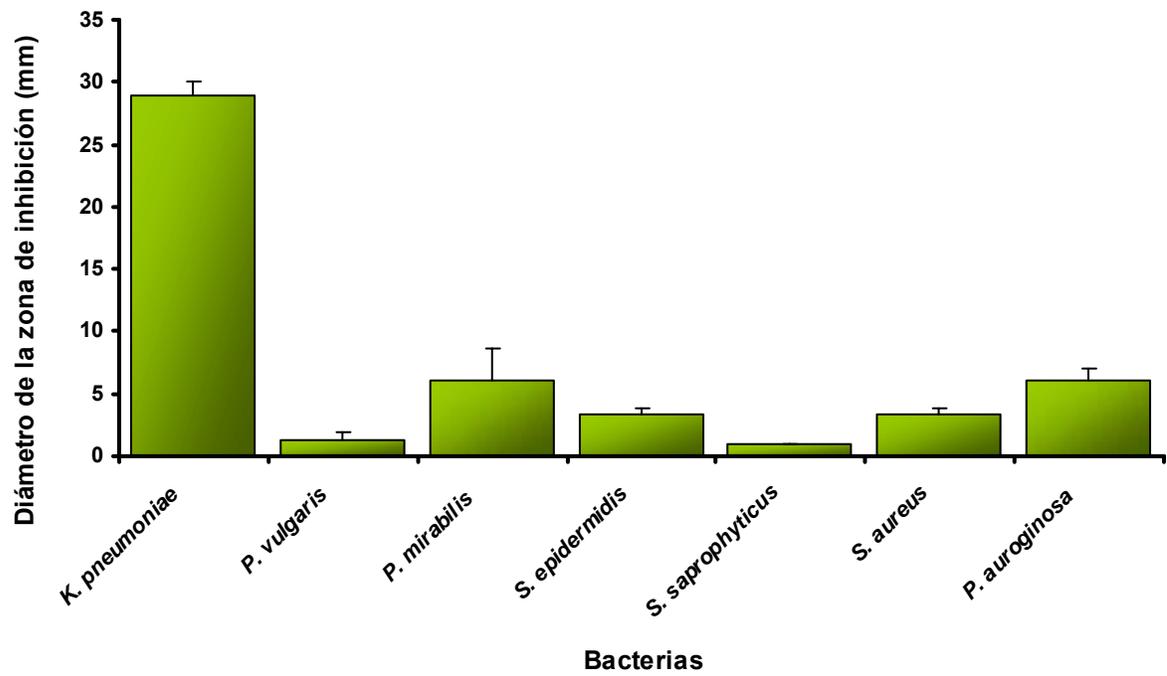


Figura 12. Efecto antibacteriano del extracto acuoso del duramen de *E. cyclocarpum* ejercido en aislados bacterianos de interés clínico.

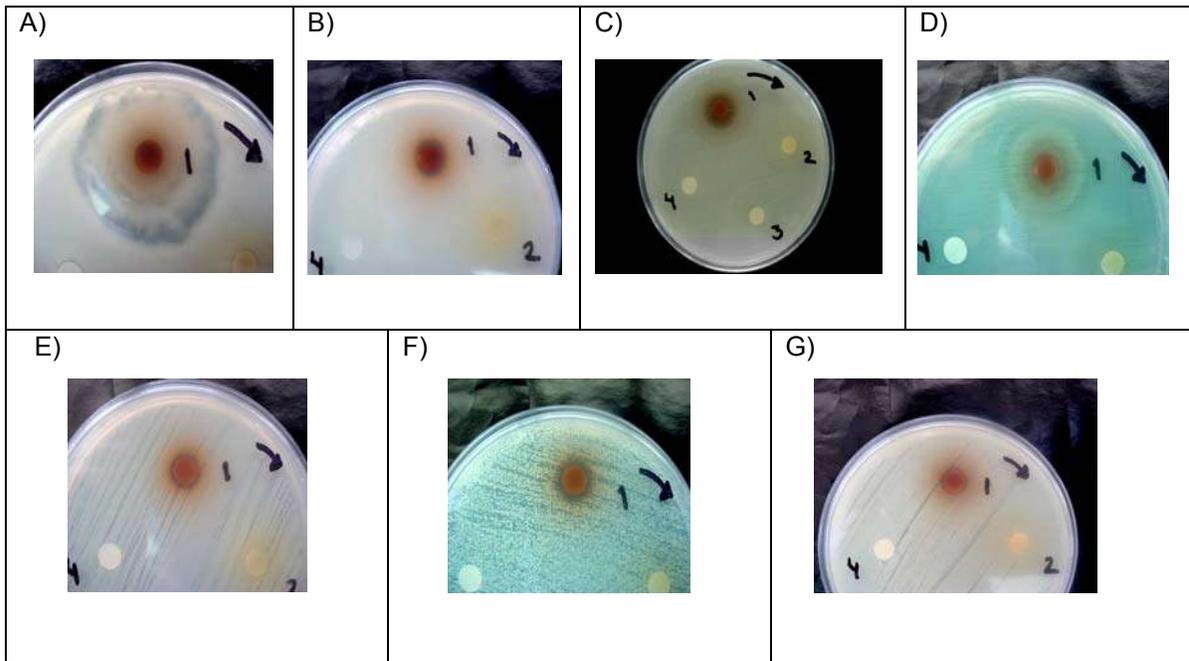


Figura 13. Efecto antibacteriano del extracto acuoso de *E. cyclocarpum* sobre bacterias de interés clínico. A) *K. pneumoniae*, B) *P. vulgaris*, C) *P. mirabilis*, D) *S. epidermidis*, E) *P. saprophyticus*, F) *S. aureus*, G) *P. auroginosa*. Las flechas nos indican el sentido en el que fueron colocados los discos. 1) Extracto acuoso de *E. cyclocarpum* (10.63 mg/ml); 2) Etanol; 3) Agua destilada; 4) DMSO.

Se obtuvo crecimiento en todos los medios de cultivo, Agar Mueller Hinton, Agar Dextrosa Sabouraud y Agar Base Sangre, a las 24 y 48 h. Tanto en condiciones de anaerobiosis como de aerobiosis, de las cuales se aislaron once colonias.

A las colonias aisladas del primocultivo se les realizó un estudio bacterioscópico para la identificación de la morfología microscópica de cada una de las bacterias aisladas, realizándose para ello la tinción de Gram.

Los resultados obtenidos son los siguientes:

Cuadro 13. Estudio bacterioscópico de los organismos aislados de intestino de la termita *Incisitermes marginipennis* (Latreille)

AISLADO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL	TINCION DE GRAM	MORFOLOGIA
MLEMBIM I(a)	Gram Negativo	Bacilo
MLEMBIM I (d)	Gram Positivo	Bacilo
MLSIM II (b)	Gram Positivo	Cocobacilo
MLMHIM III (c)	Gram Positivo	Cocobacilo
MLMHIM I (a)	Gram Positivo	Bacilo
MLMHIM III 1	Gram Positivo	Bacilo
MLMHIM III 3	Gram Positivo	Levadura
MLMHIM III 4	Gram Negativo	Bacilo

7.2.2 Determinación *in vitro* del efecto antibacteriano del extracto de *E. cyclocarpum*.

Los aislados bacterianos denominados arbitrariamente MLEMBIM I(a), MLMHIM I(a), MLEMBIM I (d), MLSIM II(b), MLMHMIII(c) presentaron un efecto bacteriostático en presencia del extracto acuoso. Ninguno de los aislados bacterianos presentó efecto bactericida en presencia del extracto etanólico. Los aislados bacterianos MLMHIM I(a) y MLEMBIM I(d) presentaron también un efecto bacteriostático en presencia del extracto etanólico, mientras que MLEMBIM I(a), MLSIM II(b) y MLMHMIII(c) mostraron un efecto bactericida en presencia del extracto etanólico (Cuadro 14).

Los aislados MLMHIM III-1 y MLMHIM III-4 presentaron un efecto bacteriostático en presencia del extracto etanólico y ningún efecto bactericida o bacteriostático en presencia del extracto acuoso (Cuadro 15)

7.2.3 Determinación *in vitro* del efecto antifúngico del extracto de *E. cyclocarpum*.

También obtuvimos un aislado fúngico el cual presentó un efecto fungistático en presencia de ambos extractos (Cuadro 16)

Los resultados obtenidos de la determinación del efecto tóxico de los extractos vegetales sobre los aislados bacterianos y fúngico contenidos en el intestino de las termitas se muestran en las Figuras 14, 15 y 16 y en los Cuadros 13, 14 y 15.

Cuadro 14. Efecto tóxico de los extractos de *Enterolobium. cyclocarpum* (Jacq) Griseb sobre los aislados microbianos anaerobios facultativos de *Incisitermes marginipennis* (Latreille).

Aislado bacteriano del intestino de termita	Extracto de <i>E. cyclocarpum</i>			
	Acuoso		Etanólico	
	Bacteriostático	Bactericida	Bacteriostático	Bactericida
MLEMBIM I (a)	+	-	-	+
MLMHIM I (a)	+	-	+	-
MLEMBIMI (d)	+	-	+	-
MLSIM II (b)	+	-	-	+
MLMHMIII (c)	-	-	-	+

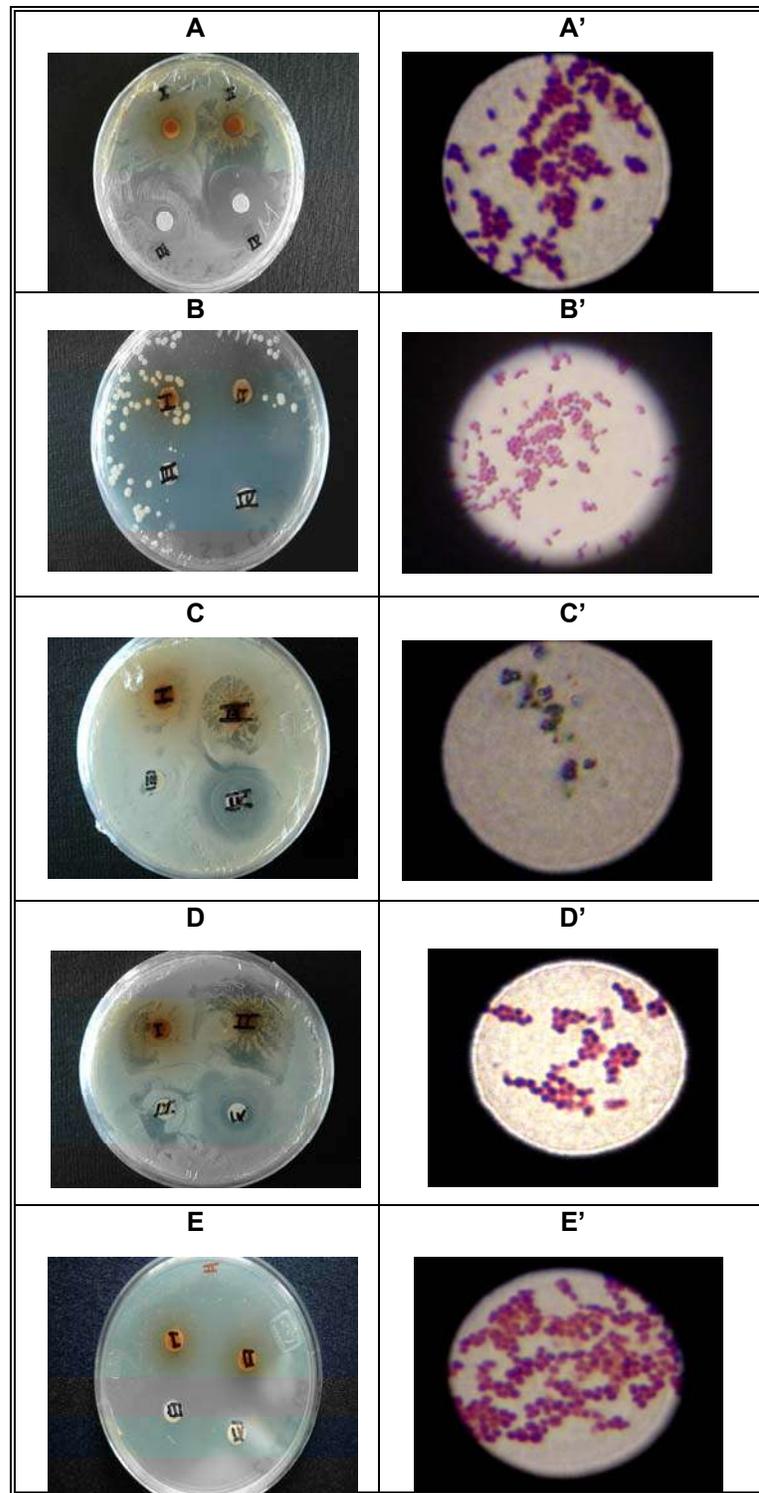


Figura 14. Efecto de los extractos vegetales de *Enterolobium cyclocarpum* sobre las enterobacterias anaerobias facultativas de *Incisitermes marginipennis*. Extracto acuoso (I), Extracto etanólico (II), A) MLEMBIM I (a), A') Bacilos Gram negativos; B) MLSIM (b), B') cocobacilos Gram positivo; C) MLMHIM I (a), C') Bacilos Gram positivos; D) MLMHIM II (c), E) MLEMBIM I (d), E') Bacilos Gram negativos.

Cuadro 15. Efecto tóxico de los extractos de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq) Griseb sobre los aislados bacterianos intestinales anaerobios estrictos de *Incisitermes marginipennis* (Latreille).

Aislado bacteriano del intestino de termita	Extracto de <i>E. cyclocarpum</i>			
	Acuoso		Etanólico	
	Bacteriostático	Bactericida	Bacteriostático	Bactericida
MLMHIM III -1	-	-	+	-
MLMHIM III-4	-	-	+	-

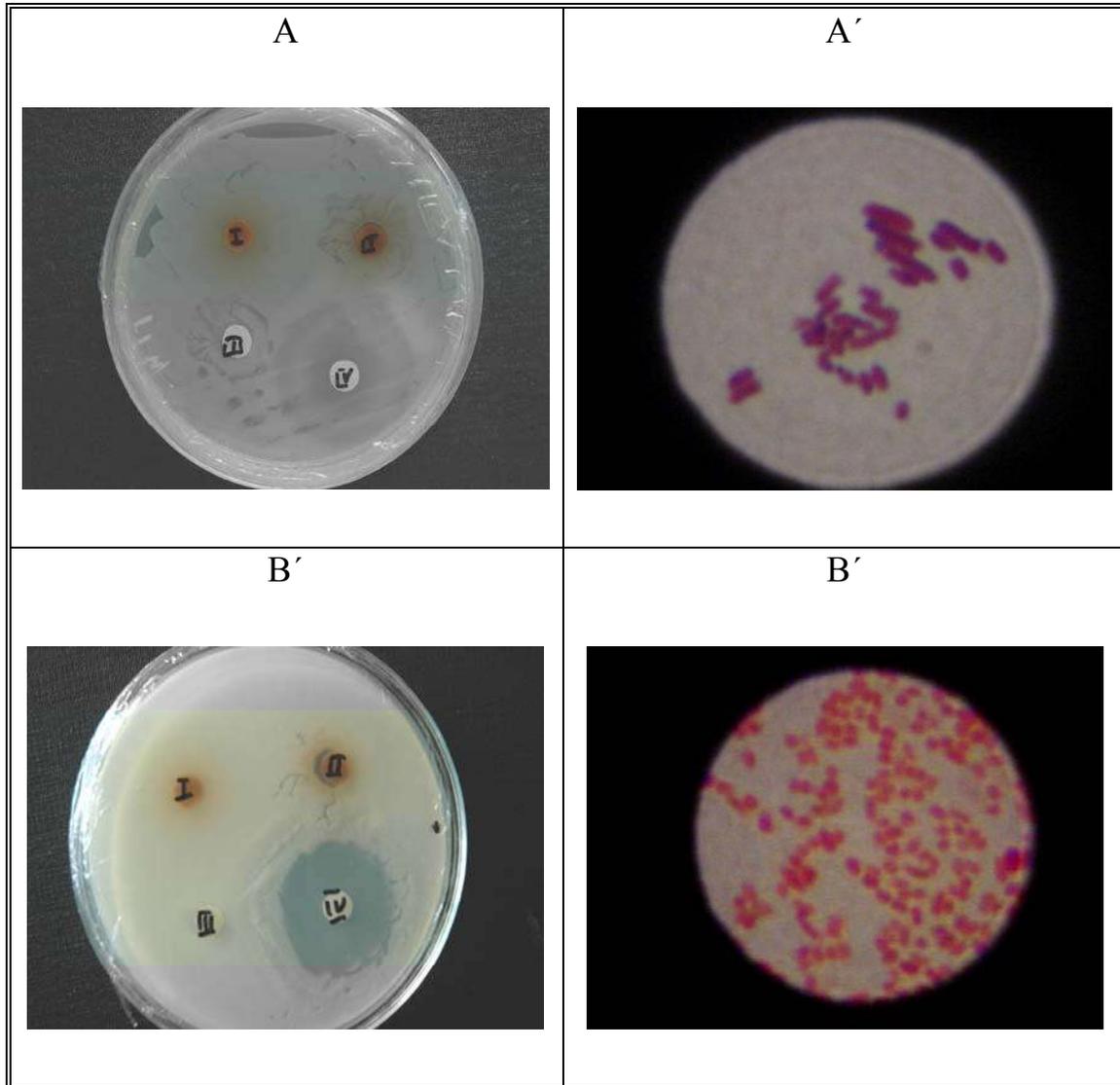


Figura 15. Efecto antibacteriano de los extractos vegetales de *Enterolobium cyclocarpum* sobre las enterobacterias anaerobias estrictas de *Incisitermes marginipennis*. Extracto acuoso (I); Extracto etanólico (II); A) MLMHIM III-1; A') Bacilos Gram positivo; B) MLMHIM III-4; B') Bacilos Gram positivo; C) MLMHIM I (a); C') Bacilos Gram negativo.

Cuadro 16. Efecto tóxico de los extractos de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq) Griseb sobre el aislado fúngico de *Incisitermes marginipennis* (Latreille).

Aislado fúngico intestinal de termita	Extracto de <i>E. cyclocarpum</i>				Morfología
	Acuoso		Etanólico		
	Fungistático	Fungicida	Fungistático	Fungicida	
MLMHIM III-3	+	-	+	-	Levadura

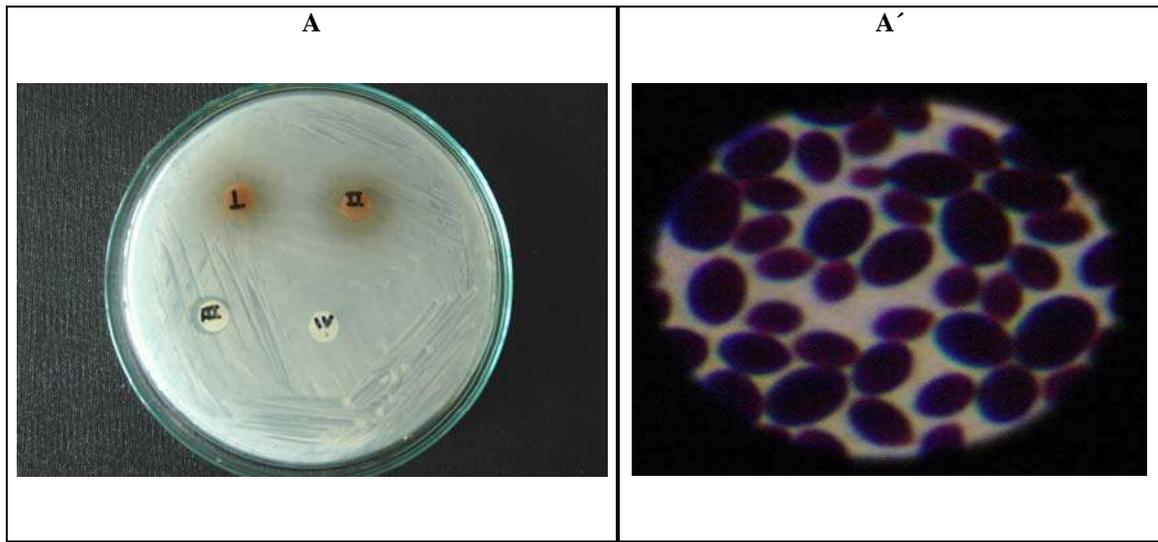


Figura 16. Efecto de los extractos vegetales de *Enterolobium cyclocarpum* sobre el aislado fúngico de *Incisitermes marginipennis*. Extracto acuoso (I), Extracto etanólico (II), A) MLMHIM III-3, A') Levadura.

7.3 Determinación del efecto tóxico *in situ* del extracto acuoso de *E. cyclocarpum* (Jacq) Griseb sobre la microbiota intestinal de *Incisitermes marginipennis* (Latreille).

7.3.1 Determinación del efecto tóxico en pruebas de difusión de Agar.

El resultado obtenido para las termitas tratadas con el extracto acuoso fue de 1.24×10^6 UFC, las termitas tratadas en condiciones de ayuno obtuvieron un crecimiento bacteriano de 1.33×10^6 UFC, el crecimiento bacteriano en termitas tratadas con solución de boro fue de 0.165×10^6 UFC , mientras que el control alcanzó un crecimiento bacteriano de 0.956×10^6 UFC (Figura 17).

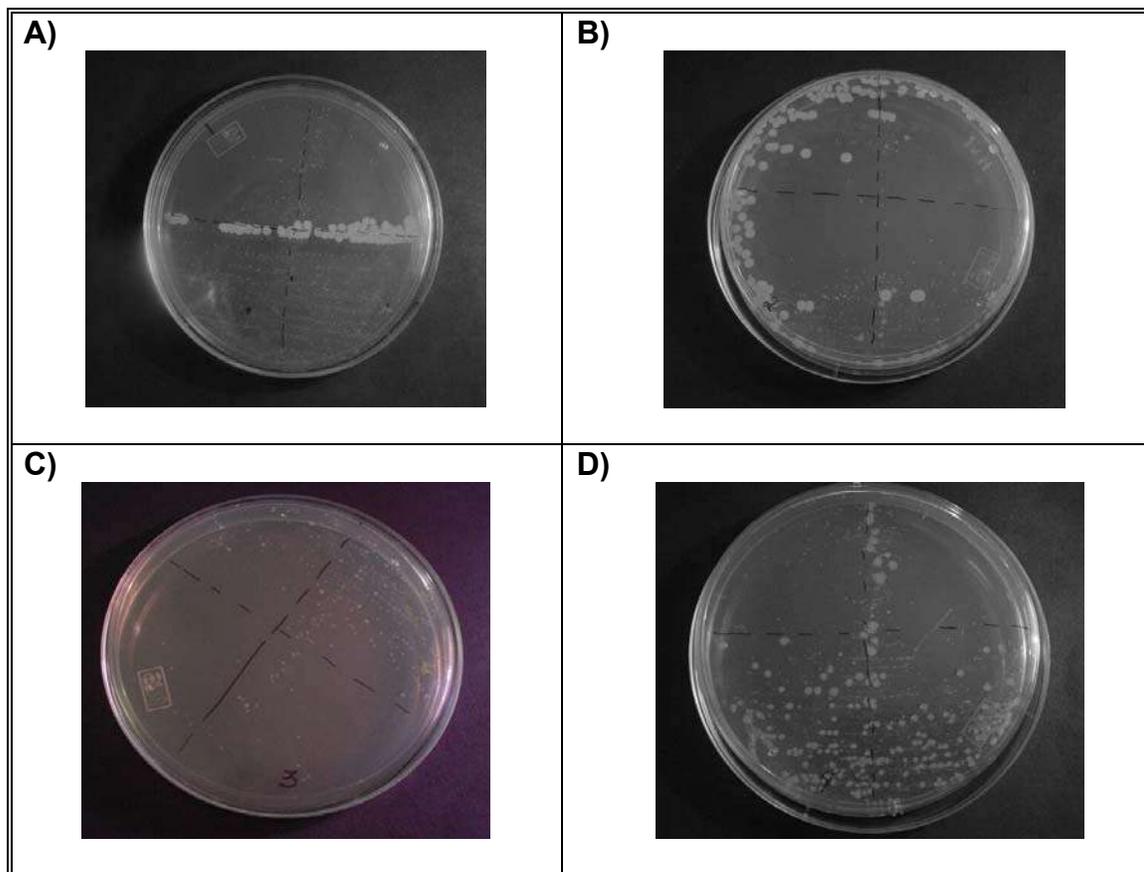


Figura 17. Crecimiento de la microbiota intestinal de *Incisitermes marginipennis* (Latreille) en presencia de cuatro diferentes tratamientos. A) Ayuno, B) Control (-) Alimento impregnado con agua desionizada, C) Control (+) Boro, D) Alimento impregnado con extracto acuoso de *E. cyclocarpum* (Jacq) Griseb.

7.3.2 Recuento y clasificación de la Microbiota Intestinal.

Se encontraron dos formas diferentes de microbiota presente en el intestino de *I. marginipennis*, formas circulares mayoritariamente y en menor proporción las espiroquetas (Figura 19).

El efecto antialimentario producido por el extracto acuoso de *E. cyclocarpum* (Jacq) Griseb sobre la termita *I. marginipennis* puede comprobarse al observar la Figura 16, se observó que la termita *I. marginipennis* ingiere en un primer paso el papel impregnado con el extracto acuoso de *E. cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. pero posteriormente deja de hacerlo (Figura 18).

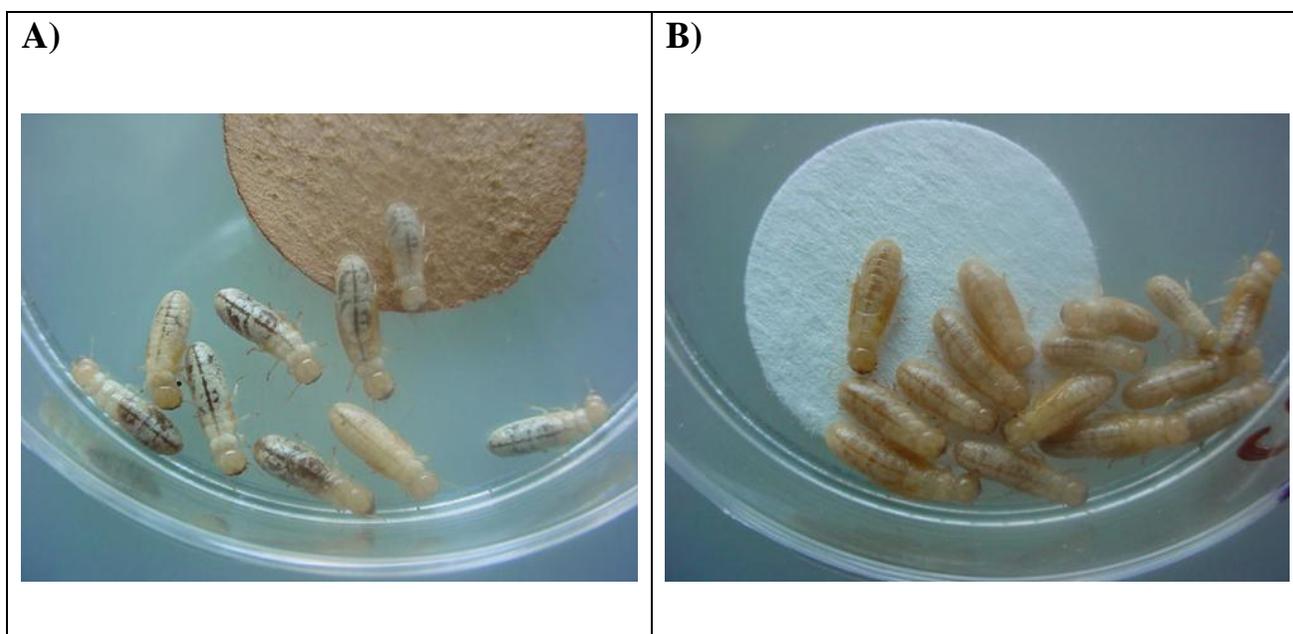


Figura 18. Termitas de madera seca *Incisitermes marginipennis* (Latreille) en ensayos de alimentación forzada. A) En presencia de extracto de *Enterolobium. cyclocarpum* (Jacq) Griseb. B) Control negativo.

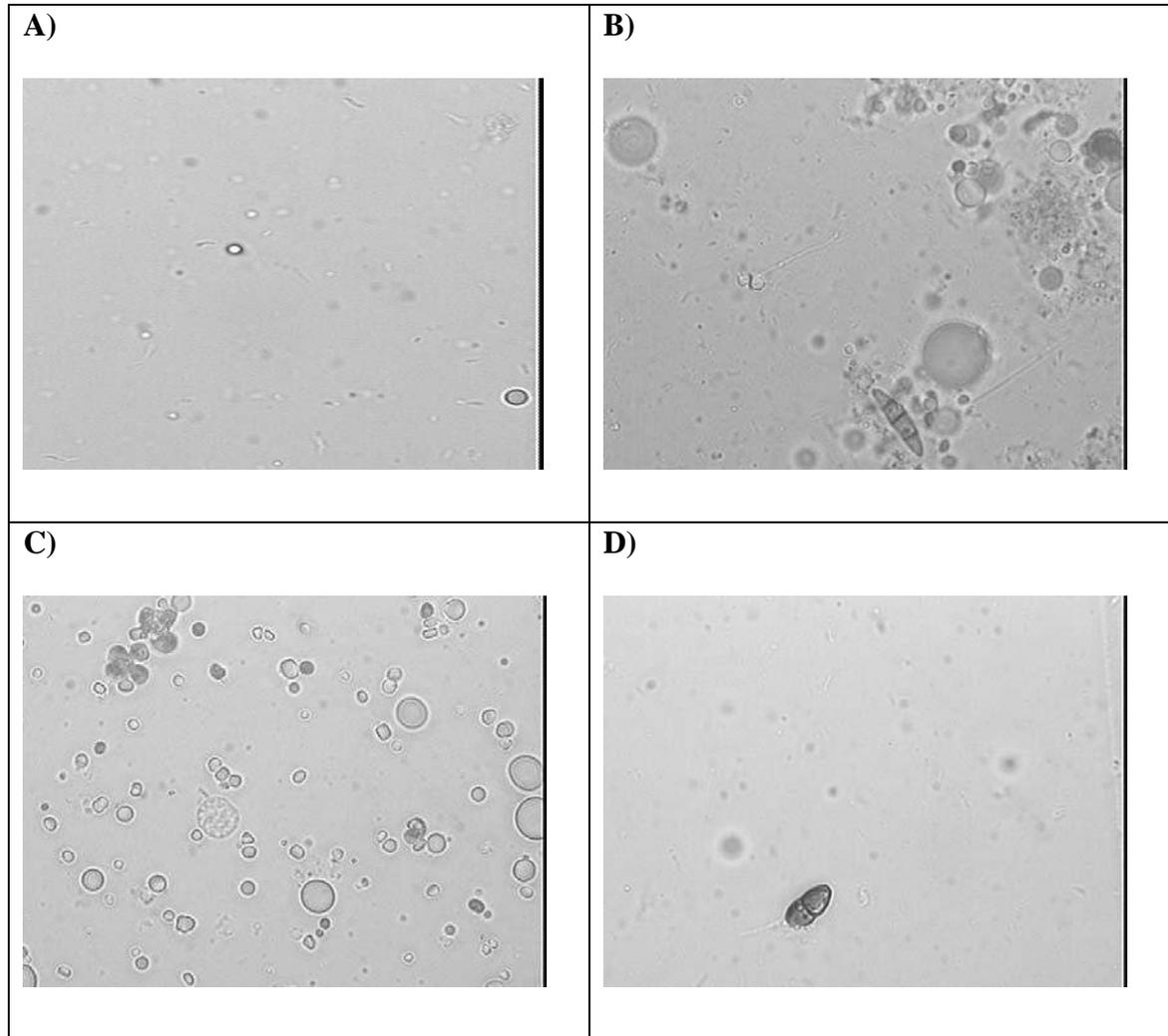


Figura 19. Microbiota Intestinal de *Incisitermes marginipennis* (Latreille). A) Espiroquetas, B y D) Protozoarios, C) Formas circulares.

Cuadro17. Comparación entre el contenido intestinal de *I. marginipennis* (Latreille) en los diferentes tratamientos a los que fueron expuestas.

TRATAMIENTO	BACTERIAS UFC X 10⁶	PROTOZOARIOS mm³	ESPIROQUETAS mm³
AYUNO	1.33	70.96 ± 6.75	20.43 ± 4.15
EXTRACTO 0.0637mg/μl (bacterias) 10.63 mg/ml (protozoarios y espiroquetas)	1.24	80.17 ± 1.1	18.6 ± 3.59
BORO	0.165	69.67 ± 5.86	13.8 ± 0.99
CONTROL	0.956	73.86 ± 6.62	17.9 ± 0.93

7.4 Cuantificación de la actividad celulolítica en la microbiota intestinal de *Incisitermes marginipennis* (Latreille).

La degradación de la celulosa es llevada a cabo por enzimas líticas de celulosa, las celulasas, de origen microbiano y posiblemente de la termita *Incisitermes marginipennis* (Latreille). En el presente estudio se determinó la actividad celulolítica de la enzima β -glucosidasa y de la Endocelulasa.

7.4.1. Determinación de la actividad celulolítica de β -glucosidasa sobre rumen de *Incisitermes marginipennis* (Latreille).

Se observó que el comportamiento de la actividad de la β -glucosidasa en las termitas que fueron tratadas con alimento impregnado de extracto acuoso de *E. cyclocarpum*, fue de 2.71 μ moles/min/mg de proteína, mientras que el de las termitas tratadas solamente con alimento (control negativo) fue de 2.06 μ moles/min/mg de proteína, lo que indica que en presencia del extracto no hubo una alteración significativa en la actividad celulolítica con respecto al control, el valor obtenido para la actividad de β -glucosidasa en las termitas que fueron tratadas en condiciones de ayuno es de 3.35 μ moles/min/mg de proteína, lo que indica que no hay diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 20).

7.4.2. Determinación de la actividad celulolítica de la endocelulosa sobre rumen de *Incisitermes marginipennis* (Latreille).

El comportamiento de la actividad de la endocelulasa en las termitas que fueron tratadas con el extracto acuoso de *E. cyclocarpum* (Jacq) Griseb fue de 0.16 μ moles/min/mg de proteína, el valor obtenido en presencia de alimento (control negativo) fue de 0.1 μ moles/min/mg de proteína, mientras que la actividad obtenida para la condición de ayuno fue de 0.095 μ moles/min/mg de proteína, al analizar los datos concluimos que no hubo diferencias significativas entre la actividad enzimática

de los tratamientos, lo que conduce a concluir que el extracto acuoso de *E. cyclocarpum*, no causa alteraciones en la actividad celulolítica de la endocelulasa proveniente de la microbiota intestinal de la termita *Incisitermes marginipennis* (Latreille), ver Figura 20.

7.5 Estudio fitoquímico de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq) Griseb.

Los resultados observados anteriormente nos llevaron a realizar una búsqueda bibliográfica para tratar de encontrar el o los componentes responsables del efecto antialimentario. Encontrando en la literatura los productos vegetales y su órgano fuente (Cuadro 18) el dato más importante y relevante para el trabajo fue el reportado por Raya y col. (2007) con respecto al extracto acuoso de *E. cyclocarpum* en el cual se describe que el compuesto mayoritario encontrado en el extracto acuoso es el Pinitol el cual presenta efectos promotores del crecimiento microbiano. Esto es interesante ya que los resultados obtenidos y la actividad que presenta el compuesto mayoritario encontrado no eran compatibles, por lo que se cree sin comprobar, que el efecto antialimentario observado en el presente trabajo se deba a los compuestos minoritarios encontrados en el extracto.

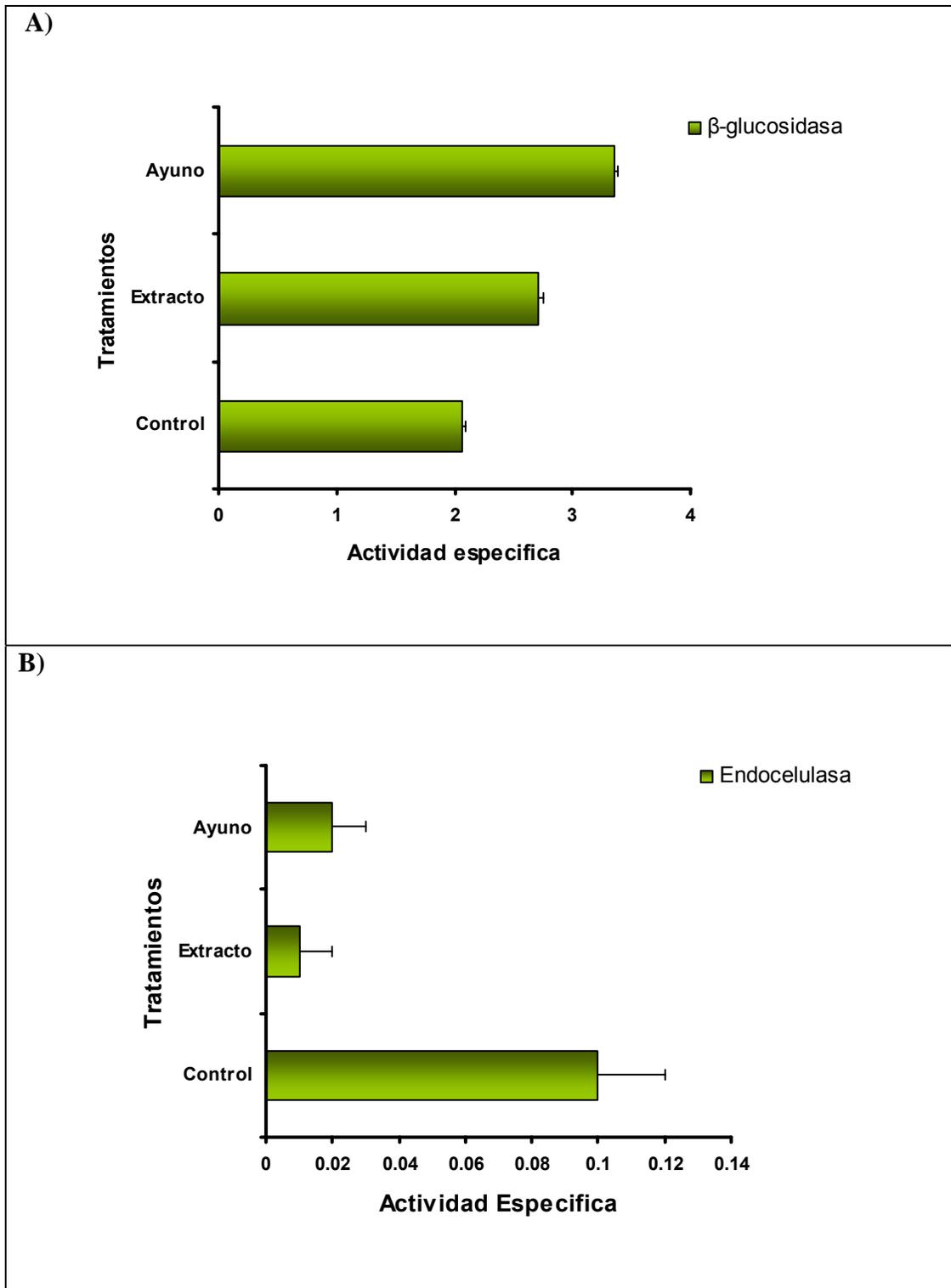


Figura 20. Efecto del extracto acuoso de *E. cyclocarpum* sobre la actividad celulolítica intestinal de la termita *I. marginipennis*. A) Actividad específica de la β -glucosidasa en el intestino de termitas *I. marginipennis*. B) Actividad específica de la endocelulasa en el intestino de termitas *I. marginipennis*. La actividad específica se expresa como $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

Cuadro 18. Análisis fitoquímico de *Enterolobium. cyclocarpum* (Jacq) Griseb.

PRODUCTO VEGETAL	ORGANO FUENTE
Ac. 2,3 diaminopropionico	Semilla ^{1,2}
Saponinas triterpénicas	Pulpa y Cascara ³
Galactosa, Arabinosa, Glucosa, Ac. Glucorónico, Polisacáridos.	Goma del tronco ^{5,4}
Treonina, Lisina, Leucina, Valina, Asparagina, Glutamina, Serina, Histidina, Glicina, Arginina, Alanina, Tirosina, Metionina, Fenilalanina, Isoleucina, Leucina y Triptófano.	Semillas ⁶
Ac. Linoléico, Oleico, Palmítico.	Semillas ⁷
Hierro, Calcio, Fósforo, Ac. Ascórbico.	Vaina madura ⁸
Albúminas, Globulinas, Proláminas.	Semilla ^{9,10}
Limoneno, p-cimeno, Furanos, Terpenos, Fenoles	Madera de duramen ¹¹
Pinitol.	Extracto acuoso¹¹

¹ ESPEJEL Y MARTINEZ, 1979. ² GMELIN, 1959. ³ DOMINGUEZ Y FRANCO, 1979. ⁴ DE PINTO y col., 1986, 1994. ⁵ SERRATO, 1989. ⁶ SOTELO y col., 1978, 1980. ⁷ AGULAR Y SOLLÁ, 1982. ⁸ GIRAL Y ECHEGOYEN, 1949. ⁹ MASSIUM Y CRAVIOTO, 1950. ¹⁰ SERRATOS AVALOS, 2000. ¹¹ RAMOS PANTALEON, 2003. ¹¹ RAYA y col, 2007.

VIII. DISCUSION

Los principios activos de origen vegetal pueden ejercer efectos benéficos deseados y no deseados con severidad variable, los cuales dependerán de los componentes del extracto, del organismo y de la afección que se desee aliviar, controlar o abatir. Sin embargo los efectos no deseados y los tóxicos pueden ser de gran utilidad para otros fines, como en el control de plagas de interés económico, para aniquilar agentes patógenos para el hombre y de organismos vivos de interés económico o para preservar diversos materiales de importancia económica susceptibles al biodeterioro.

Raya y col. (2005, 2006, 2007) demostraron que al menos un componente de un extracto acuoso de *Enterolobium cyclocarpum* posee propiedad antitermita contra la termita de madera seca *Incisitermes marginipennis*, pero desconocen cual es el blanco fisiológico del extracto vegetal acuoso. Por lo que en este trabajo se propuso dar una explicación del efecto antitermita observado.

De particular interés son aquellos químicos controladores de plagas que afectan la función intestinal del insecto, que son los denominados sustancias antialimentarias. Cuya acción es disuadir al insecto de alimentarse de plantas o de diversos materiales económicamente importantes, ya sea porque no le agrada el alimento o porque el plaguicida daña componentes de la función intestinal tales como, la absorción, el epitelio intestinal, en la microbiota intestinal o causan una alteración en el jugo gástrico del insecto. Los parámetros utilizados para medir las variables que indiquen el potencial antialimentario de una sustancia son dependientes de las características específicas del insecto, la temporalidad del ciclo biológico y del medio ambiente en el que se desarrolla. En insectos grandes que llevan a cabo su ciclo de vida en ecosistemas abiertos se pueden medir fácilmente variables tales como; la ganancia o la pérdida de peso y/o de talla, la temporalidad de los estadios morfológicos, la reproducción, etc.

A diferencia de los insectos grandes con ciclos vitales cortos, en las termitas de madera seca *Incisitermes marginipennis* un integrante de las denominadas

termitas inferiores y considerado a nivel mundial como el principal devastador de madera seca, es difícil medir las variables de peso, talla, la afectación en los estadios morfológicos, reproducción, etc. Debido principalmente a que es un insecto que tiene un ciclo de vida extremadamente largo que lo lleva a cabo dentro de la madera y solo en la época de reproducción sale para infestar nueva madera seca.

La termita *I. marginipennis* se alimenta exclusivamente de celulosa y de otros componentes de la madera seca, de tal forma que la microbiota intestinal de la termita, un ambiente microbiano único y específico, con el que establece una relación simbiótica importante y crucial para que la termita obtenga carbono, nitrógeno, fósforo, azufre y algunos otros elementos necesarios para que cumpla exitosamente su ciclo vital.

De tal forma que en este trabajo se determinó el potencial antibacteriano que algunos componentes de la mezcla compleja que es el extracto acuoso y etanólico de *E. cyclocarpum* podrían ejercer en bacterias de interés clínico.

Las bacterias utilizadas en el ensayo son causa de infecciones intra hospitalarias, siendo *P. auroginosa*, *K. pneumoniae* y *S. aureus* las que más problemas presentan en cuanto a resistencia de fármacos y mortalidad. Estudios realizados por la SSA en México estiman que de un 5–10 % de los pacientes que ingresan a un hospital adquiere una infección que no estaba presente, en el momento de su llegada al centro hospitalario (Boletín SSA, 2006). Esta eventualidad ocasiona consecuencias fatales en la salud y un elevado costo de tratamiento.

Los resultados obtenidos muestran que *K. pneumoniae* fue la bacteria que mostró un mayor efecto con 29 mm de halo de inhibición en presencia del extracto seguida de *P. mirabilis* y *P. auroginosa* con 6 mm, *S. epidermis* y *S. aureus* presentaron ambos halos de 3.33 mm, las bacterias que presentaron un halo de menor fueron *P. vulgaris* y *P. saprophyticus* con 1.33 mm y 1 mm respectivamente mientras que seis bacterias (*Bacillus subtilis*, *Salmonella sp*, *Shigella sonnei*, *Citrobacter freundii*, *E. coli* y *Enterobacter cloacae*) no presentaron inhibición alguna.

Lo que nos llevó a concluir que el extracto acuoso de *E. cyclocarpum* presenta un efecto bacteriostático sobre siete de las trece bacterias de interés clínico utilizadas en la prueba como una manifestación de su potencial antibacteriano.

Estos resultados nos ayudaron a plantearnos una serie de interrogantes sobre el uso del extracto acuoso de *E. cyclocarpum* en bacterias de difícil control en la salud humana debido a la resistencia que a causado el uso indiscriminado de fármacos en estas bacterias. Así como también nos abre una nueva línea de investigación futura del extracto acuoso de *E. cyclocarpum* sobre bacterias patógenas al hombre.

En la determinación del efecto antibacteriano *in vitro* del extracto decidimos cultivar únicamente el contenido bacteriano procedente de la microbiota intestinal de la termita, por lo complicado que es aislar los otros dos componentes del rumen intestinal que son los protozoarios y las espiroquetas, los cuales en futuras investigaciones se aislaran y identificaran (Stingl y col., 2005). Se lograron aislar por primera ocasión ocho microorganismos presentes en la microbiota intestinal de *I. marginipennis*, al realizar el estudio bacterioscópico, cinco presentan formas de bacilos, dos de cocobacilos y una levadura, presentando la tinción de Gram positiva cinco de ellos y dos con tinción de Gram negativa.

Los resultados obtenidos en la determinación antibacteriana de los extractos vegetales de *E. cyclocarpum* sobre los aislados bacterianos de *Incisitermes marginipennis* nos indican que el extracto acuoso, tiene un efecto bacteriostático sobre cuatro de los seis aislados bacterianos (MLEMBIM I a, MLMHIM I a, MLEMBIMI d, MLSIM II b), mientras que el extracto etanólico muestra este mismo efecto pero solo en dos de los seis aislados bacterianos (MLMHIM I a, MLEMBIMI d). Con ambos extractos se obtuvieron resultados prometedores, sin embargo decidimos utilizar el extracto acuoso por la razón de que se extrajeron compuestos solubles en agua y se evitan aquellos principios activos liposolubles. El extracto acuoso presentó

un efecto bacteriostático sobre las bacterias aisladas del intestino de *I. marginipennis*.

La descripción microbiológica de los aislados bacterianos es de una importancia trascendental ya que no se contaba anteriormente con ninguna descripción de la microbiota intestinal de *I. marginipennis* (Latreille).

También se obtuvo un aislado fúngico y encontramos que ambos extractos acuoso y etanólico presentan un efecto fungistático. Un efecto que está en acuerdo con resultados reportados por Castro Ortiz (2006) en el que observó que ni el crecimiento sobre agar nutritivo del patógeno levaduriforme *Candida albicans* (un aislado silvestre clínico y resistente a los funguicidas convencionales), ni el del oomiceto *Phytophthora cinamomi* (un patógeno filamentoso aislado de *Persea americana* (aguacate) causante de la enfermedad de la “tristeza”) fue inhibido por el extracto acuoso vegetal.

En el siguiente paso fue determinar si el efecto bacteriostático del extracto acuoso de *E. cyclocarpum* observado *in vitro* también se llevaba a cabo en la microbiota de la termita *I. marginipennis*. Se hicieron las siguientes consideraciones acerca de la función digestiva de la termita enfocando la atención en tres componentes importantes, 1) la cantidad y calidad de los microorganismos entéricos, 2) el jugo gástrico en el que se encuentran enzimas líticas de polímeros y otros componentes necesarios para la degradación del alimento y 3) el proceso de asimilación del alimento llevado al cabo por el intestino de la termita.

La calidad y cantidad de microorganismos intestinales de la termita es importante para la simbiosis con la termita, ya que este insecto se alimenta exclusivamente de madera, por tanto, ellos son responsables de secretar enzimas hidrolíticas capaces de la descomposición de polímeros hasta sus componentes elementales, por ejemplo carbohidratos (glucosa), aminoácidos, ácidos grasos y nucleótidos. También son los responsables de proveer de factores bióticos

necesarios para la termita tales como vitaminas, de fijar nitrógeno, reciclar fósforo, azufre y metales esenciales. Una razón fundamental para pensar que la microbiota de la termita es un blanco fisiológico potencial para el control de este insecto barrenador de Madera seca. En el intestino de la termita *I. marginipennis* se encontraron bacterias, hongos y protozoarios, de los cuales se desconoce su taxonomía y no se encontró referencia alguna de la descripción de estos microorganismos extremófilos. Se observó que las espiroquetas como los protozoarios fueron difíciles de cultivarlos *in vitro*, que la única forma de medirlos fue en preparaciones frescas, no así algunas bacterias.

En el caso de la medición de los protozoarios y debido al desconocimiento de las especies presentes y la dificultad de cultivarlos *in vitro*, en este estudio se tomó el criterio arbitrario de agrupar a todos los protozoarios intestinales de la termita como protozoarios circulares. Se puntualizó en las espiroquetas por su forma característica y se midieron las bacterias como las unidades formadoras de colonias.

Se consideró que la población de bacterias, espiroquetas y protozoarios se afectó por la presencia del extracto acuoso cuando estuviese inusualmente baja o alta. Otros signos considerados fueron cuando la termita manifestara signos de daño tales como un estómago disminuido o deposición de heces líquidas, ambos signos fueron observados pero no contabilizados.

En la determinación del efecto tóxico *in situ* del extracto acuoso de *E. cyclocarpum* sobre la microbiota intestinal de la termita *I. marginipennis* encontramos formas circulares y espiroquetas visibles al microscopio. Los resultados nos indican que al ser comparadas las formas circulares entre los diferentes tratamientos no existen diferencias significativas entre ellas, lo mismo ocurrió al analizar las espiroquetas, por lo que se concluye que el extracto acuoso de *E. cyclocarpum* (Jacq) Griseb no tiene efecto sobre la microbiota intestinal observada al microscopio de *Incisitermis marginipennis* (Latreille).

Al determinar el efecto tóxico *in situ* del extracto sobre las bacterias presentes en el rumen intestinal de la termita, observamos que en todos los tratamientos hubo crecimiento bacteriano, los resultados nos muestran que las termitas tratadas con extracto tienen un crecimiento bacteriano parecido a las termitas que se encontraban en ayuno, mientras que el control negativo permanece por debajo ambos tratamientos (extracto y ayuno) y por encima de las termitas tratadas con solución de boro. Tomando los datos de los cambios en la población de microorganismos intestinales nos hace llegar la suposición de que el extracto acuoso de *E. cyclocarpum* (Jacq) Griseb tiene un efecto antialimentario.

Estudios paralelos de alimentación selectiva (Raya y col., 2007) el cual consistió en impregnar un disco de papel Whatman dividido en tres partes con control negativo (solvente), extracto acuoso de *E. cyclocarpum* y con solución de boro, se observó que las termitas si probaron el extracto como primera intención de alimentación pero dejaban de devorarlo y se alimentaban únicamente del control negativo, lo que nos confirma que el extracto de *E. cyclocarpum* presenta un efecto antialimentario disuasivo.

El factor digestivo “jugo gástrico” es un blanco fisiológico importante de principios activos con efecto antialimentario para controlar a la termita porque en el se encuentran las enzimas secretadas por la microorganismos intestinales y por la propia termita, así como otros componentes necesarios para una absorción de alimentos exitosa. Puesto que la termita se alimenta únicamente de la celulosa que encuentra en la madera seca, donde la actividad celulolítica es crucial para la degradación de celulosa hasta glucosa, por lo que se midió el posible efecto del extracto acuoso en la actividad celulolítica intestinal total, para ello se tomaron como indicadores enzimáticos ampliamente aceptados, a la β -glucosidasa y a la endocelulasa, llamadas genéricamente celulasas.

Al medir la actividad de las celulasas presentes en la microbiota intestinal encontramos que la β -glucosidasa presentó una actividad enzimática semejante en las termitas que fueron alimentadas con el extracto y el control, mientras que las que

se mantuvieron en ayuno su actividad era ligeramente mayor sin llegar a ser significativa estadísticamente, por lo que se llega a la conclusión de que el extracto de *E. cyclocarpum* no afectó la actividad de la β -glucosidasa.

En cuanto a la determinación de la actividad enzimática de la endocelulasa se observó que la actividad enzimática no se afectó en presencia del extracto ya que presentó una actividad semejante en todos los tratamientos, lo que nos indicó que el extracto acuoso de *E. cyclocarpum* no afectó la actividad de la enzima endocelulasa.

Estos resultados nos llevaron a buscar los componentes fitoquímicos responsables del efecto antialimentario contenidos en el extracto acuoso de *E. cyclocarpum*, asumiendo que el compuesto mayoritario presente es el responsable del efecto. En la literatura encontramos que *E. cyclocarpum* es una especie arbórea con una gran riqueza alimenticia con un potencial uso agroforesteril en la alimentación de ganado. Sin embargo solo se encontró un dato reciente referente a la composición química del extracto acuoso y fue hecho por el grupo de investigación al cual estuve incorporada en el desarrollo de este trabajo, este fue; Raya y col., (2007) identificaron por medio de estudios de resonancia magnética nuclear al Pinitol, un compuesto de la familia química de los ciclitoles como el compuesto mayoritario presente en el extracto acuoso de *E. cyclocarpum*, del cual no se tiene reporte alguno de que tenga algún efecto tóxico contra insectos. Sin embargo es considerado como un promotor del crecimiento microbiano.

En este trabajo no se exploró el factor absorción intestinal sin embargo es una variable representativa para medir el contenido de azúcares libres y glucógeno, lo cual se llevará a cabo en estudios posteriores.

Los resultados encontrados en el presente trabajo nos indican que el extracto acuoso de *E. cyclocarpum* tiene una actividad antialimentaria sobre la termita *Incisitermes marginipennis* (Latreille). Que el efecto antialimentario no se debe al compuesto mayoritario, sino a los componentes minoritarios que se encuentran en el extracto o bien a la sinergia de todos los componentes.

Perspectivas

Los resultados obtenidos en el presente estudio servirán como base para la obtención de nuevos insecticidas biológicos que faciliten el control de plagas dañinas sin tener efectos tóxicos al hombre y al medio ambiente.

Otra forma de aplicar esta información es la identificación de los compuestos minoritarios para la obtención de análogos sintéticos, que faciliten el desarrollo de nuevos agroquímicos

Para la identificación y clasificación de la microbiota intestinal de la termita *Incisitermes marginipennis* (Latreille).

Todas estas posibles aplicaciones de los conocimientos básicos derivados de esta investigación pueden contribuir a aumentar y modificar las alternativas de manejo de plagas actualmente en uso, con el resultado final de una adecuada preservación del medio ambiente y el uso agroforesteril de esta especie.

IX CONCLUSION.

El extracto acuoso del duramen de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq) Griseb tiene un efecto disuasivo-antialimentario sobre la termita de madera seca *Incisitermes marginipennis* (Latreille)

X. BIBLIOGRAFIA

Abe T, Bignell DE, Higashi M (eds) (2000) Termites: Evolution, Sociality, symbiosis, Ecology. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.

Aguilar A, Zolla C. 1982. Plantas tóxicas de México. Unidad de Investigación Biomédica en Medicina Tradicional y Herbolaria IMSS. pg 46. México, D.F.

Anónimo, 1994b. Manual de Construcción para Estructuras Ligeras de Madera. Editorial COMACO. México, D.F. 472p.

Bourguet D, Genissel A, Baymond M, 2000. Insecticide, resistance and dominance levels. J. Econ. Entomol. 93:1588-1595.

Breznak JA, Pankratz HS. 1977. *In situ* morphology of the gut microbiota of wood-eating termites [*Reticulitermes flavipes* (Kollar) and *Coptotermes formosanus* Shiraki]. Appl. Environ. Microbiol. Feb; 33 (2):406-426.

Brook C. 2000. Selected plants of medicinal value in Costa Rica. University of New Hampshire. pp 1-4. England.

Brune A, Friedrich M. (2000). Microecology of the termite gut: structure and function on a microscale. *Curr. Opin. Microbiol.* 3: 263-269

Castro Ortíz R. 2006. Efecto biocida de los extractos vegetales de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq) Griseb y *Melia Azederach* L. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo. pp52.

De Pinto G, Ludovic C. 1986. Analytical study of the gum exudates from *Enterolobium cyclocarpum*. Act. Cient. Ven. 37:92-92.

De Pinto G, Martinez M, De Corredor A, Rivas C, Orlando E. 1994. Chemical and 14C NMR studies of *Enterolobium cyclocarpum* gum and Hs degradation products. Phytochemistry, 7:1311-1315.

Dixon Richard. Natural products and plant disease resistance: Plant defenses Rev. Nature, 2001, 411, 843pp.

Domínguez A, Franco R. 1979. Plantas medicinales de México XXXV Estudio químico de la corteza y fruto del guanacastle o parota *Enterolobium cyclocarpum*. Jacq. una leguminosa. Rev. Latinoam. Quim. 10:46

Duke SO.1990. Natural pesticides from plants. En: Advances in new crops. J. Janick y J. E. Simon (eds.). Timber Press. pp. 511-517

Escherich K. (1909). Die termiten oder weiBen Ameisen. Eine biologische Studie. Leipzig: Klinkhardt Verlag.

Espejel J. y Martínez E. 1979. El guanacaste. Inireb informa, Comunicado 33:1-6. Veracruz, Mex.

Evans, WC. 1991. Farmacognosia. Editorial Interamericana, 45: 692-714.

Ezeagu E, Petzke K, Lange E, Metges C. 1998. Fat content and fatty acid composition of oil extracted from select wild gathered tropical plant seed from Nigeria. J. Am. Oil Chem Soc. 75:1031-1035.

Flores Garcia A. 2004. Capacidad celulolítica de *Colletotrichum lindemuthianum* en la fase saprofitica. Tesis de Maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán. pp 95.

Freemark K, Boutin C. 1995. Agriculture,Ecosystems and Environment, 52:67-91.

Giral D, Echegoyen M. 1949. Determinaciones de treonina en alimentos mexicanos y en otros productos. Ciencia, 9:300-302

Gmelin R, Strauss G., Hasenmaier G. 1959. A new aminoacid from mimosaceae. Z. Physiol. Chem. 314:28-32.

González C. 1942. Estudio bioquímico de la parota (*Enterolobium cyclocarpum*). Tesis de la Escuela Nacional de Biología. Instituto Politécnico Nacional. Pp 1-90. México, D.F.

Graige MJ, Ahmed S. 2004. Crop Protection Handbook. Meister Media Worldwide, Willoughby, Ohio. Vol. 90, 900 pp.

Heiden P. 1991. Insecticidal constituents of *Azadirachta indica* and *Melia azedarach* (Meliaceae). In: Naturally occurring pest bioregulators. Heiden, P Ed. A C S Symp. Series, Washington, DC. pp 293-304.

López Villalobos M. 2006. Eliminación de pigmentos del extracto acuoso termicida de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq) Griseb. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán. pp 42.

Lowry DH, Rsenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem.193:268-275.

Mansaray MO. 2000. Herbal remedies - food or medicine? Chem. Ind. 20(16):677-678

Massiu G, Guzmán J, Cravioto R.1950. Contenido en aminoácidos indispensables en algunas semillas. Ciencia, 10:1424-1426

Mendieta R, Del Amor S. 1984. Catálogo de las plantas medicinales del Estado de Yucatán. pp 143. INIREB, CECSA, México.

Navas-Camacho A, Cuesta A, Anzola H, León J. 1993. Effect of supplementation with a tree legume forage on rumen function. Live. Res. Rur. Dev. 5:1-13.

Noato-Hubu, Igarashi K, Samejimat M, Pettersson B, Eriksson L, KE. 1997. Enhanced production of cellobiose dehydrogenase in cultured of *Phanerochaete chrysosporium* supplemented with bovine calf serum. Biotechnol. Appl. Biochem. 20:97-102.

Ottaway M. 2001. Botanical Pesticides: Past, present and future. En: Insecticides of Plant Origin. Arnason, J. T.; Philogene, B. J. R. y Morand, P. ACS Symposium Series, 387. 1-10.

Ramos Pantaleón D. 2003. Aislamiento y fraccionación de sustancias extraíbles de la madera de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. (parota). Tesis de Maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Mich. México.

Rao PJ, Maresh Kumar K, Singh S, Subrahmanyam S. 1999. Effect of *Artemisia annua* oil on development and reproduction of *Discercus koenigii* F. (Hem. Pyrrhocoridae). *J. Appl. Entom.* 5:315-318.

Raya González D, Martínez Pacheco MM, Flores García A, Morales López ME, Urrutia Hernández SE, N. Dasgupta-Shubert, V. Farias Rodríguez. Efecto del extracto acuoso de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. sobre la microbiota intestinal de la termita. 4o Congreso Forestal Cuba 2007.

Raya González D, Martínez Pacheco MM. 2006. Antitermite activity of *Enterolobium cyclocarpum* (jacq) Griseb. Aqueous extracts. *Journal of Applied Entomology* (en revisión)

Raya González D, Rutiaga Quiñones JG, Martínez Pacheco MM. 2005. Control de los barrenadores de madera seca *Lyctus* sp (Coleóptera:lyptidae) *Incisitermes marginipennis* (Latreille) (Isóptera:Kalotermitidae), con extractos de *Melia azederach* L., *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq) Griseb. *Nerium olander* L. IN: Congreso Nacional de Entomología. Sociedad Mexicana de Entomología A.C. (Resumen de Ponencias). Tapachula, Chiapas.721-725p.

Raya González D, Rutinaga Quiñones JG, Martínez Pacheco MM. 2006. Efecto tóxico de los extracto acuosos de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq). Griseb., de *Melia azedarach* L. y de *Nerium olander* l. III Foro de Investigación del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas. UMSNH.

Rodríguez H, Vendramin J. 1998. Uso de índices nutricionales para medir el efecto insecticida de extractos meliáceos sobre *Spodoptera frugiperda*. *Rev Manejo Integral de plagas (Honduras)*, 48 :11-18.

Rosales M, Lared M, Cuesta A, Anzola H, Hernández L. 1989. Use of tree foliages in the control of rumen protozoa. *Live. Res. Rur. Dev.* 1:78-84

Rutiaga Quiñónez JG, Windeisen E, Shumacher P. 1995. Antifungal activity of heartwood extracts from *Dalbergia granadillo* and *Enterolobium cyclocarpum*. *Halz als Rho und Werstoff.* 53:308-308

Serratos Avalos JC. 2001. Aislamiento y caracterización de proteínas de las semillas maduras de *Enterolobium cyclocarpum* para su aprovechamiento alimenticio. Tesis doctoral. Universidad de Colima. Tecoman, Col. México

Serratos J. 1989. Utilización de semillas de parota (*Enterolobium cyclocarpum*) para alimentación humana. Tesis de Maestría. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jal. México.

Silva G, Lagunes A, Rodríguez JC, Rodríguez D. 2002. Insecticidas vegetales; Una vieja-nueva alternativa en el control de plagas. Revista Manejo Integrado de Plagas (CATIE) (en prensa).

Smith HV, Gray JS, Mckenzie GA. 1991. Lyme borreliosis human serosurvey of asymptomatic adults. Zentralbl. Bakteriologie. 235(3):382-389.

Sotelo A, Lucas B, Uvalle A, Giral F. 1980. Chemical composition and toxic factors contents of sixteen leguminous seeds. Quart D. Crude Drugs Res. 18:9-16.

Stingl G, Aberer A, Silberer M, Kozsik F. 2000. Down regulation of MHC class II molecules on langerhans cells in acrodermatitis chronica atrophicans. Br J Dermatol; 143: 786-794.

Stoll G. 1989. Protección natural de cultivos en zonas tropicales. J. Margaf Ed.

Swan T, Hills WE. 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica* I. The quantitative analysis of phenolic constituents. J. Sci. Food Agric. 10: 6368.

Tripathi AK, Prajapati V, Aggarwal KK, Khanuja SPS. 2000. Repellency and toxicity of oil from *Artemisia annua* to certain stored-product beetles. J. Econ. Entomol. 93:43-47.

Tripathi AK, Prajapati V, Aggarwal KK, Kumar S. 2001. Toxicity, feeding deterrence, and effect of activity of 1,8-cineole from *Artemisia annua* on progeny of *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). J. Econ. Entomol. 94:79-83.

Ware GW, Whitacre DM. 2004. The Pesticide Book, 6th Ed. 496 pp. Meister Media Worldwide, Willoughby, Ohio USA (ISBN 1892829-11-8)

Waterhouse D, Carman WJ, Schottenfeld D, Gridley G, MacLean S. 1996. Identifying population potentially exposed to agricultural pesticides using remote sensing and geographic information system. Cancer, 77:763-770.

Wiseman S, Eggleton P. 1994. The Termitide Marked. Agrow report DS 88. PJB Publications, Richmond, Surrey, UK.

Yamin, M.A. 1979. Flagellates of the orders *Trichomonadida* Kirby, *Oxymonadida* Grasse, and *Hypermastigida* Grassi & Foa reported from lower termites. Sociobiology, 4:1-119.

Direcciones electrónicas.

Boletín de la SSA. Infecciones Intrahospitalarias.
www.salud.gob.mx/infecciones/intrahospitalarias2006

http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/41-legum16m.pdf1998

Clement. 2000. www.osasun.cl/paginas/termitas.htm

Insecticide Resistance Action Committee (<http://www.plantprotection.org/irac/>)

<http://www.Lamotina.edu.pe/insect/toxicologia/insecticidas.>+

Menjívar, R. Insecticidas naturales. Riesgos y Beneficios. 2001.
www.elsalvador.com/hablemos/Ediciones/290701/actualidad.htm [5/5/004]
Pesticide.Net- Pesticide News, Information and Resources (<http://www.pesticide.net/>)

<http://www.uturonto.ca/forest/termite/flagella.html>

Sanchez, T. Contaminación del suelo y lucha biológica. 2002
www.corazonverde.org/proyectos/ecojardin.html

ANEXO 1.

Distribución de *Incisitermes* (Kaloterme)

ESPECIE		HOLOTIPO	DISTRIBUCION
<i>Incisitermes arizonensis</i> (Snyder)	<i>Kaloterme arizonensis</i> snyder	USNM (soldado)	Arizona Butte Copper Canyon
<i>Incisitermes banksi</i> (Snyder)	<i>Kaloterme banksi</i> Snyder <i>Incisitermes banksi</i> Krishna <i>Kaloterme lighti</i> Snyder	USNM (soldado)	Arizona Butte Copper Canyon
<i>Incisitermes banksi</i> (Snyder)	<i>Kaloterme texanus</i> snyder	USNM USNM (imago)	Texas, chalk Bluff Arizona, Sabino Canyon
<i>Incisitermes bequaerti</i> (Snyder)	<i>Kaloterme bequaerti</i> Snyder <i>Incisitermes bequaerti</i> Krishna	USNM, AMNH MCZC	Cuba Antillas, Bermuda
<i>Incisitermes emersoni</i> (light)	<i>Kaloterme emersoni</i> light <i>Incisitermes emersoni</i> Krishna	USNM (soldado)	México
<i>Incisitermes galapagoensis</i> (Banks)	<i>Caloterme galapagoensis</i> <i>Incisitermes galapagoensis</i> Krishna	CASC (imago)	Ecuador Islas Galápagos
<i>Incisitermes Immigrans</i> (Snyder)	<i>Incisitermes Immigrans</i> Krishna <i>Incisitermes Immigrans</i> Gay <i>Kaloterme immigrans</i> Snyder <i>Kaloterme (Kaloterme) clevelandi</i> Snyder <i>Caloterme curvithorax</i> Kelsey <i>Kaloterme marjoriae</i> Snyder	USNM Auckland Museum USNM	Panamá Phoenix Hawaii Peru, América Central, Islas Galápagos
<i>Incisitermes incisus</i> (silvestri)	<i>Caloterme incisus</i> Silvestri <i>Incisitermes incisus</i> Krishna	LEFS AMNH	Venezuela Barbados
<i>Incisitermes marginipennis</i> (Latreille)	<i>Termes marginipenné</i> (Latreille) <i>Kaloterme marginipennis</i> Light <i>Incisitermes marginipennis</i> Krishna <i>Termes mexicanus</i> Walker <i>Kaloterme montanus</i> Snyder <i>Kaloterme tuberculifrons</i> Snyder	BMNH USNM USNM	México México, DF México Guatemala
<i>Incisitermes milleri</i> (Emerson)	<i>Kaloterme milleri</i> Emerson <i>Incisitermes milleri</i> Krishna	AMNH (imago)	Florida Elliot Key Jamaica
<i>Incisitermes minor</i> (Hagen)	<i>Caloterme marginipennis minor</i> Hagen <i>Kaloterme minor</i> Banks & Snyder <i>Incisitermes minor</i> Krishna <i>Kaloterme minor</i> Snyder	MCZC	San Diego California Canadá Toronto
<i>Incisitermes nigrinus</i> (Snyder)	<i>Kaloterme nigrinus</i> Snyder <i>Incisitermes nigrinus</i> Krishna	USNM, AMNH	México Guatemala
<i>Incisitermes platycephalus</i> (light)	<i>Kaloterme platycephalus</i> Ligth <i>Incisitermes platycephalus</i> Krishna	USNM	Costa del Sur y Este de México Madrid
<i>Incisitermes rhyzophorae</i> (Hernández)	<i>Incisitermes rhyzophorae</i> (Hernández)	ACCU	Cuba Las Tunas Sevilla
<i>Incisitermes schwarzi</i> (Banks)	<i>Incisitermes schwarzi</i> Krishna	USNM MCZC	Florida México Yucatán Bahamas
<i>Incisitermes snyderi</i> (light)	<i>Kaloterme snyderi</i> Ligth <i>Kaloterme marginipennis</i> Banks & Zinder <i>Incisitermes snyderi</i> Krishna	USNM	Texas Carolina del Sur Florida Costas de México Panamá
<i>Incisitermes seeversi</i> (Snyder & Emerson)	<i>Kaloterme seeversi</i> Snyder&Emerson <i>Kaloterme perparvus</i> Ligth <i>Incisitermes seeversi</i> Krishna	USNM	México Islas Madre María