



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE  
SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE INGENIERÍA EN  
TECNOLOGÍA DE LA MADERA



EFECTO BIOCIDA DE LOS EXTRACTOS VEGETALES DE  
*Enterolobium cyclocarpum* (Jacq). Griseb. Y *Melia azedarach* L.

Que para obtener el título de:

Ingeniero en Tecnología de la Madera

Presenta:

Ricardo Castro Ortiz

Asesor de tesis:

M. C. David Raya González

Co-asesor de tesis:

Dr. Mauro Manuel Martínez Pacheco

Morelia, Mich., Septiembre del 2006

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	1
ÍNDICE DE CUADROS. .	3
1. INTRODUCCIÓN. ....	4
1.1. Generalidades. ....	5
1.2. <i>Melia azedarach</i> L. (Paraíso).....	6
1.3. <i>Enterolobium cyclocarpum</i> (Jacq). Griseb. ....	7
1.4. Otros usos. ....	8
2. JUSTIFICACIÓN. ....	9
3. HIPÓTESIS. ....	11
4. OBJETIVO GENERAL. ....	11
4.1. Objetivo particular 1. Determinar la actividad microbici- da de los extractos. ....	11
4.2. Objetivo particular 2. Determinar la actividad herbici- da de los extractos. ....	11
4.3. Objetivo particular 3. Determinar la actividad insectici- da del extracto acuoso aclarado del duramen de <i>Enterolobium cyclocarpum</i> (Jacq). Griseb. ....	11
5. MATERIALES Y MÉTODOS. ....	12
5.1. Organismos utilizados en el presente estudio. ....	12
5.2. Obtención de los extractos acuosos. ....	12
5.3. Ensayo para determinar la actividad bacterici- da. ....	15
5.4. Ensayo para determinar la actividad antifúngica. ....	17
5.5. Ensayo para determinar la actividad herbici- da. ....	18
5.6. Ensayo para determinar el daño causado en la membrana plasmá- tica. ....	19
5.7. Fraccionamiento del extracto acuoso de <i>Enterolobium cyclocarpum</i> (Jacq). Griseb. mediante cromatografía en columna. ....	20
5.8. Obtención y aplicación de las fracciones con actividad anti-termita del extracto acuoso de <i>Enterolobium cyclocarpum</i> (Jacq). Griseb.....	21

5.9. Análisis estadístico. ....	23
6. RESULTADOS. ....	24
6.1. De la inhibición de bacterias. ....	24
6.2. De la inhibición de los hongos. ....	24
6.3. Del efecto herbicida. ....	25
6.3.1. Extracto de <i>Enterolobium cyclocarpum</i> (Jacq). Griseb. ....	25
6.3.2. Extracto de <i>Melia azedarach</i> L. (Frutos). ....	27
6.3.3. Extracto de <i>Melia azedarach</i> L. (Hojas). ....	29
6.4. Del daño en la membrana plasmática. ....	32
6.4.1. Extracto de <i>Enterolobium cyclocarpum</i> .(Jacq). Griseb. ....	32
6.4.2. Extracto de <i>Melia azedarach</i> L. (Frutos). ....	33
6.4.3. Extracto de <i>Melia azedarach</i> L. (Hojas). ....	34
6.5. Del efecto insecticida de las fracciones del extracto acuoso de <i>Enterolobium cyclocarpum</i> (Jacq). Griseb. ....	35
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS. ....	36
7.1. Efecto en el crecimiento de bacterias. ....	36
7.2. Efecto en el crecimiento de hongos. ....	37
7.3. Efecto sobre la germinación de semillas. ....	38
7.4. Efecto sobre el daño causado en la membrana plasmática. ....	38
7.5. Efecto anti-termita. ....	39
8. CONCLUSIONES. ....	40
9. RESUMEN. ....	41
10. SUMMARY. ....	42
11. BIBLIOGRAFÍA. ....	43

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Árbol de *M. azedarach*, localizado en Huandacareo, Mich. .... 7
- Figura 2. Árbol de *Enterolobium cyclocarpum* localizado en Nueva Italia, Mich. .... 8
- Figura 3. Material vegetal en la obtención de extractos acuosos. A) Hojas de *Melia azedarach*. B) Frutos de *M. azedarach*. C) Madera de duramen de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq). Griseb. D) Sustrato molido de hojas de *M. azedarach*. E) Sustrato molido de frutos de *M. azedarach*. F) Sustrato molido de madera de duramen *E. cyclocarpum*. .... 13
- Figura 4. Equipo utilizado en la preparación de los extractos acuosos y en la medición de fenólicos totales. A) Molienda de los sustratos. B) Cocción de los sustratos molidos para la obtención de los extractos acuosos. C) Concentración de los extractos mediante liofilización (vacío). D) Determinación del contenido de fenólicos totales de los extractos. .... 14
- Figura 5. Ensayo de difusión en base agar sangre. A) Inoculación de las enterobacterias en medio estéril. B) Aplicación de 6µl del extracto a los discos de papel filtro. .... 16
- Figura 6. Ensayo con agar dextrosa sabouraud para la prueba fungicida. A) Aplicación de 6 µl de los extractos. B) Patógeno previamente cultivado, utilizado en la prueba fungicida (3 mm<sup>2</sup>). .... 18
- Figura 7. Metodología para las pruebas de germinación con los diferentes extractos. A) Aplicación de 10 ml del extracto. B) Colocación de las semillas. C) Concentraciones del extracto y el control (agua tridestilada). .... 19
- Figura 8. Medición de la conductividad en células de tabaco TBY2 en suspensión. A) Medición de la conductividad eléctrica de cada extracto. B) Agitación de las células con el extracto. .... 20
- Figura 9. Obtención de las fracciones del extracto de *E. cyclocarpum* mediante cromatografía en columna. A) Preparación de la columna de sílica gel. B) Adición de 1 ml del extracto. C) Corrimiento de la columna. D) Fracciones recolectadas. E) Determinación de los pesos iniciales y finales de las fracciones. F) Concentración de las fracciones. .... 21
- Figura 10. Cromatografía en placa fina de los extractos acuosos vegetales. A) Lámpara UV utilizada para el revelado de las placas. B) Placa revelada indicando la disposición de las fracciones. .... 22
- Figura 11. Ensayo antitermita. A) Fracciones utilizadas en la impregnación de los discos de papel. B) Discos de papel impregnados con cada una de las fracciones y el control. C) Colocación de las termitas (*I. marginipennis*). .... 22
- Figura 12. Efecto bactericida presentado por los extractos. A) Efecto del extracto de *Enterolobium cyclocarpum* sobre la inhibición de 7 enterobacterias. B) Efecto del extracto crudo de *Melia azedarach* (hojas) sobre la inhibición de *Klebsiella pneumoniae*. .... 24

- Figura 13. Efecto del extracto de *E. cyclocarpum* sobre la germinación de *T. repens* a las 96 h. A) Porcentajes de germinación. B) Control. C) 25 % (3.33 mg/ml). D) 50 % (6.67 mg/ml). E) 100 % (13.33 mg/ml).  $n = 10$ , pruebas de t-Student  $\alpha = 0.01$ . ..... 25
- Figura 14. Efecto del extracto de *E. cyclocarpum* sobre la germinación de *L. multiflorum* a las 96 h. A) Porcentajes de germinación. B) Control. C) 25 % (3.33 mg/ml). D) 50 % (6.67 mg/ml). E) 100 % (13.33 mg/ml).  $n = 10$ , pruebas de t-Student  $\alpha = 0.01$ . ..... 26
- Figura 15. Efecto del extracto de frutos de *M. azedarach* sobre la germinación de *T. repens* a las 96 h. A) Porcentajes de germinación. B) Control. C) 25 % (2.97 mg/ml). D) 50 % (5.94 mg/ml). E) 100 % (11.88 mg/ml).  $n = 10$ , pruebas de t-Student  $\alpha = 0.01$ . ..... 27
- Figura 16. Efecto del extracto de frutos de *M. azedarach* sobre la germinación de *L. multiflorum* a las 96 h. A) Porcentajes de germinación. B) Control. C) 25 % (2.97 mg/ml). D) 50 % (5.94 mg/ml). E) 100 % (11.88 mg/ml).  $n = 10$ , pruebas de t-Student  $\alpha = 0.01$ . ..... 28
- Figura 17. Efecto del extracto de hojas de *M. azedarach* sobre la germinación de *T. repens* a las 96 h. A) Porcentajes de germinación. B) Control. C) 25 % (2.54 mg/ml). D) 50 % (5.08 mg/ml). E) 100 % (10.15 mg/ml).  $n = 10$ , pruebas de t-Student  $\alpha = 0.01$ . ..... 29
- Figura 18. Efecto del extracto de hojas de *M. azedarach* sobre la germinación de *L. multiflorum* a las 96 h. A) Porcentajes de germinación. B) Control. C) 25 % (2.54 mg/ml). D) 50 % (5.08 mg/ml). E) 100 % (10.15 mg/ml).  $n = 10$ , pruebas de t-Student  $\alpha = 0.01$ . ..... 30
- Figura 19. Índice de germinación en los diferentes extractos a las 72 h. A) Índice de germinación de los tres extractos con *T. repens*. B) Índice de germinación de los tres extractos con *L. multiflorum*. ..... 31
- Figura 20. Efecto presentado en la membrana de las células de tabaco TBY2 por el extracto de *E. cyclocarpum*. A) Conductividad eléctrica de células TBY2 con la adición del extracto de *E. cyclocarpum*. B) Conductividad eléctrica en las diferentes diluciones. C) Curso temporal de la conductividad eléctrica. Tukey  $\alpha = 0.01$ . ..... 32
- Figura 21. Efecto presentado en la membrana de las células de tabaco TBY2 por el extracto de frutos de *M. azedarach*. A) Conductividad eléctrica de células TBY2 con la adición del extracto de frutos de *M. azedarach*. B) Conductividad eléctrica en las diferentes diluciones. C) Curso temporal de la conductividad eléctrica. Tukey  $\alpha = 0.01$ . ..... 33
- Figura 22. Efecto presentado en la membrana de las células de tabaco TBY2 por el extracto de hojas de *M. azedarach*. A) Conductividad eléctrica de células TBY2 con la adición del extracto de hojas de *M. azedarach*. B) Conductividad eléctrica en las diferentes diluciones. C) Curso temporal de la conductividad eléctrica. Tukey  $\alpha = 0.01$ . ..... 34
- Figura 23. Efecto insecticida y antialimentario de las fracciones de *E. cyclocarpum*. A) Curso temporal de alimentación de las fracciones y el control. B) Porcentajes de mortalidad de cada una de las fracciones y el control. C) Correlación alimentación contra mortalidad. Tukey  $\alpha = 0.05$ . . 35

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Toxicidad y efectividad de compuestos químicos contra degradadores de madera seca.....	5
Cuadro 2. Microorganismos, insectos y plantas utilizadas en este estudio. ....	12
Cuadro 3. Diluciones de los extractos acuosos para determinar el contenido de fenólicos totales equivalentes. ....	15
Cuadro 4. Bacterias utilizadas en las pruebas, su hábitat natural y sus enfermedades principales.....	17
Cuadro 5. Patógenos utilizados en las pruebas, su hábitat natural y sus enfermedades principales.....	18

## 1. INTRODUCCIÓN

Para el hombre diseñar métodos para el control de plagas e insectos que sean efectivos y sin impacto ambiental negativo así como económicamente rentables le ha sido difícil. Inicialmente utilizó extractos crudos vegetales y sales minerales hasta llegar a los pesticidas sintéticos, que hoy en día se han vuelto un problema de contaminación y deterioro ambiental, una realidad terrible que ha inducido un amplio replanteamiento tecnológico para el control de plagas. Así pues, una alternativa para el control de plagas y patógenos indeseables son los metabolitos secundarios vegetales producidos por las plantas en su ciclo de vida para su comunicación o para la supervivencia o para su defensa contra patógenos, plagas y predadores. Particularmente aquellos metabolitos extraídos de árboles y plantas utilizados en la medicina tradicional de los pueblos en algunas infecciones de humanos o de árboles con una probada durabilidad natural al deterioro.

En la actualidad no existe un criterio definido que indique cuantas especies vegetales se localizan en México, ni cuantas de ellas son utilizadas en la medicina tradicional o que poseen propiedades atractivas para la comodidad humana. Las plantas son una fuente de metabolitos secundarios los cuales potencialmente pueden desplazar a la mayoría de los compuestos utilizados en la actualidad que son tóxicos para el ser humano o que no son biodegradables a corto plazo, por compuestos de origen natural alternativos que posean modos de acción molecular diferente, que sean biodegradables y amigables con el medio ambiente y que no representen peligro para el usuario.

Al respecto, este trabajo muestra un esfuerzo para hacer un planteamiento en el control de algunas plagas mediante la exploración de las propiedades biocidas de dos especies arbóreas que crecen en la región, una es autóctona, *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq). Griseb. con el nombre local de “parota” y cuyo duramen posee una durabilidad natural al biodeterioro y la otra, *Melia azedarach* L. de reciente introducción a la región y originaria de Asia, de quien se conoce parcialmente su composición fitoquímica y algunas propiedades biocidas.

## 1.1. Generalidades.

Históricamente se han ensayado métodos químicos de control de plagas y enfermedades en función del organismo que se intenta controlar, las sustancias utilizadas tienen estructuras químicas diversas con diferentes modos de acción, pueden aniquilar al organismo blanco o pueden afectar su crecimiento o ser desagradables al gusto, al olfato o la vista, por ejemplo en la importante área de la protección y cuidado de la madera y subproductos, contra bacterias, hongos, insectos y condiciones ambientales, los preservadores de madera se clasifican en tres tipos: aceites naturales, oleosolubles e hidrosolubles. (Cockcroft y Henningson, 1983; Anónimo, 1986a). Actualmente en el control de los barrenadores de la madera seca se utilizan las sales hidrosolubles CCA (cobre, cromo, arsénico) y los compuestos oleosolubles (creosota), que son productos de gran persistencia, son tóxicos al ambiente y colorean la madera por éstos productos lo que limita su uso (Vignote y Jiménez, 1996). En el Cuadro 1 se describe la efectividad y toxicidad de los preservadores químicos actuales.

Cuadro 1. Toxicidad y efectividad de compuestos químicos contra degradadores de madera seca.

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

Anónimo, 1994b

AT= Altamente tóxico

MT= Moderadamente tóxico

LT= Ligeramente tóxico

ND = No determinada

México cuenta con una superficie arbórea primaria de 93'933,127 ha, de las cuales el 40 % (37'595,246 ha) de ésta superficie corresponde a: bosques tropicales 20 % (18'797,623 ha), selvas 19 % (17'792,279 ha) y otras asociaciones tropicales 1 % (1'005,344 ha) (Anónimo, 2000e). Desafortunadamente en la actualidad no se cuenta con un inventario nacional o estatal, donde se especifiquen las especies, distribución, aprovechamientos maderables y de agroforestería, para tener una idea de cuales podrían ser los volúmenes aproximados de materia prima y desperdicios de cualquier especie tropical que se desee investigar y donde *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq). Griseb. y *Melia azedarach* L. son parte del acervo de especies tropicales que no han sido estudiadas extensamente como fuente de componentes que puedan utilizarse en un futuro en el control de plagas.

El uso excesivo de compuestos químicos causa que los insectos y otros organismos adquieran resistencia a éstos productos (Zoberi, 1995). Así pues, una alternativa para la protección de madera son los metabolitos secundarios vegetales extraídos de árboles y plantas con propiedades insecticidas. Se reportan aproximadamente 2500 plantas de 247 familias con alguna propiedad insecticida o tóxica (Heal y col., 1950). Los plaguicidas naturales son de bajo costo y su utilización responde a las necesidades sociales, económicas, culturales y políticas de la población. Para su aplicación se toma en cuenta el conocimiento tradicional de las plantas con uso atractivo para la comodidad humana, tal como *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq). Griseb. y *Melia azedarach* L. (paraíso).

## **1.2. *Melia azedarach* L. (Paraíso).**

*Melia azedarach* L. (Figura 1), es una especie nativa del sur de Asia, se le encuentra desde Irán hasta China, en América se distribuye de California a Argentina; en África Oriental y Occidental; el sureste Asiático y Australia. Es un árbol pequeño de 6 a 15 m de altura y de 30 a 40 cm de diámetro, su fuste es recto, cilíndrico y copa densa, el sistema radicular es superficial y amplio, utilizado como ornato, las hojas son compuestas y alternas, con olor fuerte característico al estrujarlas. Las flores son numerosas y de color púrpura claro. Los frutos son drupas redondeadas, cada fruto contiene de 1 a 5 semillas de color café oscuro, los frutos son venenosos y tienen propiedades narcóticas. Esta especie crece en climas tropicales, subtropicales y templados cálidos, con temperaturas media anuales de 22 a 27°C.



Figura 1. Árbol de *M. azedarach*, localizado en Huandacareo, Mich.

Su madera posee un alto poder calorífico de 5100 kcal/Kg, y se utiliza para la producción de carbón, de pulpa para papel, muebles, escaparates, chapas de la madera contrachapada y cajas para cigarrillos. Las flores y frutos tienen propiedades insecticidas, de los frutos se obtiene aceite combustible y las semillas se utilizan en artesanías. Es una especie introducida en nuestro país, que se desarrolla de 1.5 a 2 m/año en altura y tiene un rendimiento de 110 m<sup>3</sup>/ha de leña y 176 m<sup>3</sup>/ha de madera en 15 años. Crece naturalmente en áreas libres de maleza y exigentes a la luz solar, florece durante todo el año, la época de producción de semilla es de enero a mayo (Anónimo, 2006d). Por lo tanto tiene gran potencial en el aprovechamiento de sus frutos y hojas para la preparación de insecticidas naturales.

### 1.3. *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq). Griseb.

*Enterolobium cyclocarpum* (Jacq). Griseb. (Figura 2), es otra especie con gran potencial de estudio, conocido comúnmente con los nombres de parota en Jalisco y Michoacán, guanacaste o guanacastle en Oaxaca, orejón en Guerrero, es un árbol de 20 a 30 m de alto y de hasta 3 m de diámetro, con el tronco recto y a veces con pequeños contrafuertes en la base, frecuentemente más ancha que alta; caducifolio; corteza externa lisa a granulosa y a veces ligeramente fisurada, de gris claro a gris parduzco, de un grosor total de 20 a 30 mm de flores actinomorfas y frutos en forma de vainas de 7 a 12 cm de diámetro, aplanadas y enroscadas, leñosas, moreno oscuras, brillantes, de olor y sabor dulce. Se encuentra desde el nivel del mar hasta los 700 msnm. En bosque tropical subcaducifolio, en restos de selva mediana subperennifolia muy perturbada; selva mediana subcaducifolia y en selva baja caducifolia; zona plana con lomeríos suaves; en selva baja caducifolia alterada; selva mediana caducifolia, vegetación secundaria y frecuente a orilla de brechas.

Su madera es muy apreciada para leña y carbón, para la fabricación de canoas y embarcaciones ligeras por ser sumamente resistente al agua, así como para el aserrío, lambrín, triplay, ruedas, carpintería, ebanistería entre otros usos. Las semillas contienen 36 % de proteínas y en algunos lugares se emplea como forraje y como complemento alimenticio para animales; los frutos verdes son astringentes y se utilizan como medicina casera en casos de diarrea, el tronco exuda un líquido que se emplea en la medicina para remedio casero para la bronquitis. El fruto contiene saponina y se usa localmente como sustituto del jabón para lavar ropa (Pennington y Sarukhán, 1998; Anónimo, 2006c).



Figura 2. Árbol de *Enterolobium cyclocarpum* localizado en Nueva Italia, Mich.

#### 1.4 Otros usos.

Entre las especies más estudiadas se encuentra *Melia azedarach* L. (paraíso) cuyos extractos afectan negativamente la alimentación, el desarrollo y supervivencia de numerosas especies de insectos. Se han probado los extractos acuosos de los frutos maduros y hojas amarillas de ésta planta contra *Spodoptera eridania* (Cramer), que es una especie polífaga y defoliadora de vegetales de importancia económica como girasol, haba, tomate y zanahoria, encontrando que el extracto eliminó el 100 % de las larvas tratadas sin que ninguna de ellas llegara a pupar (Rossetti y col., 2006). Las especies madereras tropicales producen metabolitos que las protege contra el biodeterioro y que les dan una durabilidad natural, como ejemplo, la madera de teca (*Teutona grandis*) ampliamente utilizada en la construcción de embarcaciones por su resistencia, estabilidad y durabilidad que le confiere una sustancia con actividad antitérmica llamado tectoquinona (Thomson, 1978, citado por Rutiaga, 1991). También se ha probado la actividad anti-fungicida de los extractos de la madera de duramen de *Enterolobium cyclocarpum* extraídos con ciclohexano, etanol y agua, contra hongos que atacan la madera (Rutiaga y col., 1995).

## 2.1. JUSTIFICACIÓN

Lyn y col. (1975), hicieron extracciones de sustancias con propiedades antitérmica del duramen de 23 especies tropicales con acetona, pentano y una mezcla de agua-hexano-acetona, las comparaciones fueron hechas en base a la supervivencia de *Coptotermes formosanus* Shikari. Observaron que 18 especies tuvieron sustancias antitermitas ya que la sobrevivencia de termitas fue menor del 70 % y en las otras 5 especies hubo una sobrevivencia de menos del 50 %. Así mismo, determinaron que las poblaciones de protozoarios son un factor clave en la sobrevivencia de las termitas y que ciertas maderas son repelentes más que tóxicas.

Raya y col., (2003), preservaron madera de *Quercus* spp. con extractos de *Melia azedarach* L., *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq). Griseb. y *Nerium oleander* L. contra *Lyctus* sp., los compuestos contenidos en éstos extractos inhibieron el ataque de *Lyctus* sp., en un 54.76 %, 45.24 % y 0.0 % respectivamente. Así mismo reportaron que se encontraron compuestos fenólicos totales reportados como equivalentes a la cantidad de fenólicos totales para *M. azedarach* 1.51 mg/ml, *E. cyclocarpum* 6.58 mg/ml y para *N. oleander* L. 3.29 mg/ml, y concluyeron que el tratamiento con *M. azedarach* presenta mayor efectividad para el control del *Lyctus* sp en la madera de *Quercus* spp.

Ramos, (2003), realizó la separación de las sustancias extraíbles de la madera de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq). Griseb. utilizó técnicas cromatográficas y espectroscopias de resonancia magnética nuclear y UV-Vis, encontrando la presencia de flavononas y flavonas, y petunidina dentro del grupo de las antocianidas con el uso de las espectroscopias.

Raya y col., (2005), realizaron un estudio para el control de dos barrenadores de madera seca, el *Lyctus* sp. (Coleóptera: Lyctidae) e *Incisitermes marginipennis* (Isóptera: Kalotermitidae), con extractos vegetales de *Melia azedarach* L., *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq). Griseb. y *Nerium Oleander* L. Encontraron que el extracto de *Melia azedarach* L. es insecticida y sugieren que el tratamiento de la madera de encino con extracto acuoso *M. azedarach* L. es efectivo para el control de *Lyctus* sp. El efecto protector de madera del extracto *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq). Griseb. mostró una tendencia a comportarse como el testigo positivo (muestras impregnadas con boro). Por otra parte, en el escrutinio de extractos con termitas de madera seca *I. marginipennis* (Latreille) Isóptera: Kalotermitidae, concluyeron que la muestra impregnada con

el extracto de *E. cyclocarpum* a una concentración de 0.8845 mg/ml de sólidos fenólicos totales existió un efecto antialimentario y en la muestra impregnada a una concentración de 0.6663 mg/ml de sólidos fenólicos totales existió un efecto insecticida, siendo ésta última la dosis letal con un 511.68 % de efectividad por lo tanto es un candidato para preservar madera contra termitas de madera seca. Raya (2005) reporta los siguientes valores de factor de resistencia en cromatografía en capa fina como posibles candidatos para el control de la termita de madera seca *I. marginipennis* para las fracciones de *E. cyclocarpum* de la fracción 4 con un  $R_f = 0.83$ , la fracción 6 con un  $R_f = 0.67$ , la fracción 7 con un  $R_f = 0.41$  y finalmente la fracción 10 con un  $R_f = 0.039$ .

Se conoce que *Melia azedarach* L. contiene sustancias tóxicas, que se concentran en la raíz y en los frutos, causan graves afecciones e incluso la muerte sobre todo a los niños. *Melia azedarach* L. es un árbol ornamental cuyos frutos son usados para hacer collares e insecticida. Presenta el grave inconveniente de ser tóxica para animales de sangre caliente por lo que su uso se limita como insecticida en zonas de césped (Sánchez, 2005).

El uso indiscriminado de pesticidas y fármacos sintéticos ha generado varios efectos tóxicos en el ambiente, en los organismos y en plagas indujo resistencia a fungicidas, insecticidas y herbicidas (Devonshire y Field, 1991; Wang y Zhao, 2003). La habilidad natural de las plantas para producir metabolitos secundarios que le ayudan en la defensa contra depredadores o pestes y en la comunicación con su entorno, es una fuente inagotable de compuestos químicos que pueden ser utilizadas como moléculas con propiedades farmacológicas con posibilidad de desplazar a fármacos y pesticidas sintéticos. Estos metabolitos secundarios vegetales deberán tener una gran capacidad biocida de amplio o estrecho espectro de acción, ser eco-amigables de rápida degradación y que además puedan actuar con nuevos mecanismos de acción farmacológica, para que sean capaces de reemplazar a los existentes en el mercado.

### 3. HIPÓTESIS

Los extractos acuosos del duramen de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq). Griseb. y las hojas y frutos de *Melia azedarach* L. tienen efecto biocida.

### 4. OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad biocida de los extractos acuosos del duramen de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq). Griseb. y de las hojas y frutos de *Melia azedarach* L.

**4.1. Objetivo Particular 1.** Determinar la actividad microbica de los extractos.

1.1. Actividad bactericida.

1.2. Actividad fungicida.

**4.2. Objetivo Particular 2.** Determinar la actividad herbicida de los extractos.

2.1. Efecto sobre germinación.

2.2. Efecto sobre la permeabilidad de la membrana.

**4.3. Objetivo Particular 3.** Determinar la actividad insecticida del extracto acuoso aclarado del duramen de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq). Griseb.

3.1. Obtención de las fracciones por cromatografía en columna con gel de sílice.

3.2. Determinación de los Rf activos mediante cromatografía en capa fina.

3.3. Determinación del efecto insecticida sobre termitas de madera seca *Incisitermes marginipennis* (Latreille) Isóptera: Kalotermitidae.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Organismos utilizados en el presente estudio.

Cuadro 2. Microorganismos, insectos y plantas utilizadas en este estudio.

Reino	Organismo	Fuente
Bacteria	Gram -	Cepario del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas (I.I.Q.B.)
	<i>Salmonella</i> sp.	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
	<i>Proteus vulgaris</i>	
	<i>Shigella sonnei</i>	
	<i>Citrobacter freundii</i>	
	<i>Escherichia coli</i>	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	<i>Proteus mirabilis</i>	
	<i>Enterobacter cloacae</i>	
	Gram +	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
	<i>Bacillus subtilis</i>	
Fungae	<i>Candida albicans</i>	Obtenidas del herbario del I.I.Q.B.
	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	
Plantae	<i>Trifolium repens</i>	Obtenidos de desperdicios de los talleres de ebanistería de Cuanajo, Mich.
	<i>Lolium multiflorum</i>	
	<i>Enterolobium cyclocarpum</i> (Jacq). Griseb.	Hojas y frutos recolectados en la localidad de Huandacareo, Mich.
	<i>Melia azedarach</i> L	Obtenidas del herbario del I.I.Q.B.
	<i>Nicotiana tabacum</i> (células TBY2)	Recolectadas de vigas atacadas, Morelia, Mich.
Insecto	<i>Incisitermis marginipennis</i> (Latreille)	

### 5.2. Obtención de los extractos acuosos.

Las muestras de hojas y frutos de la especie de *Melia azedarach* L. fueron recolectadas al Norte de la población de Huandacareo, Michoacán. (Figura 3A y B). La madera de duramen de la especie de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq). Griseb. se obtuvo de los desperdicios de los talleres de ebanistería de la comunidad de Cuanajo, Michoacán, ésta madera proviene del estado de Veracruz (Figura 3C). Las muestras de las especies citadas (hojas, frutos y duramen), se dejaron secar al aire libre y bajo sombra; ya secos se molieron los sustratos en un molino de cuchillas THOMAS SCIENTIFIC (Figura 4A), y el resultado de la molienda se tamizó con una malla de

acero del número 20 y se colocaron en frascos previamente etiquetados y sellados herméticamente (Figura 3 D, E y F).

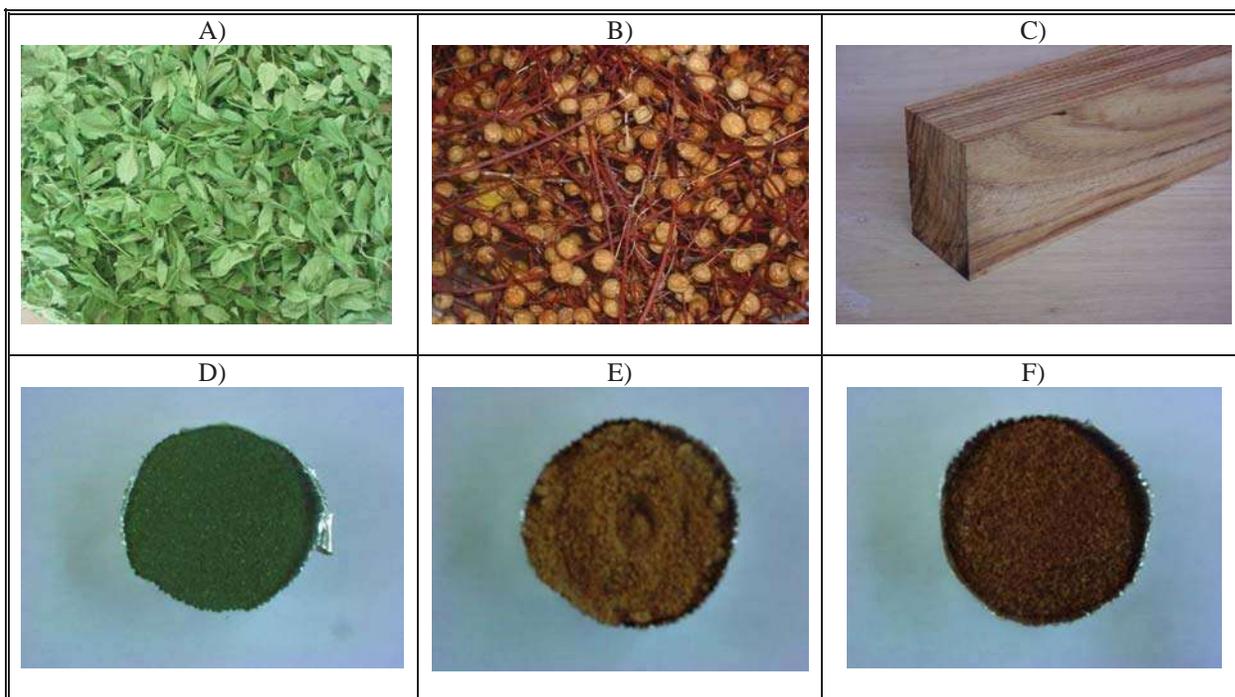


Figura 3. Material vegetal en la obtención de extractos acuosos. A) Hojas de *Melia azedarach*. B) Frutos de *M. azedarach*. C) Madera de duramen de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq). Griseb. D) Sustrato molido de hojas de *M. azedarach*. E) Sustrato molido de frutos de *M. azedarach*. F) Sustrato molido de madera de duramen *E. cyclocarpum*.

Para las cocciones se pesaron 100 g de cada sustrato, se depositó el sustrato en un vaso de precipitado de vidrio de 2 l vertiendo agua destilada hasta saturar el sustrato, se agita constantemente hasta que alcance el punto de ebullición dejando hervir por un tiempo aproximado de 20 min. (Figura 4B). A continuación se realiza un primer filtrado de la solución obtenida, mediante una manta previamente esterilizada, el sólido se vuelve a extraer repitiendo la operación de cocción y filtrado. La suspensión final se concentró en un liofilizador LABCONCO LYPH LOCK 4.5 (Figura 4C). Se liofilizaron 1000 ml de infusión de duramen de *E. cyclocarpum*, en alícuotas de 250 ml y se obtuvieron 49 ml del extracto concentrado. Asimismo, se concentraron 1000 ml del extracto acuoso de hojas y de frutos de *M. azedarach*, obteniendo un volumen aproximadamente de 147 y 333 ml respectivamente de cada extracto. A cada dilución de los extractos se les determinó la cantidad de fenólicos totales equivalentes en un espectrofotómetro VARIAN modelo CARY 50 BIO (Figura 4D) y se obtuvieron las siguientes concentraciones:

- \* Para el extracto del *E. cyclocarpum*: 13.33 mg/ml.
- \* Para el extracto de las hojas de *M. azedarach*: 10.15 mg/ml.
- \* Para el extracto de los frutos de *M. azedarach*: 11.88 mg/ml.

Los valores de las concentraciones de fenólicos totales equivalentes obtenidos, son con los que se trabajaron en todas las pruebas posteriores.

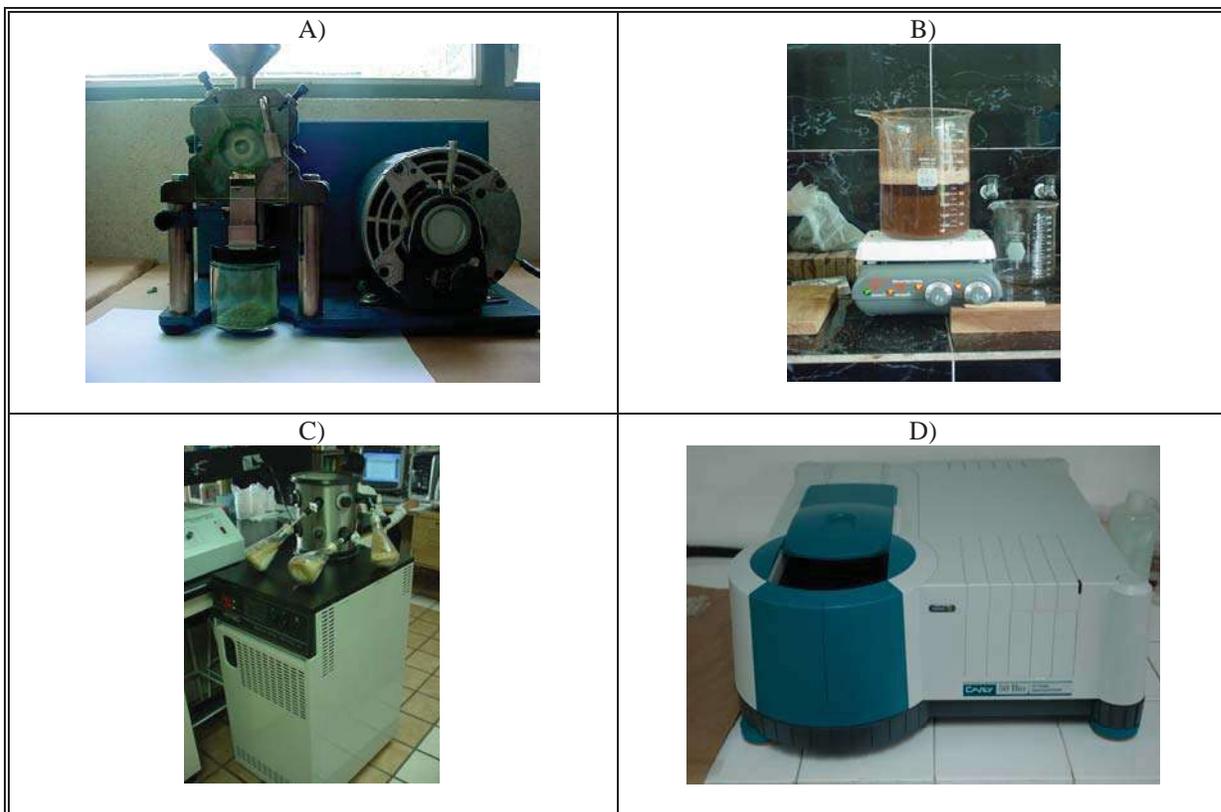


Figura 4. Equipo utilizado en la preparación de los extractos acuosos y en la medición de fenólicos totales. A) Molienda de los sustratos. B) Cocción de los sustratos molidos para la obtención de los extractos acuosos. C) Concentración de los extractos mediante liofilización (vacío). D) Determinación del contenido de fenólicos totales de los extractos.

A continuación se especifican las diluciones hechas para realizar las lecturas en el espectrofotómetro:

Cuadro 3. Diluciones de los extractos acuosos para determinar el contenido de fenólicos totales equivalentes.

Dilución (Extracto: Solución)	Extracto (µl)	Agua (µl)	Total (ml)
1	1000	---	1
1:1	500	500	1
1:10	100*	900	1
1:100	100**	900	1
1:1000	100***	900	1
1:10000	100	900	1

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

\*\* Se toman 100µl de la dilución 1:100 para hacer la dilución 1:1000.

\*\*\* Se toman 100µl de la dilución 1:1000 para hacer la dilución 1:10000.

La determinación de los fenólicos totales equivalentes se calculó por el método reportado por Swain y Hillis en 1995, en el cual la mezcla de reacción (1 ml) se prepara con 65 µl de los extractos acuosos de *E. cyclocarpum* o de *M. azedarach*, se adicionaron 435 µl de metanol, 125 µl del reactivo de Folin-Ciocalteu al 50 %, se agitó e incubó por tres minutos a temperatura ambiente, se le adicionó 0.25 ml de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e incubó por 1 h, después se determinó la absorbencia a 725 nm.

### 5.3. Ensayo para determinar la actividad bactericida.

Se prepararon tubos con caldo nutritivo sin bacterias (4 ml) según las especificaciones del proveedor BD BIOXON se incubaron a 37°C (se recomienda que solo un tubo sea incubado para ver si no hay contaminación), el caldo nutritivo debe permanecer transparente por 24 h en la incubadora para posteriormente refrigerarlos. A continuación se prepararon cajas con AMH (Agar Mueller Hinton). Posteriormente, se sembraron las bacterias crecidas previamente en BAS (base agar sangre) (Cuadro 4), en el caldo nutritivo de los tubos inclinados que contenían las bacterias tomando una azada de bacterias y sumergiéndolas en el caldo nutritivo para incubarlas por 24 h a 37 °C. Al siguiente día se sembraron las bacterias que crecieron en el caldo nutritivo (ver a simple vista que el caldo este mas turbio) y con la ayuda de un hisopo estéril se sembraron en las cajas que contiene AMH (Figura 5A), se colocaron 4 discos de papel filtro en las cajas

AMH y sobre cada uno de los discos se depositaron 6 µl de cada uno de los extractos a probar y el control (etanol 96 %) (Figura 5B), incubando las cajas a 37°C por 24 h, y finalmente determinando el efecto de la siguiente manera:

$$HI = DT - DP$$

Donde:

HI = Halo de inhibición del extracto (mm).

DT = Diámetro total de inhibición (mm).

DP = Diámetro del papel utilizado, 7 mm.



Figura 5. Ensayo de difusión en base agar sangre. A) Inoculación de las enterobacterias en medio estéril. B) Aplicación de 6µl del extracto a los discos de papel filtro.

Cuadro 4. Bacterias utilizadas en las pruebas, su hábitat natural y sus enfermedades principales.

Bacterias	Hábitat natural	Síntomas o Enfermedades
Gram -		
<i>Salmonella</i> sp.	Agua, alimentos, animales.	Fiebre tifoidea, salmonelosis, septicemia, gastroenteritis, enteropatógena.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Nariz, nasofaringe y senos paranasales.	Oportunista.*
<i>Proteus vulgaris</i>	Suelos, agua, aguas servidas, material de animales en descomposición y tracto intestinal.	Oportunista.
<i>Shigella sonnei</i>	Agua, hombre	Disentería bacilar principalmente en niños de 1 a 10 años.
<i>Citrobacter freundii</i>	Hombre, muestras urinarias y respiratorias.	Oportunista.
<i>Escherichia coli</i>	Agua e intestino grueso del hombre	Oportunista, enteropatógena.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Suelos, aire, agua, 10 % de las heces normales y en la piel.	Oportunista.
<i>Proteus mirabilis</i>	Suelos, agua, aguas servidas, material de animales en descomposición y tracto intestinal.	Oportunista.
<i>Enterobacter cloacae</i>	Suelo, agua y en el intestino grueso de hombres y animales.	Oportunista.
Gram +		
<i>Staphylococcus aureus</i>	Suelo, agua, piel del hombre, microflora humana autóctona y nariz.	Infecciones en heridas, quemaduras, produce coagulasa.
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Piel humana ocasionalmente y no muy común en la flora natural del recto, vagina o área periuretral.	Infecciones urinarias en mujeres adolescentes no muy común, es la segunda causa de infecciones urinarias en mujeres jóvenes sexualmente activas.
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Hombre, axilas, cabeza, brazos, fosas nasales y piernas.	Infecciones urinarias, especialmente en gerontes de sexo masculino internados y ocasionalmente endocarditis en válvulas propias de individuos que abusan de drogas endovenosas.
<i>Bacillus subtilis</i>	Aire, polvo, agua salada e infusión de material vegetal.	Bacteriemias importantes e infecciones oculares en adictos a heroína.

Joklik, Willet y Amos, 1986. Oportunista\*. Infecciones extraintestinales incluyendo septicemia, infecciones urinarias, de heridas, meningitis y neumonía.

#### 5.4. Ensayo para determinar la actividad antifúngica.

La preparación de las cajas petri con agar dextrosa sabouraud se hizo según indicaciones del proveedor, para después incubarlas durante 24 h a 37°C y verificar si no hubo contaminación, posteriormente fueron colocados en refrigeración, después se colocaron 4 discos de papel, los cuales fueron impregnados con 6 µl de cada uno de los extractos y el control (etanol 96 %) (Figura 6A) y sobre éstos depositando 3 mm<sup>2</sup> con el miscelio de los patógenos (Cuadro 5) previamente cultivados (Figura 6B). Se dejaron incubadas a temperatura ambiente durante 4 días y midiendo la inhibición del crecimiento.

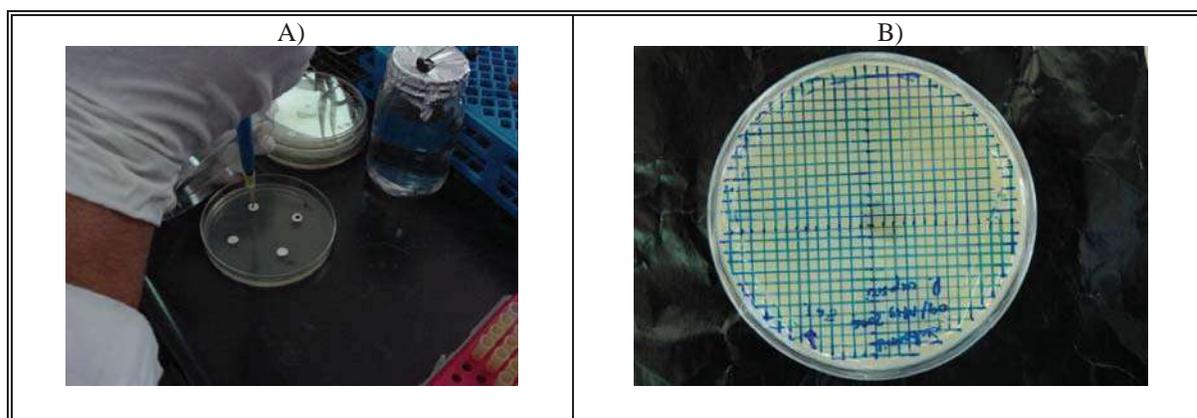


Figura 6. Ensayo con agar dextrosa sabouraud para la prueba fungicida. A) Aplicación de 6 µl de los extractos. B) Patógeno previamente cultivado, utilizado en la prueba fungicida (3 mm<sup>2</sup>).

Cuadro 5. Patógenos utilizados en las pruebas, su hábitat natural y sus enfermedades principales.

HONGOS	HÁBITAT NATURAL	SINTOMAS O ENFERMEDADES
<i>Candida albicans</i>	Piel, boca, tracto intestinal, flora humana.	Infecta lengua y la mucosa oral, provoca candidiasis (subcutánea y sistémica) de la piel, mucosas y uñas.
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	Plantas	Pudrición blanda y muerte de la planta.

Joklik, Willet y Amos, 1986.

### 5.5. Ensayo para determinar la actividad herbicida.

Para probar el efecto de los extractos en la germinación de las semillas se utilizaron semillas de una dicotiledónea, el trébol blanco (*Lolium multiflorum*) y una monocotiledónea, un pasto italiano (*Trifolium repens*), se colocaron un total de 30 semillas en cajas petri de vidrio que contenía algodón y papel filtro de poro medio previamente esterilizados (Figura 7A y B), para cada extracto se realizaron los siguientes tratamientos (extracto completo al 100 %, colocando 10 ml del extracto; al 50 %, 5 ml de agua tridestilada estéril y 5 ml de extracto; al 25 %, 7.5 ml de agua y 2.5 ml del extracto y para el control se adicionaron 10 ml de agua tridestilada todo bajo condiciones de asepsia (Figura 7C). Las evaluaciones fueron realizadas a las 24, 48, 72 y 96 h después de la siembra.

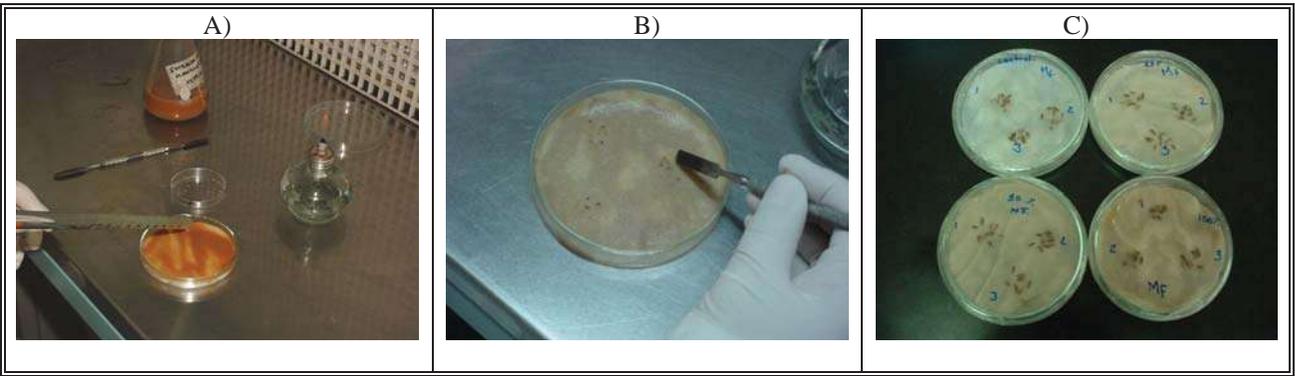


Figura 7. Metodología para las pruebas de germinación con los diferentes extractos. A) Aplicación de 10 ml del extracto. B) Colocación de las semillas. C) Concentraciones del extracto y el control (agua tridestilada).

Las variables evaluadas fueron: porcentaje de germinación, longitud de raíz e índice de germinación. Se midió las longitudes de raíz de las semillas que germinaron a las 72 h en los diferentes tratamientos, para determinar el índice de germinación en cada uno de los tratamientos.

El índice de germinación se define de la siguiente manera:

$$\% \text{ IG} = \frac{G}{G_0} * \frac{L}{L_0} * 100$$

Donde:

- % IG = Índice de germinación,
- G = Porcentaje de germinación tratado,
- G<sub>0</sub> = Porcentaje de germinación control,
- L = Crecimiento de raíz tratado,
- L<sub>0</sub> = Crecimiento de raíz control.

## 5.6. Ensayo para determinar el daño causado en la membrana plasmática.

Se utilizaron células de tabaco TB<sub>Y</sub>2 de diferentes días de edad, tomando una alícuota de 10 ml de células y filtrándolas para después resuspenderlas en 9 ml de agua desionizada, y 1 ml del extracto a diferentes concentraciones para tener un volumen final de 10 ml; las concentraciones de los extractos utilizadas fueron las siguientes: 1; 1:1, 1:10 y 1:100. Como ya se mencionó se partió de las concentraciones iniciales de fenólicos totales equivalentes de cada uno de los extractos al 100 %, 13.33 mg/ml para *E. cyclocarpum*, 10.15 mg/ml para *M. azedarach* (hojas) y 11.88 mg/ml *M. azedarach* (frutos). Agitando manualmente se vertió en un tubo de ensaye grande, colocando el electrodo del equipo SENSION 5, marca HACH y tomando la lectura al tiempo cero hasta que se estabiliza la lectura (Figura 8A). A partir de aquí se cuantificó cada

minuto hasta completar 10 mediciones, agitando previamente en el vortex a <200 rpm antes de cada medición y registrando las lecturas obtenidas (Figura 8B).



Figura 8. Medición de la conductividad en células de tabaco TBY2 en suspensión. A) Medición de la conductividad eléctrica de cada extracto. B) Agitación de las células con el extracto.

### **5.7. Fraccionamiento del extracto acuoso de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq). Griseb. mediante cromatografía en columna.**

Se empaquetaron 3 columnas de una longitud promedio de 30 cm. y un diámetro de 1cm. utilizando gel de sílice de 70-230 mesh SIGMA ALDRICH, para la fase estacionaria y una mezcla de cloroformo:1-butanol-metanol (2:1:1) para la fase móvil; dejando hidratar el gel sílice con la mezcla de los solventes durante 150 min para después ser empaquetada (Figura 9A). Posteriormente, en la columna se depositó 1 ml del extracto eluyéndolo con la mezcla de solventes y recolectando 8 fracciones de 5 ml en tubos de ensaye (Figura 9B, C y D), así como el volumen de exclusión, teniendo un goteo de 1 ml por minuto aproximadamente. Las fracciones fueron llevadas al rotovapor para eliminar el solvente y resuspender el sólido en 1 ml de agua desionizada. Se tomaron dos pesos, uno del matraz antes de colocar la fracción y uno después de haber evaporado el solvente, para finalmente determinar el peso final de la fracción obtenida (Figura 9E y F).

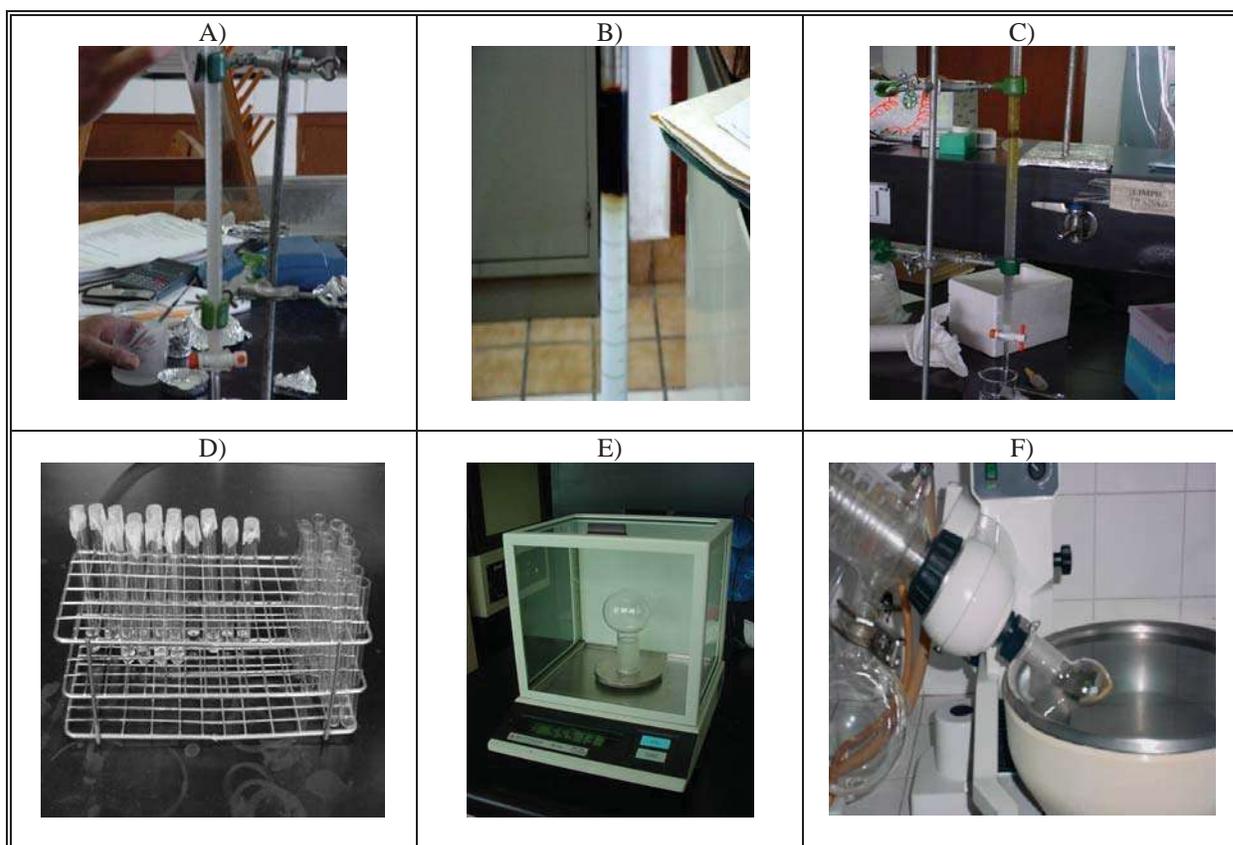


Figura 9. Obtención de las fracciones del extracto de *E. cyclocarpum* mediante cromatografía en columna. A) Preparación de la columna de sílica gel. B) Adición de 1 ml del extracto. C) Corrimiento de la columna. D) Fracciones recolectadas. E) Determinación de los pesos iniciales y finales de las fracciones. F) Concentración de las fracciones.

### 5.8. Obtención y aplicación de las fracciones con actividad anti-termita del extracto acuoso de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq). Griseb.

Las fracciones obtenidas y concentradas fueron llevadas a cromatografía en placa fina utilizando placas SIGMA-ALDRICH, de una dimensión de 20 cm x 20 cm. y la misma mezcla de solventes para la fase móvil. Las placas se revelaron en una lámpara de UV SPRECTOLINE CM-10 (Figura 10A) para revelar las señales separadas durante el corrimiento y determinar los  $R_f$  de cada una de ellas (Figura 10B), y los siguientes  $R_f$  eficaces  $R_f = 0.83$ ,  $R_f = 0.67$ ,  $R_f = 0.41$ ,  $R_f = 0.039$ , (Raya, 2005), aplicarlos para determinar si existe algún efecto insecticida o antialimentario.



Figura 10. Cromatografía en placa fina de los extractos acuosos vegetales. A) Lámpara UV utilizada para el revelado de las placas. B) Placa revelada indicando la disposición de las fracciones.

Las fracciones obtenidas que coincidieron con el mismo Rf se juntaron, dichas fracciones se etiquetaron para su identificación de la siguiente manera; Fracción A con un Rf de 0.81, Fracción B de un Rf de 0.67, Fracción C que se le determinó un Rf de 0.57 (se tomó esta fracción considerando que era la más cercana al Rf reportado por Raya, 2005, de 0.41) y Fracción D con un Rf de 0.1, (tomando el mismo criterio que la fracción C) (Figura 11A). Posteriormente se aplicaron 200  $\mu$ l de la fracción a cada uno de los discos de papel filtro de 2.3 cm de diámetro y agua desionizada a los testigos (Figura 11B). Se dejaron secar al aire libre durante 24 h.

Para el ensayo antitermita, se depositaron 10 termitas ninfas a cada uno de los discos de papel filtro impregnados (Figura 11C), los cuales se colocaron en una cámara oscura a una temperatura y humedad relativa ambiente durante un periodo de 22 días, haciendo las observaciones de mortalidad y realizando las pesadas cada tercer día para determinar la cantidad de material ingerido por las termitas.

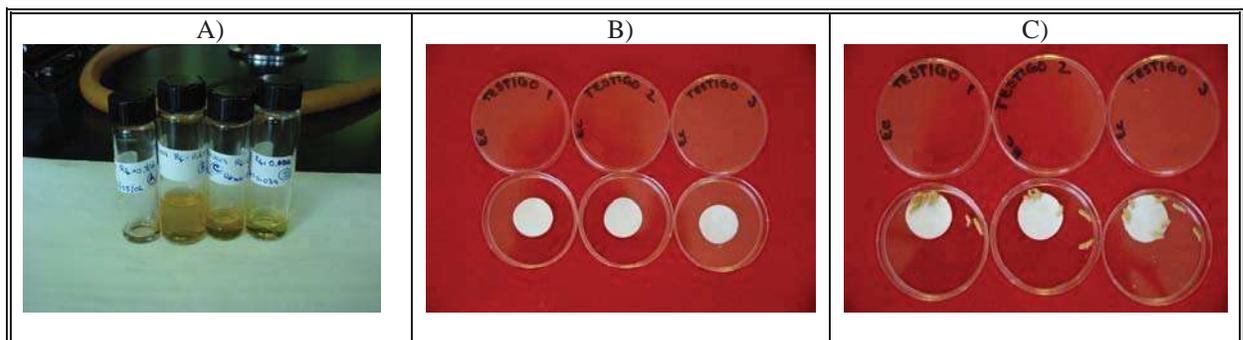


Figura 11. Ensayo antitermita. A) Fracciones utilizadas en la impregnación de los discos de papel. B) Discos de papel impregnados con cada una de las fracciones y el control. C) Colocación de las termitas (*I. marginipennis*).

## **5.9. Análisis estadístico.**

Los valores obtenidos de las pruebas bactericidas y/o fungicidas son el promedio de tres repeticiones por separado de cada uno de los extractos y su desviación estandar. Los datos obtenidos de las pruebas de germinación, daño a la membrana plasmática y pruebas antitermita se analizaron con el paquete estadístico Probit (Sáenz Olivares, 1994) versión 2.5. Utilizando análisis de varianza factorial tipo AxB con igual número de repeticiones, así como también se realizaron pruebas de t-Student con  $\alpha = 0.01$ , y comparación de medias Tukey  $\alpha = 0.01$  y  $0.05$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1. De la inhibición de bacterias.

*E. cyclocarpum* presentó un mayor efecto con respecto a *M. azedarach* (hojas) que tuvo un efecto mínimo y contra *M. azedarach* (frutos) que no presentó ningún efecto bactericida. *K. pneumoniae* fue la enterobacteria más sensible a los extractos. En la figura 12 se muestran los halos de inhibición (mm) provocados en las enterobacterias por el extracto de *E. cyclocarpum* (Figura 12A) y el efecto presentado con el extracto de hojas de *M. azedarach* (Figura 12B). Obteniendo que el mayor efecto inhibitorio fue el presentado por *E. cyclocarpum* ya que fue sensible en 7 (4 enterobacterias Gram + y 3 Gram -) de las 13 enterobacterias utilizadas en la prueba. En *K. pneumoniae* presentó un halo de inhibición de 29 mm, de 6 mm tanto en *P. mirabilis* y en *P. aeruginosa*, seguido por *S. epidermidis* y *S. aureus* con un efecto menor de 3.33 mm, y por último los halos significativos de *P. vulgaris* y *P. saprophyticus* con 1.33 y 1 mm respectivamente. Como ya se mencionó *K. pneumoniae* fue sensible también al extracto de *M. azedarach* (hojas), aún cuando presentó un halo de inhibición bajo de 1.33 mm.

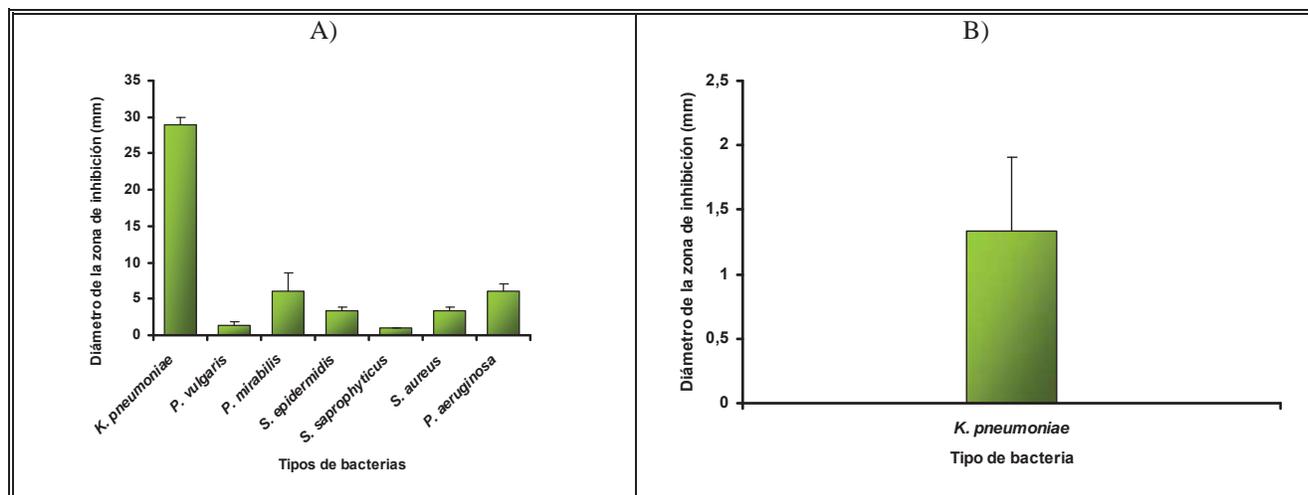


Figura 12. Efecto bactericida presentado por los extractos. A) Efecto del extracto de *Enterolobium cyclocarpum* sobre la inhibición de 7 enterobacterias. B) Efecto del extracto crudo de *Melia azedarach* (hojas) sobre la inhibición de *Klebsiella pneumoniae*.

### 6.2. De la inhibición de los hongos.

No se obtuvieron resultados positivos en esta prueba, ya que los extractos no presentaron inhibición en el crecimiento de *Candida albicans* y *Phytophthora cinnamomi*.

### 6.3. Del efecto herbicida.

#### 6.3.1. Extracto de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq). Griseb.

A las 96 h hubo una germinación del 30 % en la dicotiledónea (*Trifolium repens*) en el tratamiento al 25 % y un crecimiento nulo en los dos siguientes tratamientos (50 y 100 %), respecto del control que germinó en un 100 %, por lo tanto existió una inhibición del crecimiento cerca del 70 % en el tratamiento al 25 % (Figura 13A).

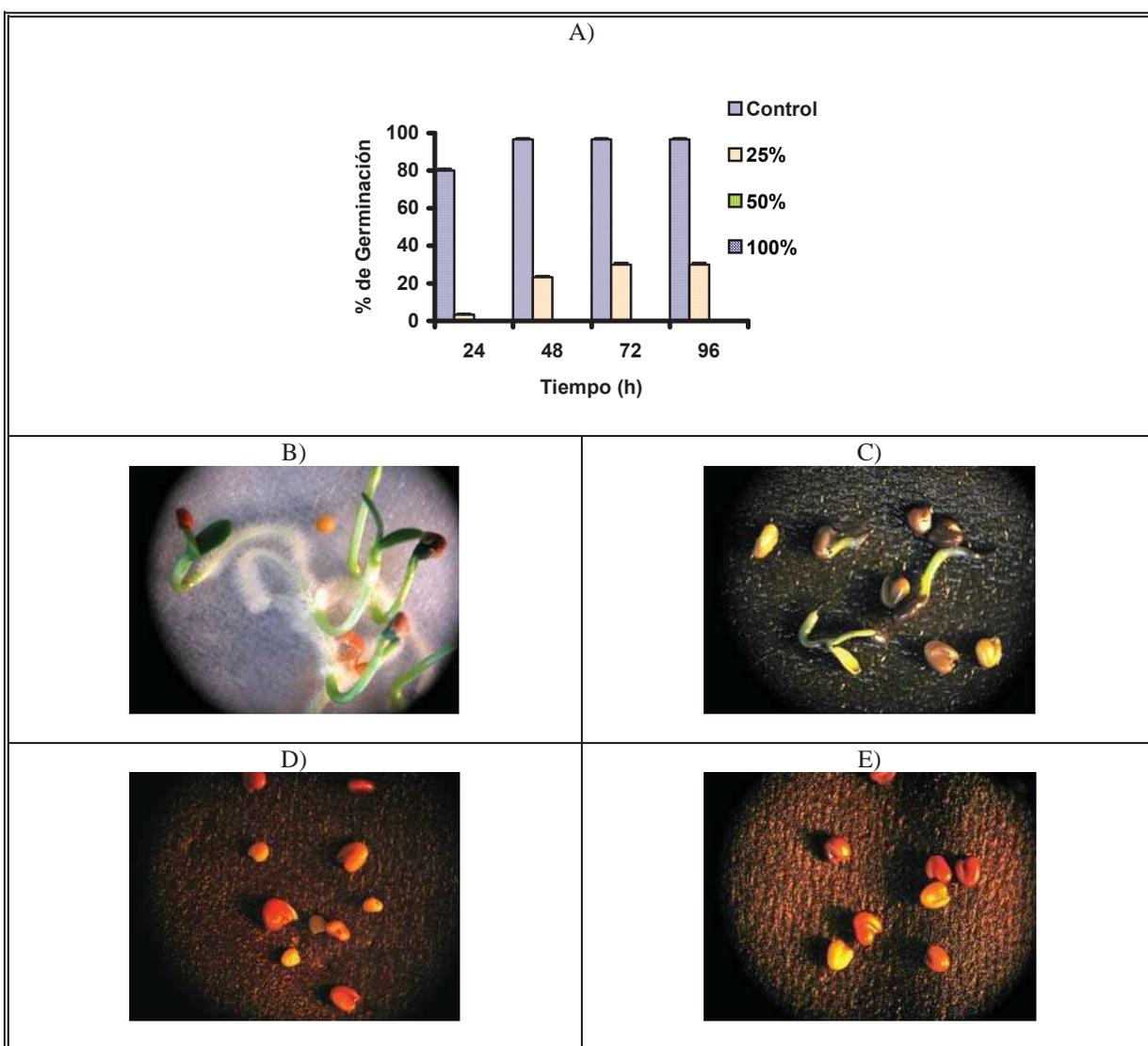


Figura 13. Efecto del extracto de *E. cyclocarpum* sobre la germinación de *T. repens* a las 96 h. A) Porcentajes de germinación. B) Control. C) 25 % (3.33 mg/ml). D) 50 % (6.67 mg/ml). E) 100 % (13.33 mg/ml).  $n = 10$ , pruebas de t-Student  $\alpha = 0.01$ .

En la monocotiledónea el extracto presentó una inhibición menor a las 96 h en los diferentes tratamientos, teniendo en el tratamiento al 25 % un crecimiento del 27 %, 33 % al 50 % y 3.33 % al 100 %, con respecto a una germinación del 100 % en el control (Figura 14A).

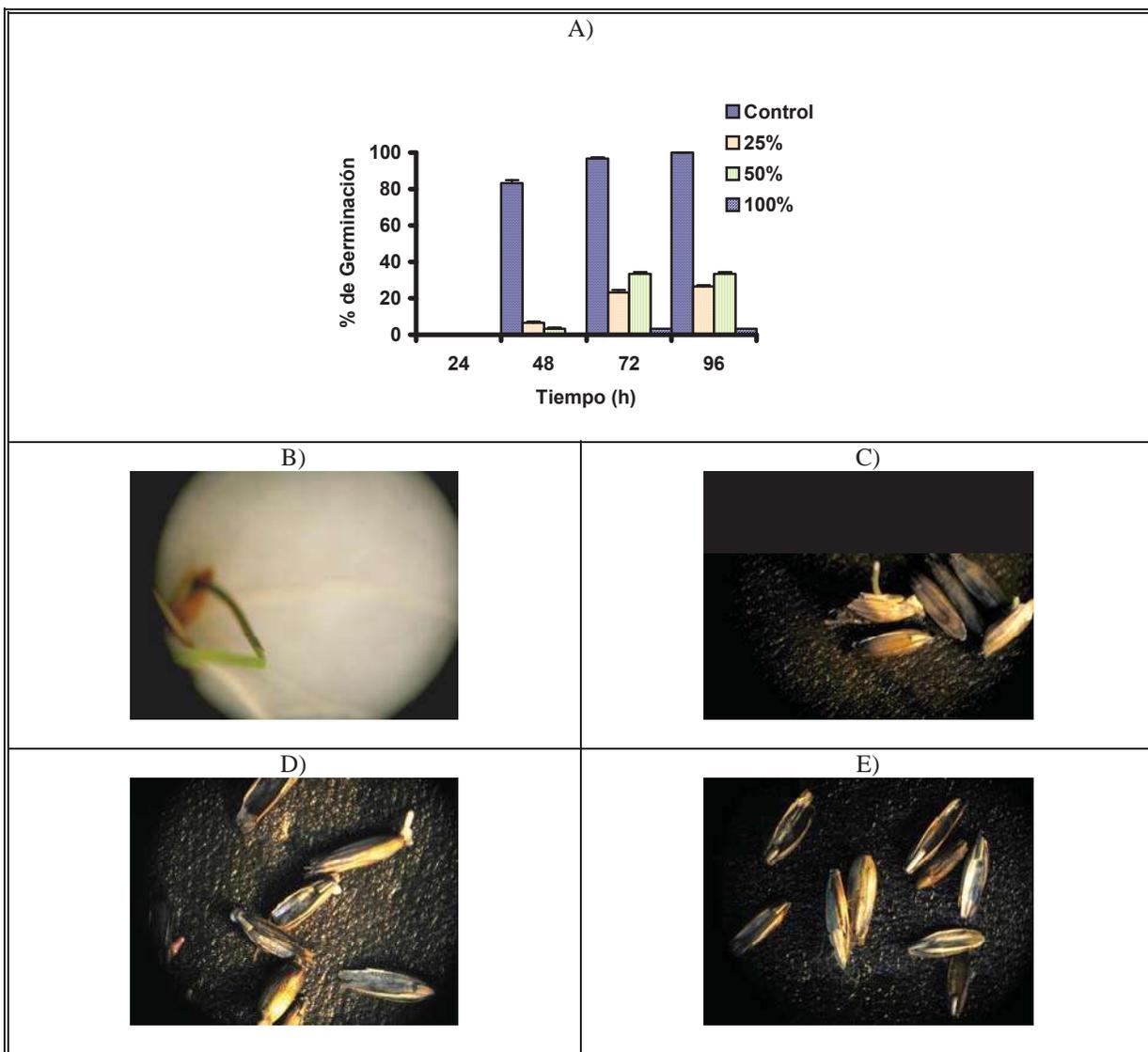


Figura 14. Efecto del extracto de *E. cyclocarpum* sobre la germinación de *L. multiflorum* a las 96 h. A) Porcentajes de germinación. B) Control. C) 25 % (3.33 mg/ml). D) 50 % (6.67 mg/ml). E) 100 % (13.33 mg/ml).  $n = 10$ , pruebas de t-Student  $\alpha = 0.01$ .

### 6.3.2. Extracto de *Melia azedarach* L. (Frutos).

Éste extracto presentó una inhibición mucho menor en *T. repens* a las 96 h con respecto al de *E. cyclocarpum*, no hubo un efecto herbicida alto, tuvo un porcentaje de germinación del 37 % en el tratamiento al 25 %, 47 % al 50 % y 10 % al 100 % (Figura 15A)

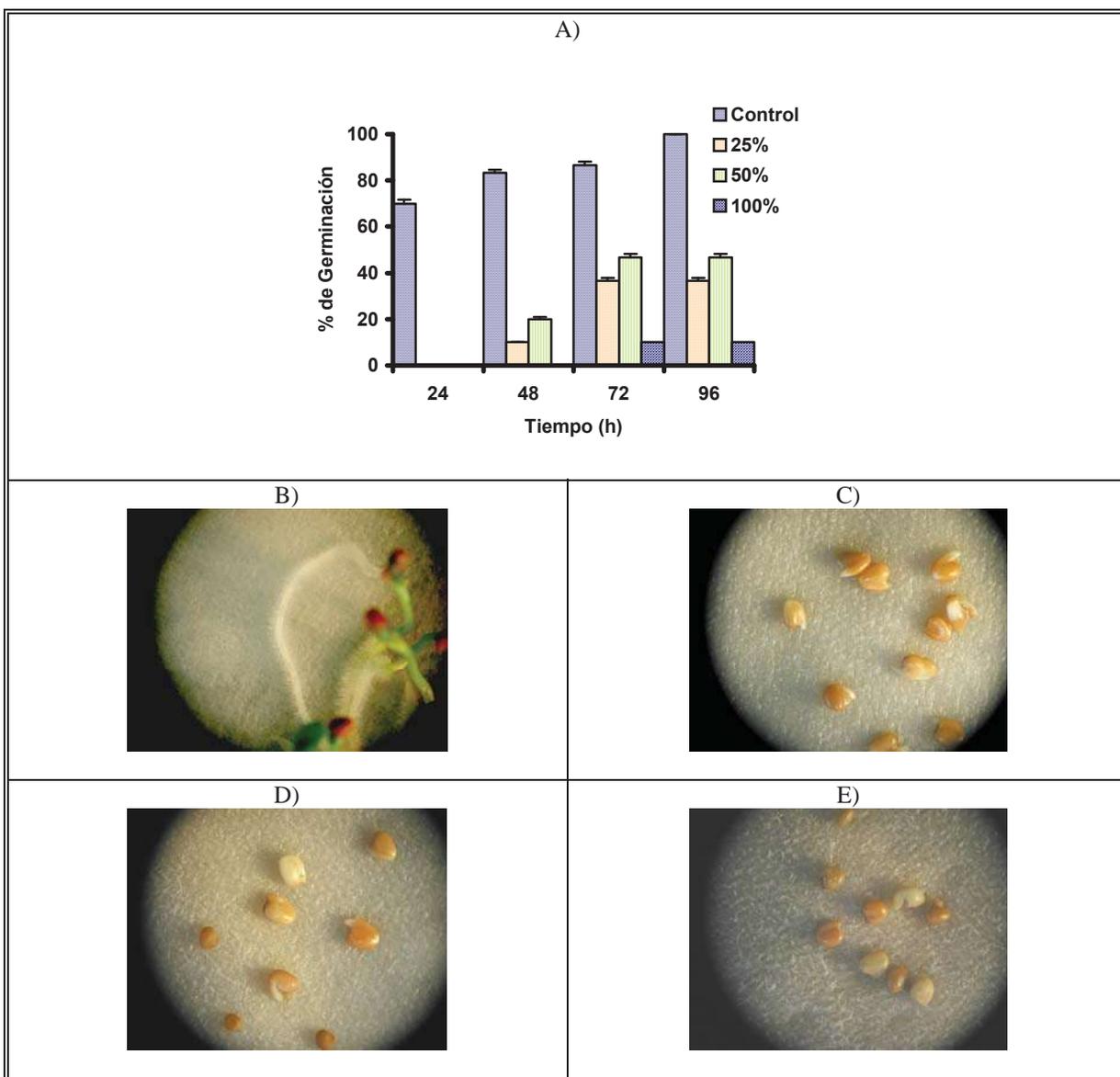


Figura 15. Efecto del extracto de frutos de *M. azedarach* sobre la germinación del *T. repens* a las 96 h. A) Porcentajes de germinación. B) Control. C) 25 % (2.97 mg/ml). D) 50 % (5.94 mg/ml). E) 100 % (11.88 mg/ml).  $n = 10$ , pruebas de t-Student  $\alpha = 0.01$ .

Con respecto a *L. multiflorum*, se presentó un efecto similar que en *T. repens* y tuvo una germinación a las 96 h del 50 % en el tratamiento al 25 % y 26.73 % al 50 % y solo en la concentración del 100 % no hubo germinación (Figura 16A).

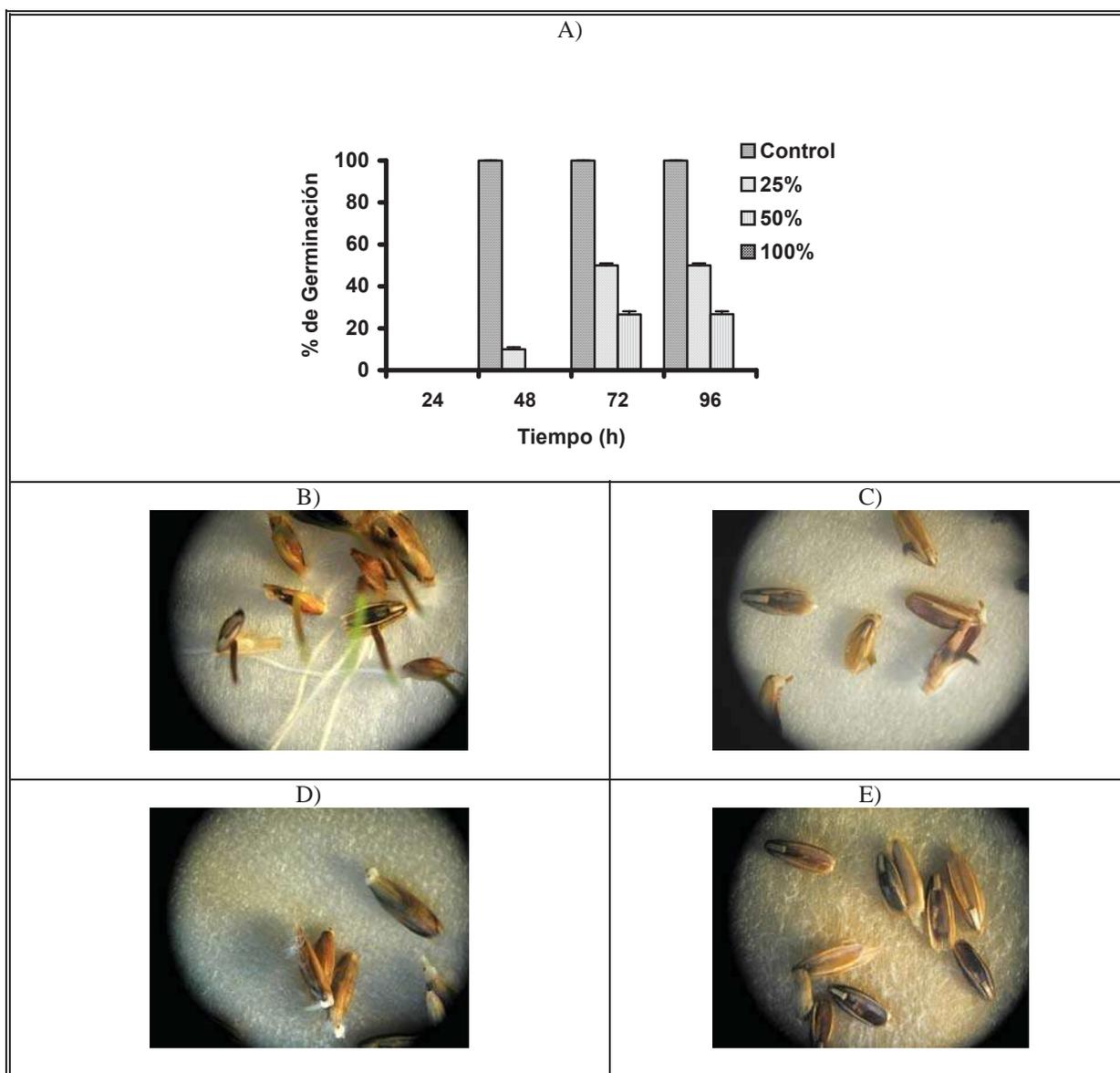


Figura 16. Efecto del extracto de frutos de *M. azedarach* sobre la germinación del *L. multiflorum* a las 96 h. A) Porcentajes de germinación. B) Control. C) 25 % (2.97 mg/ml). D) 50 % (5.94 mg/ml). E) 100 % (11.88 mg/ml).  $n = 10$ , pruebas de t-Student  $\alpha = 0.01$ .

### 6.3.3. Extracto de *Melia azedarach* L. (Hojas).

El extracto de *M. azedarach* (hojas), presentó un porcentaje de germinación menor en *T. repens*, al tener solamente un 3.3 % en el tratamiento al 25 % a las 96 h y una inhibición del 100 % en los otros dos tratamientos (Figura 17A).

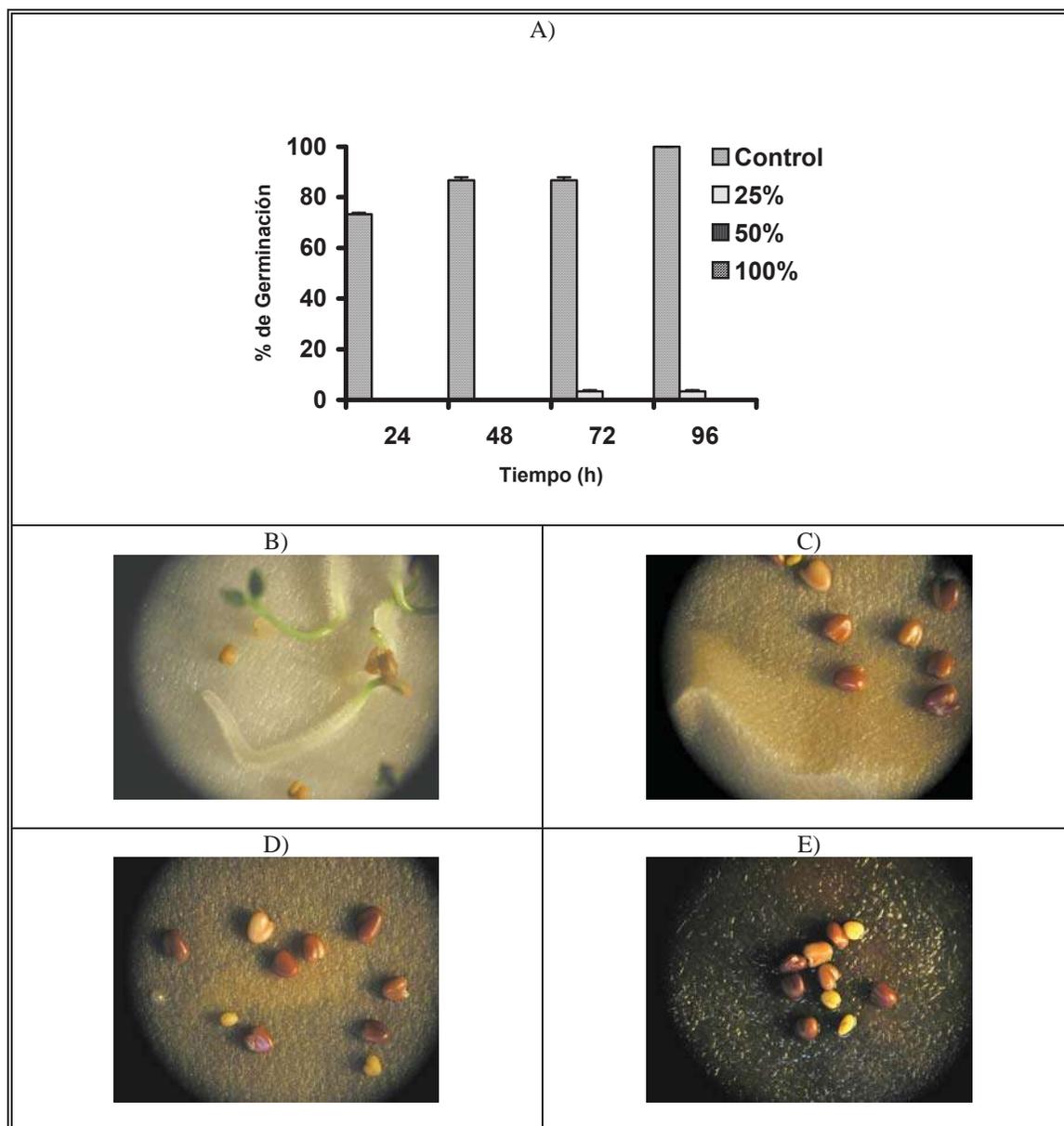


Figura 17. Efecto del extracto de hojas de *M. azedarach* sobre la germinación del *T. repens* a las 96 h. A) Porcentajes de germinación. B) Control. C) 25 % (2.54 mg/ml). D) 50 % (5.08 mg/ml). E) 100 % (10.15 mg/ml).  $n = 10$ , pruebas de t-Student  $\alpha = 0.01$ .

Mientras que en *L. multiflorum* a las 96 h el tratamiento al 25 % obtuvo una germinación del 30 % y una inhibición del 100 % en los dos tratamientos siguientes (Figura 18A).

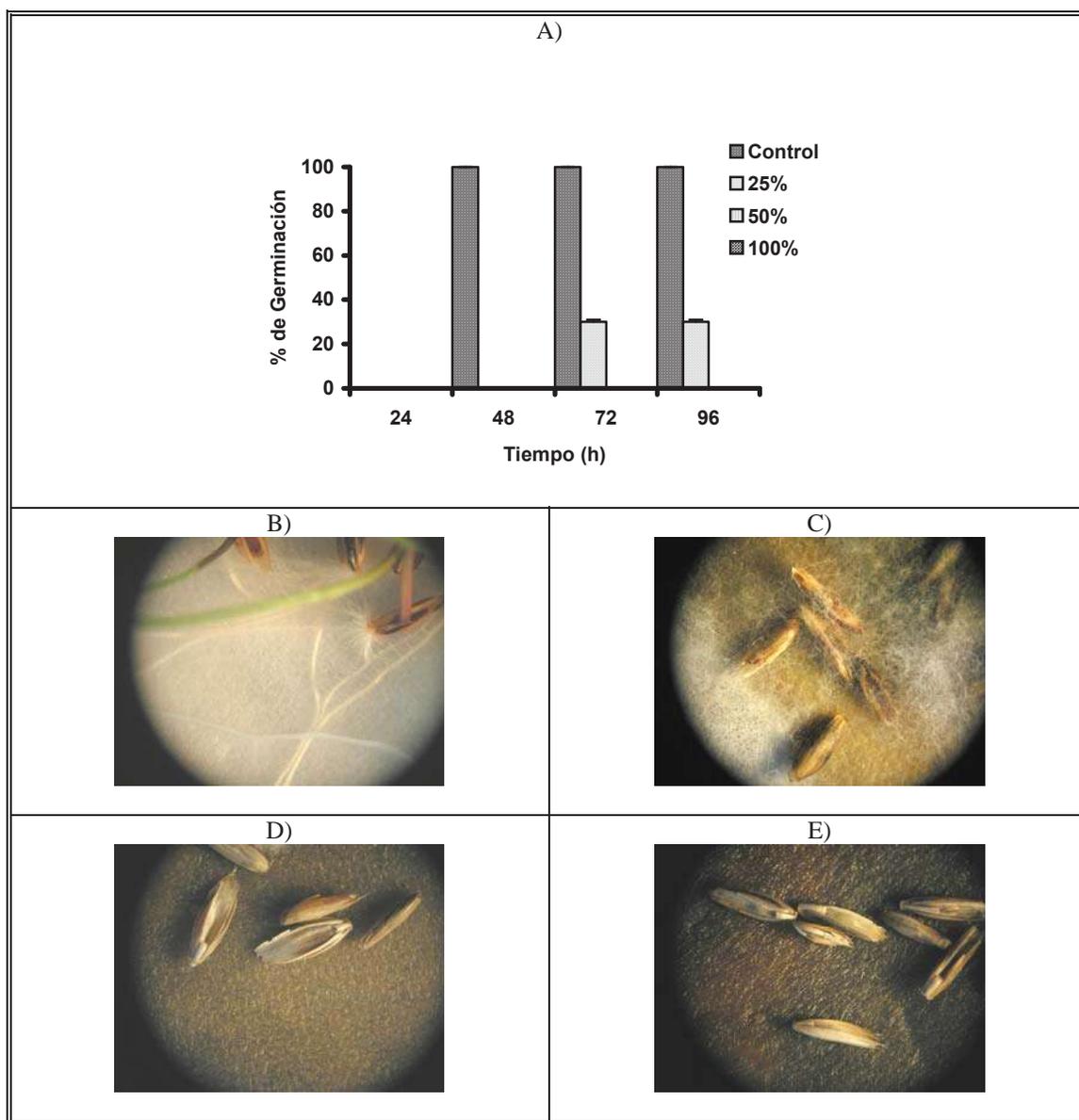


Figura 18. Efecto del extracto de hojas de *M. azedarach* sobre la germinación del *L. multiflorum* a las 96 h. A) Porcentajes de germinación. B) Control. C) 25 % (2.54 mg/ml). D) 50 % (5.08 mg/ml). E) 100 % (10.15 mg/ml).  $n = 10$ , pruebas de t-Student  $\alpha = 0.01$ .

Se determinó el índice de germinación para cada uno de los extractos uno respecto de otro, con cada una de las semillas para realizar una comparación y se obtuvieron los siguientes resultados como se muestra en la figura 19.

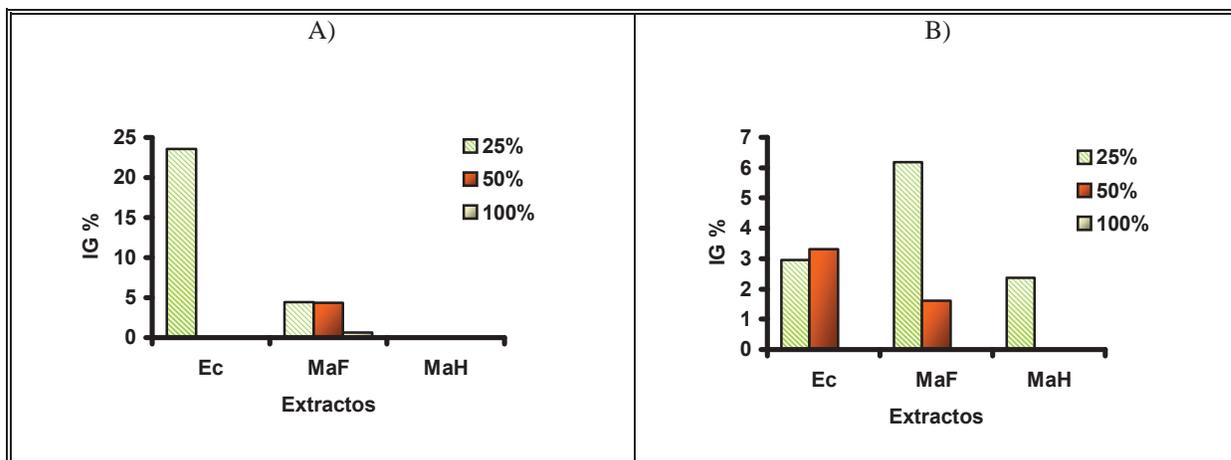


Figura 19. Índice de germinación en los diferentes extractos a las 72 h. A) Índice de germinación de los tres extractos con *T. repens*. B) Índice de germinación de los tres extractos con *L. multiflorum*.

El extracto que dio el mejor efecto herbicida fue *M. azedarach* (hojas) para todas las concentraciones en *T. repens* (0 %) y un índice de germinación mínimo en *L. multiflorum* (2.37 %), *E. cyclocarpum* obtuvo un 23.60 % en *T. repens* en el tratamiento al 25 % únicamente y en *L. multiflorum*, 2.95 % en el tratamiento al 25 %, y 3.3 % en la concentración al 50 %. Para *M. azedarach* (frutos), se encontraron índices de germinación en todas las concentraciones con respecto a los extractos anteriores aunque mínimos, el reporte para *T. repens* fue de 4.41 % para el tratamiento al 25 %, 4.40 % para el 50 % y un mínimo del 0.6 % para el 100 %; y para *L. multiflorum* 6.17 % al 25 % y 1.60 % al 50 %.

## 6.4. Del daño en la membrana plasmática.

### 6.4.1. Extracto de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb.

Presentaron un daño alto todas las concentraciones, con respecto al control (Figura 20A). Comparando las diferentes diluciones entre ellas, se tuvo que las concentraciones más elevadas de 1 (13.33 mg/ml) 1\*1 (6.67 mg/ml) y 1\*10 (1.33 mg/ml), presentaron los mayores daños en la membrana plasmática, seguida por la concentración más baja de 1\*100 (0.13 mg/ml). Cabe resaltar que las diluciones de 1\*1 y 1\*10 fueron ligeramente superiores en los primeros 5 minutos respecto a la concentración mayor (Figura 20A y B). En la figura 20C, se pueden observar los daños en relación al tiempo, se tuvo que los daños mayores fueron a partir del minuto 6 donde se añadió una porción adicional del extracto (1ml), pero cabe señalar que después del incremento los valores se mantienen.

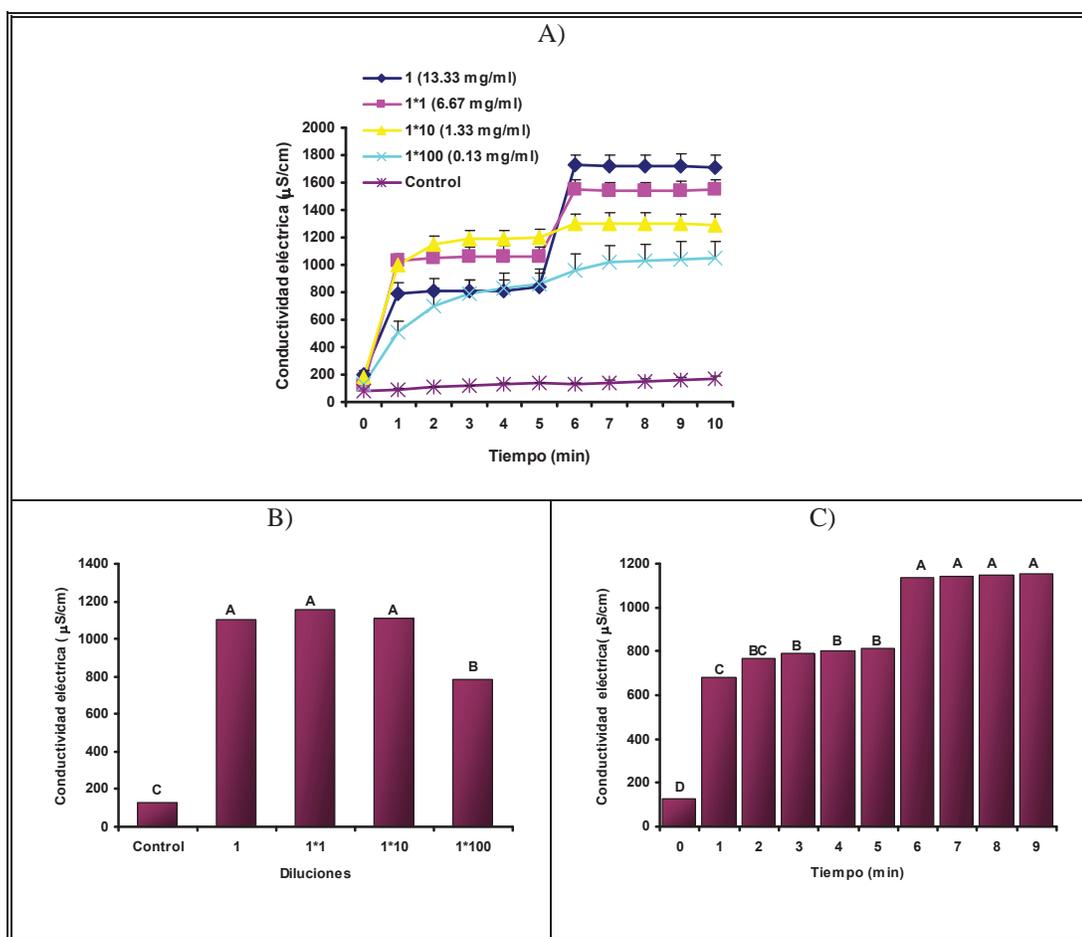


Figura 20. Efecto presentado en la membrana de las células de tabaco TBY2 por el extracto de *E. cyclocarpum*. A) Conductividad eléctrica de células TBY2 con la adición del extracto de *E. cyclocarpum*. B) Conductividad eléctrica en las diferentes diluciones. C) Curso temporal de la conductividad eléctrica. Tukey  $\alpha = 0.01$ .

### 6.4.2. Extracto de *Melia azedarach* L. (Frutos).

En éste extracto la dilución que presentó un efecto mayor, fue la concentración 1 (11.88 mg/ml), seguida por la dilución 1\*1 (5.94 mg/ml), 1\*10 (1.18 mg/ml); la dilución 1\*100 (0.11 mg/ml), tiene un comportamiento similar al control (Figura 21B). Al igual que en *E. cyclocarpum* al minuto 6 existe un incremento, pero la diferencia recae en que los valores no se mantienen sino tienen un pequeño incremento en el transcurso (Figura 21C).

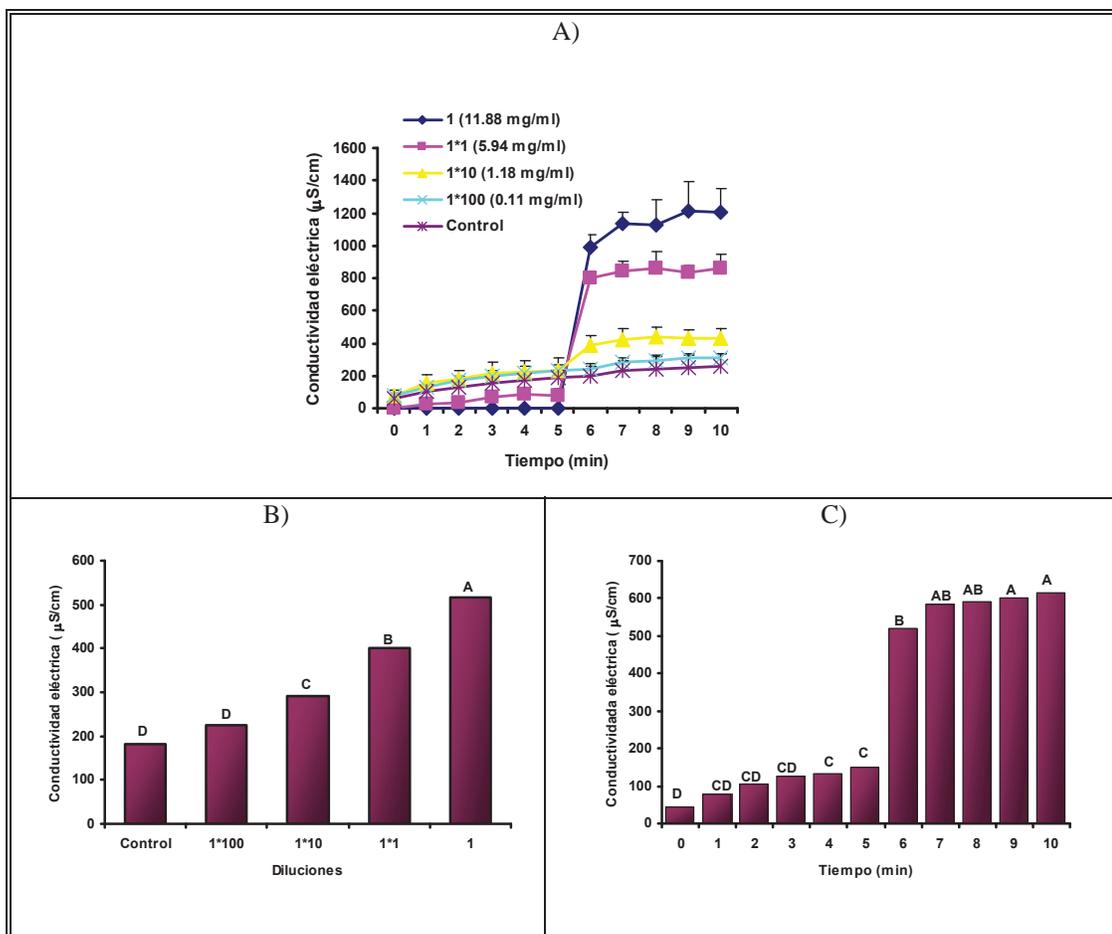


Figura 21. Efecto presentado en la membrana de las células de tabaco TBY2 por el extracto de frutos de *M. azedarach*. A) Conductividad eléctrica de células TBY2 con la adición del extracto de frutos de *M. azedarach*. B) Conductividad eléctrica en las diferentes diluciones. C) Curso temporal de la conductividad eléctrica. Tukey  $\alpha = 0.01$ .

### 6.4.3. Extracto de *Melia azedarach* L. (Hojas).

En cuanto a *M. azedarach* (hojas), se observó que la dilución con mayor efecto fue la 1\*1, (5.08 mg/ml), seguida por 1 (10.15 mg/ml) 1\*10 (1.05 mg/ml) y finalmente 1\*100 (0.10 mg/ml), que al igual que en *M. azedarach* (frutos) se comportó similar al control (Figura 22B). De igual manera en la comparación por tiempos, al minuto 6 existe un incremento, pero después se mantienen los valores (Figura 22C).

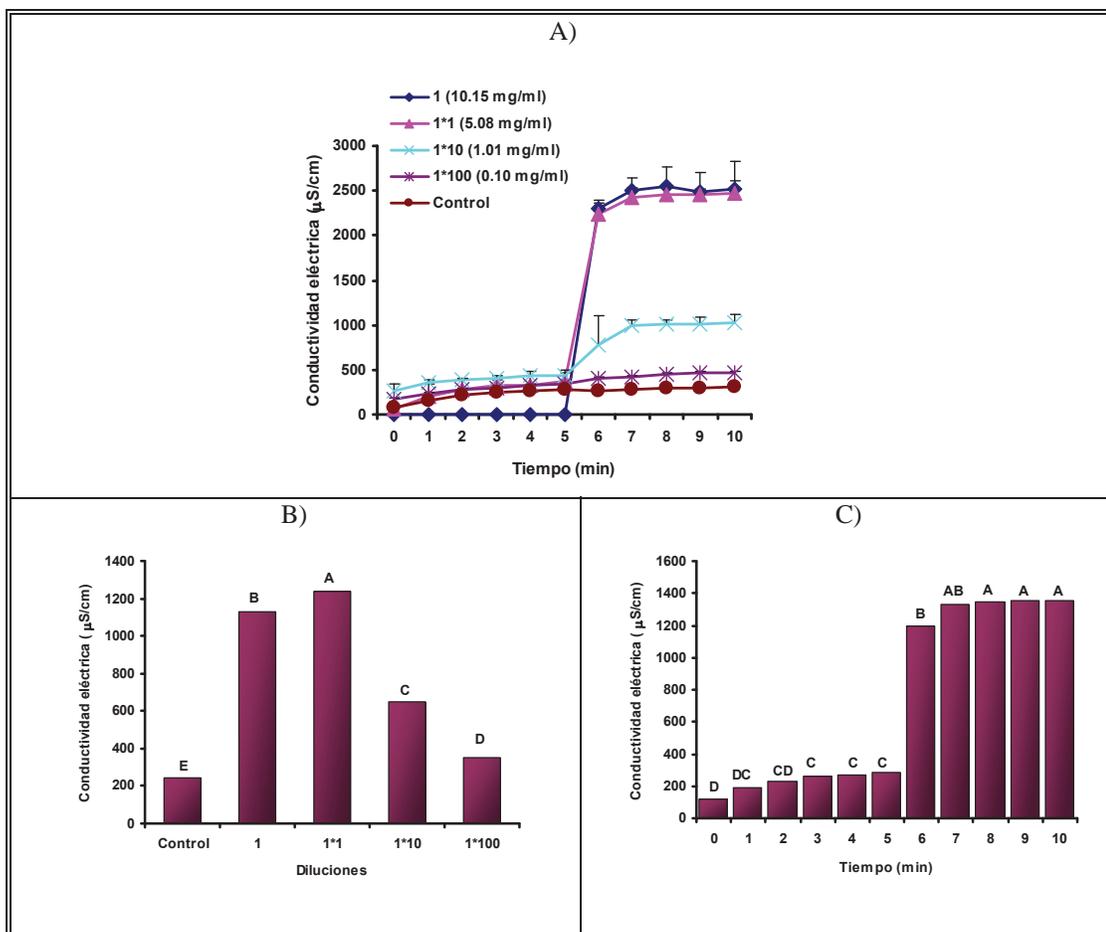


Figura 22. Efecto presentado en la membrana de las células de tabaco TBY2 por el extracto de hojas de *M. azedarach*. A) Conductividad eléctrica de células TBY2 con la adición del extracto de hojas de *M. azedarach*. B) Conductividad eléctrica en las diferentes diluciones. C) Curso temporal de la conductividad eléctrica. Tukey  $\alpha = 0.01$ .

### 6.5. Del efecto insecticida de las fracciones del extracto acuoso de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq). Griseb.

La fracción que presentó un efecto antialimentario significativamente mayor fue la fracción D ( $R_f = 0.1$ ), sobre las demás y el control (Figura 23A). En cuanto a la mortalidad también fue la fracción D, con un 30 %, seguida por la fracción C ( $R_f = 0.57$ ) la cual aún cuando presentó un porcentaje de alimentación mayor que el control se observó que tuvo una mortalidad del 26.7 % (Figura 23C).

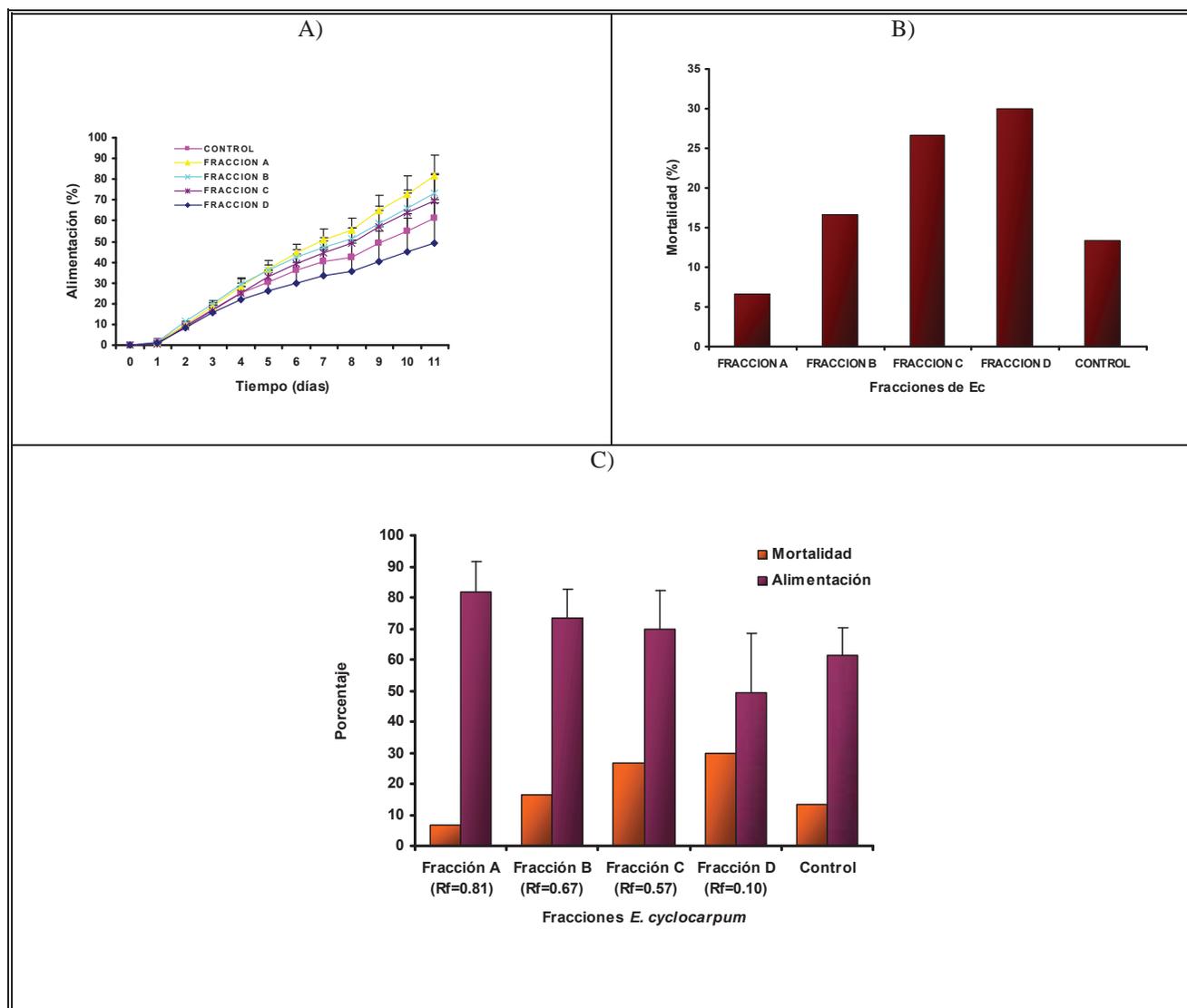


Figura 23. Efecto insecticida y antialimentario de las fracciones de *E. cyclocarpum*. A) Curso temporal de alimentación de las fracciones y el control. B) Porcentajes de mortalidad de cada una de las fracciones y el control. C) Correlación alimentación contra mortalidad. Tukey  $\alpha = 0.05$ .

## 7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Una alternativa para el control de plagas y patógenos indeseables son los metabolitos secundarios vegetales producidos por las plantas en su ciclo de vida para su comunicación, supervivencia o su defensa contra patógenos, plagas y predadores. Particularmente aquellos metabolitos extraídos de plantas utilizados en la medicina tradicional de los pueblos en tratamiento de algunas infecciones humanas o de árboles con una probada durabilidad natural al deterioro. Por ejemplo, recientemente Rutiga, (2001), analizó la durabilidad natural de *Pinus pseudostrabus*, *Manilkara zapota*, *Swietenia macrophylla*, *Cedrela odorata* y *Quercus laurina*. Encontró que el duramen de *P. pseudostrabus*, *M. zapota* y *C. odorata* es muy durable, el de *S. macrophylla* moderadamente durable y *Q. laurina* poco durable y concluyó que un factor importante en la durabilidad natural de la madera son las sustancias extraíbles producidas en la planta viva.

En este contexto, se propuso buscar qué otras actividades biocidas poseen los extractos de especies vegetales endémicas o introducidas en la región. Una especie endémica como *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. cuyas infusiones de la corteza se han utilizado en la medicina tradicional para el tratamiento del salpullido y la goma es empleada para tratar el resfriado común y la bronquitis, mientras que en las semillas se detectó actividad antiprotozoaria en el rumen de ovejas (Camacho, 1981; Ivan, M. y col., 2002).

### 7.1. Efecto en el crecimiento de bacterias.

Se encontró que el extracto acuoso del duramen de *Enterolobium cyclocarpum*, presentó un efecto bactericida mayor, teniendo efecto en *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, con respecto a los dos extractos restantes con la excepción de *Melia azedarach* (hojas) que tuvo un mínimo efecto en *Klebsiella pneumoniae*, resultados que están en acuerdo con la observación de que extractos etanólicos ejercieron un efecto inhibitorio del crecimiento de las bacterias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhi* y *Enterobacter aerogenes* (Padrón y col., 2003).

## 7.2. Efecto en el crecimiento de hongos.

El tratamiento de la micosis humana ha tenido un gran cambio ante la dermatitis y la cliniasis. Por un lado, las infecciones por hongos se han incrementado de manera alarmante mientras que por el otro, las reacciones alérgicas de la piel aumentan día con día. El avance es debido a un alto poder de sintetización de la presente generación de agentes antimicóticos. El hongo del patógeno potencial de la planta y del humano en general es normalmente tratado mediante el uso de componentes sintéticos principalmente de drogas de la familia imidazol (Davis, 2005). En realidad, la necesidad actual es investigar para nuevos agentes antifúngicos de origen vegetal los cuales sean relativamente económicos, seguros y fácilmente disponibles para el hombre común. Sin embargo, en algunas ocasiones los derivados del imidazol no son efectivos por lo cual se requieren drogas alternativas (Lowey y col., 1985). Alguna literatura muestra que muchos investigadores han reportado algunas propiedades bactericidas o fungicidas de extractos de una gran cantidad de plantas (Rai y col., 1999; Rai and Acharya, 1999; Singh, 1999). Muchas plantas producen aceites esenciales como metabolitos secundarios. Pero su función exacta en el proceso de la vida de la planta es desconocida. Una revisión de la literatura revela que un gran número de aceites esenciales han reportado poseer una actividad fungi-tóxica (Rai y col., 1999). La mayoría de los miembros de la familia Asteraceae conocidos contienen aceites esenciales los cuales normalmente tienen lactonas antifúngicos sesquiterpenos citotóxicos (Singh, 1999; Rai y Acharya, 1999).

Los extractos acuosos de *E. cyclocarpum* no registraron efectos en la inhibición del crecimiento de los hongos utilizados, *Candida albicans* y *Phytophthora cinnamomi*. A diferencia de la actividad anti-fungicida que presentaron los extractos de la madera de duramen de *Enterolobium cyclocarpum* obtenidos con ciclohexano, etanol y agua, contra hongos que atacan la madera como lo son: *Trametes versicolor* (pudrición blanca), *Coniophora puteana* (pudrición café), *Chaetomium globosum* (pudrición blanda) y *Trichoderma viride* (mancha azul) (Rutiaga y col., 1995). Los extractos acuosos de *M. azedarach* no afectaron el crecimiento de *Candida albicans* y *Phytophthora cinnamomi*. Sin embargo, Padrón y col. (2003), observaron que los extractos etanólicos de *M. azedarach* afectaron a los hongos *Trichophyton tonsurans*, *Cryptococcus neoformans* y *Sporotrix schenckii*.

### **7.3. Efecto sobre la germinación de semillas.**

La alelopatía es un fenómeno vegetal importante que de una manera simplista se entiende cuando una planta en crecimiento no permite el crecimiento de otras plantas a su alrededor y que opera tanto en ecosistemas naturales como en los intervenidos (manejados). Muchos metabolitos vegetales secundarios en los que se incluyen a los compuestos fenólicos, terpenoides, flavonoides y alcaloides, actúan como aleloquímicos vegetales. El efecto fitotóxico de metabolitos solubles en agua de *E. cyclocarpum* y *M. azedarach* no se han estudiado, por lo que se utilizaron semillas de una monocotiledónea (*Lolium multiflorum*) y de una dicotiledónea (*Trifolium repens*). En general, todos los extractos tuvieron un efecto herbicida a la concentración mas alta, *E. cyclocarpum* 13.33 mg/ml, *M. azedarach* (hojas) 10.15 mg/ml y *M. azedarach* (frutos) 11.88 mg/ml, que inhibieron el crecimiento en ambas semillas al 100 %, seguida de la concentración al 50 %, teniendo en *E. cyclocarpum* (6.67 mg/ml) un índice de germinación del 3.33 % en *L. multiflorum* y del 0 % en *T. repens*, mientras que *M. azedarach* (frutos) (5.94 mg/ml) presentó un índice de germinación por debajo del 5 % en ambas semillas. Con la concentración más baja del 25 %, en el extracto de *E. cyclocarpum* (3.33 mg/ml) hubo un índice de germinación del 2.95 % y de 6.17 % para *M. azedarach* (frutos) (2.97 mg/ml) para la semilla de *L. multiflorum*, mientras que en *T. repens* el extracto de *E. cyclocarpum* tuvo un índice de germinación de 23.6 % y en *M. azedarach* (frutos) del 4.41 %. El extracto de *Melia azedarach* L. (hojas), presentó el mayor efecto herbicida con una inhibición total en *T. repens* y solamente un índice de germinación mínimo a la concentración del 25 % (2.54 mg/ml) del 2.37 % sobre *L. multiflorum*.

### **7.4. Efecto sobre el daño causado en la membrana plasmática.**

Para conocer el posible modo de acción de los extractos acuosos se expusieron células de tabaco línea TBY2 a ellos y se midió la conductividad, se observó que la conductividad del medio aumentó. El extracto que presentó un mayor daño en la membrana plasmática fue el de *Enterolobium cyclocarpum*, ya que con una menor cantidad de extracto (1 ml) dañó la membrana plasmática en un nivel mayor, seguido por *M. azedarach* (hojas) que tuvo un efecto similar pero con 2 ml del extracto, y por último *M. azedarach* (frutos), presentó un efecto menor, sugiriendo que los extractos perturban la permeabilidad de la membrana plasmática vegetal.

## 7.5. Efecto anti-termita.

El control químico es el método primario para controlar plagas, sin embargo, el control con pesticidas 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 sobrevivencia de los insectos que no entraron en contacto con el compuesto químico, o c) ciclos de vida múltiples y cortos con altas tasas de reproducción que favorecen una rápida selección de biotipos resistentes a diferentes clases de insecticidas, como los organofosfatos, piretroides, ciclodienos y al reciente insecticida el cloro nicotinil (Prabhaker y col., 1989; Dittrich y col., 1990 a,b; Cahill y col., 1995; Byrne y col., 2003). De tal forma que los biopesticidas tienen ventajas como, una toxicidad reducida para el hombre, una rápida y completa degradación en el ambiente, un riesgo bajo para resistencia y selectividad para organismos no blanco.

De las fracciones separadas del extracto de *Enterolobium cyclocarpum* las que presentaron mejores efectos insecticidas fue la fracción D ( $R_f = 0.1$ ) que tuvo un 49 % de alimentación y un porcentaje de mortalidad del 30 %, seguida por la fracción C ( $R_f = 0.57$ ), que reportó un 69.7 % de alimentación, pero presentó un 26.7 % de mortalidad, que se pueden considerar bajos de acuerdo con los resultados reportados por Raya (2005), en los cuales obtuvo porcentajes de mortalidad del 40 % para las fracciones con los siguientes  $R_f$  0.83, 0.67 y 0.41, mientras que en la fracción con  $R_f = 0.039$ , alcanzó una mortalidad del 50 %. Reyes y col., (1995), determinaron la actividad antitermita de los extractos y flavonoides del duramen de *Lonchocarpus castilloi*, contra el ataque de *Cryptotermes brevis* (Walker), realizaron las extracciones con hexano, diétil éter, acetona, metanol y agua, detectaron que si bien los cinco extractos reducen la alimentación y la supervivencia de las termitas no hay una diferencia significativa entre ellos; de los dos flavonoides que aislaron (castillen D y castillen E) impregnados en papel filtro mostraron una actividad antialimentaria en función de la concentración pero no fue tóxica a *C. brevis*.

Los metabolitos secundarios extraíbles de maderas con durabilidad natural, además de servir en la defensa vegetal contra pestes 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 comprensión paralela en la madera de duramen de *Enterolobium 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.

En países que son las potencias económicas o con gran cultura y conciencia ecológica se ha prohibido el uso de muchos de los productos químicos que actualmente existen en los mercados tales como el DDT (diclorodifeniltricloroetano), pentaclorofenol y bromuro de metilo. Sin embargo, en los países del tercer mundo se siguen utilizando hasta nuestros días, con la autorización de las autoridades ambientales y de salud que conocen que es un producto altamente contaminante y que no es biodegradable (Ware y Whitacre, 2004). En la agricultura, la revolución verde promovió un incremento sustancial en el rendimiento de muchos cultivos económicamente importantes, a través del abuso de los plaguicidas sintéticos. (Rivera y col., 2003). Donde la investigación fitoquímica y farmacológica de maderas con durabilidad natural al biodeterioro son esfuerzos de investigación para sustituir a los plaguicidas actuales tal como lo es el presente trabajo.

## 8. CONCLUSIONES

En general, todos los extractos tuvieron algún efecto biocida en las diferentes pruebas realizadas. El extracto de *Enterolobium cyclocarpum* presentó el mayor efecto inhibitorio con respecto a los dos extractos restantes en las enterobacterias, con excepción de *Melia azedarach* (hojas), que inhibió una de ellas. En cuanto al efecto herbicida *M. azedarach* (hojas), fue el extracto con un mejor resultado, seguido por los extractos de *M. azedarach* (frutos) y *E. cyclocarpum*. Los mayores daños presentados en las membranas plasmáticas de las células de tabaco TBV2, fueron las ocasionadas por *E. cyclocarpum*, después *M. azedarach* (hojas) y por último *M. azedarach* (frutos). Los resultados en las pruebas realizadas para determinar la inhibición del crecimiento de los hongos con los diferentes extractos fueron negativos. Las pruebas que se les realizaron a las fracciones obtenidas del extracto acuoso de *E. cyclocarpum*, hubo resultados en dos fracciones que presentaron una mínima efectividad insecticida y antialimentaria por debajo del 50 %, las cuales fueron la fracción D (Rf = 0.57) seguida por la fracción C (Rf = 0.1).

## 9. RESUMEN

La durabilidad natural al biodeterioro de *Enterolobium cyclocarpum*, el efecto insecticida de *Melia azedarach* contra la mosca de la papa, son propiedades vegetales de interés para el control de patógenos y plagas. *E. cyclocarpum* tuvo un efecto bacteriostático sobre *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. saprophyticus* y *S. aureus*. Los extractos acuosos vegetales de hojas y frutos *M. azedarach*, y del durámen de *E. cyclocarpum* no ejercieron efecto tóxico sobre *Candida albicans* y *Phytophthora cinnamomi*. Todos los extractos acuosos de las especies arbóreas ejercieron un efecto tóxico sobre la germinación de las semillas de *Lolium multiflorum* y *Trifolium repens* a concentraciones mayores de  $2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Los índices de germinación de *L. multiflorum* y *T. repens* que se lograron en presencia de los extractos acuosos fueron menores al 6.17 % y 23.6 %, respectivamente. El extracto acuoso de hojas de *M. azedarach* y del duramen de *E. cyclocarpum* fueron los mejores tóxicos para la germinación de las semillas. Afectaron la membrana plasmática de células de tabaco TBY2, pero el extracto acuoso de *E. cyclocarpum* fue el más tóxico. Por métodos cromatográficos se obtuvieron dos fracciones con Rf de 0.1 y 0.57, después de tres semanas de exposición a las fracciones se observó un efecto antitermita, disminuyeron las tasas de alimentación a un 49 % y de supervivencia a un 70 %. En general, todos los extractos acuosos vegetales presentaron algún efecto tóxico en las especies de prueba.

## 10. SUMMARY

Natural durability to biodeterioration of *Enterolobium cyclocarpum* heartwood, insecticide effect of *Melia azedarach* on sweet potato fly, are interesting plant properties for to pest and pathogen control. *E. cyclocarpum* has a bacteriostatic effect on *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. saprophyticus* y *S. aureus*. The extracts from *M. azedarach* and *E. cyclocarpum* have not toxic effect on *Candida albicans* and *Phytophthora cinnamomi*. All species tree aqueous extracts have toxic effect on seed germination of *Lolium multiflorum* y *Trifolium repens* to concentrations greater than 2 mg·ml<sup>-1</sup>. The germination indexes of *L. multiflorum* and *T. repens* with aqueous extract plant were smaller than 6.17 % and 23.6 %, respectively. The *M. azedarach* leaf aqueous extract and *E. cyclocarpum* heartwood aqueous extract were the best toxic to seed germination. They affected tobacco cells TBV2 plasmatic membrane, but *E. cyclocarpum* extract was the best. By chromatographic methods were obtained two fractions with Rf de 0.1 and 0.57, three weeks post exposition to fractions, it observed a antitermite effect with feeding and survival rate decreased at 51 and 70 %, respectively. All plant extracts made some toxic effect on test species.

## 11. BIBLIOGRAFIA

- Anónimo, 1986a. Manual de Preservação de Madeiras. Vol. I y II. Secretaria de Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia do Estado de São Paulo, Brasil.
- Anónimo, 1994b. Manual de Construcción para Estructuras Ligeras de Madera. Edit. COMACO. México, D. F. 472 p.
- Ávila Calderón, L. E. A. 1999. Efecto de los extraíbles en cuatro propiedades físicas y mecánicas de la madera de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq). Griseb. Tesis de maestría. Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mich., México. 73 p.
- Byrne, F. J., Castle, S., Prabhaker, N., Toscano, N. C. 2003. Biochemical study of resistance to imidacloprid in B biotype *Bemisia tabaci* from Guatemala. *Pest Manag. Sci.* **59**: 347-352 p.
- Cahill, M., Byrne, F. J., Gorman, K., Denholm, L., Devonshire, A. L. 1995. Pyrethroid and organophosphate resistance in the tobacco whitefly *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Bull. Entomol. Res.* **85**: 181-187 p.
- Camacho, M. P. 1981. Ensayos de adaptabilidad y rendimiento de especies forestales en Costa Rica, Cartago, Costa Rica: Instituto Tecnológico de Costa Rica y Ministerio de Agricultura y Ganadería. 287 p.
- Cockcroft, R. y B. O. Henningson. 1983. The global needs of wood preservation. *The International Journal of Wood Preservation.* **3 (2)**: 65-71 p.
- Davis, S. 2005. An overview of the antifungal properties of allicin and its breakdown products- the possibility of a safe and effective antifungal prophylactic. *Mycoses.* **48**: 95-100 p.
- Devonshire, A. L., Field, L. M. 1991. Gene amplification and insecticide resistance. *Ann. Rev. Entomol.* **36**: 1-23 p.
- Dittrich, V., Ernat, G.H., Ruesh, O., Uk, S. 1990b. Resistance mechanism in sweet potato whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) population from Sudan, Turkey, Guatemala and Nicaragua. *J. Econ. Entomol.* **83**: 1665-1670 p.
- Dittrich, V., Uk, D., Ernat, G.H. 1990 a. Chemical control and insecticide resistance of whiteflies. *In: Whiteflies: their bionomics, pest status and management.* Ed. By Gerling, D. Andover, Hants, UK. 263-285 p.
- Heal, R. E. Rogers, Wallace R. T. y Starnes, O. 1950. A Survey of Plants for insecticidal Activity. *Lloydia* 13(2):89-162. Rosenthal, G. and M. Berenbaum (Eds). 1991. *Herbivores:*

- Their interactions with secondary plant metabolites. Academic press. INC. San Diego, USA. 467 p.
- Ivan M., Mir, P. S., Koenig, K. M., Newbold, C. J., Entz, T., Ride, L. M., Ibrahim, M. 2002. Use of dietary saponin or vegetable oil to control protozoal populations in the rumen of sheep. 6<sup>th</sup> International Conference on Agricultural Biotechnologies. Revello, Italy from July 11 to 14.
- Joklik, W. K., Willet, H. P., Amos, B. D. 1986. Zinsser Microbiología. Editorial: Médica Panamericana, Edición 18<sup>a</sup>. Buenos Aires, Argentina. 1454 p.
- Lyn Carter, F., H. Beal, R., D. Bultman, J. 1975. Extraction of antitermic substances from 23 tropical hardwoods. Wood Science. **8(1)**: 406-410 p.
- Lowey M, Parent D, Ledonx-Corbus-Ies M. 1985. A new combination of tolnaphtata and methylparticine (SPA-5-345, Triol). Mycoscien. **28**: 452-456 p.
- Padrón Márquez, B., Oranday Cárdenas, A., Rivas Morales, C., Verde Star, M. J. 2003. Identificación de compuestos de *Melia azedarach*, *Syzygium aromaticum* y *Cinnamomum zeylanicum* contra el efecto inhibitorio sobre bacterias y hongos. Editorial Ciencia UANL. Vol. VI, No. 3. Nuevo León, México. 333-338 p.
- Pennington, T. D., Sarukhan Kermez, J. 1998. Árboles tropicales de México. Ediciones Científicas Universitarias, 2da. Edición. Editorial UNAM - Fondo de Cultura Económica. México. 498 p.
- Prabhaker, N., Toscano, N.C., Coudriet, D.L. 1989. Susceptibility of the immature and adult stage of the sweetpotato whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) to selected insecticides. J. Econ. Entomol. **82**: 983-988 p.
- Rai MK, Acharya D. 1999. Screenig of some Asteraceous plants for antimycotic activity. Compositae Newsletter. **34**: 37-43 p.
- Rai MK, Qureshi S, Pandey AK. 1999. *In vitro* evaluation of inhibitory nature of extracs of 18 plant species of Chindwara against 3-keratinophilic fungi. Hundustan Antibiotics Bulletin, **30**: 33-36 p.
- Ramos Pantaleón, D. 2003. Aislamiento y fraccionamiento de sustancias extraíbles de la madera de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq). Griseb., (parota). Tesis de maestría. Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Mich., México. 102 p.
- Raya González, D., Rutiaga Quiñónez, J. G., Martínez Pacheco, M. M. 2003. Preservación de Madera de *Quercus* spp., con extracto de *Melia azedarach* L., *Enterolobium cyclocarpum*

- (Jacq). Griseb. y *Nerium oleander* L. contra *Lyctus* sp. **In:** I Foro de Investigación. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. Morelia, Mich.
- Raya González, D., Rutiaga Quiñónez, J. G., Martínez Pacheco, M. M. 2005. Control de dos barrenadores de madera seca *Lyctus* sp. (Coleóptera: Lyctidae) e *Incisitermes marginipennis* (Latreille) (Isóptera: Kalotermitidae), con extractos de *Melia azedarach* L., *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq). Griseb. y *Nerium oleander* L. **In:** Congreso Nacional de Entomología. Sociedad Mexicana de Entomología A.C. (Resumen de ponencias). Tapachula, Chiapas. 721-725 p.
- Reyes Chilpa, R., Viveros Rodríguez, N., Gómez Garibay, F., Alavéz Solano, D. 1995. Antitermic activity of *Lonchocarpus castilloi* flavonoids and heartwood extracts. Journal of Chemical Ecology. Vol 21, No. 4. 455-463 p.
- Rutiaga Quiñones, J. G., Windelsen, E., Schumacher, P. 1995. Anti fungal activity of heartwood extracts from *Dalbergia granadillo* and *Enterolobium cyclocarpum*. Institut für Holzforschung der Universität München, Winzererstr. 45, D-80797. München, Germany.
- Rutiaga Quiñones, J. G. 1991. Determinación de la composición química de la madera de dos especies tropicales. Tesis de Licenciatura. Escuela de Ingeniería en Tecnología de la Madera. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Mich. 171 p.
- Rutiaga Quiñones, J. G. 2001. Chemische und biologische Untersuchungen zum Verhalten dauerhafter Holzarten und Extrakte gegenüber holzabbauenden Pilzen. Universität München, Alemania. Editorial Buchverlag Gräfelfing. 210 p.
- Swan, T. y Hillis W. E. 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica* I. The quantitative analysis of phenolic constituents. J. Sci. Food Agric. 10:6368.
- Singh KV. 1999. Studies on the biocidal activities of certain essential oils. JMAPS **21**: 1119-1130 p.
- Vignote, P. S. y Jiménez Périz, F. J. 1996. Tecnología de la Madera. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, España. 602 p.
- Wang, J. J., Zhao, Z. M. 2003. Accumulation and utilization of triacylglycerol and polysaccharides in *Liposcelis bostrychofila* (Psocoptera: Liposcelididae) to controlled atmosphere. International Journal of Pest Management. **45**: 75-79 p.
- Zoberi, M. H. 1995. *Materrhizium anisopliae*, a fungal pathogen of *Reticulitermes flavipes* (Isóptera: Kalotermitidae), Micology. **87**(3):354-359 p.

## Páginas en Internet:

- Anónimo. 2006c. Especies con usos no maderables en bosques tropicales y subtropicales en los estados de Durango, Chihuahua, Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca. [Internet]. Disponible en: [www.semarnat.gob.mx/pfnm2/fichas/enterolobium\\_cyclocarpum.htm](http://www.semarnat.gob.mx/pfnm2/fichas/enterolobium_cyclocarpum.htm). [Consulta: abril 24, 2006].
- Anónimo. 2006d. Dirección General de Ordenamiento Forestal Cuencas y Riegos. Área Forestal. [Internet]. Disponible en: [www.mag.gob.sv/admin/publicaciones/upload\\_file/1121114803\\_6.pdf](http://www.mag.gob.sv/admin/publicaciones/upload_file/1121114803_6.pdf). [Consulta: abril 25, 2006].
- Anónimo. 2000e. Superficie forestal por ecosistema según formación primaria y secundaria. Instituto Nacional de Geografía e Informática (INEGI). [Internet]. Disponible en: [www.inegi.gob.mx/est/contenidos/espanol/rutinas/ept.asp?t=mamb136&c=5933](http://www.inegi.gob.mx/est/contenidos/espanol/rutinas/ept.asp?t=mamb136&c=5933) [Consulta: julio 5, 2006].
- Pérez D., D., Iannacone O. J. 2006. Efectividad de extractos botánicos de diez plantas sobre la mortalidad y repelencia de larvas de *Rhynchophorus palmarum* L., insecto plaga del Pijuayo *Bactris gasipaes* Kunth en la Amazonía del Perú. Agricultura Técnica, Vol. 66, No. 1. ISSN 0365-2807. Chillán, Chile. [Internet] Disponible en: [www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0365-28072006000100003&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0365-28072006000100003&script=sci_arttext) [Consulta: julio 4, 2006].
- Rivera Amita, M. M., Carballo Guerra, C., Milanés Figueredo, M., Ramos Gálvez, S. R., Orama Velasco, R. A. 2003. Efecto de plaguicidas de origen botánico sobre el áfido *Carolinaia cyperi* Ainslie. Estación Experimental de Plantas Medicinales “Dr. Juan Tomás Roig”. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. San Antonio de los Baños, Provincia La Habana, Cuba. [Internet]. Disponible en: [www.bvs.sld.cu/revistas/pla/vol8\\_3\\_03/pla09303.htm](http://www.bvs.sld.cu/revistas/pla/vol8_3_03/pla09303.htm). [Consulta: mayo 09, 2006].
- Rossetti, M. R., Defagó, M. T., Valladares, G., Carpinella, C., Palacios, S. 2006. Efectos de *Melia azedarach* (paraíso) sobre el desarrollo larval de *Spodoptera eridania*. Centro de Investigaciones Entomológicas de Córdoba. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales U.N.C. Córdoba, Colombia [Internet]. Disponible en: <http://agro.uncor.edu/~foro/FORO%202004/Resumen/Rossetti.%20Efectos%de%20extractos.doc> [Consulta: julio 04, 2006].

Sánchez, T. (s/f). Contaminación del suelo y lucha biológica. Centro de Educación Ambiental Corazón Verde. Alicante, España. [Internet]. Disponible en: [www.corazonverde.org/monografias/contamina.htm](http://www.corazonverde.org/monografias/contamina.htm). [Consulta: mayo 27, 2005].

Ware, G. W. y Whitacre, D. M. 2004. Introducción a los insecticidas. Universidad de Minnesota. Tucson, Arizona. EUA. [Internet]. Disponible en: [www.ipnworld.umn.edu/cancelado/Spchapters/W&WinsectSP.htm](http://www.ipnworld.umn.edu/cancelado/Spchapters/W&WinsectSP.htm). [Consulta: mayo 28, 2005].