

Aspectos toxicológicos de los plaguicidas naturales de origen botánico.

Margarita Alfonso Hernández*, Jesús Estrada Ortiz*, María Elena Arteaga Pérez, Nelson Carballo Velásquez**, Gladys Pérez Arnáez**, Antonia Remigio Montero** y Ulises Soca Estrada*.**

*** Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical “Alejandro de Humboldt” (INIFAT). Telf. 57 9010 e-mail: fmcanet@inifat.esihabana.cu**

**** Centro de Toxicología y Experimentación Animal, CETEX
Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, CENPALAB.
Telf. 57 9057**

RESUMEN.

Desde principios del pasado siglo, destacados investigadores como Juan T. Roig y Julián Acuña reportaron el uso de extractos de plantas en el control de plagas y enfermedades de los cultivos en nuestro país. Años después, la Revolución Verde propició la utilización indiscriminada de los plaguicidas químico-sintéticos con las negativas consecuencias para el medio ambiente que esto representa. En el presente, cuando la Agricultura Sostenible ha retomado el concepto del necesario equilibrio natural, el uso de los plaguicidas botánicos es una alternativa importante, sin embargo, muchas de estas plantas son tóxicas o venenosas para el hombre y los animales, y hay que realizar su estudio toxicológico con un enfoque diferente al de los productos químico-sintéticos. En este trabajo se exponen los criterios para la evaluación toxicológica de los plaguicidas derivados del nim (*Azadirachta indica* A. Juss), y del güirito espinoso (*Solanum globiferum* Dun.) que garantizan su empleo libre de riesgos.

ASPECTOS TOXICOLÒGICOS DE LOS PLAGUICIDAS NATURALES DE ORIGEN BOTÀNICO.

Margarita Alfonso Hernández*, **Jesùs Estrada Ortiz***, **Marìa Elena Arteaga Pèrez****, **Nelson Carballo Velàzquez****, **Gladys Pèrez Arnàez****, **Antonia Remigio Montero**** y **Ulises Soca Estrada***.

* Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical “Alejandro de Humboldt” (INIFAT). Telf. 57 9010 e-mail: fmcanet@inifat.esihabana.cu

** Centro de Toxicología y Experimentación Animal, CETEX
Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, CENPALAB. Telf. 57 9057

INTRODUCCIÓN.

Desde principios del pasado siglo, destacados investigadores como Juan T. Roig y Juliàn Acuña reportaron el uso de extractos de plantas en el control de plagas y enfermedades de los cultivos en nuestro país. Años después, la Revolución Verde propició la utilización indiscriminada de los plaguicidas químico-sintéticos con las negativas consecuencias para el medio ambiente que esto representa. En el presente, cuando la Agricultura Sostenible ha retomado el concepto del necesario equilibrio natural, el uso de los plaguicidas botánicos es una alternativa importante, porque se integran fácilmente a los programas de manejo ecológico de los sistemas productivos, debido a la facilidad de su obtención, su bajo poder residual, la no generación de resistencia y su influencia limitada hacia la fauna benéfica, lo que permite disminuir la dependencia de los insumos importados. Sin embargo, muchas de estas plantas son tóxicas o venenosas para el hombre y los animales, y hay que realizar su estudio toxicológico con un enfoque diferente al de los productos químico-sintéticos. En este trabajo se exponen los criterios para la evaluación toxicológica de los plaguicidas derivados del nim (*Azadirachta indica* A. Juss), y del güirito espinoso (*Solanum globiferum* Dun.) que garantizan su empleo libre de riesgos.

Según Ocampo (1994), se necesitan los siguientes datos para el registro de los plaguicidas botánicos:

1. Especificaciones, propiedades físicas y químicas
2. Eficacia biológica
3. Toxicología
4. Comportamiento en el ambiente

Según el Registro Central de Plaguicidas de la República de Cuba (2000, los plaguicidas se clasifican según su toxicidad en diferentes grupos:

Tabla 1. Significado de las expresiones de toxicidades.

HUMANOS	ABEJAS Y PECES
IA Extremadamente tóxico	1 Altamente tóxico
IB Altamente tóxico	2 Tóxico
II Moderadamente tóxico	3 Medianamente tóxico
III Ligeramente tóxico	4 No peligroso
	* Sin riesgos

A su vez, estos grupos responden a su toxicidad aguda, que es la medida de la peligrosidad de un compuesto cuando éste se pone en contacto directo con un organismo en concentraciones que provoquen alteraciones evidentes en él y que pueden llegar hasta la muerte, y se expresa como Dosis Letal Media (DL50) que es la cantidad del compuesto capaz de causar la muerte al 50% de los animales de experimentación, medida en mg/kg de peso corporal (Tabla 2)

Tabla 2. Clasificación de Toxicidades Agudas en humanos.

Clase	DL50 en ratas (mg/kg de peso corporal)			
	Vía oral		Vía dérmica	
	Sólidos	Líquidos	Sólidos	Líquidos
IA	< 5	<20	< 10	< 40
IB	6 – 50	21 – 200	11 – 100	41 – 400
II	51 - 500	201- 2000	101- 1000	401– 4000
III	> 500	> 2000	> 1000	> 4000

De acuerdo a Ocampo (1994) anteriormente citado, se necesitan 3 baterías de ensayos para los estudios toxicológicos de los plaguicidas botánicos, la primera de ellas es obligatoria, y las otras dos se realizarán en dependencia de la inocuidad o no del compuesto o el extracto en la precedente, lo cual establece una diferencia con los químicos sintéticos en que se necesita efectuar el estudio completo (Tabla 3).

Tabla 3. Sumario de la batería de ensayos para plaguicidas botánicos.

ENSAYOS	ESPECIES	SUSTANCIAS
BATERÍA I		
1) Toxicidad aguda		
DL50 oral	Rata	PM, PF, AT
DL50 dermal	Rata, ratón, conejo	PM, PF, AT
DL50 inhalación	Rata, ratón, conejo	PM, PF
2) Irritación		
Ocular primaria	Conejo albino	PM, PF
Dermal primaria	Cerdo de guinea o conejo albino	PM, PF
3) Hipersensibilidad		
Inmediata	Experiencia humana	PM, PF, AT
No inmediata	Hamster, cerdo de guinea	PF, AT
4) Genotoxicidad		
Batería de 5 test	Org. Microbianos	PM, PF, AT
5) Respuesta inmune		
Batería de 5 test	Ratón	AT
BATERÍA II		
1) Mutagenicidad	Células de mamíferos	PM, PF, AT
2) Toxicidad		
Subcrónica oral	Ratón, rata, perro	AT
Subcrónica dermal	Conejo, cerdo	AT
Inhalación subcrónica	Rata	AT
3) Respuesta inmune		
Batería de 2 test	Ratón	AT
3) Teratogenicidad	Rata, ratón, hamster	AT
BATERÍA III		
1) Carcinogénesis	Rata, ratón (2)	AT
2) toxicidad		
Oral crónica	Rata	AT
Dermal crónica	Rata	AT
Inhalación crónica	Ratón	AT

PM:producto manufacturado PF:producto formulado AT:agente tóxico

A su vez, son necesarios estudios ecotoxicológicos que definan el comportamiento del plaguicida en relación al medio ambiente y la fauna silvestre (Tablas 4 y 5)

Tabla 5. Acción del agente de control de plagas.

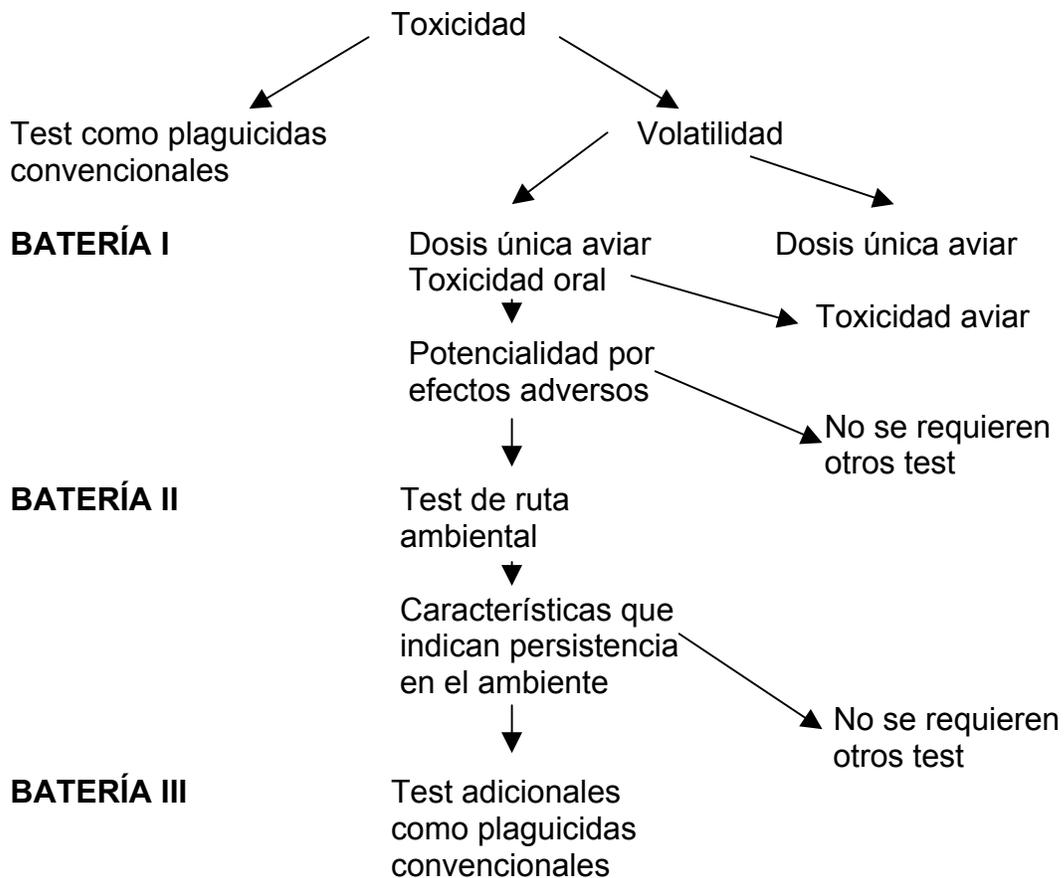
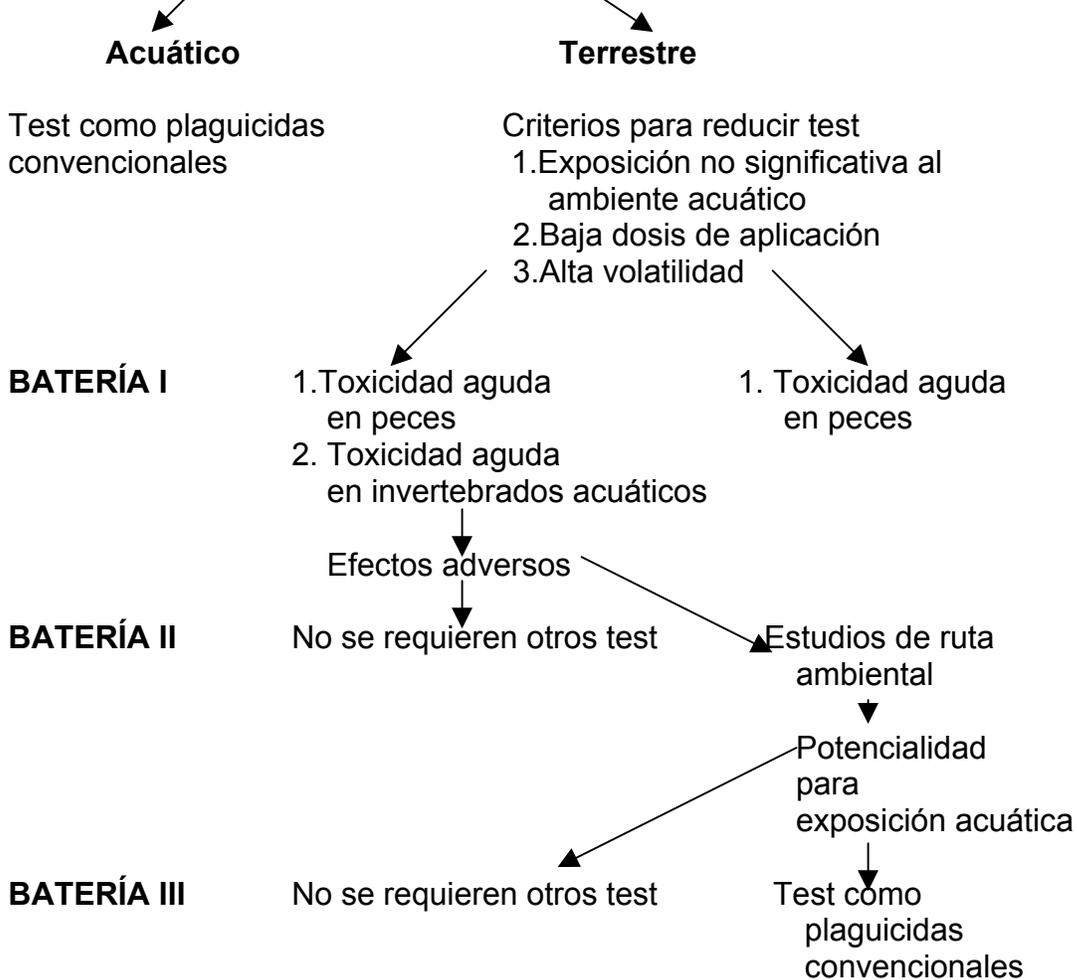


Tabla 6. Sitio de aplicación del agente botánico.



De acuerdo a estos criterios, se realizó el estudio toxicológico de las plantas *Azadirachta indica* A. Juss y *Solanum globiferum* Dunal, de las cuales se dá a continuación una breve descripción.

***Azadirachta indica* A. Juss** (árbol del nim). Familia: *Meliaceae*.

Propiedades: Las hojas y sobre todo las semillas son ricas en compuestos triterpenoides, tales como azadirachtina, nimbina, nimbidina, salanina y otros, siendo el más activo la azadirachtina.

Actividad biológica. Los bioinsecticidas nim se han probado contra más de 25 especies de insectos y varios ácaros y nematodos, con efectividades entre 60 y 95%, son compatibles con la mayoría de los medios biológicos. Pueden ser

usados en el control de ectoparásitos que afectan la ganadería vacuna, porcina, cunícola y aviar, y la cura de escabiosis en humanos.

Solanum globiferum Dunal (güirito espinoso). Familia: *Solanaceae*

Propiedades. Esta planta se caracteriza por su contenido en alcaloides esteroidales en forma de glicósidos, como la solamargina y la solasonina, cuyo aglicón común es la solasodina. La acción de estos glicósidos es parecida a las saponinas, ejercen un efecto irritante directo sobre la mucosa del tubo digestivo y tras su absorción hasta la corriente sanguínea produce hemólisis de los glóbulos rojos, en dosis grandes paralización cardíaca. Los frutos se usan como barbasco, y se le atribuyen propiedades tóxicas para el ganado.

Actividad biológica: molusquicida .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

TOXICOLOGÍA DE LOS PRODUCTOS DEL NIM.

SUSTANCIA DE ENSAYO: NeoNim 60. Concentrado etanólico emulsionable. Líquido ligeramente viscoso de color marrón claro y olor característico, de Ph 4.5 – 6.0 que contiene como principio activo el extracto etanólico concentrado de azadirachtina y otros triterpenos (salanina, nimbina).

Toxicidad aguda oral del NeoNim 60 en ratas Cenp:SPRD

- Observaciones clínicas diarias
 - Correlación dosis – efecto.
 - Observaciones macroscópicas – microscópicas
- 3 dosis; alta, media y baja

Evaluaciones: NeoNim 60, tensoactivo y extracto concentrado de nim.

RESULTADOS.

El tensoactivo Blandet NI a las concentraciones de 15 y 7.5% causa la muerte al 70 y 20% de los animales, respectivamente, y en los demás, signos de toxicidad.

DL₅₀ Blandet NI es 1107.24 mg/kg clasifica como moderadamente tóxico

El extracto produjo mortalidad con alteraciones severas en hígado y riñón.

Dosis alta: 1 muerte y afectaciones reversibles

Dosis media: alteraciones en 1 animal

Dosis baja: no hay signos de toxicidad o daño biológico.

La toxicidad del NeoNim 60 se debe principalmente al tensoactivo.

TOXICIDAD AGUDA DÉRMICA: importante en la manipulación de plaguicidas, proporciona información sobre los daños permanentes de una sola aplicación dermal del producto .

Toxicidad aguda dérmica del NeoNim 60 y su sustancia técnica en conejos Cenp:NZW .

- Observaciones clínicas diarias.
- Afectación o cambio en el sitio de aplicación
- Variaciones en la piel y otros órganos.

Evaluaciones: NeoNim 60 y extracto acuoso de nim.

RESULTADOS.

Se reportaron eritemas que se recuperaron totalmente. No se produjeron lesiones en órganos ni en el área de aplicación, ni variaciones en el peso y comportamiento. **NeoNim 60 no resulta tóxico por vía dérmica.**

IRRITACIÓN DÉRMICA: brinda información sobre los posibles efectos irritantes de naturaleza inflamatoria sobre la piel en los animales de ensayo

Irritación dérmica del NeoNim 60 en conejos albinos Nueva Zelanda.

- Observaciones clínicas diarias.
- Reacciones cutáneas.

RESULTADOS.

No hay afectaciones en el peso corporal ni signos de toxicidad, se considera que **el NeoNim 60 es No Irritante Dérmico** en las condiciones señaladas.

IRRITACIÓN OFTÁLMICA: respuesta inflamatoria localizada a una sola, repetida o continuada aplicación de la sustancia de ensayo, sin que se involucre un mecanismo inmunológico.

Irritación oftálmica del NeoNim 60 en conejos albinos Nueva Zelanda.

- Evaluar modificaciones oculares reversibles o irreversibles después de la aplicación de la sustancia sobre el ojo.
- Escala de daños en conjuntiva, córnea e iris.

RESULTADOS.

Ligeras lesiones que fueron recuperables. Recuperación total al cabo de 3 días.

El NeoNim 60 clasifica como Ligeramente Irritante.

MUTAGÉNESIS. Todo cambio en la composición genética de una célula somática o germinal. Hay 2 clases de cambios genéticos: mutación puntual y aberración cromosómica.

Ensayo de Micronúcleos en médula ósea de ratón.

RESULTADOS.

No se observaron diferencias significativas entre los grupos tratados con NeoNim 60 y el grupo control (agua) en relación con el incremento de los eritrocitos policromáticos micronucleados.

El NeoNim 60 no exhibió efectos clastogénicos ni citotóxicos sobre la médula ósea del ratón.

Ensayo de anomalías de la cabeza del espermatozoide del ratón.

RESULTADOS

El NeoNim 60 no mostró efectos genotóxicos ni citotóxicos sobre las células espermáticas del ratón.

Ensayo de citogenética en médula ósea de ratas Cenp.SPRD

Dosis única de 1 ml de NeoNim 60. Se colectó la médula ósea del fémur.

RESULTADOS.

No hubo diferencias significativas entre NeoNim 60 y el control negativo (agua).

El NeoNim no posee efectos mutagénicos.

SUSTANCIA DE ENSAYO. DerNim U: ungüento preparado a partir de un residuo de la torta extraída, con adición de aceite de nim.

Toxicidad aguda dérmica del DerNim U en conejos Cenp:NZW

Aplicación a una sola dosis

RESULTADOS

No hay variación en comportamiento y peso corporal.

Se produjo eritema en diferentes grados, con rápida recuperación.

No hay afectación en órganos según el análisis anatomopatológico.

SUSTANCIA DE ENSAYO. DerNim P: pomada preparada a partir de un residuo de la torta extraída, y adición de petrolato.

Toxicidad aguda dérmica del DerNim P en conejos Cenp:NZW.

Aplicación a una sola dosis.

RESULTADOS

No hay variaciones en comportamiento y peso corporal.
Se reportaron eritemas en diferentes grados con recuperación rápida.
No hay alteraciones en órganos según análisis anatomopatológico.

SUSTANCIA DE ENSAYO: OleoNim 80 (aceite emulsionable) es un formulado que combina aceite de nim y un tensoactivo Blandet NI

Toxicidad aguda oral de OleoNim 80 en ratas Sprague Dawley

Ensayo: OleoNim 80, aceite de nim y Blandet NI
Tres dosis: alta, mediana y baja.

RESULTADOS

El aceite de nim no produjo variaciones en el comportamiento y peso corporal de los animales, no produce toxicidad.
El OleoNim 80 provoca a dosis media 30% de mortalidad.
El Blandet NI al 20% produce 90% de mortalidad, y a la concentración de uso diluído 1/100 en agua no es tóxico.

DL₅₀: 1107.24 mg/kg

El causante de los efectos tóxicos parece ser el tensoactivo.

Toxicidad aguda dérmica (volumen límite) del OleoNim 80 y su sustancia técnica, en conejos albinos NWZ.

RESULTADOS

Se presentaron diferentes grados de eritema que se recuperaron rápidamente.
No hay alteraciones en órganos internos ni en el peso corporal.

Irritación dérmica del OleoNim 80 en conejos albinos Nueva Zelanda.

RESULTADOS

Oleonim 80 clasifica como No Irritante Dérmico.

Irritación oftálmica de OleoNim 80 en conejos albinos Nueva Zelanda.

RESULTADOS.

Al cabo de 1 h. de la instilación se observaron inflamación en los párpados, congestión en el iris, la córnea perdió su transparencia, a las 24 h. Secreciones. Las lesiones no se revierten totalmente
El OleoNim 80 se clasifica como irritante severo..

Irritación ocular del OleoNim 80 in vitro sobre la membrana corioalantoidea del huevo de gallina.

La membrana corioalantoidea del huevo de la gallina es una prueba alternativa in vitro al potencial de irritación ocular en conejos albinos (in vivo). Mide el daño sobre la conjuntiva y asume que los efectos irritantes son similares a los inducidos por la misma sustancia en el ojo..

Ensayos: aceite de nim y tensoactivo Blandet NI

RESULTADOS.

El tensoactivo Blandet NI es Irritante Severo y produce intensa hemorragia y coagulación.

El formulado OleoNim 80 también clasifica como Irritante Severo.

Se indica que el tensoactivo contenido en la formulación al parecer induce el efecto irritante en el producto evaluado.

EVALUACIÓN MUTAGÉNICA DEL ACEITE DE NIM (SUSTANCIA TÉCNICA DEL OLEONIM 80)

Análisis citogenético de la médula ósea en ratas Cenp:SPRD tratadas con aceite de nim.

RESULTADOS

No se detectó efecto mutagénico sobre los cromosomas de la médula ósea de la rata, y se concluye que el aceite de nim en el nivel de dosis aplicado, no posee efectos mutagénicos.

Ensayo de micronúcleos en médula ósea en el ratón Cenp: NMRI

RESULTADOS

En las condiciones del ensayo realizado y con el nivel de dosis aplicado, el aceite de nim no exhibió efectos clastogénicos ni citotóxicos sobre la médula ósea del ratón.

Ensayo de las anomalías de la cabeza del espermatozoide en ratón Cenp:NMRI

RESULTADOS

En las condiciones en que se realizó el ensayo y el nivel de dosis empleado, el aceite de nim no mostró efectos genotóxicos ni citotóxicos sobre las células espermáticas del ratón.

TOXICOLOGÍA DE *SOLANUM GLOBIFERUM* DUNAL.

Se utilizó un extracto acuoso al 30% del polvo de los frutos de *S. globiferum*.

Toxicidad oral aguda en ratas: DL₅₀ > 2000 mg/kg

Categoría toxicológica: No clasificada.

Evaluación mutagénica de *S. globiferum*.

- Análisis de citogenética de médula ósea en ratas.
- Ensayo de las anomalías de la cabeza del espermatozoide en ratones.
- Ensayo de micronúcleos en sangre periférica en ratones.
- Ensayo de micronúcleos en médula ósea en ratones.

***S. globiferum* no mostró efectos mutagénicos, genotóxicos ni citotóxicos.**

Toxicidad aguda de *S. globiferum* en Tilapia (*Oreochromis* sp.)

Se estudiaron 5 concentraciones de la sustancia de prueba en grupos de 10 alevines cada uno.

Resultados

S. globiferum provocó en las concentraciones de 20, 44 y 96.8 mg/L una degradación del medio con afectación para el valor del oxígeno disuelto, siendo de 3.2, 2.3 y 1.0 mg/L respectivamente para las primeras 24 h., así como un rango de mortalidad entre 30 y 40%. Moderadamente tóxico.

Categoría toxicológica III.

CONSIDERACIONES GENERALES.

Según el resultado de los estudios toxicológicos, los productos Nim resultaron poco tóxicos. En el caso de los bioinsecticidas NeoNim 60 y OleoNim 80, la toxicidad se debía al tensoactivo utilizado en la formulación, por lo cual se recomendó sustituirlo. Ambos formulados son irritantes oftálmicos, sobre todo el OleoNim 80, lo cual debe especificarse en el envase, y las medidas de protección pertinentes. No son mutagénicos o genotóxicos ni provocan reacción dérmica.

El extracto acuoso de *S. globiferum* no resultó tóxico en los estudios agudos y tampoco es mutagénico, genotóxico o citotóxico, pero las investigaciones ecotoxicológicas arrojaron que es tóxico a los peces, por lo que debe limitarse su uso cerca de embalses o cursos de agua donde pueda llegar por escurrimiento. Estos resultados permiten el registro de los formulados en estudio, y se realizaron por primera vez en el país para plaguicidas botánicos.

BIBLIOGRAFÍA.

Environmental Protection Agency (EPA) (1992): Guidelines for registering pesticides in the US; Subpart M: Guidelines for registering biorational pesticides. EPA, Washington, DC.

Lista Oficial de Plaguicidas Autorizados (2000): Registro Central de Plaguicidas. República de Cuba.

Ocampo, V. R. (1994): Botanical insecticide research and development in relation to safe use. *The Philippine Agriculturist*, Vol. 77 No. 1: 47 – 66.