

EFFECTO DISUASIVO DE UN EXTRACTO ACUOSO DE *Enterolobium cyclocarpum* (JACQ.) GRISEB.

David Raya-González¹, Mauro, Manuel Martínez-Pacheco², Rosa Elva Norma del Rio-Torres². ¹Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera, ²Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Santiago tapia No. 403. Morelia, Michoacán México. rayadavid@gmail.com. mpacheco@umich.mx

RESUMEN: Para determinar el efecto disuasivo del extracto acuoso de *Enterolobium cyclocarpum* se consideraron tanto el efecto antialimentario como el de repelencia. El extracto se clasificó como un antialimentario de Clase III en la escala de Ohmura, que se confirmó con la evaluación de la microbiota intestinal de las termitas en ayuno y alimentadas con el extracto acuoso en las cuales se observó similitud en la población de los simbioses; bacterias, espiroquetas y protozoarios. En el extracto de *E. cyclocarpum* se observó un efecto de repelencia de termitas comparado respecto del control (citronelol). Los componentes mayoritarios del extracto vegetal fueron el D-limoneno, el *p*-cimeno, butilato hidroxitolueno, α -terpineol, *p*-cimeno-8-ol, fenol-4-metil, 1-hexanol-2-etil, 2(3H)-furanona-5-etenildihidro-5-metil y fenol, donde los componentes mayoritarios del extracto vegetal pueden ser los responsables del efecto antialimentario y repelente observados. El propósito de este trabajo fue determinar el efecto disuasivo del extracto de *E. cyclocarpum* (Jacq.) Griseb sobre termitas de madera seca *Incisitermes marginipennis*.

Palabras clave: Extracto acuoso, *Enterolobium cyclocarpum*, disuasivo, repelente.

Dissuasive effect of the aqueous extract of *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Grieseb

ABSTRACT: To determine the deterrent effect of the aqueous extract of *Enterolobium cyclocarpum* considered the antifeedant effect as well as the repellency. The extract was classified as antialimentary Class III in the scale of Ohmura, which was confirmed with the assessment of the intestinal microbiota of termites in fasting and fed with aqueous extract in which similarities were observed in the population of the symbionts; bacteria, protozoa and spirochetes. In the extract of *E. cyclocarpum* was observed an effect of repellency termite compared regarding control (citronelol). The major components of the plant extract were: D-limonene, *p*-cymene, butylated hydroxytoluene, α -terpineol, *p*-cymene-8-ol, phenol-4-methyl, 1-hexanol-2-ethyl, 2(3H)-furanone-5-ethenyldihydro-5-methyl and phenol, where major components of the plant extract may be responsible for the observed antialimentary and repellent effect. The purpose of this research was to determine the deterrent effect of the extract of *E. cyclocarpum* (Jacq.) Griseb on termite wood dry *Incisitermes marginipennis*.

Key words: Aqueous extract, *Enterolobium cyclocarpum*, deterrent, repellent

Introducción

Se estima que anualmente, una tercera parte de la producción mundial de alimento y de productos almacenados es destruida por plagas resistentes que no han sido controladas por los plaguicidas convencionales, por lo que es imprescindible el estudio de nuevas alternativas de control de plagas (Bourguet 2000 y Waterhouse 1996). Las plantas producen metabolitos secundarios de bajo peso molecular no-esenciales para el proceso metabólico básico de la planta. Una estrategia química importante en la supervivencia de las plantas, que en los últimos años se ha reevaluado como una fuente inexplorada se refiere a los plaguicidas amigables y seguros para el medio ambiente y la salud humana (Mansaray 2000 y Ottaway 2001). Un ejemplo son las *piretrinas* obtenidas de las flores de *Chrysanthemum cinaerifolium*, de la Familia Compositae (piretro). Son seis ésteres con actividad insecticida, derivados de la piretrolona, la cinerolona, la jasmolona y de los ácidos crisantémico y pirétrico. Afectan al sistema nervioso central y al periférico, son bloqueadores del transporte de iones

de sodio que alteran la conductividad del ión en tránsito, inducen descargas eléctricas repetidas que al insecto le provocan convulsiones y la muerte. Poseen un marcado efecto irritante o "knock down", cuando el insecto entra en contacto con la superficie tratada con las piretrinas, le induce a que deje de alimentarse y repentinamente es aniquilado. Estos productos vegetales son ampliamente usados con éxito, son una primera estrategia de aniquilamiento del insecto plaga, pero que también mata a insectos benéficos. Otra estrategia en el control de insectos plaga son los productos naturales con propiedades irritantes y desagradables que inducen en el insecto la acción de disuasión para acercarse (repelente) o para devorar al sustrato alimenticio (antialimentario), una estrategia que no es letal para los insectos plaga o benéficos, ni para otros organismos del ecosistema. Esta es una posible explicación para entender la durabilidad y resistencia al biodeterioro de la madera de duramen de *E. cyclocarpum*, es una madera con alta durabilidad natural que elegimos como modelo de estudio para idear estrategias de protección de madera seca de baja durabilidad, como la madera de *Pinus* spp. o *Quercus* spp. Para probar esta hipótesis el objetivo de este trabajo fue determinar la potencial acción disuasiva de un extracto acuoso de madera de duramen de *E. cyclocarpum* en la termita de madera seca *Incisitermes marginipennis*.

Materiales y Método

Material biológico. Termitas de *I. marginipennis* se obtuvieron de: Huandacareo, Uruapan y Morelia, Michoacan. Se colectaron varias colonias de termitas con representantes de todas las castas (ninfas, soldados y reproductores). Se mantuvieron en una cámara cerrada y oscura a una temperatura de 25 °C y una humedad relativa ambiente durante un mes para su aclimatación antes de los ensayos biológicos.

Obtención del extracto acuoso. Los extractos se elaboraron de madera de duramen de *E. cyclocarpum*. En cada extracción se colocaron 100 g de madera molida y seleccionada en malla 20 (20 micrometros) en 600 mL de agua desionizada, calentada hasta ebullición por 15 a 20 min. El extracto fue concentrado por liofilización hasta tener la mayor concentración de fenólicos totales equivalentes de 0.2626 mg/mL.

Se utilizaron disco con un diámetro de 4.6 cm y espesor de 0.58 mm, con un volumen de 0.9639 cm³. Los especímenes de madera de pino se pesaron y se impregnaron con: a) Agua desionizada como testigo negativo, b) Con disolución de sales de boro 5 % de ácido bórico equivalente (50 ml de agua desionizada se aplicaron 3.5 g de disodio tetraborato y 2.5 g de ácido bórico) y c) Extracto acuoso. La impregnación se realizó durante 36 horas, Los discos fueron secados hasta peso constante y por diferencias de peso se determinaron los sólidos retenidos en la madera. Para los ensayos de selección del alimento se colocó una mitad del espécimen de madera con el tratamiento indicado y la otra mitad sin tratamiento.

Determinación del coeficiente antialimentario (T) del extracto acuso de *E. cyclocarpum*. Se hicieron ensayos de alimentación forzada y de selección del alimento como lo describe Ohmura *et al.*, (2000). Para los ensayos de alimentación forzada y de selección del alimento, se colocaron 10 termitas en cada caja de petri con los especímenes de madera de pino impregnados y con los no impregnados, se hicieron evaluaciones del consumo de madera y se midió la pérdida del peso de madera cada tres días por nueve días.

Determinación del coeficiente antialimentario de alimentación forzada (A). Se hizo mediante la aproximación: $[(KK - EE) / (KK + EE)]100 = A\%$. Donde: A = Coeficiente antialimentario, KK = Pérdida de peso en el control, EE = Pérdida de peso en el tratado. Para la determinación del coeficiente antialimentario R en ensayos de selección de alimento se hizo mediante la expresión: $[(K -$

$E) / (K + E)] 100 = R\%$. Donde: R = Coeficiente antialimentario, K = Pérdida de peso en el control, E = Pérdida de peso en el tratado. Consideraciones para la determinación de la preferencia alimentaria según Ohmura *et al.*, (2000): Clase I ($0 \geq T < 50$), Clase II ($50 \geq T < 100$), Clase III ($100 \geq T < 150$) y Clase IV ($150 \geq T < 200$). El coeficiente antialimentario total (T) es igual a: $T = A + R$. El máximo valor de T para un antialimentario eficaz es de 200.

Ensayo para determinar la microbiota intestinal de termitas *Incisitermes marginipennis* (Latreille). Las termitas se dejaron en ayuno por 24 horas, se hicieron cuatro grupos de diez termitas con los tratamientos de alimentación forzada descrito anteriormente. Las termitas se alimentaron por 5 h continuas a temperatura y humedad relativa ambiente colocadas en oscuridad. Se procedió a succionar el contenido intestinal de la termita por punción con aguja fina y se suspendió en un mililitro de solución salina 0.9 %, utilizando un asa calibrada de 0.001 ml, se estrió el contenido intestinal sobre una placa de agar Mueller Hinton contenido en cajas de petri. Se incubó por 24 horas en anaerobiosis a las 6, 8, 12, y 24 h se contaron las unidades formadoras de colonia (UFC) x 1000, reportadas como unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL). La cuantificación de los protozoarios y espiroquetas se hizo en preparaciones frescas utilizando una cámara de Neubauer y un microscopio de contraste de fases y de campo claro. Se reporta como el número de microorganismos por mm^3 .

Ensayo de repelencia de termitas *Incisitermes marginipennis*. Se utilizaron discos de papel filtro de 8.5 cm de diámetro en cajas petri y se impregnaron con: a) 1500 μl de extracto de *E. cyclocarpum* (15.75 mg/mL de fenólicos totales equivalentes) y secado a temperatura ambiente, b) 40 μl de citronelol (concentración de 23.5 mg/ml) diluido en 1460 μl de agua desionizada y un control sin tratamiento. Los tratamientos fueron aplicados en la periferia del papel a 1.5 cm de radio de la periferia al centro del papel. Después se colocaron 25 termitas en cada caja. Cada 10 min durante 100 min se contarán las termitas ubicadas en el centro del disco y las ubicadas adyacentes a la pared de vidrio.

Análisis químico del extracto acuoso de *E. cyclocarpum*. Se realizaron en un Cromatógrafo de Gases Agilent 6850 Series II, acoplado a un Espectrómetro de Masas Agilent MS detector 5973 y con una columna HP-5 MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm) bajo las siguientes condiciones: el gas acarreador fue Helio con una presión de 13.3 psi (0.935 kp/cm^2) y flujo de columna de 1 ml/min, la temperatura inicial del horno fue de 150 °C por 3 min con incrementos de 5 °C/min, la temperatura final fue de 278 °C y se mantuvo por 5 min. Las temperaturas del inyector y de la línea de transferencia fueron de 270 y 300 °C, respectivamente. Los parámetros del espectrómetro de masas fueron las siguientes: presión de la fuente de 50 mTorr, voltaje del filamento de 70 eV y una velocidad de escrutinio de 1.9 scan/s. La identificación de los compuestos se realizó por comparación con los espectros de masas de la librería NIST Rev. D.04.00 2002.

Análisis estadístico. Los experimentos se hicieron con tres repeticiones independientes por triplicado. Los datos se analizaron por ANOVA-1 con una prueba de Tukey con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$, procesados en el paquete estadístico Statistica 7.

Resultados y discusión

La mayoría de las especies de vegetales que se utilizan en la protección contra insectos muestran un efecto isectistático (Silva *et al.*, 2002) más que insecticida es decir inhiben el desarrollo normal de los insectos al actuar como repelentes, disuasivos de la alimentación u oviposición, confusores o disruptores y reguladores del crecimiento. Por lo tanto todas las plantas con efecto insectistático son preventivas, los insectos después de una pequeña prueba dejan de alimentarse y mueren por inanición o se irritan y se retiran. (Lagunes 1994; Rodríguez 1994).

Muchas plantas son capaces de sintetizar metabolitos secundarios que poseen propiedades biológicas con importancia contra insectos plagas (Céspedes 2000). La selección de plantas que contengan metabolitos secundarios capaces de ser utilizados como insecticidas naturales debe ser de fácil cultivo y con principios activos potentes, con alta estabilidad química y de óptima producción.

Retención de sólidos en la madera de pino. En el extracto de *E. cyclocarpum* acuoso y filtrado y en las sales de boro en los discos de madera de pino fue superior a lo reportado por COFAN 1995, (3.2 mg/cm³), para un riesgo de deterioro por insectos bajo. Los tratamientos con boro y con *E. cyclocarpum* fueron los mejores. En el tratamiento con agua desionizada (testigo negativo) la mortalidad fue la más baja debido a que no existieron compuestos que impidieran la alimentación de las termitas. Se observó que en los tratamientos con boro (testigo positivo) y con extracto acuoso de *E. cyclocarpum* las termitas se alimentaron en menor porcentaje que en los tratamientos con agua y con extracto de *E. cyclocarpum* filtrado (Fig. 1 A, B, C, y D). En la figura 1 B, los discos impregnados con boro se observan manchas de excremento líquido de las termitas, lo que sugiere que el boro provoca un disturbio en la microbiota intestinal de termitas.

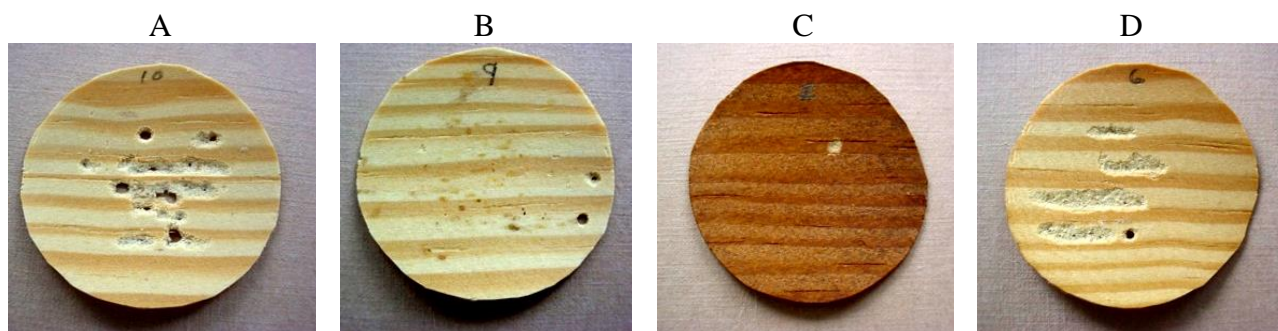


Figura 1. Deterioro de la madera de pino causado por termitas durante 45 días. A) Discos impregnados con agua desionizada (control negativo), B) Discos impregnados con disolución de sales de boro (control positivo), C) Extracto acuoso de *E. cyclocarpum* y D) Extracto acuoso de *E. cyclocarpum* filtrado en celulosa 101.

La calidad y cantidad de microorganismos intestinales es importante para la termita en esta simbiosis, le ayudan a digerir el alimento, la celulosa, por tanto, son responsables de secretar enzimas hidrolíticas capaces de la descomposición de polímeros hasta sus componentes elementales, por ejemplo carbohidratos (glucosa), aminoácidos, ácidos grasos y nucleótidos. También son proveedores los factores bióticos como las vitaminas, o bien son responsables de fijar nitrógeno, reciclar fósforo, azufre y metales esenciales. Una razón fundamental para pensar que la microbiota de la termita es un blanco fisiológico potencial para el control de este insecto barrenador de madera seca. En el intestino de la termita *I. marginipennis* se encontraron bacterias, hongos y protozoarios, de los cuales se desconoce su taxonomía y no se encontró referencia alguna de la descripción de estos microorganismos extremófilos. Se observó que las espiroquetas como los protozoarios fueron difíciles de cultivarlos *in vitro*, y la única forma de medirlos fue en preparaciones frescas, no así algunas bacterias.

Para la medición de los protozoarios se agruparon los protozoarios intestinales de la termita como protozoarios circulares. Se puntualizó en las espiroquetas por su forma característica y se midieron las bacterias como las unidades formadoras de colonias.

Se consideró que la población de bacterias, espiroquetas y protozoarios se afectó por la presencia del extracto acuoso cuando estuviese inusualmente baja o alta. Otros signos considerados

fueron cuando la termita manifestara signos de daño tales como un estómago disminuido o deposición de heces líquidas, ambos signos fueron observados pero no contabilizados.

Se encontró que los coeficientes antialimentarios (T) del el extracto acuoso de *E. cyclocarpum* y las sales de Boro (control negativo) fueron de 121.82 (Clase III) y de 1.51 (Clase I). Estos datos sugieren que el extracto acuoso vegetal posee propiedades de un potente antialimentario según la clasificación de Ohmura *et al.*, (2000). Por el contrario las sales de Boro poseen una débil influencia antialimentaria y el valor de T se ubica en la Clase I, es un insecticida por ingestión. Por lo anterior se puede concluir que el extracto de *E. cyclocarpum* tiene un efecto antialimentario.

Al comparar los protozoarios y las espiroquetas entre los diferentes tratamientos no existen diferencias significativas entre ellos, pero se observó un cambio en las bacterias, por lo que se concluye que el extracto acuoso de *E. cyclocarpum* (Jacq) Griseb no afectó severamente a la microbiota intestinal de *I. marginipennis* (Latreille). Estos datos también sugieren que la microbiota de la termita alimentada con extracto acuoso se comportó igual que la microbiota de la termita en ayuno, lo que refuerza la observación de que algún componente del extracto ejerce una acción antialimentaria en la termita.

El efecto repelente de los tratamientos aplicados, hace que las termitas se ubiquen en el centro o en la periferia de la caja, en el tratamiento con citronelol las termitas se agrupan en un círculo más cerrado debido al compuesto que es un repelente activo y en el tratamiento con extracto de *E. cyclocarpum* la ubicación de las termitas es en toda el área libre de extracto y finalmente en el control sin tratamiento las termitas se dispersaron hacia las periferia y mostraron un efecto contrario a los tratamientos.

De los compuestos encontrados en el extracto se hizo una búsqueda de información en la literatura y se encontró que el compuesto mayoritario, el D-limoneno es un insecticida y repelente contra garrapatas, piojos y pulgas (Mondragón 2002), el *p*-cimeno es un insecticida y puede controlar larvas de mosquitos *Culex pipiens molestus* y el α -terpineol afecta huevesillos y adultos de *Mayetiola destructor* (mosca de Hess) (Arcila *et al.*, 2004), el butilato hidroxitolueno se usa como antioxidante y el 1-hexanol-2-etil se ha usado como ingrediente en la formulación de insecticidas. (Dirección General de Normas 2006).

Conclusión

Los componentes mayoritarios del extracto acuoso de madera de duramen ejercen una acción antialimentaria y de repelencia (disuasiva) en la termita de madera seca *I. marginipennis*. Los metabolitos contenidos en el duramen de *E. cyclocarpum* son un factor importante en la durabilidad de la madera de esta especie y pueden ser aplicados en maderas de baja durabilidad natural como la de *Pinus* sp.

Agradecimientos:

A la UMSNH-CIC y al CONACyT por los apoyos recibidos para este proyecto.

Literatura Citada

Céspedes C.L., Calderón J.S., Lina L. and Aranda E. 2000. Growth effects on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* of some limonoids isolated from *Cedrela* spp. (Meliaceae). J. Agric. Food Chem. 48: 1903-1908.

COFAN 1995. Manual de Construcción de Estructuras Ligeras de Madera. Comisión Forestal de América del Norte. Consejo Nacional de la Madera en la Construcción A.C. México D.F. p 472.

- DGN 2006. Secretaría de Economía. Dirección General de Normas. Alimentos-Aceite Comestible puro de ajonjolí-Especificaciones. NMX-F016-S-1979. Margarina para mesa.
- Lagunes T.A. 1994. Extractos, polvos vegetales y polvos minerales para el combate de plagas del maíz y del frijol en la agricultura de subsistencia. Memoria. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco. Mexico.32 p.
- Mondragón Agular J. 2002. Insecticidas. (En revisión para publicación). http://www.csr.servicios.es/laboratorio/descargas/los_insecticidas_lectura_avanzada.pdf
- Ohmura W. Doi S., Aoyama M. and Ohara S. 2000. Antifeedant activity of flavonoids and related compounds against the subterranean termite *Coptotermes formosanus*. The Japan Wood Research Society. 46:149-153.
- Reyes Chilpa R., Viveros Rodríguez N., Gómez Garibay F. y Alavez Solano D. 1995. Antitermitic Activity of *Lonchocarpus castilloi* flavonoids and heartwood extracts. Journal of Chemical Ecology, Vol. 21(4).
- Rodríguez Rodríguez M.D. 1994. Aleuródidos. En: R. Moreno Vázquez (Ed.): *Sanidad Vegetal en la horticultura protegida*. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía, España. p. 123-153.
- Silva G., A. Lagunes J.C. Rodríguez y D. Rodríguez. 2002. Insecticidas vegetales; Una vieja-nueva alternativa en el control de plagas. Revista Manejo Integrado de Plagas (CATIE) (en prensa).
- Watanabe Y., Mihara R., Mitsunaga T., Yoshimura T. 2005. Termite repellent sesquiterpenoids from *Callitris glaucophylla* heartwood. Journal Wood Sci. 51:514-519.