

## Estudio toxicológico del extracto acuoso obtenido del duramen de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb.

### Toxicological study of an aqueous extract from *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. duramen

David Raya González<sup>I</sup>; Judith Chávez Duran<sup>II</sup>; Sara E. Urrutia Hernández<sup>III</sup>; Ricardo Castro Ortiz<sup>III</sup>; Rosa E. Martínez Muñoz<sup>III</sup>; Oscar A Ron Echevería<sup>III</sup>; Rosa E. del Río<sup>IV</sup>; María E. Morales López<sup>V</sup>; Marco Cajero Juárez<sup>VI</sup>; Mauro Manuel Martínez Pacheco<sup>VII</sup>

<sup>I</sup> Máster en Ciencias. Instituto de Investigación Químico Biológicas. Morelia, Michoacán. México.

<sup>II</sup> Estudiantes de maestría. Q.F.B. Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas Morelia, Michoacán. México.

<sup>III</sup> Estudiantes de licenciatura. Instituto de Investigación Químico Biológicas. Morelia, Michoacán. México.

<sup>IV</sup> Doctor en Ciencias. Instituto de Investigación Químico Biológicas. Morelia, Michoacán. México.

<sup>V</sup> Máster en Ciencias. Facultad de Ciencias Médicas y Biológica Morelia, Michoacán. México.

<sup>VI</sup> Doctor en Ciencias. Profesor e investigador. Facultad de Medicina Veterinaria-CMEB. Morelia, Michoacán. México.

<sup>VII</sup> Doctor en Ciencias. Instituto de Investigación Químico Biológicas. Morelia, Michoacán. México.

---

#### RESUMEN

**Fundamentos:** se reportó un efecto protector del extracto acuoso de madera de duramen de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb en la madera de pino y se le atribuyó una acción antialimentaria y de repelencia en contra de la termita de madera seca *Incisitermes marginipennis* (Latreillé); se considera un potencial candidato para preservar madera seca perecedera del que se requiere conocer la toxicidad que pudiese causar.

**Objetivos:** determinar la toxicidad de extracto acuoso de madera de duramen de *E. cyclocarpum*.

**Métodos:** se determinaron las concentraciones inhibitorias y letales medias

( $CI_{50}/CL_{50}$ ) de un extracto acuoso obtenido del duramen de *E. cyclocarpum* en organismos de diferentes niveles tróficos.

**Resultados:** las  $CL_{50}$  para el crustáceo *Artemia salina*, la termita *I. marginipennis* y la rata Wistar fueron de 1,3; 2 mg/mL y > 2 000 mg/kg<sub>ind</sub>, respectivamente. En los aislados microbianos la  $CI_{50}$  fue >1 mg, mientras que en la bacteria *Klebsiella pneumoniae* la  $CI_{50}$  fue de 300 mg. En la línea celular tumoral MCF-7 la  $CI_{50}$  fue de 1,3 mg.

**Conclusiones:** al comparar las  $CI_{50}/CL_{50}$  observadas con los límites permisibles de toxicidad se concluye que el extracto no es tóxico para estos organismos.

**Palabras clave:**  $CI_{50}/CL_{50}$ , crustáceo, termita, rata, bacterias, hongo, oomiceto, células MCF-7.

---

## ABSTRACT

**Rationale:** A protective effect of the aqueous extract from *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb duramen on pinewood was reported. It was also attributed anti-nutritional and repellent action against dry wood termites *Incisitermes marginipennis* (Latreillé); it is considered a potential candidate for perishable dry wood preservation, whose possible toxicity must be studied.

**Objectives:** To determine the toxicity of aqueous extract from *E. cyclocarpum* duramen.

**Methods:** Mean inhibitory and lethal concentrations ( $IC_{50}/LC_{50}$ ) of an aqueous extract from *E. cyclocarpum* duramen in organisms from different trophic levels.

**Results:**  $LC_{50}$  for *Artemia salina* crustacean, *I. marginipennis* termite and Wistar rat were 1,3; 2 mg/mL and over 2 000 mg/kg<sub>ind</sub> respectively. In microbial isolates,  $IC_{50}$  was 300 mg. In MCF-7 tumor cell line,  $IC_{50}$  was 1,3 mg.

**Conclusions:** When comparing observed  $IC_{50}/LC_{50}$  with allowable toxicity limits, it was concluded that the extract under study was not toxic for these organisms.

**Key words:**  $IC_{50}/LC_{50}$ , crustacean, termite, rat, bacteria, fungus, oomicet, MCF-7 cells.

---

## INTRODUCCIÓN

El deterioro de madera seca causado por insectos barrenadores produce pérdidas económicas anuales de millones de dólares, además afecta de manera drástica y sensiblemente el patrimonio cultural de los pueblos. La investigación fitoquímica de maderas con gran durabilidad natural y resistencia al biodeterioro puede ser la forma de encontrar nuevas moléculas con actividad insecticida para controlar insectos barrenadores de madera. De *Enterolobium cyclocarpum* se obtiene madera de duramen apreciada en la fabricación de muebles por su resistencia al biodeterioro, es una especie de uso agroforestal que se encuentra distribuida desde las vertientes centrales del Océano Pacífico y del Golfo de México hasta el Norte de Brasil. En madera de pino se reportó un efecto protector del extracto acuoso de madera de duramen de *E. cyclocarpum* y se le atribuyó una acción antialimentaria y de repelencia en contra de la termita de madera seca *I. marginipennis*,<sup>1</sup>

considerándolo como un potencial candidato para preservar madera seca percedera del que se requiere conocer la toxicidad que pudiese causar.

## MÉTODOS

Material biológico: los huevos de *Artemia salina* [*Salt Creek Co*<sup>TM</sup>] y el agua de mar sintética *Red Sea Salt*<sup>TM</sup> [*Red Sea Fish Pharm*], se obtuvieron en el mercado local. Especímenes de *I. marginipennis* fueron colectados de una colonia de termitas ubicada a los 10° 59' 22" latitud Norte y 101° 16' 31" longitud Oeste. Las ratas *Wistar* fueron obtenidas del bioterio universitario. La línea celular tumoral de epitelio de glándula mamaria MCF-7 fue obtenida de la *American Type Culture Collection* (ATCC). Las enterobacterias se mantuvieron y propagaron en medio de cultivo BAS (base agar sangre) a 37 °C por 24 h. Los aislados silvestres del hongo *Candida albicans* y del oomiceto *Phytophthora cinnamomi* fueron crecidos y mantenidos en medio *Sabouraud* y papa dextrosa agar (PDA), respectivamente. *E. cyclocarpum* fue colectado en un sitio a los 9° 14' latitud Norte y 101° 28' longitud Oeste e identificados por el botánico y M.C. *Xavier Madrigal*, un espécimen está depositado en el herbario universitario con el vaucher No. 10277. Esta especie no está en riesgo de extinción y se manipuló de acuerdo con las normas oficiales mexicanas que regulan la utilización de los recursos naturales.<sup>2</sup>

### *Obtención de los extractos acuosos*

Se obtuvo una decocción con 100 g del polvo vegetal y 500 mL de agua destilada y desionizada, se filtró y el sólido se eliminó (3X). La suspensión final se concentró por liofilización. El polvo contuvo 0,2626 mg fenólicos totales, equivalentes al ácido *p*-cumárico/mL (mgFTE/mL).<sup>3</sup> El ensayo con *A. salina* se efectuó de acuerdo con el método de *Meyer*.<sup>4</sup> Se obtuvieron nauplios fototróficos (instar I y II) en agua de mar con una fuente de luz (1 000-4 000 lux) a 25 °C por 24 h. Se colocaron 10-15 nauplios (100 µL) en pocillos de una placa de ELISA y se agregaron 100 µL del extracto acuoso (0,1, 1, 10 mg). El control positivo fue el sulfato de berberina. Se incubaron a temperatura ambiente durante 24 h y se contaron los nauplios vivos y muertos. Se adicionaron 100 µL de metanol para aniquilar a los nauplios sobrevivientes. La supervivencia se determinó por el cociente del número de nauplios vivos entre el total de nauplios (10), el criterio fue que con una  $CL_{50} > 20$  mg del extracto/mL no es tóxico.<sup>5</sup>

Ensayo con *I. marginipennis*: en un ensayo de no-selección de alimento, los sustratos alimenticios fueron discos de papel de filtro impregnados con el extracto acuoso (0,2626; 0,1313; 0,026 y 0,0026 µg/mL), sin extracto acuoso y una dosis única de 842 mg/mL de sales de boro (DBT) [ $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$  a 0,7 % y  $H_2BO_3$  a 0,5 %] como control positivo. Encima de ellos se depositaron 25 termitas ninfas y durante 8 semanas se alimentaron de la madera impregnada con los tratamientos. Las cajas se colocaron en una cámara oscura a temperatura ambiente y humedad relativa entre 11 y 15 %, cada semana se monitorearon las termitas muertas y el consumo de sustrato alimenticio. Para las sales DTB el tiempo letal medio ( $TL_{50}$ ) fue de 15 d.

### *Ensayo con ratas Wistar*

La prueba de toxicidad aguda se determinó de acuerdo con la «prueba límite» que utiliza dosis única de 2 000 mg/kg/individuo;<sup>6</sup> 5 ratas (234 ± 42 g y de 6 a 10 meses de edad) por grupo para cada tratamiento. El extracto acuoso se administró con una sonda orogástrica, el control positivo fue la quercitina (1, 10, 100 y 1 000

mg/kg de peso), al grupo control negativo se le administró agua. Se registraron los animales muertos a los 7 d.

#### *Ensayos con microorganismos*

Discos de papel filtro de 7 mm diámetro se impregnaron con 6 µL del extracto acuoso (0,2626; 0,1313; 0,026; 0,0026 mg/mL) y se colocaron por triplicado dentro en medio de crecimiento sólido previamente inoculado con los microorganismos ( $1 \times 10^6$  células/mL). Los cultivos bacterianos fueron incubados a 37 °C por 72 h, el fúngico y oomicético a 25 °C por 72 y 192 h, respectivamente. Los controles positivos fueron: cefatoxima, 10 mg (bacterias); 2-(4-tiazolil)-1H-benzimidazol 6 mg (*C. albicans*) y mefenoxam 6 mg (*P. cinnamomi*), el máximo halo de inhibición fue de  $20 \pm 3$  mm. La expresión empírica  $HI = DT - DP$  se utilizó para determinar la inhibición del crecimiento (mm). Donde: HI= halo de inhibición del extracto, DT= diámetro total de inhibición, DP= diámetro del papel.

#### *Ensayo con las líneas celulares*

Las líneas celulares MCF-7 y los fibroblastos de ratón 3T3 rutinariamente fueron mantenidos en medio DMEM modificado. Se colocaron de 2 000 a 3 500 células en los pocillos de una placa de ELISA, se incubaron con concentraciones logarítmicas del extracto acuoso y del control positivo el 5- fluoruracilo (5FU). Se determinó la viabilidad celular a las 24 y 48 h postratamiento, por la reducción del amarillo de tetrazolium a formazán púrpura en células vivas. Se consideró que  $CI_{50} > 100 \mu\text{g}$  no son tóxicas.<sup>7</sup>

#### *Ensayo de lixiviación*

Discos de madera de pino de 4,5 cm de diámetro de 1 mm de espesor fueron impregnados con el extracto acuoso (0,2626 mg/mL de FTE) durante 3 h. Los discos impregnados se colocaron en agua desionizada durante 5 d. En cada procedimiento los discos preservados y tratados se secaron a peso constante para determinar por diferencia de peso los sólidos retenidos y el lixiviado fue concentrado por liofilización.

#### *Análisis de los resultados*

Para cada organismo se calculó la concentración que inhibe su crecimiento o aniquila a 50 % de la población ( $CI_{50}/CL_{50}$ ) en un intervalo de 24 a 168 h de postratamiento mediante una curva de dosis-respuesta. Se hizo un diseño experimental completamente al azar. Los datos fueron analizados por ANOVA y por la prueba t de *Student* para una significación de  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

#### *Toxicidad del extracto acuoso en los animales A. salina, I. marginipennis y rata Wistar*

Se determinó la concentración letal media ( $CL_{50}$ ) del extracto acuoso sobre *A. salina*, fue de 1,3 mg/mL y el efecto de sulfato de berberina fue letal a 0,01 mg/mL a los 5 min ([tabla 1](#)).

El extracto acuoso exhibió un efecto antitermita contra *I. marginipennis* dependiente del tiempo y de la concentración. La  $CL_{50}$  fue de 2 mg/mL y el tiempo efectivo medio de muerte ( $TL_{50}$ ) fue de 5 semanas ([tabla 1](#)). En la rata Wistar la toxicidad aguda causada por el extracto acuoso fue nula, se observó erizamiento de pelos y una disminución de la actividad motora, signos que desaparecieron a las 3 h de la alimentación con el extracto ([tabla 1](#)). La quercitina indujo una toxicidad aguda con 200 mg/kg ( $CL_{50}$ ), que causó 50 % de muerte en la población de ratas en 4 d ( $TL_{50}$ ).

#### *Toxicidad en bacterias, hongos, oomicetos y células celulares*

No se observó efecto inhibitorio del crecimiento causado por el extracto acuoso en los 6 aislados bacterianos (bacterias grampositivas y gramnegativas) expuestas 1 mg. Sin embargo en *K. pneumoniae* la  $CI_{50}$  fue de 300 mg hasta por 6 h. No se observó un efecto tóxico sobre el crecimiento en el hongo *C. albicans* ni en el oomiceto *P. cinnamomi* ([tabla 2](#)).

Efecto tóxico en línea celular tumoral MCF-7 y en fibroblastos 3T3 de ratón. La  $CI_{50}$  del extracto acuoso fue 1,3 mg/mL para la línea celular MCF-7 y para los fibroblastos 3T3 fue 1,70 mg/mL, ambos fueron sensibles a 5-FU al cabo de 3 d postratamiento ([tabla 3](#)).

#### *Lixiviación del extracto acuoso de los discos de madera de pino*

Los discos de madera de pino retuvieron 43,7 mg del extracto acuoso (100 % de retención), fueron sometidos a una condición extrema con agua desionizada por 5 d, el extracto se lixivió hasta 62,92 % y la madera retuvo 37,08 % ([tabla 4](#)).

## **DISCUSIÓN**

Se determinaron las concentraciones inhibitorias y letales medias ( $CI_{50}/CL_{50}$ ) de un extracto acuoso obtenido del duramen de *E. cyclocarpum* en organismos de diferentes niveles tróficos, puesto que son numerosos los ejemplos de plantas venenosas o de componentes vegetales que en bajas dosis causan efectos tóxicos diversos que incluyen la muerte. Se observó que en el organismo blanco (la termita) se requirió de una  $CL_{50}$  y  $TL_{50}$  superiores al control, lo cual fortalece la sugerencia de que el extracto acuoso contiene sustancias disuasivas.<sup>1</sup> En *A. salina*, el indicador biológico de toxicidad por su credibilidad y confiabilidad se observó una  $CL_{50}$  superior al criterio de toxicidad.<sup>8,9</sup> La rata Wistar es un modelo razonablemente análogo a los humanos, utilizado para ensayar la toxicidad aguda de sustancias de interés, en quien la  $CL_{50}$  se determinó de acuerdo con los lineamientos de la IACUC.<sup>6</sup> Se acepta que es improbable que una sustancia sólida ingerida por más de 2 000 mg/kg/individuo ejerza una toxicidad aguda oral.<sup>10</sup>

El uso de roedores para estimar la dosis letal media/concentración letal media ( $DL_{50}/CL_{50}$ ), presenta una baja correlación entre el efecto observado en el roedor y en el humano ( $R^2 = 0,61$  y  $0,65$  para rata y ratón).<sup>11</sup> También existe una baja predicción de los efectos de la toxicidad aguda para el humano (43 %) y hace falta una validación formal por estándares modernos para establecer su relevancia para los humanos cuando se usa la  $DL_{50}/CL_{50}$  o cualquier otro protocolo para estimar la toxicidad aguda.<sup>12,13</sup> Por ello se amplió la determinación de la toxicidad del extracto utilizando otros modelos biológicos.<sup>14</sup>

Se observó que el extracto acuoso ejerció un efecto bacteriostático únicamente para *K. pneumoniae* y no tuvo efecto antimicrobiano para las demás bacterias ni para *C. albicans* ni *P. infestans*. En células cancerosas MCF-7 y no cancerosas 3T3, se requirió más de 100 µg/mL de extracto vegetal en relación con la actividad citotóxica considerada peligrosa; la CI<sub>50</sub> fue superior al indicador, lo cual sugiere que el extracto acuoso no posee componentes citotóxicos.<sup>5,15</sup> El agua lixivió al extracto acuoso, sin embargo, por los resultados del presente trabajo se sugiere que los sólidos lixiviados no son factores que inducen toxicidad aguda. Por lo tanto, como el extracto acuoso obtenido no causa toxicidad aguda ni citotoxicidad en los organismos expuestos a él, además de la posibilidad de utilizar los residuos sólidos generados en la fabricación de muebles de madera de duramen de *E. cyclocarpum*, esto induce a pensar en una potencial aplicación del extracto acuoso en la protección de maderas percederas.

## AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado por la UMSNH (CIC 2.1 MMP) y FOMIX de CONACYT y Gobierno del Estado de Michoacán (2005-C01-009). DRG (becario CONACYT). LMDB, JCD y SEUH (becarios UMSNH). Los autores están agradecidos con A. Flores García por sus valiosas opiniones.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Raya González D. Las maderas secas de encino (*Quercus* spp) y pino (*Pinus* spp) son protegidas del daño causado por *Lyctus* spp e *Insicitermes marginipennis* con extractos vegetales acuosos [Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas opción Biología Experimental]. Morelia, Michoacán: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; 2007.
2. Secretaría de Desarrollo Social. NOM-059-ECOL-1994. Secretaría de Recursos Naturales. NOM-005-RECNAT-1997, NOM-007-RECNAT-1997 y NOM-009 RECNAT-1997; México.
3. Swain T, Hillis WE. The phenolic constituents of *Prunus domestica* L. The quantitative analysis of phenolic constituents. J Sci Food Agric. 1959;10:636.
4. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, Mc Laughlin JL. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. Planta Med. 1982;45:31-4.
5. Geran RI, Greenberg HM, McDonald M, Abbot BJ. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. Cancer Chemoth Rep. 1972;33-117.
6. Institutional Animal Care and Use Committee. Recommendation on LD50 testing (IACUC). 2000. Disponible en: <http://iacuc.cwru.edu/policy/nihpolicies/iracl50.htm>
7. Mongelli E, Desmarchelier C, Rodríguez Talou J, Coussio J, Ciccía G. *In vitro* antioxydant and cytotoxic activity of extracts of *Baccharis coridifolia* DC. J Ethnopharmacol. 1997;58:157-63.

8. Badii MH, Garza Almanza V. Resistencia en insectos, plantas y microorganismos. CULCyT//Impacto Ecológico 2007;4:9-25.
9. Vanhaecke P, Persoone G, Claus C, Sorgeloos P. Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia* nauplii. Ecotoxicol Env Safety. 1981;5:382-7.
10. WHO. The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification. Geneva: World Health Organization; 2005.
11. Ekwall B, Barile F, Castano A, Clemedson A. Multicentre evaluation of *in vitro* cytotoxicity tests program (MEIC) evaluation of acute systemic toxicity. Part VI. The prediction of human toxicity by rodent LD50 values and results from 61 *in vitro* methods. ATLA. 1998;26:617-58.
12. Olson H. Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in human and in animals. Reg Toxicol Pharmacol. 2000;32:56-67.
13. OECD. Final report of the Solna workshop on validation and regulatory acceptance criteria for alternative tests. OECD report ENV/MC/CHEM/TG 1996; (96)9.
14. Langley G. Acute toxicity testing without animals: More scientific and less of a gamble. British Union for the Abolition of Vivisection; 2005. Disponible en: [www.buav.org](http://www.buav.org)
15. Monks NR, C Lerner, AT Henriques, FM Farias, ES Schapoval. Anticancer, antichemotactic and antimicrobial activities of marine sponges collected off the coast of Santa Catarina, Southern Brazil. J Exp Mar Biol Ecol. 2002;281:1-12.

Recibido: 12 de junio de 2008.

Aprobado: 10 de agosto de 2008.

D.C. *Mauro Manuel Martínez Pacheco*. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. Edificio B-3, Cd. Universitaria; Francisco J. Mújica s/n; Col. Felicitas del Río. Morelia, Mich. México CP 58060. Teléfonos: 52 443 3 26 57 88 y 52 443 3 26 57 90, extensión 118. Correo electrónico: [mpacheco@zeus.umich.mx](mailto:mpacheco@zeus.umich.mx)

Tabla 1. CL<sub>50</sub> del extracto acuoso obtenido de duramen de *E. cyclocarpum* en animales

Especie	Tratamiento	CL <sub>50</sub>	Tiempo
<i>A. salina</i>	Extracto acuoso	1,3 mg/mL	24 h
	Sulfato de berberina	0,01 mg/mL	5 min
<i>I. marginipennis</i>	Extracto acuoso	2 mg/mL	5 semanas
Ratas Wistar	Extracto acuoso	> 2 000 mg/kg	> 168 h
	Quercitina	200 mg/kg	168 h

Tabla 2. CI<sub>50</sub> del extracto acuoso de madera de duramen de *E. cyclocarpum* en microorganismos

Microorganismos	Especie	CI <sub>50</sub> (µg)	Tiempo (h)
	<i>K. pneumoniae</i>	300 >	> 6
Bacterias	<i>P. aeruginosa</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. saprophyticus</i>	1 000	-
Hongos	<i>C. albicans</i>	> 1 000	> 120
Oomiceto	<i>P. cinnamomi</i>	> 1 000	> 120

Tabla 3. CI<sub>50</sub> del extracto acuoso de duramen de *E. cyclocarpum* en la línea celular MCF-7

Línea celular	CI <sub>50</sub>		Tiempo (h)
	Extracto acuoso (mg/mL)	5-Fluoruracilo (µg/mL)	
Fibroblastos	1,7	2	72
MCF-7	1,3	5	72

Tabla 4. Lixiviación de los sólidos en madera seca de pino protegida con el extracto acuoso obtenido del duramen de *E. cyclocarpum*

Tratamiento	mg de sólidos	% lixiviación
Sólidos retenidos iniciales	44	0
Sólidos lixiviados	27,7	63
Sólidos retenidos finales	16,3	-