



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO-FARMACOBIOLOGÍA

T E S I S

“DETERMINACIÓN DEL EFECTO DISUASIVO DE
TAGETES LUCIDA CAV. CONTRA LA TERMITA DE
MADERA SECA *INCISITERMES MARGINIPENNIS*
LATREILLE”

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN QUÍMICO – FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

HUGO GASCA NAVARRO

ASESOR:

D.C. EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL: BIOQUÍMICA
MAURO MANUEL MARTÍNEZ PACHECO

COASESOR:

M.C. EN TECNOLOGÍA DE LA MADERA
CESAR BONIFACIO RAMÍREZ LÓPEZ

MORELIA, MICHOACÁN

JUNIO 2014

Resumen

La termita de madera seca *Incisitermes marginipennis* son consideradas una plaga, su principal fuente de alimento es la celulosa, los sectores industriales y de servicios afectados son industrias muebleras, sistemas ferrocarrileros, comunicación y monumentos históricos ocasionando grandes pérdidas económicas. Hoy en día los preservadores utilizados para prolongar su tiempo de vida útil de la madera, son bioacumulables y ocasionan daño a la salud humana. Una alternativa es el estudio de moléculas de origen vegetal que sean biodegradables y no tóxicos al ambiente y al ser humano, que sustituyan a los preservadores comerciales. *Tagetes lucida* es una especie abundante en Michoacán y es considerada como candidato ideal para la búsqueda de moléculas que puedan proteger la madera del deterioro causado por la termita. Pues se conoce que contiene cumarinas, lactonas, terpenos, flavonoides y bitiofenos con actividad farmacológica. La medición del efecto disuasivo de los bitiofenos se realiza en varias termitas de madera seca. Se evaluó en efecto anti-alimentario y repelente a partir de extractos y aceites esenciales de *T. lucida* obtenidos. Flor y tallo del extracto dicloro-metano presentó mayor actividad anti-alimentaria, el aceite esencial de flor fue el que presentó mayor efecto repelente. Los bitiofenos se encuentran en raíz y tallo por lo que se le atribuye el efecto disuasivo. De bitiofenos comerciales (aldrich) se realizó la actividad anti-alimentaria siendo el mejor el 2,2-bitiofeno 5-carboxaldehído; se atribuyó su efectividad al grupo funcional. Bacterias intestinales fueron aisladas del tracto digestivo de la termita para ensayar los bitiofenos con efecto inhibitorio, el único que presentó inhibición fue el 2,2-bitiofeno 5-carboxaldehído. *T. lucida* es un candidato ideal para la búsqueda de moléculas con efecto disuasivo contra la termita de madera seca *I. marginipennis*.

Palabras claves: *Incisitermes marginipennis*, *Tagetes lucida*, efecto disuasivo, actividad anti-alimentaria, efecto repelente.

Abstract

The dry wood termite *Incisitermes marginipennis* are considered a pest, its main food source is cellulose, the industrial and service sectors are affected muebleras industries, railway systems, communication and landmarks causing great economic losses. Today preservatives used to prolong the lifetime of wood, are bioacomulables and cause harm to human health. An alternative is the study of molecules from plants that are biodegradable and non-toxic to the environment and humans, to replace the commercial preservatives. *Tagetes lucida* is an abundant species in Michoacán and is considered ideal for finding molecules that can protect the wood from deterioration caused by termite candidate. As is known to contain coumarins, lactones, terpenes, flavonoids and pharmacological activity bithiophenes. Measuring the deterrent effect of bithiophenes is done in several drywood termites. Were evaluated in anti-food repellent effect from extracts and essential oils of *T. lucida* obtained. Flower and stem dichloromethane extract showed higher anti-feeding activity, the flower essential oil was presented the highest repellent effect. The bithiophenes found in roots and stems so that the deterrent effect is attributed. Bithiophenes commercial (Aldrich) the anti-feeding activity was performed being the best 2,2-bithiophene-5-carboxaldehyde its effectiveness was attributed to the functional group. Intestinal bacteria were isolated from the digestive tract of the termite to test the inhibitory effect bithiophenes with the inhibition was only introduced 2,2-bithiophene 5-carboxaldehyde. *T. lucida* is an ideal place to search for candidate molecules deterrent against drywood termites *I. marginipennis*.

Keywords: *Incisitermes marginipennis*, *Tagetes lucida*, deterrent effect, anti-feeding activity, repellent effect.

Índice

1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	2
2.1. Aspectos generales de los plaguicidas.....	2
2.2. Insecticidas de origen natural.....	4
2.3. Biodeterioro de la madera en México.....	5
2.4. Termita de madera seca.....	7
2.4.1. Especie del Género <i>Incisitermes</i> en México.....	7
2.4.2. Ciclo de la termita.....	8
2.5. Preservadores de la madera.....	9
2.6. Tiofenos.....	10
2.7. Asteraceae en México.....	12
2.8. Género <i>Tagetes</i>	13
2.8.1. <i>Tagetes lucida</i>	13
3. Justificación.....	15
4. Hipótesis.....	16
5. Objetivo General.....	16
5.1. Objetivos Particulares.....	16
6. Materiales y Métodos.....	17
6.1. Estrategia Experimental.....	17
6.2. Organismo.....	18
6.2.1. Colecta de la termita de madera seca <i>Incisitermes marginipennis</i>	18
6.3. Material vegetal.....	18
6.3.1. Colecta de la planta <i>Tagetes Lucida</i>	18

6.4. Obtención de los extractos de <i>Tagetes Lucida</i>	19
6.4.1. Maceración sucesiva con disolventes de polaridad ascendentes	19
6.5. Obtención de aceites esenciales de <i>T. lucida</i> por el método de hidrodestilación	20
6.6. Análisis químico de <i>T. lucida</i>	21
6.6.1. Cromatografía de Gases-Masas (GC/MS)	21
6.7. Ensayos biológicos	21
6.7.1. Efecto repelente de los aceites esenciales de <i>T. lucida</i> en la termita de madera seca <i>I. marginipennis</i>	21
6.7.2. Efecto anti-alimentario de los extractos de <i>T. lucida</i> y componentes puros en la termita de madera seca <i>I. marginipennis</i>	22
6.7.2.1. Alimentación forzada	22
6.7.2.2. Selección de alimento.....	23
6.7.2.3. Determinación de los coeficientes anti-alimentarios total de los extractos de <i>T. lucida</i>	23
6.7.3. Preparación de los Bitiofenos	24
6.7.4. Aislamiento de la microbiota de la termita de madera seca <i>I. marginipennis</i>	24
6.7.4.1. Aislamiento e identificación de los microorganismos	24
6.7.5. Preparación de los bitiofenos con dimetil-sulfóxido (DMSO) para la evaluación del efecto bactericida.....	25
6.7.5.1. Evaluación del efecto inhibidor de los bitiofenos en las bacterias aisladas de la microbiota de la termita <i>I. marginipennis</i>	26
7. Conclusión.....	27
8. Bibliografía.....	28

Índice de cuadros:

Cuadro 1. Clasificación de los plaguicidas por su toxicidad.....	2
Cuadro 2. Clasificación de los plaguicidas según la familia química	3
Cuadro 3. Clasificación de especies <i>Incisitermes</i> en México	8
Cuadro 4. Bacterias microaerofílicas.....	25
Cuadro 5. Bacterias aerobias	25

Índice de figuras:

Figura 1. Producción y consumo maderable aparente.....	6
Figura 2. Biodiversidad de organismo en México y el mundo	6
Figura 3. Estructura base de un tiofeno	10
Figura 4. Distribución de <i>Tagetes</i> spp en México.....	13
Figura 5. Colonia de termitas de madera seca <i>I. marginipennis</i>	18
Figura 6. Muestras de órganos secos de <i>T. lucida</i> para la obtención de extractos	18
Figura 7. Imágenes del proceso de extracción de los extractos de <i>T. lucida</i>	19
Figura 8. Obtención de los aceites esenciales por hidrodestilación.....	21
Figura 9. Efecto repelente de los aceites esenciales de <i>T. lucida</i> en termitas <i>I. marginipennis</i>	22
Figura 10. Aplicación de los bitiofenos.....	26

1. Introducción

La madera es un material de gran importancia en Michoacán como en el resto del país. Sin embargo, es un material que está expuesto al ataque de insectos, hongos y bacterias. Una de las plagas que ocasionan mayor daño a nivel mundial son las termitas de madera seca las cuales causan pérdidas económicas en sistemas de comunicación, ferrocarrileros, industrias muebleras y monumentos históricos, su principal fuente de alimento es la celulosa y principalmente se encuentran en monumentos históricos e industrias muebleras, ya que no requiere de una fuente de humedad para su adaptación. En México existen 63 especies de termita, en Michoacán se encuentra la especie *Incisitermes marginipennis* donde se compone únicamente por tres tipos de casta: ninfa, soldado y reproductores **(Cibrián et al., 1995; Canello y Myles 2000, Raya González 2007 e Ibáñez et al., 2012)**.

Los preservadores de madera generan bioacumulación ya que pueden tardar días, semanas, mese o años su degradación y son nocivos para el ambiente y ser humano. Existe una gran biodiversidad de especies vegetales del genero *tagetes* en la naturaleza y México cuenta con 56 de ellas. Michoacán se encuentra *Tagetes lucida* conocida como *Santa María* o *pericón*, nativa de México de la familia Asteraceae y Tribu tagetae, que era usada en ceremonias rituales por nuestros ancestros. Se le atribuye propiedades medicinales se usan para aliviar problemas estomacales, cólicos, asma, tos, espasmos y vómito; además tiene propiedades insecticidas contra mosquitos **(Villarreal 2003)**. Es importante buscar nuevas alternativas para preservar la madera y prolongar su tiempo de uso y evitar la pérdida económica y cultural que causa *I. marginipennis*, por lo que es un candidato ideal para investigar en sus metabolitos secundarios, moléculas que pueden presentar un efecto de disuasión y no de aniquilación en termitas de madera seca (*Incisitermes marginipennis*) y proteger a la madera del deterioro; siendo este el principal tópico que se tratara en ésta investigación.

2. Antecedentes

2.1. Aspectos generales de los plaguicidas

La Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO) define un plaguicida como: “una sustancia o mezcla de ellas, de carácter orgánico o inorgánico, destinada a combatir insectos, ácaros, roedores y otras especies indeseables en plantas y animales que son perjudiciales para el hombre o que interfieren en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas y productos de madera” **(FAO 1986; Briggs y Carson 1992; Albert 2007)**.

Los plaguicidas se pueden clasificar por: toxicidad aguda, vida media, estructura química y uso. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció una clasificación en relación a la toxicidad aguda y peligrosidad, definida como la capacidad de producir un daño a la salud por una o múltiples exposiciones en un período de tiempo temprano. También se clasifican según su modo de acción, solubilidad. **(López 1993 y Albert 2007)**.

Cuadro 1. Clasificación de los plaguicidas por su toxicidad expresada en DL₅₀ (mg/kg)

Clase	Toxicidad	Ejemplos
Clase IA	Extremadamente peligroso	Paratión, dieldrín
Clase IB	Altamente peligrosos	Eldrín, diclorvos
Clase IC	Moderadamente peligrosos	DDT, clordano
Clase ID	Ligeramente peligroso	Malatión

***Nota:** Los parámetros varían de acuerdo a la presentación del producto (sólido, gel, líquido, gas, polvo), la temperatura, la dieta, la edad, sexo **(López 1993; Albert 2007)**.

De acuerdo a su estructura química, los plaguicidas se clasifican en: compuestos organoclorados, compuestos organofosforados, compuestos inorgánicos como se muestra en el cuadro 2 (López 1993; Albert 2007).

Cuadro 2. Clasificación de los plaguicidas según la familia química

Familia química	Ejemplos
Organoclorados	DDT, aldrín, endosulfán, endrín
Organofosforados	Bromophos, diclorvos, malatión
Carbamatos	Carbaryl, methomyl, propoxur
Tiocarbamatos	Ditiocarbamato, mancozeb, maneb
Piretroides	Cipermetrín, fenvalerato, permetrín
Derivados bipyridilos	Colmequat, diquat, paraquat
Derivados del ácido fenoxiacético	Dicloroprop, picram, silvex
Derivados cloronitrofenólicos	DNOC, dinoterb, dinocap
Derivados de triazinas	Atrazine, ametryn, desmetryn
Compuestos orgánicos del estaño	Cyhexatín, dowco, plictrán
Compuestos inorgánicos	Arsénico pentóxido, obpa, fosfito de magnesio, cloruro de mercurio, arsenato de plomo, antimonio, mercurio, selenio, talio
Compuestos de origen botánico	Retenona, nicotina, aceite de canola

Uno de los problemas graves de la aplicación de los plaguicidas a los cultivos; es que únicamente el 1 % del plaguicida alcanza al organismo blanco, el 25 % es retenido en el follaje, el 30 % llega al suelo y el 44 % restante es exportado a la atmósfera y a los sistemas acuáticos; lo que ocasiona daños al medio ambiente (Brady y Weil 1996 y Wesseling 1997).

2.2. Insecticidas de origen natural

Un insecticida natural es una sustancia o mezcla de sustancias la cual ejerce acción biocida para controlar o repeler a insectos, debido a la naturaleza de su estructura química (**González 2004; Albert 2007**).

Estos productos a diferencia de otros insecticidas convencionales, están compuestos por plantas, aceites vegetales y un activo no sintético que determinará sus efectos. El uso de productos sintéticos causa enfermedades o muerte por envenenamiento a corto y largo plazo, así como afectación al medio ambiente y desequilibrio en la cadena alimenticia (**Molina et al., 2009**). La organización Mundial de la Salud (**OMS 1993**) incorpora dentro de la definición de insecticida a compuestos con disuasión (disuadir al insecto evitando principalmente su reproducción y no eliminándolo).

Los problemas causados por el uso excesivo de insecticidas sintéticos obligan a la búsqueda de nuevas alternativas en el manejo de insectos. Una de las herramientas importante es el uso de insecticidas botánicos o de origen natural. La mayoría de las plantas sintetizan alrededor de 100.000 metabolitos secundarios que poseen propiedades insecticidas. Los metabolitos secundarios que mayoritariamente se encuentran en las plantas son: terpenos, lignanos, alcaloides, azúcares, ácidos grasos y esteroides, algunos con efectos anti-microbianos o insecticida. Los metabolitos secundarios influyen en el mecanismo de defensa en las plantas, por lo que se ha retomado el uso de ellas como insecticidas más seguros para el ser humano y el ambiente. Sin embargo, la gran diversidad de especies vegetales sugiere que pocas plantas han sido estudiadas y por lo tanto es un campo amplio y poco explorado (**Jacobson 1989 y Cortés 2011**). Algunos de estos compuestos pueden actuar como:

- Repelentes: Son capaces de alejar plagas a través de sustancias desagradable que contiene la planta.

- Fago-repelentes o anti-alimentario: Reducen la capacidad de alimentación y eliminación de la plaga por inanición.
- Venenoso por contacto: La sustancia debe aplicarse o ponerla en contacto con el insecto para provocar su muerte.
- Reguladores del crecimiento: Las biomoléculas al ser consumidos alteran el desarrollo normal del insecto, evitando que alcance su crecimiento pleno.
- Acción de disfrazar olores: Se aprovechan los olores desagradables que le permiten ocultar el olor del cultivo y evitar ser atacado.
- Confusores: Las sustancias de la planta van a contribuir a una señal equivocada para el insecto el cual no le permitirá encontrar su fuente de alimento (**Silva et al., 2002**).

2.3. Biodeterioro de la madera en México

La madera es un material orgánico no homogéneo formado por celulosa, que le confiere estructura en la pared celular. La madera está expuesta al ataque de agentes biológicos como: hongos e insectos xilófagos, perforadores marinos y agentes no biológicos como: desgaste mecánico y fuego. El deterioro de la madera ocasiona cambios en la apariencia o estructura al igual que sus propiedades químicas, físicas y mecánicas (**Ibáñez et al., 2012**). Las termitas son una amenaza en la biodegradación de la madera en zonas tropicales que ocasiona pérdidas económicas en productos maderables de 1500 millones de dólares cada año en Estados Unidos de America, siendo su única alternativa el protegerla del deterioro con tratamientos químicos (**Ebeling 1968; Pérez et al., 1981; Carter y Beal 1982**).

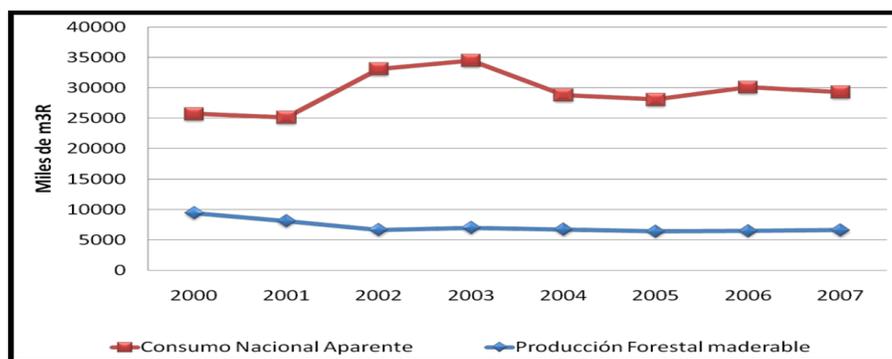


Figura 1. Producción y consumo maderable aparente. http://era-mx.org/accion/UZACHI_plestr/PanoramaSector_forestal.

La durabilidad natural de la madera es la capacidad de resistir al ataque de insectos, hongos, bacterias, algas, esto debido a la composición química de la pared celular. La lignina (15-20 %) y celulosa (40-60%), son polisacáridos que se encuentran en la madera y es fuente de alimento para los insectos xilófagos, hongos, moluscos, crustáceos, (Findlay 1985; Honorato *et al.*, 2001; Novoa 2006). En la figura 2 podemos observar que México presenta gran biodiversidad de organismos en comparación con todo el mundo principalmente de insectos.

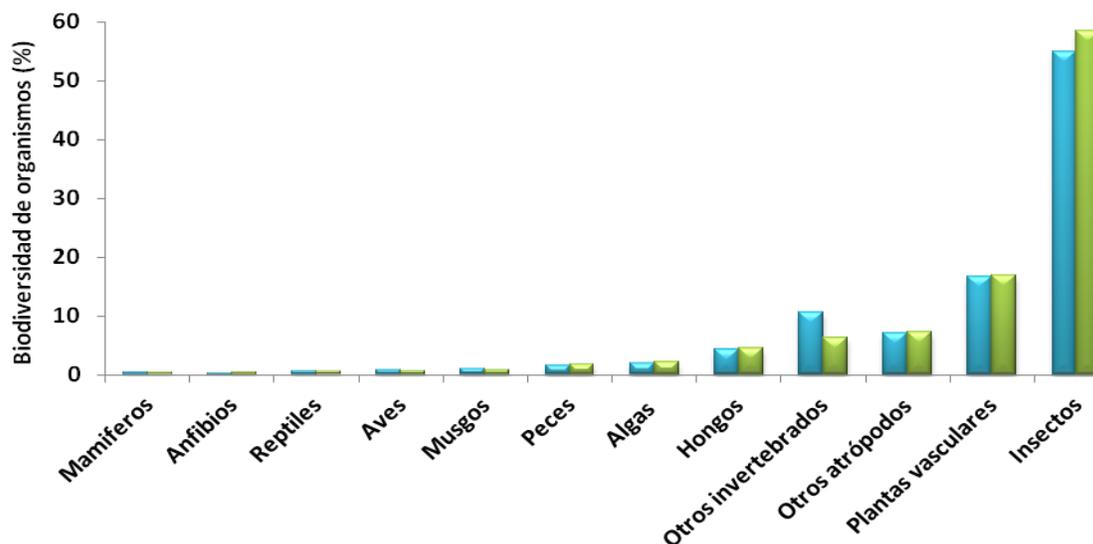


Figura 2. Biodiversidad de organismo en México y el mundo (barras azules = biodiversidad en México y barras verdes = biodiversidad en el mundo). http://era-mx.org/accion/UZACHI_plestr/PanoramaSector_forestal. Modificado por Hugo Gasca Navarro.

2.4. Termita de madera seca

Las termitas son insectos pálidos, su principal fuente de alimento es la celulosa, ocasiona daños en productos maderables, papel y algodón. Hay aproximadamente 2,000 especies de termitas en el mundo, de la cual una pequeña parte es considerada como problema de plaga **(CTT 2008)**.

Las termitas se clasifican en tres categorías:

Termitas de maderas húmedas: atacan la madera en procesos de pudrición. La eliminación de la fuente de humedad que causa la pudrición es un control adecuado.

Termitas subterráneas: requieren de un ambiente húmedo para desarrollarse en suelo natural. Aún cuando la colonia principal se encuentra en el suelo, es posible encontrar nidos satélites en construcciones. Las termitas subterráneas construyen túneles de protección (barro, fibra de madera y saliva) que les permite pasar del suelo a construcciones.

Termitas de madera seca: no requieren de una fuente importante de humedad. Este tipo de termita puede volar a construcciones y establecer colonias en madera seca. Las termitas de madera seca se controlan mediante el uso de madera preservada y se erradican mediante fumigación o tratamiento con calor **(CTT 2008)**.

2.4.1. Especie del Género *Incisitermes* en México

Los termes son insectos poco estudiados con 540 especies, 63 de ellas presentes en México **(Canello y Myles 2000)**. *Incisitermes* tiene gran importancia en zonas templadas de México, afectan construcciones de madera (puertas, postes, marcos, muebles, libros, etc.) lo cual reduce la vida de la madera.

En México su distribución abarca Chiapas, Colima, Distrito Federal, Estado de México, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Tlaxcala y Veracruz en el cuadro 3 se muestra la clasificación de la especie *Incisitermes* en México (**Cibrián et al., 1995**).

Cuadro 3. Clasificación de especies *Incisitermes* en México (**Cibrián et al., 1995**).

<i>Incisitermes arizonensis</i> (Snyder)
<i>Incisitermes banksi</i> (Snyder)
<i>Incisitermes emersoni</i> (Light)
<i>Incisitermes immigrans</i> (Snyder)
<i>Incisitermes marginipennis</i> (Latreille)
<i>Incisitermes milleri</i> (Emerson)
<i>Incisitermes minor</i> (Hagen)
<i>Incisitermes nigrinus</i> (Snyder)
<i>Incisitermes platycephalus</i> (Light)
<i>Incisitermes schwarsi</i> (Banks)
<i>Incisitermes seeversi</i> (Snyder y Emerson)
<i>Incisitermes snyderi</i> (Light)

2.4.2. Ciclo de la termita

Hay tres tipos de castas: reproductores, soldados y ninfas. La casta de los reproductores vuela a principios de verano y establecen en la madera una cámara donde depositaran los huevos. Los reproductores alados son color café a café-rojizo (9 a 11 mm de longitud, excluyendo las alas), la cabeza tiene color amarillento y alargada, cuentan con antenas divididas en 18 segmentos y se encargan de la reproducción de la colonia.

Los soldados se encuentran entre los más grandes en México con una longitud de 19 mm, hay dos tipos de soldados, los de cabeza pequeña (2.5 mm) y cabeza grande (3.3 mm), se encargan de la protección de la colonia. Los reproductores y soldados no pueden comer por si solos ocupan de la ayuda de la ninfa. Las ninfas son de color blanco-cremoso de 8 mm de longitud, a diferencia de las otras castas su función dentro en la colonia es construir la galería o el hábitat dentro de la madera. Los huevos tiene forma ovoide de 1.7 mm de largo por 0.6 mm de ancho de color blanquecido. Los árboles muertos es una opción para formar una nueva colonia, se guían por el olor que transmite el árbol muerto. Las termitas se juntan en parejas y dependen de sus alas para poder plagar el árbol, cada pareja formará una nueva colonia, donde los reproductores cavan una galería y culminara su reproducción hasta la obtención de los huevos para la nueva generación de termitas y formación de la colonia. La colonia crece lentamente, el soldado empezará a diferenciarse del resto de la colonia para la protección de los reproductores y la colonia. La diferenciación de castas es a través de feromonas que emiten los reproductores entre soldados o ninfas dependiendo de la necesidad en la colonia. La digestión de la celulosa en la termita es mediante la ayuda de protozoarios, bacterias y hongos que se encuentran presentes en el intestino de la termita, esto los ayuda a la supervivencia de la colonia. La colonia de termitas se puede evitar con algunas recomendaciones: destrucción total del árbol o usar un preservador de madera (sales hidrosolubles), aplicación de pintura o barniz sobre la madera, lo cual reduce la infestación (**Cibrián et al., 1995**).

2.5. Preservadores de la madera

La madera es un material de origen vegetal, siempre está expuesto al ataque de insectos, hongos y bacterias. La impregnación de un compuesto tóxico evita el deterioro de la madera, esto es por la inhibición del desarrollo del organismo. Los más usados son las sales de Cobre, Cromo y Arsénico (CCA), se comercializan en altas concentraciones y tiene aspecto gelatinoso.

Para preservar la madera se puede modificar su composición química, haciéndola no agradable o apetecible a organismos biológicos (**Novoa 2006 y Cruz 2007-2011**). Otra opción es hacer la madera repelente o venenosa con químicos contra agentes biológicos, aplicación de feromonas sintéticas o cebos para controlar o eliminar agentes principalmente insectos (**Reyes et al., 1995; Rayner y Boddy 1988**). Para que un compuesto se considere preservador de madera es importante tener en cuenta si repele o mata los agentes biológicos que afectan la madera para su desarrollo en dosis mínima del producto químico activo para erradicarlo (<http://maderapreservacion.blogspot.mx/2010/05/sustancias-preservantes>).

2.6. Tiofenos

El tiofeno (C_4H_4S) es un compuesto heterocíclico, consta de un anillo plano de cinco miembros, aromático y comportamiento similar al del benceno (**Howard et al., 1949**). La polarizabilidad de los átomos de azufre en los anillo del tiofeno conduce a una estabilización de cadenas conjugadas. Sin embargo, los tiofenos no son estables en algunas condiciones tales como la radiación ultravioleta y en presencia de agentes oxidantes debido a su fuerte sistema conjugado (**Koopmans et al., 1995**). El núcleo del tiofeno (figura 3) se ha establecido como un compuesto potencial en la química en gran medida debido a que posee características farmacológicas prometedoras. El conocimiento de las propiedades fisicoquímicas, químicas y biológicas de estos compuestos atrae la atención de los investigadores con el objetivo de producir una base de datos combinatoria y llevar a cabo una búsqueda de moléculas biológicamente activas.

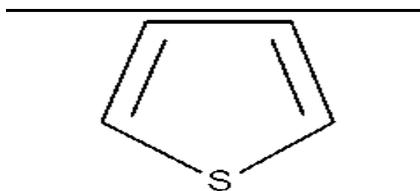


Figura 3. Estructura base de un tiofeno

Los tiofenos tienen usos farmacéuticos e industriales, es un producto natural que presenta un potencial foto-quimioterapéutico de infecciones virales, cáncer y contra las larvas de los mosquitos *Aedes aegypti*, *Anopheles* y *Culex* (Sharma y Goel 1994). Los derivados de los tiofenos están ampliamente distribuidos en la familia Asteraceae, sin embargo, no existe información sobre sus funciones fisiológicas en plantas y poco se conoce su metabolismo (Siitfeld 1982).

Fokialakis *et al.*, (2006) aislaron ocho tiofenos: 2,2':5',2''- tertiofeno, 4-[5-(penta-1,3-diinil)tien-2-il]but-3-inil, 4-[5-(penta-1,3-diinil)tien-2-il]-2-clorobut-3-inil acetato, 5'-(3-buten-1-inil)-2,2'-bitiofeno, 4-(2,2'-ditien-5'-il)-2-acetoxi but-3-inil acetato, 4-(2,2'-ditien-5'-il)but-3-inil alcohol, (2,2'-ditien-5'-il)but-3-inil isovalerato e isocardopatina y α -tertienilo de cuatro especies de *Echinops* (*E. ritro*, *E. spinosissimus*, *E. albicaulis* y *E. transiliensis*) y evaluaron su actividad contra la termita subterránea *Coptotermes formosanus* presentando a su vez efecto disuasivo. Posteriormente Mejía Barjas 2012 purificó dos tiofenos (5-(but-3-en-1-inil)-5'-metil-2,2'-bitiofeno; 5-(4-acetoxi-1-butinil)-2,2'-bitiofeno) con actividad citotóxica contra la *Artemia salina* y línea celular (DU 145 (HTB-81), Hep-G2 (HB-8065)).

El α -tertienilo, un derivado de los tiofenos se encuentra de forma abundante en las raíces de *Tagetes* sp., este compuesto es activado por la luz ultravioleta y es tóxico para numerosas especies de insectos generando radicales de oxígeno e inhibiendo enzimas *in vitro* como *in vivo*, además posee propiedades plaguicidas al actuar de manera rápida con características de degradación que hacen su uso seguro para el medio ambiente (Nivsarkar *et al.*, 2001).

Se ha demostrado que el α -tertienilo posee actividades como antibiótico (Ciofalo *et al.*, 1996), anti-HIV (Hudson *et al.*, 1993) y como un inhibidor de la proteína cinasa C (Kim *et al.*, 1998).

2.7. Asteraceae en México

El nombre del género *Aster* proviene del término latino “aster” que significa “estrella” y se refiere a la forma de las inflorescencias (**Freire 2004**). La mayoría proporciona néctar y polen al insecto. Su distribución se encuentra en las regiones semiáridas, tropicales y subtropicales. La familia Asteraceae cuenta con alrededor de 20,000 especies entre árboles, arbustos, subarbustos y plantas herbáceas. Gran importancia económica tiene en malezas (*Bidens*, *Cirsium*, *Hypochaeris*, *Sonchus*), plantas medicinales (*Matricaria chamomilla*, *Artemisia absinthium*, *Tussilago farfara*), plantas ornamentales (*Aster*, *Bellis*, *Cosmos*, *Chrysanthemum*, *Gazania*, *Gerbera*), plantas oleaginosa (*Carthamus tinctorius*, *Helianthus annuus*) y plantas hortícolas (**Heywood 1985 y Freire 2004**).

Sus características son:

- Hojas: Generalmente lobadas o dentadas, pueden ser alternas u opuestas (por ejemplo *Baccharis genistelloides*).
- Flores: Formada por muchas o pocas flores y raramente conformado por una sola flor. Pueden ser todas las flores iguales, perfectas, estaminadas o pistilada (homógamos), las flores centrales son perfectas y las periféricas pistiladas o estériles (heterógamos).
- Porte: Plantas herbáceas, excepcionalmente arbóreas, erectas, trepadoras o rastreras. Algunas plantas pueden producir sustancias aromáticas (*Tagetes pusilla*, *anís*), otras producen material de reserva como carbohidratos (*Smallanthus sonchifolius*, *jicama*).
- Perianto: Sépalos en forma de pelos, escamas que conforman el “papus” el cual es para la dispersión del fruto.
- Androceo: Cinco estambre unidos por las enteras, el cual forman un tubo donde corre el estilo.

Las flores son ligadas color amarillo, sus láminas flaveladas de 3 a 6 mm de largo y las corolas de color amarillo de 4 a 6 mm, los frutos y semillas de forma claviformes de 5 a 8 mm de largo de color negruzco, vilanos de 2 escamas aristiformes de 3 a 5 mm de largo **(Martínez y Cáceres 2002)**.

En la antigüedad los aztecas usaron la planta *T. lucida* con fines medicinales como té a partir de una infusión de la hierba fresca. Es recomendada para la diarrea, disentería, empacho, vómito, dolor de riñón, dolor de muela, reumatismo, asma, fiebre tifoidea, várices, cólicos menstruales, resfriado, insecticida y alucinógeno **(Gupta 1995; Cáceres 1996; Linares et al., 1999; Márquez et al., 1999)**. *T. lucida* está distribuida en México, Guatemala y Honduras, su habitat es en climas cálidos, semicálidos, seco, semiseco y templado, entre 8 y 850 metros sobre el nivel del mar y los 1000 hasta los 4000 msnm. Es nativa de México y se encuentra distribuida en los Estados de: Aguascalientes, Chiapas, Coahuila, Colima, Distrito Federal, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas **(Rzedowski y Rzedowski 2001, Villarreal 2003)**.

En su fitoquímica se han reportado la presencia de cumarinas, lactonas, terpenos, bitiofenos y flavonoides (glicósidos de quercetina, quercetagrítin, tagenona, tagetina y camferol). En México es conocida como: *Tagetes florida Sweet*, Anisillo, atagote, cedrón, flor de xuchitl, hierbanís, hierba anís, hierba de nubes, hierba de San Juan, hierba santa, periquillo, rincón, Santa María, Santa María de jardín, tatalencho, yerbanís. Chiapas: k'anal nich wamal, k'ixin vomol, perikon vomol, tzitz ak, tzitz pox, tzitz vomol, tzitzilal **(www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx)**.

3. Justificación

Michoacán cuenta con una gran diversidad de vegetación, entre ellas encontramos las especies del género *Tagetes*, ya que presentan antecedentes con usos farmacológicos. En *Tagetes lucida* se han realizado estudios fitoquímicos y se encontraron cumarinas, lactonas, terpenos, flavonoides y tiofenos, algunos con actividad biológica. Por lo que ésta especie puede ser considerada para la búsqueda de metabolitos secundarios que prolonguen el tiempo de uso en la madera y evitar el deterioro causado por la termita de madera seca *I. marginipennis*.

4. Hipótesis

T. lucida contiene metabolitos secundarios con efecto disuasivo contra la termita de madera seca *I. marginipennis*.

5. Objetivo General

Estudiar los metabolitos secundarios con efecto disuasivo contra la termita de madera seca *I. marginipennis*.

5.1. Objetivos Particulares

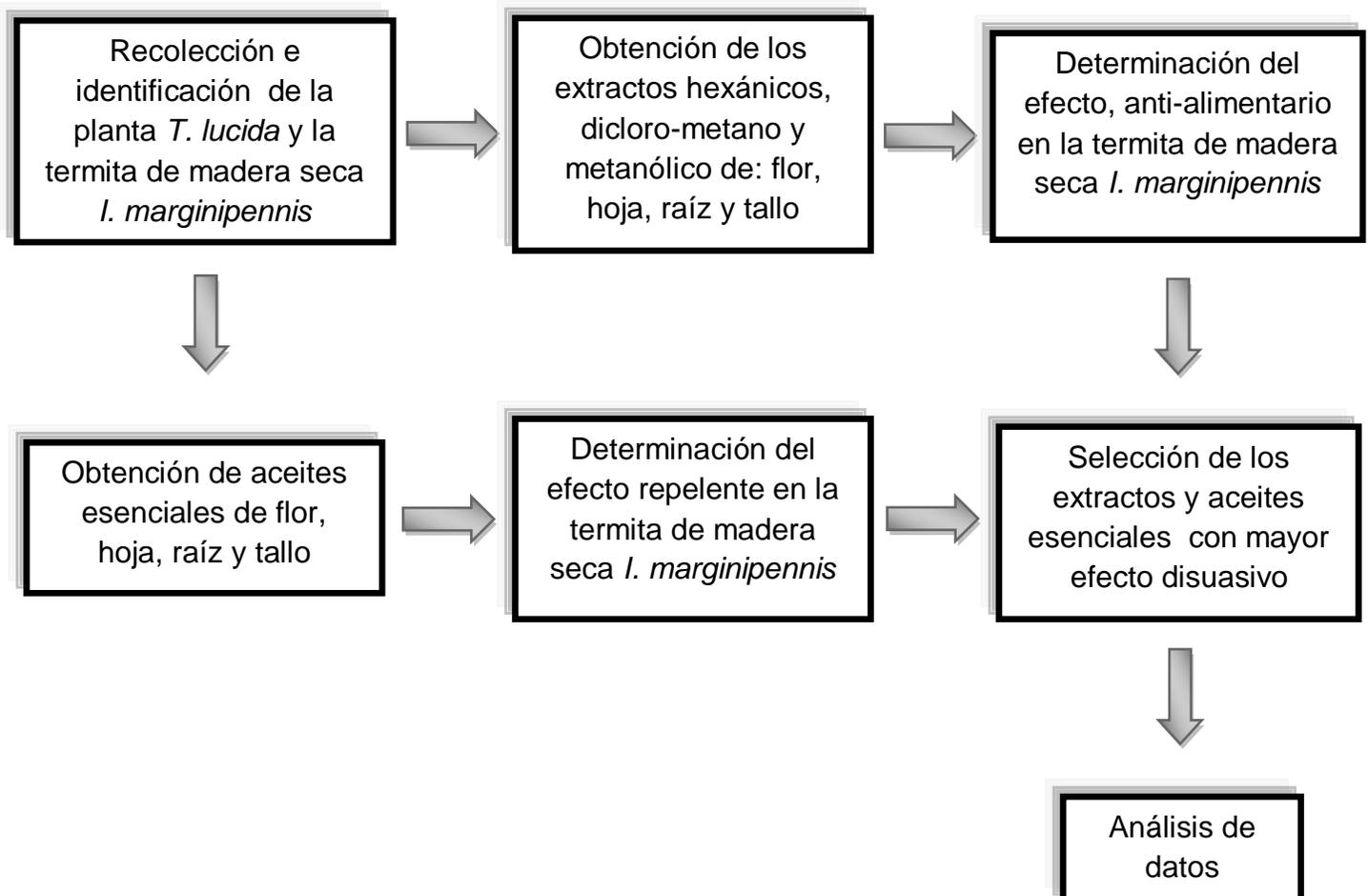
Determinar la actividad anti-alimentaria de los extractos de *T. lucida* en la termita de madera seca *I. marginipennis*.

Evaluar el efecto repelente de los aceites esenciales de *T. lucida* contra la termita de madera seca *I. marginipennis*.

Evaluar el efecto inhibitorio de los bitiofenos en las cepas aisladas del tracto digestivo de la termita de madera seca *I. marginipennis*.

6. Materiales y Métodos

6.1. Estrategia Experimental



6.2. Organismo

6.2.1. Colecta de la termita de madera seca *Incisitermes marginipennis*

Las termitas fueron extraídas de maderas en las localidades de:



Uruapan: Latitud 19°22'18" Norte
Longitud 102°03'19" Oeste
Huandacareo: Latitud 19°59'22"
Norte Longitud 101°16'31" Oeste
Morelia: Latitud 19°42'16" Norte
Longitud 101°11'30" Oeste
Maravatio: Latitud 19°57'12" Norte
Longitud 100°27'10" Oeste

Figura 5. Colonia de termitas de madera seca *I. marginipennis*

Se identificó la termita con las claves **Krishna (1961)**, se aclimataron las termitas en condiciones de oscuridad a una temperatura de 25 °C de 24 a 48 h antes de su utilización de cada experimento.

6.3. Material vegetal

6.3.1. Colecta de la planta *Tagetes Lucida*

La planta *T. lucida* fue colectada en el kilómetro 3.5 de la carretera Tiripetío-Acuitzio del Canje, Michoacán a una altitud de 2045 msnm con coordenadas: N 19°30.916' y W 101°20.634' en Noviembre del 2011.



Figura 6. Muestras de órganos secos de *T. lucida* para la obtención de extractos. a) Flores. b) Hojas. c) Raíz. d) Tallo.

Una vez colectadas las plantas se separaron en sus diferentes órganos: flor, hoja, raíz y tallo fueron secados a la sombra (Figura 6). Los extractos se obtuvieron por maceración sucesiva y los aceites esenciales por hidrodestilación de cada órgano de la planta.

6.4. Obtención de los extractos de *Tagetes Lucida*

6.4.1. Maceración sucesiva con disolventes de polaridad ascendentes

La maceración es un proceso de extracción sólido-líquido. El producto sólido (materia prima) posee compuestos solubles en el líquido los cuales se pretenden extraer. Para la obtención de los extractos de cada órgano de *T. Lucida* se realizó una maceración sucesiva en polaridad ascendentes con hexano, cloruro de metileno y metanol de acuerdo a cada órgano de la planta: flor (130g), hoja (125 g), raíz (230g) y tallo (340 g). En la primera etapa cada órgano de la planta se colocó en un frasco de vidrio dejándose reposar con hexano durante tres días a temperatura ambiente protegiéndolo de la luz, posteriormente se concentró en un rotavapor (BUCHI R-114, B-480) a 55°C, el disolvente obtenido (hexano) se vertió nuevamente en la misma muestra y se dejó macerar por tres días, repitiéndose el proceso hasta agotar componentes. Se obtuvo un extracto no polar (extracto hexánico). Los extractos hexánicos fueron desengrasados mediante precipitación con metanol, filtrados y concentrados en un rotavapor.

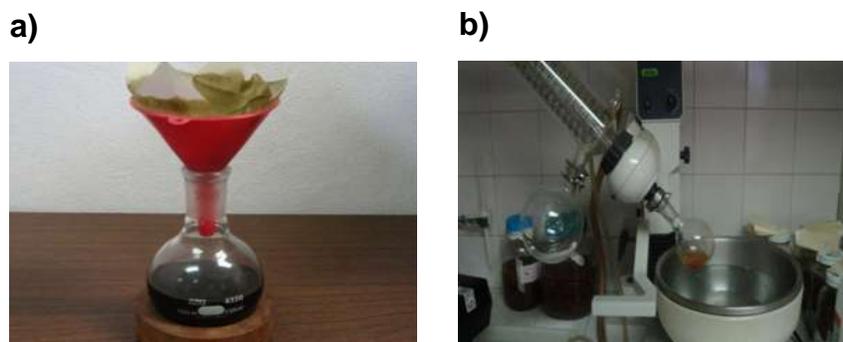


Figura 7. Imágenes del proceso de extracción de los extractos de *T. lucida*. a) Filtrado del extracto. b) Concentrado del extracto.

Una vez concluida la extracción con hexano, se continuó con la segunda etapa de extracción, se eliminó el hexano y el residuo restante en la muestra se dejó airear por 24 h hasta evaporar el disolvente. Transcurrido el tiempo se adicionó el disolvente de polaridad intermedia cloruro de metileno y se dejó reposar por tres días a temperatura ambiente protegiéndolo de la luz. Se concentró en un rotavapor a 35 °C y el disolvente obtenido se vertió con la misma muestra; repitiendo este procedimiento hasta agotar componentes (polaridad intermedia) obteniéndose un extracto cloruro metilénico.

Finalmente en la tercera etapa de extracción se adicionó metanol como último disolvente, se desarrolló un proceso de extracción similar a las etapas anteriores para la obtención de extractos metanólicos el cual se concentró en un rotavapor a 65 °C. Los extractos obtenidos por maceración fraccionada se utilizaron para los análisis químico y biológico.

6.5. Obtención de aceites esenciales de *T. lucida* por el método de hidrodestilación

Se realizó una hidrodestilación de cada órgano de la planta: flor (340 g), hoja (170 g), raíz (440 g) y tallo (355 g), en este caso se trabajó con la muestra fresca. La planta *T. lucida* se colocó en un matraz balón de 5 L, posteriormente en otro matraz balón se adicionó 3 L de agua destilada para someterlo a ebullición y generar vapor de agua. El vapor generado pasará al segundo matraz para arrastrar los componentes volátiles de la muestra, se condensaran en un tubo refrigerante para la obtención de hidrodestilado durante cuatro horas a partir de la primera gota. Ya obtenido el hidrodestilado de cada órgano, se separó la fase orgánica de la fase acuosa utilizando cloruro de metileno 1:1 v/v en un embudo de separación de 500 mL y concentrado en un rotavapor a 35°C para obtener cada uno de los aceites esenciales, los cuales fueron analizados por cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC/MS). Para eliminar los residuos de agua se filtró con sulfato de sodio anhidro.



Figura 8. Obtención de los aceites esenciales por hidrodestilación

6.6. Análisis químico de *T. lucida*

6.6.1. Cromatografía de Gases-Masas (GC/MS)

Los análisis químicos de los compuestos volátiles de los extractos de *T. lucida* se obtuvieron en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard modelo 5890 Serie II plus. El método utilizado fue MSA, con una temperatura inicial del horno cromatográfico de 50 °C durante cinco minutos, posteriormente cada minuto subió 20 °C hasta llegar a 200 °C permaneciendo cinco minutos, de igual manera cada minuto se incrementó la temperatura por 20 °C, hasta llegar a 250 °C permaneciendo durante 10 min, el tiempo total de corrida fue de 30 min. La temperatura del inyector y de la interface fue de 240 °C y 260 °C, respectivamente. Como fase móvil se usó un gas acarreador (Helio) y una columna no polar Hp-5 MS, como la fase estacionaria (5-fenil)-metilpolisiloxano, con 30 m de longitud, diámetro interno de 0.25 mm y la capa de la fase estacionaria de 0.25 µm y el banco de datos para la comparación de las señales fue NIST, 2000.

6.7. Ensayos biológicos

6.7.1. Efecto repelente de los aceites esenciales de *T. lucida* en la termita de madera seca *I. marginipennis*

A un disco de papel filtro No. 3 de 8.5 cm de diámetro se adicionaron 30 µL de los aceites esenciales (flor, hoja, raíz y tallo), en la periferia del papel a la concentración de 10 mg/mL disueltos en etanol absoluto, se utilizó como control positivo (sales de Boro), un insecticida comercial (citronelol 23.5 mg/mL) y un control negativo etanol absoluto.

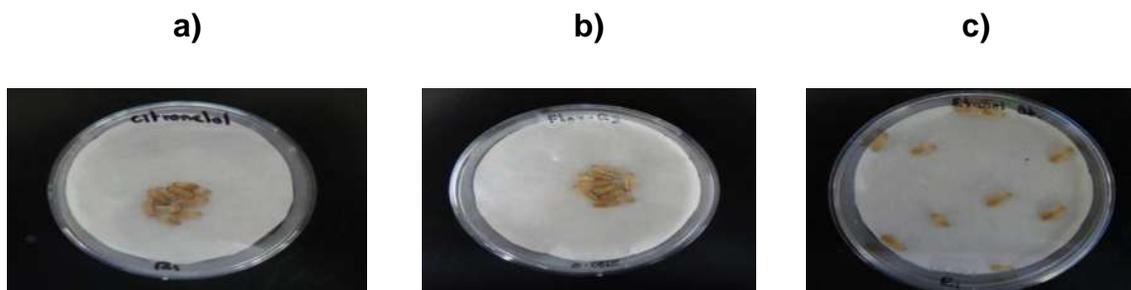


Figura 9. Efecto repelente de los aceites esenciales de *T. lucida* en termitas *I. marginipennis*. a) control positivo (citronelol). b) aceite esencial. c) etanol absoluto.

Se colocaron diez termitas ninfas en una caja con cada uno de los tratamientos (n=3), almacenándolas en oscuridad en la caja, posteriormente se contaron termitas en el centro y en la periferia cada 10 min durante diez tiempos, seleccionando así los aceites con mayor efecto repelente. Los aceites esenciales seleccionados fueron aquellos presentaron más del 50 % del efecto repelencia.

6.7.2. Efecto anti-alimentario de los extractos de *T. lucida* y componentes puros en la termita de madera seca *I. marginipennis*

6.7.2.1. Alimentación forzada

Discos de madera de *Pinus* sp de 8.5 cm de diámetro, se impregnaron por inmersión con cada uno de los extractos de *T. lucida* (disueltos en etanol 96 %) a la concentración de 10 mg/mL y se colocaron en caja de petri; posteriormente se coloraron 10 termitas para cada extracto. Se utilizó un control positivo el cual fue las sales de Boro [7 kg de bórax (tetraborato disódico), 5 kg de ácido bórico en 100 L (120 g/L)], las cuales son sales hidrosolubles utilizados como preservador de madera. De igual forma se utilizó un control negativo (disco de madera sin tratamiento), cada experimento fue realizado por triplicado y almacenado en oscuridad, dejándose de tres a cuatro semanas dependiendo del nivel de deterioro del disco control (sin tratamiento).

6.7.2.2. Selección de alimento

Se cortaron discos de madera de *Pinus* sp de 8.5 cm de diámetro, los cuales fueron cortados en tres partes (con un ángulo de 120° cada sección del disco), la primera parte se impregnó con el extracto de *T. lucida* a una concentración de 10 mg/mL, la segunda parte con las sales de Boro y en la tercera parte un control negativo (madera sin tratamiento). Se colocaron 10 termitas en cada caja para después almacenarse en oscuridad de tres a cuatro semanas. El experimento se realizó por triplicado.

6.7.2.3. Determinación de los coeficientes anti-alimentarios total de los extractos de *T. lucida*

El experimento del efecto anti-alimentario se llevó a cabo en dos condiciones; alimentación forzada y selección de alimento y los datos obtenidos se procesaron mediante la formulas reportadas por **Daniewski et al., 1995**. Los datos utilizados provienen de medias por ANOVA, los tratamientos fueron realizados por triplicado, se realizó un ANOVA con prueba de comparación de medias Tukey ($\alpha=0.05$) en un programa estadístico conocido como estadística versión 7.0.

$$\underline{[(KK-EE)/(KK+EE)] 100= A\% \text{ (alimentación forzada).}$$

Donde A= coeficiente anti-alimentario, KK= pérdida de peso en el control y
EE= pérdida de peso en el tratado.

$$\underline{[(K-E)/(K+E)] 100= R\% \text{ (selección de alimento).}$$

Donde R= coeficiente anti-alimentario, K= pérdida de peso en el control y
E= pérdida de peso en el tratado.

Una vez obtenidos los coeficientes de alimentación forzada y selección de alimento se obtuvieron los coeficientes anti-alimentario total a partir de la suma de las dos observaciones y se clasificara de acuerdo a **Daniewski et al., 1995**. Preferencia alimenticia ($T \leq 0$), Clase I ($0 \leq T < 50$), Clase II ($50 \leq T < 100$), Clase III ($100 \leq T < 150$) y Clase IV ($150 \leq T < 200$).

6.7.3. Preparación de los Bitiofenos

Los bitiofenos (2,3-bitiofeno, 3,3-dibromo 2,2-bitiofeno, 5,5-diiodo 2,2-bitiofeno y 2,2-bitiofeno 5-carboxaldehido) fueron preparados a la concentración de 1 mg/mL, fueron disueltos en cloruro de metileno, posteriormente se realizaron diluciones 1:10 hasta obtener concentraciones de 0.1, 0.01, 0.001 y 0.0001 mg/mL. Se envolvieron con papel aluminio para proteger de la luz cada uno de los Bitiofenos.

6.7.4. Aislamiento de la microbiota de la termita de madera seca *I. marginipennis*

6.7.4.1. Aislamiento e identificación de los microorganismos

Se seleccionaron 13 termitas ninfas al azar, se les realizó una asepsia con solución salina y agua tridestilada estéril de los individuos seleccionados, con jeringa de insulina se introdujo a través del pronoto en la parte posterior de la cabeza hasta el intestino y se extrajo el consorcio intestinal, el cual fue resuspendido en caldos nutritivos y caldo celulosa; teniendo esta última como fuente de carbono carboximetilcelulosa (10 g/L) e incubadas a 36°C por 24 h de los microorganismos que se desarrollaron en los caldos (Nutritivo y CC) se realizó un estriado por agotamiento para su purificación e identificación. Los medios de cultivos como Mueller Hinton (MH), Sabouraud (Sb) y Agar celulosa termita (ACT) se utilizaron dejándose incubar durante 24 h/36°C. Una vez observados crecimientos en los primocultivos se realizaron selección de morfologías coloniales y se realizaron sub-cultivos, los cuales fueron incubados a 24 h/36 °C.

De los sub-cultivos aislados se realizó una tinción de Gram para observar la morfología, agrupación, afinidad tintorial y pureza de la colonia elegida. Mediante la observación al microscopio óptico a 100x en un promedio de 10 campos observados se ratificaron los resultados.

Cuadro 4. Bacterias microaerofílicas

No.	Clave	Morfología Macroscópica	Morfología Microscópica	Observación
I	T ₂ C ₁ EMB			Bacilos cortos Gram +
II	T ₂ C ₁ SB			Bacilos cortos Gram +
III	T ₄ C ₂ SB			Cocos Gram -

Cuadro 5. Bacterias aerobias

No.	Clave	Morfología Macroscópica	Morfología Microscópica	Observaciones
I	T ₁ C ₂ ACT			Cocos Gram +
II	T ₁ C ₂ MH			Bacilos cortos Gram -
III	T ₁ C ₂ SB	ND		Cocos Gram +
IV	T ₂ C ₂ MH			Cocos Gram +
V	T ₂ C ₂ SB			Cocobacilos Gram +
VI	T ₂ C ₂ MH			Cocos Gram +
VII	T ₄ C ₂ MH			Cocos Gram +

6.7.5. Preparación de los bitiofenos con dimetil-sulfóxido (DMSO) para la evaluación del efecto bactericida

Se pesaron 30 mg de cada Bitiofeno (2,3-bitiofeno, 2,2-bitiofeno 5-carboxaldehído, 3,3-dibromo 2,3-bitiofeno y 5,5-diiodo 2,2-bitiofeno), posteriormente se disolvieron en 300 µl de dimetil-sulfóxido al 95% [950 µl (DMSO) hasta aforar a 1 mL con agua des-ionizada] para obtener una concentración de 100 mg/mL, tomar una

alícuota de 30 μL de mi primera concentración y adicionarle 270 μL de dimetil-sulfóxido (concentración 10 mg/mL), se tomó la misma cantidad para la segunda concentración (30 μL en 270 μL DMSO) y obtener una concentración de 1 mg/mL. Para la preparación de la Cefotaxima se adicionaron 4 mL de agua des-ionizada a la Cefotaxima y se agitó hasta disolverse por completo para tomar 100 μL y se adicionó 100 μL de agua des-ionizada en un vial, para obtener una concentración de 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

6.7.5.1. Evaluación del efecto inhibitor de los bitiofenos en las bacterias aisladas de la microbiota de la termita *I. marginipennis*

De las bacterias aisladas y purificadas del intestino de la termita, se tomó una aza bacteriológica para resembrar en caldo Miller Hilton y se incubó en un tiempo de 2 h hasta observar turbidez. Posteriormente se resembró en agar Miller Hilton y se le colocaron 5 discos de papel filtro N° 3 con un diámetro de 6 mm, se adicionó 80 μL de los bitiofenos a las concentraciones de 100, 10 y 1 mg/mL un control positivo (Cefotaxima) y DMSO como se muestra en la figura 10.

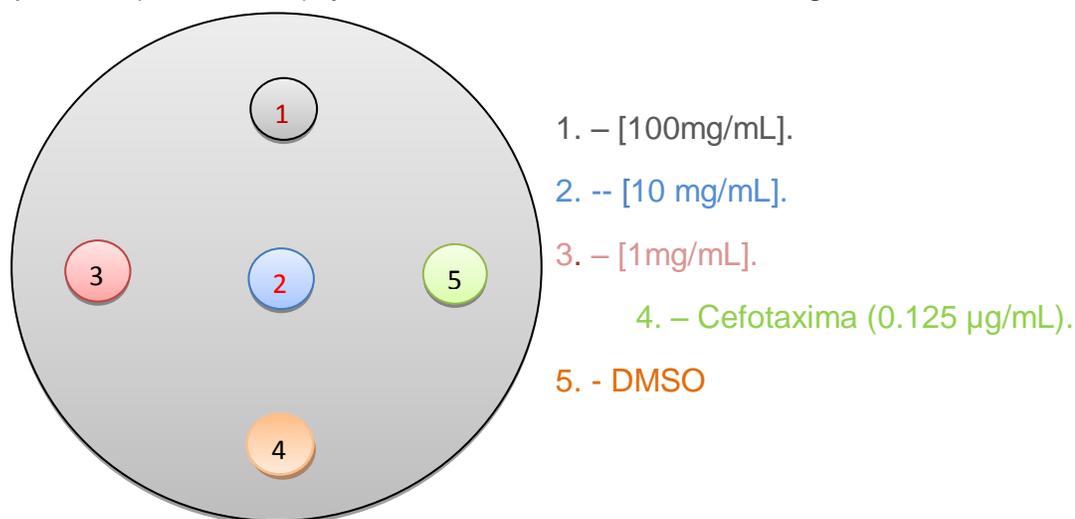


Figura 10. Aplicación de los bitiofenos 100-1 mg/mL, el control positivo Cefotaxima (0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y DMSO (control negativo).

7. Conclusión

T. lucida presenta metabolitos secundarios con efecto repelente y anti-alimentario contra la termita de madera seca *I. marginipennis*.

8. Bibliografía

1. Albert L. A. 2007. "Panorama de los plaguicidas en México". 7° Congreso de Actualización en Toxicología Clínica. Xalapa Veracruz. Pág. 359-378
2. Brady N. C. y Weil R. R. 1996. Soils and chemical pollution. Chapter 18 of book *The Nature and Properties of Soils*. Prentiss Hall Intl.
3. Briggs S. A. y Carson C. R. 1992. *Basic guide to pesticides. Their characteristics and hazards*. Washington: Taylor & Francis.
4. Cáceres A. 1996. Plantas de uso medicinal en Guatemala. Guatemala: Editora Universitaria.; p. 305-7.
5. Canello E. y Myles T. G. 2000. Isóptera. Biodiversidad, Taxonomía y Biogeografía de Artrópodos de México: Hacia una Síntesis de su Conocimiento. En: Llorente J., González B. E. y Papavero N. Volumen 2. Pág. 295-315.
6. Carter F. L. y Beal. R. H. 1982. Termite responses to susceptible pine wood treated with antitermitic wood extracts. *The International Journal of Wood Preservation* 2:185-191.
7. Centro de transferencia tecnologica de la madera (CTT) corporacion chilena de la madera. 2008. Control de termitas.
8. Cibrián T. D., Campos M. R., Yates O. H. y Flores L. J. 1995. Insectos forestales de México/forest insects of México. Universidad Autónoma Chapingo y Comisión Forestal de América del Norte. Publicación No. 6 Chapingo, Texcoco, México. p 453.
9. Ciofalo M., Petruso S. y Schillaci D. 1996. Quantitative assay of photoinduced antibiotic activities of naturally-occurring 2,2':5',2''-terthiophenes. *Planta Medica*. 62: 374-375.
10. Cortés N. H. 2011. Ventajas y Desventajas de los insecticidas químicos y naturales. Licenciatura en Ingeniera Ambiental. Universidad Veracruzana Facultad de Ciencias Químicas. Poza Rica de Hidalgo Veracruz.

11. Cruz L. J. 2007-2011. Manual para la protección contra el deterioro de la madera. Comisión Nacional Forestal. Fitecma. Umich. Morelia Mich.
12. Daniewski W. M., Gumulka M., Przesmycka D., Ptaszynska K., Bloszyk E., Drozd B. (1995) Sesquiterpenes of *Lactarius* origin, antifeedant structure-activity relationships. *Phytochemistry* 38:
13. Ebeling W. 1968. Termites. Identification, biology and control of termites attacking buildings. University of California, Division of Agricultural Sciences. Manual 38. EUA.
14. Findlay W. K. 1985. The nature and durability of wood. In: Findlay, W. K. (Ed.). *Preservation timber in the tropics*. Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publishers. The Netherlands. pp. 1-13.
15. Fokialakis N., Weste L. A., Osbrink L. K., Nadejda G., Amelia B., Alexios L., Skaltsounis A. R. y Charles L. C. 2006. Antifeedant and toxicity effects of thiophenes from four *Echinops* species against the Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus*. *Pest Manag Science* 62: 832-838.
16. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 1986. *International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides*. Roma: FAO; 28.
17. Freire F. A. 2004. *Botánica Sistemática Ecuatoriana*. Missouri Botanical Garden, FUNDACYT, QCNE, RLB y FUNBOTANICA. Murray Print, St. Louis, Missouri. 122-123p.
18. González P. 2004. *Riesgos químicos por uso de plaguicidas en el medio ambiente*. Federación de Serveis i Administracions Públiques.
19. Gupta M. P. 1995. *270 Plantas Medicinales Iberoamericanas*. Santafé de Bogotá, Colombia: Editora Presencia Ltda.; p. 157-60.
20. Heywood V. H. 1985. *Las plantas con flores*. Ed. Reverté. España. Pág. 329
21. Honorato S., Jaspe A., Vásquez L., Zamudio F. 2001. Durabilidad natutra de la madera de cicno especies de *Quercus* del Estado de Puebla. *Polibotanica* 12:85-102

22. Howard D., Hartough Pitman, N. J. y Alvin I. Kosak. 1949. Acylation of thiophene. United States Patent Office, Patented 2,492,692.
23. Hudson J. B., Harris L., Teeple A. y Towers G. H. 1993. The anti-HIV activity of the phytochemical alpha-terthienyl. *Antiviral Research*. 20: 33-43.
24. Ibañez O. C., Montero C., Rabinovich M., Cecchetto. G y Cerdeiras P. 2012. Deterioro y Preservación de la madera. *Revista Digital Universitaria*.
25. Jacobson M. 1989. Botanical pesticides: past, present and future. Insecticides of plant origin. Arnason, J. T., Philogene B. J. R. y Morand P. ACS Symposium Series, 387. 1-10.
26. Kim D. S., Ashendal C. L., Zhou Q., Chang C. T., Lee E. S. y Chang C. J. 1998. *Bioorganic and Medical Chemistry Letters*. 8: 2695-2698.
27. Koopmans M. P., Damate J. S., Lewan M. D. y De Leeuw J. W. 1995. Thermal stability of thiophene biomarkers as studied by hydrous pyrolysis. *Organic Geochemistry*. 23: 583-596.
28. Krishna, K. 1961. A generic revision and phylogenetic study of the family Kalotermitidae (Isoptera). *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.*, 122: 303-408.
29. Linares E., Bye R. y Flores B. 1999. *Plantas Medicinales de México. Usos y remedios tradicionales*. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
30. López C. L. 1993. *Exposición a plaguicidas organofosforados. Perspectivas en Salud Pública No 18*. México: Instituto Nacional de Salud Pública.
31. Márquez A. C., Lara F. O., Esquivel B. R. y Mata R. E. 1999. *Plantas medicinales de México II. Composición, usos y actividad biológica*. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
32. Martínez J. V y Cáceres A. 2002. *Agrotecnología para el cultivo del pericón o hierba de San Juan. Fundamentos de Agrotecnología de Cultivo de Plantas Medicinales Iberoamericanas*. Santafé de Bogotá, Colombia: Convenio Andrés Bello y Programa Iberoamericano de Ciencia y

- Tecnología para el Desarrollo; En: Martínez JV, Yesid Bernal H, Cáceres A, editores Pág. 451-62.
33. Mejía B. J. 2012. Estudio citotóxico de las cumarinas y bitiofenos naturales y modificados de *Tagetes lucida* Cav. Maestría en Ciencias en Biología Experimental. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Pág. 63-76.
34. Molina D. *et al.*, 2009. “Resistencia metabólica a insecticidas organofosforados”. Revista del Instituto Nacional de Salud de Colombia. ISSN: 0120-4157. Pág. 605.
35. Nivsarkar M., Cheirian B. y Padh H. 2001. Alpha-terthienyl: A plant-derived new generation insecticide. *Current Science*, 81: 6-25.
36. Novoa R. L. A. 2006. Manual de buenas prácticas de manufactura para la preservación de madera aserrada; acorde a los estándares expresados en las propuestas de normas. Dirección nacional de desarrollo de comercio exterior vice ministerio de comercio exterior. Lima – Perú.
37. Organización Mundial de la Salud (OMS). 1993 Organización Panamericana de la Salud (OPS). División Salud y Ambiente. Plaguicidas y salud en las Américas, Washington: OMS/OPS.
38. Pérez N., Bárcenas P. y Echenique M. 1981. Prevención y control de daño por termitas en estructuras con madera. La madera y su uso en la construcción N1 7 INIREB LACITEMA, Xalapa.
39. Raya G. D. 2007. Las maderas secas de encino (*Quercus* spp.) y pino (*pinus* spp.) son protegidas del daño causado por *Lyctus* spp. e *Incisitermes marginipennis* (Latreille) con extractos vegetales acuosos. Doctorado en Ciencias en Biología Experimental. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Pág. 53-74
40. Rayner A. D. y Boddy L. 1988. Fungal decomposition of wood. Its biology and ecology. John Wiley and Sons.

41. Reyes R., Viveros. N. y Pérez. V. 1995. Resistencia Natural de trece maderas mexicanas al ataque de termitas subterráneas. *Madera y Bosques* 1(1): 39-43
42. Rzedowski G. C. y Rzedowski J. 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. 2a ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.
43. Sharma A. y Goel H. C. 1994. Some naturally occurring phytophoto-toxins for mosquito control. *Indian Journal Experimental Biology*. 32: 745-751.
44. Siitfeld R. 1982. Distribution of thiophene derivatives in different organs of *Tagetes patula* seedlings grown under various conditions. *Planta*. 156: 536-540.
45. Silva G., Lagunes A., Rodríguez J. C. y Rodríguez D. 2002. Insecticidas vegetales una Vieja-nueva alternativa en el control, de plagas. *Revista Manejo Integrado de plagas (CATIE)*.
46. Villarreal J. A. 2003. Compositae. Tribu Tagetae. Flora del Bajío. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. En: Rzedowski G. C. y Rzedowski J. Pátzcuaro, Michoacán, México.
47. Wesseling C. 1997. Health effects from pesticide use in Costa Rica. An epidemiologic approach. Kongl. Karolinska Medico Chirurgiska Institutet. Stockholm, Sweden.

Páginas de internet

48. http://era-mx.org/accion/UZACHI_plestr/PanoramaSector_forestal.
49. http://www.biodiversidad.gob.mx/genes/centrosOrigen/Tagetes/Informe_Fin_al/Anexo%20la.
50. <http://maderapreservacion.blogspot.mx/2010/05/sustancias-preservantes.html>
51. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&i d=8002>