



FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
“DR. IGNACIO CHAVEZ”
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

T E S I S

“ESTUDIO TOXICÓLOGICO DEL EXTRACTO ACUOSO DE DURAMEN DE *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq) Griseb”

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN FARMACOLOGIA BASICA

PRESENTA

Q.F.B. JUDITH CHAVEZ DURAN

ASESORES

M. F. B. MARIA EUGENIA MORALES LOPEZ

D. C. MAURO MANUEL MARTINEZ PACHECO

MORELIA, MICHOACAN

MEXICO

2008

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Los plaguicidas en México.	3
2.2 Conceptos básicos de la toxicología de los plaguicidas.	5
2.3 Estrategia oficial para reducir el impacto negativo de los plaguicidas.	9
2.4 Plaguicidas alternativos.	9
2.4.1 Plaguicidas naturales.	10
2.4.2 Repelentes de Insectos.	11
2.4.3 Insecticidas inorgánicos.	12
2.4.4 Insecticidas bio-rationales.	13
2.5 Preservación de madera.	14
2.5.1 <i>Incisitermes marginipennis</i> un agente que causa biodeterioro en la madera seca.	14
2.6 Biología de las termitas.	15
2.7 Plaguicidas botánicos.	22
2.7.1 Durabilidad natural de la madera como fuente de Insecticidas.	22
2.7.2 <i>Enterolobium cyclocarpum</i> (Jacq) Griseb.	24
III. JUSTIFICACIÓN	32
IV. HIPÓTESIS	34
V. OBJETIVOS	34
5.1 Objetivo general.	34
5.2 Objetivos particulares.	34
VI. Desarrollo experimental	35
6.1 Material Biológico	35
6.2 Medios de cultivo	36
6.2.1 Condiciones de cultivo	38
6.3 Obtención de los extractos acuosos.	38

6.3.1 Determinación de la concentración del extracto acuoso de duramen de <i>E. cyclocarpum</i> (Jacq) Griseb.	39
6.4 Métodos experimentales	39
6.5 Ensayos de toxicidad aguda en animales	40
6.5.1 Ensayo con el crustáceo <i>A. salina</i> .	40
6.5.2 Ensayo con <i>I. Marginipennis</i> .	41
6.5.3 Ensayo en Ratas.	41
6.6 Ensayos de toxicidad aguda con microorganismos.	42
6.6.1 Ensayo para determinar la actividad antibacteriana del extracto acuoso de <i>E. cyclocarpum</i> sobre bacterias de Interés clínico.	42
6.6.2 Ensayo con el hongo y el oomiceto.	42
6.4.3 Ensayo en la línea celular tumoral de glándula mamaria humana MCF-7.	43
6.5 Lixiviación del extracto acuoso de <i>E. cyclocarpum</i> en discos de madera de pino.	43
VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS	44
VIII. RESULTADOS	45
8.1 Determinación de la toxicidad aguda en animales provocada por el extracto acuoso de madera de duramen de <i>E. cyclocarpum</i> .	45
8.1.1 Efecto tóxico agudo de <i>A. salina</i> causado por el extracto acuoso de <i>E. cyclocarpum</i> .	45
8.1.2 Toxicidad aguda en la termita de madera seca <i>I. marginipennis</i> .	45
8.1.3 Toxicidad aguda en las ratas Wistar macho causada por el extracto acuoso de madera de duramen de <i>E. cyclocarpum</i> .	47
8.2 Determinación de la toxicidad aguda en otros organismos causada por el extracto acuoso de madera de duramen de <i>E. cyclocarpum</i> .	47
8.2.1 Ensayo de inhibición del crecimiento en bacterias.	47

8.2.2 Efecto tóxico en el hongo <i>C. albicans</i> y en el oomicete <i>P. cinnamomi</i> .	48
8.2.3 Efecto tóxico en línea celular MCF-7 y Fibroblastos 3T3 de ratón.	48
8.3 Lixiviación del extracto acuoso de <i>E. cyclocarpum</i> de los discos de madera de pino.	49
IX. DISCUSIÓN	51
X. CONCLUSIÓN	56
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

RESUMEN

La potencial aplicación de un extracto acuoso obtenido de duramen de *E. cyclocarpum* en la protección de maderas al biodeterioro causado por barrenadores de madera seca, condujo a determinar la posible toxicidad aguda de este extracto. Para ello se determinaron las concentraciones letales medias en organismos de diferentes niveles tróficos aceptados ampliamente como indicadores de toxicidad aguda y de citotoxicidad.

La toxicidad aguda causada por el extracto acuoso de *E. cyclocarpum* en las ratas Wistar fue nula, únicamente se observó erizamiento de pelos y una disminución de la actividad motora en las ratas que fue superado después de tres horas. Se determinó la concentración letal media (CL₅₀) del extracto acuoso *E. cyclocarpum* sobre el crustáceo *A. salina*, que fue de 1300 µg. Mientras que para el organismo blanco, las termitas de madera seca de la especie *I. marginipennis*, el extracto acuoso exhibió un efecto antitermita en ensayos de alimentación forzada que dependió de periodos largos de tiempo y de la concentración. La mortalidad de las termitas aumentó en función de la concentración del extracto alcanzando el 50% de muerte a la concentración de 0.56 mg de equivalentes fenólicos/ml. El tiempo efectivo de muerte fue a las cinco semanas (TL₅₀). En los aislados clínicos bacterianos, no se observó efecto inhibitorio del crecimiento a una concentración de 1 mg, a excepción de la bacteria *K. pneumoniae* en la que se observó inhibición del crecimiento a una concentración de 0.3 mg, mientras que en el hongo dimórfico *C. albicans* y el oomiceto *P. cinnamomi* no afectó el crecimiento. No presentó efecto tóxico agudo en línea celular MCF-7 ya que la CL₅₀ fue de 133.26 µg y para fibroblastos 3T3 de ratón fue de 170 µg, considerando que la actividad citotóxica es menor <100 µg para extractos vegetales. El extracto acuoso de *E. cyclocarpum* es lixiviable en condiciones extremas, lo cual no es relevante por los datos anteriormente expuestos que demuestran su inocuidad y se puede utilizar como protector de madera seca que se utilizará en interiores. Por lo anterior se concluye que el extracto acuoso obtenido de madera de duramen de *E. cyclocarpum* no indujo efectos tóxicos en los organismos probados por lo que se sugiere que es inocuo por lo que se puede usar con seguridad en la protección de la madera.

I. Introducción

La necesidad de producir alimentos y otros bienes de consumo susceptibles de biodeterioro, la pujante industrialización, los intereses económicos de los grandes productores de plaguicidas, así como, la necesidad de controlar químicamente las plagas, favoreció la fabricación de plaguicidas eficaces obtenidos por síntesis química, lo que provocó una gran demanda y aplicación a escala mundial, que hasta nuestros días ha sido un factor clave en la vida productiva de las naciones.

En el presente, los plaguicidas sintéticos son usualmente considerados la manera más eficaz y rápida de combatir a los insectos plaga, pero su uso desmedido e indolente ha causado serios problemas como toxicidad a otros organismos, resistencia, resurgencia de plagas y la aparición de plagas secundarias por eliminación de sus enemigos naturales (van Emden, 1992).

El Código Internacional de Conducta Sobre la Distribución y Uso de Plaguicidas de la Food and Agriculture Organization (FAO, por sus siglas en inglés) de las Naciones Unidas establece que un plaguicida es:

una sustancia o mezcla de ellas, destinada a prevenir, destruir o controlar plagas, incluyendo los vectores de enfermedad humana o enfermedad, las especies no deseadas de plantas o animales que ocasionan un daño verdadero o otras que interfieren con la producción procesamiento, comercialización y transporte; los artículos agrícolas de consumo, la madera y sus productos, el forraje para animales o los productos que pueden administrárseles para el control de insectos, arácnidos u otras plagas corporales. (The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification, 2004).

En este trabajo se estudió el sofisticado campo de los plaguicidas y la re-evaluación de los plaguicidas naturales tomando como modelo de estudio a la preservación de la madera seca de baja durabilidad o perecedera derivada de especies maderables económicamente importantes, tal como el pino y el encino. Para ello fue necesario revisar la situación general de los plaguicidas en México, la estrategia oficial para reducir el impacto negativo de los plaguicidas, los plaguicidas en la preservación de la madera y uno de los

organismos que la deterioran así como algunos conceptos y definiciones básicas utilizadas en la toxicología moderna. Para utilizarlos en un estudio toxicológico de un extracto acuso obtenido de madera de duramen de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq) Griseb del que se demostró que posee propiedades disuasivas sobre dos insectos barrenadores de madera seca conocidos genéricamente como polilla; el líctido *Lyctus planicollis* Le Conte y la termita *Incisitermes marginipennis* Latreille (Raya González, 2007).

Estas bases teóricas y otros planteamientos serán desarrollados en los siguientes apartados de este manuscrito que soporta el trabajo experimental que se realizó para probar la hipótesis de que el extracto acuso obtenido de madera de duramen de *E. cyclocarpum* (Jacq) Griseb no tiene efectos de toxicidad aguda sobre los organismos indicadores utilizados en este estudio.

II. ANTECEDENTES

2.1 Los plaguicidas en México

El uso continuo e indiscriminado de plaguicidas sintéticos, no solo han causado enfermedades y muertes por envenenamientos a corto y largo plazo. También han afectado al medio ambiente, acumulándose por bioconcentración en organismos de los distintos eslabones de la cadena alimenticia, en el suelo y en el agua. Además, son responsables de inducir la resistencia a insecticidas en los insectos, sin por ello restar importancia a la destrucción de parásitos, predadores naturales y polinizadores, entre los otros tantos integrantes del ecosistema que han visto alterado su ciclo de vida a causa de estos productos (Freemark, 1995; Bourguet, 2000).

El uso y abuso irracional de plaguicidas va en aumento, en el 2007 el Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática de México (INEGI) realizó un estudio acerca de la producción de plaguicidas en nuestro país, ver la Figura 1. En 1996 se producían 35,000 toneladas de plaguicidas y en el 2006 se produjeron más de 45,000 toneladas, destacando que del 2004 al 2006 hubo un incremento en la producción de más de 10,000 toneladas. Lo cual nos indica que la producción de plaguicidas tiende a la alza. En este contexto y en este trabajo no se consideró el consumo de plaguicidas importados, ver el Cuadro 1.

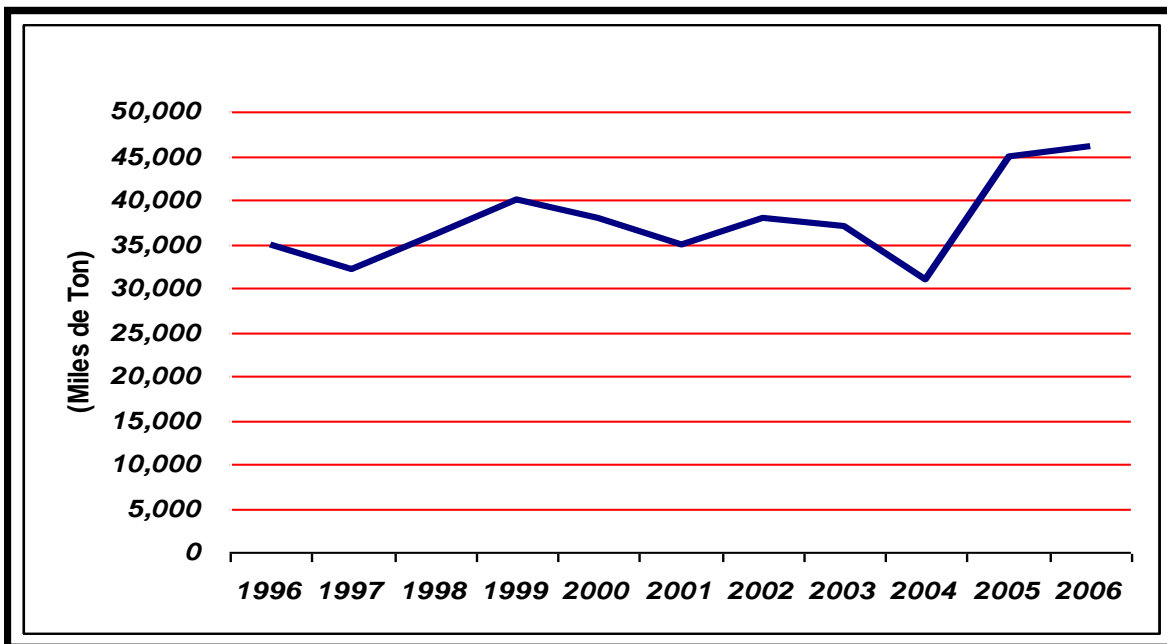


Figura 1. Producción de plaguicidas en México en la década 1996 a 2006. (INEGI 2007)

Cuadro 1. Consumo nacional de plaguicidas utilizados en la preservación y conservación de madera seca.

Consumo nacional de 36,000 Tn/año	Composición de plaguicidas comerciales (Prohibidos en 49 países)
490 plaguicidas comerciales	Clordano
458 permitidos por la Norma Oficial Mexicana	DDT
32 estrictamente prohibidos	Lindano
	Paraquat
Usos de plaguicidas comerciales	Paration metílico
370 marcas son de uso agrícola	Pentaclorofenol
70 marcas de uso urbano y pecuario	
50 marcas son de uso doméstico, industrial y forestal.	

Por ejemplo en la agricultura se han observado casos dramáticos del impacto negativo de los plaguicidas, causado por una práctica indolente debida a la falta de conocimiento de la peligrosidad del plaguicida y de la desesperación por la obtención de una cosecha económicamente redituable. Se estima que cada año se producen 25 millones de casos de envenenamiento a causa de

plaguicidas y alrededor de 20,000 muertes involuntarias, sobre todo en los países en vía de desarrollo (Organización Mundial de la Salud, 2005).

Los efectos a largo plazo de la exposición habitual a los plaguicidas provocan a menudo enfermedades crónicas como el cáncer, así como trastornos neurológicos, teratogénesis, mutagénesis, efectos en el hígado, alteraciones hormonales, en el sistema inmune y del aparato reproductor. En buena parte de los países más pobres las sustancias agroquímicas se utilizan o se almacenan sin tener en cuenta las normas más elementales de seguridad. Por los fuertes intereses socioeconómicos, continúa la producción e importación de plaguicidas baratos pero muy tóxicos, como los organofosforados y los carbamatos (OMS). La interacción de un tóxico con el organismo comienza con la fase de exposición. Cuyas vías pueden ser: las respiratorias (inhalación), la tegumentaria (piel y mucosas) y la vía gastrointestinal, ver la Figura 2.

En el 2001 la Comisión Federal de Protección Contra Riesgos Sanitarios dependencia de la Secretaría de Salud de México (COFEPRIS) realizó una encuesta al nivel nacional acerca de intoxicaciones agudas causadas por plaguicidas en donde el estado de Michoacán se ubica en tercer lugar de intoxicaciones por el uso de plaguicidas con 177 casos, ver la Figura 3.

También se ha observado una alteración del equilibrio ecológico al eliminar uno o varios eslabones de cadenas tróficas, lo que ha provocado la aparición de nuevas plagas por la ausencia de predadores o competidores. La acumulación en el suelo o en las aguas puede dañar a posteriores cultivos en esa zona o si se abusa de la dosis, por ejemplo, tener un efecto fitotóxico en el propio cultivo.

2.2 Conceptos básicos de la toxicología de los plaguicidas

Sin embargo, al paso de algunos años de abuso de plaguicidas se han hecho evidentes los efectos indeseables de estas sustancias sobre la salud del ser humano y del medio ambiente. Independientemente de sus beneficios, los plaguicidas que son sustancias químicas y biológicas deliberadamente tóxicas, creadas para interferir algún sistema biológico en particular y que la mayoría de los plaguicidas convencionales carecen de selectividad real.

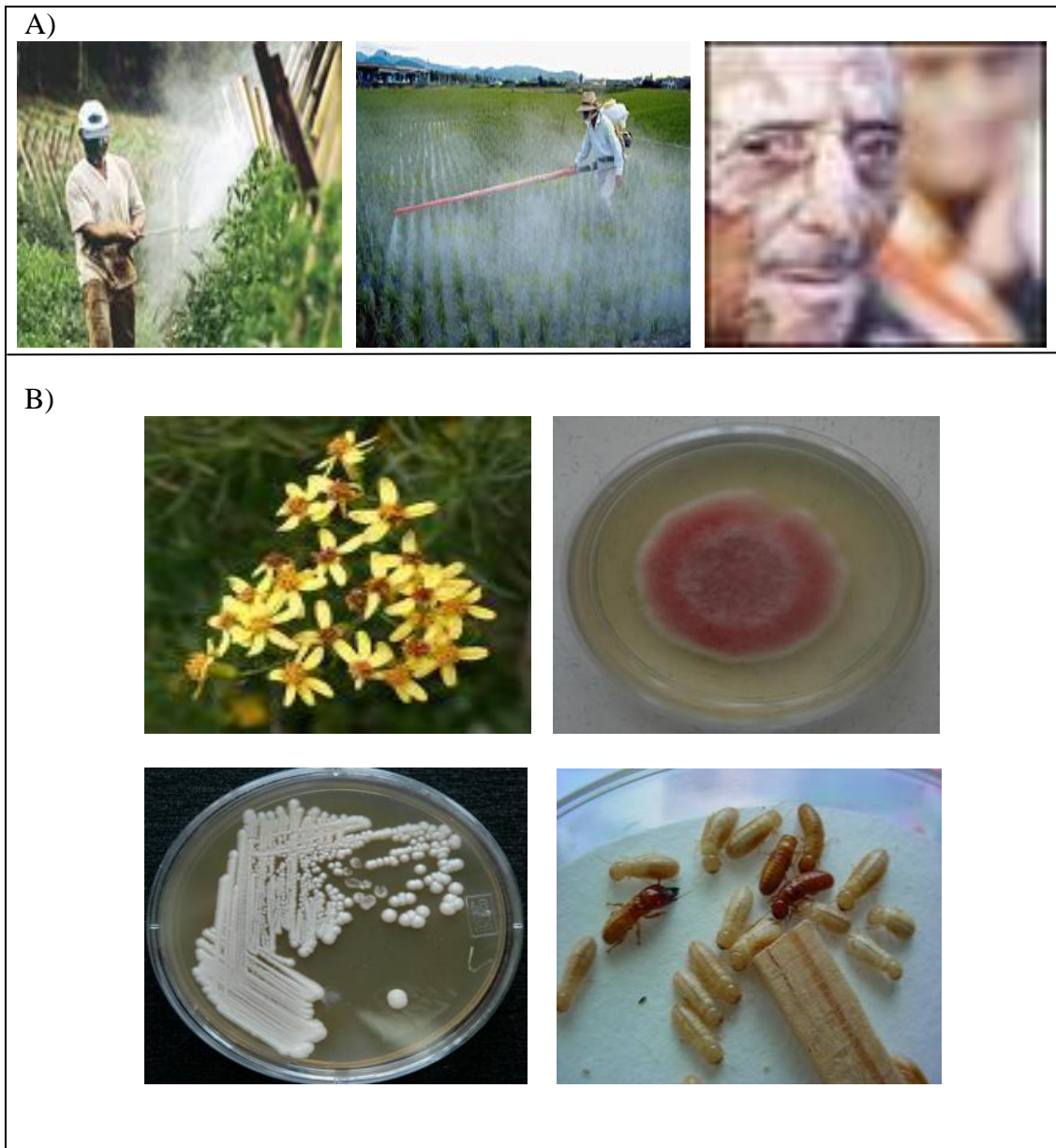


Figura 2. Daños causados por los plaguicidas convencionales. A) Nulas medidas de seguridad de aplicación y efectos a largo plazo de exposición a los plaguicidas provocan a menudo enfermedades crónicas como el cáncer. B) Resistencia del uso de plaguicidas en plantas (malezas), hongos, bacterias e insectos.

Afectan simultáneamente a la especie blanco como a otras categorías de seres vivos, particularmente al ser humano. Que tienen que ser estudiadas con la disciplina de la Toxicología, que estudia a estas sustancias en función de 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. La relación entre la dosis del tóxico absorbido por un organismo vivo y su efecto se describen por: la toxicocinética y la toxicodinamia. La primera comprende la absorción y distribución del tóxico

y la toxicodinamia los efectos bioquímicos y fisiológicos de los tóxicos, así como su mecanismo de acción.

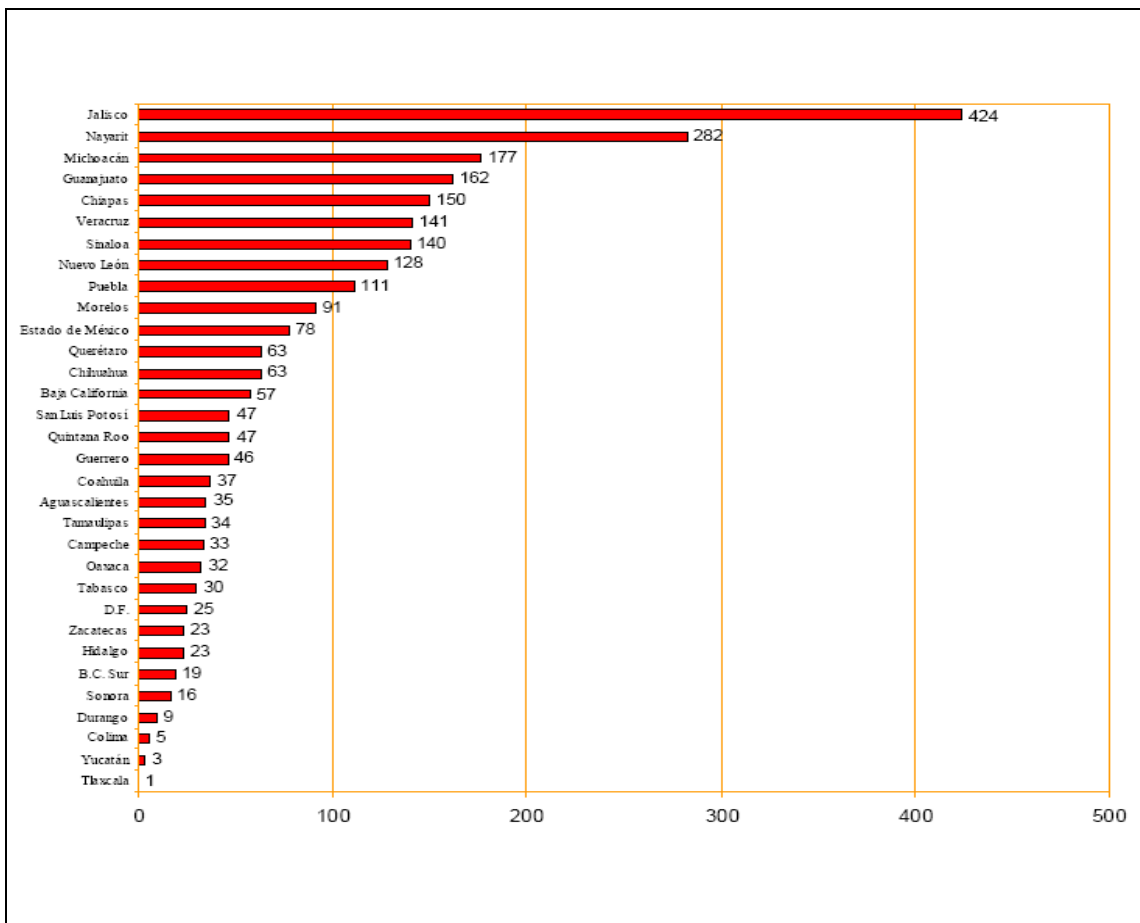


Figura 3. Intoxicaciones por el uso de plaguicidas a nivel nacional (COFEPRIS 2001).

Sin embargo se requiere puntualizar lo siguiente: Se define como **veneno** a aquellas sustancias que ha sido suministrada con fines lesivos premeditados, y **tóxico** a la sustancia que aunque pueda ocasionar daño no se suministra con esta intención. Normalmente veneno es cualquier sustancia de naturaleza intrínsecamente peligrosa aún en pequeñas dosis, tales como el cianuro, el arsénico, plomo, etc.; y tóxico (del latín *toxicum* y del griego *toxikón*) es aquella sustancia que puede ocasionar daño pero no por la naturaleza misma de la sustancia, ejemplo de ello sería el agua, oxígeno, etc. o bien, cualquier elemento ingerido, inhalado, aplicado, inyectado o absorbido, que por sus propiedades físicas o químicas es capaz de provocar alteraciones orgánicas o funcionales y la muerte.

Los tóxicos se clasifican en químicos y físicos. Los tóxicos químicos pueden ser a su vez tóxicos de origen mineral, vegetal, animal y sintético. Estos últimos, creados por el hombre y que inundan cada vez más todos los ambientes. Los plaguicidas se clasifican en función de algunas de sus características principales como son la toxicidad aguda, la vida media, la estructura química y su uso, por ejemplo, considerando la vida media los plaguicidas se clasifican en permanentes, persistentes, moderadamente persistentes y no persistentes.

En la clasificación de la toxicidad de los plaguicidas los indicadores son la toxicidad aguda límite y la crónica, aunque por mucho tiempo se ha intentado desarrollar un sistema práctico para evaluarlos. El indicador para medir la toxicidad más comúnmente utilizado es el propuesto por la Organización Mundial de Salud (OMS) es la Dosis Letal 50 (DL_{50}/CL_{50}) que se define como “la cantidad mínima de una sustancia, generalmente expresada en mg/kg, que es capaz de matar al 50 % de la una población de animales de prueba”. Los resultados de la DL_{50}/CL_{50} obtenidos para una sustancia dada se extrapolan a los humanos y sirven de base para los sistemas de clasificación de toxicidad.

En México el catálogo de plaguicidas de la Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICLOPLAFEST) adopta la clasificación de la toxicidad aguda recomendada por la OMS, con base en la DL_{50} obtenida en ratas cuando el plaguicida se administra por vía oral. La clasificación según estos criterios se anota en el siguiente Cuadro 2.

Cuadro 2. Valores que indican la categoría toxicológica.

Categoría	Tipo Toxicológico	DL_{50} en mg/kg de masa corporal
Extremadamente tóxico	I	< 5.0
Altamente tóxico	II	5.0-50.0
Moderadamente tóxico	III	50.0-500.0
Ligeramente tóxico	IV	>500.0

Fuente: Catálogo Cicoplafest, 1998.

La toxicidad se mide a través de la dosis letal media (DL_{50}) o de la concentración letal media (CL_{50}), aunque ambos parámetros varían conforme a

múltiples factores como la presentación del producto (sólido, gel, líquido, gas, polvo, etc.), la vía de entrada (oral, dérmica, respiratoria), la temperatura, la dieta, la edad, el sexo, etc. Al basarse en la observación de especies animales es importante señalar que estos indicadores no proporcionan información sobre los efectos crónicos, ni sobre la citotoxicidad de algún compuesto.

Los plaguicidas se distribuyen en los vertebrados a través del torrente sanguíneo. Los compuestos liposolubles se unen a las lipoproteínas, mientras que las moléculas hidrosolubles lo hacen a las proteínas plasmáticas o permanecen disueltas en la sangre. Según su afinidad el plaguicida se fijará en órganos o tejidos específicos, como el hígado o los riñones y aquellos que son lipofílicos que se acumulan en los tejidos como el adiposo y el nervioso, tal es el caso del DDT (Tomlin, 2000).

2.3 Estrategia oficial para reducir el impacto negativo de los plaguicidas

El impacto negativo de los plaguicidas utilizados en la producción agrícola e industrial es tan grande y devastador que las autoridades de casi todos los países incluyendo a México han implementado acciones para la regulación sanitaria de los plaguicidas tendientes a mitigar el impacto negativo y prescindir del plaguicida. Sin embargo las autoridades sanitarias enfrentan el reto de adaptar o desarrollar métodos para estimar la exposición humana a los diversos riesgos ambientales, hacer diagnósticos integrales de exposición y priorizar sus acciones. Entre 1995 y 2000 se presentaron en México 28,734 casos de intoxicación por plaguicidas registrados en el Sistema Nacional de Salud.

Así, para el sexenio 2000-2005 el objetivo principal del Programa Nacional de Salud Mexicano fue reducir en 15% la exposición promedio de contaminantes atmosféricos en la población general, atender y resolver el 65% de las enfermedades ocupacionales. La exposición tanto en el hogar como en el lugar de trabajo a un gran número de sustancias químicas como lo son los artículos para limpieza, plaguicidas residuales en los alimentos, subproductos de la combustión de energéticos y otros artículos específicos conteniendo asbesto, ftalatos y metales pesados entre otros.

Cada año se suman a las ya existentes, miles de nuevas sustancias químicas que se deben de evaluar para conocer, principalmente, sus efectos a la salud y al medio ambiente. Para esto, en 1987 se creó en México la Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas y Peligrosas (CICLOPLAFEST), formada por las secretarías de Salud, Medio Ambiente y Recursos Naturales, Economía y Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación, que tiene como una de sus funciones principales, la de coordinarse en materia de definición de políticas con relación a plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas. Como resultado de las interrelaciones que en materia de exposición laboral y de las implicaciones durante el transporte de sustancias tóxicas, es que se propone la inclusión de las Secretarías de Comunicaciones y Transportes y de la de Trabajo y Previsión Social a la CICLOPLAFEST (Programa de Acción Salud Ambiental SSA, 2002).

2.4 Plaguicidas alternativos

Otra alternativa es el uso de plaguicidas menos dañinos al medio ambiente, al hombre y con menos efectos colaterales. La búsqueda de métodos para la protección natural de cultivos sigue vigente aun cuando en el mercado se ofrece una amplia variedad de productos. La naturaleza nos proporciona medios para la protección contra depredadores y microorganismos plaga que merecen atención. Estos se originan en la riqueza intrínseca de las especies y que surgen de la lucha por la supervivencia. La protección natural de cultivos reduce el riesgo de la resistencia en los insectos, tiene menos consecuencias letales para los enemigos naturales, reduce la aparición de plagas secundarias, es menos nocivo para el hombre y no ocasiona daños en el medio ambiente (Stoll, 1989).

Tal diversidad química en todos los reinos es consecuencia del proceso evolutivo que ha llevado a la selección de especies con mejores defensas contra el ataque microbiano o la depredación de insectos y animales (Dixon, 2001). Hoy en día se sabe que estos metabolitos secundarios tienen una función importante en el mecanismo de defensivo de las plantas (Jacobson, 1989). Por lo tanto en los últimos años se esta retomado al uso de las plantas

como una fuente de plaguicidas más seguros para el medio ambiente y la salud humana (Ottaway, 2001; Mansaray, 2000). Entendiendo que los plaguicidas pueden ser clasificados de acuerdo a diversos criterios, por ejemplo al tipo de organismo frente a los cuales son eficaces: funguicidas, herbicidas, insecticidas, moluscicidas, nematocidas, rodenticidas, etc. (Evans, 1991).

Sin lugar a dudas la re-evaluación de los insecticidas naturales a partir de extractos vegetales constituye un marco interesante para plantear alternativas de control de insectos objetivo. Además de que solo se ha evaluado un número pequeño de plantas en relación al total de especies vegetales que habitan el planeta, por lo que las perspectivas futuras de encontrar moléculas vegetales para el control de plagas, son prometedoras.

2.4.1 Plaguicidas naturales

Los primeros registros de insecticidas corresponden a la quema de azufre como fumigante (Año 23 A.D). Al comienzo de la Segunda Guerra Mundial (1939) nuestra selección de insecticidas se limitaba a varios arsenicales, aceites de petróleo, nicotina, piretro, rotenona, azufre, gas de hidrógeno y creolita. La 2ª Guerra Mundial fue la que abrió el control de la “*era de la química moderna*” con la introducción de un nuevo concepto en el control de insectos, los insecticidas orgánicos sintéticos, el primero de los cuales fue el dicloro-difenil-tricloroetano (DDT).

2.4.2 Repelentes de Insectos

Históricamente, los repelentes han incluido humo, plantas que cuelgan dentro de las habitaciones o que son frotadas sobre la piel como plantas frescas o como sus coceduras, aceites, breas, alquitranes y varias tierras aplicadas al cuerpo.

En la historia reciente, los repelentes han sido dimetil ftalato, Indalone R, Rutgers 612R, dibutilftalato, sustancias patentadas bajo la denominación de repelentes MGK (McLaughlin Gormeneley King), benzoil benzonantato, dimetil carbamato, dietil toluamina y derivados del citronelol.

En 1999, Environmental Protection Agency de EE.UU (EPA por sus siglas en inglés) ha registrado un nuevo repelente de insectos, N-metil *neo*-decamida. En lugar de ser usado sobre los humanos para repeler a los insectos, se aplica a los pisos, paredes y otras superficies de las casas para repeler cucarachas y hormigas.

2.4.3 Insecticidas inorgánicos

Son insecticidas inorgánicos aquellos que no contienen carbono. En su estado natural usualmente son cristales blancos, parecidos a las sales. Son productos químicos estables, no se evaporan y usualmente son solubles en agua. Como por ejemplo: Antimonio, Arsénico, Boro, Flúor, Mercurio, Selenio y Talio. Los arsenicales desacoplan la fosforilización oxidativa, inhiben ciertas enzimas que contienen grupos sulfhidrilos (-SH) y coagulan la proteína haciendo que cambie la forma (Aspelin y Grube, 1998).

Los fluoruros inorgánicos inhiben muchas enzimas que contienen hierro y calcio, magnesio. Varias de estas enzimas están involucradas en las células productoras de energía, como en el caso de las fosfatasas y las fosforilasas (Thomson, 2001a).

El ácido bórico tiene la más alta actividad residual de todos los insecticidas usados para insectos rastreros de las casas. Funciona como un veneno estomacal y absorbe la cera de la cutícula de los insectos (Thomson, 2001b).

El borato de sodio se parece al ácido bórico en su modo de acción. Esta sal soluble en agua se usa para preservar madera y productos de lana para el control de hongos de la pudrición, termitas y otras plagas que infestan la madera.

El último grupo de insecticidas inorgánicos es el de los geles de sílice. Estos matan a los insectos al absorber las ceras de la cutícula de los insectos, permitiendo la pérdida continua de agua del cuerpo del insecto, haciendo que los insectos se des sequen y mueran por deshidratación.

2.4.4 Insecticidas bio-rationales

La EPA-USA identifica a los plaguicidas bio-rationales como inherentemente diferentes de los pesticidas convencionales, que tienen modos de acción fundamentalmente diferentes y en consecuencia reducen el riesgo de efectos adversos como resultado de su uso. **Bio-racional** ha venido a significar *“cualquier sustancia de origen natural o también sustancias hechas por los humanos que se parecen a las de origen natural, que tiene un efecto negativo o letal sobre plagas objetivo específicas, por ejemplo, insectos, malezas, enfermedades de las plantas (incluyendo nemátodos) y vertebrados”*.

Poseen un modo de acción único, no son tóxicos a los humanos ni a sus plantas o animales domésticos y tienen un efecto que no es adverso o lo es muy poco, sobre la vida silvestre y el medio ambiente. La EPA coloca los bio-plaguicidas en tres categorías:

- 1) Plaguicidas microbianos (bacterias, hongos, virus o protozoarios).
- 2) Bioquímicos: sustancias naturales que controlan plagas mediante mecanismos no tóxicos. Por ejemplo las feromonas de los insectos.
- 3) Protectores incorporados a las plantas (PIPs) (principalmente plantas transgénicas, por ejemplo, maíz Bt, transgénico con la proteína insecticida de *Bacillus thuringensis*).

La EPA informó que para finales del 2001 había casi 200 ingredientes activos de bio-plaguicidas registrados que agrupa a cerca de 800 productos.

Las características que distinguen los bio-plaguicidas y los bio-rationales de los convencionales incluyen: muy bajos niveles de toxicidad para especies que no son objetivos, las plagas objetivos son específicas, generalmente las dosis de uso son bajas, rápida descomposición en el medio ambiente y reducen la dependencia en los productos plaguicidas convencionales.

2.5 Preservación de madera

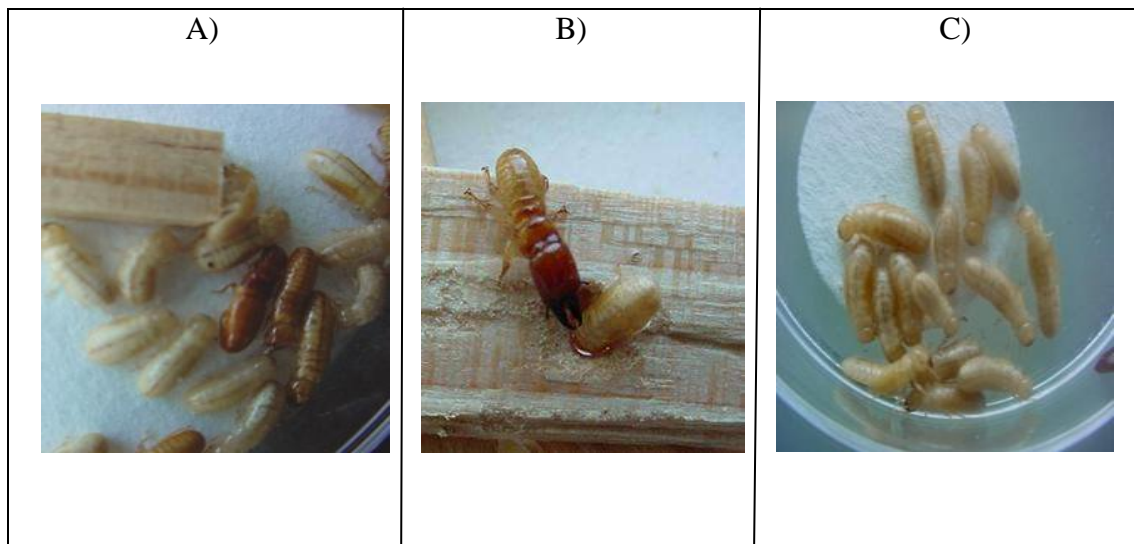
2.5.1 *Incisitermes marginipennis* un agente que causa biodeterioro en la madera seca.

La madera seca sin preservar esta sujeta al deterioro causado por agentes bióticos tales como bacterias, hongos e insectos. Siendo los insectos barrenadores los que causan el mayor daño a la madera seca, provocan pérdidas de sus propiedades mecánicas de resistencia y de durabilidad. Los líctidos y las termitas son los insectos más devastadores de la madera que se conocen, ellos causan una gran pérdida económica en todo el mundo (Wiseman y Eggleton, 1994, Suiter *et al.*, 2002). Se presentan varias especies de termes, algunos son cosmopolitas y otros son endémicos, todos han sido difíciles de controlar y los métodos de control cada vez son más radicales. En este trabajo se puso especial atención al termes barrenador de madera seca de pino *I. marginipennis* (Latreille) que se alimenta preferentemente de celulosa. Este insecto vive dentro de la madera y sale al exterior en la época de apareamiento, reproducción y colonización de nuevos nichos para cumplir su ciclo de vida; una característica que ha hecho difícil su control y detección, ver la Figura 4.

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 celulosa es el componente principal de la madera y 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.

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, columnas estructurales y decorativas, alfombras, papel mural, libros, ropa, polietileno expandido, yeso y pinturas.



*Figura 4. Estadios biológicos de I. marginipennis (Latreille).
A) Reproductores de color rojizo, B) Soldado y C) Ninfas.*

El daño económico que causan las termitas sobrepasa los dos billones de dólares anuales en Estados Unidos (Wiseman y Eggleton, 1994, Suiter *et al.*, 2002).

En Francia el daño, más el costo de control alcanzó 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 la República Mexicana, cálculos efectuados indican que el daño por termitas alcanza los 28.5 millones de dólares sólo en la Región Metropolitana (Wiseman y Eggleton, 1994). La característica más importante 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.

2.6 Biología de las termitas

Las termitas pertenecen al Orden Isóptera, este Orden es pequeño en comparación con los cuatro Ordenes mayores de Insecta: Coleoptera, Lepidoptera, Diptera e Hymenoptera. Morfológicamente se caracterizan por presentar cuatro alas membranosas iguales; con cinco segmentos tarsales

primitivos, aunque con frecuencia son cuatro segmentos; las mandíbulas son de tipo masticador con una placa molar en la base de ellas; las alas son caedizas, se desprenden de la base a lo largo de la sutura basal, esta es una característica distintiva del Orden. Filogenéticamente se relacionan con los mántidos y cucarachas, en virtud de que una especie primitiva de termita *Mastotermes darwinensis* produce sus huevos en una estructura parecida a una ooteca y porque presenta un lóbulo anal en las alas posteriores como en las cucarachas. Hay dos características fundamentales que las diferencian de los otros Ordenes: las termitas están especializadas en una dieta a base de madera y otros materiales ligno-celulósicos, hojas, fruta fresca y seca, y bacterias del suelo que junto con los coleópteros son los principales insectos especializados en degradar la madera (Canello y Myles, 2000). Las termitas que se alimentan solamente de la madera dependen de microorganismos que viven en su aparato digestivo, estas 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 intestinales.

Figura 5.

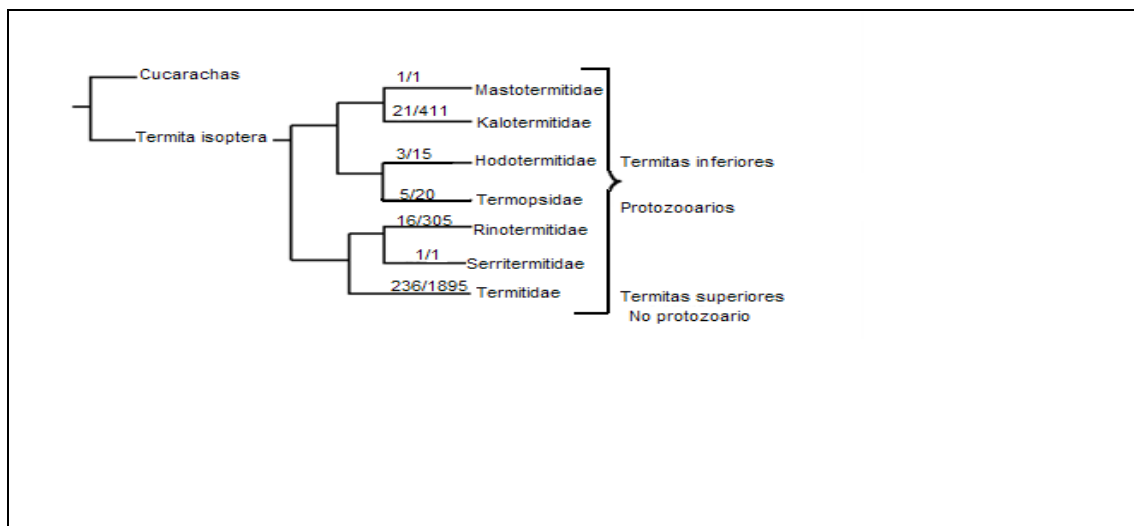


Figura 5. Árbol filogenético de las termitas (Abe et al., 2000).

Las termitas son insectos que siempre viven en familias numerosas de miles a millones de individuos donde los hijos y padres conviven, se les da cuidado y protección (Canello y Myles, 2000).

Las termitas son ecológicamente importantes en los ecosistemas forestales tropicales y en los desiertos de las áreas neárticas y están estrechamente ligadas con los ciclos biogeoquímicos (nutrientes). Los ciclos más importantes son: Azufre, Carbono, Fosforo, Hidrógeno, Nitrógeno, Oxígeno (Staley y Orians, 1992).

Las especies de termitas del género *Incisitermes* presentes en República Mexicana se muestran en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Termitas del género Incisitermes presentes en República Mexicana.

Especies presentes en México.

I. arizonensis (Snyder)

I. banksi (Snyder)

I. emersoni (Light)

I. immigrans (Snyder)

***I. marginipennis* (Latreille) (Michoacán)**

I. milleri (Emerson)

I. minor (Hagen)

I. nigrinus (Zinder)

I. platycephalus (Light)

I. schwarzi (Banks)

I. seeversi (Snyder y Emerson)

I. snyderi (Light)

(Cibrián *et al.*, 1995; Raya *et al.*, 2007)

El control de las termitas se ha hecho por impregnación de la madera con sales metálicas de boro, con derivados fenólicos sintéticos, los cuales han causado daño al hombre, al medio ambiente y han seleccionado insectos resistentes. Por lo que una alternativa para desplazar las formulaciones antitermita convencionales son los extractos vegetales.

Históricamente se han ensayado métodos químicos para la preservación de la madera con el fin de aumentar el tiempo de vida útil y contrarrestar el deterioro causado por factores físicos, como la temperatura, la humedad, el fuego o bien

por factores bióticos, donde el control de plagas está en función del organismo que se intenta controlar. Los plaguicidas sintéticos se han considerado para preservar la madera seca del biodeterioro.

En el Cuadro 4 se muestran los plaguicidas utilizados en la preservación y conservación de madera seca por el tipo de madera, por el posible uso y condiciones climáticas, aunque sean consideradas de alto riesgo al biodeterioro, ya que existen maderas, que debido a sus propias características son de alta durabilidad natural, otras sin embargo, presentan menor durabilidad o no la tienen, por lo que deben impregnarse con sustancias preservadoras para incrementar su vida útil en servicio.

Cuadro 4. Toxicidad y efectividad de compuestos químicos contra degradadores de madera seca.

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

AT = Altamente tóxico, MT = Moderadamente tóxico, LT = Ligeramente tóxico, ND = No determinada. ACC (ácido-cromo-arsénico), CCA (cobre-cromo-arsénico), ACA (amoníaco-cobre-arsénico) CZC (cloruro-zinc-cromo) y FCAP (fluoro-cromo-arsénico-fenol). Fuente: (COMACO 1995).

Las entidades industriales y de servicio público consumidoras son: Ferrocarriles Nacionales (durmientes), Teléfonos de México (Telmex), la industria agrícola (tutores y soportes en los cultivos), los constructores en general (pisos, muros, techos, torres de enfriamiento) y Petróleos Mexicanos (PEMEX), entre otros. Figura 6.



Figura 6. Usos de la madera preservada. A) Extracción de madera de los bosques, B) Un uso de la madera, en la Industria mueblera.

Actualmente en el control de los barrenadores de la madera seca se utilizan las sales hidrosolubles CCA (cobre-cromo-arsénico) y los componentes óleo solubles (creosota), que son productos de gran persistencia, son tóxicos al ambiente, causan resistencia y colorean la madera por lo que se limita su uso (Vignote y Jiménez, 1996).

Los distintos tratamientos empleados en la preservación de la madera conllevan a la utilización de diversas sustancias que puedan suponer un riesgo hacia el medio ambiente y la salud humana. Por ello se considera necesario identificar y conocer el contenido de estos compuestos contaminantes en los residuos de madera tratada, así como la afección potencial asociada a la presencia de estos. Así, la Sociedad Pública de Gestión Ambiental Española, en el año 2005, reportó una caracterización química de los residuos de madera tratada y tuvo como finalidad identificar las sustancias potencialmente contaminantes presentes en madera preservada. La caracterización química se realizó con dos muestras tomadas de los residuos acumulados de madera que fue retirada de su uso y el resultado se muestra en el Figura 7. Es importante señalar los productos como el dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) y el pentaclorofenol, que han sido retirados del mercado por su gran persistencia en el medio ambiente y la dificultad para su degradación y sin embargo se siguen usando en la formulación de plaguicidas. Al respecto en México no existe un organismo similar ni tampoco estudios que indiquen la peligrosidad y el riesgo

de los aditivos y plaguicidas usados en la preservación de la madera una vez que terminó la vida útil del derivado maderable. Sin embargo se infiere que por la utilización global de plaguicidas permitidos y no permitidos para la preservación de la madera, la situación mexicana es similar a la española.


<p>A)</p> 	<p>B) Constituyentes de los plaguicidas lixiviados.</p> <p>Preservadores inorgánicos:</p> <p>As, B, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Ti y Zn.</p> <p>Preservadores orgánicos:</p> <p>Antraceno, Benceno, Benzo-perileno, Criseno, Aldrín, DDT, lindano, Pentaclorofenol, m-o-p-Xileno, Naftaleno, Pireno, Tolueno.</p>
--	---

Figura 7. A) Depósitos de residuos de madera preservada, B) Preservadores químicos detectados en la madera tratada. Fuente: Sociedad Pública de Gestión Ambiental 2005, España.

2.7 Plaguicidas botánicos

Los productos naturales provenientes de una gran variedad de plantas actúan inhibiendo, repeliendo, disuadiendo o eliminando insectos y plagas de distinto tipo (rastreros, voladores, chupadores, defoliadores, etc) como así también estimulando procesos vitales de los cultivos para fortalecerlos y protegerlos de los ataques de las distintas plagas. Algunas de estas plantas han sido investigadas científicamente y otras siguen vigentes por leyenda popular (Salgado, 1997).

Las plantas 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, lindanos, alcaloides, azúcares, esteroide y ácidos grasos (Dixon, 2001). Mientras que otros metabolitos tales como terpenos, alcaloides, rotenonas, flavonoides y otros, algunos de los cuales poseen actividad tóxica contra insectos, interfieren en el desarrollo o en el comportamiento de los mismos y pueden contribuir así a la regulación de sus poblaciones (Schoonhoven *et al.*, 1998). Es necesario considerar que los insecticidas naturales también representan riesgos y beneficios, por lo que se debe vigilar sus formas de uso. 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 su efecto protector va desde repelencia, disuasión de la alimentación, oviposición, interrupción del desarrollo y alteración del comportamiento, toxicidad aguda hasta la interferencia con el crecimiento y el desarrollo de los insectos.

Los insecticidas vegetales presentan la gran ventaja de ser compatibles con otras opciones de protección. En la categoría de plaguicidas de bajo riesgo se encuentran las feromonas, aceites, jabones, hongos entomopatógenos, depredadores y parásitos, entre otros, lo que aumenta enormemente las posibilidades de que sean incorporados a programas de manejo integrado de plagas de insectos. La actividad biológica de un compuesto natural está en función de su estructura y en la dosis usada para tales fines.

Los plaguicidas botánicos tendrían menor probabilidad de generar especies resistentes que los sintéticos, ya que ejercerían presiones selectivas múltiples sobre los insectos, al estar constituidos por una combinación de compuestos actuando simultáneamente. Los principales compuestos aislados de plantas usadas hasta la fecha están indicados en el Cuadro 5.

2.7.1 Durabilidad natural de la madera como fuente de insecticidas

Ante la acción agresiva de agentes biológicos las distintas maderas presentan diferentes resistencias. Esto se debe a la estructura y a las proporciones de sustancias químicas contenidas en el duramen, variables según la especie, la edad del árbol y las condiciones de desarrollo (Carballeira López *et al.*, 1986; Bobadilla *et al.*, 2005; Pamatz Bolaños, 2008).

Cuadro 5. Plantas con propiedades insecticidas, principio activo, uso y acción

Especie	Nombre	Principio activo	Familia química	Uso
<i>Anabasis aphylla</i>		Anabasina o neonicotina ²	Chenopodiaceae	Insecticida de contacto no persistente
<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
<i>Derris elliptica</i>	Derris	Rotenona ¹	Flavonoide	Insecticida de contacto, ingestión y repelente
<i>Lonchocarpus utilis</i>		Rotenona ¹	Flavonoide	Insecticida de contacto, ingestión y repelente
<i>Melia azedarach</i>	Paraíso	Meliartenina ¹	Limonoide	Insecticida, antialimentario
<i>Nicotiana tabacum</i>	Tabaco	Nicotina ²	Alcaloide	Insecticida de contacto no persistente
<i>Polygonum hydropiper</i>	_____	Poliglodial ⁵	Sesquiterpeno	
<i>Riania speciosa</i>	_____	Rianodina ²	Alcaloide	Insecticida de contacto e ingestión
<i>Schoenocaulon officinale</i>	_____	Cebadilla ²	Alcaloide	Insecticida

Fuente: ²Duke, 1990, ³Heiden, 1991, ⁵Menjivar, 2001 ⁴Rao, 1999, ¹Silva *et al.*, 2002, Tripathi, 2000, 2001,

La durabilidad natural comprende aquellas características de resistencia que posee la madera sin tratamiento químico frente al ataque de hongos, insectos, perforadores marinos y otras influencias nocivas. Normalmente se mide, como el tiempo en años durante el cual una madera es capaz de mantener sus propiedades mecánicas estando puesta en servicio empotrada en contacto con el suelo o el agua. La mayoría de las maderas tienen una durabilidad diferente frente a los diversos organismos que la puedan degradar.

La resistencia natural de la madera contra organismos xilófagos depende principalmente, de ciertas sustancias con gran poder fungicida o insecticida que están incrustadas en las células del leño, ver el Cuadro 6. Estos componentes corresponden a grupos químicos diferentes y casi siempre son de estructura bastante complicada, (Kraemer, 1958).

Cuadro 6. Clasificación de durabilidad natural de la madera

CLASE	DEFINICIÓN	CLIMA TEMPLADO AÑOS	CLIMA TROPICAL AÑOS
1	Muy durable	>25	>15
2	Durable	15 – 25	10 - 15
3	Moderadamente durable	10 -15	5 - 10
4	No durable	5 – 10	1 - 5
5	Perecedero	<5	<2

Fuente: Chudnoff, 1984; Consejo Nacional de la Madera en la Construcción, 1995; Encinas, 2004.

También la durabilidad natural de la madera varía en el tronco del mismo árbol, en el que existen diferencias entre la albura y el duramen. La albura que es la parte activa del xilema que en el árbol vivo, contiene células vivas y material de reserva, conduce gran cantidad de agua y de sales en solución, de la raíz a las hojas; provee rigidez al tallo y sirve de reservorio de sustancias de almacenaje según la International Association of Wood Anatomists (IAWA) y el duramen es el leño biológicamente inactivo, con funciones de sostén, que ocupa la porción del tronco entre la médula y la albura, generalmente es de estructura compacta y de coloración más oscura que la albura (IAWA, 1964). Esta diferencia de

coloración entre albura y duramen puede no ser siempre claramente distinguible Figura 8.



Figura 8. Corte transversal de madera donde se observa la albura (color claro) y el duramen (color oscuro).

El duramen contiene metabolitos secundarios con diversas funciones en el árbol y que genéricamente se denominan “extraíbles”, los cuales son metabolitos secundarios que le proporcionan entre otras propiedades, su color y olor característicos, además son repelentes a insectos y hongos, permitiéndole resistir en mayor o menor grado los ataques de éstos organismos (Reyes-Chilpa *et al.*, 1987). Sólo el duramen de algunas angiospermas es muy durable, mientras que la albura de todas las especies se considera como madera no durable (Scheffer, 1973).

Se emplea el concepto de resistencia natural, cuando se refiere a la capacidad de una madera para resistir el ataque de un agente degradador en particular como puede ser un hongo o un insecto.

2.7.2 *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq) Griseb

Se ha vuelto una imperiosa necesidad la búsqueda de alternativas naturales de bajo costo y alto rendimiento, no tóxicos ni al medio ambiente ni al ser humano, que no induzcan resistencia y que sean lo mas selectivos posibles al organismo blanco a controlar, que su utilización responda a las diferentes necesidades de

la población, que en su aplicación se tome en cuenta el conocimiento tradicional de las plantas, así como la observación empírica del efecto biológico de las plantas y del organismos blanco. Con este enfoque se reportó que el árbol *E. cyclocarpum* (parota, nombre local) posee componentes acuosos con acción disuasiva por lo que es necesario conocer las generalidades de esta especie motivo de estudio en este trabajo (Raya González, 2007).

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

Sinonimia: *Mimosa cyclocarpa*, Jacq. *M. parota*, Seseé y Moc.

Familia: Leguminosae (Mimosoideae).

Nombres comunes: el árbol de *E. cyclocarpum* es conocido como guanacaste, guanacastle, nacaste, necaste (del náhuatl cuaunacaztli, nombres más comúnmente usados en toda su área de distribución). Dependiendo de la región es conocido con diferentes nombres, en Michoacán, Jalisco, Guerrero y Oaxaca es conocido con el nombre de parota; en San Luis Potosí, se le dan los nombres de orejón, tíyohu y nacascuahuitl; en Sinaloa: huanacaxtle y huinecaxtle; en Tamaulipas se le llama cascabel y cascabel sonaja, en Veracruz lo nombran cuytátsuic, nacastle y orejón; en Oaxaca se le conoce como aguacaste, lash-matz-zi, ma-ta-cua-tze, mo-cuadzi, mo-ñi-no, ya-chibe; en Tabasco se le llama charamusquillo y picho; este último nombre también lo recibe en Chiapas y en Yucatán se conoce con el nombre de pich (Pennington y Sarukhan, 1968; Corral López, 1985).

Descripción de la especie: el *E. cyclocarpum* es un árbol caducifolio de rápido crecimiento que llega a medir hasta 30 m de altura y su diámetro a la altura del pecho (d.a.p) va desde 0.60 hasta 3 m, su tronco es recto y a veces con pequeños contrafuertes en la base, las ramas son ascendentes y forman una copa hemisférica, frecuentemente más ancha que alta; la corteza externa es lisa a granulosa y en ocasiones ligeramente fisurada, de color gris claro a gris parduzco. La corteza interna es de color crema rosada, con textura granulosa, desprende un exudado pegajoso y dulzón que se coagula al contacto con el aire. El grosor total de la corteza es de 20 a 30 mm. Los árboles de esta especie pierden las hojas cuando fructifican, de Febrero a Abril (Pennington y Sarukhan, 1968).

El fruto es considerado como un excelente alimento para ganado vacuno, y algunas veces cocinado se usa como alimento humano. Tanto el fruto como la corteza tienen un alto contenido de taninos y proteínas (Corral López, 1985).

Distribución de la especie: 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. Es difícil relacionar esta especie con algún tipo de vegetación primaria; se encuentra en zonas de vegetación perturbada en selvas altas perennifolias y medianas subperennifolias al parecer en asociaciones primarias de selvas medianas subcaducifolias y caducifolias (Pennington y Sarukhan, 1968).

Características organolépticas de la madera: La madera presenta diferencia de color entre la albura y el duramen. La albura es de color blanco con jaspeaduras castañas y el duramen es castaño claro; olor y sabor picante, brillo mediano, veteado pronunciado, textura gruesa (Guridi Gómez, 1980; Corral López, 1985).

Propiedades físicas de la madera. La albura de *E. cyclocarpum* es dura, es susceptible a la descomposición y al ataque de insectos pero el duramen es resistente a la descomposición y al ataque de termitas de madera seca (Chudnoff, 1984).

Usos de la madera. Es una especie protegida por el hombre al usarla como árbol de sombra en áreas ganaderas o agrícolas. Su madera es fácil de trabajar, se usa para obtener tablas y vigas para construcciones rurales, para la elaboración de utensilios de cocina como bateas; para la construcción de canoas y de ruedas de carreta. Industrialmente se usa para la fabricación de duela y lambrín y madera aserrada. Artesanalmente se utiliza para la elaboración de artículos diversos como: muebles coloniales, muebles tallados.

Otros usos. Las semillas contienen aproximadamente 36 % de proteína y en algunos lugares se emplean como forraje y como complemento alimenticio para animales. La corteza contiene taninos y se utiliza para curtir pieles.

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, el fruto contiene saponinas y se usa localmente como sustituto del jabón para lavar ropa (Niembro Rocas, 1990). En la figura 9 se muestra un espécimen de *E. cyclocarpum*.

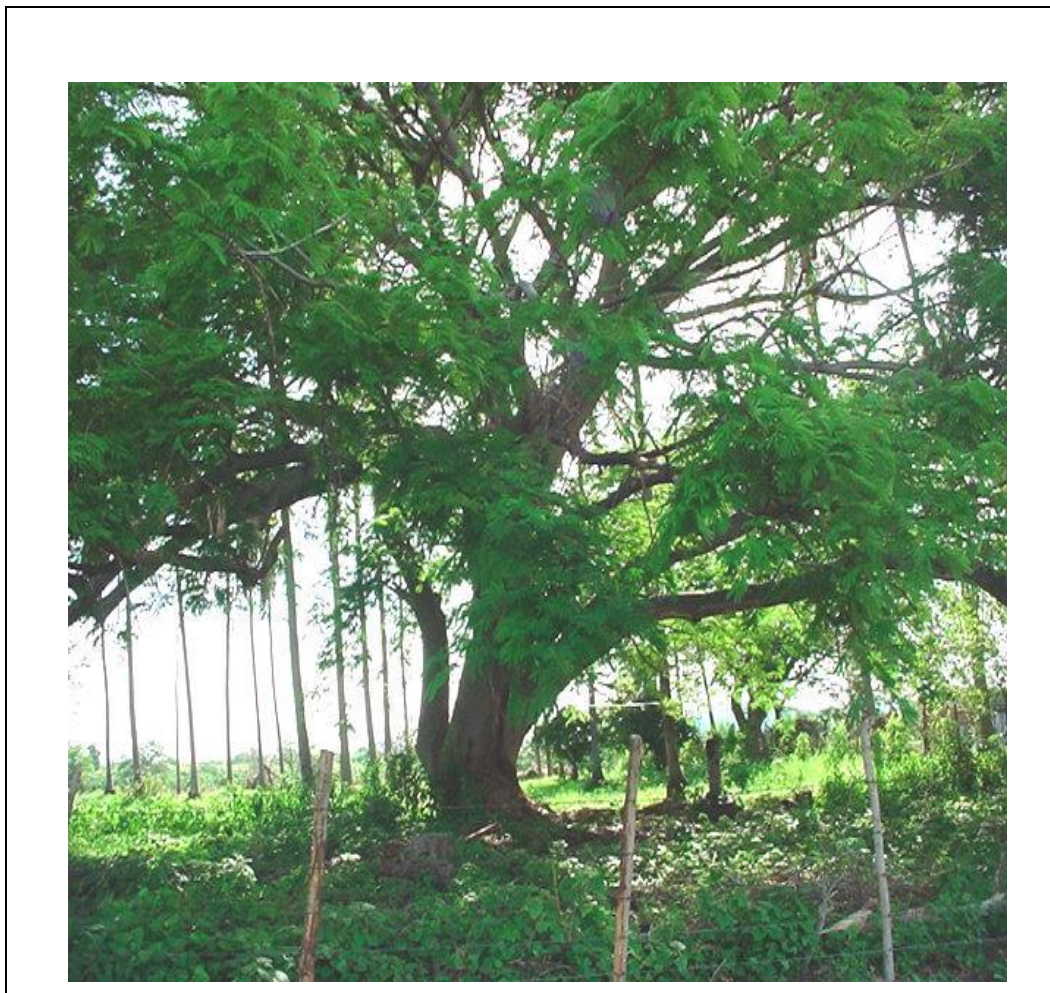


Figura 9. Árbol de *E. cyclocarpum* localizado en Nueva Italia, Mich.

Ya existe el antecedente de las propiedades insecticidas que posee el extracto acuoso de *E. cyclocarpum*, lo refieren López *et al.*, (2006), en su estudio realizaron ensayos de absorción del extracto en diferentes tipos de madera, llegando a la conclusión de que el extracto es bien absorbido por los tres tipos de madera probados como se observa en las imágenes Figura 10.

Posteriormente Raya *et al.* (2007) realizaron estudios de repelencia del extracto de *E. cyclocarpum* y observaron que el extracto ejerció un efecto de repelencia, sobre la termita de madera seca, les sugirió que el extracto posee componentes disuasivos.

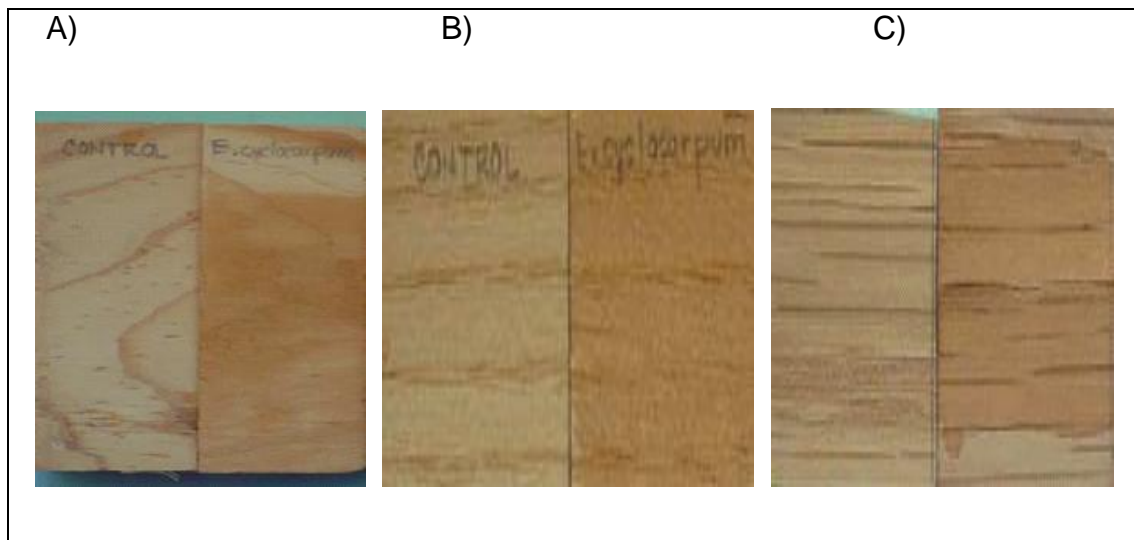


Figura 10. Aplicación del extracto de *E. cyclocarpum* en madera de A) *Pinus spp* (Pino), B) *Fraxinus spp* (Fresno) y C) *Quercus spp* (Encino)

El tratamiento con citronelol (un compuesto ampliamente usado en formulaciones comerciales como repelentes de insectos) se utilizó como testigo positivo y tuvo el 98.68 % de repelencia de ninfas de termitas que se aglomeraron en un área más reducida en el centro del papel que los demás tratamientos y para el testigo sin tratamiento el 26.80% de las ninfas de termitas se ubicaron en el centro del papel y el mayor porcentaje se ubicó en la periferia debido a que buscan sentir en su cuerpo las paredes de la madera y no existió compuesto alguno que las ubicara en el centro del papel. En todos los tratamientos se mostraron diferencias significativas destacando el tratamiento con el extracto de *E. cyclocarpum*, ver la Figura 11. El extracto acuoso de *E. cyclocarpum* (Jacq.) Griseb desprende compuestos volátiles que actúan como repelentes contra ninfas de termitas de madera seca *I. marginipennis*.

Raya *et al.*, (2007) realizaron estudios de protección de madera de pino, para lo cual utilizaron discos de madera de pino de 4.6 cm con espesor de 0.58 mm, y se impregnaron con: a) Control negativo, b) Con disolución de sales de boro (control positivo), c) Extracto acuoso con una concentración de 10.63 mg de fenólicos totales equivalentes/ml. La mortalidad de termitas en los discos de madera fue a los 45 días, de una población de 10 termitas, la mortalidad en el

control negativo fue de 3.30%, en el control positivo fue del 83.33%, en el extracto de *E. cyclocarpum* acuoso fue de 76.70%.

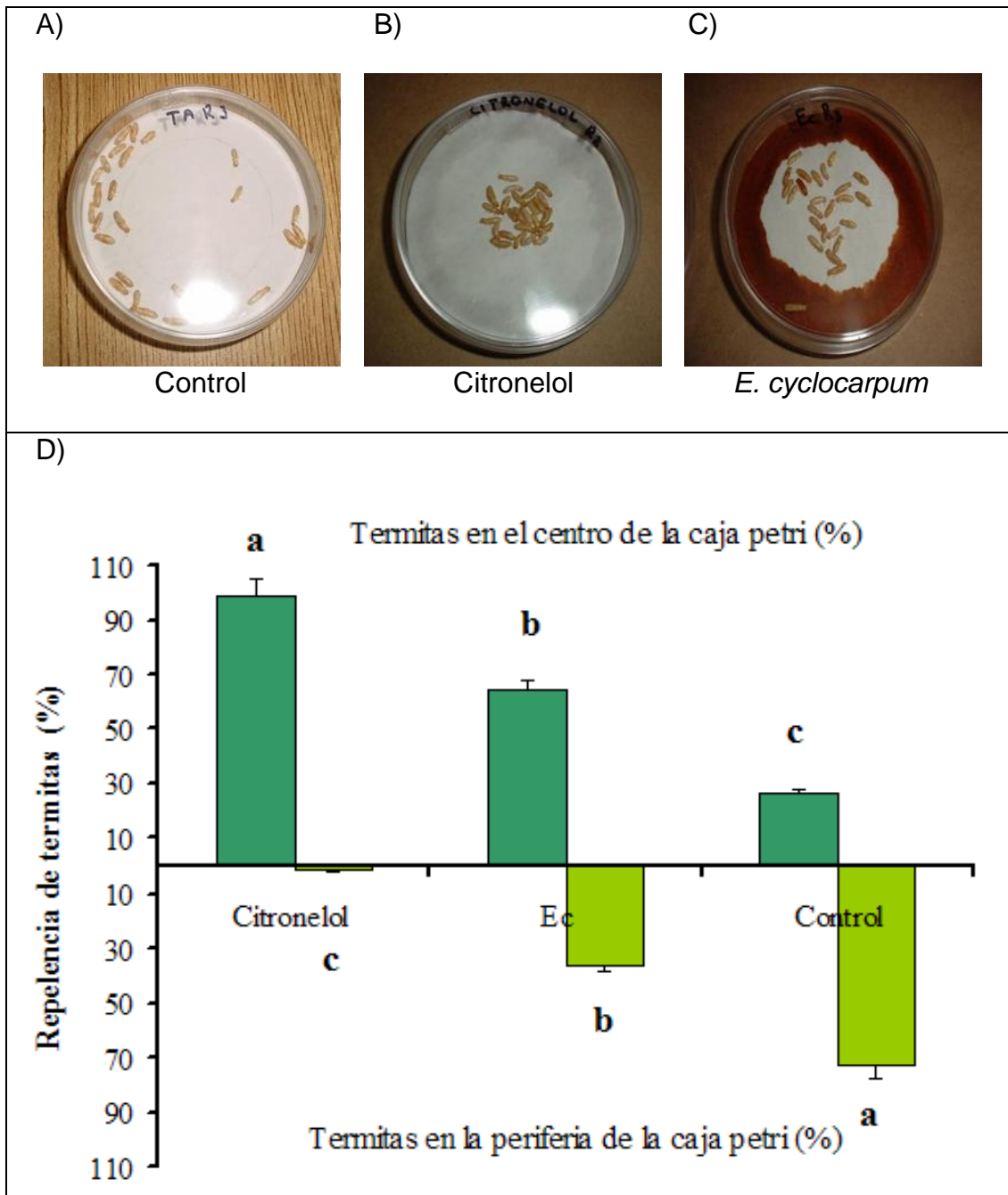


Figura 11. Efecto repelente del extracto de *E. cyclocarpum* contra ninfas de termitas de madera seca *I. marginipennis*. A) Control. Termitas ubicadas en la periferia del papel B) Citronelol. Termitas ubicadas en el centro del papel. C) Extracto acuoso de *E. cyclocarpum*. Termitas dispersas en el centro del papel. D) Parte superior: termitas ubicadas en el centro de la caja petri. Parte inferior: termitas ubicadas en la periferia de la caja petri. Citronelol = testigo positivo, repelente comercial. Ec = Tratamiento con extracto acuoso de madera de duramen de *E. cyclocarpum*. Control = Papel filtro sin tratamiento. Tukey $\alpha=0.05$.

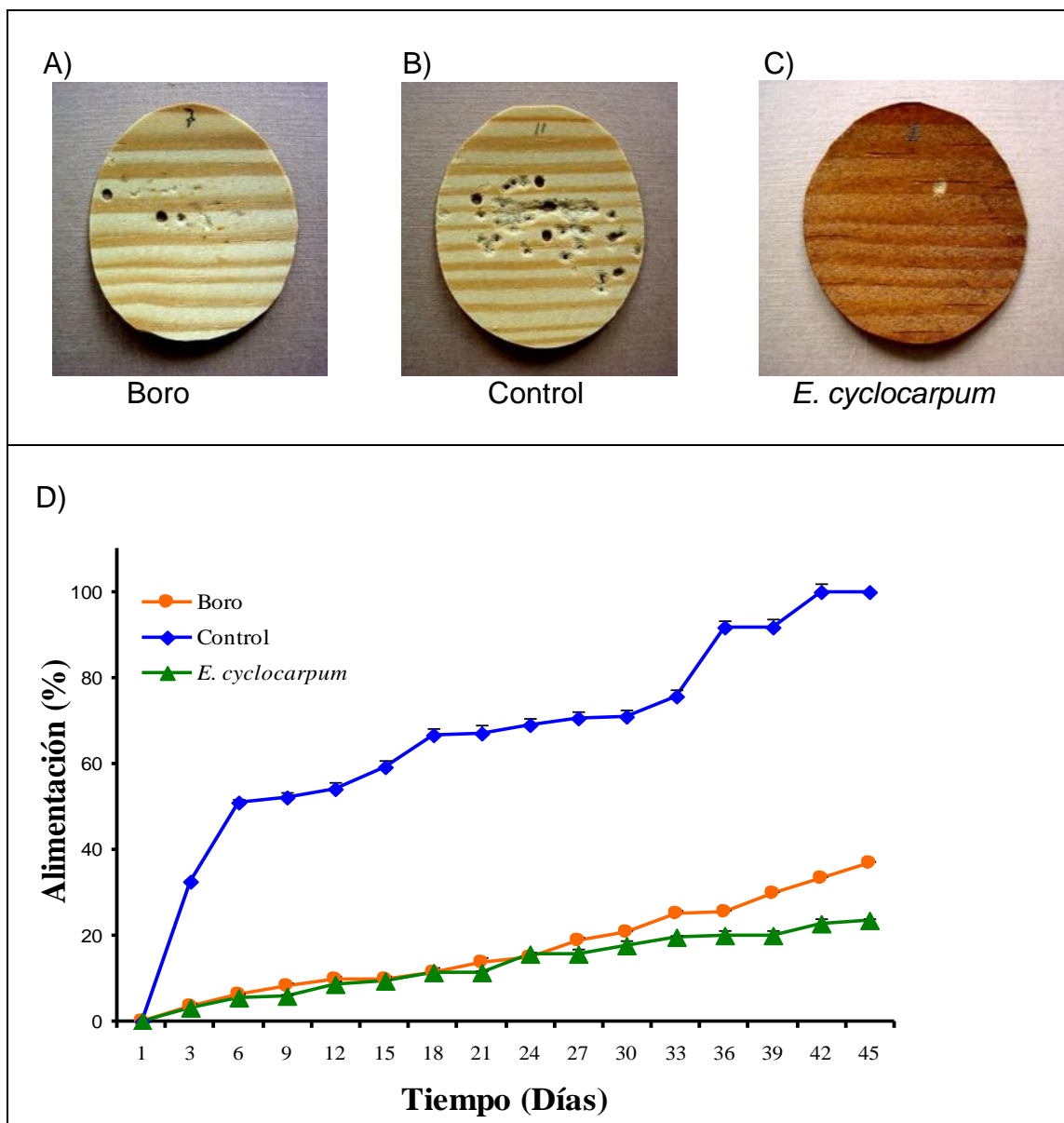


Figura 12. Estudios de protección de madera de pino. A) Control negativo. B) sales de boro (control positivo). C) Extracto acuoso. D) La mortalidad de termitas en el los discos de madera a los 45 días.

Una vez que los autores observaron que el extracto era bien absorbido por la madera y que tiene propiedades de repelencia y protección sobre la madera seca realizaron un análisis químico del extracto *E. cyclocarpum* de los compuestos semivolátiles analizados por cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas, así como también analizaron el extracto acuoso Cuadro 7.

Cuadro 7. Compuestos semivolátiles del extracto de *E. cyclocarpum* analizado en CG-MS

No.	Tiempo (min)	Área	Nombre del compuesto	Área (%)
1	6.538	23743244	D-limoneno	17.83
2	8.720	14548050	<i>p</i> -cimeno	10.92
3	33.848	9331503	Butilato hidroxitolueno	7.01
4	26.310	7459758	α -terpineol	5.60
5	31.892	6442735	<i>p</i> -cimeno-8-ol	4.84
6	39.949	591462	Fenol, 4-metil	4.51
7	18.592	4537833	1-hexanol,2-etil	3.41
8	25.299	4497730	2(3H)-furanona,etenildihidro-5-metil	3.38
9	37.301	4153615	Fenol	3.12

Extracto Acuoso

1	23.23	135876	Acido benceno dicarboxílico, bis(2-etil hexil) éster	62.0
---	-------	--------	--	------

III JUSTIFICACIÓN

En la agricultura, la revolución verde promovió un incremento sustancial en el rendimiento de las cosechas de muchos cultivos económicamente importantes, a través del abuso de los plaguicidas sintéticos. El uso irracional de plaguicidas y fármacos ha causado un severo daño y resistencia a los organismos expuestos causándoles afecciones en su metabolismo, acelerando la evolución o la muerte.

En países que son las potencias económicas y tecnológicas con una gran cultura y conciencia ecológica se ha prohibido el uso de muchos de los productos químicos que actualmente existen en los mercados tales como DDT (diclorodifeniltricloroetano, pentaclorofenol y bromuro de metileno). Sin embargo en los países del tercer mundo se siguen utilizando hasta nuestros días con la aprobación de las autoridades locales en materia de la conservación del medio ambiente y de la salud, que conocen que son productos altamente contaminantes y que no son biodegradables (Ware y Whitacre, 2004).

Estos factores han motivado a la búsqueda de moléculas alternativas para el control de plagas a través del entendimiento de la defensa vegetal en la interacción de las plantas con sus enemigos naturales. Se han descrito varios plaguicidas de origen vegetal exitosos tales como la nicotina, el piretro y la rotenona, o el uso de extractos vegetales tales como el aceite de neem (*Azadirachta indica*) (Mansour *et al.*, 1986; Prabhaker *et al.*, 1989). Estos bioplaguicidas tienen una toxicidad reducida para el hombre, un riesgo bajo para resistencia, selectividad para organismos no blanco, una rápida y completa degradación en el ambiente.

Por otra parte el deterioro de madera seca por insectos barrenadores anualmente a nivel mundial produce pérdidas económicas en el orden de millones de dólares, afecta drástica y sensiblemente el patrimonio cultural de los pueblos y el abuso de preservadores de madera seca provocan un impacto negativo en el medio ambiente. La investigación fitoquímica de maderas con gran durabilidad natural y resistencia al biodeterioro, potencialmente puede ser la forma de encontrar nuevas moléculas con actividad plaguicida, para controlar

insectos barrenadores de madera y de otros organismos para que en un futuro se sustituya a los plaguicidas actuales.

Una ejemplo de especie vegetal que produce madera resistente al biodeterioro es *E. cyclocarpum*, que por ésta característica en México solo se aprovecha la madera de duramen para la fabricación de muebles. Es un árbol que crece desde las vertientes centrales del Pacífico y del Golfo de México hasta el Norte de Brasil y el Sur de Colombia, ampliamente aprovechado en los países de la América Central como especie agroforestal.

Posee antecedentes de uso en la medicina tradicional de la región, se conoce del uso de infusiones de la corteza o de las vainas para controlar el salpullido o bien como depurativo, mientras que la goma es empleada para combatir la bronquitis y el resfriado común. Los frutos verdes son astringentes y se utilizan en casos de diarrea (Francis, 1988). Ivan *et al.*, (2002) describieron que las saponinas del follaje de *E. cyclocarpum* tienen actividad antiprotozoaria temporal en el rumen de ovejas con un periodo efectivo de 12 a 14 días.

También se conoce que el duramen contiene compuestos solubles en disolventes orgánicos con actividad fungicida contra hongos destructores de la madera tales como *Cheatomium globosum*, *Trametes versicolor* y *Trichoderma viridis* (Ruitaga *et al.*, 1995). Por otra parte las semillas contienen un aminoácido no proteínico, el ácido pipercolico un osmoprotector en la bacteria *Sinorhizobium meliloti* (Gouffi *et al.*, 2000).

Recientemente se reportó que un extracto acuoso de madera de duramen de *E. cyclocarpum* provocó un efecto antialimentario y de repelencia en la termita de madera seca *I. marginipennis* al proteger madera de pino, con lo cual el extracto es un potencial candidato preservador de madera seca (Raya González *et al.*, 2007).

En una continuación del trabajo y en la búsqueda de la aplicación segura del extracto acuoso de *E. cyclocarpum* en madera seca para el hombre y el medio ambiente, es el motivo de este trabajo evaluar la toxicidad aguda del extracto acuoso de duramen de *E. cyclocarpum* en ratas Wistar, línea celular MCF-7 y en organismos de diferentes niveles tróficos.

IV. HIPOTESIS

El extracto acuoso de madera de duramen de *E. cyclocarpum* es inocuo en su uso en la protección de la madera.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Determinar el efecto tóxico agudo del extracto acuoso del duramen de *E. cyclocarpum*.

5.2 Objetivos Particulares

1. Evaluar la toxicidad aguda del extracto acuoso de duramen de *E. cyclocarpum* en ratas Wistar.
2. Determinar la toxicidad aguda del extracto acuoso del duramen de *E. cyclocarpum* en organismos de diferentes niveles tróficos.

VI. Desarrollo experimental

6.1 Material Biológico

Crustáceo: Ensayo con el crustáceo *Artemia salina*. Los quistes (huevos) de *A. salina* [Salt Creek Co™] y el agua de mar sintética: Red Sea Salt™ [Red Sea Fish Pharm], fueron obtenidos en el mercado local.

Insecto: Especímenes de *I. marginipennis* fueron obtenidos de colonias de termitas localizada en las localidades de Huandacareo 10° 59' 22" latitud Norte y 101 ° 16' 31" longitud oeste a una altura de 1848 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.), Morelia 19 ° 42' 16" latitud norte y 101° 11' 03" y una altura de 1941 m.s.n.m., Uruapan (19° 22' 18" latitud Norte a 102 ° 03' 19" longitud oeste a una altura de 1634 msnm) todas localidades del Estado de Michoacán.

El **roedor** Ratas Wistar™ macho fue obtenido del bioterio universitario.

La **línea celular tumoral** de epitelio de glándula mamaria MCF-7 fue obtenida de la ATCC (American Type Culture Collection) y forma parte de la colección de líneas celulares del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología (CMEB) de la Facultad de Veterinaria de la UMSNH.

Microorganismos: Los microorganismos utilizados en este estudio fueron aislados silvestres clasificados por métodos microbiológicos, los proporcionó el Laboratorio de Microbiología Médica de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez" y el Laboratorio de Fisiología Celular del Instituto de Investigación Químico Biológicas de la UMSNH. Bacterias: Gram negativas; *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp*, *Shigella sonnei*. Gram positivas; *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermis* y *S. saprophytics*. Las bacterias se propagaron en medios sólidos, como agar Mueller Hinton (AMH), y en caldo nutritivo (medio líquido). Las bacterias se mantuvieron y propagaron por resiembra sucesiva en medio de cultivo AMH a 37°C por 24 h. Para rescatar los aislados bacterianos silvestres, se tomó una asada de cepas previamente identificadas y se inocularon en caldo nutritivo y se incubaron a 37°C por 24 h. Aislados clínicos del hongo dimórfico *Candida albicans*. Aislados silvestres del oomiceto *Phytophthora cinnamomi* fueron crecidos y mantenidos en medio

Sabouraud y papa dextrosa agar (PDA), respectivamente. Para determinar la sensibilidad de *C. albicans* y *P. cinnamomi* se llevó al cabo un diseño experimental similar al que se efectuó con bacterias. Se prepararon cajas Petri con medio Sabouraud y papa dextrosa agar, respectivamente, se incubaron durante 24 h a 37°C.

Árbol: Los ejemplares de *E. cyclocarpum* (Jacq). Griseb se recolectaron en las zonas de Tacámbaro, Tuzantla y Apatzingán, fueron identificados por el botánico y M.C. Javier Madrigal, una muestra de hojas y madera se encuentran depositadas en la Xiloteca de la Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera. El resto de los organismos se encuentran a resguardo en el Laboratorio de Fisiología celular del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas.

6.2 Medios de Cultivo.

Las bacterias se propagaron en medios sólidos, como agar Mueller Hinton, agar base sangre y en caldo nutritivo (medio líquido). El hongo *C. albicans* en medio Sabouraud, y el oomiceto *P. cinnamomi* en papa dextrosa agar.

- 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.
 - Esterilizar a 121°C por 15 min.

- 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.

- Agar Muller Hinton (BD Bioxon)
 - Extracto de carne 2.0 g
 - Peptona de caseína ácido 17.5 g
 - Almidón 1.5 g
 - Agar 17.0 g
 - pH final 7.4±0.2
 - Suspender 38 g del agar en 1000 mL 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.

- Agar Dextrosa Sabouraud. (BD Bioxon).
 - Agar 15.0 g
 - Dextrosa 40.0 g
 - Peptona 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.

- Papa Dextrosa Agar
 - Infusión papa 4.0 g
 - Dextrosa 20.0 g
 - Agar 15.0 g
 - Hervir 200 g de papa (pelada y cortada en cuadros pequeños)

- en 1000 mL de agua durante 5 a 10 minutos. Filtrar a través
- de una gasa con ayuda de un embudo.
- pH final 5.6 ± 0.2
- Suspender 39 g del polvo en 1000 mL de agua.
- Mezclar perfectamente, calentar con agitación frecuente y
- hervir durante un minuto hasta disolución completa. Distribuir
- esterilizar a 121°C por 15 min.

6.2.1 Condiciones de cultivo

Las bacterias se mantuvieron y propagaron por resiembra sucesiva en medio de cultivo BAS (base agar sangre) a 37°C por 24 h. Para rescatar los aislados bacterianos silvestres, se tomó una asada de las cepas previamente identificadas y se inocularon en caldo nutritivo y se incubaron a 37°C por 24 h. Para *C. albicans* y *P. cinnamomi* se llevó a cabo en un diseño experimental similar al que se efectuó con bacterias. Se prepararon cajas Petri con agar dextrosa Sabouraud y agar papa dextrosa (respectivamente), se incubaron durante 24 h a 37°C .

6.3 Obtención de los extractos acuosos.

El duramen de madera seca de *E. cyclocarpum* (Jacq) Griseb, se dejó secar al aire libre y bajo la sombra. El material seco se molió en molino de cuchillas THOMAS SCIENTIFIC (Laboratorio de Preservación de la Madera de la Facultad de Tecnología de la Madera) y el polvo resultante de la molienda se tamizó con una malla de acero del número 20 y se colocaron en frascos previamente etiquetados y sellados herméticamente.

Para la obtención de la decocción se pesaron 100 g de cada sustrato, se depositó el polvo vegetal en un vaso de precipitado de vidrio de 2 L vertiendo agua destilada hasta saturación, se agitó constantemente hasta que se alcanzó el punto de ebullición, se dejó hervir por un tiempo aproximado de 20 min. A continuación se realizó un primer filtrado de la suspensión obtenida mediante una manta previamente esterilizada, el sólido se extrajo repitiendo la operación de cocción y filtrado. La suspensión final se concentró en un liofilizador

LABCONCO LYPH LOCK 4.5 (Laboratorio de Fisiología Celular y Productos Naturales). Se liofilizaron 2250 ml de infusión de duramen de *E. cyclocarpum*, en alícuotas de 250 ml y se obtuvo 110 ml del extracto concentrado. A cada dilución de los extractos se les determinó la cantidad de fenólicos totales equivalentes (FTE) en un espectrofotómetro VARIAN modelo CARY 50 BIO y se obtuvieron 0.2626 mg FTE /ml.

6.3.1 Determinación de la concentración del extracto acuoso del duramen de *E. cyclocarpum* (Jacq) Griseb.

En la legislación mexicana la especie vegetal *E. cyclocarpum* no se encuentra en el listado de especies mexicanas en riesgo de extinción regulado en la norma ecológica NOM-059-ECOL-1994. Mientras que el manejo del material vegetal para la obtención de los extractos acuosos de ésta especie se hicieron observando los lineamientos indicados en las normas de los recursos naturales; NOM-005- RECNAT-1997, NOM-007-RECNAT-1997 y NOM-009 RECNAT-1996.

Los equivalentes fenólicos totales (FTE) se determinaron por el método de Swain y Hills (1959). Para la determinación de los equivalentes fenólicos la mezcla de reacción (1 ml) se preparó con 65 µl de los extractos vegetales acuosos 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 adicionaron 0.25 ml de Na₂SO₄ y se incubó por 1 h, después se determinó la absorbencia a 725 nm. Para determinar la cantidad de FTE y mediante una curva estándar referida al estándar coniferil alcohol. Los valores de las concentraciones de FTE obtenidos, son con los que se trabajaron en todas las pruebas posteriores.

6.4 Métodos experimentales

Para conocer la toxicidad aguda del extracto acuoso obtenido de madera de duramen de *E. cyclocarpum* sobre los organismos de diferentes niveles tróficos, se desarrollaron los métodos que a continuación se describen.

6.3.1 Ensayos de toxicidad aguda con animales

6.3.1.1 Ensayo con el crustáceo *A. salina*.

Ensayo con el crustáceo *A. salina*. Los quistes (huevos) de *A. salina* [Salt Creek Co™] y el agua de mar sintética: Red Sea Salt™ [Red Sea Fish Pharm], fueron obtenidos en el mercado local. Se consideró el método reportado por Meyer *et al.*, (1982). Los quistes (huevos) de *A. salina* se resuspendieron en 12 ml de agua de mar artificial contenida en una caja Petri. La caja Petri se cubrió, se expuso a una fuente de luz (1000-4000 lux) y se incubó por una hora. Los quistes fueron incubados en la oscuridad a temperatura ambiente (25 °C) por 24 horas y en agitación suave para una mejor distribución de los organismos. En 24 horas los quistes mudaron a larvas (instar I). Las larvas (instar I) se transfirieron a un medio fresco. Se llevaron a incubar por otras 24 horas, todas las larvas mudaron a los siguientes estadios (instar II y III). Después los nauplios fototróficos fueron colectados y contados, se preparó una suspensión que contuvo 100-150 nauplios/ml.

De la suspensión de nauplios se tomaron 100 µl (10 – 15 nauplios) y se colocaron en los pocillos de una placa de ELISA de 96 pocillos. Se agregó el extracto acuoso (0.1, 1, 10 µg) y todas en un volumen final de 100 µl. Los controles fueron sulfato de berberina (0.01 gr/ml de una mezcla de agua:acetona 1:1 v/v) a las concentraciones de 1, 10 y 100 ng y una serie que no contuvo ninguna sustancia. La placa se cubrió y se incubó a temperatura ambiente durante 24 h.

Después de este periodo los nauplios vivos y muertos se contabilizaron con el objetivo 10X de un microscopio invertido. Finalmente se adicionaron 100 µl de metanol para matar a los nauplios sobrevivientes de cada pocillo y después de 30 minutos se contó el total de nauplios muertos. La sobrevivencia se determinó contando los nauplios muertos después de 24 h de estar en contacto con el extracto acuoso y restándolos de los muertos después del tratamiento con metanol. Se consideró el criterio de toxicidad de valores de CL₅₀ menores de 20 µg/ml (punto de corte para detectar actividad citotóxica en extractos

vegetales sugerido por Geran *et al.*, 1972), un criterio ampliamente aceptado para escrutinio de extractos vegetales con componentes citotóxicos.

6.3.1.2 Ensayo con *I. marginipenis*.

En un ensayo de no-selección de alimento utilizando como sustrato alimenticio discos de papel filtro impregnados con extracto acuoso a diferentes concentraciones (0.2626, 0.1313, 0.026 y 0.0026 µg/ml), sin extracto acuoso y sales de boro (DBT) [tetra borato di-sódico *deca*-hidratado ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) al 0.7% combinado con ácido bórico (H_2BO_3) al 0.5%, la retención fue de 0.0387 g/cm³] como control positivo, colocados en cajas Petri y encima de ellos se depositaron 25 termitas ninfas se colocaron en una cámara oscura a temperatura ambiente y humedad relativa del 11 – 15 % durante un periodo de 8 semanas. Cada semana se monitoreó el número de termitas muertas y el consumo de sustrato alimenticio.

6.3.1.3 Ensayo en Ratas.

La concentración letal media (CL_{50}) se determinó de acuerdo a los lineamientos de la IACUC (2000) que indican que la dosis de prueba puede ser de 2000 y 5000 mg/Kg_{individuo}

Se utilizaron ratas Wistar (macho) con un peso promedio de 234 ± 42 gr, se hicieron grupos de 5 animales para cada concentración de sustancia o extracto vegetal ensayada en cada tratamiento.

Las ratas fueron anestesiadas previamente, se les colocó una sonda orogástrica a cada animal, por esta vía se les administró una dosis única del extracto acuoso de *E. cyclocarpum* (10, 100, 1000 y 3000 mg/Kg), los controles positivos fueron; un extracto de crisantemo (10, 100, 1000, 3000 mg/Kg) y la Quercitina (1, 10, 100 y 1000 mg/Kg de peso).

Al grupo control negativo se le administró agua. Se hizo la observación de signos de toxicidad aguda en función del erizamiento de pelos, disminución de la actividad motora y animales muertos.

6.3.2 Ensayos de toxicidad aguda con microorganismos.

6.3.2.1 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 37°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, se colocaron cuatro discos de papel filtro en las cajas AMH y sobre cada uno de los discos se depositaron 6 µl del extracto acuso a diferentes concentraciones (0.2626, 0.1313, 0.026, 0.0026 µg/mL), el control negativo fue cefatoxima 10 µg que indujo un halo de inhibición de 20 ± 3 cm a las 12 h post-tratamiento y se incubaron las cajas a 37°C por 24h. El halo de inhibición se determinó de acuerdo a la siguiente expresión empírica $HI = DT - DP$, donde: HI = Halo de inhibición del extracto (mm), DT = Diámetro total de inhibición (mm), DP = Diámetro del disco de papel utilizado fue 7mm.

6.3.2.2 Ensayo con el hongo y el oomiceto.

Se distribuyó homogéneamente una alícuota de una suspensión de levadura sobre el medio de crecimiento sólido, encima se colocaron discos de papel filtro impregnados con 6 µl de los extractos a probar a las concentraciones de 0.2626, 0.1313, 0.026 y 0.0026 µg/mL. Para el ensayo de toxicidad en *P. cinnamomi* se uso medio agar papa dextrosa (PDA), se colocaron discos de papel filtro impregnado con extracto acuoso a las concentraciones utilizadas con *C. albicans* y encima de estos se le colocó un fragmento de 3 mm² con el micelio del oomiceto previamente cultivado. Se incubaron a temperatura ambiente durante 96 h y se determinó el efecto inhibitorio sobre el crecimiento. El control positivo para *C. albicans* y *P. cinnamomi* fue el 2-(4-tiazolil)-1H-bencimidazol.

6.3.2.3 Ensayo de la línea celular tumoral de glándula mamaria MCF-7.

Las línea celular MCF-7 obtenida de epitelio mamario humano y los fibroblastos de ratón rutinariamente fueron mantenidos en medio DMEM Modificado: suero bovino fetal, penicilina y eritromicina bajo condiciones estándares. Se colocaron de 2000-3500 células en los pocillos de una placa de ELISA se incubaron con diferentes concentraciones del extracto acuoso de madera de duramen de *E. cyclocarpum* (1, 10, 100 y 1000 µg), como control positivo se uso el 5- fluorouracilo (5FU) (0.1, 1,10 y 100 µg). La concentración inhibitoria media del crecimiento celular CI_{50} se determinó por el método de regresión lineal ($y = mx + b$), utilizando los datos de la viabilidad celular obtenida a las 24 y 48 horas después del tratamiento determinada por un método colorimétrico para medir crecimiento celular y citotoxicidad con el amarillo de tetrazolium [MTT; bromuro de 3-(4,5-dimetil tiazol-3-il)-2,5-difenil tetrazolium)] el cual es reducido a formazán púrpura en células vivas. Se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (r) que nos indica la relación dosis respuesta entre las concentraciones y el porcentaje de crecimiento. Se tomará en consideración que concentraciones >1000 µg no son tóxicas y <1000 µg son tóxicas, según el criterio de (Cordell *et al.*, 1993; Mongelli *et al.*, 1997; Boik, 2001).

6.4 Lixiviación del extracto acuoso de *E. cyclocarpum* en discos de madera de pino.

Se utilizaron discos de madera de pino de 4.5 cm de diámetro un 1 mm de espesor. Se pesaron los discos de madera, se impregnaron con el extracto acuoso de madera de duramen de *E. cyclocarpum* a la concentración de 0.2626 mg/mL de fenolicos totales equivalentes durante 3 horas. Se pesaron los discos impregnados después de secarlos, se determinó la cantidad de sólidos retenidos en la madera. Se secaron en el horno a 40°C y se determinó el peso final. Posteriormente se colocaron los discos impregnados y secos en agua desionizada durante cinco días, se pesaron y secaron para determinar los sólidos retenidos, el liquido lixiviado se concentró por liofilización y se determinó la cantidad de sólidos lixiviados. Los discos tratados se llevaron a sequedad hasta peso constante.

VII Análisis de los resultados

Los experimentos fueron conducidos en un diseño completamente al azar para las pruebas de toxicidad: a) barrenadores de madera seca con $n = 3$ (la unidad experimental fue de 15 - 25 ninfas por tratamiento); b) con ratas, $n = 3$ (la unidad experimental fue de 5 ratas por concentración en cada tratamiento); c) con el crustáceo $n = 3$ (la unidad experimental fue de 10-15 individuos por tratamiento); d) para bacterias, hongo y oomiceto con $n = 3$ (unidad experimental fue de tres aislados clínicos por especie bacteriana y por tratamiento); e) líneas neoplásicas y tumorales, $n = 3$ (una línea neoplásica y una línea celular de fibroblastos de ratón, unidad experimental de 5). Los datos fueron analizados por ANOVA y por *t*-Student a una significancia de $p = 0.05$.

A excepción de los datos obtenidos con los aislados microbianos y las líneas celulares en los cuales se determinó la CI_{50} en función del índice de crecimiento midiendo el halo de inhibición del crecimiento bacteriano en presencia del extracto y dividido entre el halo de crecimiento del control negativo, o la turbidez del medio para las líneas celulares. Mientras que los datos obtenidos con animales se sometieron a un análisis Probit para calcular la concentración letal que aniquila al 50 % de los individuos (CL_{50}) en el intervalo de 24 a 168 h de exposición, según el organismo.

VIII. Resultados

8.1 Determinación de la toxicidad aguda en animales provocada por el extracto acuoso de madera de duramen de *E. cyclocarpum*.

8.1.1 Efecto tóxico agudo de *A. salina* causado por el extracto acuoso de *E. cyclocarpum*.

Se determinó la concentración letal media del extracto acuoso obtenido de madera de duramen de *E. cyclocarpum* sobre el crustáceo *A. salina*, un organismo aceptado como indicador en ensayos de toxicidad aguda y citotoxicidad ver el Cuadro 8. La CL_{50} fue de 1300 $\mu\text{g/ml}$ de extracto acuoso de *E. cyclocarpum* casi igual que para el extracto de crisantemo, mientras que el efecto de sulfato de berberina fue letal a los cinco minutos (0.083 h).

Cuadro 8. CL_{50} del extracto acuoso de duramen de *E. cyclocarpum* sobre crustáceo *A. salina*.

Para determinar la CL_{50} se hizo una curva de dosis respuesta de individuos muertos versus la concentración del extracto acuoso (intervalo de concentración fue de 1, 10, 100, 1000 μg); $n = 3$; $ue = 10-15$ individuos; Tukey $p = 0.05$

Tratamiento	CL_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	Tiempo (h)
Extracto acuoso de <i>E. cyclocarpum</i>	1300	24
Sulfato de Berberina	0.01	0.083

81.2 Toxicidad en la termita de madera seca *I. marginipennis*.

El extracto acuoso del duramen de *E. cyclocarpum*, exhibió un efecto antitermita contra *I. marginipennis* (Latreille) dependiente del tiempo y de la concentración. La mortalidad de las termitas aumentó en función de la concentración del extracto alcanzando más el 60% de muerte a la concentración de 0.2626 mg de equivalentes fenólicos, comparada a la muerte natural de las termitas control (12%) Figura 13A. Mientras que la concentración efectiva media sobre la muerte de las termitas fue de 0.56 mg/mL (CL_{50})

Figura 13B. Conforme la concentración de FTE va aumentando las termitas dejan de alimentarse Figura 13C. Y el tiempo efectivo medio de muerte de la termita fue de 5 semanas (TL_{50}) Figura 13D.

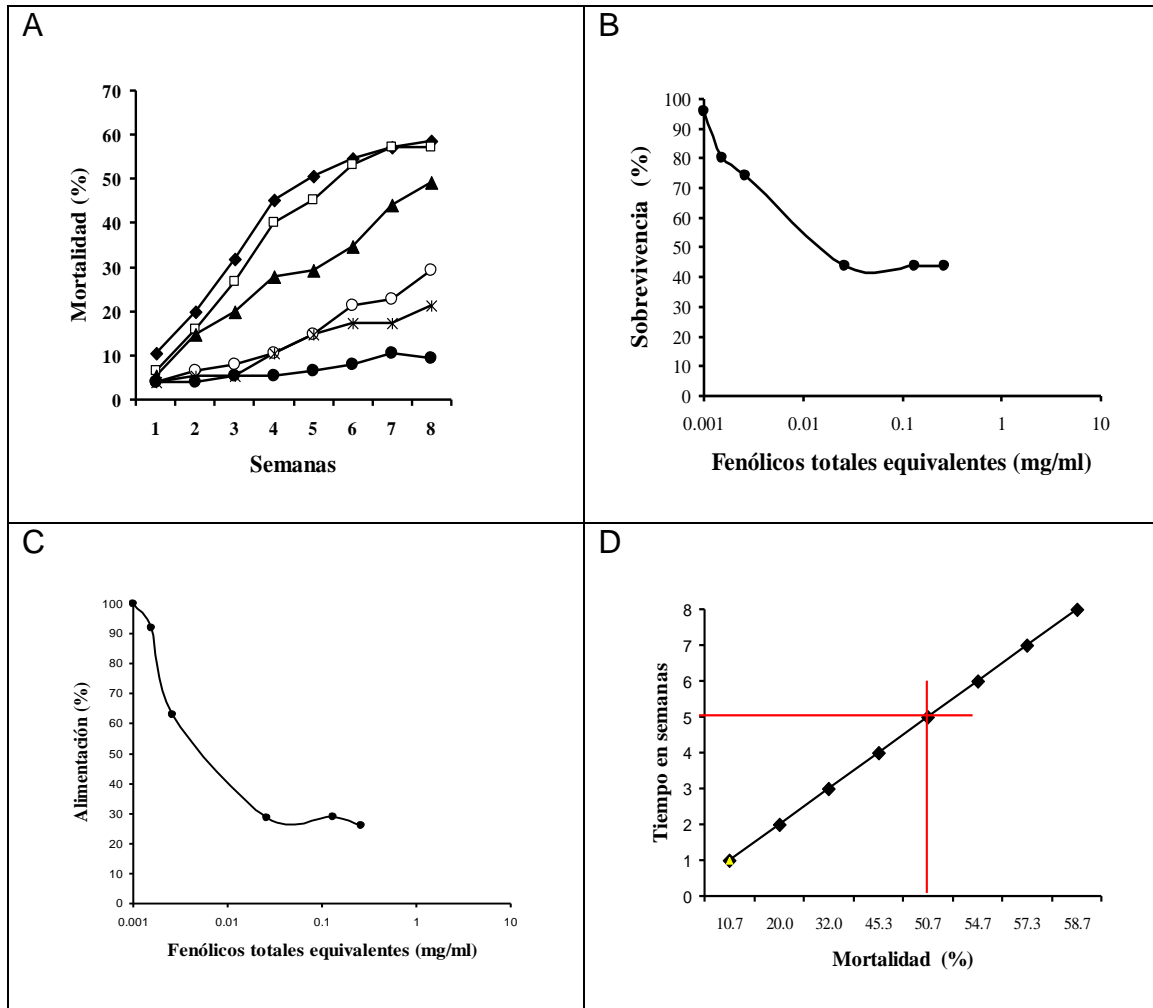


Figura 13. Mortalidad y alimentación de termitas. A) Mortalidad de *I. marginipennis* en presencia del extracto acuoso de *E. cyclocarpum* durante ocho semanas. Fenólicos totales equivalentes ■ 0.2626 mg/mL, □ 0.1313 mg/mL, ▲ 0.026 mg/mL, ○ 0.0026 mg/mL, ✕ 0.00026 mg/mL, ● control. B) Curva de dosis respuesta entre el extracto acuoso de *E. cyclocarpum* y *I. marginipennis*. C) Alimentación relativa de *I. marginipennis* a diferentes concentraciones del extracto acuoso de *E. cyclocarpum*, y D) Tiempo Letal 50 (TL_{50}) se observa el 50% del la muerte de la población. $n = 3$; $ue = 25$ termitas; Tukey, $p = 0.05$.

81.3 Toxicidad aguda en las ratas Wistar por el extracto acuoso de madera de duramen de *E. cyclocarpum*.

La toxicidad aguda causada por el extracto acuoso de *E. cyclocarpum* fue nula, se observó erizamiento de pelos y una disminución de la actividad motora de las ratas que fue superada después de tres horas de la alimentación con sonda oró-gástrica, un comportamiento similar se observó con las ratas alimentadas con el extracto de crisantemo Cuadro 9. Mientras que la quercitina indujo una toxicidad aguda de 200 mg/kg (CL_{50}) causando el 50% de muerte en la población de ratas a los cuatro días (TL_{50}).

Cuadro 9. CL_{50} del extracto acuoso de duramen de *E. cyclocarpum* en ratas Wistar.

Para la determinación de la CL_{50} se siguió el protocolo de la IACUC para determinar la toxicidad aguda límite cuando se utiliza como modelo biológico de estudio a la rata Wistar. $n = 3$; $ue = 5$ ratas; Tukey $p = 0.05$

Extracto/sustancia activa	CL_{50} (mg/kg)	Tiempo (h)
Extracto acuoso de <i>E. cyclocarpum</i>	> 3000	> 168
Extracto de crisantemo	> 3000	> 168
Quercitina	200	168

8.2 Determinación de la toxicidad aguda en otros organismos causada por el extracto acuoso de madera de duramen de *E. cyclocarpum*.

8.2.1 Ensayo de inhibición del crecimiento en bacterias.

El extracto acuoso de madera de duramen de *E. cyclocarpum* ejerció un efecto en el crecimiento de *K. pneumoniae* hasta por seis horas con una CI_{50} de 300 μ g, con un halo de inhibición de 29 mm, fue la enterobacteria más sensible a los extractos. No se observó efecto inhibitorio del crecimiento causado por el extracto acuoso de *E. cyclocarpum* en los doce aislados bacterianos restantes (bacterias Gram positivas y Gram negativas) pues crecieron en concentraciones hasta de 1 mg, Cuadro 10.

8.2.2 Efecto tóxico en el hongo *C. albicans* y en el oomicete *P. cinnamomi*.

No se obtuvieron resultados de inhibición en esta prueba, ya que los extractos a una concentración de 1 mg no inhibieron el crecimiento del hongo dimórfico *C. albicans* ni del oomiceto *P. cinnamomi* Cuadro 10.

Cuadro 10. CI_{50} del extracto acuoso de madera de duramen de *E. cyclocarpum* sobre bacterias, hongos y oomicetos

Se determinó la concentración inhibitoria media (CI_{50}) del crecimiento bacteriano mediante el clásico ensayo de difusión en papel-agar. $n = 3$, $ue = 3$; Tukey $p = 0.05$.

Microorganismo	Especie	CI_{50} (μ g)	Tiempo (h)
Bacterias	<i>K. pneumoniae</i>	300	>6
	<i>P. vulgaris</i>	>1000	..
	<i>P. mirabilis</i>
	<i>S. epidermidis</i>
	<i>S. saprophyticus</i>
	<i>S. aureus</i>
	<i>P. auriginosa.</i>
Hongos	<i>C. albicans</i>	>1000	>120
Oomiceto	<i>P. cinnamoni</i>	>1000	>120

82.3 Efecto tóxico en línea celular MCF-7 y Fibroblastos 3T3 de ratón.

La concentración letal media del extracto acuoso fue de 133.26 μ g para la línea celular MCF-7 y para los fibroblastos fue de 170 μ g, ambos fueron sensibles a 5-FU al cabo de tres días de exposición Cuadro 11. En relación a la actividad citotóxica considerada peligrosa de <100 μ g para extractos vegetales. (Mongelli *et al.*, 1997; Monks *et al.*, 2002).

Cuadro 11. CI_{50} del extracto acuoso de duramen de *E. cyclocarpum* en la línea celular MCF-7

Se determinó la concentración inhibitoria media provocada por el extracto acuoso en células tumorales de epitelio mamario MCF-7 y una línea celular no tumoral fibroblastos 3T3, la viabilidad se determinó por la extrapolación simple a un estándar de MTT y la construcción de una curva de dosis respuesta. $n = 3$, $ue = 5$; Tukey $p = 0.05$

Línea celular neoplásica	Extracto acuoso CI_{50} (μg)	5-Fluoro Uracilo CI_{50} (μg)	Tiempo (h)
Fibroblastos	170	2	72
MCF-7	133.26	5	72

8.3 Lixiviación del extracto acuoso de *E. cyclocarpum* de los discos de madera de pino.

En los discos impregnados con el extracto acuoso de *E. cyclocarpum* se determinó la retención del extracto en la madera de pino y esta fue del 43.7mg equivalente al 100% relativo. Cuando los discos impregnados fueros puestos en una condición extrema con agua desionizada durante cinco días, el extracto se lixivió hasta en un 62.92%, y la madera después de este tiempo sólo retuvo el 37.08 % Figura 14. Este resultado sugiere que la madera impregnada para protegerla contra insectos debe estar en interiores donde no esté en contacto con la humedad. Sin embargo aun cuando el extracto es lixiviado y está en contacto con las personas y los enseres impregnados con el extracto están en contacto con agua y ésta es vertida al medio ambiente y por los datos anteriormente expuestos en cuanto a su inocuidad se puede utilizar como protector de madera seca debido a que el extracto no mostró toxicidad aguda sobre los diferentes organismos utilizados en este trabajo.

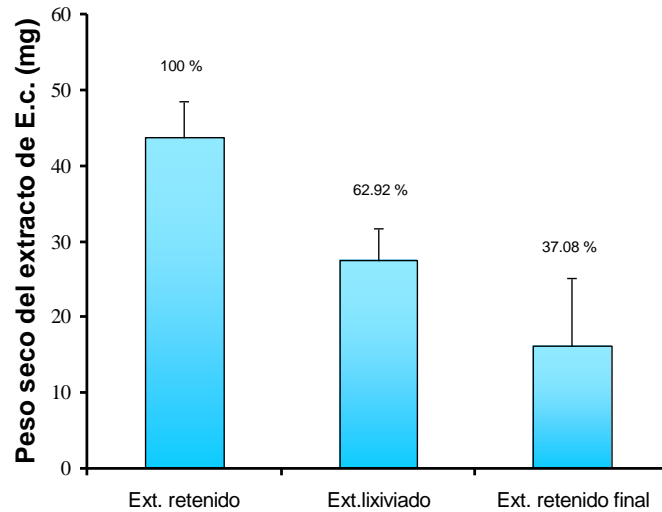


Figura 14. Lixiviación del extracto acuoso obtenido de duramen de E. cyclocarpum. Madera de pino tratada con el extracto acuoso fue sometida a un proceso de lixiviación por cinco días, al final se determinó la cantidad de extracto lixiviado y el retenido. Se reporta como miligramos de extracto lixiviado y en porcentaje relativo ($n = 4$, unidad experimental = 5, Tukey $p = 0.05\%$).

IX DISCUSION

Una alternativa para el control de plagas y patógenos indeseables son los metabolitos secundarios vegetales producidos por las plantas en su ciclo de vida y que los utilizan para su comunicación, supervivencia o su defensa contra patógenos, plagas y predadores. Particularmente aquellos metabolitos extraídos de plantas utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de algunas infecciones humanas, o bien, de maderas con una probada durabilidad natural al biodeterioro.

Es conocido en la sabiduría popular que el duramen de *P. pseudostrobus*, *M. zapota* y *C. odorata* es muy durable, el de *S. macrophylla* moderadamente durable y *Q. laurina* poco durable, siendo un factor importante en la durabilidad natural de la madera las sustancias extraíbles producidas en la planta viva. Los metabolitos secundarios extraíbles de maderas con durabilidad natural, además de servir en la defensa vegetal contra plagas y fitopatógenos cumplen otras funciones, por ejemplo Ávila, (1999), estudió el efecto de los extractos en la variación dimensional, la densidad, el punto de saturación de la fibra (PSF) y el esfuerzo a la compresión paralela en la madera de duramen de *E. cyclocarpum* (Jacq). Griseb. y concluyó que a altos contenidos de extractivos disminuyen la variación dimensional y el punto de saturación de la fibra, mientras que la densidad y el esfuerzo a la compresión paralela no se vieron afectados por la variación del contenido de éstos compuestos.

Indudablemente que los extractos vegetales son potencialmente útiles al hombre, pero es necesario tomar en cuenta que también pueden contener componentes que pueden causar toxicidad en su uso normal. Son numerosos los ejemplos de plantas venenosas o de componente vegetales presentes en bajas dosis que causan efectos tóxicos diversos incluyendo la muerte. Por lo que es importante conocer tanto el efecto tóxico agudo como el crónico, sin embargo en este trabajo se estudió el posible efecto tóxico agudo de un extracto acuoso obtenido de madera de duramen de *E. cyclocarpum* que mostró actividad disuasiva contra barrenadores de madera seca (Raya González, 2007) y que dada la importancia económica y ecológica de estos organismos hacen que este extracto sea un posible protector de madera seca

“eco-amigable” que se pueda comercializar en el futuro cercano, como un agente disuasivo de insectos barrenadores de madera seca.

Toxicidad aguda en animales bio-indicadores

El control químico es el método primario para controlar plagas. Sin embargo el control con plaguicidas es difícil en los trópicos, por varias razones, por ejemplo, a) la penetración de los venenos de contacto y de bajo costo después del tratamiento tópico pueden ser inhibidos por la cubierta protectora cerosa de los insectos, b) falta de cobertura de la aplicación tópica en el follaje, permitiendo la sobre vivencia de los insectos que no entraron en contacto con el compuesto químico, o bien, c) ciclos de vida múltiples y cortos con altas tasas de reproducción favorecen una rápida selección de biotipos resistentes a diferentes clases de insecticidas, como los organofosfatos, piretroides, cyclodienos y al reciente insecticida el nicotinil cloruro (Georghiou y Lagunas-Tejada, 1991; Badii y Garza Almanza, 2007). En donde las sustancias repelentes son importantes en el control de plagas.

Recientemente Raya *et al.*, (2007) demostraron que el extracto acuoso obtenido de madera de duramen de *E. cyclocarpum* (parota, nombre común) tiene propiedades repelentes y antialimentarias contra la termita de madera seca *I. marginipennis* y contra el licuido barrenador de madera de encino *Lyctus planicollis*. Un extracto con el que se puede proteger maderas de baja durabilidad tal como la de pino y la de encino, por lo que el propósito de este estudio es demostrar que el extracto acuoso obtenido de duramen de *E. cyclocarpum* no produce toxicidad aguda en los organismos que entran en contacto con madera de pino protegida con este extracto. Se demostró que en ensayos de no selección de alimento (alimentación forzada) el 50 % de las termitas murieron después de las cinco semanas de alimentación con el extracto y el tiempo letal medio (TL₅₀) fue de cinco semanas, la concentración letal 50 (CL₅₀) fue de 2 mg. Por la cantidad grande de extracto acuoso vegetal y por el periodo de tiempo en que tardaron de morir el 50 % de las termitas, se considera que el extracto no causa toxicidad aguda a las termitas. Fortalece la observación de Raya *et al.*, (2007) de que el extracto contiene componentes disuasivos.

En este trabajo se utilizaron larvas del crustáceo *A. salina* el que fue seleccionado debido a que esta especie es utilizada como indicador biológico por su sensibilidad a compuestos químicos. Se adapta fácilmente a una amplia variedad de ambientes y es un organismo ampliamente investigado y aceptado como un indicador biológico con un alto grado de credibilidad y confiabilidad en ensayos de eco-toxicidad marina (Vanhaecke *et al.*, 1981). Ha sido de tal magnitud el éxito de este organismo como bioindicador que desde entonces se ha utilizado para ensayar la toxicidad aguda de nuevas moléculas, tóxicos ambientales, etc. Cuando se expusieron nauplios de *A. salina* al extracto acuoso se observó una CL₅₀ de 1300 µg/ml una cantidad superior al criterio de toxicidad de valores de CL₅₀ 20 µg/ml (punto de corte para detectar actividad citotóxica en extractos vegetales sugerido por Geran *et al.*, 1972), un criterio ampliamente aceptado para escrutinio de extractos vegetales con componentes citotóxicos. Esto significa que el extracto acuoso obtenido del duramen de *E. cyclocarpum* no es tóxico para *A. salina*.

La rata Wistar es un organismo modelo que es razonablemente análogo para los humanos, ampliamente utilizado para ensayar la toxicidad aguda de sustancias de interés. La concentración letal media (CL₅₀) se determinó de acuerdo a los lineamientos de la IACUC (2000) que indican que para determinar la toxicidad aguda límite de un sustancia o grupo de sustancias existen dos procedimientos ambos de dosis única, uno es la “prueba límite” (Limit test) en el que la dosis de la sustancia problema puede ser de 2000 mg/kg_{individuo} y 5000 mg/kg_{individuo}. Se observó que las ratas Wistar sobrevivieron a las dosis de 2000 y 5000 mg/kg_{individuo} del extracto acuoso vegetal, no se observó muerte en las primeras 24 y consecutivas 72 horas, al igual que con uno de los testigos positivos, el extracto de crisantemo. En tanto que para la quercitina si se observó un efecto tóxico agudo a la concentración de 200 mg/kg de peso.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en su documento “Acute Hazard Rankings”, indica que es improbable que una sustancia sólida ingerida por mas de 2,000 mg/kg_{individuo} presente una toxicidad aguda oral en el uso normal según las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization, 2005). Este dictamen en algunos casos es equivalente al

de otros organismos evaluadores de la toxicidad tales como; US-Environmental Protection Agency. (US-EPA) (Categoría IV) [U.S. EPA *Health Effects Test Guidelines: Acute Toxicity Background*, U.S. EPA], US-NTP [U.S. National Toxicology Program; Acute Hazard Rankings], Chemical Health and Safety Data, U.S. National Toxicology Program 2002, Materials Safety Data Sheets (MSDS) y al TRI (U.S. EPA's Toxics Release Inventory). Esta base de datos construida por OMS incluye la toxicidad aguda de alrededor de 575 plaguicidas químicos, no incluye plaguicidas gaseosos ni obsoletos. Es una base de datos que se actualiza cada dos años y se presenta en PAN Pesticide (Pesticide Action Network (PAN) Acute Toxicity Description) (<http://www.pesticideinfo.org>). Estos resultados indican que la CL_{50} es mayor que las concentraciones de extracto acuoso vegetal y que por tanto el extracto acuoso obtenido del duramen de madera de *E. cyclocarpum* no produce toxicidad aguda en ratas Wistar.

Toxicidad aguda en organismos de otros niveles tróficos

Más allá de la fuerte y seria crítica del uso de roedores para estimar la dosis letal media/concentración letal media (DL_{50}/CL_{50}), debido principalmente a la baja correlación entre el efecto observado en el roedor y en el humano con un coeficiente de correlación, $R_2 = 0.61$ y 0.65 para rata y ratón (Ekwall, 1998), a la baja predicción de los efectos de la toxicidad aguda para el humano de 43 % (Olson, 2000) y a que las pruebas de toxicidad aguda en animales cuando se usa la DL_{50}/CL_{50} o cualquier otro protocolo, nunca han sido formalmente validados por estándares modernos para establecer su relevancia para los humanos [OECD, 1996].

Como se pretende aplicar este extracto para proteger a la madera de pino del biodeterioro causado por insectos barrenadores, se determinó la toxicidad de este extracto en organismos de otros niveles tróficos como lo recomienda la Unión Británica para la Abolición de la Vivisección (BUAV, por sus siglas en inglés) [Langley, 2005]

Encontramos que el extracto acuoso del duramen de *E. cyclocarpum* presentó un efecto bactericida únicamente para *K. pneumoniae* y no tuvo efecto antimicrobiano en *Proteus vulgaris*, *P. mirabilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. aureus* y *Pseudomonas auriginosa*, indicando que el extracto no es bacterio-tóxico para estas bacterias test.

Los extractos acuosos de *E. cyclocarpum* no registraron efectos negativos sobre el crecimiento del hongo dimórfico *C. albicans*, ni del oomiceto *P. cinnamomi*. A diferencia de la actividad anti-fungicida de los extractos de la madera de duramen de *E. cyclocarpum* obtenidos con una mezcla de ciclohexano, etanol y agua, contra hongos que atacan la madera como *Trametes versicolor* (pudrición blanca), *Coniophora puteana* (pudrición café), *Chaetomium globosum* (pudrición blanda) y *Trichoderma viride* (mancha azul) (Rutiaga *et al.*, 1995). La observación indica que el extracto acuoso de *E. cyclocarpum* no contiene componentes fungi ni oomiceti tóxicos.

En el programa de escrutinio de plantas del Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos de América (USA-NCI, por sus siglas en inglés), indica que un extracto crudo es generalmente considerado por tener actividad citotóxica *in vitro* si la CI_{50} en células de carcinoma KB, después de 48 a 72 es menor de 20 $\mu\text{g/ml}$, mientras que un compuesto puro es tóxico si la CI_{50} es menor de 4 $\mu\text{g/ml}$ (Cordell *et al.*, 1993; Boik, 2001). Se observó que se requiere una concentración de extracto acuoso mayor de 130 μg para causar la muerte del 50 % de células cancerosas MCF-7 y de no cancerosas 3T3, mientras que para la sustancia de referencia 5-FU (control positivo) se requirió de menos de 5 μg para causar un efecto citotóxico a los tres días. Es una cantidad de extracto acuoso superior al indicador propuesto por USA-NCI, sugiriendo que el extracto acuoso obtenido de duramen de *E. cyclocarpum* no posee componentes citotóxicos.

De un objeto de madera de pino preservado se determinó la cantidad de extracto acuoso que se desprendía al medio ambiente, por lo que se hicieron ensayos de lixiviación y se observó que efectivamente el agua arrastra al extracto acuoso. Sin embargo el extracto acuoso lixiviado no es un factor importante para inducir una posible toxicidad aguda, debido a que ya se demostró que el extracto acuoso no contiene componentes que causen toxicidad aguda, es decir es inocuo. Por otra parte, debido a que en el procesamiento y acabado de objetos de madera se aplican varias capas de aditivos y pinturas que son impermeables al agua pero no a la mordedura de insecto barrenador de madera. Por lo que se recomienda que el extracto acuoso vegetal se aplique en primer lugar, después el “sellador” y por último la

pintura y barnices protectores y de acabado. Asimismo se recomienda que el extracto acuoso se aplique para preservar objetos de madera cuyos destinos son los interiores en donde están escasamente en contacto con factores ambientales como la lluvia, la nieve y el hielo.

X CONCLUSIÓN

El extracto acuoso de *Enterolobium cyclocarpum* es inocuo para los organismos probados en este estudio y puede ser utilizado como protector de madera de baja durabilidad que va a ser utilizada en interiores.

XI Referencias bibliográficas

- Abe T, Bignell DE, Higashi M. 2000. Termites: Evolution, Sociality, simbiosis, Ecology. Kluwer Academic Publisher (eds), Dordrecht.
- Aspelin AL, Grube AH. 1998. Pesticide Industry Sales and Usage: 1996 and 1997 Market Estimates. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, US Environmental Protection Agency. 733-R-98- 0001. Washington, DC 20460. 37 pp.
- Avila Calderón LEA. 1999. Efecto de los extraíbles en cuatro propiedades físicas y mecánicas de la madera de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq) Griseb. Tesis de Maestría en Ciencias en Tecnología de la Madera FITECMA, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Mich. México.
- Badii MH, Garza Almanza V. 2007. Resistencia en insectos, plantas y microorganismos. CULCyT//Impacto Ecológico, 4:9-25.
- Bobadilla, EA, Pereyra, O, Silva F, Stehr AM, Estehr, Curitiba PR. 2005. Durabilidad natural de la madera en dos especies aptas para la industria de la construcción. Floresta, 35:419-428.
- Boik J. 2001. Natural compounds in cancer therapy. Oregon Medical Press, Minesota, USA, p. 25.
- Bourguet D, Genissel A, Baymond M. 2000. Insecticide, resistance and dominance levels. J. Econ. Entomol. 93:1588-1595.
- Cancello EM, Myles TG. 2000. Isoptera. En: Llorente JB, González E, García A, Papayero N. (Eds); Biodiversidad, Taxonomía y Biogeografía de Artrópodos de México: Hacia una síntesis de su conocimiento. Volumen 2.
- Carballeira López S, Milano G. 1986. Manual de preservación de maderas. San Pablo: Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de San Pablo, cap. 10.
- CICOPLAFEST. 1998. Catálogo oficial de plaguicidas autorizados para uso agrícola, Comisión Intersecretaril para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizante y Sustancias Tóxicas. México D.F.pp. 15– 54.
- Clement 2000. Dirección electrónica: www.osasun.cl/paginas/termitas.htm.
- COMACO. 1995. Manual de Construcciones de estructuras ligeras de madera en la construcción. Comisión Forestal de América del Norte. Consejo Nacional de la Madera en la Construcción A. C. México D. F. 472 p.
- Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS). 2002. Primer Diagnóstico Nacional de Salud Ambiental y Ocupacional. 52 p.
- Cordell GA, Kinghorn D, Pezzuto JM. 1993. En: Bioactive Natural Products. Colegate SM, Molyneux RJ. Eds. Boca Raton CRC Press. Pp 195-216.

- Corral López MG. 1985. Características anatómicas de la madera de once especies tropicales. Bol. Tec. Inst. Nac. Inv. For. No. 127. México. 68 p.
- Chudnoff M. 1984. Tropical timbers of the World. United States Department of Agriculture. Agriculture Handbook No. 607. Washington, D. C.
- Dixon R. 2001. Natural products and plant disease resistance: Plant defenses Rev. Nature, 411, 843pp.
- Duke SO. 1990. Natural pesticides from plants. En: Advances in new crops. J. Janick and J. E. Simon (eds.), Timber Press, 511-517.
- Ekwall B. et al., 1998. Multicentre Evaluation of *In vitro* Cytotoxicity tests program (MEIC) evaluation of acute systemic toxicity. Part VI. The prediction of human toxicity by rodent LD50 values and results from 61 *in vitro* methods. ATLA 26:617-658
- Evans WC. 1991. Farmacognosia. Editorial Interamericana, 45: 692-714.
- Francis JK. 1988. *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. Guanaste, earpod-tree. SO-ITF-SM-15. New Orleans, LA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station. 4 p.
- Freemark K. 1995. Assessing effects of agriculture on terrestrial wildlife: developing ahierarchical approach for the US EPA. Landscape and Urban Planning, 31:99-115.
- Georghiou GP, Lagunas-Tejada A. 1991. The occurrence of resistance to pesticides in arthropods. Food and agriculture organization of the United Nations. Rome. P 318.
- Geran RI, Greenberg HM, McDonald M, Abbot BJ. 1972. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. Cancer. Chemoth. Rep. 33:1-17,
- Gouffi K, Bernard T, Blanco C. 2000. Osmoprotection by pipercolic acid in *Sinorhizobium meliloti*: Specific effects of D and L isomers. App. Environ. Microbil. 66: 2358-2364 p.
- Guridi Gómez LI. 1980. La madera en las artesanías del Estado de Michoacán. Inst. Nac. Inv. For. Bol. Tec. No. 50. México.132 p.
- Heiden P. 1991. Insecticidal constituents of *Azadirachta indica* and *Melia azedarach* (Meliaceae). En: Naturally occurring pest bioregulators. Heidin P. Ed. ACS Symp. Series, Washington, DC. pp 293-304
- IACUC (2000). Institutional Animal Care and Use Committee). Recommendation on LD50 testing. Página de internet: <http://iacuc.cwru.edu/policy/nihpolicies/iracl50.htm>.
- Ivan M, Mir PS, Mir M, Koenig K M, Newbold CJ, Entz T, Ride LM, Ibrahim M. 2002. Use of dietary saponin or vegetable oil to control protozoal populations in

the rumen of sheep. 6th International Conference on Agricultural biotechnologies: New avenues for production, consumption and technology transfer. Revello, Italy from July 11 to 14.

Langley G. 2005. Acute toxicity testing without animals: "more scientific and less of a gamble. British Union for the Abolition of Vivisection. Web: www.buav.org.

IAWA 1964. International Association of Wood Anatomist. Multilingual glossary of terms used in wood anatomy. Committee on Nomenclature International Association of Wood Anatomist. 186 p.

Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) 2007. Publicación El Sector Alimentario en México, Edición 2007.

Jacobson M. 1989. Botanical pesticides: past, present and future. En: Insecticides of plants origin. Eds. JT Arnason y BJR Philogene. American Chemical Society, 1-10 pp.

Kraemer KG. 1958. Compendio de la conservación de maderas. Ed. Santa Lucia. Santander, España. 527 p.

Langley G. 2005. Acute toxicity testing without animals: "more scientific and less of a gamble. British Union for the Abolition of Vivisection. Web: www.buav.org.

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

Mansour FA, Aschr KRS, Omari N. 1986. Toxicity of neem (*Azadiracta indica*) seed kernel extracts prepared with different solvents, on the spider *Chiracanthium mildei*. *Phytoparasitica*, 14:73-76.

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

Menjívar R. 2001. Insecticidas naturales. Riesgos y Beneficios. www.elsalvador.com/hablemos/Ediciones/290701/actualidad.htm [5/5/004]

Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, Mc Laughlin JL. 1982. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.* 45:31-34.

Mongelli E, Desmarchelier C, Rodríguez Talou J, Coussio J, Ciccía G. 1997. *In vitro* antioxydant and cytotoxic activity of extracts of *Baccharis coridifolia* DC. *J. Ethnopharmacology.* 58:157-163;

Monks NR, C Lerner, AT Henriques, FM Farias, ES Schapoval, ES. Suyenaga, AB Rocha, G Schwartzmann, B Mothes. 2002. Anticancer, antichemotactic and antimicrobial activities of marine sponges collected off the coast of Santa Catarina, southern Brazil. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 281: 1-12.

Niembro Rocas 1990. Árboles y arbustos de México. Naturales e Introducidos. Ed. Limusa. México D. F. 206 p.

NOM-005-RECNAT-1997. Que establece los procedimientos, criterios y especificaciones para realizar el aprovechamiento, transporte y almacenamiento de corteza, tallos y plantas completas de vegetación forestal. Secretaría de Recursos Naturales. México (1997).

NOM-007-RECNAT-1997. Que establece los procedimientos, criterios y especificaciones para realizar el aprovechamiento, transporte y almacenamiento de ramas, hojas o pencas, flores, frutos y semillas. Secretaría de Recursos Naturales. México (1997).

NOM-009 RECNAT-1997. Que establece los procedimientos, criterios y especificaciones para realizar el aprovechamiento, transporte y almacenamiento de látex y otros exudados de vegetación forestal. Secretaría de Recursos Naturales. México (1997).

NOM-059-ECOL-1994. Que determina las especies y subespecies de flora y fauna silvestres terrestres y acuáticas en peligro de extinción, amenazadas, raras y sujetas a protección especial, y que establece especificaciones para su protección. Secretaria de Desarrollo Social. México (1994).

OECD 1996. Final report of the Solna workshop on validation and regulatory acceptance criteria for alternative tests. OECD report ENV/MC/CHEM/TG(96)9.

Olson H, 2000. Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in human and in animals. Reg. Toxicol. Pharmacol. 32:56-67.

Organización Mundial de la Salud (OMS) 2005. Anexo I: Manejo racional de plaguicidas químicos.

Ottaway M. 2001. Botanical Pesticides: Past, present and future. En: Insecticides of Plant Origin. Arnason, JT. Philogene BJR, Morand P ACS Symposium Series, 387. 1-10.

Pamatz Bolaños T. 2008. Purificación del pinitol a partir de un extracto acuoso obtenido del duramen de *Enterolobium cyclocarpum*. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Pennington TD, Sarukhan J. 1968. Árboles de México, Ediciones Científicas Universitarias, 2da. Edición. Editorial UNAM-Fondo de Cultura Económica. México. 210 p.

Pesticide Action Network (PAN). Acute Toxicity Description 2006. <http://www.pesticideinfo.org>.

Prabhaker N, Toscano NC, Coudriet DI. 1989. Susceptibility of the immature and adult stage of the sweetpotato whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) to select insecticides. J. Econ. Entomol. 82:983-988.

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 2007. Las maderas secas de encino (*Quercus* spp) y pino (*Pinus* spp) son protegidas del daño causado por *Lyctus* spp e *Insicitermes marginipennis* con extractos vegetales acuosos. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas opción en Biología Experimental Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Mich.

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.

Reyes Chilpa R, Pérez Morales V, Del Ángel SB. 1987. Influencia de los extractivos en la resistencia natural de seis maderas tropicales al hongo de pudrición morena *Lenzites trabea*. INIREB. Xalapa, Ver.

Rutiaga Quiñones JG, Windeisen E, Shumacher P. 1995. Antifungal activity of heartwood extracts from *Dalbergia granadillo* and *Enterolobium cyclocarpum*. Holz als Roh und Werkstoff, 53:308-308

Salud Ambiental, México, 2002. SSA-Programa Nacional contra los Riesgos por el Uso de Plaguicidas. 214p.

Salgado VL. 1997. The modes of action of spinosad and other insect control products. Down to Herat, 52(2):35-43. Dow AgroSciences, Midland, MI.

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

Scheffer TC. 1973. Microbiological degradation and the causal organisms. En: Wood deterioration and its prevention by preservative treatments. Vol. I. Degradation and protection of Wood. D.D. Nicholas (ed). Syracuse Wood Science Series 5. Syracuse Univ. Press. New York.

Schoonhoven LM, Jermy T, Van Loon JJ. 1998. Insect-Plant Biology from physiology to evolution. Chapman & Hall, Londres.

Sociedad Pública de Gestión Ambiental. 2005. Inventario y caracterización de residuos de madera tratada en la comunidad Autónoma del País Vasco. España. 37 p.

Suiter DR, Jones S, Forschler C. 2002. La Biología de Termitas Subterráneas del Este de los Estados Unidos. University of Georgia, State University. 7 p.

Staley JT, Orians GH. 1992. Evolution of the biosphere. En: Global Biogeochemical Cycles. Butcher, S.S., R.J. Charlson, Orians, G.H. y G.V. Wolfe (eds.). Academic Press Ltd. London. pp 21-54.

- Stoll G. 1989. Protección natural de cultivos en zonas tropicales. J. Margaf Ed.
- Swain T, Hillis WE. 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica* I. The quantitative analysis of phenolic constituents. J. Sci. Food Agric. 10:636
- The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification, 2004
- Tomlin C (2000). The Pesticide Manual, 12th Ed. British Crop Protection Council. Blackwell Scientific Publications, Cambridge, Massachusetts. 1250 pp.
- Thomson WT 2001. (1999-2000 Revision). Agricultural Chemicals, Book III, Miscellaneous Agricultural Chemicals. Thomson Publications, Fresno, California. 189 pp.
- Thomson WT (2001). Agricultural Chemicals, Book I, Insecticides. Thomson Publications, Fresno, California. 249 pp.
- Tripathi AK, Prajapati V, Aggarwal KK, Khanuja SPS. 2000. Repellency and toxicity of oil from *Artemisia annua* to certain stored-product beetles. J. Econ. Entom. 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. Entom. 94:979-83.
- Van Emden HF. 1992. Pest Control. University Press (2a ed.), Cambridge.
- Vanhaecke P, Persoone G, Claus C, Sorgeloos P. 1981. Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia* nauplii. Ecotoxicol. Env. Safety, 5:382-387.
- Vignote PS, Jiménez Periz FG. 1996. Tecnología de la Madera. Ministerio de agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid, España. 602 p.
- Ware GW, Whitacre DM (2004) The Pesticide Book, 6th Ed. 496 pp. Meister Media Worldwide, Willoughby, Ohio.
- WHO 2005. The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2004,
- Wiseman S, Eggleton P. 1994. The Termitidae Marked. Agrow report DS 88. PJB Publications, Richmond, Surrey, UK.