

11821  
13  
A



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN

"ESTUDIO ANTIGENOTÓXICO DE DIFERENTES EXTRACTOS  
DE RUDA (*Ruta graveolens*), SOBRE EL DAÑO  
CROMOSÓMICO PRODUCIDO POR EL INSECTICIDA  
DIAZINÓN, EN CÉLULAS RADICULARES DE  
HABA (*Vicia faba L.*).

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**INGENIERO AGRÍCOLA**  
P R E S E N T A  
**RICARDO GUTIÉRREZ RUEDA**

---

ASESOR:  
ING. OSCAR HORACIO GUILLÉN AYALA



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# **PAGINACIÓN DISCONTINUA**

B

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES-CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE  
EXAMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen Garcia Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Estudio antígenotóxico de diferentes extractos de papa (Solanum tuberosum), sobre el daño cromosómico producido por el diazinón, en células radiculares de haba (Vicia faba L.)"

que presenta el pasante: Ricardo Gutiérrez Rueda  
con número de cuenta: 9460314-4 para obtener el título de :  
Ingeniero Agrícola

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 5 de marzo de 2003

PRESIDENTE	<u>Biol. Elva Martínez Holguin</u>	<u>[Firma]</u>
VOCAL	<u>M. C. Sandra Díaz Barriga Arceo</u>	<u>[Firma]</u>
SECRETARIO	<u>Ing. Oscar Horacio Guillén Ayala</u>	<u>[Firma]</u>
PRIMER SUPLENTE	<u>Ing. Andrés Simón Marbán Bahena</u>	<u>[Firma]</u>
SEGUNDO SUPLENTE	<u>QFB. Rosalba Bonilla Sánchez</u>	<u>[Firma]</u>

c

## AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis familiares por el apoyo brindado durante los años de estudio de mi carrera, especialmente a mi madre y mi abuela.

A mis compañeros de la generación 19 agradezco su amistad y momentos de alegría que pasamos en estos años.

Para mis maestros de la carrera de Ingeniero Agrícola, gracias por contribuir a mi formación profesional y al enriquecimiento de mis conocimientos.

Agradezco al Ingeniero Ángel López Cortes, a la Doctora Sandra Díaz Barriga y al Doctor Enrique Ángeles Anguiano su valiosa cooperación en el desarrollo de mi tesis.

Especialmente gracias a mi asesor, el Ingeniero Oscar H. Guillén Ayala por su apoyo y paciencia en el transcurso y evolución de mi trabajo de investigación.

**ÍNDICE DE TABLAS**

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1. Dosis letal media (DL50) oral aguda (OA) en rata, de algunos insecticidas organofosforados .....</b>	<b>15</b>
<b>Tabla 2. Cultivos agrícolas donde se utiliza el diazinón .....</b>	<b>19</b>
<b>Tabla 3. Límite Máximo Residual permitido para el diazinón en diferentes cultivos agrícolas en México .....</b>	<b>30</b>
<b>Tabla 4. Plaguicidas detectados en alimentos .....</b>	<b>32</b>
<b>Tabla 5. Tratamientos evaluados para la determinación de micronúcleos e índice mitótico .....</b>	<b>55</b>
<b>Tabla 6. Análisis de varianza para la frecuencia de micronúcleos .....</b>	<b>56</b>
<b>Tabla 7. Análisis de varianza para la frecuencia del índice mitótico .....</b>	<b>56</b>
<b>Tabla 8. Frecuencia de micronúcleos en los diferentes tratamientos evaluados .....</b>	<b>59</b>
<b>Tabla 9. Frecuencia del Índice Mitótico de los diferentes tratamientos evaluados .....</b>	<b>61</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Estructura química del diazinón .....	16
Figura 2. Ciclo celular .....	40
Figura 3. Profase .....	43
Figura 4. Metafase .....	43
Figura 5. Anafase .....	43
Figura 6. Telofase .....	43
Figura 7. Frecuencia de micronúcleos .....	60
Figura 8. Frecuencia de índice mitótico .....	62
Figura 9. Células de haba ( <i>Vicia faba</i> L.) con micronúcleos inducidos por el insecticida diazinón .....	63
Figura 10. Célula de haba ( <i>Vicia faba</i> L.) en profase .....	64
Figura 11. Célula de haba ( <i>Vicia faba</i> L.) en metafase .....	64
Figura 12. Célula de haba ( <i>Vicia faba</i> L.) en anafase .....	65
Figura 13. Célula de haba ( <i>Vicia faba</i> L.) en telofase .....	65

## RESUMEN

La ruda es una planta medicinal, originaria del sur de Europa, la cual se utiliza principalmente en enfermedades digestivas y nerviosas en el humano. A la ruda se le han atribuido propiedades bioplaguicidas. El presente trabajo tuvo el objetivo de evaluar si los extractos de esta planta ejercen un efecto antigenotóxico en células apicales de raíz de haba expuestas al insecticida diazinón, mediante la evaluación de la frecuencia de micronúcleos e índice mitótico. Para el estudio genotóxico se empleó una concentración de 12 ppm (i.a.) de diazinón. Para el ensayo antigenotóxico se manejaron 4 extractos diferentes de la planta de ruda, extraídos con metanol, acetona, hexano y acetato de etilo, respectivamente, para obtener las concentraciones de 500 y 1000 ppm. Los resultados mostraron que el diazinón, a la concentración estudiada, es un agente clastogénico, pero no afecta la división celular. Se encontró que la mayoría de los tratamientos (extracto + diazinón) sí actúan como agentes antigenotóxicos, ya que no mostraron diferencia estadística significativa con respecto al testigo negativo, lo que indica que hubo una disminución en el número de células micronucleadas, pero también ocasionaron una disminución de la división celular. Las células expuestas a extractos solos presentaron un bajo número de micronúcleos y no se vio afectada la división celular. Es importante efectuar los estudios fitoquímicos de éstos extractos para conocer sus principios activos y saber que componentes actúan como antigenotóxicos, y que sustancias, en combinación con el diazinón, actúan como inhibidores de la división celular.

## Í N D I C E.

	Página
Índice de tablas .....	I
Índice de figuras .....	II
Resumen .....	III
Índice .....	1
1.- Introducción .....	3
Objetivos .....	6
Hipótesis .....	6
2.- Revisión de Literatura .....	7
2.1.- Generalidades de la ruda .....	7
2.1.1.- Requerimientos ambientales .....	7
2.1.2.- Descripción botánica .....	7
2.1.3.- Clasificación taxonómica .....	8
2.1.4.- Reproducción .....	8
2.1.5.- Uso medicinal .....	8
2.1.6.- Uso potencial como bioplaguicida .....	9
2.2.- Generalidades de los insecticidas órganofosforados .....	12
2.3.- Generalidades del insecticida diazinón .....	16
2.3.1.- Cultivos agrícolas donde se utiliza el diazinón en México .....	19
2.3.2.- Residualidad del diazinón en las plantas cultivadas .....	27
2.3.3.- Toxicidad del diazinón en humanos y animales .....	33
2.3.4.- Fitotoxicidad del diazinón .....	37
2.4.- Ciclo celular y mitosis en células meristemáticas .....	38

2.4.1.- Ciclo celular .....	38
2.4.2.- Mitosis .....	39
2.5.- Importancia de la evaluación genotóxica .....	42
2.6.- Definición y antecedentes de la prueba de micronúcleos .....	44
2.7.- Importancia de la prueba de micronúcleos .....	46
2.8.- El haba ( <i>Vicia faba</i> ) como material biológico .....	47
3.- Materiales y métodos .....	48
3.1.- Material biológico .....	48
3.2.- Materiales y reactivos .....	48
3.3.- Metodología .....	50
3.3.1.- Obtención de la ruda .....	50
3.3.2.- Preparación del extracto de ruda .....	50
3.3.3.- Realización de la prueba de micronúcleos .....	51
3.4.- Diseño experimental y análisis estadístico .....	53
4.- Resultados .....	56
5.- Discusión de resultados .....	66
6.- Conclusiones .....	72
7.- Recomendaciones .....	73
8.- Bibliografía .....	74

## 1. INTRODUCCIÓN

La idea de emplear nuevas técnicas biológicas para el control de plagas y enfermedades surge por los graves problemas de contaminación al ambiente que ocasionan el uso de agroquímicos; problemas que se manifiestan en las plantas cultivadas, principalmente, en donde dichos productos influyen en una disminución en la producción y además ocasionan resistencia de los organismos patógenos y, por otra parte, producen efectos negativos en la salud de los agricultores (Gutiérrez y Betancourt, 1996).

También se conoce que la mayoría de los agroquímicos son tóxicos para los cultivos, y se siguen usando al no tener conocimiento del daño genético que poco a poco van ocasionando a las plantas, lo cual trae consigo que vaya disminuyendo la variabilidad genética de esas especies vegetales y que por consiguiente desaparezcan características de interés agronómico para el ser humano (Garza, 1987).

El uso de las plantas medicinales que poseen propiedades plaguicidas es una de las opciones más viables para sustituir a los productos químicos, ya que pueden llegar a ser igualmente efectivas, son de origen natural y menos dañinas a todos los seres vivos (Aguilar, 1982; Argueta, 1994; Garza, 1987; Gutiérrez y Betancourt, 1996).

En el transcurso de su evolución las plantas han tenido una estrecha relación con los organismos patógenos a nivel de sus procesos bioquímicos y fisiológicos, y llegan a sintetizar sustancias bioactivas que de alguna forma, ya sea directa o indirectamente, pueden causar alteraciones en los procesos biológicos de dichos organismos. Algunas de estas sustancias tienen características de acción

bioplaguicida, como son los que se presentan en la planta de ruda (*Ruta graveolens*), a la que se le han encontrado propiedades bioplaguicidas debido a la presencia de unos compuestos químicos llamados flavonoides (De Paula y Martins, 2000; Duval, 1992 Echeverri, 1987; García,1992; Mancebo, et al, 2000; Mora, 1993; Sasanelli, 1995; Valádez, 1986).

A parte del poder bioplaguicida que presenta la ruda, se ha planteado la posibilidad de que también tenga actividad biológica como antimutágeno y así actúe como un bioprotector de los posibles daños genéticos que pueden causar los productos químicos utilizados en el combate de plagas y enfermedades.

Un antimutágeno es una sustancia capaz de contrarrestar o disminuir el daño mutagénico, independientemente de los mecanismos involucrados (Luna, 1999).

Por otra parte, un producto químico ampliamente utilizado en México y que combate a una gran cantidad de insectos plaga en diferentes cultivos, es el diazinón. Este agroquímico actúa contra insectos y ácaros por contacto y por ingestión; es muy tóxico para peces, abejas y vida silvestre y actúa sobre el sistema nervioso central de los animales y del ser humano, alterando el proceso normal de los impulsos nerviosos asociados a la relación colinesterasa/acetilcolina (Crisanto, 1996; Lagunes y Villanueva, 1994).

Mientras que en México se sigue usando el diazinón en grandes cantidades, tanto en la agricultura, como en la jardinería y a nivel doméstico, en Estados Unidos desde diciembre del año 2000 la Agencia de Protección al Ambiente (EPA) dio a conocer un desplegado donde prohibía el uso doméstico y en jardinería de este insecticida, y que poco a poco se fuera reduciendo también su uso en la agricultura, debido a los graves daños que ocasiona tanto a animales

como a seres humanos (Environmental Working Group, 2000).

Los agentes genotóxicos son sustancias que afectan principalmente al material genético de las células, con propiedades físicas y químicas que les permiten interactuar directa o indirectamente con los ácidos nucleicos y que, por lo tanto, poseen actividad mutagénica (Sawger, 1994).

Un estudio que se utiliza frecuentemente para determinar el daño de los compuestos tóxicos es la llamada prueba de micronúcleos que se encuentra entre los estudios que detectan rupturas a nivel de cromosomas y es considerada una prueba sencilla, confiable y de alta sensibilidad para determinar el efecto genotóxico de una sustancia química (De Marco, et al., 1988).

Desafortunadamente no se han detectado estudios experimentales que corroboren la actividad antimutágena de la ruda en las plantas, por esta razón en el presente trabajo se plantea realizar un estudio antigenotóxico de diferentes extractos de ruda obtenidos con diferentes solventes para evaluar su acción como antimutágenos de los daños genotóxicos ocasionados por el insecticida diazinón, para así tener una opción viable de un producto natural que actúe como promotor de defensas naturales en las plantas y evite los daños que indirectamente les causan los productos químicos utilizados para el combate de plagas, y con esto se podría tener una mayor confianza, al momento de usar un agroquímico.

## **OBJETIVOS.**

### **Objetivo general:**

1- Evaluar el efecto antigenotóxico de diferentes extractos de ruda (*Ruta graveolens*), en contra del daño cromosómico ocasionado por el insecticida diazinón por medio de la frecuencia de micronúcleos en células meristemáticas de raíz de haba (*Vicia faba*).

### **Objetivos particulares:**

1- Determinar el efecto genotóxico del insecticida diazinón por medio de la frecuencia de micronúcleos en células apicales del meristemo de raíz de haba.

2- Realizar el estudio del índice mitótico en células meristemáticas apicales de raíz de haba expuestas a la acción del insecticida diazinón.

3- Evaluar el efecto antigenotóxico de la ruda mediante la disminución de la frecuencia de micronúcleos en células del meristemo apical de raíz de haba.

4- Obtener el índice mitótico en las células del meristemo apical de raíz de haba ocasionado por la acción de los diferentes extractos de ruda.

## **HIPÓTESIS.**

Si los extractos de ruda poseen capacidad antigenotóxica, entonces serán capaces de disminuir la frecuencia de micronúcleos producidos por el insecticida diazinón.

## **2. REVISIÓN DE LITERATURA.**

### **2.1. GENERALIDADES DE LA RUDA.**

#### **2.1.1. REQUERIMIENTOS AMBIENTALES.**

La ruda es originaria del sur de Europa (región del mediterráneo). Su hábitat es zonas templadas, cálidas, semicálidas y semisecas, de los 10 hasta los 2750 msnm. Tiene una distribución cosmopolita, asociada a la selva tropical caducifolia, subcaducifolia, perennifolia, matorral xerófilo, bosque de encino y de pino. Se desarrolla mejor en una temperatura que va de los 15 a 30 °C, requiriendo una humedad relativa del 70%, y una precipitación anual de 600 a 1200 mm. El suelo en el que mejor se desarrolla esta planta es uno de textura franca con un pH de 6.5 a 7.5 (Aranda, 1996; Argueta, 1994; Gutiérrez y Betancurt, 1996).

#### **2.1.2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.**

Planta herbácea perenne de 50 a 90 cm de altura, raíz fibrosa ramificada de coloración amarillenta pálida, con tallos redondos, erectos y follaje verde-azuloso, y con aroma fuerte. Sus hojas son compuestas bi-tripinadas, alternas, glabras, oblongas de 5 a 10 cm de largo, segmentadas, elípticas, de 1 a 1.5 cm de largo, con puntas glandulares, translúcidas, pecioladas. Sus flores están en cimas terminales de color amarillo, flores bisexuales, cáliz de cuatro sépalos, verdes, corola de cuatro pétalos, timbrados, de 6 a 8 mm de largo; los frutos son carnosos de forma de drupa o cápsula lobada que al madurar se abren en cuatro partes, empezando en la punta, hasta la mitad (Aranda, 1996; Argueta, 1994; Cabrera, 1992; Martínez, 1994).

### **2.1.3. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.**

Reino:	Vegetal
Subreino:	Embryophyta
División:	Spermatophyta
Clase:	Angiospernae
Orden:	Geraniales
Familia:	Rutaceae
Género:	<i>Ruta</i>
Especie:	<i>graveolens</i> (Martínez, 1992)

### **2.1.4. REPRODUCCIÓN.**

La reproducción sexual se realiza por medio de polinización con ayuda de los insectos. Las semillas llegan a presentar un 90% de germinación (Gutiérrez y Betancurt, 1996). Se puede propagar asexualmente por medio de esquejes presentando un 85% de enraizamiento (Argueta, 1994; Gutiérrez y Betancurt, 1996).

### **2.1.5. USO MEDICINAL.**

El uso de la ruda data desde el siglo XVI y se empleaba para disminuir la fiebre, dolor de riñón, de pecho e inflamación de la garganta. En diversos estados del centro y norte del país como Guerrero, Michoacán, Oaxaca y Baja California, el principal uso de la ruda es para tratar problemas en el estómago, también es empleada para aliviar el dolor de oído o contra enfermedades nerviosas, vértigos, gripa, tos, artritis, várices, heridas leves, reumatismo y gota. Es igualmente útil

para úlceras, llagas, lavado bucal y como loción para el cuero cabelludo, además se emplea para regular cólicos menstruales, ayudar en el parto y estimular la producción de leche. También se emplea el triturado de hojas para eliminar verrugas, mezquinos, parásitos (lombrices y piojos) y para el "mal de aire" (Aranda, 1996; Argueta, 1994; Baytelman, 1993; Cabrera, 1992; Martínez, 1994).

#### **2.1.6. USO POTENCIAL COMO BIOPLAGUICIDA.**

Se evaluaron trece especies vegetales contra la mosca doméstica (*Musca domestica* L.) en su tercer estadio larvario, encontrando que la ruda tuvo una efectividad del 79% de mortandad, contra la mosca, a una concentración del 40% de hojas pulverizadas (Ahmed, et al.,1981).

En un estudio se probó la actividad insecticida de extractos de semilla de algunas especies vegetales en contra de la abeja negra del haba y el desarrollo bacteriológico intestinal de la abeja, obteniendo que el extracto de ruda ocasiona una inhibición bacteriana y una mortandad del 100% en la abeja negra y no se presentaron efectos fitotóxicos en el haba (Salem, 1983).

Se realizó un trabajo donde reportan que un extracto acuoso de hojas y tallos de ruda inhibieron el crecimiento de algunas especies de *Xanthomonas*. Cuando se probaron los extractos obtenidos a partir de la planta con agua, todos formaron halos de inhibición en *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, *X. c.* pv. *begoniae* y *X. c.* pv. *campestris*. La efectividad de los extractos se hizo en base al desarrollo y diámetro del halo de inhibición del crecimiento bacteriano (García, 1992).

En un ensayo señalan que los extractos de hoja y raíz de *Ruta graveolens* presentan una actividad nematostática en contra de *Heterodera schachtlii*

(Sasanelli y D'Addabbo, 1992a). Los mismos autores (1992b) indican que extractos acuosos de hojas de ruda tuvieron un alto efecto nematicida contra *Xiphinema index* in vitro. Observaron que la mortandad del nemátodo se incrementa con respecto a la concentración de los extractos de hoja y al tiempo de exposición. También, estos autores (1993a) encontraron que la ruda utilizada como abono verde disminuye la densidad de población del nemátodo de *Meloidogyne javanica*, así mismo señalan (1993b) que un extracto de hoja de ruda actúa como nematicida en contra de otras especies del género *Meloidogyne*. (Sasanelli y D'Addabbo, 1992b)

En otro trabajo se menciona que en el caso de las extracciones a partir de ruda y aplicadas a *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, ésta fue inhibida en mayor parte por las extracciones hechas con acetona y hexano (Mora, 1993).

En un cultivo hidropónico de *Lycopersicum esculentum* se aplicó un extracto de ruda a una concentración de 0.8 mg/ml. La aplicación se efectuó de dos maneras, por aspersión foliar para controlar insectos y por vía radicular para prevenir el ataque de hongos y bacterias. El extracto de ruda que se utilizó por vía radicular tenía el objetivo de inducir en las plantas la producción de fitoalexinas. Los resultados obtenidos indican que hubo repelencia en contra de los insectos y no se presentaron problemas de hongos y bacterias (Arango, 1994).

Se realizó un trabajo aplicando un extracto de ruda por vía radicular a una concentración de 0.0043 g/ml con la finalidad de generar defensas y prevenir enfermedades en plantas de fresa (*Fragaria vesca*) y pimiento (*Capsicum annuum*). Los resultados obtenidos indicaron que no hubo presencia de enfermedades en los cultivos durante todo su ciclo de vida (Bonilla, 1994).

En un estudio de extractos vegetales encontraron que la rutina (un compuesto químico del extracto de hoja de la ruda) no actuó como nematocida en contra de *Heterodera schachtii*, por lo cual concluyeron que es otro compuesto de la planta el que actúa como nematocida. (Sasanelli y D'Addabbo, 1995).

Se publicó un trabajo donde se afirma que los extractos de ruda tienen un prometedor uso agrícola como nematocida para controlar diferentes especies del género *Meloidogyne* y *Heterodera schachtii* (Sasanelli, 1995).

Insunza (1995) menciona que algunos investigadores obtuvieron buenos resultados utilizando la ruda como nematocida, ya que obtuvieron un 100% de control en la población de nemátodos de *Ditylenchus dipsaci*.

Al realizar un estudio, se concluyó que el extracto de ruda incorporado al suelo disminuye los daños causados por *Xanthomonas campestris pv. begoniae*, al observarse una infección de menos del 10% en la planta de la begonia (Barrios, 1995).

Al efectuar un experimento Walker (1995) concluyó que la ruda es resistente al ataque del nemátodo "nudo de raíz" (*Meloidogyne incognita*) al permanecer sus raíces sanas cuando fueron expuestas a dicho patógeno.

En una investigación califican a la ruda como un herbicida natural al disminuir en gran porcentaje la germinación de las semillas de *Portulaca oleraceae*, además de dañar la radícula de aquellas plantas que llegan a germinar (Aliotta, et al., 1996).

Probando a la ruda contra *Meloidogyne incognita* se observó que si hay una actividad nematocida por parte de la planta. (Mareggiani, et al., 1997)

Se evaluó un extracto de ruda en donde previamente la planta fue secada, filtrada y pulverizada sobre plantas de frijol, encontrando que la ruda tiene un efecto insecticida en adultos de *Bemisia tabaci* (Gómez, et al, 1997).

En una prueba se concluye que la ruda, en especial sus hojas, tiene una gran actividad nematocida contra varias especies de los géneros *Globodera*, *Heterodera*, *Meloidogyne* y *Xhifinema* (Sasanelli, 1997).

Se experimentó con un tamizado general de la ruda a una concentración del 1% detectando que causaba un efecto inhibitor en larvas de *Hypsipyla grandella*. (Mancebo, 1998).

Científicos evaluaron los aceites esenciales de la ruda para demostrar su repelencia en larvas de la polilla mimosa (*Cydea pumonell*) que ataca al fruto del manzano (Landolt, et al, 1999).

Se encontró a la ruda con actividad fungistática en el control de *Fusarium solani*, *Trichoderma viridi*, *Penicillium spp*, *Verticillum dahliae*, *Thiclariopsis bassicola* (Oliva, et al, 1999).

## **2.2. GENERALIDADES DE LOS INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS**

El origen de los compuestos químicos organofosforados data de 1820, cuando Lassaingne estudia por vez primera las reacciones de un alcohol con ácido fosfórico. Durante 1854 Clemont preparó pirofosfato de tetraetilo (TEPP) por calentamiento de sal de plata con cloruro de etilo (Cremlyn, 1995; Morífusa, 1997; Restrepo, 1992).

Durante la Segunda Guerra Mundial, los técnicos alemanes encargados del estudio de materiales que podrían ser útiles en la guerra química, descubrieron y

sintetizaron una gran cantidad de compuestos organofosforados. De esta manera Saunders, en Inglaterra, obtiene fluoruro tetrametilfosfordiamídico o dimefox (DFP), mientras que Schrader en Alemania trabajando en este tipo de compuestos, descubre gases nerviosos altamente tóxicos y, posteriormente en 1937, encuentra en algunos organofosforados propiedades de insecticidas de contacto. Durante 1941 Schrader y colaboradores preparan la pirofosforamida de octametil (OMPA), a la que dan el nombre de Schradan, que fue reconocido como el primer insecticida sistémico, sin embargo, éste es altamente tóxico a los mamíferos. Al mismo tiempo él descubre otros productos insecticidas incluyendo al llamado "Bladan" que contenía tetraetil pirofosfato (TEPP), el cual fue registrado en Alemania en 1944 (Morifusa, 1997).

Con los trabajos hechos en el campo de la agricultura comprobaron que muchos de los compuestos orgánicos del fósforo presentaban toxicidad elevada contra insectos perjudiciales. La mayoría de los organofosforados actúan como fumigantes y de acción estomacal, pero también se encuentran varios sistémicos que cuando se aplican al suelo o al follaje circulan en la savia haciéndola tóxica para los insectos que se alimentan de ella. Los primeros compuestos organofosforados utilizados como insecticidas pertenecen al tipo de ésteres sencillos del ácido fosfórico tales como el TEPP y otros, a los que se agregó después el paratión, que a pesar de su antigüedad sigue siendo de uso común en todo el mundo (Lagunes y Villanueva, 1994; Restrepo, 1992).

Los organofosforados tiene dos características básicas:

- Son menos tóxicos para vertebrados que los compuestos organoclorados.

- No son persistentes en el medio ambiente, principal causa que motivó la sustitución en el uso de los organoclorados por los organofosforados (Lagunes y Villanueva, 1994).

Los organofosforados inhiben aparentemente la acción de varias enzimas, pero la actividad más importante *in vivo* es contra la enzima colinesterasa que se encuentra en el tejido nervioso de los animales y cuya función es interrumpir la transmisión de los impulsos nerviosos. La inhibición de la enzima colinesterasa por los insecticidas organofosforados impide la destrucción de la acetilcolina, la cual al no ser eliminada produce una actividad continua entre las neuronas, con la consecuente pérdida de coordinación nerviosa, esto produce finalmente la muerte del insecto y mamíferos en general (Cremlyn, 1995; Lagunes y Villanueva, 1994; Restrepo, 1992).

Para conocer un poco más de la toxicidad de los organofosforados, en comparación de otros insecticidas, en la tabla 1, se presentan las siguientes dosis letales.

Tabla 1. Dosis letal media (DL<sub>50</sub>) oral aguda (OA) en rata, de algunos insecticidas organofosforados.

PRODUCTO	DL <sub>50</sub> OA (mg Kg <sup>-1</sup> de rata)
Cianuro de sodio	10
Avermectina	10
Sulfato de nicotina	50-91
Cipermetrina	247
Organofosforados:	1-2
TEPP	4-7
mevinfós	7
paratión	9-42
paratión metílico	<b>108-205</b>
<b>diazinón</b>	<b>225-740</b>
fentión	<b>885-2800</b>
malatión	<b>1125-4000</b>
stirofós	

Fuente: (Lagunes y Villanueva, 1994).

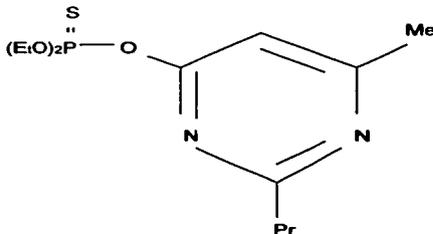
Al comparar la toxicidad de insecticidas organofosforados con tóxicos naturales, se encuentran varios de los últimos mucho más tóxicos que algunas sustancias insecticidas. Sin embargo, dentro de los organofosforados existe un intervalo muy amplio de toxicidad. La amplitud de este intervalo de toxicidad también se puede apreciar en la amplia gama de usos de este grupo de insecticidas, como son:

- 1) De amplio espectro de actividad: paratión metílico, fentión, diazinón
- 2) Sistémicos para vegetales: demetón, disulfotón, dimetoato
- 3) Sistémicos para animales: triclorfón, cruformato, famfur, coumafos

4) De corta vida residual: mevinfós, TEPP, naled (Lagunes y Villanueva, 1994)

### 2.3. GENERALIDADES DEL INSECTICIDA DIAZINÓN

El insecticida diazinón es un organofosforado, su nombre químico es 0,0-dietil 0-(2-isopropil-6-metil-4-pirimidinil) Fosforotioato, presenta la fórmula molecular:  $C_{12}H_{21}N_2O_2PS$ , y su estructura química se muestra en la figura 1. Es un insecticida que actúa por contacto, es de uso agrícola, pecuario, en jardinería y urbano.



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Figura 1: Estructura química del diazinón.

Fuente: (Roberts y Hutson, 1999)

Tiene un peso molecular de 304.3 g/mol, presenta una alta solubilidad en agua (60 mg l<sup>-1</sup> -20 °C), la presión de vapor es de 1.2 x 10<sup>-1</sup> Pa (25 °C), su punto de inflamación es de 180 °F, pertenece a la familia de los fosforotioatos.

El diazinón presenta propiedades físicas como ser una sustancia incolora, con un 90% de pureza y miscible con etanol, acetona, xileno, y soluble en petróleo.

En cuanto a su incompatibilidad se recomienda no mezclar con productos de fuerte reacción alcalina ni con fosmet, acefate, metamidofos, triclorfón, anilazina, maneb y zineb (Anónimo, 1994; Crisanto, 1996; Cornell University, 2000; IchSC, 1997; Montgomery, 1997; Novartis, 1999; Roberts y Hutson, 1999; Rossentein, 2000).

En México, el diazinón se consigue con los nombres comerciales de Basudin 25E, Basudin 4% G, Basudin 40 PH, Basudin 60CE, Diazinón 25E, Diazinón 25CE, Diazinón Dragón 25E, Diazinón Técnico 95, Diagran 5% G, Diatox 25%CE, Diazol 25 CE, Diazol 60CE, Diazol 50EW, Diazol Técnico, Fitoterra D, Granudin 4G, Hercules 5G, Horta 25 Tridente, Thor 5G, Indio 2.5% PLV, Tantor 5G, Velsidol 25 CE, Velsidol 40PH (Crisanto 1996; Hayes y Laws, 1991; Rossenstein, 2000; SARH, 1988).

El insecticida se usa con las formulaciones de aerosol, polvo, gránulado, líquido, polvos humectables, soluciones emulsivas y concentradas (Cornell University, 2000; EPA, 2000; Montgomery, 1997; Rossenstein, 2000; SARH, 1988).

El diazinón se puede encontrar en formulaciones con una variedad de otros pesticidas tales como las pyretrinas, landano y disulfotón (Cornell University, 2000). También se recomienda en mezcla con carboxin y lindano para el tratamiento de semillas (Rossenstein, 2000).

Diazinón es un insecticida con cierta acción acaricida de contacto y muestra una actividad residual bastante buena, también es lo suficientemente volátil como para ser activo contra las moscas. Es de uso agrícola, pecuario, doméstico, en jardinería y en los granos almacenados. Es efectivo contra un buen número de plagas del suelo en frutales, ornamentales, hortalizas, nemátodos, en tabaco, forraje, pastizales. También se utiliza para plagas domésticas como cucarachas y en el tratamiento de semillas (CICOPLAFEST, 1998; Crisanto, 1996; Rossenstein, 2000; SARH, 1988).

Así mismo, se aplica al follaje principalmente para combatir chicharritas, minadores de la hoja, mosca blanca, pulga saltona y araña roja (CICOPLAFEST, 1998; Crisanto, 1996; Rossenstein, 2000; SARH, 1988).

El diazinón, al igual que todos los organofosforados, actúa sobre la enzima colinesterasa, de insectos y mamíferos, que es esencial para el control de la transmisión del impulso nervioso. (Buffin, 2000; Cornell University, 2000; Lagunes y Villanueva, 1994; Red de Acción en Plaguicidas de Chile, 1998).

De acuerdo a la clasificación de la Organización Mundial de Salud (OMS) (1986) el diazinón pertenece a la categoría II (altamente tóxico) ó III (moderadamente tóxico) variando de acuerdo a su presentación, que puede ser en polvo, soluciones, granulados, polvo humectante o microcapsulado.

### 2.3.1. CULTIVOS AGRÍCOLAS DONDE SE UTILIZA EL DIAZINÓN EN MÉXICO

Los cultivos agrícolas en donde se utiliza el diazinón en México se presentan en la tabla 2 (CICOPLAFEST, 1998; Rossenstein, 2000; SARH, 1988).

Tabla 2. Cultivos agrícolas donde se utiliza el diazinón.

#### CULTIVOS HORTÍCOLAS

PLAGAS	FORMULACIÓN (%)	Dosis / ha
<b>AJO</b> -Minador de la hoja ( <i>Liriomyza spp.</i> ). -Trips ( <i>Trips tabaci</i> ), ( <i>Aelothrips major</i> ), ( <i>Frankliniella occidentalis</i> ).	Concentrado emulsionable (CE) 25 %	1 – 1.5 t/Ha
<b>APIO</b> -Araña roja ( <i>Tetranychidae</i> ). -Chinche lyngus ( <i>Lyngus spp.</i> ). -Pulgones ( <i>Aphididae</i> ).	CE 60 %	0.5 t/Ha
<b>BRÓCOLI</b> -Chinche arlequín ( <i>Murgantia histrionica</i> ). -Pulga saltona ( <i>Phyllotreta spp.</i>	CE 60 %	0.5 – 0.65 t/Ha
-Pulgón de la col ( <i>Brevicoryne brassicae</i> ).	CE 25 %	1 – 1.5 t/Ha
<b>CALABACITA</b> -Chicharritas ( <i>Empoasca spp.</i> ). -Mosquita blanca ( <i>Aleurothrixus floccosus</i> ), ( <i>Trialeurodes packordii</i> ).	CE 60 %	0.5 – 0.65 t/Ha

-Diabroticas ( <i>Diabrotica indecimpunctata</i> ).	CE 60 %	0.4 – 0.6 lt/Ha
-Minador de la hoja ( <i>Liriomyza pusilla</i> ).	CE 25 %	1 – 1.5 lt/Ha

## CEBOLLA

-Chinche lyngus ( <i>Lyngus lineolaris</i> ). -Trips ( <i>Trips tabaci</i> ), ( <i>Aelothrips major</i> ), ( <i>Frankliniella occidentalis</i> ).	(CE) 25 %	1 – 1.5 lt/Ha
-Minador de la hoja ( <i>Liriomyza spp.</i> ). -Gusano de la cebolla ( <i>Hylemya antiqua</i> ).	(CE) 25 %	1 lt/Ha

## COLIFLOR

-Chinche arlequin ( <i>Murgantia histrionica</i> ).	CE 60 %	0.5 – 0.65 lt/Ha
---	---------	---------------------

## COL Y COL DE BRUCELAS

-Chicharritas ( <i>Empoasca spp.</i> ). -Chinche arlequin ( <i>Murgantia histrionica</i> ). -Diabroticas ( <i>Diabrotica indecimpunctata</i> ). -Pulga saltona ( <i>Phyllotreta spp.</i> ). -Pulgón de la col ( <i>Brevicoryne brassicae</i> ). -Mariposa blanca de la col ( <i>Pieris rapae</i> ), ( <i>Leptophobia arpa</i> ).	CE 57 %	0.6 – 0.8 lt/Ha
---	---------	--------------------

## CHICHARO

-Araña roja ( <i>Tetranychus spp.</i> ). -Trips ( <i>Frankliniella spp.</i> ).	CE 60 %	0.5 – 0.65 lt/Ha
-Chicharritas ( <i>Empoasca spp.</i> ).	CE 50 %	0.5 – 0.65 lt/Ha
-Minador de la hoja ( <i>Liriomyza pusilla</i> ).	CE 25 %	1 – 1.5 lt/Ha
-Pulga verde ( <i>Acyrtosiphon pisum</i> ).	CE 60 %	0.4 – 0.5 lt/Ha

## CHILE

-Minador de la hoja ( <i>Liriomyza spp.</i> )	CE 25 %	1 – 1.5 t/Ha
-Mosquita blanca ( <i>Trialeurodes vaporarum</i> ). -Pulga saltona ( <i>Chaetoenema spp.</i> ), ( <i>Epitrix spp.</i> )	CE 60 %	0.5 – 0.65 t/Ha

## FRESA

-Araña ciclamina ( <i>Stenotarsonemus pallidus</i> ).	CE 25 %	4 – 5 t/Ha
-Mosquita blanca ( <i>Trialeurodes packardii</i> ).	CE 25 %	3 – 4 t/Ha
-Pulgones ( <i>Pentatrichopus fragaefolii</i> ), ( <i>Pentatrichopus jacobii</i> ).	CE 25 %	2 – 4 t/Ha
-Trips ( <i>Trips spp.</i> )	CE 25 %	2 – 3 t/Ha

## JITOMATE

-Chicharrita ( <i>Eutettix tenellus</i> ). -Diabrotica ( <i>Diabrotica variegata</i> ). -Pulgones ( <i>Aphididae</i> ). -Trips ( <i>Frankliniella tritici</i> ).	CE 25 %	1 – 1.5 t/Ha
-Mosquita blanca ( <i>Trialeurodes vaporarum</i> ).	CE 25 %	1.5 – 2.0 t/Ha
-Pulga saltona ( <i>Epitrix spp.</i> ), ( <i>Chaetoenema spp.</i> )	CE 25 %	1 t/Ha
-Minador de la hoja ( <i>Liriomyza munda</i> ).	CE 25 %	0.5 – 1 t/Ha
-Chinche pequeña del tomate ( <i>Dicyphus minimus</i> ). -Chinche brincadora ( <i>Halticus spp.</i> )	CE 25 %	1.2 – 1.6 t/Ha

## LECHUGA

-Pulgones ( <i>Pulgón myzus</i> ).	CE 25 %	1 – 1.5 t/Ha
------------------------------------	---------	--------------

<b>MELON</b>		
-Minador de la hoja ( <i>Liriomyza spp.</i> ) -Pulga saltona ( <i>Epitrix spp.</i> )	CE 25 %	1 – 1.5 lt/Ha
-Mosquita blanca ( <i>Bemisia tabaci</i> ), ( <i>Trialeurodes vaporarum</i> ).	25 %	1.2 – 1.6 lt/Ha
-Pulga del melón ( <i>Aphis gossypii</i> ).	CE 25 %	1 – 1.25 lt/Ha
<b>PAPA</b>		
-Chicharritas ( <i>Empoasca spp.</i> ) -Mosquita blanca ( <i>Trialeurodes vaporarum</i> ) -Pulga saltona ( <i>Epitrix cucumeris</i> ) -Pulgón ( <i>Macrosiphum solanipholij</i> ).	CE 60 %	0.5 – 0.65 lt/Ha
<b>PEPINO</b>		
-Minador de la hoja ( <i>Liriomyza pusilla</i> ).	CE 25%	1 – 1.5 lt/Ha
<b>SANDIA</b>		
-Minador de la hoja ( <i>Liriomyza pusilla</i> ).	CE 25 %	1 – 1.5 lt/Ha
-Mosquita blanca ( <i>Bemisia tabaci</i> ), ( <i>Trialeurodes vaporarum</i> ) -Pulga saltona ( <i>Epitrix spp.</i> )	CE 60 %	0.65 – 0.65 lt/Ha
-Pulgón del melón ( <i>Aphis gossypii</i> ).	CE 25 %	1 – 1.25 lt/Ha
<b>CULTIVOS BÁSICOS</b>		
<b>FRIJOL</b>		
-Chicharritas ( <i>Empoasca spp.</i> )	CE 25 %	1 – 1.25 lt/Ha
-Diabrotica ( <i>Diabrotica balteata</i> ).	CE 60 %	0.4 – 0.6 lt/Ha

-Mosquita blanca ( <i>Trioleurodes vaporarium</i> ).	CE 60 %	0.2 – 0.4 t/Ha
-Mosquita del frijol ( <i>Hylemia alicrura</i> ). -Trips ( <i>Caliothrips phaseoli</i> ), ( <i>Hercotrips phaseoli</i> ), ( <i>Frankliniella spp.</i> ).	CE 25 %	1 t/Ha
-Minador de la hoja ( <i>Liriomyza spp.</i> ). -Picudo del ejote ( <i>Apioh godmani</i> ).	CE 25 %	1 – 1.5 t/Ha

**MAÍZ**

-Chapulines ( <i>Brachystola magna</i> ), ( <i>Melanoplus spp.</i> ), ( <i>Speriarium spp.</i> ).	Polvo 2 %	20 – 25 kg/Ha
-Pulgón del cogollo ( <i>Rhopalosiphum maidis</i> ). -Pulgón del follaje ( <i>Schizaphis graminum</i> ).	CE 25 %	1 – 1.5 t/Ha
-Chicharritas ( <i>Dalbulus elimatus</i> ), ( <i>Dalbulus maidis</i> ). -Trips ( <i>Frankliniella occidentalis</i> ), ( <i>Frankliniella williamsi</i> ).	CE 25 %	1 – 1.25 t/Ha
-Gusano cogollero ( <i>Spodoptera frugiperda</i> ).	Granular 14 %	8 kg/Ha

**SORGO**

-Barrenador del tallo ( <i>Zeadiatraca grandiosella</i> ).	CE 60%	0.75 – 1.25 t/Ha
-Gusano cogollero ( <i>Spodoptera frugiperda</i> ).	Granular 14 %	8 kg/Ha
-Mosquita de la panoja o midge ( <i>Contarina sorghicola</i> ).	CE 25 %	1 t/Ha
-Pulgón del cogollo ( <i>Rhopalosiphum maidis</i> ). -Pulga del follaje ( <i>Schizaphis graminum</i> ).	CE 25 %	1 – 1.5 t/Ha

## SOYA

-Trips negro ( <i>Hercotrips phaseoli</i> ).	CE 25%	1.2 – 1.6 t/Ha
--	--------	-------------------

## TRIGO

-Pulgón del follaje ( <i>Schizaphis graminum</i> ).	CE 60%	0.5 t/Ha
---	--------	----------

## CULTIVOS FORRAJEROS

## ALFALFA

-Chicharritas ( <i>Aceratogalia curvata</i> ), ( <i>Empoasca abrupta</i> ).	CE 25%	1 - t/Ha
-Pulgón manchado ( <i>Theraphis maculata</i> ). -Pulgón verde ( <i>Acyrtosiphon pisum</i> ).	CE 25 %	1 – 1.5 t/Ha

## CULTIVOS INDUSTRIALES

## ALGODONERO

-Pulgón del algodón ( <i>Aphis gossypii</i> ).	CE 25%	1 - 1.25 t/Ha
--	--------	------------------

## CACAHUATE

-Chicharritas ( <i>Empoasca spp.</i> ). -Trips ( <i>Frankliniella spp.</i> ).	CE 25%	1.5 – 2 t/Ha
-Doradilla o <i>diabrotica</i> ( <i>Diabrotica spp.</i> ).	CE 25 %	1 – 1.5 t/Ha

## CAFETO

-Minador de la hoja ( <i>Leucoptera coffeella</i> ).	CE 57%	0.75 - 1 t/Ha
--	--------	------------------

## CAÑA DE AZUCAR

-Pulgón amarillo ( <i>Sipha flava</i> ).	CE 25%	0.3 t/Ha
--	--------	----------

## TABACO

-Mayate prieto ( <i>Tenebrio obscurus</i> ).	CE 25%	1.5 t/Ha
--	--------	----------

-Mosquita blanca ( <i>Bemisia tabaci</i> ).	CE 60 %	0.5 – 0.65 lt/Ha
-Pulga saltona ( <i>Epitrix hortipennis</i> ).	CE 25 %	1 lt/Ha

**FRUTALES  
CIRUELO**

PLAGAS	FORMULACIÓN (%)	DOSIS/ 100 lt DE AGUA
-Escama de San José ( <i>Quadraspidiotus perniciosus</i> ). -Frailecillo ( <i>Macroductylus spp.</i> ).	CE 25%	150 – 200 cc/100

**CÍTRICOS**

-Escama roja de california ( <i>Aonidiella aurantii</i> ). -Escama roja de florida ( <i>Chrysomphalus aonidium</i> ). -Escama amarilla ( <i>Aonidiella citrina</i> ). -Escama púrpura o escama ostión ( <i>Lepidosaphis beckii</i> ).	CE 25%	125 – 200 cc/100
-Piojo harinoso ( <i>Planococcus citri</i> ).	CE 25 %	200 cc/100
-Pulgón negro ( <i>Toxoptera aurantii</i> ). -Pulgón del algodón ( <i>Aphis gossypii</i> ).	CE 25 %	150 – 200 cc/100

**DURAZNO**

-Escama de San José ( <i>Quadraspidiotus perniciosus</i> ).	CE 25%	150 – 200 cc/100
---	--------	---------------------

**MANZANO**

-Escama de San José ( <i>Quadraspidiotus perniciosus</i> ). -Pulgón lanigero ( <i>Eriosoma lanigerum</i> ). -Pulgón verde del manzano ( <i>Aphis pomi</i> ).	CE 25%	200 cc/100
--	--------	------------

**NOGAL PECANERO**

-Barrenador de la nuez ( <i>Acrobasis coryae</i> ).	CE 25%	350 cc/100
---	--------	------------

-Barrenador de las hojas ( <i>Acrobasis jungladis</i> ).	CE 25 %	150 cc/100
-Chinche manchadora ( <i>Dysdercus spp.</i> ).	CE 25 %	250 – 350 cc/100
-Gusano tejedor o gusano de la bolsa ( <i>Hyphantria cunea</i> ).	CE 25%	350 cc/100
-Pulgón amarillo ( <i>Monellia catalis</i> ). -Pulgón negro ( <i>Melanocallis caryaefoliae</i> ).	CE 25 %	150 – 200 cc/100

## PERAL

-Escama de San José ( <i>Quadraspidiotus perniciosus</i> ). -Pulgón lanigero ( <i>Eriosoma lanigerum</i> ). -Pulgón verde del manzano ( <i>Aphis pomi</i> ).	CE 25%	200 cc/100
--	--------	------------

## PIÑA

PLAGAS	FORMULACIÓN (%)	Dosis / ha
-Piojo harinoso ( <i>Dysmicoccus brevipes</i> ).	CE 60%	0.75 – 1 t/Ha

## PLATANO

-Trips ( <i>Frankliniella párvula</i> ).	Polvo humectable 25%	1.5 – 2.0 Kg/100
--	----------------------------	---------------------

## VID

-Chicharrita de la vid ( <i>Dikrella cockerelli</i> ), ( <i>Erythroneura comis</i> ).	CE 25%	1.8 - 3 t/Ha
-Pulgón ( <i>Aphis illinoisensis</i> ).	CE 25 %	1 – 1.5 t/Ha

PLAGAS EN EL SUELO	FORMULACIÓN	Dosis / ha	OBSERVACIONES
-Gallina ciega ( <i>Pyllophaga spp.</i> , ( <i>Anomala spp.</i> , ( <i>Ciclocephala spp.</i> ), ( <i>Macroductylus spp.</i> ) -Gusano de alambre Varias especies de <i>Elatridae</i> . -Diabrotica o gusano alfilerillo ( <i>Diabrotica spp.</i> ).	Granular 4 %	25 kg/Ha	Dosis recomendadas para la aplicación en banda al momento de la siembra.  Para la aplicación total emplear la cantidad proporcional del insecticida.
-Hormiga arriera ( <i>Atta mexicana</i> ), ( <i>Atta cephalotes</i> ), ( <i>Atta texana</i> ).	Polvo 2 %	30 g/hormig uero	La aplicación debe hacerse alrededor de la boca del hormiguero
-Gusanos trozadores ( <i>Agrostis spp.</i> , ( <i>Peridroma spp.</i> ), ( <i>Prodenia spp.</i> ), ( <i>Feltia spp.</i> ), ( <i>Euxoa spp.</i> ) -Grillo de campo ( <i>Gryllus assimilis</i> ).	Granular 14 %	10 – 12 kg/Ha	Aplicación a la base de las plantas.

### 2.3.2. RESIDUALIDAD DEL DIAZINÓN EN LAS PLANTAS CULTIVADAS

El empleo de plaguicidas en los cultivos o en productos destinados al consumo humano o animal, ocasiona que con frecuencia, queden residuos en el producto cosechado o en otra fase determinada. Además, un plaguicida puede desplazarse del lugar en que se aplicó y permanecer durante algún tiempo en cualquier parte del ambiente (Anaya, 1992).

La facultad de un plaguicida de permanecer en el medio se ha considerado de vital importancia en el control de plagas y enfermedades, pero al mismo tiempo, esta característica entraña un riesgo tóxico inherente al producto empleado, sea cual fuere el mismo. Esta toxicidad y sus consecuencias inmediatas o remotas, han sido objeto de muchos estudios (Anaya, 1992).

El residuo de plaguicida se define como cualquier sustancia especificada presente en alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales como consecuencia del uso de un plaguicida. El término incluye cualquier derivado de un plaguicida, como productos de conversión, metabolitos y productos de reacción, y las impurezas consideradas de importancia toxicológica (Codex Alimentarius, 1994).

El Límite Máximo Residual (LMR) se define como la concentración máxima de residuos de un plaguicida (expresada en mg/kg), recomendada por la Comisión del Codex Alimentarius, para que se permita legalmente su uso en la superficie o la parte interna de productos alimenticios para consumo humano y de piensos.

Los LMR tienen por objeto lograr que los alimentos derivados de productos básicos que se ajustan a los respectivos LMR sean toxicológicamente aceptables (Codex Alimentarius, 1994).

El diazinón tiene una persistencia baja en el suelo, con un período que va de 2 a 4 semanas, dependiendo de las condiciones del suelo. Se puede filtrar hasta 1.3 cm de la superficie del suelo, pero en algunos casos puede moverse a través del suelo y contaminar aguas subterráneas (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1997; Cornell University, 2000).

La descomposición del diazinón en el agua varía dependiendo del pH, a un

pH = 5 se descompone en 12 días y a un pH = 7 dura hasta 138 días (Anónimo, 2001).

En las plantas, una baja temperatura y un alto contenido de aceite tiende a incrementar la persistencia del diazinón. Generalmente la vida media es rápida en vegetales frondosos, cultivos forrajeros y pastos, con un rango de 2 a 14 días. En plantas de arroz tratadas con diazinón sólo el 10% de residuos se presentó después de 9 días (Cornell University, 2000; GTI, 1995).

Se recomienda dejar tiempo entre el momento de la última aplicación y el consumo de los productos vegetales en un período que varía de 1 a 21 días (Anónimo, s.f.), ya que se han encontrado residuos del insecticida a los 20 días después de la última aplicación en frutas como la pera, fresa y hortalizas como el jitomate, haba y soya (Buffin, 2000).

Tabla 3. Límite Máximo Residual permitido para el diazinón en diferentes cultivos agrícolas en México.

CULTIVO	LÍMITE MÁXIMO RESIDUAL (LMR) (ppm)	INTERVALO DE SEGURIDAD (EN DÍAS)
AJO	0.75	10
APIO	0.7	10
BRÓCOLI	0.7	5
CALABACITA	0.75	7
CEBOLLA	0.75	10
COLIFLOR	0.7	14
COL Y COL DE	0.7	7
BRUSELAS		
CHICHARO	0.5	21
CHILE	0.5	5
FRESA	0.5	5
JITOMATE	0.75	1
LECHUGA	0.7	14
MELÓN	0.75	3
PAPA	0.1	35
PEPINO	0.75	7
SANDÍA	0.75	3
FRIJOL	0.5	7
MAÍZ	0.7	Sin límite
SORGO	0.75	7
SOYA	0.1	7
TRIGO y CEBADA	0.05	7
ALFALFA	40 alfalfa fresca	Sin límite
ALGODONERO	0.2	14
CACAHUATE	0.75	28
CAFETO	0.2	10
CAÑA DE AZUCAR	0.75	28
TABACO	Sin límite	21
CIRUELO	0.5	20
CÍTRICOS	0.7	21
DURAZNO	0.7	20
MANZANO	0.5	14
NOGAL PECANERO	0.5	No aplicar después de que el pericarpio ha empezado a abrirse
PERAL	0.5	14
PIÑA	0.5	30
PLÁTANO	0.2	Sin límite
VID	0.75	7

**TESIS CON FALLA DE ORIGEN**

Fuente: (CICOPLAFEST, 1998; SARH, 1988)

En una prueba se reportó un análisis químico de 796 muestras de fresa provenientes de Guanajuato y Michoacán en el período 1980-1984, donde se obtuvo que 574 no presentaron residuos y en 222 muestras se les encontraron 11 plaguicidas organoclorados y 15 organofosforados, entre éstos al diazinón (Crisanto, 1996).

En otro estudio se encontraron residuos del insecticida diazinón en muestras de jitomate y pepino, donde las cantidades detectadas están arriba del límite máximo de residuos establecido por la Dirección General de Sanidad Vegetal observando sus rangos para diazinón de 1.9 a 33.2 ppm (Crisanto, 1996)

La mayoría de la contaminación del diazinón viene del uso agrícola y de la aplicación en casa para controlar insectos, también puede entrar en el ambiente durante el proceso industrial. Cuando se rocía en las cosechas y plantas, pueden irse partículas tan pequeñas del químico lejos del campo o patio antes de caer a la tierra. Después de que el diazinón se ha aplicado, puede estar presente en la tierra, aguas de la superficie y en la superficie de las plantas. En el ambiente, el diazinón es rápidamente descompuesto por otros químicos. Puede moverse a través de la tierra y contaminar el agua (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1997).

En Dzidzantún, Yucatán, se aplican varios insecticidas: endosulfán, tamarón y diazinón. Este último posee la vida media más larga: doce semanas, y los residuos pueden acumularse en suelo y agua. Se determinaron y cuantificaron los residuos del insecticida diazinón en el agua subterránea de dos comunidades hortícolas. Se encontraron residuos del diazinón a nivel traza, principalmente durante la

temporada de lluvias. Esto indica que la naturaleza cársica del suelo, aunada a las descargas pluviales, coadyuva a la filtración del insecticida hacia el manto acuífero (Chab y Cobos, 2000).

Al realizar un estudio sobre residuos, se determinaron siete niveles de insecticidas organofosforados, basándose en las ventas de registro del año, entre ellos el diazinón. Los residuos del diazinón se detectaron a niveles desde 1 a 7.785 mg/kg en suelos sembrados. Así mismo, fue encontrado en zanjas de agua con una concentración promedio de 0.07 mg/l, esto es un gran problema debido al impacto potencial sobre los organismos acuáticos de estos insecticidas organofosforados, (Crisanto, 1996).

Al llevar a cabo un monitoreo de 317 muestras de alimentos, se detectó uno o más plaguicidas, siendo los más frecuentes malatión, clorpirifós metil, diazinón y clorpirifós, los cuales representaron el 77% de todos los residuos detectados, tabla 4, (Crisanto, 1996).

Tabla 4. Plaguicidas detectados en alimentos.

PRODUCTO	No. MUESTRAS CON RESIDUOS	RESIDUOS ENCONTRADOS	
		RANGO	MEDIA
- malatión	232	- a 5.1	0.05
- clorpirifós metil	103	- a 5.1	0.03
- diazinón	45	0.38	0.03
- clorpirifós	32	- 0.79	0.02

Fuente: (Crisanto, 1996).

### **2.3.3. TOXICIDAD DEL DIAZINÓN EN HUMANOS Y ANIMALES**

El efecto toxicológico del insecticida se clasifica como ligeramente tóxico a moderado tóxico, dependiendo de la formulación. Algunas formulaciones del compuesto se pueden degradar a formas más tóxicas. Esta transformación puede ocurrir en el aire, particularmente en presencia de humedad y por radiación UV. El diazinón es altamente tóxico a los pájaros, abejas y otros insectos benéficos. También es altamente tóxico a los peces de agua dulce, como las truchas. Se ha encontrado que es 100 veces más tóxico a los pájaros que a los mamíferos. La toxicidad del pesticida también puede variar grandemente entre una especie de pájaro y otra. La exposición repetida al pesticida ha llevado a efectos letales como adelgazamiento de la cáscara de huevo, reducción de peso y disminución de la población joven en una gran variedad de especies (American Bird Conservancy, s.f.; Cornell University, 2000; EPA,2000; Extension Toxicology Network, 1996; GTI, 1995; Montgomery, 1997)

Las LD50 para los pájaros van de 2.75 mg/kg a 40.8 mg/kg (Extension Toxicology Network, 1996).

Entre 1994 y 1998, se le atribuyeron más muertes de pájaros que a cualquier otro pesticida, la mayoría causada por su uso residencial (Douglas, 2001).

En 1986, la EPA prohibió su uso en áreas abiertas como granjas y campos de golf, porque constituía un peligro para las aves migratorias y a partir de marzo del 2001, no se puede usar diazinón en los hogares, pero todavía estará disponible para el uso al aire libre hasta el 2003. Si se usara el diazinón correctamente, no

habría ninguna preocupación, en exceso es veneno y realmente no se necesita usarlo (Cornell University, 2000; Douglas, 2001; EPA,2000).

Las dosis altas de diazinón dañan los riñones de animales expuestos. Perros machos expuestos al diazinón han desarrollado atrofia testicular (ECO-USA, 2002).

El diazinón es también una amenaza al salmón del Pacífico y es el pesticida encontrado más a menudo en la superficie de las aguas en los Estados Unidos, principalmente debido a su uso pesado en céspedes en donde es lavado por la lluvia y llevado por los arroyos hasta los ríos (Environmental Working Group, 2000).

En las ratas, las LD50 son 300 a 400 mg/kg de diazinón de calidad técnico. La inhalación LD50 (4-horas) en ratas es de 3.5 mg/l. En conejos, el LD50 dérmico es de 3600 mg/kg (Extensión Toxicology Network, 1996; Cornell University, 2000).

Se han observado efectos crónicos a dosis que van de 10 mg/kg/día para el cerdo a 1000 mg/kg/día para las ratas. La Inhibición de la colinesterasa en células de sangre, y la respuesta de la enzima ocurrió a dosis más bajas en las ratas (GTI, 1995; Novartis, 1999; Cornell University, 2000). La inhibición de la enzima se ha experimentado en las células de sangre, y en células del cerebro a varias dosis y con especies diferentes (Extensión Toxicology Network, 1996).

Un estudio mostró que una inyección de diazinón en huevos de pollo produce deformidades del esqueleto y de la espina dorsal en los polluelos. Un polluelo nacido de huevos tratados mostró deformidades de esqueleto pero ninguna anomalía espinal. La acetilcolina fue altamente afectada en este último estudio (GTI, 1995).

Pruebas con marmotas y conejos a dosis bajas (0.125 y 0.25 mg/kg/día) no mostraron efectos de desarrollo, mientras pruebas con perros y cerdos a los niveles más altos (1.0 y 10.0 mg/kg/día) revelaron anomalías graves (Extensión Toxicology Network, 1996).

Pruebas en ratas mayores de 2 años a dosis moderadas (aproximadamente 45 mg/kg) no causaron desarrollo de tumores en los animales de la prueba (Buffin, 2000; Cornell University, 2000; Extensión Toxicology Network, 1996)

La vida media del diazinón en animales es aproximadamente 12 horas. El producto se elimina del cuerpo a través de la orina y el excremento. Los metabolitos considerados son excretados aproximadamente en un 70% de la cantidad total. El ganado expuesto al diazinón puede guardar el compuesto en su grasa arriba del término corto. Un estudio mostró que el compuesto aclaró la leche de las vacas durante 2 semanas. La aplicación de diazinón a la piel de las vacas produce estos cambios en la leche 24 horas después de la exposición (Cornell University, 2000; Extensión Toxicology Network, 1996)

Los síntomas de envenenamiento en el ser humano incluyen dolor de cabeza, vértigo, debilidad, ansiedad, encogimiento de los ojos, no pudiendo ver claramente. Los síntomas más severos incluyen náusea y vómito, calambres abdominales, pulso lento, diarrea, dificultad respiratoria y coma. La muerte ha ocurrido en algunos casos de exposiciones cutáneas y orales en niveles muy altos. La toxicidad en el humano y animales esta asociada con la inhibición de la enzima colinesterasa. Esta enzima cataliza la hidrólisis del transmisor químico conocido como acetilcolina. El insecticida por si mismo no es inhibidor potente de la enzima, sin embargo, en el humano y animales se convierte en diazoxón (donde

la molécula del sulfuro se sustituye por una de oxígeno) un compuesto que es un inhibidor enzimático fuerte en seres humanos y animales y al inhibir esta enzima impide la destrucción de la acetilcolina, la cual al no ser eliminada se acumula en músculos, nervios y glándulas. En los músculos causa contracciones, en las glándulas causa secreción y en los nervios causa disturbios sensoriales y de comportamiento, ocasionando la pérdida de la coordinación nerviosa y produciendo la muerte (Buffin, 2000; Cornell University, 2000; Lagunes y Villanueva, 1994; Red de Acción en Plaguicidas de Chile, 1998 Restrepo, 1992).

El daño al páncreas se ha desarrollado en algunas personas y en animales de laboratorio expuestos a grandes cantidades de diazinón. En animales estudiados, las dosis altas de diazinón produjeron efectos en el sistema nervioso similar a aquellos vistos en personas (Agency for Toxic Sustances and Disease Registry, 1997; Buffin, 2000; Cornell University, 2000; ECO-USA, 2002; IchSC, 1997; Kennedy, 2002; Restrepo, 1992;:).

El diazinón es considerado mutagénico y no se ha encontrado como causante de cáncer en personas o animales. La Sección de Salud y Servicios del Humano (DHHS), la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC), y la EPA no han clasificado al diazinón en base su carcinogenicidad (Agency for Toxic Sustances and Disease Registry, 1997; Buffin, 2000; Cornell University, 2000; Extensión Toxicology Network, 1996).

Si se ingiere comida o agua que contienen diazinón, el químico puede ser absorbido por el estómago e intestinos. El diazinón también puede entrar en el cuerpo por la piel. Una vez en el cuerpo, el diazinón es rápidamente biotransformado y eliminado del cuerpo en la orina y el excremento.

Diazinón no se ha mostrado como un acelerador del aumento del tejido y casi todos los residuos se eliminan del cuerpo en 12 días, por lo que no se considera carcinógeno (Cornell University, 2000; ECO-USA, 2002).

El diazinón se encuentra en muchos vegetales que las personas comen todos los días, creando con ello muchas fuentes diferentes de exposición, tanto para personas, pájaros, peces, abejas y otros organismos. Es un neurotóxico y afecta los procesos de desarrollo. El diazinón también puede ocasionar riesgos serios a campesinos que entran en campos fumigados con este insecticida. Pueden exponerse personas que viven o trabajan en áreas de cultivo a los niveles peligrosos por los campos tratados o a través de agua (Consumer Union, 2000).

#### **2.3.4. FITOTOXICIDAD DEL DIAZINÓN**

Se considera, en general que el diazinón no causa fitotoxicidad si se utiliza en los cultivos indicados y con las dosis e indicaciones recomendadas, con respecto a esto último se recomienda no mezclarlo con productos de fuerte reacción alcalina ni con fosfet, acefate, metamidofos, triclorfon, anilazina, maneb, zineb y caldo bordeles. También se sugiere que cuando se desconozca su compatibilidad no aplicar para evitar efectos fitotóxicos (Buffin, 2000; CICOPLAFEST, 1998; Cornell University, 2000; IchSC, 1997; Montgomery, 1997;; Rossenstein, 2000). Por ejemplo mezclado con dinocap puede causar toxicidad en algunas variedades de manzana (Rossenstein, 2000).

La poca información obtenida señala que el diazinón es tóxico para plantas de nochebuena, gardenia y orquídeas (Anónimo, s.f.).

## **2.4. CICLO CELULAR Y MITOSIS EN CÉLULAS MERISTEMÁTICAS.**

### **2.4.1. CICLO CELULAR.**

El ciclo celular comprende una serie de eventos en los cuales ocurre el crecimiento y la división celular (figura 2). La duración varía de 16 a 24 horas en los vegetales, dependiendo de la especie, edad y temperatura del ambiente (Lodish, et al., 1995; Stern, 1994).

El ciclo celular comprende dos etapas: la interfase y la mitosis. Antiguamente se decía que la interfase era un estado de reposo, pero no es así, ya que es aquí donde la célula aumenta su volumen y hay una síntesis y replicación del DNA (Lodish, et al., 1995; Paniagua, 1993). La interfase se divide en tres fases que son: G1, S y G2. La fase G1 corresponde a un intervalo entre la mitosis y la iniciación de la replicación del DNA, durante ésta etapa la célula es metabólicamente activa y continuamente está creciendo pero no hay replicación del DNA, presentándose una síntesis de RNA y proteínas. En la fase S, se lleva a cabo la replicación del DNA o duplicación de los cromosomas. En la fase G2, la célula continúa una nueva etapa de crecimiento y más síntesis de RNA y proteínas, preparándose para la mitosis (Cooper, 1997; Karp, 1999; Lodish, et al., 1995).

La duración de la interfase comprende un 90% del ciclo celular, la etapa G1 es la de mayor duración con un 40-50% de la interfase, luego sigue la etapa S con un 30% y la fase G2 con un 20% (Cooper, 1997; Stern, 1994).

En el haba el ciclo celular comprende los siguientes tiempos: para G1 la duración es de 4.9 horas, la etapa S dura 7.5 horas, la etapa G2 tiene una duración de 4.9 horas y por último la mitosis con una duración de 3 horas, a una temperatura de 26 ° C. (Curtis, 1986)

Las células pueden abandonar el ciclo celular y entran en una etapa llamada G<sub>0</sub>, en donde permanecen viables y activas metabólicamente presentándose el crecimiento y diferenciación celular, pero no se dividen. La mayoría de las células nunca reinician el ciclo celular y hay otras que pueden volver a G<sub>1</sub>, continuando el ciclo celular (Klug y Cummings, 1999).

#### **2.4.2. MITOSIS.**

La mitosis es un fenómeno en el cual el material genético celular se divide en partes iguales entre las células hijas. Este proceso es sólo la parte final de un cambio subyacente que ha ocurrido en el plano bioquímico macromolecular en las restantes etapas del ciclo celular, particularmente en la etapa S (Karp, 1999; Paniagua, 1993).

En las plantas, la mitosis ocurre en regiones específicas o tejidos como son las células meristemáticas que se encuentran en los ápices de la raíz y tallo, y en los tejidos del cambium vascular (Stern, 1994).

La mitosis para su estudio se divide en cinco fases nombradas: profase, prometafase, metafase, anafase y telofase.

La profase dura aproximadamente un 40% de la mitosis, (figura 3) los cromosomas aparecen como delicados filamentos extendidos o enrollados dentro de la esfera nuclear. Cada cromosoma está compuesto por dos filamentos denominados cromátidas, que se encuentran asociados íntimamente a todo lo largo, a medida que la profase avanza, ambas cromátidas van acortándose y engrosándose (Paniagua, 1993), y están unidas por el centrómero (Karp, 1999). Con el aumento en espesor de los cromosomas, la región del centrómero se hace

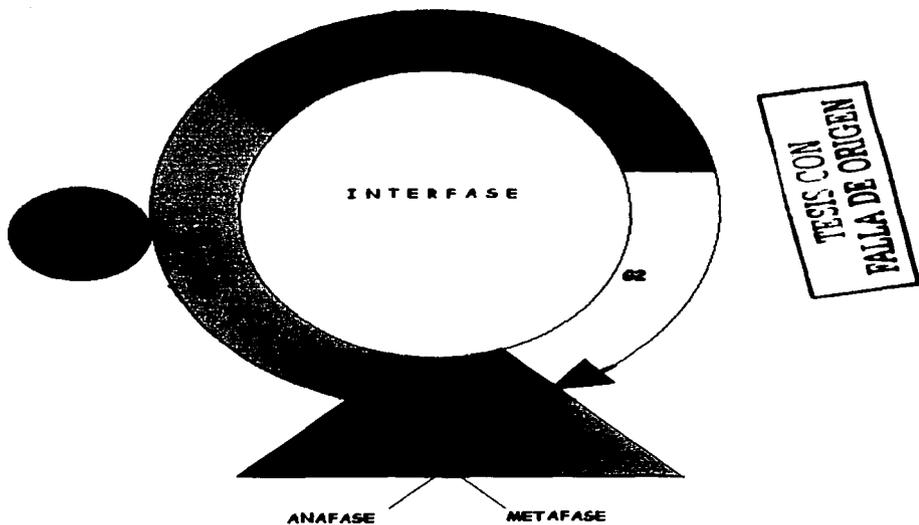


Figura 2. Ciclo celular

más acentuada hasta llegar a aparecer como una constricción. A medida que avanza la profase, los cromosomas tienden a acercarse al borde del núcleo y la membrana nuclear y el nucléolo van disgregándose (Stern, 1994). Durante la profase tiene lugar la formación del huso acromático, que se forma fuera de la envoltura nuclear (Paniagua, 1993). El huso acromático está compuesto de numerosas fibrillas orientadas longitudinalmente, cada una de ellas constituida por microtúbulos (Cronquist, 2000). La profase termina con la desorganización de la envoltura nuclear (Paniagua, 1993).

La prometafase es la transición entre la profase y metafase, dura muy poco tiempo, y consiste en que los cromosomas se desplazan hacia el ecuador o placa ecuatorial de la célula (Karp, 1999).

La metafase (figura 4) comienza cuando los cromosomas alcanzan el plano ecuatorial y se disponen irregularmente ocupando toda la superficie del plano ecuatorial y se "enganchan" a las fibras del huso acromático, a través de su centrómero (Cooper, 1997; Paniagua, 1993).

En la anafase (figura 5), se lleva a cabo la separación de las cromátidas, de cada cromosoma, hacia polos opuestos de la célula, y se denominan cromosomas hijos (Paniagua, 1993; Stern, 1994).

La telofase es la etapa final de la mitosis (figura 6), comienza con el final de la migración de los cromosomas hacia los polos. Los cromosomas comienzan a desenrollarse y se hacen cada vez menos condensados y se agrupan finalmente en masas de cromatina rodeados de segmentos discontinuos de envoltura nuclear que finalmente se fusionan para formar la envoltura nuclear completa. Al final de la telofase reaparecen los nucléolos a partir de los organizadores nucleolares

localizados en las constricciones secundarias de los satélites de los cromosomas. Los microtúbulos se reorganizan y reaparece el citoesqueleto y la forma propia de la célula (Cooper, 1997; Paniagua, 1993).

La mitosis en haba tiene una duración total de tres horas bajo determinadas condiciones de cultivo como la temperatura propia de laboratorio y humedad ambiental. La duración de las distintas fases de la mitosis a 26 °C son las siguientes: profase 95 minutos, metafase 35 minutos, anafase 23 minutos y telofase 27 minutos. (Curtis, 1986)

## **2.5. IMPORTANCIA DE LA EVALUACIÓN GENOTÓXICA.**

Las plantas están expuestas a la acción de numerosos productos agroquímicos que son tóxicos, que pueden provocar alteraciones que se presentan en el material genético de los vegetales, dichas alteraciones provocan efectos bioquímicos y fisiológicos. La exposición puede ser aguda, cuando en una sola dosis se absorben cantidades elevadas del compuesto, o crónica cuando la exposición es continua y a dosis bajas; la respuesta tóxica que se presenta depende de la concentración y características del compuesto, así como del tiempo de exposición al mismo (De Marco, et al, 1986).

Los agentes genotóxicos son sustancias que afectan principalmente el material genético de las células, con propiedades físicas y químicas que les permiten interactuar directa o indirectamente con los ácidos nucleicos y que poseen por lo tanto, actividad mutagénica. (Sawger, 1994).

Se puede prevenir el daño que ocasionan estos compuestos realizando estudios genotóxicos que permitan detectar de manera temprana el daño genético

## FASES DE LA MITOSIS EN CÉLULAS VEGETALES



Figura 3. Profase



Figura 4. Metafase



Figura 5. Anafase



Figura 6. Telofase

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

en las plantas cultivadas, tratando de evitar pérdidas en la producción y, por lo tanto, económicas (Morales, 1988).

## **2.6. DEFINICIÓN Y ANTECEDENTES DE LA PRUEBA DE MICRÓNÚCLEOS.**

Un estudio que se utiliza frecuentemente para determinar el daño de los compuestos tóxicos es la llamada prueba de micronúcleos que se encuentra entre los estudios que detectan rupturas a nivel de cromosomas, y es considerada una prueba sencilla, confiable y de alta sensibilidad para determinar el efecto genotóxico de una sustancia química. (De Marco, et al., 1986).

Los micronúcleos son corpúsculos intracitoplasmáticos de cromatina separados del núcleo principal, que se producen por la ruptura de fragmentos de cromosomas acéntricos o por cromosomas que sufren un rezago anafásico durante la mitosis, o pueden ser producidos por aberraciones cromosómicas como las deleciones simples lo cual se traduce en la aparición de micronúcleos (Chauhan, et al., 1986; Rizzoni, et al., 1987). Inclusive se menciona que los micronúcleos son un índice importante de la cantidad de fragmentos cromosómicos que se llegan a producir en las células. (Amer y Farah, 1985). Los micronúcleos también pueden ser el resultado de cromosomas enteros retrazados durante la división celular y que se pierden debido a una falla en el funcionamiento del huso acromático. (Chauhan, et al., 1986; Gustavino, et al., 1987).

Se ha encontrado que la presencia de fragmentos cromosómicos acéntricos se incrementa conforme aumenta la concentración del agroquímico y se considera que este efecto puede ser atribuido a un retraso en los periodos S o G2 del ciclo celular. (Chauhan, et al., 1986).

Los micronúcleos pueden ser observados en una gran variedad de células animales como espermatogonias, hepatocitos, linfocitos, cigotos; y en las células vegetales como en las meristemáticas de ápice y raíz.

La posibilidad de inducir micronúcleos por sustancias mutagénicas en *Vicia faba* fue descubierto en los años 50's, y posteriormente se ha ido demostrando, a través de muchos trabajos, de que la prueba de micronúcleos en *Vicia faba* tiene un amplio espectro de detección del daño mutagénico, siendo una prueba muy recomendada por su confiabilidad. (Rizzoni, et al., 1987).

El tamaño de los micronúcleos ha sido medido directamente en médula ósea de ratón, en ápices radicales de cebolla (*Allium cepa*), en linfocitos humanos y en células de hámster chino, utilizando la microfotografía, la citofotometría y el procesador de imágenes. Estos estudios permiten diferenciar el origen de los micronúcleos, por ejemplo se ha encontrado que si se originan de fragmentos cromosómicos acéntricos, los MN son pequeños, y si el origen es de cromosomas enteros rezagados, los MN son grandes. (Gustavino, et al., 1987).

El diámetro de los MN no debe exceder 1/3 del tamaño del núcleo principal. Los MN se deben localizar dentro de la pared celular, en el citoplasma, y alrededor del núcleo principal. (De Marco, et al., 1988).

Básicamente existen 2 tipos de micronúcleos llamados picnóticos y granulares. Los micronúcleos picnóticos son homogéneamente decolorados posiblemente de una degeneración. Los micronúcleos granulares son de una consistencia parecida al núcleo principal existente. (Gustavino, et al., 1987).

La posibilidad de sobrevivencia de los micronúcleos parece depender de la información genética que contienen. (Gustavino, et al., 1987).

Células con micronúcleos en contacto con el núcleo principal o con más de un micronúcleo, pueden ser resultado de expulsiones nucleares o de procesos degenerativos. (De Marco, et al., 1988).

## **2.7. IMPORTANCIA DE LA PRUEBA DE MICRONÚCLEOS.**

La prueba de micronúcleos utilizando células meristemáticas de raíz de haba (*Vicia faba*) como sistema biológico de detección, es de gran utilidad para mostrar y medir el potencial genotóxico de sustancias químicas, medios sólidos y acuosos, y es considerada como una técnica sencilla, rápida y ampliamente usada en diversos lugares con diferentes ambientes y contaminantes, tanto en condiciones de laboratorio o in situ (Ji, et al., 1999; Ma, et al., 1995).

La prueba de micronúcleos en células meristemáticas de raíz de haba (*Vicia faba*) consiste en obtener células y exponerlas a un determinado tiempo con los compuestos químicos a evaluar, para posteriormente cortar los ápices radicales, tratarlos con una solución fijadora y teñirlos para su observación al microscopio y cuantificar el número de micronúcleos y fases mitóticas (Cabrera y Rodríguez, 1999).

La prueba de micronúcleos también se puede efectuar en otras plantas autorizadas y validadas como biomonitores como son la cebolla (*Allium cepa*), *Tradescantia spp* y *Arabidopsis thaliana*. Estas especies son sensibles a los posibles efectos genotóxicos inducidos por sustancias químicas (Cabrera y Rodríguez, 1999; Rodríguez, et al., 1998; Sandhu, et al., 1994).

El International Programme on Chemical Safety (IPCS) tiene un programa para el monitoreo ambiental que es el International Programme on Plant Bioassays

(IPPB) creado para el monitoreo y observación de agentes genotóxicos en un ambiente contaminado, realizando una inspección de la genotoxicidad de contaminantes en aire, agua y suelo, utilizando la prueba de micronúcleos en cualquiera de las especies antes mencionadas (Grover y Satwinderjeet, 1999).

En la República Popular China, desde el año de 1980, se ha establecido la prueba de micronúcleos como bioensayo oficial de genotoxicidad de contaminantes en el aire, agua y suelo (Gopalan, 1999). También se esta utilizando la prueba, para medir la genotoxicidad en organismos expuestos a mezclas de compuestos químicos, o por la radiación de rayos ultravioleta; además, se utiliza para detectar genotoxicidad de metales pesados en el ambiente, suelos y aguas contaminadas (Minissi y Lombi, 1997; Wang, 1999).

## **2.8. EL HABA (*Vicia faba* L.) COMO SISTEMA BIOLÓGICO.**

El haba es un sistema biológico muy útil para la detección de la actividad genotóxica de los contaminantes ambientales. Es un sistema barato, de fácil manejo, de fácil adquisición y no requiere equipo sofisticado ni condiciones estériles. Presenta pocos cromosomas ( $2n = 12$ ) que son muy grandes y perfectamente visibles. Tiene una fracción metabólica S10 que es capaz de transformar sustancias promutágenas en mutágenas, aspecto muy importante ya que muchos compuestos químicos que no son mutágenos por si mismos, requieren de un metabolismo animal o vegetal para activarse y provocar daños al DNA (Gómez y Villalobos, 1997; Gómez, et al., 1997; Grant, 1994).

### **3. MATERIALES Y METODOS**

#### **3.1. MATERIAL BIOLÓGICO**

- Hoja seca y molida de ruda (*Ruta graveolens*).
- Semilla de haba (*Vicia faba*).

#### **3.2. MATERIALES Y REACTIVOS**

- Vermiculita.
- Vasos de precipitados de 100, 250, 500 y 1000 ml.
- Cajas de Petri.
- Pipetas de 1 y 5 ml.
- Pipetas pasteur.
- Micropipeta de 50  $\mu$ l
- Matraz erlenmeyer de 250 y 500 ml.
- Tubos ensaye de 10 ml.
- Agitadores de vidrio.
- Embudo de vidrio.
- Mechero de gas.
- Autoclave.
- Liofilizadora.
- Bomba de vacío.
- Vasos viales.
- Báscula granataria.
- Agujas de disección.

- **Bisturf.**
- **Mortero.**
- **Microscopio óptico.**
- **Vidrio de reloj.**
- **Cubreobjetos.**
- **Portaobjetos.**
- **Hipoclorito de sodio.**
- **Alcohol etílico.**
- **Agua destilada.**
- **Ácido acético glacial.**
- **Solución tampón-citrato pH = 4.2.**
- **Enzima pectinasa 0.5%.**
- **Ácido clorhídrico 5 N.**
- **Colorante aceto – orceína.**
- **Xitol.**
- **Resina.**
- **Tween 20.**
- **Metanol.**
- **Acetona.**
- **Hexano.**
- **Acetato de etilo.**
- **Dimetil sulfóxido.**

### **3.3. METODOLOGIA**

#### **3.3.1. OBTENCIÓN DE LA RUDA**

Primeramente se realizó un recorrido por el mercado de flores de Xochimilco en donde se compraron plantas de ruda con una edad de tres meses. Posteriormente las plantas se secaron colgándolas "cabeza abajo" por un período de 21 días, evitando que el sol les diera directamente. Después se separaron las hojas, se trituraron en un mortero, y se guardaron en un frasco de vidrio para su posterior uso.

#### **3.3.2. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO DE RUDA**

La obtención de los extractos de ruda se realizó en el laboratorio de Química Medicinal de la FES Cuautitlan. Para la preparación de los extractos se utilizaron cuatro diferentes solventes, que fueron metanol, acetona, hexano y acetato de etilo, según la siguiente metodología:

- Se pesó el total de las hojas secas y molidas de ruda (*Ruta graveolens*).
- La cantidad total se dividió en cuatro porciones (resultando 17.5 g por porción).
- Cada porción se mezcló con un solvente que contenía un volumen de 150 ml.
- Se dejaron reposar las mezclas por un período de 48 horas, agitándolas en varias ocasiones.
- Concluido el tiempo, se filtraron las soluciones en dos ocasiones para eliminar impurezas.

- Las soluciones ya filtradas se evaporaron en un rotovapor para eliminar el solvente.
- El extracto obtenido se vació en frascos viales previamente pesados.
- Los frascos viales se dejaron durante 24 horas en una bomba de vacío para eliminar totalmente el solvente correspondiente.
- Para saber la cantidad de extracto obtenido se pesaron nuevamente los frascos viales y por medio de una diferencia se determinó la cantidad de material obtenido.

Preparación de las concentraciones del extracto de ruda para el análisis antigenotóxico:

- Los extractos obtenidos se disolvieron en 2 ml de dimetilsulfóxido.
- Después se procedió a preparar las concentraciones establecidas de 500 y 1000 ppm para cada uno de los extractos.

### **3.3.3. REALIZACIÓN DE LA PRUEBA DE MICRONÚCLEOS**

Para la determinación de frecuencia de micronúcleos e Índice mitótico, las pruebas fueron realizadas en el laboratorio de Genética Vegetal de la carrera de Ingeniería Agrícola de la FES Cuautitlan.

La concentración del diazinón fue de 12 ppm que, en un ensayo preliminar se reportó como tóxica a las plantas.

Las concentraciones de ruda fueron de 500 y 1000 ppm para cada uno de los extractos obtenidos con los diferentes solventes.

Estas concentraciones del diazinón y extractos de ruda fueron utilizadas en la prueba de micronúcleos para determinar si presentaban algún efecto genotóxico o

antigenotóxico respectivamente, para esto se utilizó como sistema biológico células meristemáticas de raíz de haba (*Vicia faba L.*) con la siguiente metodología.

1.- Desinfección de semillas. Se lavaron con agua de la llave; posteriormente en 400 ml de agua destilada se agregaron 46 ml de cloro y 7 gotas de Tween 20 y se agitaron durante 20 minutos.

2.- Primeramente, las semillas se dejaron hidratando durante 12 horas en recipientes que contenían los extractos de ruda, así como también, las semillas que correspondieron al testigo, que se dejaron en agua destilada, y al control positivo, que se pusieron en la solución del diazinón; Posteriormente, las semillas que correspondieron a los tratamientos combinados de extracto + diazinón, se pasaron a otros recipientes que contenían la solución del insecticida y ahí permanecieron otras 12 horas.

3.- Las semillas de haba se sembraron en cajas de Petri, utilizando como sustrato vermiculita.

4.- Las semillas se mantuvieron en condiciones de temperatura ambiente hasta que tuvieron una longitud de 2 a 3 cm, procediendo a cortar los ápices de una longitud aproximada de 3 mm. Los ápices se fijaron en una solución de etanol-ácido acético en proporción 3:1, durante 24 horas.

5.- Los ápices ya fijados se transfirieron a una solución de etanol al 70% durante 15 minutos.

6.- Los ápices se lavaron con una solución tampón citrato con un pH de 4.2.

7.- Se incubaron en pectinasa 0.5% durante una hora a 37 °C.

8.- Los ápices de haba se dejaron en el HCl 5N durante 10 minutos a temperatura ambiente.

9.- Se efectuó la maceración de los ápices usando agujas de disección.

10.- Se colocó una gota de colorante aceto-orceína, se dejó secar al aire y se quitó el exceso con papel secante.

11.-Se colocó el cubreobjetos y se realizó el aplastado aplicando la técnica llamada "squash".

12.- Se observaron las preparaciones al microscopio.

### **3.4. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para la determinación de la frecuencia de micronúcleos e Índice mitótico se utilizó un diseño experimental completamente al azar en donde se evaluaron 18 tratamientos (Tabla 5), cada uno constó de 5 repeticiones. Por cada repetición se contaron 200 células, para dar un total de 1000 células por tratamiento indicando cuantas células presentaron micronúcleos y cuantas se encontraban en alguna fase mitótica.

Los criterios para seleccionar células micronucleadas fueron:

- 1.- Que las preparaciones presentaran una buena tinción.
- 2.- Los micronúcleos debían distinguirse como pequeños corpúsculos circulares bien definidos con una coloración roja característica.
- 3.- Los micronúcleos deberían de tener un diámetro que no excediera 1/3 del tamaño del núcleo principal y que estuvieran localizados dentro de la pared celular y en el área del citoplasma circundante al núcleo principal.

4.- Los micronúcleos no debían mostrar refractibilidad, es decir, que al momento de mover el micrométrico del microscopio, el objeto no debía desaparecer o pasar a otro plano ya que si éste se presentaba se excluía como micronúcleo.

#### **Análisis Estadístico.**

Para realizar el análisis estadístico se utilizó el programa INSTAT2 versión 2.03, para evaluar la frecuencia de micronúcleos e índice mitótico. El diseño experimental fue completamente al azar, se utilizó un análisis de varianza con la finalidad de determinar la diferencia entre los tratamientos y a continuación se compararon los tratamientos por medio de la prueba de significancia de Tukey –Kramer con una probabilidad de 0.05 y 0.01.

Tabla 5. Tratamientos evaluados para la determinación de micronúcleos e índice mitótico.

TRATAMIENTO
Testigo
Diazinon 12 ppm
Extracto de metanol 500 ppm
Extracto de metanol 1000 ppm
Extracto de metanol 500 ppm + diazinon 12 ppm
Extracto de metanol 1000 ppm + diazinón 12 ppm
Extracto de acetona 500 ppm
Extracto de acetona 1000 ppm
Extracto de acetona 500 ppm + diazinon 12 ppm
Extracto de acetona 1000 ppm + diazinon 12 ppm
Extracto de hexano 500 ppm
Extracto de hexano 1000 ppm
Extracto de hexano 500 ppm + diazinon 12 ppm
Extracto de hexano 1000 ppm + diazinon 12 ppm
Extracto de acetato de etilo 500 ppm
Extracto de acetato de etilo 1000 ppm
Extracto de acetato de etilo 500 ppm + diazinon 12 ppm
Extracto de acetato de etilo 1000 ppm + diazinon 12 ppm

#### 4. RESULTADOS

Se realizó el análisis estadístico de los resultados obtenidos efectuando primeramente el análisis de varianza para la frecuencia de micronúcleos e índice mitótico para determinar el grado de significancia entre los tratamientos evaluados presentándose una diferencia altamente significativa en ambos parámetros estudiados (Tablas 6 y 7).

Tabla 6. Análisis de varianza para la frecuencia de micronúcleos.

FUENTES DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO
TRATAMIENTOS	17	110.90	6.524
ERROR	72	129.20	1.794
TOTAL	89	240.10	

F = 3.635

Tabla 7. Análisis de varianza para la frecuencia del índice mitótico.

FUENTES DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO
TRATAMIENTOS	17	11500	676.46
ERROR	72	4521.2	62.794
TOTAL	89	16021	

F = 10.773

Se efectuó la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer para conocer la diferencia estadística entre los tratamientos evaluados tanto en la frecuencia de micronúcleos e índice mitótico.

Los resultados obtenidos para la frecuencia de micronúcleos, en todos los tratamientos evaluados, con el insecticida diazinón y con los diferentes extractos de ruda, se muestran en la tabla 8 y en la figura 7, en donde se puede observar que el tratamiento con la concentración de 12 ppm del insecticida presentó el mayor número de células micronucleadas (Figura 9) indicando que el diazinón es un agente clastogénico obteniéndose una diferencia estadística altamente significativa con respecto al testigo o control negativo. Por otra parte, comparando el testigo con los demás tratamientos no hubo diferencia estadística, ya que no aumentó la frecuencia de micronúcleos, confirmando que todos los extractos de ruda no son genotóxicos, además se manifestó que las concentraciones de los extractos demostraron no ser tóxicas a las células, sin presentar alguna alteración observable en éstas. También, los tratamientos con los extractos, presentaron una diferencia estadística significativa en comparación con el tratamiento del diazinón, a excepción del extracto de acetato de etilo en sus dos concentraciones más el diazinón, en donde no se observó una diferencia estadística. Comparando los tratamientos de los extractos solos y los que contenían el diazinón no se presentaron diferencias estadísticas, lo cual indica que los diferentes extractos si actúan como agentes antígenotóxicos.

Con respecto al índice mitótico los resultados (Figuras 10,11,12 y 13), mostrados en la tabla 9 y en la figura 8, indican que comparando, el tratamiento del diazinón sólo con el testigo y los demás tratamientos, no presentaron

diferencia estadística. Esto indica que el diazinón por sí sólo no afecta el índice mitótico de las células meristemáticas del haba.

Comparando el testigo con todos los tratamientos que contenían los extractos de ruda únicamente, no existió diferencia estadística, lo que indica que los extractos por sí solos no interfieren con la frecuencia de división celular. También, comparando el testigo con los tratamientos de extractos de ruda más el diazinón, los resultados señalan que si existió una diferencia estadística significativa, lo que manifiesta que el insecticida en combinación con los extractos si afectan la división mitótica de las células de haba, a excepción de los tratamientos de hexano y acetato de etilo a 1000 y 500 ppm, respectivamente, más el diazinón, que no mostraron una diferencia estadística.

Los resultados obtenidos, entre los tratamientos con extractos unicamente y con los extractos más el diazinón, mostraron una diferencia estadística, lo que también indica que el insecticida combinado con los diferentes extractos si alteran la división celular.

Por otra parte, comparando entre si los tratamientos con extractos unicamente, los resultados que se obtuvieron no presentaron diferencia estadística. Esto señala que los extractos de ruda en su actividad antigenotóxica no interfieren en el proceso de división celular.

Tabla 8. Frecuencia de micronúcleos en los diferentes tratamientos evaluados.

TRATAMIENTO	REPETICIÓN					TOTAL	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTANDAR
	I	II	III	IV	V			
Testigo	0	0	1	1	0	2	0.4	0.54
Diazinon 12 ppm	7	8	3	3	4	25	5	2.34
Metanol 500 ppm	0	1	0	1	1	3	0.6	0.54
Metanol 1000 ppm	0	1	1	0	0	2	0.4	0.54
Metanol 500 ppm + diazinon 12 ppm	2	1	0	3	1	7	1.4	1.14
Metanol 1000 ppm + diazinon 12 ppm	1	0	2	0	2	5	1	1.0
Acetona 500 ppm	0	0	2	1	0	3	0.6	0.89
Acetona 1000 ppm	0	0	1	2	0	3	0.6	0.89
Acetona 500 ppm + diazinon 12 ppm	1	1	2	4	0	8	1.6	1.51
Acetona 1000 ppm + diazinon 12 ppm	3	3	2	1	0	9	1.8	1.30
Hexano 500 ppm	0	0	2	1	0	3	0.6	0.89
Hexano 1000 ppm	1	0	1	0	0	2	0.4	0.54
Hexano 500 ppm + diazinon 12 ppm	0	0	1	4	0	5	1	1.73
Hexano 1000 ppm + diazinon 12 ppm	1	0	3	2	1	7	1.4	1.14
Acetato de etilo 500 ppm	0	0	1	1	0	2	0.4	0.54
Acetato de etilo 1000 ppm	0	0	2	0	0	2	0.4	0.89
Acetato de etilo 500 ppm + diazinon 12 ppm	0	2	1	7	1	11	2.2	2.77
Acetato de etilo 1000 ppm + diazinon 12 ppm	3	5	3	0	1	12	2.4	1.94

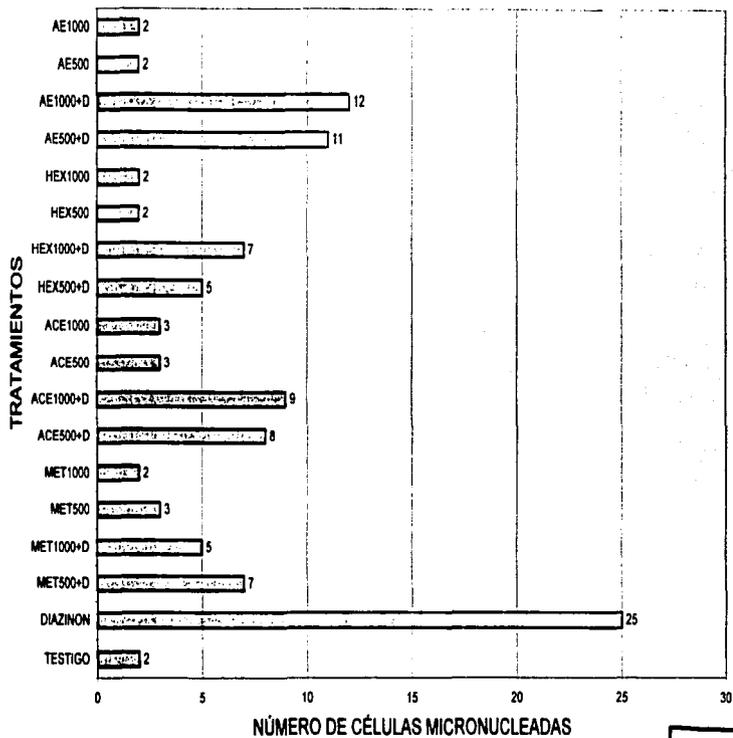


Figura 7. Frecuencia de micronúcleos

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Tabla 9. Frecuencia del Índice Mitótico de los diferentes tratamientos evaluados.

TRATAMIENTO	REPETICIÓN					TOTAL	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTANDAR
	I	II	III	IV	V			
Testigo	47	35	42	59	57	240	48	10.1
Diazinon 12 ppm	38	29	33	45	21	166	33.2	9.06
Metanol 500 ppm	58	40	39	36	21	194	38.8	13.18
Metanol 1000 ppm	44	46	47	41	57	235	47	6.04
Metanol 500 ppm + diazinon 12 ppm	14	19	24	19	26	102	20.4	4.72
Metanol 1000 ppm + diazinon 12 ppm	14	13	27	7	20	81	16.5	7.59
Acetona 500 ppm	46	28	46	39	38	197	39.4	7.40
Acetona 1000 ppm	54	41	46	56	43	240	48	6.67
Acetona 500 ppm + diazinon 12 ppm	18	4	20	17	28	87	17.4	8.64
Acetona 1000 ppm + diazinon 12 ppm	18	17	20	8	14	77	15.4	4.66
Hexano 500 ppm	46	57	38	61	39	241	48.2	10.42
Hexano 1000 ppm	37	29	35	42	33	176	35.2	4.81
Hexano 500 ppm + diazinon 12 ppm	5	14	24	29	28	100	20	10.27
Hexano 1000 ppm + diazinon 12 ppm	23	34	41	30	26	154	30.8	7.05
Acetato de etilo 500 ppm	42	36	51	40	37	206	41.2	5.97
Acetato de etilo 1000 ppm	34	47	31	49	43	204	40.8	7.95
Acetato de etilo 500 ppm + diazinon 12 ppm	42	30	28	31	27	159	31.6	6.02
Acetato de etilo 1000 ppm + diazinon 12 ppm	34	19	31	24	23	131	26.2	6.14

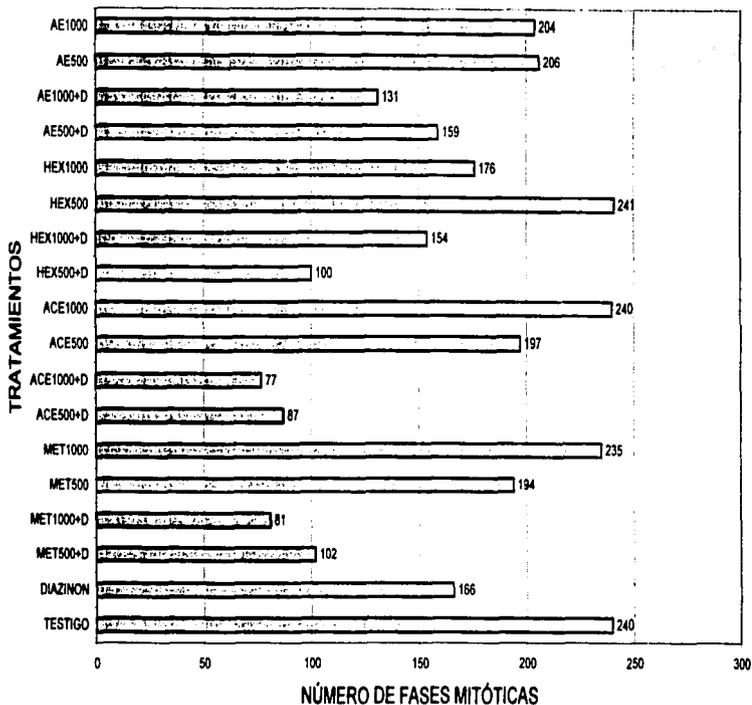
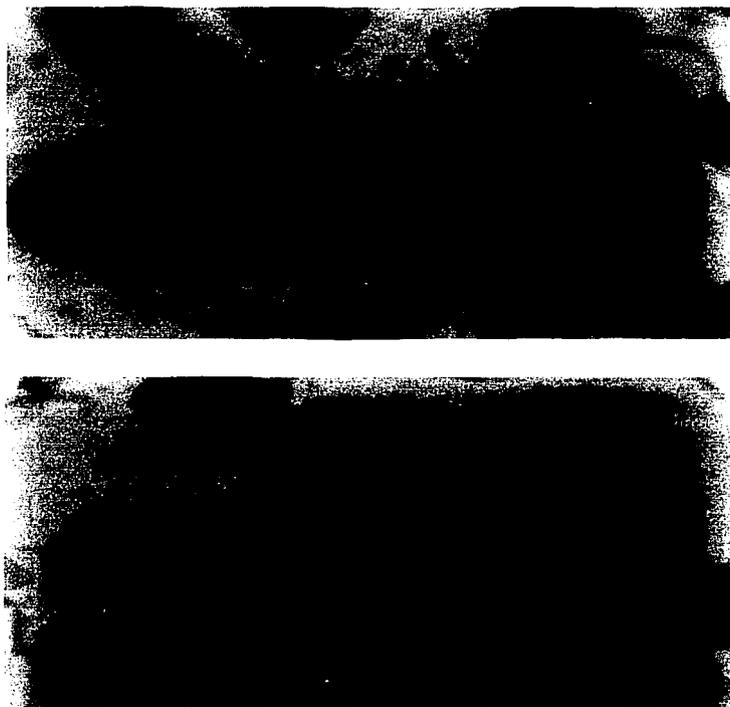


Figura 8. Frecuencia de Índice mitótico

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 9. Células de haba (*Vicia faba L.*) con micronúcleos inducidos por el insecticida diazinón.

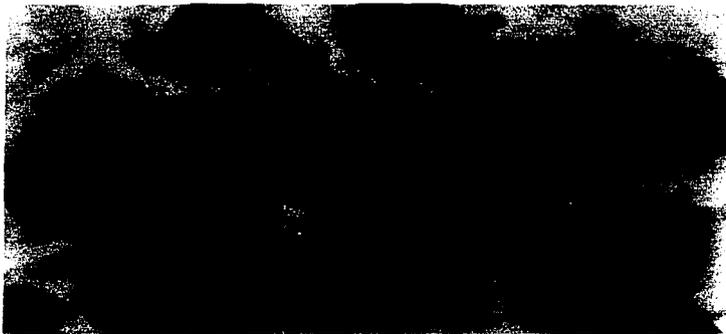


Figura 10. Célula de haba (*Vicia faba L.*) en profase.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Figura 11. Célula de haba (*Vicia faba L.*) en metafase.



Figura 12. Célula de haba (*Vicia faba* L.) en anafase.



Figura 13. Célula de haba (*Vicia faba* L.) en telofase.

TESIS CON  
... A DE ORIGEN

## 5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Es muy conocido que desde hace mucho tiempo la planta de ruda se ha utilizado para curar diferentes enfermedades en el humano, sin haber presentado ningún efecto nocivo (Aranda, 1996; Argueta, 1994; Baytelman, 1993; Cabrera, 1992; Martínez, 1994). También se ha mencionado en diversas investigaciones que la misma planta presenta propiedades bioplaguicidas (Ahmed, et al., 1981; Arango, 1994; Bonilla, 1994; García, 1992; Mancebo, 1998; Sasanelli y D'Addabbo, 1992a). En base a lo anterior se procedió a determinar si los diferentes extractos de ruda podrían tener efectos antígenotóxicos calculando la frecuencia de micronúcleos e índice mitótico. Para dicho estudio se utilizó el insecticida diazinón como testigo positivo, por conocer que este compuesto es un buen inductor de micronúcleos (Bianchi, et al., 1997; De Ferrari, et al., 1991; Pastor, et al., 2001; Sobti, et al., 1982).

Como se mencionó en la metodología la concentración de diazinón que se utilizó fue de 12 ppm, la cual se seleccionó de experiencias previas realizadas en el laboratorio de citogenética, en donde se demostró la genotoxicidad del diazinón en células meristemáticas de raíz de haba, al utilizar diferentes concentraciones del compuesto, y diferentes tiempos de exposición del insecticida sobre las semillas de haba. Esto coincide con los reportes de otros autores quienes establecen el efecto genotóxico del diazinón, a diferentes dosis, en otros cultivos celulares (Bianchi, et al., 1997; De Ferrari, et al., 1991; Pastor, et al., 2001; Sobti, et al., 1982).

Los resultados confirman que el diazinón si es un buen agente genotóxico, al obtener un promedio de 5 células micronucleadas por repetición, como se muestra en la tabla 8.

La alta toxicidad del diazinón a concentraciones bajas podría explicarse debido a que es muy alto el poder de penetración del insecticida en las células afectando rápidamente el metabolismo de éstas.

No se han encontrado estudios *in vitro* e *in vivo* en donde se relacione la inhibición de daño genético con tratamientos en los que se usen extractos de ruda, pero existen estudios realizados con otras plantas medicinales en donde se ha evaluado su capacidad antigenotóxica, en diferentes cultivos celulares (Brockman, *et al*, 1992; Bu-Abbas, *et al*, 1996; Catterall, *et al*, 1998; Hemaiez, *et al*, 1998; Hui-Yin y Gow-Chin, 1997; Pérez y Hurtado, 1997; Takeshi, *et al*, 2001), por lo que se procedió a efectuar este ensayo para estudiar si la planta de ruda presenta propiedades antigenotóxicas.

Para el ensayo antigenotóxico, en la tabla 8 se puede observar que los extractos de ruda, solos y los que presentan el insecticida, en las concentraciones empleadas de 500 y 1000 ppm, no aumentaron el número de micronúcleos, no existiendo diferencia estadística significativa con respecto al testigo o control negativo. También se observaron los mismos resultados en la comparación de los tratamientos de los extractos solos con los que contenían el diazinón.

En los resultados se encontró que el número de células micronucleadas en las dos concentraciones evaluadas, para todos los tratamientos con extracto, no varía

significativamente, por lo que no se puede decir que exista una relación proporcional entre dosis y respuesta.

El estudio de las dosis de los extractos de ruda aquí presentados demostraron no ser tóxicas para las células meristemáticas de raíz de haba, sin presentar alguna alteración observable en las células. Lorke (1988), en su trabajo menciona que un compuesto al no producir algún efecto a la dosis estudiada, es considerado como atóxico, es decir, que no ocasiona algún efecto toxicológico.

Analizando los resultados anteriores, se dedujo, que los extractos de ruda pueden ser candidatos para probarse como agentes antígenotóxicos, ya que los resultados, también confirman que los extractos no son genotóxicos al presentar un número de micronúcleos similares al del testigo o control negativo, los cuales no son estadísticamente significativos con respecto a éste.

Los extractos solos en las concentraciones probadas no aumentaron el número de micronúcleos, estos valores son muy similares a los del control negativo, lo cual concuerda con otros estudios que argumentan que los compuestos provenientes de extractos vegetales tienen una amplia variedad de efectos benéficos y que no conducen a un daño celular ni genético (Atta y Alkofahi, 1998; Muñoz, et al, 2001; Trovato, et al, 1996; Ulubelen, 1994).

Por otra parte, la disminución en el número de micronúcleos, en todos los tratamientos que presentaban el extracto más el diazinón, se debe a que los compuestos químicos presentes en la ruda, por diferentes mecanismos protegen o disminuyen el daño genético, y en si el número de micronúcleos producidos por el insecticida diazinón.

El mecanismo de acción, por el cual los extractos de ruda disminuyen el número de micronúcleos, es propuesto en base a los constituyentes químicos de los mismos extractos, a los cuales se les debe demostrar su capacidad antigenotóxica, por lo que es necesario realizar el estudio fitoquímico preliminar de los extractos para demostrar que diversos compuestos químicos contienen y definir que componentes son responsables de la naturaleza protectora que puedan presentar los diferentes extractos de ruda que se evaluaron.

En diferentes estudios fitoquímicos realizados en la ruda, se ha descrito que las hojas contienen como principios activos aceites esenciales, flavonoides, cumarinas (psolareno, bergapteno, xantoxina, chalepin, chalepsin), alcaloides (arborinina, rutamina, graveolinina, graveolina, furoquinolina, T-fagarina, acridona, quinolina, acridona, rutacridona, dihydrofuroacridona, gravacridonediol acetato), táninos, glicosidos (rutina, cinidiosida A, 3'-6-dinisapolisucrosa, pircraquasiosida A), terpenoides (derivados de bergatomina), además de ácidos cáprico, plagónico y caprílico (Atta y Alkofahi, 1998; Chen, et al., 2001; Mancebo, et al., 2000; Ojala, et al., 2000; Paulini, et al., 1991; Ulubelen, 1994; Wessner, et al., 1999).

Diversos estudios fitoquímicos de la ruda, han demostrado que su actividad bioplaguicida es debido, principalmente, a la presencia de flavonoides, y aceites esenciales (De Paula y Martins, 2000; Duval, 1992; Echeverri, 1987; García, 1992; Mancebo, et al., 2000; Mora, 1993; Sasanelli, 1995; Valadez, 1987). También, se considera que las cumarinas, aceites esenciales y flavonoides pueden ser responsables de una actividad antimicrobiana (De Paula y Martins, 2000; Guarrera, 1999; Ojala et al., 2000; Ramesh, et al., 2002; Wessner, et al., 1999).

Pero, se necesitan investigaciones más profundas para identificar que componentes están presentes en los extractos de ruda, de acuerdo con los solventes que se utilizaron, para posteriormente deducir su mecanismo de acción y determinar que principios activos son los que intervienen en la actividad antigenotóxica, ya que los resultados encontrados pueden explicarse por un proceso multifactorial, debido a que en los extractos puede haber más de una sustancia que tenga una acción antigenotóxica como pueden ser los flavonoides (Bu-Abbas, et al, 1996) y los alcaloides, como la quinolina (Hernaiz, et al, 1998; Hui-Yin y Gow-Chin, 1997;).

Con respecto a la frecuencia del índice mitótico, los resultados señalan que, el tratamiento del diazinón sólo y los tratamientos con los extractos únicamente, no afectaron la división celular, pero los tratamientos de los extractos más el insecticida si afectaron la división mitótica de las células meristemáticas de haba. Estos resultados se debieron posiblemente a que en las raíces, las zonas establecidas en el esquema clásico (cofia, meristemo, zonas de alargamiento y diferenciación) no tienen límites definidos porque cada grupo de células tienden a actuar con independencia, pero existen unos puntos llamados de transición (Rost, 1994; Rost y Bryant, 1996). Estos puntos pueden ser diferentes en la epidermis, la corteza y el cilindro vascular. Se considera que en cada grupo de células hay contactos o señales que indican donde se dividen las células, donde cesan de dividirse, donde se alargan y cuando se diferencian (Rost, 1994). No se conoce con exactitud que sucede en un punto de transición, pero se cree que debe haber una activación y desactivación de genes específicos que intervienen en el ciclo celular, y que pueden separarse en tres categorías: genes que codifican enzimas

que controlan eventos específicos del ciclo celular, como las enzimas de replicación del DNA, genes relacionados con la regulación del ciclo celular y genes involucrados en la especificación de la identidad del meristemo (Rost y Bryant, 1996).

Se supone que el insecticida diazinón y los componentes de los extractos de ruda, no ocasionan daño en el funcionamiento de estos genes, ya que se tuvo un equilibrio dinámico en las células meristemáticas, es decir, el número de células que entran a división es proporcional al número de células que entran a un alargamiento y diferenciación, estableciéndose un índice mitótico con un valor constante que varía entre 17.6 y 24%, para el caso del haba, lo cual coincide con el índice mitótico reportado en diversos estudios (Bautista, 2002; Moreno, 2001).

La combinación del insecticida más los extractos, tal vez, si afectaron el funcionamiento de alguno(s) de los genes, ocasionando que las células meristemáticas que debían entrar en división no lo hagan, saliendo del ciclo celular y entren a una etapa llamada G0, la cual representa un período de tiempo en que la célula empieza el alargamiento y diferenciación celular, todo esto ocasionando el rompimiento del equilibrio dinámico, de manera que el número de células que pasan a un alargamiento y diferenciación supera a las células que entran en división y que, por lo tanto, disminuya la frecuencia del índice mitótico en estos tratamientos.

Es necesario realizar estudios más profundos, para determinar con seguridad, si la combinación de diazinón más extractos, afectan la actividad de estos genes en el ciclo celular.

## 6. CONCLUSIONES

- El insecticida diazinón a la concentración de 12 ppm fue un fuerte inductor de células micronucleadas, confirmando su efecto clastogénico.
- Los diferentes extractos de ruda en las concentraciones estudiadas de 500 y 1000 ppm, no presentaron actividad genotóxica ni citotóxica.
- En el ensayo antigenotóxico, la mayoría de los extractos de ruda en sus dos concentraciones evaluadas, disminuyeron el número de micronúcleos en las células expuestas al diazinón.
- Los tratamientos del extracto con acetato de etilo, en las dos concentraciones más el diazinón, no presentaron una actividad antigenotóxica, lo que indica que los componentes de la ruda que se obtuvieron con éste solvente no actúan como inhibidores del daño genotóxico ocasionado por el insecticida.
- Los tratamientos del diazinón sólo y de los extractos únicamente, en sus dos concentraciones, no afectaron el índice mitótico de las células meristemáticas de la raíz de haba.
- La combinación de los extractos de ruda más el insecticida diazinón si alteran el índice mitótico de las células meristemáticas, ocasionando que la mayoría de las células entren rápidamente a la etapa de crecimiento y diferenciación celular.

## **7. RECOMENDACIONES.**

- Es recomendable realizar este tipo de estudio más profundamente para verificar si la planta de ruda presenta una acción antígenotóxica en contra de agroquímicos.
- Se tiene que hacer previamente el estudio fitoquímico de los extractos de la planta, obtenidos con los diferentes solventes, para conocer que principios activos presenta y determinar cual(es) intervienen en la actividad antígenotóxica.
- Hay que considerar como influyen factores como la luz, temperatura, y la humedad, sobre la efectividad de los extractos de ruda, para utilizarlos en ensayos antígenotóxicos
- Es necesario conocer la etapa fenológica de la planta, así como la época del año y el lugar en donde se encuentren las especies a probar, ya que puede haber variación en cuanto a la concentración, distribución y presencia de los principios activos.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- 1) -Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 1997. Tox FAQs for Diazinon Division of Toxicology. Atlanta, GA. <http://www.atsdr.edc.gov/facts86.html>
- 2) Aguilar, C. A. 1982. Plantas tóxicas de México. Subdirección General Médica. División de Información Etnobotánica, Unidad de Investigación Biomédica en Medicina Tradicional y Herbolaria del Instituto Mexicano del Seguro Social. México. Pág. 7.
- 3) Ahmed, S. M., et al, 1981. Insecticidal potential and biological activity of indian indigenous plants against *Musca domestica* L., International Pest Control. pp: 170 –175.
- 4) Aliotta, G., et al, 1996. Infusion of rue for control of purslane weed: biological and chemical. Allelopathy Journal. 3:2 pp: 207 – 216. Caserta, Italy.
- 5) Amer, S. M. and Farah, O. R. 1985. Cytological effects of pesticides. XII. Effects of the phosphorothioate insecticide dursban on the mitosis of *Vicia faba*. Cytologia 48: 27 – 33.
- 6) American Bird Conservancy. (s.f.). Pesticide and Birds Campaign. <http://www.abcbirds-org/pesticides/pesticideindex.htm>
- 7) Anaya, R. S. 1992. Manejo Fitosanitario de las Hortalizas en México. Centro de Entomología y Acarología, Colegio de postgraduados, Chapingo, México. 401 pp.
- 8) Anónimo. 1994. Bioassay of diazinon for possible carcinogenicity. <http://ntp-server.niehs.nih.gov/htdocs/Lt-studies/tr137.html>

- 9) Anónimo. 2001. Hoja técnica del insecticida diazinón. <http://www.abcbirds.org/pesticides/Profiles/diazinon.htm>
- 10) Anónimo. (s.f.). Utilización del diazinón en Canadá. <http://www.mb.ec.gc.ca/pollution/pesticides.html>
- 11) Aranda, T. F. M. (ed.) 1996. Plantas que curan. Guía México Desconocido no. 20. México. Pág.. 20.
- 12) Arango, A. I. 1994. Uso de extractos vegetales como biorreguladores del ataque de insectos, hongos y bacterias con cultivos hidropónicos de *Lycopersicum esculentum*. En: Las plantas y el hombre. Primer Simposio Ecuatoriano de Etnobotánica y Botánica Económica. Depto. de Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador. pp: 89 – 102.
- 13) Argueta, V. A. 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional. Instituto Nacional Indigenista. México. pp: 1236 – 1241.
- 14) Atta, A. H. y Alkofahi, A. 1998. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of some jordanian medicinal plant extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 60 (2): 117-124.
- 15) Barrios, D. B. 1995. Tejido foliar antibacteriano incorporado al sustrato de begonia (*Begonia tubcrhybrida*) para reducir la severidad de *Xanthomonas campestris pv. begoniae*(Takimoto) Dowson, en Chapingo, México. Tesis de Licenciatura. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de México.
- 16) Bautista, M. T. 2002. Ensayo de genotoxicidad de los funguicidas captan y maneb en células meristemáticas del ápice de raíz de haba (*Vicia faba L.*).

- Tesis Profesional. Ingeniero Agrícola. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. Cuautitlán Izcalli, México.
- 17) Baytelman, B. 1993. Acerca de plantas y curanderos. Instituto Nacional de Antropología e Historia. México. pp: 180 – 184.
  - 18) Bianchi, S. A., et al, 1997. Human lymphocyte micronucleus genotoxicity test with mixtures of phytochemicals in environmental concentrations. *Mutation Research* 388 (1): 27-32.
  - 19) Bonilla, B. 1994. Los extractos vegetales, una alternativa al uso de plaguicidas: aplicación de extractos de *Bidens pilosa* (Asteraceae) y *Ruta graveolens* (Rutaceae) en cultivos hidropónicos de *Fragaria vesca* (Rosaceae) y *Capsicum annum* (Solanaceae). En: las plantas y el hombre. Primer Simposio Ecuatoriano de Etnobotánica y Botánica Económica. Depto. de Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador. pp: 81 – 88.
  - 20) Brockman, H. E., et al, 1992. Antimutagenicity profiles of some natural substances. *Mutation Research* 267 (2): 157-172.
  - 21) Buffin, D. 2000. Diazinon is a organophosphate pesticide. *Pesticides News*. 49:1-20.
  - 22) Bu-Abbas, A., et al, 1996. A comparison of the antimutagenic potential of green black and decaffeinated teas: Contribution of flavanols to the antimutagenic effect. *Mutagenesis* 11 (6): 597-603.
  - 23) Cabrera, L. 1992. Plantas curativas de México. Editores Mexicanos Unidos. México. pp: 207 – 209.

- 24) Cabrera, G. L. y Rodríguez, D. M. G. 1999. Genotoxicity of leachates from a landfill using three bioassays. *Mutation Research* 426: 207 – 210.
- 25) Catterall, F., et al., 1998. Contribution of theaflavins to the antimutagenicity of black tea: Their mechanism of action. *Mutagenesis* 13 (6): 631–636.
- 26) Chab, M. y Cobos, G. 2000. Contaminación por diazinón en Dzindzantú. <http://www.jornada.unam.mx/2000/mar00/000327/eco-contaminaciones.htm>
- 27) Chauhan, L. K. S., et al., 1986. Effect of deltamethrin on plant cells. I. Cytological effects on the root meristems of *Allium cepa*. *Mutation Research* 171: 25 – 30.
- 28) Chen, C., et al., 2001. Water-Soluble Glycosides from *Ruta graveolens*. *Journal Natural Products* 64 (7): 990 – 992.
- 29) CICOPLAFEST (Comisión Intersecretarial Para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas). 1998. Catálogo oficial de plaguicidas. SAGAR, SEMARNAP, SSA y SECOFI. México. pp:405-450.
- 30) Codex Alimentarius. 1994. Residuos de plaguicidas en los alimentos. Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias. Comisión del Codex Alimentarius. Volumen 2. Roma, Italia. 484 pp.
- 31) Consumer Union. 2000. Consumer Union Praises (EPA) Phase out of the Pesticide Diazinon. Washington, DC. <http://www.consumerunion.org/food/diazinondc1200.htm>
- 32) Cooper, G. M. 1997. The Cell. Library of Congress Cataloging in Publication Data, USA. pp: 561 – 582.

- 33) Cornell University. 2000. **Extensión Toxicology Network: Diazinon**. Ithaca, New York. pp: 1-3.
- 34) Cremlyn. 1995. **Plaguicidas modernos y su acción bioquímica**. Limusa. México, D. F. 356 pp.
- 35) Crisanto, M. 1996. **Determinación de residuos de insecticidas organofosforados en melón (Cucumis melo) por media de cromatografía de capa fina**. Tesis de Licenciatura. Parasitología Agrícola. Chapingo, México. 6 - 9, 19, 20, 26 y 27 pp.
- 36) Cronquist, A. 2000. **Introducción a la Botánica**. 3ª. Ed. CECSA. México. pp: 62 – 71.
- 37) Curtis, P. J. 1986. **Introducción a la citología vegetal**. Fitotecnia. UACH. Patena, A. C. Chapingo, México. pp 115-123.
- 38) De Ferrari, M., et al., 1991. **Cytogenetic biomonitoring of an italian population exposed to pesticides: chromosome aberration and sister-chromatid exchange análisis in peripheral blood lymphocytes**. *Mutation Research* 260 (1): 105-113.
- 39) De Marco, A., et al., 1986. **Induction of micronucleated cells in *Vicia faba* and *Allium cepa* root tips treated with nitrilotriacetic acid (NTA)**. *Mutation Research* 171: 145 – 148.
- 40) De Marco, A., et al., 1988. **Induction of micronuclei in *Vicia faba* root tips treated with heavy metals (cadmium and chromium) in the presence of NTA**. *Mutation Research* 206: 311 – 315.

- 41) De Paula, S. J. y Martins, S. A. 2000. Acción antibacteriana de extractos hidroalcohólicos de *Rubus urticaefolius*. Rev. Cubana Plant Med 5 (1): 26-29.
- 42) Douglas, O. 2001. Natural grub remedies safer than diazinon. Scripps Howard News Service. Pittsburgh, <http://www.s-t.com/daily/03-01/03-11-01/#04ho202.htm>
- 43) Duval, J. 1992. La culture de la rue. Ecological Agriculture Projects. Paris, France. pp: 1 – 9.
- 44) Echeverri, L. F. 1987. Productos naturales biológicamente activos. Departamento de Química, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. pp: 57 – 60.
- 45) ECO-USA. 2002. Toxics: Diazinon. [http://www.eco-usa.net/toxics/diazinon\\_5html](http://www.eco-usa.net/toxics/diazinon_5html)
- 46) Environmental Working Group. 2000. Unsafe in Any Store. Washington, DC. [http://www.ewg.org/pub/home/reports/diazinon/retailer\\_letter.html](http://www.ewg.org/pub/home/reports/diazinon/retailer_letter.html)
- 47) EPA (Environmental Protection Agency). 2000. Diazinon Summary. <http://www.epa.gov/pesticides/op/diazinon/summary.htm>
- 48) Extension Toxicology Network. 1996. Pesticide Information Profiles. <http://ace.a ce.orst.edu/info/extoxnet/pips/diazinon.htm>
- 49) García, B. N. O. 1992. Control de la vena negra de las crucíferas (*Xanthomonas campestris pv. campestris*) en col (*Brassica oleracea var. capitata L.* ). Tesis de licenciatura. Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de México.

- 50) Garza, V. P. 1987. El árbol insecticida Neem *Azadirachta indica* A. juss, para el control de plagas y el desarrollo rural en México. Tesis de licenciatura. Facultad de Agronomía. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, Nuevo León.
- 51) Gómez, P., et al, 1997. Evaluación de posibles repelentes de *Bemisia tabaci*. Manejo Integrado de Plagas. 46: 17 – 25.
- 52) Gómez, A. S. y Villalobos, P. R. 1997. El Intercambio de Cromátidas Hermanas en *Vicia faba* como monitor genético de contaminantes ambientales. En: Resúmenes del VII Congreso Nacional de Genética. Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, Baja California Norte.
- 53) Gómez, A. S., et al, 1997. Sister chromatid exchanges in *Vicia faba* induced by arsenic contaminated drinking water from Zimapan, Hidalgo, México. Mutation Research 394 (1): 1 – 7.
- 54) Gopalan, H. N. B. 1999. Ecosystem health and human well being: the mission of the International Programme on Plant Bioassays. Mutation Research 426: 99 –102.
- 55) Grant, W. F. 1994. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. Mutation Research 310 (2): 175 – 185.
- 56) Grover, I. S. y Satwinderjeet, K. 1999. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assays. Mutation Research 426: 183 – 188.
- 57) GTI (Guelph Turfgrass Institute). 1995. Pesticides in the urban landscape. <http://www.voguelph.ca/GTI/urbanpst/diazinon.htm>

- 58) Guarrera, P. M. 1999. Traditional antihelminthic, antiparasitic and repellent uses of plants in central Italy. *Journal of Ethnopharmacology* 68 (1-3): 183-192.
- 59) Gustavino, B., et al., 1987. A comparison between short-term evolution of micronuclei induced by X-rays and colchicine in root tips of *Vicia faba*. *Mutation research* 192: 109 – 119.
- 60) Gutiérrez, D. M. A. y Betancurt, A. Y. (coord.) 1996. *Plantas medicinales de México. Primer Congreso Nacional. Universidad Autónoma de Tlaxcala. Tlaxcala, Tlax.* pp: 9 – 11.
- 61) Hayes Jr., W. y Laws Jr., E. 1991. *Handbook of Pesticide Toxicology. Volumen 2. Clases of Pesticides, Academia Preess, Inc. San Diego, California.* 1049 pp.
- 62) Hernaez, J. F., et al., 1998. Antimutagenic activity of tea towards 2-hydroxyamino-3-methylimidazo-4,5f-quinoline: Effect of tea concentration and brew time on electrophile scavenging. *Mutation Research* 402 (1-2): 299-306.
- 63) Hui-Yin, Ch. Y Gow-Chin, Y. 1997. Possible mechanisms of antimutagens by various teas as judged by their effects on mutagenesis by 2-amino-3-methylimidazo[4,5f]quinoline and benzo[a]pyrene. *Mutation Research* 393 (1-2): 115-122.
- 64) IchSC (International Chemical Safety Cards). 1997. Diazinon summary. <http://www.telecable.es/personales/ea1aha/quimicos.htm>

- 65) Insunza, V. B. 1995. Control of *Ditylenchus dipsacion* garlic (*Allium sativum*) with extracts of medicinal plants from Chile. *Nematropica* 25:1 pp: 35 – 41. Uppsala, Sweden.
- 66) Ji, Q., et al., 1999. *Vicia* root-micronuclei assays on the clastogenicity of water samples from the Kui river hear Xuzhou City, People's Republic of China. *Mutation Research* 426: 133 – 135.
- 67) Karp, G. 1999. Cell and Molecular Biology. 2a. ed. John Wiley & Sons. USA. pp: 609 – 628.
- 68) Kennedy, V. 2002. MEDLINEplus Enciclopedia: Diazinon. A.D.A.M. editorial. <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/002837.htm>
- 69) Klug W. S. y Cummings M. R. 1999. Conceptos de genética. Quinta edición. Prentice Hall. Madrid, España. pp: 25-27
- 70) Lagunes, T. y Villanueva, J. 1994. Toxicología y manejo de insecticidas. Centro de Entomología y Acarología. Colegio de Postgraduados. Montecillos, México. pp: 45 - 49 y 184.
- 71) Landolt, P., et al., 1999. Plant essential oils as arrestants and repellents for neonato larvae of the codling moth (Lepidoptera: Turtricidae). *Environmental Entomology* 28: 954 – 960.
- 72) Lodish, H., et al., 1995. Molecular Cell Biology. 3a. ed. Scientific American Book. USA. pp: 609 – 628.
- 73) Lorke, D. 1988. New approach to practical acute toxicity testing. *Arch. Toxicol* – 54 : 275-287.
- 74) Luna, M. M. A. 1999. Estudio de la capacidad antigenotóxica del gordolobo (*Gnaphalium oxyphyllum*) evaluada por la frecuencia de intercambio de

- cromátidas hermanas in vivo. Tesis de Licenciatura. Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. Cuautitlán Izacalli, México.
- 75) Ma, T. H., et al. 1995. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutation Research* 334: 185 – 195.
- 76) Mancebo, F. 1998. Efectos de extractos vegetales sobre la alimentación y el desarrollo de larvas de *Hypsipyla grandella* (Zeller). Manejo Integrado de Plagas. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad de Turrialba, Costa Rica.
- 77) Mancebo, F., et al. 2000. Biological activity of *Ruta graveolens* (Rutaceae) and *Sechium pittieri* (Cucurbitaceae) extracts on *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. Unidad de Fitoprotección, CATIE. Turrialba, Costa Rica.
- 78) Mareggiani, G., et al. 1997. In vitro activity of natural plant products on *Meloidogyne incognita* larvae (Nematoda: Meloidogyne). *Revista de la facultad de Agronomía de Buenos Aires* 16:3 pp: 141 – 145. Buenos Aires, Argentina. (abstract).
- 79) Martínez, M. 1992. Las plantas medicinales de México. Ed. Botas. México. pp: 282 – 283.
- 80) Martínez, J. L. 1994. Plantas medicinales mexicanas. 2ª. edición. Editores Mexicanos Unidos. México. pp: 48 – 50.

- 81) Minissi, S. y Lombi, E. 1997. Heavy metal content and mutagenic activity, evaluated by *Vicia faba* micronucleus test, of Tiber river sediments. *Mutation Research* 393: 17 – 21.
- 82) Montgomery, J. H. 1997. *Agrochemicals: Desk Reference*. 2<sup>nd</sup> edition. Lewis Publishers. Boca Raton, Florida. Pag.205.
- 83) Mora, D. A. L. 1993. Principios antibacterianos de jacaranda (*Jacaranda acutifolia*), ruda (*Ruta chalapensis*) y sábila (*Aloe vera*). Tesis de licenciatura. Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de México.
- 84) Morales, P. R. 1998. El daño a la información genética y los intercambios de cromátidas hermanas. *Ciencia y Desarrollo* 14: 65 – 67.
- 85) Moreno, L. J. 2001. Genotoxicidad del insecticida clorpirifos en células ápicales de raíz de haba (*Vicia faba* L.). Tesis Profesional. Ingeniero Agrícola. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. Cuautitlan Izcalli, México. pp: 40.
- 86) Morifusa, E. 1997. Organophosphorus pesticides organic and biological chemistry. CRC. Preess Cleveland, Ohio, USA. pp: 381 – 386.
- 87) Muñoz, C. A., et al, 2001. Efecto de extractos de *Ruta graveolens* (ruda) sobre la contractibilidad de útero de rata y perro ex vivo. Depto. de Farmacología, Facultad de Medicina Humana, Universidad Autónoma de Zacatecas. Zacatecas, México.
- 88) Novartis. 1999. Hoja técnica del insecticida diazinón. Barcelona, España.

- 89) Ojala, T., et al., 2000. Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland. *Journal of Ethnopharmacology* 73 (1-2): 299-305
- 90) Oliva, A., et al., 1999. Fungistatic activity of *Ruta graveolens* extracts and its allelochemicals. *Journal of Chemical Ecology* 25:3 pp: 519 – 526. Caserta, Italy. (Abstract).
- 91) OMS (Organización Mundial de la Salud). 1986. Clasificación de los plaguicidas conforme a su peligrosidad. Centro Panamericano de Ecología y Salud. Metepec, México. 82 pp.
- 92) Paniagua, R. 1993. Citología e Histología Vegetal y Animal. Interamericana McGraw Hill. Madrid. pp: 166 – 257.
- 93) Pastor, S., et al., 2001. Micronulei in peripheral blood lymphocytes and bucal epithelial cells of polish farmers exposed to pesticides. *Mutation Research* 494 (2): 147-156.
- 94) Paulini, H., et al., 1991. Gravacridonediol acetate, a new dihydrofuroacridine alkaloid from *Ruta graveolens*. *Planta Medica* 57 (1): 82-83.
- 95) Pérez, P. A. y Hurtado, A. T. 1997. Actividad antimutagénica de extractos vegetales sobre la aflotoxina B1. *Rev. Cubana Aliment Nutr* 11 (1):10-14.
- 96) Ramesh, M. B., et al., 2002. Phytochemical and antimicrobial studies of *Begonia malabarica*. *Journal of Ethnopharmacology* 79 (1): 129-132.
- 97) Red de Acción en Plaguicidas de Chile. 1998. Plaguicidas con solicitudes de prohibición y de severa restricción.  
<http://relca.net/oca/plaguicidas/plag04.htm>

- 98) Restrepo, I. 1992. Los plaguicidas en México. 2ª. Edición. Comisión Nacional de Derechos Humanos. México. pp: 262-264.
- 99) Rizzoni, M., et al, 1987. Micronucleus induction by low doses of X-rays in *Vicia faba* root doses tips. Mutation Research 176: 205 – 209.
- 100) Rodrigues, G. R., et al, 1998. In situ assesment of pesticide genotoxicity in an integrated pest management program I-Tradescantia micronucleus assay. Mutation Research 412: 235 – 244.
- 101) Roberts, T. y Hutson, D. 1999. Metabolic Pathways of Agrochemicals. The Royal Society of Chemistry. USA. 258 pp.
- 102) Rossentein, S. E. 2000. Diccionario de especialidades agroquímicas. Edamsa Impresiones, S. A. de C. V. Ediciones PLM S. A. de C. V. Décima edición. México, D. F. pp: 881 – 889.
- 103) Rost, T. L. 1994. Root tip organization and the spatial relationships of differentiation events. IN: Iqbal, M. (ed.) Growth patterns in vascular plants. Dioscórides Press. Portland, Oregon. pp: 307 – 321.
- 104) Rost, T. L. y Bryant, J. A. 1996. Root organization and gene expression patterns. Journal of Experimental Botany 47: 1613 – 1626.
- 105) Salem, I. E. M. 1983. Local plant natural products having aphicidal effects against the black bean aphid (*Aphis craccivora*). Medelingen van de Facultat Landbouwwetenschappen Rijksuniversitat Gent 48: 215 – 223.
- 106) Sandhu, S. S., et al, 1994. Results and recommendations. Mutation Research 310: 257 – 263.
- 107) SARH (Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos). 1988. Manual de plaguicidas químico-farmacéutico, alimentarios y biológicos veterinarios

Volumen 1. Plaguicidas. Dirección General de Sanidad y Protección Agropecuaria y Forestal de México.

- 108) Sasanelli, N. y D'Addabbo, T. 1992a. The effects of *Cineraria maritima*, *Ruta graveolens* and *Tagetes erecta* extracts on the hatching of *Heterodera schachtii*. *Nematología Mediterránea* 1: 49 – 51. Bari, Italy.
- 109) Sasanelli, N. y D'Addabbo 1992b. Nematicidal activity of aqueous extracts from leaves of *Ruta graveolens* on *Xiphinema index*. *Nematología Mediterránea* 20:1 pp:53 – 55. Bari, Italy.
- 110) Sasanelli, N. y D'Addabbo, T. 1993a. Potential application of the leaves of *Ruta graveolens* for controlling *Meloidogyne javanica* on sunflower. *Russian Journal of Nematology* 1:2 pp: 117 – 120. Bari, Italy.
- 111) Sasanelli, N. y D'Addabbo, T. 1993b. Effect of *Cineraria maritima*, *Ruta graveolens* and *Tagetes erecta* leaf and root extracts on italian population of *Meloidogyne* species. *Nematología Mediterránea* 21:1 pp:21 – 25. Bari, Italy.
- 112) Sasanelli, N. y D'Addabbo, T. 1995. Effect of aqueous solutions of rutin on the beet cyst nematode *Heterodera schachtii*. *Nematologia Mediterránea* 23:1 pp: 31 – 34. Bari, Italy.
- 113) Sasanelli, N. 1995. Prospects for the use of some plants with nematicide action. *Informatore Agrario* 51:48 pp: 55 – 56. Bari, Italy.
- 114) Sasanelli, N. 1997. Perspectives for the use of nematicidal plants. *Revue Suisse d'Agriculture* 29:3 pp: 157 – 158. Bari, Italy.

- 115) Sawger, T. W. 1994. Cellular Methods of genotoxicity and carcinogenicity. In: Introduction to in vitro citotoxicology. Mechanims and methods. CRC Press Inc. Boca Ratón, Florida. Pp: 75 – 105.
- 116) Segura, M. A. 1992. Técnicas para detectar residuos de plaguicidas. Manejo Fitosanitario de Hortalizas en México. Centro de Entomología y Acarología, Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. 401 pp.
- 117) Sobti, R. C., et al. 1982. Cytokinetic and cytogenetic effects of some agricultural chemical en human lymphoid cells in vitro: organophosphates. Mutation Research 102 (1): 89-102.
- 118) Sterm, K. R. 1994. Introductory Plant Biology. Brown Publishers. USA. pp: 34 – 37.
- 119) Takeshi, O., et al. 2001. Catechins are not major components responsible for antigenotoxic effects of tea extracts against nitroarenes. Mutation Research 496 (1-2): 75-81.
- 120) Trovato, A., et al. 1996. In vitro cytotoxic effect of some medicinal plants containing flavonoids. Bolletin Chemical Farm 135 (4): 263-266.
- 121) Ulubelen, A. 1994. Antifertility effects of some coumarins isolated from *Ruta chalepensis* and *R: chalepensis var. latifolia* in rodents. Phytotherapy Research 8 (4): 233-236.
- 122) Valadez, M. E. 1986. Influencia de los pigmentos de la testa de semillas. de frijol en la resistencia a *Pseudomonas syringae*, *P. phaseolicola* y *Xanthomonas campestris*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Genética. Colegio de Postgraduados. Montecillos, Edo. de México.

- 123) Walker, J. I. 1995. Garden herbs as hosts for southern rootknot nematode (*Meloidogyne incognita*) (Kofoid and White) Chitwood, race 3. Hort Science 30:2 pp: 292 – 293. Georgia, USA.
- 124) Wang, H. 1999. Clastogenicity of chromium contaminated soil samples evaluated by *Vicia* root-micronucleus assay. Mutation Research 426: 147 – 149.
- 125) Wessner, D., et al., 1999. Phytophotodermatitis due to *Ruta graveolens* applied as protection against evil spells. Contact Dermatitis 41 (4): 232 – 234.