



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

*"Efecto toxicológico de extractos de *Salvia connivens* y *Salvia ballotiflora* sobre *Poecilia reticulata* y *Danio rerio*"*

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AMBIENTAL

PRESENTA
SALVADOR ALEJANDRO VENTURA SALCEDO

DIRIGIDA POR
Dr. MIGUEL ANGEL RAMOS LÓPEZ

CENTRO UNIVERSITARIO. QUERÉTARO, QUERÉTARO, DICIEMBRE
DE 2017



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

"Efecto toxicológico de extractos de *Salvia connivens* y *Salvia ballotiflora* sobre *Poecilia reticulata* y *Danio rerio*"

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AMBIENTAL

PRESENTA
SALVADOR ALEJANDRO VENTURA SALCEDO

DIRIGIDA POR
Dr. MIGUEL ANGEL RAMOS LÓPEZ

SINODALES:

Dr. MIGUEL ANGEL RAMOS LÓPEZ
DIRECTOR

Dra. MARÍA DEL CARMEN MONROY DOSTA

Dr. MIGUEL ÁNGEL RICO RODRÍGUEZ

Dr. VICTOR PÉREZ MORENO

Dr. JUAN CAMPOS GUILLÉN

Firma
Firma
Firma
Firma
Firma

MSP. Sergio Pácheo Hernández
Director Facultad de Química

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora Investigación y Posgrado

CENTRO UNIVERSITARIO, QUERÉTARO QRO. DICIEMBRE, 2017

RESUMEN

Las plantas han desarrollado durante su evolución mecanismos químicos y físicos que les han permitido defenderse de organismos fitófagos. Varios compuestos químicos que son sintetizados por las plantas se han aislado para su estudio, observándose que mediante su correcta aplicación pueden resultar eficientes en el manejo de insectos plaga, ya sea como extractos o como sustancias puras ofreciendo un menor impacto al ambiente que los plaguicidas sintéticos. Tal es el caso de los extractos botánicos de *Salvia ballotiflora* y *Salvia connivens* sin embargo, el hecho de ser mezclas de origen natural y activas frente a organismos plaga, no garantiza la seguridad frente organismos no blanco, es por esto que en el presente trabajo se determinó actividad biológica de los extractos de *S. ballotiflora* y *S. connivens* sobre *Poecilia reticulata* y *Danio rerio*, debido al papel que juegan los peces en el ecosistema. Se realizaron pruebas de exposición aguda y los resultados mostraron que de manera general *D. rerio* presentó la mayor sensibilidad a los extractos y al ácido rosmarínico (compuesto mayoritario de *S. ballotiflora*) respecto a *P. reticulata* con CL_{50} de 18.27, 39.22 y 108.57 mg L⁻¹ en extractos hexánico, clorofórmico y metanólico de *S. ballotiflora*, respectivamente; la respuesta de los extractos clorofórmico y metanólico de *S. connivens* fue 92.24 y 154.22 mg L⁻¹ y para ácido rosmarínico 477.86 y 21.57 mg L⁻¹ en adultos y embriones respectivamente.

Palabras Clave: ácido rosmarínico; compuesto natural; extracto; insecticida; toxicología

ABSTRACT

The plants have developed during their evolution chemical and physical mechanisms that have allowed them to defend themselves from phytophagous organisms. Several chemical compounds that are synthesized by plants have been isolated for their study, observing that by their correct application can be efficient in the management of pests, either as extracts or as pure substances offering a lower impact to the environment than synthetic pesticides. Such is the case of the botanical extracts of *Salvia ballotiflora* and *Salvia connivens*, however, the fact of being mixtures of natural origin and active against pest organisms, does not guarantee the safety against organisms not target, that is why in the present work the biological activity of *S. ballotiflora* and *S. connivens* extracts on *Poecilia reticulata* and *Danio rerio* was determined due to the role of fish in the ecosystem. Acute exposure tests were performed and results showed that *D. rerio* presented the highest sensitivity to extracts and rosmarinic acid in respect of *P. reticulata* with LC₅₀ of 18.27, 39.22 and 108.57 mg L⁻¹ in hexanic, chloroform and methanolic extracts of *S. ballotiflora*, respectively; the response of *S. connivens* chloroform and methanolic extracts was 92.24 and 154.22 mg L⁻¹ and for rosmarinic acid, the major compound identified in *S. ballotiflora*, 477.86 and 21.57 mg L⁻¹ in adults and embryos, respectively.

Keyword: rosmarinic acid; insecticide; natural compounds; extract; toxicology

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
ÍNDICE GENERAL	iii
ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
INTRODUCCIÓN	1
1. MARCO TEÓRICO	2
1.1 Impacto y consecuencias de los plaguicidas sintéticos en el ambiente	2
1.2 Plantas en el combate de plagas	5
1.3 Género <i>Salvia</i>	6
1.4 Generalidades de <i>Salvia ballotiflora</i>	6
1.4.1 Distribución geográfica de <i>Salvia ballotiflora</i>	6
1.5 Generalidades de <i>Salvia connivens</i>	7
1.5.1 Distribución geográfica de <i>Salvia connivens</i>	7
1.6 Estudios realizados sobre el uso del género <i>Salvia</i> contra insectos plaga	7
1.7 Compuestos químicos del género <i>Salvia</i> biológicamente activos	8
1.8 Estudios ecotoxicológicos	9
1.9 Generalidades de <i>Poecilia reticulata</i>	10
1.9.1 Ciclo biológico de <i>Poecilia reticulata</i>	11
1.10 Generalidades de <i>Danio rerio</i>	11
1.10.1 Ciclo biológico de <i>Danio rerio</i>	12
2. HIPÓTESIS	
3. OBJETIVOS	
3.1 General	13
3.2 Específicos	13
4. METODOLOGÍA	
4.1. Evaluación la actividad toxicológica por exposición aguda a mezclas de metabolitos secundarios	13
4.1.1. Colecta del material vegetal	14
4.1.2. Obtención del extracto	14
4.1.3. Origen de los peces	14
4.1.4. Aclimatación y acondicionamiento	14
4.1.5. Bioensayo con larvas de <i>Poecilia reticulata</i>	15
4.1.6. Bioensayo con embriones de <i>Danio rerio</i>	16
4.1.7. Bioensayo con peces adultos	16
4.2. Identificación de principio activo de mayor abundancia en la mezcla de metabolitos secundarios.	17
4.3. Residuos	19
5. RESULTADOS Y DISCUSIONES	20
5.1. Efecto toxicológico de extractos de <i>Salvia ballotiflora</i> en peces adultos <i>Poecilia reticulata</i> .	20
5.1.1. Extracto metanólico de <i>Salvia ballotiflora</i>	20
5.1.2. Extracto clorofórmico de <i>Salvia ballotiflora</i>	21
5.2. Efecto toxicológico de extractos de <i>Salvia connivens</i> en peces adultos de <i>Poecilia reticulata</i> .	22

5.2.1. Extracto metanólico de <i>Salvia connivens</i>	22
5.2.2. Extracto clorofórmico de <i>Salvia connivens</i>	23
5.2.3. Extracto hexánico de <i>Salvia connivens</i>	24
5.3. Efecto toxicológico de extractos de <i>Salvia ballotiflora</i> en alevines de <i>Poecilia reticulata</i> .	25
5.3.1. Extracto metanólico de <i>Salvia ballotiflora</i>	25
5.4. Efecto toxicológico de extractos de <i>Salvia connivens</i> en adultos de <i>Danio rerio</i> .	26
5.4.1. Extracto metanólico de <i>Salvia connivens</i>	26
5.4.2. Extracto clorofórmico de <i>Salvia connivens</i>	27
5.5. Efecto toxicológico de extractos de <i>Salvia ballotiflora</i> en adultos de <i>Danio rerio</i> .	28
5.5.1. Extracto metanólico de <i>Salvia ballotiflora</i>	28
5.5.2. Extracto clorofórmico de <i>Salvia ballotiflora</i>	29
5.5.3. Extracto hexánico de <i>Salvia ballotiflora</i>	30
5.6. Efecto toxicológico de extractos de <i>Salvia connivens</i> en embriones de <i>Danio rerio</i> .	31
5.6.1. Extracto metanólico de <i>Salvia connivens</i>	31
5.6.2. Extracto clorofórmico de <i>Salvia connivens</i>	32
5.6.3. Extracto hexánico de <i>Salvia connivens</i>	33
5.7. Efecto toxicológico de extractos de <i>Salvia ballotiflora</i> en embriones de <i>Danio rerio</i> .	34
5.7.1. Extracto metanólico de <i>Salvia ballotiflora</i>	34
5.7.2. Extracto clorofórmico de <i>Salvia ballotiflora</i>	35
5.7.3. Extracto hexánico de <i>Salvia ballotiflora</i>	36
5.8. Resultados de HPLC	37
5.9. Efecto toxicológico del ácido rosmarínico sobre <i>Poecilia reticulata</i>	39
5.9.1. Efecto toxicológico del ácido rosmarínico sobre adultos de <i>Poecilia reticulata</i>	39
5.9.2. Efecto toxicológico del ácido rosmarínico sobre alevines de <i>Poecilia reticulata</i>	40
5.10. Efecto toxicológico del ácido rosmarínico sobre <i>Danio rerio</i>	41
5.10.1. Efecto toxicológico del ácido rosmarínico sobre adultos de <i>Danio rerio</i>	41
5.10.2. Efecto toxicológico del ácido rosmarínico sobre embriones de <i>Danio rerio</i>	42
6. CONCLUSIONES	46
7. REFERENCIAS	47

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Grupos de insecticidas, modo de acción y fecha de introducción (Devine y col, 2008).....	3
Cuadro 2. Clasificación taxonómica de <i>Salvia ballotiflora</i> (IBUNAM, 2014).....	6
Cuadro 3. Clasificación taxonómica de <i>Salvia connivens</i> (IBUNAM, 2014).....	7
Cuadro 4. Clasificación taxonómica de <i>Poecilia reticulata</i> (Bailey y Peter, 2002)..	11
Cuadro 5. Clasificación taxonómica de <i>Brachydanio rerio</i> (Spence y col, 2008)....	12
Cuadro 6. Composición del agua semidura reconstituida (Martínez y Espinoza, 2008).....	15
Cuadro 7. Puntos apicales de toxicidad aguda en embriones de <i>Brachydanio rerio</i> . Las 24/48hrs son los tiempos mínimos de observación. (OECD, 2006).....	16
Cuadro 8. Gradiente utilizado en la identificación de compuestos fenólicos en el extracto metanólico de las partes aéreas de <i>Salvia ballotiflora</i>	18
Cuadro 9. Estándares utilizados en el análisis de compuestos fenólicos.....	19
Cuadro 10. Actividad toxicológica del extracto metanólico de las partes aéreas de <i>Salvia ballotiflora</i> sobre adultos de <i>Poecilia reticulata</i>	20
Cuadro 11. Actividad toxicológica del extracto clorofórmico de las partes aéreas de <i>Salvia ballotiflora</i> sobre adultos de <i>Poecilia reticulata</i>	21
Cuadro 12. Actividad toxicológica del extracto metanólico de las partes aéreas de <i>Salvia connivens</i> sobre adultos de <i>Poecilia reticulata</i>	22
Cuadro 13. Actividad toxicológica del extracto clorofórmico de las partes aéreas de <i>Salvia connivens</i> sobre adultos de <i>Poecilia reticulata</i>	23
Cuadro 14. Actividad toxicológica del extracto hexánico de las partes aéreas de <i>Salvia connivens</i> sobre adultos de <i>Poecilia reticulata</i>	24
Cuadro 15. Actividad toxicológica del extracto metanólico de las partes aéreas de <i>Salvia ballotiflora</i> sobre alevines de <i>Poecilia reticulata</i>	25
Cuadro 16. Actividad toxicológica del extracto metanólico de las partes aéreas de <i>Salvia connivens</i> sobre adultos de <i>Danio rerio</i>	26

Cuadro 17. Actividad toxicológica del extracto clorofórmico de las partes aéreas de <i>Salvia connivens</i> sobre adultos de <i>Danio rerio</i>	27
Cuadro 18. Actividad toxicológica del extracto metanólico de las partes aéreas de <i>Salvia ballotiflora</i> sobre adultos de <i>Danio rerio</i>	28
Cuadro 19. Actividad toxicológica del extracto clorofórmico de las partes aéreas de <i>Salvia ballotiflora</i> sobre adultos de <i>Danio rerio</i>	29
Cuadro 20. Actividad toxicológica del extracto hexánico de las partes aéreas de <i>Salvia ballotiflora</i> sobre adultos de <i>Danio rerio</i>	30
Cuadro 21. Actividad toxicológica del extracto metanólico de las partes aéreas de <i>Salvia connivens</i> sobre embriones de <i>Danio rerio</i>	31
Cuadro 22. Actividad toxicológica del extracto clorofórmico de las partes aéreas de <i>Salvia connivens</i> sobre embriones de <i>Danio rerio</i>	32
Cuadro 23. Actividad toxicológica del extracto hexánico de las partes aéreas de <i>Salvia connivens</i> sobre embriones de <i>Danio rerio</i>	33
Cuadro 24. Actividad toxicológica del extracto metanólico de las partes aéreas de <i>Salvia ballotiflora</i> sobre embriones de <i>Danio rerio</i>	34
Cuadro 25. Actividad toxicológica del extracto clorofórmico de las partes aéreas de <i>Salvia ballotiflora</i> sobre embriones de <i>Danio rerio</i>	35
Cuadro 26. Actividad toxicológica del extracto hexánico de las partes aéreas de <i>Salvia ballotiflora</i> sobre embriones de <i>Danio rerio</i>	36
Cuadro 27. Valores promedio de tres determinaciones de los tiempos de retención del análisis por HPLC del extracto metanólico de <i>Salvia ballotiflora</i>	37
Cuadro 28. Actividad toxicológica del ácido rosmarínico presente en extracto metanólico de las partes aéreas de <i>Salvia ballotiflora</i> sobre adultos de <i>Poecilia reticulata</i>	39
Cuadro 29. Actividad toxicológica del ácido rosmarínico presente en extracto metanólico de las partes aéreas de <i>Salvia ballotiflora</i> sobre alevines de <i>Poecilia reticulata</i>	40
Cuadro 30. Actividad toxicológica del ácido rosmarínico presente en extracto metanólico de las partes aéreas de <i>Salvia ballotiflora</i> sobre adultos de <i>Danio rerio</i>	41

Cuadro 31. Actividad toxicológica del ácido rosmarínico presente en extracto metanólico de las partes aéreas de <i>Salvia ballotiflora</i> sobre embriones de <i>Danio rerio</i>	42
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del ácido rosmarínico.....	37
Figura 2. Cromatograma por HPLC y espectro del estándar del ácido rosmarínico.....	39
Figura 3. Cromatograma por HPLC y espectro del extracto metanólico de las partes aéreas de <i>Salvia ballotiflora</i>	39

INTRODUCCIÓN

Las plantas son laboratorios naturales que biosintetizan una gran variedad de sustancias químicas ya sea como metabolitos primarios o secundarios, estos últimos les otorgan cualidades defensivas contra insectos y fitopatógenos estos compuestos comparados con los plaguicidas sintéticos poseen baja toxicidad, además de presentar menos efectos nocivos al ambiente, son de naturaleza biodegradable y presentan una seguridad mayor para los organismos benéficos (Isman, 2000; Lizana, 2005). Por estas razones las plantas en forma de polvo, extractos e infusiones se les ha considerado como una propuesta para el manejo de plagas agrícolas y como una alternativa para los problemas causados por el uso indiscriminado de los insecticidas químicos sintéticos (Nava y col. 2012). Sin embargo, debido a la sensibilidad que presentan diferentes organismos a los metabolitos botánicos, es indispensable desarrollar pruebas de toxicidad para limitar los efectos negativos al ambiente. Una herramienta para el desarrollo de nuevos productos de origen natural son los ensayos biológicos, mediante los cuales se conoce la bioactividad de estos productos (Pino y Jorge, 2010). Los peces son organismos indicadores debido a la importancia que juegan en las redes tróficas pues consumen y controlan las poblaciones de insectos, microcrustáceos y algas, permitiendo de esta forma la recirculación, remoción y resuspensión del material orgánico dentro del ecosistema jugando un papel importante en el intercambio de materia y nutrientes (Layman y col. 2013; Allgeier y col, 2013). Dentro de los peces más utilizados en pruebas biológicas se encuentran las especies de *Poecilia reticulata* (guppies) y *Danio rerio* (pez cebra) debido a la facilidad de crianza en condiciones de laboratorio y amplia distribución en ecosistemas naturales acuáticos del mundo, haciendo posible que se pueda probar sobre estas especies el efecto de los extractos de *Salvia ballotiflora* y *Salvia connivens* (Lamiaceae), especies reportadas con efectos insecticidas e insectistáticos, con el fin de evaluar su efecto frente a organismos no blanco.

1. MARCO TEORICO

1.1 Impacto y consecuencias de los insecticidas sintéticos en el ambiente.

La agricultura de interés alimenticio y comercial ha tenido una lucha constante para controlar a las plagas que limitan los cultivos, y a las cosechas de manera directa, para esto se han empleado durante los últimos 90 años masivamente plaguicidas obtenidos mediante síntesis química, los cuales si bien han tenido un papel importante en la protección de los cultivos, también han mostrado efectos adversos, ya que su uso constante e indiscriminado (cerca de 500 mil toneladas de ingrediente activo al año a nivel mundial) no han logrado proteger como se pretendía a los cultivos agrícolas debido a que las plagas continúan evolucionando y generando resistencia a estos productos químicos, otro efecto adverso es que dañan el medio ambiente causando con ello la ruptura de equilibrios naturales, además de presencia de residuos en las cosechas que pueden causar deterioros en la salud humana (Nava y col. 2012).

Una vez que los plaguicidas son aplicados, de acuerdo a sus características físicas y químicas estos pueden permanecer en el ambiente ya sea en el suelo (Zhang, 2006), el agua (Maciej, 2010) o bien ser transportados hasta sitios tan remotos como la Antártida (Cabrerizo y col. 2012).

Las aplicaciones de insecticidas contribuyen a la contaminación química del ambiente con el agravante de tratarse de productos de gran actividad biológica. Las mayores dosis y los menores intervalos entre aplicaciones en los cultivos, generan un impacto toxicológico cada vez más agudo sobre la biota que habita en los distintos compartimientos ambientales a los que se puede trasladar el plaguicida una vez usado (Devine y col. 2008). Por otro lado los insecticidas pueden tener efectos tóxicos directos en los organismos (letales o subletales) o pueden tener efectos indirectos debido a la eliminación de las especies que son presas o competencia de los organismos que son originalmente blanco. Por lo tanto, existe preocupación por los efectos potencialmente dañinos de los plaguicidas que operan

a través de la cadena alimenticia, además los impactos de los insecticidas en los invertebrados pueden reducir la disponibilidad de fuentes de alimento y afectar su productividad o supervivencia a través de distintos modos de acción (Cuadro 1) (Mills, 2004; Morris, 2005).

Cuadro 1. Grupos de insecticidas, modo de acción y fecha de introducción (Devine y col. 2008)

Lugar y principales modos de acción	Tipo de Insecticida	Ejemplos comunes	Primer uso ¹
Inhibidores de acetilcolinesterasa: Bloquean la acción de la enzima acetilcolinesterasa, interrumpiendo la transmisión de impulsos entre las células nerviosas.	Carbamatos	Aldicarb, Bendiocarb, Carbaril , Carbofuran, Carbosulfan, Metiocarb, Metomil, Pirimicarb, Tiodicarb	1956
	Organofosforados	Acefato, Clorpirifos, Diazinon, Dimetoato, Fenitrothion, Fention, Malation , Metamidofos, Monocrotofos, Paration, Pirimifos, Profenofos, Temefos	1950
Antagonistas del canal de cloruro regulado por GABA: Interfieren con los canales de cloruro en la membrana nerviosa, interrumpiendo la transferencia de iones y la transmisión de impulsos entre las células nerviosas	Ciclodieno organoclorados	Clordano , Endosulfan, gamma-HCH (Lindano)	1945
	Fenilpirazoles (Fiproles)	Fipronil	1993
Moduladores del canal de sodio Interfieren con los canales de sodio en la membrana nerviosa interrumpiendo la transferencia de iones y la transmisión de impulsos entre las células nerviosas	Organoclorados	DDT	1943
	Piretroides	Alletrina , Bifentrina, Ciflutrina, Lambda-Cialotrina, Cipermetrina, Deltametrina , Fenvalerate, Permetrina, Resmetrina	1952 1977
	Piretrinas	Piretrinas (piretrum)	1850s
Agonista/antagonista del receptor de Acetilcolina de tipo nicotínico	Neonicotinoides	Acetamiprida, Imidacloprida , Nitenpiram, Tiacloprida, Tiametoxam	1991
Imita la acción de neurotransmisor acetilcolina bloqueando los receptores e interrumpiendo la transmisión de impulsos de entre las células nerviosas.	Nicotina	Nicotina	1930s
	Spinocina	Spinosad	1996

Activadores del canal de cloruro Se adhieren y activan los canales de cloruro en la membrana nerviosas interrumpiendo la transferencia de iones y la transmisión de impulsos entre las células nerviosas.	Avermectina	Abamectina , Benzoato de emmamectina	1985
Hormona juvenil compite e interfiere con las hormonas juveniles esenciales para el desarrollo del insecto.	Hormona juvenil análoga e imitadora	Hidropreno, Kinopreno, Metopreno, Fenoxicarb , Pyiriproxifen	1993
Componentes con un modo de acción desconocido o no específico (bloqueadores selectivos de alimentación).	Criolita	Criolita	1929
	Pimetrozina	Pimetrozina	1999
Inhibidores de fosforilación oxidativa. Interrumpe el transporte de electrones dentro de las células	Diafentiuron	Diafentiuron	1997
	Clorfenapir	Clorfenapir	1985
Inhibidores de la biosíntesis de quitina. Inhibe la formación normal del exoesqueleto de los insectos	Benzoilúreas	Novaluron, Diflubenzuron , Teflubenzuron	1983
	Buprofezina	Buprofezina	1988
Agonista de ecdisona/interruptores de muda de piel. Interfiere con el proceso de muda del insecto	Diacilhidrazinas	Halofenozid , Tebufenozid	1999
	Azadiractina	Azadiractina	1985
Inhibidores del transporte del electrón del complejo mitocondrial. Interrumpe el transporte de electrones dentro de las mitocondrias.	Rotenona	Derris , Rotenona	1850
	Indoxacarb	Indoxacarb	2000

¹Las fechas se refieren al ejemplo del insecticida que se presenta en negritas.

Por razones ya expuestas, se ha considerado a las plantas como un campo apropiado para la búsqueda de nuevas estructuras con menor impacto ambiental y con potencial para el manejo de plagas agrícolas (Castro, 2011).

1.2 Plantas en el combate de plagas

El empleo de plaguicidas de origen botánico se remonta al origen de las civilizaciones más antiguas del mundo como China, Egipto, Grecia y la India. (Thacker, 2002). En la agricultura moderna los plaguicidas sintéticos han relegado a los de origen botánico pues permiten reducir la brecha de productividad, a pesar de todas las dificultades que puede traer consigo su uso como intoxicación de aplicadores, trabajadores de la agricultura y consumidores de alimentos contaminados, muerte de peces y aves, destrucción de hábitats naturales, contaminación de aguas subterráneas, y la aparición de resistencia por parte de las plagas, debido al abuso en que son utilizados en forma general (Gómez-Arroyo y col. 2013).

Debido al surgimiento de acciones regulatorias en cuanto al uso indiscriminado de plaguicidas sintéticos dado a sus efectos perjudiciales, se han establecido límites máximos permisibles de residuos de plaguicidas en los alimentos para que puedan comercializarse y consumirse, esto a su vez propicia la necesidad de productos adecuados para el manejo de plagas que afectan la agricultura, pero con una gran disminución de las afectaciones al medio ambiente y a la salud humana (Isman, 2006).

En los últimos años la literatura ha reportado cientos de compuestos aislados a partir del metabolismo secundario de las plantas que han mostrado actividad plaguicida, y son una forma de eliminar en gran medida el uso de los plaguicidas sintéticos. La mayoría de los productos comerciales botánicos se originaron a partir de plantas tropicales y subtropicales debido a que las plantas en estas regiones desarrollaron mecanismos de defensa contra plagas de insectos con una intensidad mayor, lo que resulta en fuentes prometedoras de nuevas sustancias insecticidas (Prakash y Rao 1997). Tal es el caso de plantas de género *Salvia*, que en México se distribuyen ampliamente en áreas con bosques de pino y encino, mesófilo y selva baja caducifolia, aunque también manifiesta diversidad y endemismo notable en zonas áridas y desérticas del país (Cornejo e Ibarra, 2011).

1.3 Género *Salvia*

Salvia es el género más diverso de la familia Lamiaceae, este género se distribuye en zonas tropicales y subtropicales, al rededor del mundo existen cerca de 900 especies distribuidas en regiones aproximadamente de la siguiente manera: mediterráneo (250 spp.), Asia central (90 spp.), sudeste africano (30 spp.), Sudamérica (210 spp.), finalmente centro y Norteamérica (320 spp.) (Walker y col. 2004). México es considerado mundialmente como una de las áreas con mayor diversidad de este género, 307 especies (Martínez y col. 2013). Los estados con mayor riqueza de especies son: Oaxaca, Guerrero, Puebla, Jalisco, Michoacán, Coahuila, Baja California Sur, Tamaulipas y San Luis Potosí (Cornejo e Ibarra, 2011). Sus formas de crecimiento incluyen hierbas anuales y perennes, arbustos y raramente, arbustos trepadores (Kamatou y col. 2008).

1.4 Generalidades de *Salvia ballotiflora*

Es un arbusto que alcanza 1.2-1.8 m de altura, las flores son de color azul y púrpura, miden 1.5-3.8 cm de largo y tienen los márgenes ondulados o dentados con tricomas sobre las superficies de las mismas, que les dan una textura áspera y se desarrollan desde abril a octubre (Cuadro 2) (BDMTM, 2014).

Cuadro 2. Clasificación taxonómica de *Salvia ballotiflora* (IBUNAM, 2014)

Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Género	<i>Salvia</i>
Especie	<i>Salvia ballotiflora</i>

1.4.1 Distribución geográfica de *Salvia ballotiflora*

Es originaria del sur de Texas, en México se encuentra en zonas rocosas, arenosas o zonas con matorrales de los estados de Querétaro, Nuevo León, Tamaulipas, San Luis Potosí, Chihuahua (Giménez y González, 2011; González y

col, 2007).

1.5 Generalidades de *Salvia connivens*

Es un arbusto pequeño que alcanza una altura de 1.0 a 1.2 m, las hojas son elípticas miden entre 2.5-3.5 cm, las flores se dan en espiga son color azul-violeta y de forma acampanada (Cuadro 3) (BDMTM, 2014).

Cuadro 3. Clasificación taxonómica de *Salvia connivens* (IBUNAM, 2014)

Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Género	<i>Salvia</i>
Especie	<i>Salvia connivens</i>

1.5.1 Distribución geográfica de *Salvia connivens*

En México se encuentra en zonas rocosas, arenosas o zonas con matorrales de los de Hidalgo, Querétaro. También están ampliamente distribuidas en San Luis Potosí, Nuevo León (González y col. 2007).

1.6 Estudios realizados sobre el uso del género *Salvia* contra insectos plaga.

Kotan y col. (2008) evaluaron la actividad insecticida del aceite esencial de *Salvia hydrangea* a 10, 20, 30 y 40 μ L sobre una superficie de 13.5 cm² de papel Whatman del No.1 en el que se colocaron 20 adultos de *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) y 20 adultos de *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae). Este aceite presentó actividad insecticida contra *S. granarius* y *T. confusum* al presentar viabilidad 31.5% y 25%, respectivamente, a 40 μ L después de 96 horas de exposición. Fraga y col. (2005) reportaron la actividad antialimentaria en larvas del 6^{to} instar de *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae), ocasionada los compuestos de extracto etanólico de las raíces de

S. broussenetti; Kouzi y col. (1996) encontraron que el aceite esencial de *Salvia esclarea* (Lamiaceae) incorporado a la dieta artificial, presentó actividad insectistática sobre *S. frugiperda*. Estos autores observaron una reducción en el peso de la pupa de 13.5% respecto al control, a 250 ppm. Liu y col. (2013) probaron el aceite esencial de las partes aéreas de *Salvia umbratica* (Lamiaceae) obteniendo la DL_{50} de $18.12 \mu\text{g adulto}^{-1}$ al ser aplicado vía tópica sobre el tórax dorsal de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Dryophthoridae). Souguir y col. (2013) evaluaron la actividad insecticida, mediante la prueba de fumigación del aceite esencial, de hojas de *S. officinalis* sobre larvas de 1^{er} ínstar de *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae), obteniendo 100% de mortalidad a una concentración de $100 \mu\text{L L}^{-1}$.

1.7 Compuestos químicos del género *salvia* biológicamente activos.

Se ha reportado actividad desinflamatoria y antidiarreica en ratones por los extractos de *Salvia connivens* atribuida a sustancias como alcaloides, taninos, saponinas y triterpenos, compuestos químicos de este género principalmente con actividad insecticida, aunque también se ha demostrado actividad antidiarreica, desinflamatoria y antibacteriana por parte de los extractos. De este género se han identificado diversos compuestos, Azcan y col. (2004) identificaron del extracto hexánico de las semillas de 12 especies de *Salvia* los ácidos grasos: linoleico, linolénico, oleico, palmítico y esteárico; Fraga y col. (2005) obtuvieron de las raíces de *Salvia brossonetti* los terpenos brussonol, iguestol, 11-hidroxi-12-metoxiabietatrieno, demetilsalvicanol, 7-oxodihidroabietano, ferruginol, sugiol, taxodiona, deoxo-carnosol 12-metil eter, criptojaponol, demetil-criptojaponol, inuroileanol, pisiferal, 14-deoxicoleon U y isomanool; Moghddam y col. (2008) obtuvieron del extracto de éter dimetílico de partes aéreas de *Salvia macrosiphon* cinco flavonoides: β -sitosterol, óxido de 13-epimanoil, salvigenina, eupatorina y daucosterol; (Nikolova y col. 2006) reportaron que los extractos acetónicos de las partes aéreas de plantas del género *Salvia*, contienen los siguientes flavonoides:

salvigenina y cirsilineol en *Salvia nemorosa*; 3-metil quercetina éter, 3-metil camferol, pachypodol, en *Salvia glutinosa*; luteolina y salvigenina en *Salvia scabiosifolia*; luteolina, 3-metil quercetina éter y 3-metil camferol en *Salvia ringens*; cirsilineol y salvigenina en *Salvia tomentosa*; ladancina y salvigenina en *Salvia argentea*; luteolina y cirsilinol en *Salvia officinalis*; Kharazian (2014) realizó un estudio a extractos metanólicos de hojas de plantas del género *Salvia* encontrando los siguientes flavonoides: Para *Salvia spinosa* se tiene flavonas, flavonoles y flavononas en *S. macrosiphon*; flavonas y flavonoles en *Salvia reuterana*; flavonas, flavonoles y chalconas en *Salvia sharifii*; flavonas e isoflavonas en *S. nemorosa*; flavonas e isoflavonas en *Salvia virgata*; flavonas y flavononas en *Salvia syriaca*; isoflavonas en *Salvia mirzayanii* ; dihidroflavonoles, chalconas e isoflavonas en *Salvia multicaulis*; flavonas, flavononas e isoflavonas en *Salvia hydrangea*; dihidroflavonoles, chalconas, isoflavonas y flavonoles en *Salvia atropatana*; chalconas, flavonoles, isoflavonas en *Salvia limbata*; flavonas, flavonoles y isoflavones en *Salvia ceratophylla*; flavones, flavononas, flavonoles, isoflavonas y chalconas en *Salvia sclarea*. Por otra parte, Pérez y col. (2013), aislaron del extracto clorofórmico de *Salvia ballotiflora* el diterpeno 19-dioxi-icetexano.

1.8 Estudios toxicológicos

La importancia y preocupación por el ambiente comenzó durante los años 50's y 60's dado que los plaguicidas son sustancias tóxicas generalmente no específicas y que se liberan intencionalmente al ambiente, sus posibles efectos eran algo medianamente esperado; sin embargo, una vez que se comenzaron a documentar sus impactos y efectos tóxicos, así como la existencia de muchos otros contaminantes en el ambiente, los hallazgos fueron totalmente sorprendentes para la comunidad científica dedicada a estos temas. La persistencia de los contaminantes y la sensibilidad de las especies, eran aspectos que no se consideraban para el manejo de las sustancias, es por esto que como una extensión de la toxicología nace la ecotoxicología (Ramírez y Mendoza, 2008). Esta ciencia estudia los efectos de sustancias tóxicas sobre los organismos

individuales, se vale de dos herramientas básicas para realizar sus investigaciones: el monitoreo ambiental y el monitoreo biológico. El monitoreo ambiental es un procedimiento para detectar la presencia y cuantificar las concentraciones de los contaminantes en los diferentes compartimentos, incluyendo al aire, agua, suelo y sedimentos. El monitoreo biológico, desde el punto de vista de la ecotoxicología, consiste en evaluar los efectos adversos de los contaminantes sobre los individuos, poblaciones, comunidades y ecosistemas que han estado expuestos. En este sentido, se pueden aplicar pruebas en el laboratorio o realizar estudios en campo. (INECC, 2015)

Un bioensayo de toxicidad es una prueba para establecer la relación causa efecto entre la presencia de contaminantes químicos en el medio y los organismos o sistemas biológicos expuestos a él, los biomarcadores son empleados dentro del bioensayo para evaluar de forma temprana el efecto negativo de los contaminantes. Entre los primeros estudios para evaluar la contaminación en el medio acuático se encontraba la carpa dorada como biomarcador, pero debido a que esta es una especie con más resistencia a los contaminantes que otras, desde entonces se han buscado especies acuáticas con una mayor sensibilidad para poder predecir los impactos ambientales con una mejor certeza, las especies *P. reticulata* y *B. rerio* son empleadas como indicadoras ecotoxicológicas por su hipersensibilidad a sustancias extrañas al medio en que se desarrollan (Ramírez y Mendoza, 2008).

1.9 Generalidades de *Poecilia reticulata*

Poecilia reticulata mejor conocido como pez guppy es originario de Trinidad, Barbados, Venezuela y el norte de Brasil. Se encuentra en todo Centroamérica, Norteamérica en aguas cálidas y Europa. Son peces que viven en aguas con temperaturas entre los 20 y 28 °C, siendo la óptima 25°C. Los machos son más pequeños que las hembras y poseen sus aletas ventrales modificadas en la parte inferior con forma de tubo, llamada gonopodio que utilizan para la cópula (Balon, 1990). Los machos adultos miden alrededor de 3 cm, mientras que las hembras pueden alcanzar los 6 cm o incluso 8 en las variedades más grandes (Allen, 1991).

Las hembras alojan los huevos fertilizados en su interior, expulsando posteriormente los alevines completamente desarrollados (Cuadro 4) (Balon, 1990).

Cuadro 4. Clasificación taxonómica de *Poecilia reticulata* (Bailey y Burgess, 2002)

Reino	Animalia
Filo	Chordata
Clase	Actinopterygii
Orden	Cyprinodontiformes
Familia	Poeciliidae
Género	<i>Poecilia</i>
Especie	<i>Poecilia reticulata</i>

1.9.1 Ciclo biológico de *Poecilia reticulata*

Los peces guppy adultos por lo general viven de 2 a 3 años, alcanzan la madurez sexual a los 3 meses de vida, momento en el cual el macho ya habrá desarrollado una aleta anal modificada conocida como gonopodio, órgano mediante el cual fecundará a la hembra (fecundación interna). Los alevines abandonan el vientre de la madre de 3 a 4 semanas de gestación cuando estén mínimamente desarrollados y su primer esfuerzo lo dedicarán a esconderse en el fondo para evitar a los depredadores, que en ocasiones pueden ser sus propios progenitores. La hembra no realizará puesta alguna ya que es una especie ovovivípara, las hembras tienen la capacidad de efectuar de 3 a 4 ciclos de gestación por apareamiento, el número de alevines depende en gran medida del tamaño de la hembra, pudiendo variar desde una decena a cerca de un centenar (Devezé y col. 2004).

1.10 Generalidades de *Danio rerio*

El registro del origen de *Danio rerio* (pez cebra) no es específico ya que van desde el oeste Pakistán y el este Birmania, al norte de Nepal y el estado de Karnataka perteneciente a la India.

Los individuos adultos suelen tener entre 3 y 5 cm de largo y 1 cm de ancho dependiendo de las condiciones ambientales. Tiene una forma alargada con una

aleta dorsal. En los costados presenta entre 5 y 9 bandas de color azulado que se superponen al color de fondo que en los machos es dorado y en las hembras plateado. Es un animal omnívoro que se alimenta de larvas de mosquito y de otras especies de insectos (zooplancton) y también de algas microscópicas (fitoplancton). En el acuario, se mantienen a una temperatura de entre 22 y 30 °C, pH del agua neutro (~7) y de 5° a 10° dGH de dureza (Spence y col, 2008) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Clasificación taxonómica de *Danio rerio* (Spence y col, 2008).

Reino	Animalia
Filo	Chordata
Clase	Actinopterygii
Orden	Cipriniformes
Familia	Cyprinidae
Género	<i>Danio</i>
Especie	<i>Danio rerio</i>

1.10.1 Ciclo biológico de *Danio rerio*

Estos peces viven en promedio 3.5 años, Es una especie ovípara y la puesta de huevos ocurre en los márgenes de los ríos. Los huevos suelen eclosionar 3 días a partir de la fertilización y, a los 5 o 6 meses, los individuos llegan a la madurez reproductiva pasando de alevín a adulto. En el laboratorio, las hembras pueden poner entre 200 y 300 huevos, el desarrollo embrionario tiene lugar en 24 horas y las larvas empiezan a alimentarse independientemente a los 5 días. En condiciones óptimas, el tiempo de generación, de huevo a huevo, es de 3 meses. (CSIC, 2011).

2.HIPÓTESIS

Los extractos metanólicos, clorofórmicos y hexánicos de *Salvia ballotiflora* y *Salvia connivens* contienen metabolitos secundarios como son los compuestos fenólicos, los cuales presentarán actividad toxicológica sobre *Poecilia reticulata* y *Danio rerio*.

3.OBJETIVOS

3.1. General

Determinar la actividad toxicológica de los extractos de *Salvia ballotiflora* y *Salvia connivens* sobre *Poecilia reticulata* y *Danio rerio*.

3.2. Específicos

1) Evaluar la actividad toxicológica por exposición aguda a mezclas de metabolitos secundarios, sobre *Poecilia reticulata* y *Danio rerio* obtenidos con hexano, cloroformo y metanol de las partes aéreas de *Salvia connivens* y *Salvia ballotiflora*.

2) Identificar al menos un principio activo de mayor abundancia en la mezcla de metabolitos secundarios y determinar la actividad toxicológica de este sobre *Poecilia reticulata* y *Danio rerio*.

4.METODOLOGÍA

4.1 Evaluación de la actividad toxicológica por exposición aguda a mezclas de metabolitos secundarios, sobre *Poecilia reticulata* y *Danio rerio* obtenidos con hexano, cloroformo y metanol de las partes aéreas de *Salvia connivens* y *Salvia ballotiflora*.

4.1.1 Colecta del material vegetal.

Se colectaron las partes aéreas de *S. ballotiflora* y de *S. connivens* en el municipio de Guadalcazar, San Luis Potosí, cuya localización se encuentra entre las coordenadas 22°37´ latitud norte y 100°24´ longitud oeste a una altura promedio de 1640 msnm. Los especímenes muestreados de las plantas fueron autenticados por el taxónomo José García Pérez en el herbario Isidro Palacios de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, y se dejaron secar a la sombra durante 15 días a temperatura ambiente y posteriormente se molieron.

4.1.2 Obtención del extracto

Para obtener los extractos de diferente polaridad se utilizaron 100 g de las partes aéreas de *S. ballotiflora* y *S. connivens* previamente secas y molidas, colocándolas en un matraz bola con 500 mL de hexano en posición de reflujo durante 4 h, posteriormente los extractos fueron filtrados al vacío en un matraz Kitasato de y embudo buchner, el disolvente se eliminó a presión reducida usando un evaporador rotatorio. Siguiendo esta misma metodología, se trabajaron los extractos con metanol y cloroformo (Pérez y col. 2009).

Posteriormente se hicieron pruebas de toxicidad preliminares en los peces para cada uno de los extractos obtenidos de *S. ballotiflora* y *S. connivens*, realizándose pruebas con cinco concentraciones logarítmicas 1,000, 100, 10, 1 y 0.1 ppm

4.1.3 Origen de los peces

Los especímenes de *Poecilia reticulata* y *Danio rerio* fueron provistos de una colonia establecida en el Laboratorio de Análisis Químico del Alimento Vivo en la Universidad Autónoma Metropolitana - Xochimilco.

4.1.4 Aclimatación y acondicionamiento

La aclimatación de los peces se realizó por 14 días, siendo colocados en

peceras de vidrio de 90 cm de largo x 40 cm ancho x 30 cm alto, introduciendo plantas acuáticas (*Elodea* sp.) para evitar el estrés de los peces (Iannacone y col. 2007). En un medio de agua semidura reconstituida (Cuadro 6), los peces fueron alimentados con hojuelas para peces marca Wardley. La temperatura de las peceras osciló entre los $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$.

4.1.5 Bioensayo con larvas de *Poecilia reticulata*

Este ensayo fue de tipo estático, sin renovación de la solución de la prueba, con una duración total de 96 horas. Se tomaron registros de mortalidad a las 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 horas, anotando esta información en una bitácora diseñada para tal propósito. Como agua de dilución se empleó agua reconstituida de tipo semidura (80 a 100 mgL^{-1} como CaCO_3) (USEPA, 2002), ya que la especie se desarrolla satisfactoriamente en este tipo de agua. Siguiendo el modelo propuesto de ensayos de toxicidad de (Martínez y Espinoza, 2008) y tomando en consideración una representatividad muestral procurando el menor uso de organismos posible, las pruebas se realizaron exponiendo 3 larvas por unidad experimental con 4 repeticiones para un total de 12 determinaciones por concentración, es decir, de un total de 5 concentraciones se emplearán por cada repetición 15 especímenes para cada tipo de extracto (metanólico, clorofórmico y hexánico).

La evaluación toxicológica se realizó con los valores de mortalidad e inmovilidad a 96 horas, se construyeron cuadros de mortalidades acumuladas a todos los tiempos en que se hicieron las determinaciones; con los datos totales a las 96 horas se hizo la estimación de la CL_{50} .

Cuadro 6. Composición del agua semidura reconstituida (Martínez y Espinoza, 2008).

Tipo de agua.	Reactivos grado analítico (mgL^{-1}) en agua destilada.				Características finales.	
	NaHCO_3	$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	MgSO_4	KCl	pH	Dureza
Semidura	96	60	60	4	7.4-7.8	80-100

4.1.6 Bioensayo con embriones de *Danio rerio*

Los embriones son expuestos individualmente en microplacas de 24 pozos. La prueba inició inmediatamente después de la fertilización y continuó por 48h usando 5 concentraciones diferentes con la apropiada muestra control.

Exponiendo 4 embriones individualmente por cada concentración con 4 réplicas respectivas (16 determinaciones). Se usaron 20 pozos de cada microplaca para las pruebas de exposición y se dejaron 4 pozos como prueba control usando 2 mL de solución.

El recuento de embriones vivos o muertos a lo largo de la prueba se realizó mediante el criterio de 4 puntos apicales. (Cuadro 7).

Cuadro 7. Puntos apicales de toxicidad aguda en embriones de *Brachydanio rerio*. Las 24/48hrs son los tiempos mínimos de observación (OECD, 2006).

Puntos apicales	Tiempo de exposición							
	4h	8h	12h	16h	24h	36h	48h	
Número de huevos oculados	+	+	+	+	+	+	+	
Formación de segmentos				+	+	+	+	
Cola detallada					+	+	+	
Presencia de latido cardíaco						+	+	

Los huevos que no presentaron las características descritas se consideraron muertos al tiempo correspondiente. Con los datos de mortalidad se estimó la CL_{50} mediante el análisis probit del paquete estadístico SYSTAT 9.0.

4.1.7 Bioensayo con peces adultos

Los guppies y cebras usados en los bioensayos se tomaron de la colonia a partir de la segunda semana de aclimatación. Se verificó que los peces seleccionados no presentaran ningún signo de lesión o enfermedad (hemorragias, patequias, nado errático, entre otros) para su uso en los ensayos toxicológicos. Las pruebas de toxicidad se realizaron con 4 repeticiones, y cinco concentraciones

más el control. Las lecturas definitivas de pruebas toxicológicas se realizaron a las 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 hrs de exposición, registrando valores de mortalidad o inmovilidad. Los peces no se alimentaron durante los bioensayos, con los datos de mortalidad a las 96 hrs se estimó la CL_{50} . Por el mismo motivo, en este ensayo con adultos, se usaron también 3 peces para cada una de las concentraciones de cada uno de los extractos (12 determinaciones con las réplicas respectivas). Los grupos de 3 organismos se colocaron al azar en recipientes plásticos circulares de 250 mL con las respectivas concentraciones y el control. Este tamaño del envase se seleccionó debido a que los ensayos son de corta duración (Iannacone y col. 2007).

4.2 Identificación de principio activo de mayor abundancia en la mezcla de metabolitos secundarios.

La identificación del ácido rosmarínico se realizó en un equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) marca Waters integrado por una bomba cuaternaria de entrega de disolventes modelo 600, acoplada a un sistema de detección de arreglo de diodos, modelo 2998 (Waters), de absorción de luz ultravioleta. El equipo utilizado está provisto de un inyector manual Rheodyne 7725i y un degasificador electrónico de cuatro canales (Metachem Technologies Inc.). La adquisición y el procesamiento de datos se llevaron a cabo utilizando el programa Empower2 (Waters).

Las condiciones utilizadas para este análisis fueron: una columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.5 μ m, 150 x 4.6 mm d.i.) con pre-columna marca Agilent, como fase estacionaria ; y como fase móvil una mezcla de ácido acético 0.0125 N-acetonitrilo, (el gradiente utilizado se explica en el Cuadro 8); el flujo fue de: 0.7 mL min⁻¹; λ de detección se ajustó a: 280 nm; muestra inyectada: 20 μ L; tiempo de análisis: 40 minutos.

Cuadro 8. Gradiente utilizado en la identificación de compuestos fenólicos en el extracto metanólico de las partes aéreas de *Salvia ballotiflora*.

Tiempo (min)	Composición de la fase móvil	
	Ácido acético 0.0125 N	CH ₃ CN
0	95%	5%
2	95%	5%
5	85%	15%
20	50%	50%
25	95%	5%
35	95%	5%

Las muestras analizadas se prepararon de la siguiente manera: se pesó 1 mg de cada estándar de los compuestos fenólicos (Sigma-Aldrich) (Cuadro 9) y un 1 mg de extracto metanólico de *S. ballotiflora*, para preparar diluciones finales de 0.1 µg µL⁻¹; los estándares y el extracto metanólico de las partes aéreas de *S. ballotiflora* se disolvieron en 1 mL de metanol grado HPLC. Posteriormente, se filtraron las soluciones en acrodiscos con tamaño de poro de 45 µm y diámetro de 25 mm (Agilent Technologies).

Se determinó de manera individual el tiempo de retención de cada uno de los compuestos fenólicos utilizados como estándares y, bajo las mismas condiciones cromatográficas se analizó la composición del extracto metanólico de las partes aéreas de *S. ballotiflora*. Teniendo en cuenta que los tiempos de retención pueden variar ligeramente de una inyección a otra se realizaron los análisis por triplicado. Como criterio adicional, y dentro del marco de los desplazamientos batocrómicos e

ipsocrómicos por efecto de disolventes e interacciones de los metabolitos, se compararon los espectros UV-visible de los picos de interés.

Cuadro 9. Estándares utilizados en el análisis de compuestos fenólicos.

Estándar	
Ácido gálico	Miricetina
Ácido rotocatéquico	Luteolina
Ácido rosmarínico	Quercetina
(+)-catequina	Apigenina
Hesperidina	Hesperetina
Rutina	Kaempferol
Ácido p-cumárico	

4.3 Residuos

Los residuos biológicos (peces muertos) fueron manejados de acuerdo a la norma NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 y de acuerdo al convenio de residuos peligrosos que tiene la Facultad de Química con una empresa privada. Los peces serán guardados debidamente en bolsas plásticas para residuos biológicos, después puestos en un congelador destinado para ese uso y puestos a disposición de la empresa contratada por esta Facultad.

El agua contaminada con los extractos anteriormente descritos en la metodología, fue almacenada debidamente en tambos de plástico en la clasificación de residuos orgánicos, que posteriormente son llevados al almacén temporal de residuos peligrosos de la Facultad de Química y puestos a disposición de una empresa privada.

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 Efecto toxicológico de extractos de *Salvia ballotiflora* en adultos *Poecilia reticulata*.

5.1.1 Extracto metanólico de *Salvia ballotiflora*

El efecto del extracto metanólico de las partes aéreas de *S. ballotiflora* en adultos de *Poecilia reticulata* mostró que la mortalidad total acumulada hasta las 96 horas fue de 16.67, 100 y 100% a concentraciones de 125, 250 y 500 mg L⁻¹ respectivamente, el control negativo (0 mg L⁻¹) no presentó mortalidad. La CL₅₀ para adultos fue de 140.19 mg L⁻¹ y puede apreciarse el efecto de mortalidad a partir de las 3h de exposición. (Cuadro 10).

Cuadro 10. Actividad toxicológica del extracto metanólico de las partes aéreas de *Salvia ballotiflora* sobre adultos de *Poecilia reticulata*.

Concentración (mg L ⁻¹)	Mortalidad (%)								
	1h	3h	6h	12h	24h	48h	72h	96 h	Total
500	0	50	50	-	-	-	-	-	100±ND
250	0	0	0	41.67	58.33	-	-	-	100±ND
125	0	0	0	0	8.33	0	8.33	0	16.67±11.24
62.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0±ND
31.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0±ND
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0±ND
CL ₅₀	140.19 mg L ⁻¹								

Resultados son el promedio de 12 determinaciones ± error estándar de la media. P<0.001. CL₅₀ Concentración letal media.

5.1.2 Extracto clorofórmico de *Salvia ballotiflora*

El efecto del extracto clorofórmico de las partes aéreas de *S. ballotiflora* en adultos de *Poecilia reticulata* mostró que la mortalidad total acumulada hasta las 96 horas fue de 8.33, 16.67, 8.33, 41.67 y 50% a concentraciones de 31.2, 62.5, 125, 250 y 500 mg L⁻¹ respectivamente, el control negativo (0 mg L⁻¹) no presentó efecto de mortalidad. La CL₅₀ para adultos fue de 467.73 mg L⁻¹, los efectos se presentaron hasta después de las 12 horas de exposición (Cuadro 11).

Cuadro 11. Actividad toxicológica del extracto clorofórmico de las partes aéreas de *Salvia ballotiflora* sobre adultos de *Poecilia reticulata*.

Concentración (mg L ⁻¹)	Mortalidad (%)								
	1h	3h	6h	12h	24h	48h	72h	96 h	Total
500	0	0	0	0	25	8.33	8.33	8.33	50±ND
250	0	0	0	25	0	0	8.33	8.33	41.67±ND
125	0	0	0	0	8.33	0	0	0	8.33±ND
62.5	0	0	0	0	8.33	8.33	0	0	16.67±ND
31.2	0	0	0	0	0	0	0	8.33	8.33±ND
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0±ND
CL ₅₀	467.73 mg L ⁻¹								

Resultados son el promedio de 12 determinaciones ± error estándar de la media. P<0.001. CL₅₀ Concentración letal media.

5.2 Efecto toxicológico de extractos de *Salvia connivens* en peces adultos de *Poecilia reticulata*.

5.2.1 Extracto metanólico de *Salvia connivens*

El efecto del extracto metanólico de las partes aéreas de *S. connivens* en peces adultos de *P. reticulata* mostró que la mortalidad total acumulada hasta las 96 horas fue de 16.67, 16.67, 8.33, 83.33 y 100% a concentraciones de 31.2, 62.5, 125, 250 y 500 mg L⁻¹ respectivamente, con efectos de mortalidad a partir de las 3 horas, el control negativo (0 mg L⁻¹) no presentó efecto de mortalidad. La CL₅₀ para adultos fue de 203.64 mg L⁻¹ (Cuadro 12)

Cuadro 12. Actividad toxicológica del extracto metanólico de las partes aéreas de *Salvia connivens* sobre adultos de *Poecilia reticulata*.

Concentración (mg L ⁻¹)	Mortalidad (%)								
	1h	3h	6h	12h	24h	48h	72h	96 h	Total
500	0	100	-	-	-	-	-	-	100
250	0	25	0	41.65	8.33	0	8.33	0	83.33
125	0	0	0	0	0	8.33	0	0	8.33
62.5	0	0	0	0	8.33	8.33	0	0	16.67
31.2	0	0	0	8.33	0	8.33	0	0	16.67
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CL ₅₀	179.3 mg L ⁻¹								

Resultados son el promedio de 12 determinaciones ± error estándar de la media. P<0.121. CL₅₀ Concentración letal media.

5.2.2 Extracto clorofórmico de *Salvia connivens*

El efecto del extracto clorofórmico de las partes aéreas de *S. connivens* en peces adultos de *P. reticulata* mostró que la mortalidad total acumulada hasta las 96 horas fue de 8.33, 8.33, 75 y 100% a concentraciones de 62.5, 125, 250 y 500 mg L⁻¹ respectivamente, con efectos de mortalidad a partir de las 6 horas de exposición, el control negativo (0 mg L⁻¹) no presentó efecto de mortalidad. La CL₅₀ para adultos fue de 203.64 mg L⁻¹ (Cuadro 13).

Cuadro 13. Actividad toxicológica del extracto clorofórmico de las partes aéreas de *Salvia connivens* sobre adultos de *Poecilia reticulata*.

Concentración (mg L ⁻¹)	Mortalidad (%)								
	1h	3h	6h	12h	24h	48h	72h	96 h	Total
500	0	0	100	-	-	-	-	-	100±ND
250	0	0	0	8.33	0	16.67	16.67	33.33	75±18.75
125	0	0	0	0	0	0	8.33	0	8.33±8.33
62.5	0	0	0	0	0	0	0	8.33	8.33±8.33
31.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0±ND
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0±ND
CL ₅₀	203.64 mg L ⁻¹								

Resultados son el promedio de 12 determinaciones ± error estándar de la media. P<0.121. CL₅₀ Concentración letal media.

5.2.3 Extracto hexánico de *Salvia connivens*

El efecto del extracto hexánico de las partes aéreas de *S. connivens* en peces adultos de *P. reticulata* mostró efectos de mortalidad a partir de las 6 horas, la mortalidad total acumulada a las 96 horas fue de 8.33, 8.33, 16.67 y 41.67% a concentraciones de 31.2, 62.5, 250 y 500 mg L⁻¹ respectivamente, el control negativo (0 mg L⁻¹) no presentó efecto de mortalidad. La CL₅₀ para adultos fue de 775.68 mg L⁻¹ (Cuadro 14).

Cuadro 14. Actividad toxicológica del extracto hexánico de las partes aéreas de *Salvia connivens* sobre adultos de *Poecilia reticulata*.

Concentración (mg L ⁻¹)	Mortalidad (%)								
	1h	3h	6h	12h	24h	48h	72h	96 h	Total
500	0	0	8.33	0	8.33	25	0	0	41.67±14.87
250	0	0	0	8.33	8.33	0	0	0	16.67±11.24
125	0	0	0	0	0	0	0	0	0±ND
62.5	0	0	0	0	0	8.33	0	0	8.33±8.33
31.2	0	0	0	0	0	8.33	0	0	8.33±8.33
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0±ND
CL ₅₀	775.68 mg L ⁻¹								

Resultados son el promedio de 12 determinaciones ± error estándar de la media. P<0.121. CL₅₀ Concentración letal media.

5.3 Efecto toxicológico de extractos de *Salvia ballotiflora* en alevines de *Poecilia reticulata*.

5.3.1 Extracto metanólico de *Salvia ballotiflora*

El efecto del extracto metanólico de las partes aéreas de *S. ballotiflora* en alevines de *P. reticulata* mostró que la mortalidad total acumulada hasta las 96 horas fue de 25, 66.66, 91.67, 100 y 100% a concentraciones de 31.2, 62.5, 125, 250 y 500 mg L⁻¹ respectivamente, con efectos de mortalidad a partir de las 3 horas, el control negativo (0 mg L⁻¹) no presentó efecto de mortalidad. La CL₅₀ para alevines fue de 58.46 mg L⁻¹ (Cuadro 15).

Cuadro 15. Actividad toxicológica del extracto metanólico de las partes aéreas de *Salvia ballotiflora* sobre alevines de *Poecilia reticulata*.

Concentración (mg L ⁻¹)	Mortalidad (%)								
	1h	3h	6h	12h	24h	48h	72h	96 h	Total
500	0	33.33	16.67	50	-	-	-	-	100±ND
250	0	8.33	16.67	16.67	33.33	16.67	8.33	-	100±ND
125	0	0	0	16.67	0	41.67	33.33	0	91.67±8.33
62.5	0	0	0	8.33	0	33.33	25	0	66.66±14.21
31.2	0	0	0	0	0	8.33	0	16.67	25±13.87
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0±ND
CL ₅₀	58.46 mg L ⁻¹								

Resultados son el promedio de 12 determinaciones ± error estándar de la media. P<0.121. CL₅₀ Concentración letal media.

5.4 Efecto toxicológico de extractos de *Salvia connivens* en adultos de *Danio rerio*.

5.4.1 Extracto metanólico de *Salvia connivens*

El efecto del extracto metanólico de las partes aéreas de *S. connivens* en adultos de *D. rerio* mostró que la mortalidad total acumulada hasta las 96 horas fue de 8.33, 16.67, 100 y 100% a concentraciones de 62.5, 125, 250 y 500 mg L⁻¹ respectivamente, con efectos de mortalidad desde la primera hora de exposición, el control negativo (0 mg L⁻¹) no presentó efecto de mortalidad. La CL₅₀ para adultos fue de 154.22 mg L⁻¹ (Cuadro 16).

Cuadro 16. Actividad toxicológica del extracto metanólico de las partes aéreas de *Salvia connivens* sobre adultos de *Danio rerio*.

Concentración (mg L ⁻¹)	Mortalidad (%)								
	1h	3h	6h	12h	24h	48h	72h	96 h	Total
500	75	25	-	-	-	-	-	-	100
250	0	0	50	50	-	-	-	-	100
125	0	0	0	0	0	8.33	8.33	0	16.67
62.5	0	0	0	0	0	8.33	0	0	8.33
31.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CL ₅₀	154.22 mg L ⁻¹								

Resultados son el promedio de 12 determinaciones ± error estándar de la media. P<0.121. CL₅₀ Concentración letal media.

5.4.2 Extracto clorofórmico de *Salvia connivens*

El efecto del extracto clorofórmico de las partes aéreas de *S. connivens* en adultos de *D. rerio* mostró que la mortalidad total acumulada hasta las 96 horas fue de 8.33, 8.33, 83.33, 100 y 100% a concentraciones de 31.2, 62.5, 125, 250 y 500 mg L⁻¹ respectivamente, respuestas de mortalidad desde la primera hora, el control negativo (0 mg L⁻¹) no presentó efecto de mortalidad. La CL₅₀ para adultos fue de 95.24 mg L⁻¹ (Cuadro 17).

Cuadro 17. Actividad toxicológica del extracto clorofórmico de las partes aéreas de *Salvia connivens* sobre adultos de *Danio rerio*.

Concentración (mg L ⁻¹)	Mortalidad (%)								
	1h	3h	6h	12h	24h	48h	72h	96 h	Total
500	100	-	-	-	-	-	-	-	100
250	25	25	50	-	-	-	-	-	100
125	0	8.33	0	41.67	8.33	8.33	16.67	0	83.33
62.5	0	8.33	0	0	0	0	0	0	8.33
31.2	0	0	0	0	0	0	8.33	0	8.33
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CL ₅₀	95.24 mg L ⁻¹								

Resultados son el promedio de 12 determinaciones ± error estándar de la media. P<0.121. CL₅₀ Concentración letal media.

5.5 Efecto toxicológico de extractos de *Salvia ballotiflora* en adultos de *Danio rerio*.

5.5.1 Extracto metanólico de *Salvia ballotiflora*

El efecto del extracto metanólico de las partes aéreas de *S. ballotiflora* en adultos de *D. rerio* mostró que los efectos de mortalidad se presentan a las 3 horas y la mortalidad total acumulada hasta las 96 horas fue de 25, 25, 50, 100 y 100% a concentraciones de 31.2, 62.5, 125, 250 y 500 mg L⁻¹ respectivamente, el control negativo (0 mg L⁻¹) no presentó efecto de mortalidad. La CL₅₀ para adultos fue de 108.57 mg L⁻¹ (Cuadro 18).

Cuadro 18. Actividad toxicológica del extracto metanólico de las partes aéreas de *Salvia ballotiflora* sobre adultos de *Danio rerio*.

Concentración (mg L ⁻¹)	Mortalidad (%)								
	1h	3h	6h	12h	24h	48h	72h	96 h	Total
500	0	100	-	-	-	-	-	-	100
250	0	0	75	25	-	-	-	-	100
125	0	0	8.33	8.33	0	16.67	0	16.67	50
62.5	0	8.33	0	0	0	8.33	0	8.33	25
31.2	0	0	0	0	0	8.33	16.67	0	25
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CL ₅₀	108.57 mg L ⁻¹								

Resultados son el promedio de 12 determinaciones ± error estándar de la media. P<0.121. CL₅₀ Concentración letal media.

5.5.2 Extracto clorofórmico de *Salvia ballotiflora*

El efecto del extracto clorofórmico de las partes aéreas de *S. ballotiflora* en adultos de *D. rerio* mostró que la mortalidad total acumulada hasta las 96 horas fue de 25, 25, 50, 100 y 100% a concentraciones de 31.2, 62.5, 125, 250 y 500 mg L⁻¹ respectivamente, con registros de mortalidad desde la primera hora, el control negativo (0 mg L⁻¹) no presentó efecto de mortalidad. La CL₅₀ para adultos fue de 108.57 mg L⁻¹ (Cuadro 19).

Cuadro 19. Actividad toxicológica del extracto clorofórmico de las partes aéreas de *Salvia ballotiflora* sobre adultos de *Danio rerio*.

Concentración (mg L ⁻¹)	Mortalidad (%)								
	1h	3h	6h	12h	24h	48h	72h	96 h	Total
500	100	0	-	-	-	-	-	-	100
250	50	50	-	-	-	-	-	-	100
125	0	100	-	-	-	-	-	-	100
62.5	0	33.33	25	25	8.33	0	0	0	91.66
31.2	0	0	0	0	8.33	16.67	8.33	0	33.33
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CL ₅₀	39.22 mg L ⁻¹								

Resultados son el promedio de 12 determinaciones ± error estándar de la media. P<0.121. CL₅₀ Concentración letal media.

5.5.3 Extracto hexánico de *Salvia ballotiflora*

El efecto del extracto hexánico de las partes aéreas de *S. ballotiflora* en adultos de *D. rerio* mostró que la mortalidad total acumulada hasta las 96 horas fue de 100, 100, 100, 100 y 100% a concentraciones de 31.2, 62.5, 125, 250 y 500 mg L⁻¹ respectivamente, mortalidades registradas desde la hora 1, el control negativo (0 mg L⁻¹) no presentó efecto de mortalidad. La CL₅₀ para adultos fue de 18.27 mg L⁻¹ (Cuadro 20).

Cuadro 20. Actividad toxicológica del extracto hexánico de las partes aéreas de *Salvia ballotiflora* sobre adultos de *Danio rerio*.

Concentración (mg L ⁻¹)	Mortalidad (%)								
	1h	3h	6h	12h	24h	48h	72h	96 h	Total
500	100	-	-	-	-	-	-	-	100
250	58.33	41.67	-	-	-	-	-	-	100
125	0	100	-	-	-	-	-	-	100
62.5	0	41.67	41.67	16.67	-	-	-	-	100
31.2	0	8.33	16.67	75	-	-	-	-	100
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CL ₅₀	18.27 mg L ⁻¹								

Resultados son el promedio de 12 determinaciones ± error estándar de la media. P<0.121. CL₅₀ Concentración letal media.

5.6 Efecto toxicológico de extractos de *Salvia connivens* en embriones de *Danio rerio*.

5.6.1 Extracto metanólico de *Salvia connivens*

El efecto del extracto metanólico de las partes aéreas de *S. connivens* en embriones de *D. rerio* mostró que la mortalidad total acumulada hasta las 48 horas fue de 25, 25, 25, 50 y 100% a concentraciones de 31.2, 62.5, 125, 250 y 500 mg L⁻¹ respectivamente, efectos de mortalidad desde las 8hrs, el control negativo (0 mg L⁻¹) no presentó efecto de mortalidad. La CL₅₀ para los embriones fue de 208.38 mg L⁻¹ (Cuadro 21).

Cuadro 21. Actividad toxicológica del extracto metanólico de las partes aéreas de *Salvia connivens* sobre embriones de *Danio rerio*.

Concentración (mg L ⁻¹)	Mortalidad (%)							
	4h	8h	12h	16h	24h	36h	48h	Total
500	0	25	50	25	-	-	-	100
250	0	25	25	0	0	0	0	50
125	0	0	0	25	0	0	0	25
62.5	0	25	0	0	0	0	0	25
31.2	0	25	0	0	0	0	0	25
0	0	0	0	0	0	0	0	0
CL ₅₀	208.38 mg L ⁻¹							

Resultados son el promedio de 16 determinaciones ± error estándar de la media. P<0.121. CL₅₀ Concentración letal media.

5.6.2 Extracto clorofórmico de *Salvia connivens*

El efecto del extracto clorofórmico de las partes aéreas de *S. connivens* en embriones de *D. rerio* mostró que la mortalidad total acumulada hasta las 48 horas fue de 75, 75, 100, 100 y 100% a concentraciones de 31.2, 62.5, 125, 250 y 500 mg L⁻¹ respectivamente, apreciándose efectos de mortalidad desde las 4 horas de exposición, el control negativo (0 mg L⁻¹) no presentó efecto de mortalidad. La CL₅₀ para los embriones fue de 32.60 mg L⁻¹ (Cuadro 22).

Cuadro 22. Actividad toxicológica del extracto clorofórmico de las partes aéreas de *Salvia connivens* sobre embriones de *Danio rerio*.

Concentración (mg L ⁻¹)	Mortalidad (%)							
	4h	8h	12h	16h	24h	36h	48h	Total
500	25	0	75	-	-	-	-	100
250	25	0	75	-	-	-	-	100
125	25	0	75	-	-	-	-	100
62.5	0	0	75	0	0	0	0	75
31.2	0	0	75	0	0	0	0	75
0	0	0	0	0	0	0	0	0
CL ₅₀	32.60 mg L ⁻¹							

Resultados son el promedio de 16 determinaciones ± error estándar de la media. P<0.121. CL₅₀ Concentración letal media.

5.6.3 Extracto hexánico de *Salvia connivens*

El efecto del extracto hexánico de las partes aéreas de *S. connivens* en embriones de *D. rerio* mostró que la mortalidad total acumulada hasta las 48 horas fue de 25 y 100% a concentraciones de 125 y 500 mg L⁻¹ respectivamente, con efectos de mortalidad a partir de las 12 horas, el control negativo (0 mg L⁻¹) no presentó efecto de mortalidad. La CL₅₀ para los embriones fue de 32.60 mg L⁻¹ (Cuadro 23).

Cuadro 23. Actividad toxicológica del extracto hexánico de las partes aéreas de *Salvia connivens* sobre embriones de *Danio rerio*.

Concentración (mg L ⁻¹)	Mortalidad (%)							
	4h	8h	12h	16h	24h	36h	48h	Total
500	0	0	25	50	25	-	-	100
250	0	0	0	0	0	0	0	0
125	0	0	25	0	0	0	0	25
62.5	0	0	0	0	0	0	0	0
31.2	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0
CL ₅₀	318.81 mg L ⁻¹							

Resultados son el promedio de 16 determinaciones ± error estándar de la media. P<0.121. CL₅₀ Concentración letal media.

5.7 Efecto toxicológico de extractos de *Salvia ballotiflora* en embriones de *Danio rerio*.

5.7.1 Extracto metanólico de *Salvia ballotiflora*

El efecto del extracto metanólico de las partes aéreas de *S. ballotiflora* en embriones de *D. rerio* mostró que la mortalidad total acumulada hasta las 48 horas fue de 75, 81.25, 75, 75 y 100% a concentraciones de 31.2, 62.5, 125, 250 y 500 mg L⁻¹ respectivamente, el control negativo (0 mg L⁻¹) no presentó efecto de mortalidad. La CL₅₀ para los embriones fue de 33.17 mg L⁻¹ (Cuadro 24).

Cuadro 24. Actividad toxicológica del extracto metanólico de las partes aéreas de *Salvia ballotiflora* sobre embriones de *Danio rerio*.

Concentración (mg L ⁻¹)	Mortalidad (%)							
	4h	8h	12h	16h	24h	36h	48h	Total
500	0	0	37.5	62.5	-	-	-	100
250	0	6.25	25	43.75	0	0	0	75
125	0	0	6.25	68.75	0	0	0	75
62.5	0	0	18.75	62.5	0	0	0	81.25
31.2	0	0	12.5	62.5	0	0	0	75
0	0	0	0	0	0	0	0	0
CL ₅₀	33.17 mg L ⁻¹							

Resultados son el promedio de 16 determinaciones ± error estándar de la media. P<0.121. CL₅₀ Concentración letal media.

5.7.2 Extracto clorofórmico de *Salvia ballotiflora*

El efecto del extracto clorofórmico de las partes aéreas de *S. ballotiflora* en embriones de *D. rerio* mostró que la mortalidad total acumulada hasta las 48 horas fue de 6.25, 100 y 100% a concentraciones de 31.2, 250 y 500 mg L⁻¹ respectivamente, el control negativo (0 mg L⁻¹) no presentó efecto de mortalidad. La CL₅₀ para los embriones fue de 173.22 mg L⁻¹ (Cuadro 25).

Cuadro 25. Actividad toxicológica del extracto clorofórmico de las partes aéreas de *Salvia ballotiflora* sobre embriones de *Danio rerio*.

Concentración (mg L ⁻¹)	Mortalidad (%)							
	4h	8h	12h	16h	24h	36h	48h	Total
500	0	0	0	100	-	-	-	100
250	0	0	0	100	-	-	-	100
125	0	0	0	0	0	0	0	0
62.5	0	0	0	0	0	0	0	0
31.2	6.25	0	0	0	0	0	0	6.25
0	0	0	0	0	0	0	0	0
CL ₅₀	173.90 mg L ⁻¹							

Resultados son el promedio de 16 determinaciones ± error estándar de la media. P<0.121. CL₅₀ Concentración letal media.

5.7.3 Extracto hexánico de *Salvia ballotiflora*

El efecto del extracto hexánico de las partes aéreas de *S. ballotiflora* en embriones de *D. rerio* mostró que la mortalidad total acumulada hasta las 48 horas fue de 25, 75, 100, 100 y 100% a concentraciones de 31.2, 62.5, 125, 250 y 500 mg L⁻¹ respectivamente, efectos de mortalidad a partir de 8 horas, el control negativo (0 mg L⁻¹) no presentó efecto de mortalidad. La CL₅₀ para los embriones fue de 47.41 mg L⁻¹ (Cuadro 26).

Cuadro 26. Actividad toxicológica del extracto hexánico de las partes aéreas de *Salvia ballotiflora* sobre embriones de *Danio rerio*.

Concentración (mg L ⁻¹)	Mortalidad (%)							Total
	4h	8h	12h	16h	24h	36h	48h	
500	0	50	50	-	-	-	-	100
250	0	0	100	-	-	-	-	100
125	0	0	87.5	12.5	-	-	-	100
62.5	0	0	25	12.5	37.5	0	0	75
31.2	0	0	0	25	0	0	0	25
0	0	0	0	0	0	0	0	0
CL ₅₀	47.41 mg L ⁻¹							

Resultados son el promedio de 16 determinaciones ± error estándar de la media. P<0.121. CL₅₀ Concentración letal media.

5.8 Resultados de HPLC

Por análisis de los cromatogramas del extracto metanólico de las partes aéreas de *S. ballotiflora* se identificó como compuesto mayoritario al ácido rosmarínico ($C_{18}H_{16}O_8$), que pertenece a los compuestos ácidos fenólicos (Figura 1). El pico de ácido rosmarínico estándar tuvo un tiempo de retención de 19.68 min (Cuadro 27; Figura 2), siendo el compuesto mayoritario en el extracto (Figura 3). El ácido rosmarínico ha mostrado actividad insecticida contra *Acanthoscelides obtectus* (Regnault-Roger y col. 2004), antimicrobiana en *Pythium ultimum* (Bais y col. 2002), nematocida contra *Bursaphelenchus xylophylus*, como antibacterial contra *Klebsiella* sp, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptomyces* sp y *Pantoea agglomerans* (Wang y col. 2012), sobre *Brotritis cinerea*, *Pestalotiopsis magniferae*, *Penicillium citrinum* y *Alternaria kikuchiana* (Guo y col. 2004).

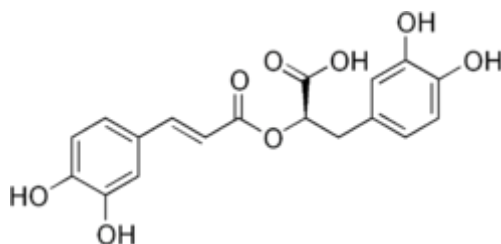


Figura 1. Estructura del ácido rosmarínico

Cuadro 27. Valores promedio de tres determinaciones de los tiempos de retención del análisis por HPLC del extracto metanólico de *Salvia ballotiflora*.

Muestra	Tiempo de retención
Ácido rosmarínico (estándar)	19.688 ± 0.38
Extracto CH ₃ OH de <i>S. ballotiflora</i>	19.762 ± 0.43

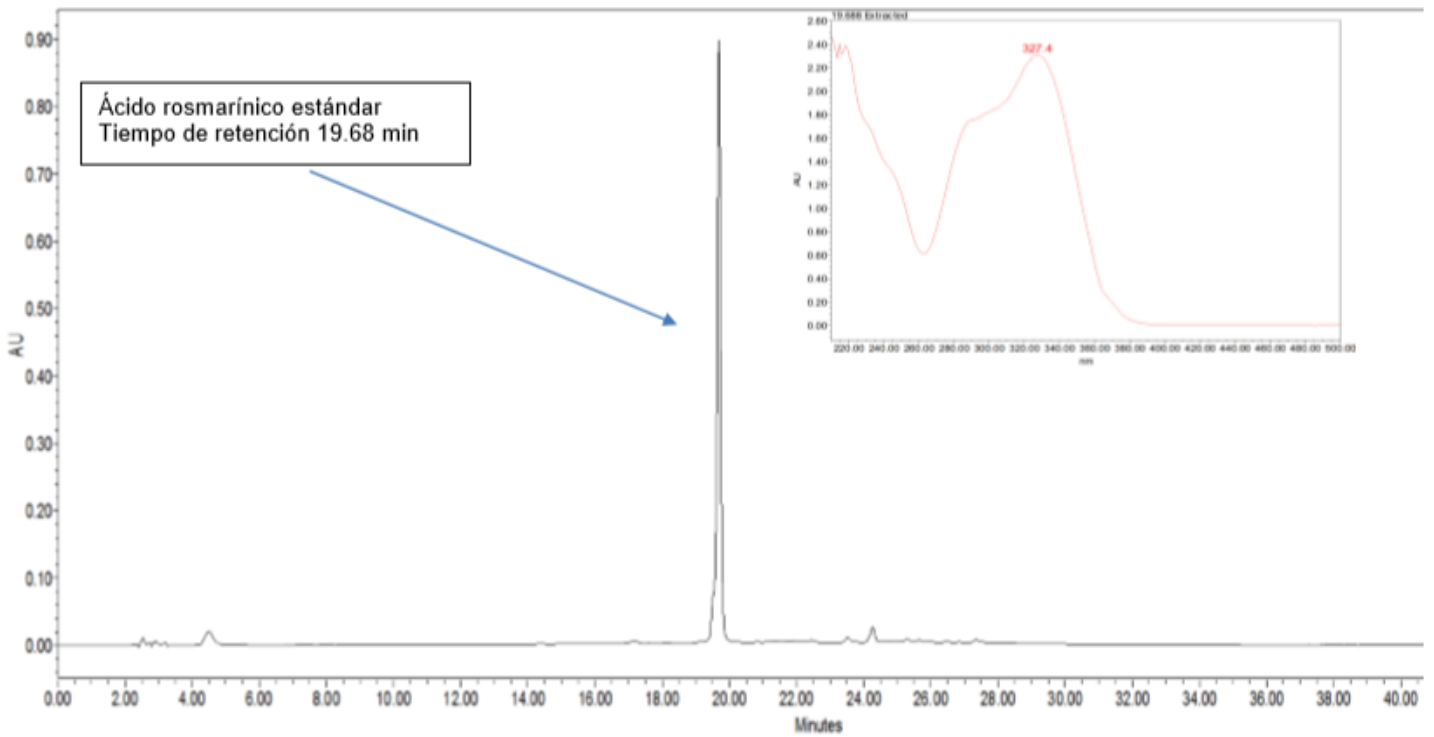


Figura 2. Cromatograma por HPLC y espectro del estándar de ácido rosmarínico.

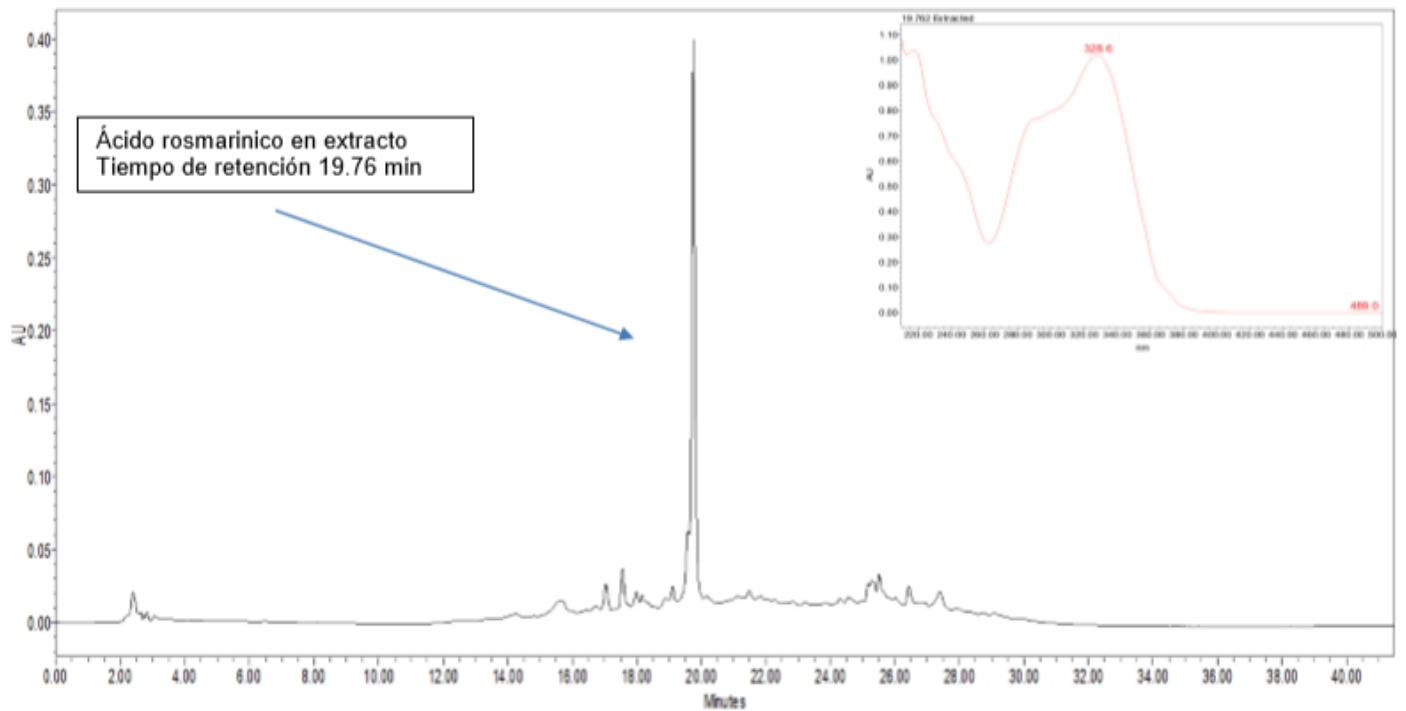


Figura 3. Cromatograma por HPLC y espectro del extracto metanólico de las partes aéreas de *Salvia ballotiflora*.

5.9 Efecto toxicológico del ácido rosmarínico sobre *Poecilia reticulata*

5.9.1 Efecto toxicológico del ácido rosmarínico sobre adultos de *Poecilia reticulata*

El efecto del ácido rosmarínico, compuesto mayoritario del extracto metanólico de las partes aéreas de *S. ballotiflora* en adultos de *P. reticulata*, no mostró efecto de mortalidad a ningún tiempo ni concentración de la prueba por lo que no fue posible determinar la CL₅₀, el control negativo (0 mg L⁻¹) no presentó efecto de mortalidad (Cuadro 28).

Cuadro 28. Actividad toxicológica del ácido rosmarínico presente en extracto metanólico de las partes aéreas de *Salvia ballotiflora* sobre adultos de *Poecilia reticulata*.

Concentración (mg L ⁻¹)	Mortalidad (%)								
	1h	3h	6h	12h	24h	48h	72h	96 h	Total
500	0	0	0	0	0	0	0	0	0±ND
250	0	0	0	0	0	0	0	0	0±ND
125	0	0	0	0	0	0	0	0	0±ND
62.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0±ND
31.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0±ND
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0±ND
CL ₅₀	ND								

Resultados son el promedio de 12 determinaciones ± error estándar de la media. CL₅₀ Concentración letal media.

5.9.2 Efecto toxicológico del ácido rosmarínico sobre alevines de *Poecilia reticulata*

El efecto del ácido rosmarínico, compuesto mayoritario del extracto metanólico de las partes aéreas de *S. ballotiflora* en alevines de *P. reticulata*, mostró que la mortalidad total acumulada hasta las 96 horas era de 0, 0, 8.33, 0 y 25% a concentraciones de 31.2, 62.5, 125, 250 y 500 mg L⁻¹ respectivamente, cuyos efectos letales se aprecian después de las 48 horas, el control negativo (0 mg L⁻¹) no presentó efecto de mortalidad. La CL₅₀ calculada para alevines fue de 698.05 mg L⁻¹ (Cuadro 29).

Cuadro 29. Actividad toxicológica del ácido rosmarínico presente en extracto metanólico de las partes aéreas de *Salvia ballotiflora* sobre alevines de *Poecilia reticulata*.

Concentración (mg L ⁻¹)	Mortalidad (%)								
	1h	3h	6h	12h	24h	48h	72h	96 h	Total
500	0	0	0	0	0	16.67	0	8.33	25±13.6
250	0	0	0	0	0	0	0	0	0±ND
125	0	0	0	0	0	0	0	8.33	8.33±8.33
62.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0±ND
31.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0±ND
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0±ND
CL ₅₀	698.05 mg L ⁻¹								

Resultados son el promedio de 12 determinaciones ± error estándar de la media. CL₅₀ Concentración letal media.

5.10 Efecto toxicológico del ácido rosmarínico sobre *Danio rerio*

5.10.1 Efecto toxicológico del ácido rosmarínico sobre adultos de *Danio rerio*

El efecto del ácido rosmarínico, compuesto mayoritario del extracto metanólico de las partes aéreas de *S. ballotiflora* en adultos de *D. rerio*, mostró que la mortalidad total acumulada hasta las 96 horas fue de 8.33, 8.33 y 58.33% a concentraciones de 125, 250 y 500 mg L⁻¹ respectivamente, el control negativo (0 mg L⁻¹) presentó efecto de mortalidad de 8.33%, correspondiente a la cantidad de 1 individuo, esta mortalidad podría darse debido a la susceptibilidad individual. La CL₅₀ calculada para adultos fue de 477.86 mg L⁻¹ (Cuadro 30).

Cuadro 30. Actividad toxicológica del ácido rosmarínico presente en extracto metanólico de las partes aéreas de *Salvia ballotiflora* sobre adultos de *Danio rerio*.

Concentración (mg L ⁻¹)	Mortalidad (%)								
	1h	3h	6h	12h	24h	48h	72h	96 h	Total
500	0	0	0	0	0	33.33	25	0	58.33
250	0	0	0	0	0	0	8.33	0	8.33
125	0	0	0	0	0	0	8.33	0	8.33
62.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	8.33	8.33
CL ₅₀	477.86 mg L ⁻¹								

Resultados son el promedio de 12 determinaciones ± error estándar de la media. CL₅₀ Concentración letal media.

5.10.2 Efecto toxicológico del ácido rosmarínico sobre embriones de *Danio rerio*

El efecto del ácido rosmarínico, compuesto mayoritario del extracto metanólico de las partes aéreas de *S. ballotiflora* en embriones de *D. rerio*, mostró que la mortalidad total acumulada hasta las 48 horas fue de 93.75, 93.75, 100, 100 y 100% a concentraciones de 31.2, 62.5, 125, 250 y 500 mg L⁻¹ respectivamente, el control negativo (0 mg L⁻¹) no presentó efecto de mortalidad. La CL₅₀ calculada para embriones fue de 21.57 mg L⁻¹ (Cuadro 31).

Cuadro 31. Actividad toxicológica del ácido rosmarínico presente en extracto metanólico de las partes aéreas de *Salvia ballotiflora* sobre embriones de *Danio rerio*.

Concentración (mg L ⁻¹)	Mortalidad (%)							
	4h	8h	12h	16h	24h	36h	48h	Total
500	0	12.5	75	12.5	-	-	-	100
250	0	0	68.75	31.25	-	-	-	100
125	0	0	68.75	31.25	-	-	-	100
62.5	0	0	43.75	50	0	0	0	93.75
31.2	0	0	0	93.75	0	0	0	93.75
0	0	0	0	0	0	0	0	0
CL ₅₀	21.57 mg L ⁻¹							

Resultados son el promedio de 16 determinaciones ± error estándar de la media. P<0.121. CL₅₀ Concentración letal media.

Los resultados de los bioensayos sobre adultos de *Poecilia reticulata* mostraron una tendencia toxicológica proporcional a la polaridad de los extractos 467.73 y 140.19 mg L⁻¹ de CL₅₀ para extractos, clorofórmico y metanólico respectivamente de *Salvia ballotiflora*; 775.68, 203.64 y 179.3 mg L⁻¹ para los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico de *Salvia connivens*. Comparando la CL₅₀ entre los extractos de plantas, resultaron más tóxicos los extractos de *S. ballotiflora*. De la misma forma el extracto metanólico de *S. ballotiflora* resulta tener un efecto de mortalidad de 58.46 mg L⁻¹ frente a alevines de *P. reticulata*. Debido a que los extractos polares de plantas del género *Salvia* poseen compuestos fenólicos, se compararon estos resultados con un estudio similar de toxicidad de compuestos fenólicos realizado sobre *Notopterus notopterus* (Pallas) donde se mostró la misma tendencia obtenida en los presentes bioensayos, la toxicidad decrece conforme el tamaño de los peces aumenta (Gupta y col. 1982).

Por otra parte, la respuesta toxicológica de los extractos frente adultos de *Danio rerio*, tuvo una tendencia de toxicidad inversa a la polaridad con CL₅₀ de 18.27, 39.22 y 108.57 mg L⁻¹ en extractos hexánico, clorofórmico y metanólico respectivamente de *S. ballotiflora*; la respuesta de los extractos clorofórmico y metanólico de *S. connivens* fue 92.24 y 154.22 mg L⁻¹ respectivamente, donde se observó nuevamente que los extractos de *S. ballotiflora* tienen una mayor actividad toxicológica. En un estudio similar de toxicidad de extractos de *Nerium indicum* sobre *Channa punctatus* se muestran tendencias similares en la mortalidad de los peces debido a que estos incorporan inmediatamente compuestos bioactivos de la planta presentes en los extractos (Tiwari y Singh, 2003). Esto indica que la toxicidad de los extractos hexánico y clorofórmico para *D. rerio* puede ser debida a la actividad de otros compuestos bioactivos para estos peces, no identificados en este trabajo.

D. rerio resultó ser una especie más sensible que *P. reticulata* frente al efecto de los extractos metanólicos, clorofórmicos y hexánicos de *S. ballotiflora* y *S. connivens*, sin embargo los extractos clorofórmicos y hexánicos le confirieron a *D. rerio* una mayor mortalidad que los metanólicos, las CL₅₀ más bajas de los ensayos para adultos (95.24 mg L⁻¹ de clorofórmico de *S. connivens*, 39.22 y 18.27 mg L⁻¹ de clorofórmico y hexánico respectivamente de *S. ballotiflora*). En un estudio

toxicológico sobre cartap en peces se muestra que tampoco para este tipo de ensayo *P. reticulata* es el mejor organismo indicador de toxicidad (Iannacone y col. 2007). Pero no deja de ser una especie ampliamente utilizada para pruebas toxicológicas por su amplia distribución mundial.

Los compuestos fenólicos como los presentes en las especies del género *Salvia*, centran su actividad en la reducción de síntesis de ATP y el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa sobre los organismos acuáticos ocasionando un efecto letal (Buikema, 1979). Una menor cantidad en el parámetro de CL_{50} implica un mayor grado de toxicidad, como lo es en el caso de las pruebas con alevines respecto a los adultos, esto debido a su menor talla, peso y así como la diferente tasa metabólica, lo cual los hace más sensibles a cambios y sustancias extrañas en su medio (Allen y Gillooly, 2007).

En el caso de las pruebas en embriones de *D. rerio*, no se presenta una tendencia clara en la toxicidad de acuerdo a la polaridad, probablemente la interacción de los compuestos sobre el corion y su efecto en el embrión no dependa de directamente de la polaridad de los compuestos en los extractos; las CL_{50} de los extractos de *S. ballotiflora* fueron 47.41, 173.90 y 33.17 mg L⁻¹ para el extracto hexánico, clorofórmico y metanólico respectivamente. Con los extractos de *S. connivens* fueron 318.81, 32.60 y 208.38 mg L⁻¹. Donde se observan menores concentraciones letales para los extractos de *S. ballotiflora*.

Los resultados de toxicidad del compuesto mayoritario identificado en el extracto metanólico de *S. ballotiflora*, el ácido rosmarínico, indicó una CL_{50} no detectable para adultos de *P. reticulata* y de 698.05 mg L⁻¹ para alevines. Para adultos de *D. rerio* se tuvo una CL_{50} de 477.86 mg L⁻¹ y para embriones 21.57 mg L⁻¹. La toxicidad del ácido rosmarínico es considerablemente más baja que la mostrada por los extractos, por lo que se atribuye la toxicidad de estos a un efecto sinérgico de los compuestos, excepto para los embriones de *D. rerio* ya que en estos se presentó una mayor toxicidad del ácido rosmarínico que en las pruebas con los extractos (21.57 mg L⁻¹).

Los compuestos polifenólicos como el ácido rosmarínico son capaces de penetrar la bicapa lipídica confiriéndole a las células protección contra la oxidación

y funciona como un protector de la embriogénesis de *D. rerio* a concentraciones de 0.1-0.5 mg L⁻¹ (Swarnalatha y col. 2017); Volodin (1973) reporta que hasta concentraciones de 40 mg L⁻¹ no se tienen efectos significativos en la mortalidad de huevos de *D. rerio*. Por lo que la exposición a altas concentraciones de ácido rosmarínico y compuestos fenólicos (31.2, 62.5, 125, 250 y 500mg L⁻¹) ocasiona un efecto de mortalidad en los embriones de *D. rerio*.

Los estudios toxicidad de extractos botánicos sobre peces son limitados, por lo que no podemos comparar directamente el nivel de toxicidad de los extractos de *S. ballotiflora* y *S. connivens* frente a otras sustancias de origen natural y plaguicidas sintéticos, pero se reporta que extractos metanólicos de *Parkia biglobosa* y *Raphia vinifera* en juveniles de *Clarias gariepinus* tuvieron una CL₅₀ de 2.8 y 2.4 mg L⁻¹ respectivamente (Fafioye y col. 2004), la azadiractina, un producto derivado del árbol del Nim, tiene una CL₅₀ a las 96hrs de 0.011 mg L⁻¹ y la Deltametrina de CL₅₀ 0.0019 mg L⁻¹ sobre adultos de *Poecilia reticulata*, la apigenina, rutina y Piretroide Cyperstar® de 44.92 mg L⁻¹, 43.62 mg L⁻¹ y 0.005 mg L⁻¹ respectivamente sobre *Cirrhinus mrigala* (Stalin y col. 2008; Pratap y Singh, 2015).

De acuerdo a la norma mexicana NOM-232-SSA1-2009 que establece los requisitos de etiquetado, envasado y embalaje de plaguicidas. Las concentraciones más tóxicas presentadas en los bioensayos (18.27 mg L⁻¹ de extracto hexánico, 39.22 mg L⁻¹ de extracto clorofórmico de *S. ballotiflora* y 21.57 mg L⁻¹ de ácido rosmarínico sobre embriones de *D. rerio*) no clasifican como productos altamente tóxicos al ambiente (<10 mg L⁻¹ criterio en peces) como sí lo son los plaguicidas sintéticos. Destacando que para alcanzar una concentración letal del extracto hexánico de *S. ballotiflora* (18.27 mg L⁻¹) en el ambiente sobre embriones de *D. rerio* es necesario el uso de una cantidad específica de masa vegetal de la cual se obtenga el extracto; 146.16 kg de planta seca para obtener 1.827 kg de extracto para alcanzar dicha concentración en 100 m³ de reservorio de agua por acumulación o derrame accidental, es decir se necesita una gran cantidad de estos compuestos para causar un daño al ambiente. Es por esto que desde el punto de vista ecológico, el empleo de estos extractos son una alternativa viable al manejo de plagas agrícolas.

6. CONCLUSIONES

La evaluación de toxicidad por exposición aguda a mezclas de metabolitos secundarios de *Salvia connivens* y *Salvia ballotiflora* muestra efectos toxicológicos sobre de *Danio rerio* y *Poecilia reticulata* pero que son inferiores a los efectos por plaguicidas sintéticos. Los extractos metanólicos de *S. ballotiflora* son lo que más afectan a *P. reticulata* y los extractos hexánicos a *D. rerio*. Por otra parte, entre estas dos especies *D. rerio* es la más sensible frente a la exposición aguda de los extractos de ambas plantas, lo que lo convierte en una especie indicadora para estas pruebas.

La identificación del principio activo mayoritario del extracto metanólico de *S. ballotiflora* muestra como compuesto más abundante al ácido rosmarínico, este compuesto presenta baja respuesta toxicológica frente a adultos *P. reticulata* y *D. rerio*, con un mayor efecto sobre embriones de *D. rerio*, comparado con la toxicidad del extracto origen, es decir, el compuesto mayoritario es de baja respuesta toxicológica al igual que los extractos, es por esto que el uso de estos extractos botánicos es una alternativa viable al manejo de plagas agrícolas.

7. REFERENCIAS

- Allen G.R. 1991**, Field guide to the freshwater fishes of New Guinea. Christensen Research Institute, Madang, Papua New Guinea. pp. 213.
- Allen P; Gollooly J.F. 2007**. The mechanistic basis of the metabolic theory of ecology. *Oikos*, 116: 1073-1077.
- Allgeier J; Yeager L; Layman C. 2013**. Consumers regulate nutrient limitation regimes and primary production in seagrass ecosystems. *Ecology*, 94(2): 521–529.
- Azcan N; Ertan A; Demirci B; Baser K. 2004**. Fatty acid composition of seed oils of twelve *Salvia* species growing in turkey. *Chemistry of Natural Compounds*. 40(3): 218-221.
- Bailey M; Burgess P. 2002**. Tropical Fishlopaedia: A Complete Guide to Fish Care. ed. Ring press Books. pp 19.
- Bais H. P; Walker T. S; Schweizer H. P; Vivianco J.M. 2002**. Root specific elicitation and antimicrobial activity of rosmarinic acid in hairy root cultures of *Ocimum basilicum*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 40: 983–995.
- Balon E.K.1990**, Epigenesis of an epigeneticist: the development of some alternative concepts on the early ontogeny and evolution of fishes. Institute of Ichthyology, University of Guelph. 1:1-48
- BDMTM. 2014**. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. [Consultado 2015, septiembre 28] Disponible en:
<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx>
- Buikema A. L.; McGinniss M, J; Cairns J.R. 1979**. Phenolics in aquatic ecosystems: aselected review of recent literature. *Marine Environmental Research*. 2:87-181
- Cabrerizo A; Dachs J; Barceló D; Jones K. 2012**. Influence of organic matter contents and humans activities on the occurrence of organic pollutants in Antarctic soils, lichen, Grass and Mosses. *Environmental Science & Technology*, 46: 1396-1405.
- Cornejo G; Ibarra G. 2011**. Diversidad y distribución del género *Salvia* (Lamiaceae) en Michoacán, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 82: 1279-1296.
- Castro G. A. 2011**. Evaluación toxicológica del extracto vegetal de orégano (*origanum vulgare*) sobre *tribolium castaneum* (herbst). Tesis presentada

como requisito parcial para obtener el título de Ingeniero Agrónomo Administrador. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. División de Socioeconómica Departamento de Administración Agropecuaria.

- CSIC. 2008.** Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Seres modélicos entre la naturaleza y el laboratorio. Pez cebrá (s.f). [Consultado 2015, noviembre 30]. Disponible en: <http://www.csic.es/seres-modelicos>.
- Devezé M. P; Reta M. J. L; Sánchez L. B. 2004.** Cultivo de *Poecilia reticulata* (Pisces: Poeciliidae) en cuerpos de agua tropicales, Veracruz, México. Revista de Biología Tropical. 52 (4): 951-958.
- Devine G. J; Eza D; Ogosuku E; Furlong M. J. 2008.** Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. 25(1): 74-100.
- Fafioye O.O; Adebisi A.A; Fagade S. O. 2004.** Toxicity of *Parkia biglobosa* and *Raphia vinifera* extracts on *Clarias gariepinus* juveniles. African Journal of Biotechnology. 3 (11): 627-630.
- Fraga B; Díaz C; Guadaño A; González A. 2005.** Diterpenes from *Salvia broussonetii* transformed roots and their insecticidal activity. Journal Agricultural and Food Chemistry. 53: 5200-5206.
- Giménez J; González O. 2011.** Pisos de vegetación de la sierra de catorce y territorios circundantes (San Luís Potosí, México). Acta Botánica Mexicana. 94: 91-123.
- Gómez-Arroyo S; Martínez-Valenzuela C; Carbajal-López Y; Martínez-Arroyo A; Calderón-Segura M. E; Villalobos-Pieteni R; Waliszewski S. M. 2013.** Riesgo genotóxico por la exposición ocupacional a plaguicidas en América latina. Revista Internacional de Contaminación Ambiental. 29: 159-180.
- González O; Giménez J; García J; Aguirre R. 2007.** Flórua vascular de la sierra de catorce y territorios adyacentes, San Luis Potosí, México. México. Acta Botánica Mexicana. 78: 1-33.
- Gupta S; Verma S.R; Saxena P. K. 1982.** Toxicity of Phenolic Compounds in Relation to the Size of a Freshwater Fish, *Notopterus notopterus* (Pallas). Ecotoxicology and Environmental Safety 6: 433-438.
- Iannacone J; Roxana O; Olga H. 2007.** Efectos ecotoxicológicos de cartap sobre *Poecilia reticulata* "guppy" (Poeciliidae) y *Paracheirodon innesi* "neon tetra"

(characidae), Gayana 71(2): 170-177.

IBUNAM. 2014. Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México.

Salvia ballotiflora [consultado 2015, agosto 30]. Disponible en:

<http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:PVT28409>

IBUNAM. 2014. Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México.

Salvia connivens [Consultado 2015, Noviembre 30].Disponible en:

<http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:PVT28280>

INECC. 2009 Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. Ecotoxicología.

[Consultado 2016, marzo 4]. Disponible en: <http://www.inecc.gob.mx/sqre-temas/766-sqre-eco>.

Isman M. 2000. Plant essential oils for pest and disease management. Crop Protection. 19: 603–608.

Isman M. 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. Annual Review of Entomology. 51: 45-66.

Kamatou G; Makungab N; Ramogolab W; Viljoen A. 2008. South African *Salvia* species: A review of biological activities and phytochemistry. Journal of Ethnopharmacology. 119: 664–672.

Kharazian N. 2014. Chemotaxonomy and flavonoid diversity of *Salvia L.* (Lamiaceae) in Iran. Acta Botanica Brasilica. 28 (2): 281-292.

Kotan R; Kordali S; Cakir A; Kesdek M; Kaya, Y; Kilic, H. 2008. Antimicrobial and insecticidal activities of essential oil isolated from Turkish *Salvia hydrangea* DC. ex Benth. Biochemical Systematics and Ecology. 36 (5-6): 360-368.

Kouzi S; Dowd P; McChesney I. 1996. Antiinsectan activity of the diterpene sclareol and analogs against fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. Natural Product Letters. 8: 217-223.

Layman C; Allgeier J; Yeager L; Stoner E. 2013. Thresholds of ecosystem response to nutrient enrichment from fish aggregations. Ecology. 94(2): 530–536

Liu Z; Liu Q; Zhou L; Jiang G. 2013. Essential oil composition and insecticidal activity of *Salvia umbratica* flowering aerial parts from China against *Sitophilus zeamais*. Journal of Essential Oil Bearing Plants. 16 (5): 672 – 678.

Lizana R. D.R. 2005. Elaboración y Evaluación de extractos del fruto de *Melia*

azedarch L. como insecticida natural. Memoria para optar por al Título Profesional de Ingeniero Forestal. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Forestales.

- Maciej T;** Jolanta F; Marek B. **2010.** Determination of organophosphorus and organonitrogen pesticides in water samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 29(9): 1050–1063.
- Martínez M;** Fragoso Itzi; García María del Rosario; Montiel O. **2013.** Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo. *Revista Mexicana de Biodiversidad.* 84: 30-86
- Martínez J. F. F;** **Espinoza C. F.** **2008.** Ensayo de toxicidad aguda con larvas y juveniles de los peces *Brachydanio rerio* y *Poecilia reticulata*. *En: (Ramírez Romero P. y Mendoza Cantú A. copiladores). Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas con agua y suelo, La experiencia en México. SEMARNAT, INE.* pp 115-126.
- Mills N. E;** Semlitsch R.D. **2004;** Competition and predation mediate the indirect effects of an insecticide on southern leopard frogs. *Ecological Applications.* 14(4): 1041-1054.
- Moghddam M;** Farimani M; Taheri S; Tafazoli M; Amin G. **2008.** Chemical constituents from *Salvia macrosiphon*. *Chemistry of Natural Compounds.* 44 (4): 518-520.
- Morris A. J;** Wilson J. D; Whittingham M. J; Bradbury R. B. **2005.** Indirect effects of pesticides on breeding yellow hammer (*Emberiza citrinella*). *Agriculture, Ecosystems and Environment.* 106(1): 1-16.
- Nava E;** García C; Camacho J; Vázquez E. **2012.** Bioplaguicidas: una opción para el control biológico de plagas. *Ra Ximhai.* 8(3): 17-29.
- Nikolova M;** Grayer R; Genova E; Porter E. **2006.** Exudate flavonoids from Bulgarian species of *Salvia*. *Biochemical Systematics and Ecology.* 34:360-364.
- OECD.** **2006.** OECD guideline for the testing of chemicals, Fish Embryo Toxicity (FET) Test.
- Norma Oficial Mexicana NOM-087 ECOL SSA1.** **2002.** Protección ambiental, salud ambiental residuos peligrosos biológico infecciosos clasificación y especificaciones de manejo.

- Norma Oficial Mexicana NOM-232-SSA1-2009.** Plaguicidas: que establece los requisitos del envase, embalaje y etiquetado de productos grado técnico y para uso agrícola, forestal, pecuario, jardinería, urbano, industrial y doméstico.
- Pérez S;** García R; Pérez C; Rodríguez R; Zavala M. **2009.** Anti-inflammatory Properties of *Salvia connivens*, Medicinal and aromatic plant science and biotechnology. 3 (1): 52-55.
- Pérez S;** Zavala D; Hernández A; Mendoza A; Pérez C; Sánchez H. **2013.** Antidiarrheal activity of 19-Deoxyicetexone isolated from *Salvia ballotiflora Benth* in mice and rats. *Molecules*. 18: 8895-8905.
- Pino Perez O;** Jorge Lazo F. **2010.** Ensayo de *Artemia*: Útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Revista de Protección Vegetal*. 22 (1): 34-43
- Prakash, A.,** and J. Rao. **1997.** Botanical pesticides in agriculture. CRC Press, Baton Rouge, Florida, USA. 461.
- Ramírez P;** **Mendoza A.** **2008.** Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México. Primera edición. Mexico: Secretaría de medio ambiente y recursos naturales, SEMARNAT. Instituto nacional de ecología INE.
- Regnault-Roger C;** Ribodeau M; Hamraoui A; Bateau I; Blanchard P; Gil-Munoz M. I; Barberan F. T. **2004.** Polyphenolic compounds of Mediterranean Lamiaceae and investigation of orientational effects on *Acanthoscelides obtectus* (Say). *Journal of Stored Products Research* 40: 395–408.
- Spence R;** Gerlach G; Lawrence C; Smith C. **2008** The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*. 83:13–34.
- Stalin S. I;** Kiruba S; Sam Manohar Das S. **2008.** A Comparative Study on the Toxicity of a Synthetic Pyrethroid, Deltamethrin and a Neem Based Pesticide, Azadirachtin to *Poecilia reticulata* Peters 1859 (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 8: 01-05.
- Souguir S;** Chaieb I; Sheikh Z; Laarif A. **2013.** Insecticidal activities of essential oils from some cultivated aromatic plants against *Spodoptera littoralis* (boisd). *Journal of Plant Protection Research*. 53(4): 388-391.

- Swarnalatha** Y; Jerrine Joseph I. S; Tippabathani Jayakrishna. **2017**. Rosmarinic acid plays a protective role in the embryogenesis of zebrafish exposed to food colours through its influence on aurora kinase A level. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 89: 1166–1171.
- Thacker** J.R.M. **2002** An introduction to arthropod pest control. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Tiwari** S; Singh A. **2003**. Control of common freshwater predator fish, *Channa punctatus*, through *Nerium indicum* leaf extracts. *Chemosphere* 53:865–875
- USEPA** **2002**. United States Environmental Protection Agency. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to Freshwater and marine organisms, 5th edition.
- Volodin** V. M. **1973**. Influence of phenol on the embryonal development of fish. Tr. Inst. Biol. Vnutr. Vod., Akad. Nauk SSSR. 24(27): 67-71. [en ruso].
- Walker** J. B; Sytsma K. J; Treutlein J; Wink J. **2004**. *Salvia* (Lamiaceae) is not monophyletic: Implications for the systematics, radiation and ecological specialization of *Salvia* and tribe Mentheae. *American Journal of Botany* 91: 1115-1125.
- Zhang** H. B; Luo Y. M; Zhao Q. G; Wong M.H; Zhang G.L. **2006**. Residues of organochlorine pesticides in Hong Kong soils. *Chemosphere*. 63(4):633-41.