



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química

Actividad toxicológica de los extractos acetónico y metanólico
de las partes aéreas de *Heterotheca inuloides*
sobre *Poecilia reticulata*

Tesis

Que como parte de los requisitos
para obtener el Grado de

Maestro en Ciencia y Tecnología Ambiental

Presenta

I.Q.A. Lina Guerrero López

Dirigido por:

Dr. Miguel Angel Ramos López

Co-Director:

Dra. María del Carmen Monroy Dosta

Querétaro, Qro. a 16 de noviembre de 2020



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental

Actividad toxicológica de los extractos acetónico y metanólico de las partes aéreas
de *Heterotheca inuloides* sobre *Poecilia reticulata*

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología Ambiental

Presenta

I.Q.A. Lina Guerrero López

Dirigido por:

Dr. Miguel Angel Ramos López

Co-dirigido por:

Dra. María del Carmen Monroy Dosta

Dr. Miguel Angel Ramos López
Presidente

Firma

Dra. María del Carmen Monroy Dosta
Co-director

Firma

Dr. José Luis Rodríguez Chávez
Secretario

Firma

Dr. Juan Campos Guillén
Vocal

Firma

Dr. Víctor Pérez Moreno
Suplente

Firma

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Director de la Facultad

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Director de Investigación y Posgrado

Dirección General de Bibliotecas UAQ

*A mis abuelitos Gregoria, Martín, Rosario
y en especial a Julio, hasta el cielo.*

AGRADECIMIENTOS

Se reconoce el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca 925642 para el desarrollo de la presente investigación.

Al Laboratorio de Compuestos Naturales Insecticidas de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

A cada uno de los integrantes del comité, por sus valiosos comentarios y aportaciones al trabajo; en especial al Dr. José Luis y al Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Asimismo, a mis compañeros de laboratorio en especial a Karla y Benjamín que se hicieron cargo de la cría de peces; a Daniel y Luis por acondicionar el bioterio.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	ix
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	3
2.1 Impacto y consecuencias de los plaguicidas químicos sintéticos en el ambiente	3
2.2 Toxicología y ecotoxicología de compuestos naturales	5
2.2.1 Estudios toxicológicos	6
2.2.2 Generalidades de <i>Poecilia reticulata</i> Peters	7
2.2.3 Toxicidad en <i>Poecilia reticulata</i> Peters	8
2.3 Plantas en el combate de plagas	9
2.3.1 Familia Asteraceae en el combate de plagas	9
2.4 <i>Heterotheca inuloides</i> Cass. (Asteraceae)	10
2.4.1 Taxonomía	10
2.4.2 Descripción botánica	10
2.4.3 Compuestos químicos biológicamente activos	11
2.4.4 Actividad insecticida de especies del género <i>Heterotheca</i>	12
3 HIPÓTESIS	13
4 OBJETIVOS	14
4.1 Objetivo General	14
4.2 Objetivos Particulares	14
5 MATERIAL Y MÉTODOS	15
5.1 Aprobación ética para uso de animales	15
5.2 Origen de los peces	15
5.3 Aclimatación y acondicionamiento	15
5.4 Colecta del material vegetal	16
5.5 Obtención del extracto	16
5.6 Bioensayos con extracto	16
5.7 Compuesto mayoritario del extracto con mayor actividad	18
5.8 Bioensayos con compuesto principal	18

5.9	Análisis estadístico	19
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
6.1	Efecto de extracto acetónico de <i>Heterotheca inuloides</i> sobre <i>Poecilia reticulata</i>	20
6.2	Efecto de extracto metanólico de <i>Heterotheca inuloides</i> sobre <i>Poecilia reticulata</i>	24
6.3	Identificación del compuesto principal en extracto acetónico	27
6.4	Efecto de 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno sobre <i>Poecilia reticulata</i>	31
6.5	Perspectivas del trabajo	37
7	CONCLUSIONES	38
8	REFERENCIAS	39

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Taxonomía de <i>Poecilia reticulata</i> Peters	8
Cuadro 2. Taxonomía de <i>Heterotheca inuloides</i> Cass.	10
Cuadro 3. Agua reconstituida	16
Cuadro 4. Actividad toxicológica del extracto acetónico de las partes aéreas de <i>Heterotheca inuloides</i> sobre alevines de <i>Poecilia reticulata</i>	20
Cuadro 5. Actividad toxicológica del extracto acetónico de las partes aéreas de <i>Heterotheca inuloides</i> sobre adultos machos de <i>Poecilia reticulata</i>	21
Cuadro 6. Actividad toxicológica del extracto acetónico de las partes aéreas de <i>Heterotheca inuloides</i> sobre adultos hembras de <i>Poecilia reticulata</i>	22
Cuadro 7. Actividad toxicológica del extracto metanólico de las partes aéreas de <i>Heterotheca inuloides</i> sobre alevines de <i>Poecilia reticulata</i>	24
Cuadro 8. Actividad toxicológica del extracto metanólico de las partes aéreas de <i>Heterotheca inuloides</i> sobre adultos machos de <i>Poecilia reticulata</i>	25
Cuadro 9. Actividad toxicológica del extracto metanólico de las partes aéreas de <i>Heterotheca inuloides</i> sobre adultos hembras de <i>Poecilia reticulata</i>	26
Cuadro 10. Actividad toxicológica de 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno sobre alevines de <i>Poecilia reticulata</i>	32
Cuadro 11. Actividad toxicológica de 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno sobre adultos machos de <i>Poecilia reticulata</i>	33
Cuadro 12. Actividad toxicológica de 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno sobre adultos hembras de <i>Poecilia reticulata</i>	34
Cuadro 13. Categorías toxicológicas para productos agrícolas en peces	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cromatograma por HPLC del extracto acetónico de <i>Heterotheca inuloides</i>	28
Figura 2. Cromatograma por HPLC del compuesto principal del extracto acetónico de <i>Heterotheca inuloides</i>	29
Figura 3. 7-hidroxi-3,4-dihidrocadalenol	30

Dirección General de Bibliotecas UAQ

RESUMEN

El abuso de insecticidas químicos sintéticos en la agricultura, ha causado contaminación debido a sus características de persistencia y bioacumulación en la red trófica. Dentro de las alternativas que hay al uso de estos insumos se encuentran los extractos de plantas que se utilizan debido a que producen un impacto ambiental menor. La especie conocida como árnica mexicana *Heterotheca inuloides* Cass. (Asteraceae), es una planta usada en la medicina tradicional por sus beneficios terapéuticos. Asimismo, se ha reportado que presenta propiedades insecticidas. No obstante, existe poca información sobre sus efectos toxicológicos y ecotoxicológicos por lo que se hace necesario obtener información de este tipo. En este estudio se evaluó la toxicidad aguda de los extractos acetónico y metanólico, así como del compuesto principal presente en el extracto acetónico el cual fue 7-hidroxi-3,4-dihidrocadalenol, sobre alevines, machos adultos y hembras adultas de un organismo no blanco: el pez guppy (*Poecilia reticulata* Peters), debido a que presenta alta sensibilidad a compuestos ajenos a su ambiente. La toxicidad se registró durante 96 h de exposición. Los valores estimados de concentración letal media (CL₅₀) del extracto acetónico y metanólico para alevines fueron de 15.7 y 187.2 mg L⁻¹, respectivamente. Para peces machos fueron de 63.0 y 224.0 mg L⁻¹; y para hembras fueron de 103.7 y 153.7 mg L⁻¹. Mientras que los valores de CL₅₀ para 7-hidroxi-3,4-dihidrocadalenol para alevines, adultos machos y hembras fueron de 0.9, 4.1 y 1.0 mg L⁻¹, respectivamente. Los extractos acetónico y metanólico de *H. inuloides* fueron ligeramente tóxicos para los guppies en comparación con los plaguicidas sintéticos. Por otra parte, el sesquiterpeno fue altamente tóxico para machos y extremadamente tóxico para alevines y hembras adultas.

(Palabras clave: ecotoxicología, extractos botánicos, árnica mexicana, pez guppy, toxicidad aguda)

SUMMARY

The abuse of synthetic chemical insecticides in agriculture cause contamination due to their persistence and bioaccumulation characteristics in the trophic network. Among the alternatives to the use of these inputs are plant extracts that are used because they produce less environmental impact. The species known as Mexican arnica *Heterotheca inuloides* Cass. (Asteraceae), is a plant used in traditional medicine for its therapeutic benefits and, in addition, it has been reported to have insecticidal properties, but there is little information on its toxicological and ecotoxicological effects. In this study, the acute toxicity of acetonic and methanolic extracts was evaluated, as well as the main compound present in the acetone extract, which was 7-hydroxy-3,4-dihydrocadalene, on alevins, male adults and female adults of a non-target organism: the guppy fish (*Poecilia reticulata* Peters), due to its high sensitivity to compounds outside its environment. Toxicity was recorded during 96 h of exposure. The estimated values of mean lethal concentration (LC₅₀) of acetone and methanolic extract for alevins were 15.7 and 187.2 mg L⁻¹, respectively. For male fish they were 63.0 and 224.0 mg L⁻¹; and for females they were 103.7 and 153.7 mg L⁻¹. While the LC₅₀ values for 7-hydroxy-3,4-dihydrocadalene for alevins, male and female adults were 0.9, 4.1 and 1.0 mg L⁻¹, respectively. The acetone and methanolic extracts of *H.inuloides* were slightly toxic to guppies compared to synthetic pesticides. Furthermore, sesquiterpene was highly toxic to males and extremely toxic to alevins and adult females.

(Key words: ecotoxicology, botanical extracts, guppy fish, Mexican arnica, acute toxicity)

Dirección General de Bibliotecas UAQ

1 INTRODUCCIÓN

Los plaguicidas químicos sintéticos tienen el objetivo de controlar organismos que pongan en riesgo las actividades humanas, su uso continuo y extensivo ha causado efectos negativos en la red trófica; presentan bioacumulación y bioaumentación debido a sus características químicas (DiBartolomeis et al., 2019). Entre las enfermedades asociadas por plaguicidas químicos sintéticos a los humanos están el cáncer, trastornos del aprendizaje y del desarrollo, Parkinson, asma, efectos en los sistemas reproductor y endócrino (Gentile et al., 2017).

Existen alternativas más amigables para el manejo de plagas, dentro de estas se encuentran los extractos botánicos. Debido a su origen natural, los plaguicidas a base de plantas se consideran más seguros para los agricultores durante su manejo. Las mezclas de compuestos contenidas en los extractos botánicos limitan el desarrollo de resistencia de las plagas, se degradan rápidamente en la exposición a la luz solar, el aire, a la humedad, se transforman por enzimas de detoxificación y son menos dañinos para los organismos no blanco. Por lo tanto, se consideran más seguros para el ambiente (Pino-Otín et al., 2019).

En este sentido, algunos extractos de familias botánicas Lamiaceae, Cucurbitaceae, Apocynaceae y Asteraceae han sido utilizados como insecticidas (Cheraghi-Niroumand et al., 2016); dentro de la familia Asteraceae se han reportado especies con este tipo de actividad debido a los metabolitos secundarios que contienen, ejemplos de especies de esta familia son *Coreopsis mutica* var. *mutica*, *Porophyllum punctatum* Blake y *Helenium quadridentatum* Labill (Villavicencio-Nieto et al., 2010). Otra especie perteneciente a la familia es *Heterotheca inuloides* Cass. para la cual se han reportado diversas actividades biológicas tales como antiinflamatoria, analgésica, antioxidante, antimicrobiana, citotóxica, quelante, plaguicida, entre otras (Rodríguez-Chávez et al., 2017). No obstante, la información de sus efectos tóxicos es escasa.

Existe poca información disponible sobre los efectos ambientales de los plaguicidas botánicos. De modo que, es necesario evaluar su ecotoxicidad especialmente en organismos no blanco. Los estudios de toxicidad ambiental proporcionan información sobre los posibles impactos biológicos de una sustancia liberada en el ambiente (Pavela y Govindarajan, 2017).

Poecilia reticulata, especie conocida como pez guppy, es utilizado como un modelo biológico para estudios de ecotoxicidad debido a su alta susceptibilidad a contaminantes ambientales, fácil manejo y cultivo en acuario. Además, es reconocido como un excelente modelo para estudios de toxicidad por la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (Forouhar-Vajargah et al., 2020).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la toxicidad de los extractos acetónico y metanólico de las partes aéreas de *Heterotheca inuloides* sobre alevines, machos y hembras adultos de *Poecilia reticulata*.

2 ANTECEDENTES

2.1 Impacto y consecuencias de los plaguicidas químicos sintéticos en el ambiente

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (por sus siglas en inglés EPA) describe a los plaguicidas como cualquier sustancia que se usa para prevenir, destruir, repeler o mitigar cualquier plaga (EPA, 2019). Las plagas son animales, plantas o microorganismos que comprometen los alimentos, la salud o comodidad del humano. El control de plagas con compuestos sintéticos se inició a finales de 1930. El libro “Primavera silenciosa” de Rachel Carson abrió el debate sobre el uso de plaguicidas y su efecto nocivo a la flora y fauna de los organismos no blanco (Sabarwal et al., 2018).

Los plaguicidas de síntesis química pueden ser peligrosos para el ambiente y para el ser humano debido a su uso indiscriminado y generalizado, su persistencia y su capacidad de bioacumulación en los organismos. Estos productos se clasifican según su acción específica en: acaricidas, fungicidas, bactericidas, herbicidas e insecticidas, entre otros. Los insecticidas agrupan la mayor variedad de compuestos y de mayor toxicidad. De acuerdo con su estructura química, los insecticidas se clasifican en: compuestos organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, neonicotinoides, misceláneos y botánicos (AnvariFar et al., 2018).

El grupo de los organoclorados incluye a muchos de los compuestos altamente tóxicos y persistentes en ambientes terrestres y acuáticos; como el dicloro difenil tricloroetano (DDT), dieldrín, lindano, clordano y endosulfán. Entre los efectos nocivos que producen algunos de estos compuestos se incluye neurotoxicidad que afecta los procesos reproductivos de los peces (Newton, 2018). Además, los compuestos clorados volátiles causan disminución de la capa de ozono en la estratósfera (Steinbrecht et al., 2018).

Los organofosforados se derivan del ácido fosfórico o fosforotióico y sus efectos en los peces han sido reconocidos y revisados. Su toxicidad es generada principalmente por la fosforilación de la acetilcolinesterasa y además, el estrés oxidativo puede provocar la muerte celular (Chawla et al., 2018).

Los carbamatos, al igual que los organofosforados, bloquean la acción de la enzima acetilcolinesterasa, interrumpiendo la transmisión de impulsos entre las células nerviosas. El carbaril, metilcarbamato de 1-naftilo, retrasa el desarrollo embrionario, afecta el tamaño del embrión y retrasa la eclosión de *Danio rerio* Hamilton (AnvariFar et al., 2018). Por otro lado, el carbendazim, 2-metoxicarbamoil-bencimidazo, una amina de éster de carbamato que se usa ampliamente como fungicida, fue reportado como dañino para el desarrollo embrionario y eclosión de la carpa prusiana *Carassius gibelio* Bloch. Este compuesto también induce apoptosis celular y causa inmunotoxicidad y alteración endocrina en embriones de *D. rerio* (Andrade et al., 2016).

Los piretroides son químicos sintéticos que comparten algunas similitudes con las piretrinas naturales, conocidos como los insecticidas “más seguros” que se usan en todo el mundo, pero son altamente tóxicos para la mayoría de los peces en relación dosis-tiempo. Por ejemplo, la cipermetrina causa daño al ADN e incrementa la expresión de genes relacionados con la apoptosis en células hepáticas y nerviosas en embriones de *D. rerio* (Zhang et al., 2017; Ranjani et al., 2020). La exposición prolongada puede causar efectos neurotóxicos, teratogénicos, inducción de estrés oxidativo a través de la generación de especies reactivas de oxígeno y daño oxidativo en *Labeo rohita* Hamilton (Ullah et al., 2016).

La generación más reciente de insecticidas sintéticos son los neonicotinoides: carbofuran, imidacloprid, clotianidina, dinotefuran, tiacloprid y acetamiprid. A pesar de tener una mayor degradabilidad en el ambiente en comparación con sus plaguicidas antecesores, son motivo de preocupación debido a su uso creciente. Los neonicotinoides se distribuyen sistémicamente a lo largo de la planta en crecimiento después de las aplicaciones de semillas o suelo, dando

como resultado persistencia en el ambiente. En los peces actúan uniéndose al receptor nicotínico de acetilcolina en la neurona postsináptica actuando como falsos neurotransmisores provocando la activación continua del receptor, lo que provoca efectos neurológicos adversos (Gibbons et al., 2015). Los neonicotinoides pueden transferirse al polen y al néctar de varios cultivos de polinización y han sido asociados como cofactor en la disminución de colonias de la abeja común europea *Apis mellifera* Linnaeus (Hymenoptera: Apidae) (Jiang et al., 2018).

El uso intensivo y excesivo de plaguicidas químicos sintéticos ha llevado al desarrollo de poblaciones de plagas resistentes y a una reducción de sus enemigos naturales. Por lo tanto, se deben desarrollar estrategias que incluyan insecticidas menos tóxicos, de espectro reducido, menos persistentes y ecológicos como los bioplaguicidas. El término bioplaguicida, también conocido como plaguicida biológico, es definido como sustancias naturales producidas por las plantas y microorganismos que controlan plagas (Arrázola et al., 2013; Villa-Martínez et al., 2014; Alehaideb et al., 2019).

Los plaguicidas botánicos se basan en que la presencia de sustancias químicas producidas por las plantas tienen efecto sobre las plagas además de tener otras funciones benéficas. Los extractos botánicos pueden contener metabolitos secundarios como: terpenoides, esteroides, fenoles, cumarinas, flavonoides, taninos, alcaloides y glucósidos cianogénicos (Yang et al., 2018; Rashwan y Hammad, 2020). Estos compuestos tienen dos funciones en las plantas: protegerlas contra los herbívoros y, por otro lado, atraer a organismos benéficos, principalmente para la reproducción. Los productos terpénicos, que confieren fragancia, se acumulan en tallos, hojas y flores (Vallès et al., 2011).

2.2 Toxicología y ecotoxicología de compuestos naturales

Los estudios de toxicidad se dirigen a evaluar los efectos tóxicos o para comprender los posibles mecanismos involucrados. Los plaguicidas naturales también pueden ser tóxicos como la matrina, un alcaloide obtenido de las raíces de *Sophora flavescens* Aiton (Fabaceae) que presentó concentración letal media (CL₅₀) de 240 mg L⁻¹ en embriones de *D. rerio* (Lu et al., 2014).

La camptotecina, aislada de la corteza y el tallo del árbol *Camptotheca acuminata* Decne. (Nyssaceae), un alcaloide de quinolina citotóxico, se ha reportado que bloquea las enzimas reparadoras del ADN y, por lo tanto, causa apoptosis celular (Venditto y Simanek, 2010); este compuesto ha ocasionado fragmentación del ADN y apoptosis celular en la brema plateada de mar *Sparus sarba* Forsskål (Deane y Woo, 2005). También se ha registrado como un inhibidor de la topoisomerasa 1 en el pez cebra *D. rerio*, causando deformación en embriones y en algunos tejidos como músculo, nervio periférico y hueso (Ishaq et al., 2017; Kari et al., 2007).

2.2.1 Estudios toxicológicos

La evaluación toxicológica de los insecticidas es importante para la salud humana como para la del ambiente (Zhu et al., 2018). Previo a la comercialización de cualquier sustancia química se deben realizar pruebas de laboratorio para la obtención de información para evaluar su peligrosidad. Las pruebas de toxicidad son usadas para determinar los efectos nocivos de cualquier sustancia en organismos y se dividen en aguda y crónica (He et al., 2019).

La evaluación de la toxicidad potencial de las sustancias para los seres humanos se realiza a partir de datos generados en animales de laboratorio expuestos en condiciones controladas. Entre las pruebas agudas se encuentran la toxicidad oral, peritoneal, dérmica e inhalatoria (INECC, 2019). Estos métodos experimentales que evalúan la toxicidad de los compuestos para el ser humano

tienen sus limitaciones inherentes en la obtención de datos de toxicidad para el medio; es decir, evaluar la seguridad ambiental de cualquier compuesto sobre las poblaciones y comunidades animales y vegetales en un ecosistema particular, debe utilizar modelos que evalúen la peligrosidad ambiental, término denominado ecotoxicología. Entre las pruebas ecotoxicológicas se encuentran la fitotoxicidad en áreas no blanco, germinación de semillas, vigor vegetativo, crecimiento de plantas acuáticas, determinación de la dosis letal media (DL₅₀) y concentración letal media (CL₅₀) oral en aves, DL₅₀ y CL₅₀ en abejas, CL₅₀ en invertebrados de agua dulce, CL₅₀ en peces de agua dulce, entre otras. Las pruebas de toxicidad en laboratorio se pueden complementar con pruebas químicas y evaluaciones de campo (Malaj et al., 2016).

Los peces se observan en casi todos los sistemas acuáticos y para algunas especies se dispone de numerosa información sobre la respuesta ambiental en comparación con muchos invertebrados. Aunque las pruebas iniciales de toxicidad acuática se llevaron a cabo utilizando bacterias, invertebrados como Cladóceras, Rotíferos y otros grupos, de ninguna manera pueden reemplazar la prueba realizada en peces, es el último nivel trófico en la cadena alimentaria acuática. Algunas especies de peces se han utilizado con éxito como bioindicadores ecotoxicológicos de calidad ambiental en una amplia variedad de nichos debido a su hipersensibilidad a las diversas sustancias contaminantes a su medio (Ferrante et al., 2017).

2.2.2 Generalidades de *Poecilia reticulata* Peters

Poecilia reticulata Peters, comúnmente conocido como guppy, es un pez con un período reproductivo corto cuyo conteo de espermatozoides, coloración corporal, tamaño de gónada, el comportamiento sexual y la tasa reproductiva son independientes de la estación del año. La diferenciación de gónadas y el desarrollo de características sexuales secundarias ocurren durante el período juvenil, y los peces maduran sexualmente a partir de tres meses. El macho adulto tiene una coloración brillante y realiza distintos comportamientos de cortejo, su aleta anal se

convierte en un órgano copulador (el gonopodio) para la fertilización interna (Tian et al., 2012). En el Cuadro 1 se muestra su información taxonómica.

Cuadro 1. Taxonomía de *Poecilia reticulata* Peters

Reino	Animalia
Phylum	Craniata
Clase	Actinopterygii
Orden	Cyprinodontiformes
Familia	Poeciliidae
Genero	<i>Poecilia</i>
Especie	<i>P. reticulata</i> Peters

CONABIO, (2014).

2.2.3 Toxicidad en *Poecilia reticulata* Peters

El pez guppy es un modelo importante para estudio de los contaminantes del medio acuático. Se ha utilizado en estudios de toxicología por la Asociación Americana de Salud Pública (por sus siglas en inglés APHA) y la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (por sus siglas en inglés OECD) para caracterizar el impacto ambiental de varios contaminantes (APHA, 1981; OECD, 1992; Rocha et al., 2015). Estos peces han sido empleados por su nivel dentro de la red trófica debido a que consumen y controlan las poblaciones de insectos, microcrustáceos y algas; además, permiten de esta forma la recirculación, remoción y resuspensión del material orgánico en su ecosistema. Esta especie presenta ventajas respecto de otros indicadores ambientales tales como su tolerancia a bajas concentraciones de oxígeno disuelto, puede respirar oxígeno del aire, acepta un pH de 5.5 a 8.5 y temperatura de 20 a 30 °C. Su reproducción ovovivípara se da de forma mensual con 10 alevines aproximadamente por hembra. Los alevines son extremadamente sensibles a la perturbación ambiental, siendo afectados en su crecimiento y en sus funciones reproductivas (Iannacone et al., 2007).

2.3 Plantas en el combate de plagas

Los plaguicidas de bajo espectro son importantes no solo para la protección del ambiente, sino también porque su uso evita daños a organismos benéficos. Los plaguicidas botánicos presentan un impacto ambiental más bajo que el de los químicos sintéticos, por lo tanto, hay mucho interés en desarrollar este tipo de productos que sean eficientes y que cumplan con los requisitos de seguridad alimentaria, la salud humana y la del ambiente (Lawler, 2017; Marutescu et al., 2017). Los extractos de plantas usados como insecticidas botánicos podrían tener un efecto negativo para las especies no blanco, por lo que, es necesario comprender cómo los extractos influyen en otros organismos del ecosistema, especialmente en los acuáticos (Bullangpoti et al., 2018).

2.3.1 Familia Asteraceae en el combate de plagas

Algunas especies de la familia Asteraceae son utilizadas como plantas medicinales a pesar de diferir en características botánicas. Por otro lado, en la agricultura se han aplicado metabolitos secundarios de asteráceas para combatir insectos plaga, que a diferencia de los compuestos sintéticos son ecológicamente menos dañinos. Es el caso de *Tanacetum cinerariifolium* Trevir. y *Tanacetum coccineum* Grierson que contienen ésteres monoterpénicos: piretrinas, cinerinas y jasmolinas. También contienen compuestos semejantes a las raíces de *Anacyclus pyrethrum* Cass. y *Corrigiola litoralis* L. Por su parte, *Melampodium americanum* L., nativa de México, contiene lactonas de acción insecticida efectivas contra larvas de *Spodoptera frugiperda* Smith (Villavicencio-Nieto et al., 2010; Del Vitto y Petenatti, 2015).

2.4 *Heterotheca inuloides* Cass. (Asteraceae)

2.4.1 Taxonomía

Heterotheca inuloides es conocida comúnmente como “árnica mexicana” o “falsa árnica” (CONABIO, 2009). En el Cuadro 2 se reporta la taxonomía de la planta.

Cuadro 2. Taxonomía de *Heterotheca inuloides* Cass.

Reino	Platae
Subreino	Traqueobionta
Superdivisión	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Tribu	Astereae
Genero	<i>Heterotheca</i>
Especie	<i>H. inuloides</i> Cass.

CONABIO, (2009).

2.4.2 Descripción botánica

Es una planta herbácea perenne o anual con raíz pivotante, su tallo va de 50 cm hasta 150 cm de alto, erecto y generalmente poco ramificado debajo de la inflorescencia, con pubescencia piloso hispida de 2 mm de largo. Sus hojas son de 2 a 8 cm de largo ensanchadas de la base, limbo ovado a lanceolado de 3 a 10 cm de largo y de 1 a 3.5 cm de ancho, ápice agudo a obtuso, margen entero a profundamente aserrado, con pubescencia similar a la del tallo. Su floración

comienza a partir del primer año con floretes de rayos y flores amarillas de disco (CONABIO, 2019).

Tradicionalmente, las infusiones de *H. inuloides* solas o en combinación con otras hierbas, se han utilizado principalmente para disminuir el dolor de contusiones, reumatismo, úlceras estomacales, para lavar heridas y otras afecciones dolorosas asociadas con procesos inflamatorios. También se usa para el tratamiento de trastornos gastrointestinales que incluyen diarrea, gastritis, dolor de estómago y úlceras, para tratar problemas dermatológicos como erisipela, inflamación tópica de la piel, erupciones, mordeduras de perros, quemaduras e infecciones causadas por picaduras de insectos o arañas, golpes, úlceras, enfermedades vasculares, fiebre, enfermedad renal e infecciones del tracto urinario, tos y enfermedades pulmonares, enfermedades dentales, infecciones vaginales o vaginitis. Además, se ha utilizado para tratar el cáncer, la diabetes, para aumentar el apetito, reducir la flema y para mantener la salud en mujeres después del parto (Alonso-Castro et al., 2011; Rodríguez-Chávez et al., 2017).

2.4.3 Compuestos químicos biológicamente activos

Heterotheca inuloides representa una fuente de compuestos químicos con diferentes patrones estructurales. Se han aislado compuestos fenólicos, sesquiterpenos, triterpenos, fitoesteroles y compuestos orgánicos volátiles del aceite esencial y extractos orgánicos de varias partes, incluidas las raíces, las partes aéreas y las flores. El aislamiento y la purificación de estos compuestos se han llevado a cabo utilizando diversas técnicas (Sagrero-Nieves y Bartley, 1996; Egas et al., 2017; Rodríguez-Chávez et al., 2017).

2.4.4 Actividad insecticida de especies del género *Heterotheca*

Los datos publicados indican que especies del género *Heterotheca* han mostrado actividad insecticida y acaricida contra el ácaro de la abeja *Varroa jacobsoni* Oudemans (Ruffinengo et al., 2002), larvas de tercer estadio de *Spodoptera litura* Fabricius. También se ha reportado la acción de *H. inuloides* Cass. en contra de *Sitophilus zeamais* Motschulsky y *Zabrotes subfasciatus* Boheman. Estos insectos son las principales plagas que infestan el maíz *Zea mais* (Poaceae) y el frijol *Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae) almacenados (Romero y Johnson, 2014). Los polvos de hojas y flores causaron 87.7 % de mortalidad sobre *S. zeamais* Motschulsky en los granos de maíz tratados 15 días después de la infestación (Juárez-Flores et al., 2010). La actividad contra *Z. subfasciatus* Boheman se consideró débil debido a que la mortalidad de adultos observada en los ensayos fue inferior al 40 % (Rendón-Huerta, 2013).

De acuerdo a la actividad toxicológica, Rodríguez-Chávez et al. (2015) reportaron que el sesquiterpeno 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno contenido en los extractos de *H. inuloides* tuvo una DL_{50} estimada de alrededor de 500 mg kg^{-1} en ratón, clasificándose en la Categoría 4 según el System Globally Harmonized System of Classification and Labeling Chemicals (GHS por sus siglas en inglés) de las Naciones Unidas. También se ha reportado una concentración de inhibición media (CI_{50}) en *Artemia salina* Linnaeus de $45.47 \pm 1.74 \text{ } \mu\text{M}$ para el mismo compuesto. Ruiz-Pérez et al. (2014) reportaron que los extractos acetónico y metanólico pueden tener actividad mutagénica. Sin embargo, la toxicidad aguda de los extractos y compuestos puros no han sido suficientemente evaluados.

3 HIPÓTESIS

Los extractos acetónico y metanólico de las partes aéreas de *Heterotheca inuloides* contienen sesquiterpenos los cuales presentarán actividad toxicológica contra *Poecilia reticulata*.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Determinar la actividad toxicológica de los extractos acetónico y metanólico de las partes aéreas de *Heterotheca inuloides* sobre *Poecilia reticulata*.

4.2 Objetivos Particulares

- 1) Evaluar la actividad toxicológica por exposición aguda de los extractos acetónico y metanólico de *Heterotheca inuloides* sobre alevines, adultos machos y hembras de *Poecilia reticulata*.
- 2) Identificar el compuesto principal del extracto que presente la mayor actividad toxicológica.
- 3) Evaluar la actividad toxicológica del compuesto mayoritario del extracto con mayor actividad sobre alevines, adultos machos y hembras de *Poecilia reticulata*.

5 MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Aprobación ética para uso de animales

Los procedimientos experimentales y el manejo de animales fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro (No. De oficio: CBQ19/023). Los bioensayos siguieron las pautas de la norma 203 OCDE (OCDE, 1992).

5.2 Origen de los peces

Los peces fueron obtenidos del Laboratorio de Análisis Químico de Alimento Vivo, perteneciente al Departamento El Hombre y su Ambiente de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

5.3 Aclimatación y acondicionamiento

La aclimatación se dio en peceras con 40 L de agua semidura reconstituida por 15 días (Cuadro 3) con plantas acuáticas (*Ceratophyllum demersum*) para evitar el estrés de los peces (Iannacone et al., 2007). La densidad de peces fue igual o menor a 3 peces por litro (Görelşahin et al., 2018). Se alimentaron *Ad libitum* con hojuelas para peces Lomas (hecho en Alemania por Tetra GmbH) hasta 12 h antes de cada ensayo. Se mantuvo un fotoperiodo de luz-oscuridad 14:10 a condiciones ambientales, así como la temperatura. Se colocó aireador y filtro en cada contenedor. La temperatura del agua fue de 20.7 ± 1.2 °C y la temperatura ambiente 23.4 ± 1.8 °C. El oxígeno disuelto se mantuvo en 5.1 mg L^{-1} (60.2 %).

5.4 Colecta del material vegetal

Se colectaron las partes aéreas, tallos, hojas y flores, de *Heterotheca inuloides* en zonas boscosas de Atlixco, Puebla. El material vegetal fue autenticado por M. en C. María Edelmira Linares-Mazari y un ejemplar se depositó en el Jardín Botánico del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) con número de colecta 2823.

Cuadro 3. Agua reconstituida

Reactivo	Fórmula	Cantidad para llevar a 1 L de agua destilada
Cloruro de calcio	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.2940 g
Sulfato de magnesio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1233 g
Bicarbonato de sodio	NaHCO_3	0.0648 g
Cloruro de potasio	KCl	0.0058 g

OECD, (1992).

5.5 Obtención del extracto

Los extractos se prepararon macerando el material seco y molido en acetona y metanol destilados, por separado. La maceración se realizó tres veces por 24 h a temperatura ambiente. El sobrenadante de maceración se filtró y se evaporó hasta sequedad en evaporador rotatorio R-210 (Büchi, Switzerland) (Rodríguez-Chávez et al., 2015).

5.6 Bioensayos con extracto

Se realizaron tres bioensayos: uno con alevines (menos de dos días de nacidos), uno con adultos machos (peso 0.168 g y longitud 2.8 cm) y otro con

adultos hembras (peso 0.849 g y longitud 3.5 cm). Se tomaron de forma aleatoria estratificada procurando representatividad muestral con el menor número de organismos posible, por lo tanto, cada bioensayo se realizó exponiendo tres ejemplares de pez guppy por unidad experimental con tres repeticiones (dos Santos Almeida et al., 2019; Li et al., 2019).

El extracto acetónico se disolvió utilizando polivinilpirrolidona (PVP) en relación 1:2 extracto:PVP. Con el residuo obtenido se prepararon cinco concentraciones 500, 250, 125, 62.5 y 31.2 mg L⁻¹ con agua semidura preparada para la cría de los peces como disolvente en vasos de precipitado de 250 mL; estas concentraciones fueron utilizadas para adultos machos y hembras. Por otro lado, para alevines se usaron 100, 10, 1, 0.1 y 0.01 mg L⁻¹. Se usó PVP en el blanco, también por triplicado. Las condiciones de temperatura fueron las mismas que en la etapa de aclimatación, pero sin aireación y sin alimentación. La lectura de mortalidad de los peces se tomó a las 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 h a partir de la exposición. Considerando muertos a los individuos cuando no se les observó movimiento opercular (OECD, 1992).

Las concentraciones usadas para los bioensayos de alevines, adultos machos y adultos hembras con el extracto metanólico fueron 500, 250, 125, 62.5 y 31.2 mg L⁻¹ con agua como disolvente en vasos de precipitado de 250 mL. Para este extracto no se utilizó co-disolvente por lo que el blanco constó de agua solamente. Al igual que en los bioensayos con el extracto acetónico, las condiciones de temperatura fueron las mismas que en la etapa de aclimatación, pero sin aireación y sin alimentación. La lectura de mortalidad de los peces se tomó a las 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 h a partir de la exposición. Se calculó la concentración letal media (CL₅₀) así como el tiempo letal medio (TL₅₀).

5.7 Compuesto mayoritario del extracto con mayor actividad

El compuesto 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno fue donado por el Dr. Guillermo Delgado Lamas del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El extracto acetónico fue analizado empleando un equipo de Cromatografía de Líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) Thermo Scientific UltiMate 3000 HPLC system, bomba binaria, detector de arreglo de diodos HL; con una columna analítica Agilent 927975-902, 4.6 x 550 mm, 1.8 micrón particle size ZORBAX Eclipse XDB-C18. La muestra fue inyectada con un volumen de 20 μL y tres repeticiones; el tiempo de corrida fue de 20 minutos.

5.8 Bioensayos con compuesto principal

Se realizaron tres tipos de bioensayo: con alevines, con adultos machos y adultos hembras. Se tomaron de forma aleatoria estratificada tres peces por unidad experimental con tres repeticiones.

El 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno se co-disolvió utilizando polivinilpirrolidona (PVP) en relación 1:2 compuesto:PVP. Con el residuo obtenido se prepararon cinco concentraciones 100, 10, 1, 0.1 y 0.01 mg L^{-1} con agua como disolvente en vasos de precipitado de 250 mL; se usó PVP a la concentración más alta como blanco negativo. Las condiciones de temperatura fueron las mismas que en la etapa de aclimatación pero sin aireación y sin alimentación. Los peces se revisaron cada 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 h. Se calculó la CL_{50} y TL_{50} del compuesto principal.

Los individuos muertos fueron retirados de los contenedores inmediatamente después de registrar la actividad mortalidad. Los peces muertos fueron manejados de acuerdo a la norma NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002

Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos
- Clasificación y especificaciones de manejo. Los residuos se colocaron en bolsas de polietileno color amarillo con el símbolo de riesgo biológico según lo indicado en la norma, las bolsas se cerraron y se trasladaron al almacén temporal de residuos peligrosos de la Facultad de Química y posteriormente fueron dispuestos según la empresa privada con la que la Facultad tiene convenio.

5.9 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de cada bioensayo se analizaron mediante un análisis de varianza ANDEVA de una vía y prueba de Tukey $\alpha=0.05$, así mismo se calculó la concentración letal media (CL_{50}) y tiempo letal medio (TL_{50}), usando el software estadístico Minitab® 18.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Efecto de extracto acetónico de *Heterotheca inuloides* sobre *Poecilia reticulata*

En el presente trabajo se observó que el extracto acetónico de las partes aéreas de *Heterotheca inuloides* sobre alevines de *Poecilia reticulata* (Cuadro 4) causó mortalidad del 100 % a una concentración de exposición de 100 mg L⁻¹ en 6 h de exposición, el tiempo letal medio TL₅₀ fue de 4.5 h, es decir que en este tiempo estimado se dio la mortalidad del 50 % de la población de peces. La concentración letal media CL₅₀ fue de 12.39 mg L⁻¹, de acuerdo a la clasificación toxicológica (Cuadro 13) de Helfrich et al. (2009) para productos agrícolas en peces, la CL₅₀ entró en la categoría de Ligeramente Tóxico.

Cuadro 4. Actividad toxicológica del extracto acetónico de las partes aéreas de *Heterotheca inuloides* sobre alevines de *Poecilia reticulata*

Concentración (mg L ⁻¹)	Mortalidad (%)									TL ₅₀ (h)
	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h	Total	
100	0	0	100	-	-	-	-	-	100.00 ^A	4.49
10	0	0	0	0	11.11	0	0	0	11.11 ^B	178.94
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00 ^B	--
0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00 ^B	--
0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00 ^B	--
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00 ^B	--
CL ₅₀	12.39 mg L ⁻¹									

Resultados son el promedio de 9 determinaciones. Se realizó ANOVA de una vía y prueba de Tukey, letras diferentes significan tratamientos estadísticamente diferentes. P<0.001. CL₅₀ Concentración letal media. TL₅₀ tiempo letal medio.

Respecto a la exposición del extracto acetónico en adultos machos (Cuadro 5), se registró mortalidad del 100 % a concentraciones de 500, 250 y 125 mg L⁻¹. Los TL₅₀ (h) calculados para estos tratamientos fueron de 0.5, 2 y 2.78 respectivamente. La concentración letal media fue de 62.94 mg L⁻¹ categorizándose en Ligeramente Tóxico de acuerdo con Helfrich et al. (2009).

Cuadro 5. Actividad toxicológica del extracto acetónico de las partes aéreas de *Heterotheca inuloides* sobre adultos machos de *Poecilia reticulata*

Concentración (mg L ⁻¹)	Mortalidad (%)									TL ₅₀ (h)
	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h	Total	
500	100	-	-	-	-	-	-	-	100.00 ^A	0.50
250	0	100	-	-	-	-	-	-	100.00 ^A	2
125	0	77.78	22.22	-	-	-	-	-	100.00 ^A	2.78
62.5	0	0	0	11.11	11.11	0	0	11.11	33.33 ^B	117.23
31.2	0	0	0	0	0	0	0	22.22	22.22 ^B	99.66
0	0	0	0	0	0	0	0	11.11	11.11 ^B	--
CL ₅₀	62.94 mg L ⁻¹									

Resultados son el promedio de 9 determinaciones. Se realizó ANOVA de una vía y prueba de Tukey, letras diferentes significan tratamientos estadísticamente diferentes. P<0.001. CL₅₀ Concentración letal media. (IC fiducial de 95 % inferior de 42.123 mg L⁻¹ y superior de 95.257 mg L⁻¹). TL₅₀ tiempo letal medio.

En el bioensayo con adultos hembras (Cuadro 6) se registró mortalidad del 100 % a 500 mg L⁻¹ y 250 mg L⁻¹; los TL₅₀ fueron 0.5 h y 2.67 h, respectivamente. A la concentración de 125 mg L⁻¹ se obtuvo 55.56 % de mortalidad acumulada a 96 h, menor a la registrada por los machos. La CL₅₀ para las hembras fue de 103.67 mg L⁻¹ entrando en la categoría de Mínimamente Tóxico según Helfrich et al. (2009).

Cuadro 6. Actividad toxicológica del extracto acetónico de las partes aéreas de *Heterotheca inuloides* sobre adultos hembras de *Poecilia reticulata*

Concentración (mg L ⁻¹)	Mortalidad (%)									TL ₅₀ (h)
	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h	Total	
500	88.89	11.11	-	-	-	-	-	-	100.00 ^A	0.50
250	0	88.89	11.11	-	-	-	-	-	100.00 ^A	2.67
125	0	22.22	0	0	11.11	22.22	0	0	55.56 ^{AB}	66.05
62.5	0	0	0	0	0	0	33.33	0	33.33 ^{BC}	100.95
31.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00 ^{BC}	--
0	0	0	0	0	0	22.22	0	0	22.22 ^C	--
CL ₅₀	103.67 mg L ⁻¹									

Resultados son el promedio de 9 determinaciones. Se realizó ANOVA de una vía y prueba de Tukey, letras diferentes significan tratamientos estadísticamente diferentes. P<0.001. CL₅₀ Concentración letal media. (IC fiducial de 95 % inferior de 69.099 mg L⁻¹ y superior de 161.550 mg L⁻¹). TL₅₀ tiempo letal medio.

Se observó una CL₅₀ menor en alevines respecto a adultos. Pelli y Connaughton (2015) reportaron que los efectos de fluoxetina en *P. reticulata* fueron más pronunciados a menor edad, es decir, que los alevines son más susceptibles que los adultos debido a su tamaño y por lo tanto, rápida absorción de los xenobióticos. No obstante, los contaminantes acuáticos podrían ser perjudiciales en todas las etapas de vida.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

6.2 Efecto de extracto metanólico de *Heterotheca inuloides* sobre *Poecilia reticulata*

Se observó que la mortalidad del extracto metanólico sobre alevines (Cuadro 7) fue del 100 % a las concentraciones de 500 mg L⁻¹ y 250 mg L⁻¹. El TL₅₀ a 500 mg L⁻¹ fue de 2 h y a 250 mg L⁻¹ fue de casi un día (23.09 h). La concentración letal media fue de 187.16 mg L⁻¹, según Helfrich et al. (2009) se categorizó en Mínimamente Tóxico.

Cuadro 7. Actividad toxicológica del extracto metanólico de las partes aéreas de *Heterotheca inuloides* sobre alevines de *Poecilia reticulata*

Concentración (mg L ⁻¹)	Mortalidad (%)									TL ₅₀ (h)
	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h	Total	
500	0	100	-	-	-	-	-	-	100.00	2
250	0	0	0	44.44	22.22	22.22	11.11	0	100.00	23.09
125	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	--
62.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	--
31.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	--
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	--
CL ₅₀	187.16 mg L ⁻¹									

Resultados son el promedio de 9 determinaciones. Se realizó ANOVA de una vía. CL₅₀ Concentración letal media. TL₅₀ tiempo letal medio.

En la exposición al extracto metanólico de las partes aéreas de *H. inuloides* en los adultos macho de *P. reticulata* (Cuadro 8), la única concentración que mostró mortalidad acumulada a 96 h fue a 500 mg L⁻¹, alcanzando 100 % de mortalidad, mientras que a la concentración de 250 mg L⁻¹ e inferiores se observó un efecto estadísticamente igual al control negativo.

Por otra parte, se observó que a la concentración más alta el TL₅₀ fue corto con apenas 1.32 h y la CL₅₀ fue de 223.97 mg L⁻¹ correspondiente a la categoría de Mínimamente Tóxico (Helfrich et al., 2009) (Cuadro 13).

Cuadro 8. Actividad toxicológica del extracto metanólico de las partes aéreas de *Heterotheca inuloides* sobre adultos machos de *Poecilia reticulata*

Concentración (mg L ⁻¹)	Mortalidad (%)									TL ₅₀ (h)
	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h	Total	
500	11.11	88.89	-	-	-	-	-	-	100.00 ^A	1.32
250	0	0	0	0	11.11	11.11	11.11	11.11	44.44 ^{AB}	93.50
125	0	0	0	0	0	11.11	0	0	11.11 ^B	151.87
62.5	0	0	0	0	11.11	11.11	0	0	22.22 ^B	123.56
31.2	0	0	0	11.11	11.11	0	0	0	22.22 ^B	138.70
0	0	0	0	0	0	11.11	11.11	0	22.22 ^B	--
CL ₅₀	223.97 mg L ⁻¹									

Resultados son el promedio de 9 determinaciones. Se realizó ANOVA de una vía y prueba de Tukey, letras diferentes significan tratamientos estadísticamente diferentes. P<0.001. CL₅₀ Concentración letal media. (IC fiducial de 95 % inferior de 148.728 mg L⁻¹ y superior de 364.322 mg L⁻¹). TL₅₀ tiempo letal medio.

La mortalidad acumulada a 96 h del extracto metanólico de las partes aéreas de *H. inuloides* en pez guppy hembras (Cuadro 9) llegó al 100 % en la concentración de 500 mg L⁻¹. Aunque se registraron individuos muertos en el control y en los tratamientos de 31.2 mg L⁻¹ y 62.5 mg L⁻¹, la mortalidad a estos niveles pudo haber ocurrido a la susceptibilidad de los individuos similar a lo que sucedió en el control. El TL₅₀ en 500 mg L⁻¹ fue de apenas 30 minutos (0.5 h); a 250 mg L⁻¹ el TL₅₀ pasó a ser de casi dos días (44.91 h).

Cuadro 9. Actividad toxicológica del extracto metanólico de las partes aéreas de *Heterotheca inuloides* sobre adultos hembras de *Poecilia reticulata*

Concentración (mg L ⁻¹)	Mortalidad (%)									
	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h	Total	TL ₅₀ (h)
500	88.89	11.11	-	-	-	-	-	-	100.00 ^A	0.50
250	11.11	33.33	0	11.11	0	0	0	0	55.56 ^{AB}	44.91
125	0	22.22	11.11	0	0	11.11	0	0	44.44 ^{AB}	90.57
62.5	0	0	11.11	11.11	0	0	11.11	0	33.33 ^B	117.25
31.2	11.11	11.11	11.11	0	0	0	0	0	33.33 ^B	196.71
0	0	11.11	11.11	0	0	0	0	0	22.22 ^B	--
CL ₅₀	153.74 mg L ⁻¹									

Resultados son el promedio de 9 determinaciones. Se realizó ANOVA de una vía y prueba de Tukey, letras diferentes significan tratamientos estadísticamente diferentes. P=0.011. CL₅₀ Concentración letal media. (IC fiducial de 95 % inferior de 73.542 mg L⁻¹ y superior de 269.985 mg L⁻¹). TL₅₀ tiempo letal medio.

La CL₅₀ a 96 h para las hembras fue de 153.74 mg L⁻¹, menor a la estimada para los peces machos. A pesar de ello, se clasificó también en la categoría Mínimamente Tóxico según Helfrich et al. (2009).

De acuerdo a los resultados presentados anteriormente, se identificó que las concentraciones letales medias provocadas por el extracto acetónico fueron menores a las del extracto metanólico de *H. inuloides*, es decir, el efecto letal en peces *Poecilia reticulata* se dio a menor concentración del extracto acetónico.

La CL₅₀ fue menor en alevines respecto a los adultos en el extracto acetónico. Esto se puede comparar con lo reportado por Ventura-Salcedo et al. (2016) para el extracto hexánico de *Senecio salignus* DC. (Asteraceae) que presentó CL₅₀ de 35.41 mg L⁻¹ en alevines y 71.63 mg L⁻¹ en adultos de *P. reticulata*; la diferencia podría radicar en la menor longitud y peso, así como en la diferente tasa metabólica: las larvas carecen de maduración fisiológica de órganos y tejidos responsables de la transformación y eliminación de contaminantes tóxicos, como lo son el riñón, intestino e hígado. En contraparte, los peces adultos cuentan con los órganos desarrollados para la eliminación de sustancias tóxicas (Grech et al., 2019).

Pino-Otín et al. (2019) obtuvieron CL₅₀ a 24 h para *Daphnia magna* de 0.093 y 0.103 mg L⁻¹ con los extractos etanólico y hexánico, respectivamente de las partes aéreas de *Artemisia absinthium* L. (Asteraceae). Las concentraciones fueron menores debido a que *D. magna* es un organismo de tamaño inferior y se encuentra en un nivel trófico menor a los peces. Con esto se demuestra que las plantas de la familia Asteraceae pueden ser tóxicas para organismos no blanco.

6.3 Identificación del compuesto principal en extracto acetónico

En la Figura 1 se muestra el cromatograma del extracto acetónico debido a que fue el de mayor actividad frente a *Poecilia reticulata* en los tres tipos de bioensayo: alevines, adultos machos y adultos hembras. En el cromatograma se observaron seis picos principales y, además, en la base unos picos más pequeños que pueden corresponder a otros. El pico de mayor intensidad se encontró en el tiempo de retención de 14.4 min. Empleando esta técnica, se han identificado

previamente ciertos compuestos de tipo presentes en el extracto acetónico de *Heterotheca inuloides* (Rodríguez-Chávez et al., 2019).

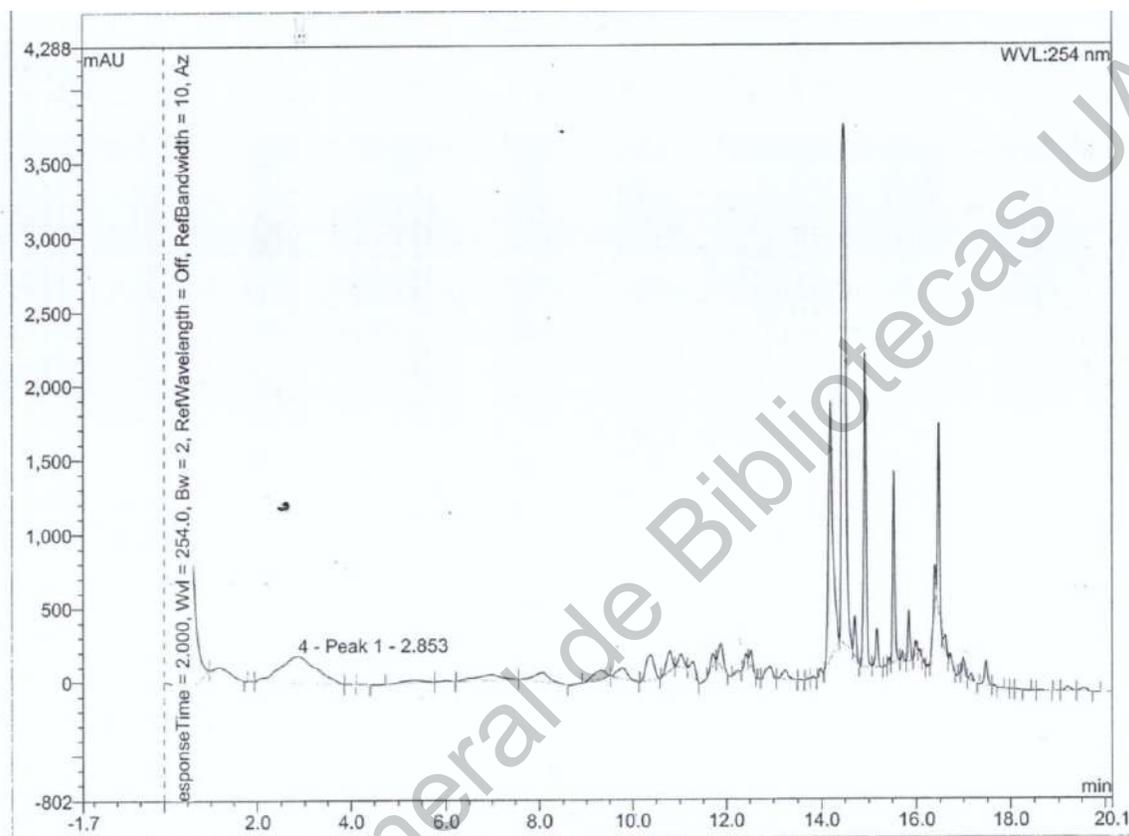


Figura 1. Cromatograma por HPLC del extracto acetónico de *Heterotheca inuloides*

La Figura 2 corresponde al cromatograma del compuesto puro aislado por cromatografía en columna. Se observa un pico con un tiempo de retención de 14.4 min, similar a la señal más grande observada en el cromatograma del extracto acetónico (Figura 1).

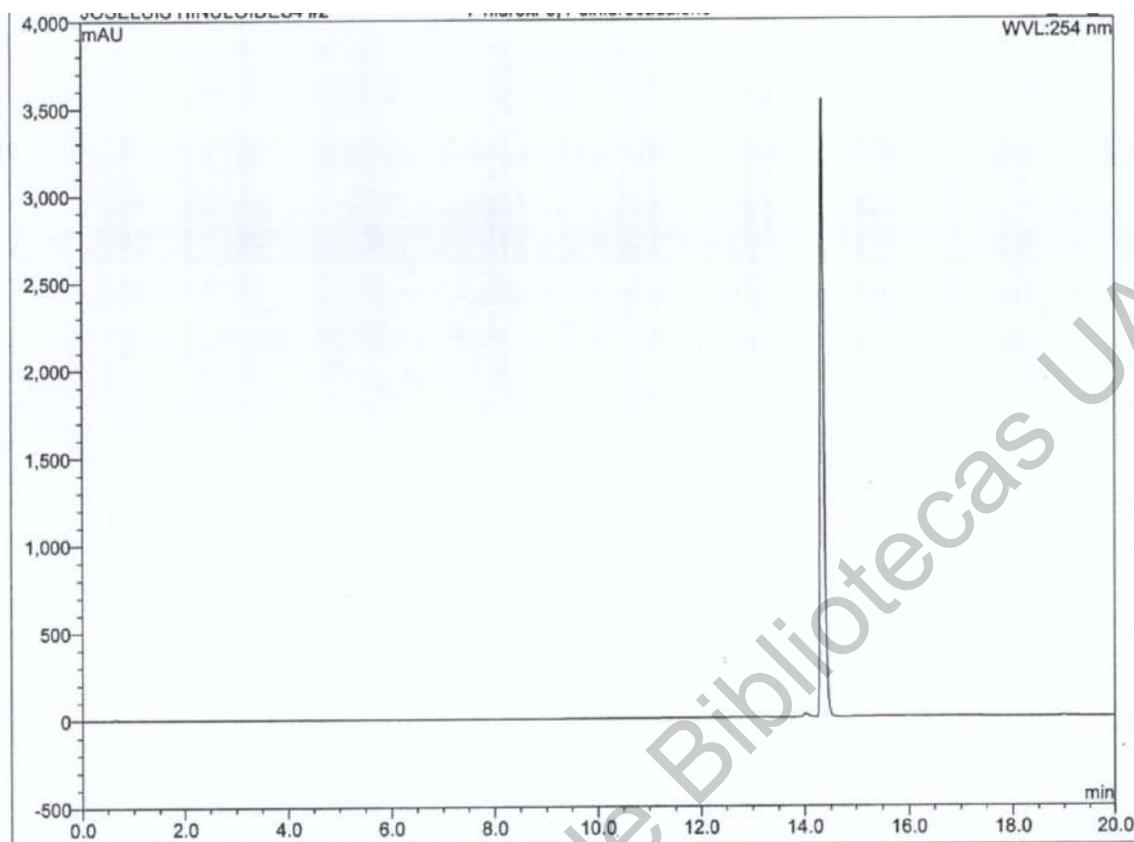


Figura 2. Cromatograma por HPLC del compuesto principal del extracto acetónico de *Heterotheca inuloides*

La similitud entre ambos tiempos de retención permitió indicar que el pico principal que se observa en el cromatograma del extracto acetónico de *H. inuloides* corresponde al compuesto 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno, mostrado en la Figura 3. La diferencia con el cadaleno es la saturación de un enlace en el primer anillo aromático y un sustituyente hidroxilo en el segundo anillo aromático (Ait El Had et al., 2020). Este compuesto es un sesquiterpeno, este grupo se caracteriza ya que posee tres unidades de isopreno, teniendo en total 15 átomos de carbono (Kashkooli et al., 2019).

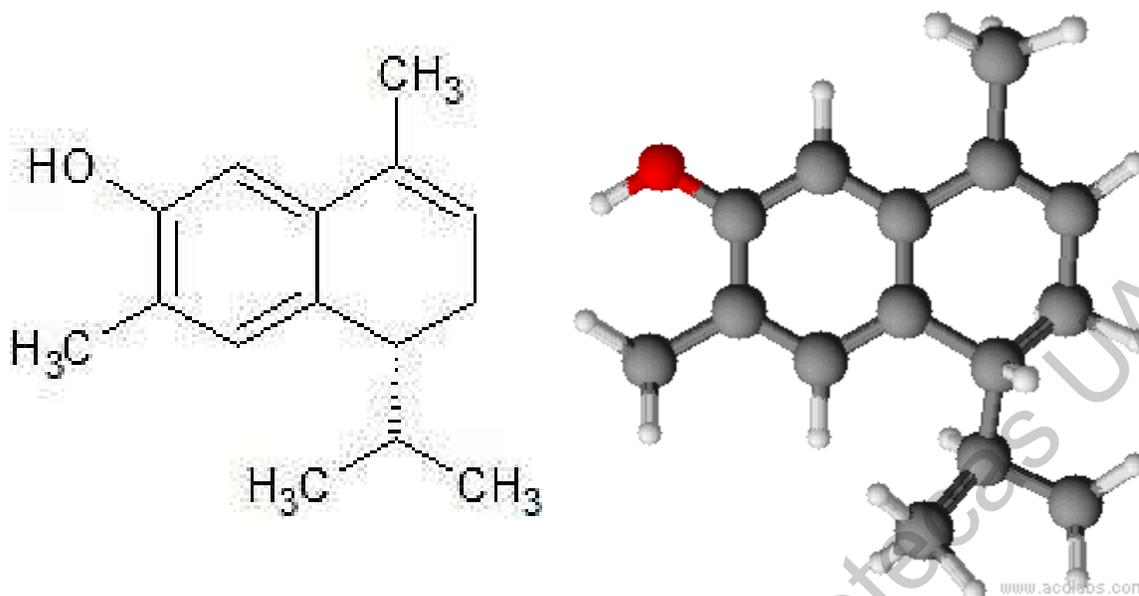


Figura 3. 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno

Las plantas de la familia Asteraceae son abundantes en monoterpenos y sesquiterpenos (Riaz et al., 2020). Por ejemplo, Julio et al. (2017) reportaron a (5Z)-2,6-dimetilocta-5,7-dien-2,3-diol, un monoterpeno como el compuesto principal aislado del hidrolato de *A. absinthium*. También se han aislado monoterpenos y sesquiterpenos de *Otanthus maritimus* L. como crisantenona, filifolona, cis-crisantenil acetato y α -pineno (Bessada et al., 2015).

Zhao et al. (2015) identificaron diferentes clases de sesquiterpenos en plantas del género *Senecio*: eremofilanos, cacaloides, eudesmanos, germacranos, bisabolanos y oplopanos; en menor cantidad cadinanos, fomalairdanos, cariofilanos, guaianos e isodaucanos. Se ha reportado al 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno como el compuesto principal del extracto acetónico de *H. inuloides* (Rodríguez-Chávez, Méndez-Cuesta, et al., 2019).

6.4 Efecto de 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno sobre *Poecilia reticulata*

La mortalidad del compuesto principal aislado del extracto acetónico de *Heterotheca inuloides* sobre alevines de *Poecilia reticulata* se muestra en el Cuadro 10. Se registró mortalidad del 100 % a las concentraciones de 100 y 10 mg L⁻¹, en las cuales el tiempo letal medio no superó una hora de exposición. En el tratamiento de 1 mg L⁻¹ se registró una mortalidad acumulada de 77.78 % con TL₅₀ de 59.7 h, un tiempo mayor con respecto al registrado para las concentraciones más altas. Las concentraciones menores (0.1 mg L⁻¹ y 0.01 mg L⁻¹) no mostraron efectos toxicológicos.

La concentración letal media calculada fue la más baja de todos los bioensayos de la presente investigación con 0.89 mg L⁻¹. De acuerdo a Helfrich et al. (2009) la categoría correspondiente (CL₅₀ de 0.11 a 1.0 mg L⁻¹ a 96 h) es Altamente tóxico en peces como producto agrícola. En el mismo sentido, la Norma Oficial Mexicana NOM-232-SSA1-2009, establece que, para plaguicidas de uso agrícola, forestal, pecuario, urbano, industrial y jardinería, se debe etiquetar como Extremadamente tóxico para peces al tener CL₅₀ ≤ 1 mg L⁻¹ a 96 h.

Cuadro 10. Actividad toxicológica de 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno sobre alevines de *Poecilia reticulata*

Concentración (mg L ⁻¹)	Mortalidad (%)									
	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h	Total	TL ₅₀ (h)
100	100	0	0	0	0	0	0	0	100.00 ^A	0.5
10	55.56	44.44	0	0	0	0	0	0	100.00 ^A	0.96
1	0	0	0	0	22.22	33.33	11.11	11.11	77.78 ^A	59.7
0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00 ^B	--
0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00 ^B	--
0	b	0	0	0	0	0	0	0	0.00 ^B	--
CL ₅₀	0.89 mg L ⁻¹									

Resultados son el promedio de 9 determinaciones. Se realizó ANOVA de una vía y prueba de Tukey, letras diferentes significan tratamientos estadísticamente diferentes. P<0.001. CL₅₀ Concentración letal media. TL₅₀ tiempo letal medio.

La actividad para adultos machos del compuesto principal se reportó en el Cuadro 11 en el que se observó mortalidad del 100 % en las concentraciones de 100 y 10 mg L⁻¹. Los TL₅₀ fueron 0.5 h y 2 h. Las concentraciones menores no mostraron diferencias significativas de efecto tóxico respecto al control.

La CL₅₀ fue de 4.09 mg L⁻¹ y de acuerdo a Helfrich et al. (2009) se encontró en Moderadamente Tóxico. Bullangpoti et al. (2018) reportaron las concentraciones letales medias a 24 h en *Poecilia reticulata* de dos monoterpenos con actividad insecticida, CL₅₀ de 10.99 mg L⁻¹ de timol y 1701.93 mg L⁻¹ de 1,8-cineol con el cual se observó una diferencia de un par de órdenes de magnitud respecto a este estudio.

Cuadro 11. Actividad toxicológica de 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno sobre adultos machos de *Poecilia reticulata*

Concentración (mg L ⁻¹)	Mortalidad (%)									Total	TL ₅₀ (h)
	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h			
100	100	-	-	-	-	-	-	-	-	100.00 ^A	0.50
10	0	100	-	-	-	-	-	-	-	100.00 ^A	2
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00 ^B	--
0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00 ^B	--
0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00 ^B	--
0	0	0	0	0	11.11	11.11	0	0	0	22.22 ^B	--
CL ₅₀	4.09 mg L ⁻¹										

Resultados son el promedio de 9 determinaciones. Se realizó ANOVA de una vía y prueba de Tukey, letras diferentes significan tratamientos estadísticamente diferentes. P<0.001. CL₅₀ Concentración letal media. (IC fiducial de 95 % inferior de 2.224 mg L⁻¹ y superior de 13.346 mg L⁻¹). TL₅₀ tiempo letal medio.

La Norma Oficial Mexicana NOM-232-SSA1-2009, establece que, para plaguicidas de uso agrícola, forestal, pecuario, urbano, industrial y jardinería, se debe etiquetar como Altamente Tóxico para peces al tener CL₅₀ entre 1 y 10 mg L⁻¹ a 96 h. La exposición con pez guppy alevines y con hembras adultos se clasificó como Extremadamente tóxico de acuerdo a la misma norma al tener menores CL₅₀.

El efecto de 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno sobre adultos hembras se muestra en el Cuadro 12 en el cual se observó mortalidad de 100 % a 100 mg L⁻¹ y 10 mg L⁻¹. Los TL₅₀ fueron de 1.21 h a 10 mg L⁻¹ y de media hora a la concentración más alta probada en este bioensayo 100 mg L⁻¹. Se registró una mortalidad del 55.56 % a 1 mg L⁻¹ con un TL₅₀ de más de tres días (86.07 h). En el control y las

concentraciones de 0.01 mg L⁻¹ y 0.1 mg L⁻¹ no se encontraron peces muertos ni con efectos tóxicos.

Cuadro 12. Actividad toxicológica de 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno sobre adultas hembras de *Poecilia reticulata*

Concentración (mg L ⁻¹)	Mortalidad (%)									
	1h	3h	6h	12h	24h	48h	72h	96 h	Total	TL ₅₀ (h)
100	100	-	-	-	-	-	-	-	100.00 ^A	0.50
10	22.22	77.78	-	-	-	-	-	-	100.00 ^A	1.21
1	0	11.11	0	0	22.22	0	0	22.22	55.56 ^B	86.07
0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00 ^C	--
0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00 ^C	--
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00 ^C	--
CL ₅₀	0.98 mg L ⁻¹									

Resultados son el promedio de 9 determinaciones. Se realizó ANOVA de una vía y prueba de Tukey, letras diferentes significan tratamientos estadísticamente diferentes. P<0.001. CL₅₀ Concentración letal media. TL₅₀ tiempo letal medio.

La CL₅₀ a 96 h para el compuesto aislado sobre adultas hembras fue de 0.98 mg L⁻¹, de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-232-SSA1-2009, que establece que para plaguicidas de uso agrícola, forestal, pecuario, urbano, industrial y jardinería, se debe etiquetar como Extremadamente Tóxico para peces al tener CL₅₀ ≤ 1 mg L⁻¹ a 96 h, al igual que este mismo compuesto en alevines. Según Helfrich et al. (2009) en el Cuadro 13 el compuesto se clasificó en Altamente Tóxico.

En comparación con Bullangpoti et al. (2018), la CL₅₀ de 0.98 mg L⁻¹ del sesquiterpeno fue menor a las reportadas por los autores: CL₅₀ a 24 h de 12.51 mg L⁻¹ y 3997.07 mg L⁻¹ de timol y 1,8-cineol respectivamente, estos monoterpenos con actividad insecticida clasificarían como Ligeramente Tóxico y Mínimamente Tóxico.

Cuadro 13. Categorías toxicológicas para productos agrícolas en peces

Clase de toxicidad	CL ₅₀ -96 h (mg L ⁻¹)
Súper tóxico	<0.01
Extremadamente tóxico	0.01 a 0.1
Altamente tóxico	0.11 a 1.0
Moderadamente tóxico	1.1 a 10
Ligeramente tóxico	11 a 100
Mínimamente tóxico	>100

Helfrich et al., (2009).

En los tres tipos de bioensayos se registró también el comportamiento de los peces y se destacó que, en los minutos previos a la muerte dada por el 7-hidroxí-3,4-dihidrocadaleno, su nado fue errático e incluso se observó la inmovilidad de los individuos al mantenerse en el fondo del recipiente con reacción al tocar el pedúnculo caudal. Además, los peces presentaron movimiento rápido de las branquias e incremento de nado en la mayor concentración. Estas observaciones son similares a las reportadas por Bullangpoti et al. (2018) en la misma especie con la exposición a timol, un monoterpeno.

Yousefi et al. (2018) obtuvieron resultados de anestesia en juveniles de carpa común *Cyprinus carpio* Linnaeus con dos monoterpenos: 300 – 100 mg L⁻¹ con citronelal y, por separado, 400 – 2000 mg L⁻¹ con linalool. El efecto anestésico de este último terpeno en pez *Rhamdia quelen* Quoy y Gaimard, ha sido reportado a 150 mg L⁻¹ (Heldwein et al., 2014).

Sharbidre et al. (2011) reportaron para metil paratión CL₅₀ a 96 h de 8.48 mg L⁻¹ y para clorpirifós 0.176 mg L⁻¹, ambos en adultos de pez guppy. Los compuestos son plaguicidas químicos sintéticos organofosforados y los valores de CL₅₀ rondan alrededor del calculado en el presente trabajo (0.89 mg L⁻¹) para el compuesto aislado de un extracto botánico. Los autores también describieron

incremento de movimiento opercular, nado anormal y estado letárgico o hiperactividad previos a la muerte; condiciones similares observadas en la exposición al 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno.

Deltametrina es un plaguicida químico sintético piretroide que presentó CL_{50} a 96 h en carpa *Labeo rohita* de 0.38 mg L^{-1} (Suvetha et al., 2015). Fue una concentración menor a las presentadas en esta investigación a pesar de que el tamaño de las carpas duplica el del pez guppy. La CL_{50} a 48 h para *P. reticulata* fue $5.13 \mu\text{g L}^{-1}$ (Viran et al., 2003). La toxicidad del plaguicida piretroide respecto a los extractos de *H. inuloides*, así como del compuesto aislado, fue mayor y podría explicarse debido a que los peces parecen ser deficientes en el sistema enzimático que hidroliza los piretroides (Bille et al., 2017).

Por otra parte, el compuesto presentó un coeficiente de partición ($\log P$) de 4.548 (Mendoza-Fuentes, 2019). Este coeficiente representa la división de una molécula en estado neutro en equilibrio entre dos fases líquidas en contacto: octanol-agua (Işık et al., 2019). El valor positivo denotó que el sesquiterpeno es lipofílico; es decir, que tiene afinidad por los tejidos grasos lo que explicaría la toxicidad del xenobiótico en el pez guppy; la lipofilicidad facilita la absorción por las branquias y una vez dentro del organismo, la eliminación es difícil (Fan et al., 2019; Tang et al., 2018). Además, la ONU (2019) menciona que las sustancias con un potencial real de bioconcentración son aquellas con un valor de $\log P \geq 4$.

Los extractos botánicos y sesquiterpenos no se encuentran dentro del listado de sustancias peligrosas en la Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005, Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos. A pesar de ello, en este trabajo se reportó que el compuesto 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno tuvo toxicidad moderada en pez guppy.

6.5 Perspectivas del trabajo

Se requieren más estudios para comprender mejor los mecanismos de acción de los plaguicidas botánicos, tanto de los extractos como de los compuestos aislados en el pez guppy, así como una evaluación más completa de riesgo a diferentes comunidades naturales de organismos no blanco de diferentes niveles tróficos y análisis de biodegradabilidad a fin de garantizar una incorporación más segura de los productos en el manejo de plagas agrícola.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

7 CONCLUSIONES

Los peces *Poecilia reticulata* presentaron mayor mortalidad tanto en larvas como en machos y hembras a menores concentraciones del extracto acetónico de *Heterotheca inuloides* respecto del extracto metanólico de la misma planta. La clasificación de toxicidad para peces fue ligeramente y mínimamente tóxico para los extractos acetónico y metanólico, respectivamente.

El sesquiterpeno 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno fue el compuesto principal presente en el extracto acetónico de *H. inuloides*, dicho compuesto se puede catalogar como altamente tóxico por exposición aguda en machos adultos de *P. reticulata* y extremadamente tóxico para alevines como para hembras adultos.

Por lo tanto, la aplicación de extractos naturales como productos insecticidas agrícolas son ecológicamente más seguros para organismos no blanco que el uso de sus compuestos activos aislados debido a que se observó mayor mortalidad con el 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno en *P. reticulata*.

8 REFERENCIAS

- Ait El Had, M., Oukhrib, A., Zaki, M., Urrutigoñy, M., Benharref, A., & Chauvin, R. (2020). Versatile synthesis of cadalene and iso-cadalene from himachalene mixtures: Evidence and application of unprecedented rearrangements. *Chinese Chemical Letters*, (2019), 8–11. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2020.03.008>
- Alehaideb, Z., Chin, K. C., Yao, M. C., & Law, F. C. P. (2019). Predicting the content of anthraquinone bioactive in Rhei rhizome (*Rheum officinale* Baill.) with the concentration addition model. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 27(1), 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.07.015>
- Alonso-Castro, A. J., Villarreal, M. L., Salazar-Olivo, L. A., Gomez-Sanchez, M., Dominguez, F., & Garcia-Carranca, A. (2011). Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(3), 945–972. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.11.055>
- Andrade, T. S., Henriques, J. F., Almeida, A. R., Machado, A. L., Koba, O., Giang, P. T., ... Domingues, I. (2016). Carbendazim exposure induces developmental, biochemical and behavioural disturbance in zebrafish embryos” *Aquatic Toxicology*, 170, 390-399. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.01.015>
- AnvariFar, H., Amirkolaie, A. K., Jalali, A. M., Miandare, H. K., Sayed, A. E.-D. H., Üçüncü, S., ... Romano, N. (2018). Environmental pollution and toxic substances: Cellular apoptosis as a key parameter in a sensible model like fish. *Aquatic Toxicology*, 204, 144–159. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.09.010>
- Arrázola, G., Grané, N., & Dicenta, F. (2013). Determinación de compuestos cianogénicos amigdalina y prunasina en semillas de almendras (*Prunus Dulcis* L) utilizando cromatografía líquida de alta resolución. *Revista Colombiana de Química*, 42(3), 1–22.
- Bessada, S. M. F., Barreira, J. C. M., & Oliveira, M. B. P. P. (2015). Asteraceae species with most prominent bioactivity and their potential applications: A review. *Industrial Crops and Products*, 76, 604–615. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.07.073>

- Bille, L., Binato, G., Gabrieli, C., Manfrin, A., Pascoli, F., Pretto, T., ... Arcangeli, G. (2017). First report of a fish kill episode caused by pyrethroids in Italian freshwater. *Forensic Science International*, 281, 176–182. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.10.040>
- Bullangpoti, V., Mujchariyakul, W., Laksanavilat, N., & Junhirun, P. (2018). Acute toxicity of essential oil compounds (thymol and 1,8-cineole) to insectivorous guppy, *Poecilia reticulata* Peters, 1859. *Agriculture and Natural Resources*, 52(2), 190–194. <https://doi.org/10.1016/j.anres.2018.06.011>
- Chawla, P., Kaushik, R., Shiva Swaraj, V. J., & Kumar, N. (2018). Organophosphorus pesticides residues in food and their colorimetric detection. *Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management*, 10, 292–307. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2018.07.013>
- Cheraghi Niroumand, M., Farzaei, M. H., Karimpour-Razkenari, E. E., Amin, G., Khanavi, M., Akbarzadeh, T., & Shams-Ardekani, M. R. (2016). An evidence-based review on medicinal plants used as insecticide and insect repellent in traditional Iranian medicine. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 18(2). <https://doi.org/10.5812/ircmj.22361>
- Coballase-Urrutia, E., Pedraza-Chaverri, J., Camacho-Carranza, R., Cárdenas-Rodríguez, N., Huerta-Gertrudis, B., Medina-Campos, O. N., ... Espinosa-Aguirre, J. J. (2010). Antioxidant activity of *Heterotheca inuloides* extracts and of some of its metabolites. *Toxicology*, 276(1), 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2010.06.013>
- Dawar, F. U., Zuberi, A., Azizullah, A., & Khan Khattak, M. N. (2016). Effects of cypermethrin on survival, morphological and biochemical aspects of rohu (*Labeo rohita*) during early development. *Chemosphere*, 144, 697–705. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.09.007>
- Deane, E. E., & Woo, N. Y. S. (2005). Growth hormone increases hsc70/hsp70 expression and protects against apoptosis in whole blood preparations from silver sea bream. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1040, 288–292. <https://doi.org/10.1196/annals.1327.044>
- Del Vitto, L. A., & Petenatti, E. M. (2015). Asteráceas de importancia económica y ambiental Segunda parte: Otras plantas útiles y nocivas. *Multequina*, 24, 47-74.

- DiBartolomeis, M., Kegley, S., Mineau, P., Radford, R., & Klein, K. (2019). An assessment of acute insecticide toxicity loading (AITL) of chemical pesticides used on agricultural land in the United States. *PLoS ONE*, *14*(8), 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220029>
- dos Santos Almeida, S., Lopes Rocha, T., Qualhato, G., Ribeiro Oliveira, L. de A., Amaral, C. L. do, Conceição, E. C. da, ... Bailão, E. F. L. C. (2019). Acute exposure to environmentally relevant concentrations of benzophenone-3 induced genotoxicity in *Poecilia reticulata*. *Aquatic Toxicology*, *216*(June), 105293. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105293>
- Egas, V., Millán, E., Collado, J. A., Ramírez-Apan, T., Méndez-Cuesta, C. A., Muñoz, E., & Delgado, G. (2017). Effect of natural and semi-synthetic cadinanes from *Heterotheca inuloides* on NF- κ B, Nrf2 and STAT3 signaling pathways and evaluation of their in vitro cytotoxicity in human cancer cell lines. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, *25*(12), 3135–3147. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.03.069>
- Fan, L. Y., Zhu, D., Yang, Y., Huang, Y., Zhang, S. N., Yan, L. C., ... Zhao, Y. H. (2019). Comparison of modes of action among different trophic levels of aquatic organisms for pesticides and medications based on interspecies correlations and excess toxicity: Theoretical consideration. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *177*(March), 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.03.111>
- Ferrante, M., Pappalardo, A. M., Ferrito, V., Pulvirenti, V., Fruciano, C., Grasso, A., ... Copat, C. (2017). Bioaccumulation of metals and biomarkers of environmental stress in *Parablennius sanguinolentus* (Pallas, 1814) sampled along the Italian coast. *Marine Pollution Bulletin*, *122*(1–2), 288–296. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.06.060>
- Forouhar Vajargah, M., Mohamadi Yalsuyi, A., Sattari, M., Prokić, M. D., & Faggio, C. (2020). Effects of Copper Oxide Nanoparticles (CuO-NPs) on parturition time, survival rate and reproductive success of guppy fish, *Poecilia reticulata*. *Journal of Cluster Science*, *31*(2), 499–506. <https://doi.org/10.1007/s10876-019-01664-y>
- Gentile, N., Bosch, B., Mañas, F., Gorla, N., & Aiassa, D. (2017). Los plaguicidas en

las zonas de cultivo y las repercusiones en la salud. *Salud(i)Ciencia*, 22(6), 569–571.

Gibbons, D., Morrissey, C., & Mineau, P. (2015). A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1), 103–118. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3180-5>

Görelşahin, S., Yanar, M., & Kumlu, M. (2018). The effects of stocking density, Tubifex feeding and monosex culture on growth performance of guppy (*Poecilia reticulata*) in a closed indoor recirculation system. *Aquaculture*, 493(April), 153–157. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.05.004>

Grech, A., Tebby, C., Brochot, C., Bois, F. Y., Bado-Nilles, A., Dorne, J. Lou, ... Beaudouin, R. (2019). Generic physiologically-based toxicokinetic modelling for fish: Integration of environmental factors and species variability. *Science of the Total Environment*, 651, 516–531. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.163>

He, L., Xiao, K., Zhou, C., Li, G., Yang, H., Li, Z., & Cheng, J. (2019). Insights into pesticide toxicity against aquatic organism: QSTR models on *Daphnia Magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 173(February), 285–292. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.02.014>

Heldwein, C. G., Silva, L. de L., Gai, E. Z., Roman, C., Parodi, T. V. parfau., Bürger, M. E., ... Heinzmann, B. M. (2014). S-(+)-Linalool from *Lippia alba*: Sedative and anesthetic for silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 41(6), 621–629. <https://doi.org/10.1111/vaa.12146>

Helfrich L.A., Weigmann D.L., Hipkins P., S. E. R. (2009). Pesticides and aquatic animals : a guide to reducing impacts on aquatic systems. *Virginia Polytechnic Institute and State University*, 24.

Iannacone, J., Onofre, R., & Huanqui, O. (2007). Efectos ecotoxicológicos del cartap sobre *Poecilia reticulata* "guppy" (Poeciliidae) y *Paracheirodon innesi* "neon tetra" (Characidae). *Gayana (Concepción)*, 71(2), 170-177.

Ishaq, O., Sadanandan, S. K., & Wählby, C. (2017). Deep fish: Deep learning–based classification of zebrafish deformation for high-throughput screening. *SLAS Discovery*, 22(1), 102–107. <https://doi.org/10.1177/1087057116667894>

- Işık, M., Levorse, D., Mobley, D. L., Rhodes, T., & Chodera, J. D. (2019). Octanol–water partition coefficient measurements for the SAMPL6 blind prediction challenge. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 1-16. <https://doi.org/10.1007/s10822-019-00271-3>
- Jiang, J., Ma, D., Zou, N., Yu, X., Zhang, Z., Liu, F., & Mu, W. (2018). Concentrations of imidacloprid and thiamethoxam in pollen, nectar and leaves from seed-dressed cotton crops and their potential risk to honeybees (*Apis mellifera* L.). *Chemosphere*, 201, 159-167. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.02.168>
- Julio, L. F., González-Coloma, A., Burillo, J., Diaz, C. E., & Andrés, M. F. (2017). Nematicidal activity of the hydrolate byproduct from the semi industrial vapor pressure extraction of domesticated *Artemisia absinthium* against *Meloidogyne javanica*. *Crop Protection*, 94, 33–37. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.12.002>
- Kari, G., Rodeck, U., & Dicker, A. P. (2007). Zebrafish: An emerging model system for human disease and drug discovery. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 82(1), 70–80. <https://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100223>
- Kashkooli, A. B., van der Krol, A. R., Rabe, P., Dickschat, J. S., & Bouwmeester, H. (2019). Substrate promiscuity of enzymes from the sesquiterpene biosynthetic pathways from *Artemisia annua* and *Tanacetum parthenium* allows for novel combinatorial sesquiterpene production. *Metabolic Engineering*, 54(October 2018), 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.01.007>
- Lawler, S. P. (2017). Environmental safety review of methoprene and bacterially-derived pesticides commonly used for sustained mosquito control. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 139(August 2016), 335–343. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.12.038>
- Li, X., Wang, J., Yu, M., Zhang, X., Wang, W., Tian, H., & Ru, S. (2019). 2,2'-Dithiobis-pyridine induced reproductive toxicity in male guppy (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 169(October 2018), 778–785. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.076>
- Malaj, E., Guénard, G., Schäfer, R. B., & Von Der Ohe, P. C. (2016). Evolutionary patterns and physicochemical properties explain macroinvertebrate sensitivity

- to heavy metals. *Ecological Applications*, 26(4), 1249–1259.
<https://doi.org/10.1890/15-0346>
- Marutescu, L., Popa, M., Saviuc, C., Lazar, V., & Chifiriuc, M. C. (2017). Botanical pesticides with virucidal, bactericidal, and fungicidal activity. *New pesticides and soil sensors*, 311-335. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804299-1.00009-6>
- Newton, I. (2018). Organochlorine pesticides, Rachel Carson, and the environmental movement. *Encyclopedia of the Anthropocene*, 97-104.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809665-9.09989-4>
- OECD, Organization for Economic Cooperation and Development. (1992). Fish, acute toxicity test. *Guideline for the Testing of Chemicals*, (July), 1–9.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1787/9789264069961-en>
- ONU, Organización de las Naciones Unidas. (2019). *Clasificación Y Etiquetado De Productos Químicos (SGA)* (Octava edi). Nueva York y Ginebra.
- Pavela, R., & Govindarajan, M. (2017). The essential oil from *Zanthoxylum monophyllum* a potential mosquito larvicide with low toxicity to the non-target fish *Gambusia affinis*. *Journal of Pest Science*, 90(1), 369–378.
<https://doi.org/10.1007/s10340-016-0763-6>
- Pelli, M., & Connaughton, V. P. (2015). Chronic exposure to environmentally-relevant concentrations of fluoxetine (Prozac) decreases survival, increases abnormal behaviors, and delays predator escape responses in guppies. *Chemosphere*, 139, 202–209.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.06.033>
- Pino-Otín, M. R., Ballesteros, D., Navarro, E., González-Coloma, A., Val, J., & Mainar, A. M. (2019). Ecotoxicity of a novel biopesticide from *Artemisia absinthium* on non-target aquatic organisms. *Chemosphere*, 216, 131–146.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.071>
- Ranjani, T. S., Pitchika, G. K., Yedukondalu, K., Gunavathi, Y., Daveedu, T., Sainath, S. B., ... Pradeepkiran, J. A. (2020). Phenotypic and transcriptomic changes in zebrafish (*Danio rerio*) embryos/larvae following cypermethrin exposure. *Chemosphere*, 249, 126148.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126148>
- Rashwan, R. S., & Hammad, D. M. (2020). Toxic effect of *Spirulina platensis* and

Sargassum vulgar as natural pesticides on survival and biological characteristics of cotton leaf worm *Spodoptera littoralis*. *Scientific African*, 8, e00323. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00323>

Rendón-Huerta, J. (2013). Insecticide effect of wild plant powders on bean weevil (*Zabrotes subfasciatus* Boheman; Coleoptera: Bruchidae) in vitro. *African Journal of Agricultural Research*, 8(11), 971–977. <https://doi.org/10.5897/AJAR12.1757>

Riaz, M., Ahmad, R., Rahman, N. U., Khan, Z., Dou, D., Sechel, G., & Manea, R. (2020). Traditional uses, Phyto-chemistry and pharmacological activities of *Tagetes patula* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 255, 112718. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112718>

Rocha, T. L., Santos, A. P. R. dos, Yamada, Á. T., Soares, C. M. de A., Borges, C. L., Bailão, A. M., & Sabóia-Morais, S. M. T. (2015). Proteomic and histopathological response in the gills of *Poecilia reticulata* exposed to glyphosate-based herbicide. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 40(1), 175–186. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.04.016>

Rodríguez-Chávez, J. L., Coballase-Urrutia, E., Sicilia-Argumedo, G., Ramírez-Apan, T., & Delgado, G. (2015). Toxicological evaluation of the natural products and some semisynthetic derivatives of *Heterotheca inuloides* Cass (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 175, 256–265. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.08.055>

Rodríguez-Chávez, J. L., Egas, V., Linares, E., Bye, R., Hernández, T., Espinosa-García, F. J., & Delgado, G. (2017). Mexican Arnica (*Heterotheca inuloides* Cass. Asteraceae: Astereae): Ethnomedical uses, chemical constituents and biological properties. *Journal of Ethnopharmacology*, 195, 39–63. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.11.021>

Rodríguez-Chávez, J. L., Franco-Navarro, F., & Delgado, G. (2019). In vitro nematocidal activity of natural and semisynthetic cadinenes from *Heterotheca inuloides* against the plant-parasitic nematode *Nacobbus aberrans* (Tylenchida: Pratylenchidae). *Pest Management Science*, 75(6), 1734–1742. <https://doi.org/10.1002/ps.5294>

Rodríguez-Chávez, J. L., Méndez-Cuesta, C. A., Ramírez-Apan, T., Egas, V., Ávila,

- J. L., Neira-González, A., ... Delgado, G. (2019). Chemo-sensitizing activity of natural cadinanes from *Heterotheca inuloides* in human uterine sarcoma cells and their in silico interaction with ABC transporters. *Bioorganic Chemistry*, 91(February), 103091. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103091>
- Romero, J., & Johnson, C. D. (2014). Revision of the genus *Zabrotes* Horn of Mexico (Coleoptera: Bruchidae: Amblycerinae). *Transactions of the American Entomological Society*, 126(2), 221–274.
- Ruffinengo, S. R., Eguaras, M. J., Cora, D., Rodriguez, E., Bedascarrasbure, E., Bailac, P. N., & Ponzi, M. I. (2002). Biological activity of *Heterotheca latifolia* essential oil against *Varroa jacobsoni*. *Journal of Essential Oil Research*, 14(6), 462–464. <https://doi.org/10.1080/10412905.2002.9699921>
- Ruiz-Pérez, N. J., Arriaga-Alba, M., Sánchez-Navarrete, J., Camacho-Carranza, R., Hernández-Ojeda, S., & Espinosa-Aguirre, J. J. (2014). Mutagenic and antimutagenic effects of *Heterotheca inuloides*. *Scientific Reports*, 4, 4–9. <https://doi.org/10.1038/srep06743>
- Sabarwal, A., Kumar, K., & Singh, R. P. (2018). Hazardous effects of chemical pesticides on human health—Cancer and other associated disorders. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 63(July), 103–114. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.08.018>
- Sagrero-Nieves, L., & Bartley, J. P. (1996). Volatile components from the leaves of *Heterotheca inuloides* Cass. *Flavour and Fragrance Journal*, 11(1), 49–51. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1026\(199601\)11:1<49::AID-FFJ538>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(199601)11:1<49::AID-FFJ538>3.0.CO;2-J)
- Sharbidre, A. A., Metkari, V., & Patode, P. (2011). Effect of methyl parathion and chlorpyrifos on certain biomarkers in various tissues of guppy fish, *Poecilia reticulata*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 101(2), 132–141. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.09.002>
- Steinbrecht, W., Hegglin, M. I., Harris, N., & Weber, M. (2018). Is global ozone recovering? *Comptes Rendus - Geoscience*, 350(7), 368–375. <https://doi.org/10.1016/j.crte.2018.07.012>
- Stipanovic, R. D., Puckhaber, L. S., Reibenspies, J. H., & Williams, H. J. (2006). The absolute configuration of (-)-3-hydroxy- α -calacorene. *Phytochemistry*, 67(13), 46

1304–1308. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.05.019>

- Suvetha, L., Saravanan, M., Hur, J.-H., Ramesh, M., & Krishnapriya, K. (2015). Acute and sublethal intoxication of deltamethrin in an Indian major carp, *Labeo rohita*: Hormonal and enzymological responses. *The Journal of Basic & Applied Zoology*, *72*, 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.jobaz.2015.04.005>
- Tang, W., Wang, D., Wang, J., Wu, Z., Li, L., Huang, M., ... Yan, D. (2018). Pyrethroid pesticide residues in the global environment: An overview. *Chemosphere*, *191*, 990–1007. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.115>
- Tian, H., Li, Y., Wang, W., Wu, P., & Ru, S. (2012). Exposure to monocrotophos pesticide during sexual development causes the feminization/demasculinization of the reproductive traits and a reduction in the reproductive success of male guppies (*Poecilia reticulata*). *Toxicology and Applied Pharmacology*, *263*(2), 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.06.006>
- Tigar, B. J., Osborne, P. E., Key, G. E., Flores-S, M. E., & Vazquez-A, M. (1994). Insect pests associated with rural maize stores in Mexico with particular reference to *Prostephanus truncatus* (Coleoptera: bostrichidae). *Journal of Stored Products Research*, *30*(4), 267–281. [https://doi.org/10.1016/S0022-474X\(94\)90319-0](https://doi.org/10.1016/S0022-474X(94)90319-0)
- Vallès, J., Garcia, S., Hidalgo, O., Martín, J., Pellicer, J., Sanz, M., & Garnatje, T. (2011). Biology, genome evolution, biotechnological issues and research including applied perspectives in *Artemisia* (Asteraceae). *Advances in Botanical Research*, *60*, 349-419. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385851-1.00015-9>
- Venditto, V. J., & Simanek, E. E. (2010). Cancer therapies utilizing the camptothecins: A review of the in vivo literature. *Molecular Pharmaceutics*, *7*(2), 307–349. <https://doi.org/10.1021/mp900243b>
- Ventura-Salcedo, S. A., Ramos-Lopez, M. A., Pérez-Moreno, V., Rea-López, M. Á., Rodríguez-Muñoz, M. E., & Robles, J. S. (2016). Actividad biológica del extracto hexánico de *Senecio salignus* (Asteraceae). *Entomología Mexicana*, *3*, 794–799.
- Villa-Martínez, A., Pérez-Leal, R., Armando Morales-Morales, H., Basurto-Sotelo, M., Manuel Soto-Parra, J., & Martínez-Escudero, E. (2014). Situación actual en

el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta agronómica*, 64(2), 194–205. <https://doi.org/10.15446/acag.v64n2.43358>

Villavicencio-Nieto, M. Á., Pérez-Escandón, B. E., & Gordillo-Martínez, A. J. (2010). Plantas tradicionalmente usadas como plaguicidas en el Estado de Hidalgo, México. *Polibotánica*, 30, 193–238.

Viran, R., Erkoç, F. Ü., Polat, H., & Koçak, O. (2003). Investigation of acute toxicity of deltamethrin on guppies (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55(1), 82–85. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(02\)00096-9](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(02)00096-9)

Wei, D.-D., Wang, J.-S., Lu, Z.-G., Liu, Q.-W., Kong, L.-Y., & Li, M.-H. (2014). Developmental toxicity and neurotoxicity of two matrine-type alkaloids, matrine and sophocarpine, in zebrafish (*Danio rerio*) embryos/larvae. *Reproductive Toxicology*, 47, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2014.05.015>

Yang, R., Xu, T., Fan, J., Zhang, Q., Ding, M., Huang, M., ... Guo, Y. (2018). Natural products-based pesticides: Design, synthesis and pesticidal activities of novel fraxinellone derivatives containing N-phenylpyrazole moiety. *Industrial Crops and Products*, 117(February), 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.088>

Yousefi, M., Hoseinifar, S. H., Ghelichpour, M., & Hoseini, S. M. (2018). Anesthetic efficacy and biochemical effects of citronellal and linalool in common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) juveniles. *Aquaculture*, 493(April), 107–112. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.04.054>

Zhang, J., Liu, L., Ren, L., Feng, W., Lv, P., Wu, W., & Yan, Y. (2017). The single and joint toxicity effects of chlorpyrifos and beta-cypermethrin in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages. *Journal of Hazardous Materials*, 334, 121–131. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.03.055>

Zhao, G., Cao, Z., Zhang, W., & Zhao, H. (2015). The sesquiterpenoids and their chemotaxonomic implications in *Senecio* L. (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 59, 340–347. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2015.02.001>

Zhu, J., Wang, J., Ding, Y., Liu, B., & Xiao, W. (2018). A systems-level approach for

investigating organophosphorus pesticide toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 149(July 2017), 26–35.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.10.066>

Dirección General de Bibliotecas UAQ