



**Toxicidad aguda del extracto metanólico de *Heterotheca inuloides* sobre *Poecilia reticulata***

**Acute toxicity of the methanolic extract of *Heterotheca inuloides* on *Poecilia reticulata***

Lina Guerrero-López<sup>1\*</sup>, Miguel Angel Ramos-López<sup>1</sup> José Luis Rodríguez-Chávez<sup>2</sup>, Carmen Monroy-Dosta<sup>3</sup>, Juan Campos-Guillén<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Cerro de las campanas S/N, Col. Las campanas, Querétaro, 76010, México.

<sup>2</sup> Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, Ciudad de México, México.

<sup>3</sup> Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Departamento El Hombre y su Ambiente, Calzada del Hueso No. 1100, Col. Villa Quietud, 04960 Ciudad de México, México.

\*Autor de correspondencia: [linaguerrerolopez@gmail.com](mailto:linaguerrerolopez@gmail.com)

Recibido 22 de abril de 2020; aceptado 21 de junio de 2020

**RESUMEN**

El uso de plaguicidas sintéticos causa 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 como alternativa ecológica debido a que producen un impacto ambiental menor. En este sentido, la especie conocida como árnica mexicana *Heterotheca inuloides* (Cass., 1827) (Asteraceae) es una planta usada en la medicina tradicional por sus beneficios terapéuticos. Además, se ha reportado que presenta propiedades insecticidas. Sin embargo, sus efectos toxicológicos y ecotoxicológicos han sido poco estudiados y la información es escasa. Por ello, se evaluó la toxicidad

aguda del extracto metanólico de las partes aéreas de *H. inuloides* utilizando pez guppy *Poecilia reticulata* (Peters, 1859) por ser un organismo bioindicador ambiental debido a que presenta alta sensibilidad a diversos compuestos tóxicos en ambiente acuático. En el presente trabajo se demostró que el extracto clasifica como mínimamente tóxico para peces debido a las concentraciones letales medias (CL<sub>50</sub>) de 224 y 154 mg L<sup>-1</sup> para machos y hembras respectivamente; lo cual indica que el extracto metanólico podría ser un plaguicida botánico que cumple con las características de seguridad ecológica.

**PALABRAS CLAVE:** plaguicidas botánicos, árnica mexicana, concentración letal media.

#### ABSTRACT

The use of synthetic pesticides causes contamination due to their persistence and bioaccumulation characteristics in the trophic network. Among the alternatives that exist to the use of these inputs are the plant extracts that are used as an ecological alternative since they produce a minor environmental impact. In this sense, the species known as Mexican Arnica *Heterotheca inuloides* (Cass., 1827) (Asteraceae) is a plant used in traditional medicine for its therapeutic benefits. In addition, it has been reported to have insecticidal properties. However, its toxicological and ecotoxicological effects have been poorly studied and information is scarce. Therefore, the acute toxicity of the methanolic extract of the aerial parts of *H. inuloides* was evaluated using guppy fish *Poecilia reticulata* (Peters, 1859) because it is an environmental bioindicator organism due to its high sensitivity to various toxic compounds in an aquatic environment. In the present work it was shown that the extract is classified as minimally toxic to fish due to the mean lethal concentrations (LC<sub>50</sub>) of 224 and 154 mg L<sup>-1</sup> for males and females respectively; this indicates that the methanolic extract could be a botanical pesticide that meets the ecological safety characteristics.

**KEY WORDS:** botanical pesticide, Mexican arnica, median lethal concentration.

## INTRODUCCIÓN

El uso intensivo y extensivo de plaguicidas químicos sintéticos ha causado daños a la salud por la manipulación directa de los mismos por los trabajadores agrícolas y afecciones a la salud por la ingesta de productos con residuos de plaguicida. Además, causan efectos adversos a los organismos no blanco, es decir, afecta a las especies que cohabitan un mismo ecosistema en donde se encuentra la plaga a manejar; también, este tipo de compuestos son bioacumulables y biomagnificables en la red trófica debido a su característica de persistencia (AnvariFar et al., 2018; Sabarwal et al., 2018).

Una alternativa para una agricultura sostenible es el uso de plaguicidas botánicos puesto que tienen un impacto ambiental menor al ser biodegradables (Vázquez et al., 2017). Este efecto plaguicida propio de algunas plantas se ha utilizado tradicionalmente en los campos agrícolas (Paes et al., 2012); entre la diversidad existente, en la familia Asteraceae se pueden encontrar especies reportadas con actividad insecticida (Romero, 2000; Villavicencio-Nieto et al., 2010; Del Vitto y Petenatti 2015),

Los extractos de plantas pueden contener

diferentes tipos de metabolitos secundarios que confieren las características de plaguicida (Medeiros- Neves, 2018); en los extractos metanólicos se pueden encontrar alcaloides, compuestos fenólicos y terpenos (Bouimeja et al., 2019).

El árnica mexicana *Heterotheca inuloides* (Cass., 1827) ha presentado acción terapéutica además de acción insecticida. Sin embargo, aunque los plaguicidas botánicos son utilizados bajo el concepto de “amigables con el ambiente”, pueden presentar efectos adversos contra organismos no blanco (Aguirre- Naranjo et al., 2016). En vista de esto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto toxicológico del extracto metanólico de *Heterotheca inuloides* sobre un modelo hipersensible como lo es el pez guppy, *Poecilia reticulata* (Peters, 1859) siendo al mismo tiempo un representante de organismos no blanco.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Origen y aclimatación de peces

Los peces fueron obtenidos del Laboratorio de Análisis Químico de Alimento Vivo de la Universidad

Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. La aclimatación se realizó en contenedores de 40 L de agua semidura reconstituida por 15 días previo a los bioensayos según OCDE (1992). Se alimentaron *Ad libitum* con hojuelas para peces Lomas hasta 12 h antes del ensayo. La temperatura del agua fue de  $20.7 \pm 1.2$  °C y la temperatura ambiente  $23.4 \pm 1.8$  °C. El oxígeno disuelto se mantuvo en  $5.1 \text{ mg L}^{-1}$  (60.2%).

#### Material vegetal y obtención de extracto

Se colectaron las partes aéreas de *Heterotheca inuloides* en zonas boscosas de Atlixco, Puebla. El material vegetal fue autenticado por M. en C. María Edelmira Linares-Mazari y se depositó en el Jardín Botánico de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) con número de colecta 2823. Los extractos se prepararon macerando el material seco y molido en acetona o metanol destilados. La maceración se realizó tres veces por 24 h a temperatura ambiente. El sobrenadante de maceración se filtró, se recogió y se evaporó hasta sequedad (Coballase-Urrutia et al., 2010).

#### Bioensayos toxicológicos

Se trabajó con individuos machos y hembras de *Poecilia reticulata* tomados 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 (Li et al., 2019). Se evaluaron concentraciones de 500, 250, 125, 62.5 y  $31.2 \text{ mg L}^{-1}$  con agua como disolvente en vasos de precipitado de

250 mL, el blanco constó de agua solamente. 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 horas a partir de la exposición. Con los datos arrojados se calculó la concentración letal media ( $CL_{50}$ ) así como el tiempo letal medio ( $TL_{50}$ ) usando el software estadístico Minitab. Además se realizaron pruebas de Tukey para comparación de las mortalidades entre las distintas concentraciones para cada bioensayo.

## RESULTADOS

En el presente trabajo se pudo observar en la Tabla 1 que, en la exposición al extracto metanólico de las partes aéreas de árnica mexicana en los adultos macho de *Poecilia reticulata*, la única concentración que mostró mortalidad acumulada a 96 h fue a  $500 \text{ mg L}^{-1}$ , alcanzando 100 % de mortalidad. A  $250 \text{ mg L}^{-1}$

se reportó que el efecto fue estadísticamente igual a la mortalidad en la concentración mayor, esto quiere decir que el efecto incrementó pero no lo suficiente para ser significativamente diferente al control. Por otra parte, se pudo observar que en la concentración más alta el TL<sub>50</sub> fue corto con apenas 1.32 h, es decir que en este tiempo estimado se dio la mortalidad del 50 % de la

población de peces. Para 250 mg L<sup>-1</sup>, el TL<sub>50</sub> aumentó a casi cuatro días (93.5 h).

La concentración letal media CL<sub>50</sub> fue de 223.97 mg L<sup>-1</sup>. De acuerdo a la clasificación de Plaguicidas y animales acuáticos: una guía para reducir los impactos en sistemas acuáticos, que se muestra en la Tabla 3 de Helfrich *et al.* (2009), el extracto contra machos fue mínimamente tóxico.

**Tabla 1.** Actividad toxicológica del extracto metanólico de *Heterotheca inuloides* sobre adultos machos de *Poecilia reticulata*.

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

Resultados son el promedio de 9 determinaciones ± error estándar de la media. Se realizó ANOVA de una vía y prueba de Tukey, letras diferentes significan tratamientos estadísticamente diferentes. P<0.000. CL<sub>50</sub> Concentración letal media. (IC fiducial de 95% inferior de 148.728 mg L<sup>-1</sup> y superior de 364.322 mg L<sup>-1</sup>). TL<sub>50</sub> tiempo letal medio.

La mortalidad acumulada a 96 h del extracto metanólico de las partes aéreas de *H. inuloides* en pez guppy hembras, representado en la Tabla 2, llegó al 100% en la concentración más alta del bioensayo: 500 mg L<sup>-1</sup>. Aunque se registraron individuos muertos en el control y en los tratamientos de 31.2 y 62.5 mg L<sup>-1</sup>, la

mortalidad a estos niveles pudo no deberse al efecto del extracto, más bien a la susceptibilidad de los individuos similar a lo que sucedió en el control.

El TL<sub>50</sub> en 500 mg L<sup>-1</sup> fue de apenas 30 minutos (0.5 h); a la mitad de esta, es decir, 250 mg L<sup>-1</sup> el TL<sub>50</sub> pasó a ser de casi dos días (44.91 h).

**Tabla 2.** Actividad toxicológica del extracto metanólico de *Heterotheca inuloides* sobre adultos hembras de *Poecilia reticulata*.

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

Resultados son el promedio de 9 determinaciones  $\pm$  error estándar de la media. Se realizó ANOVA de una vía y prueba de Tukey, letras diferentes significan tratamientos estadísticamente diferentes.  $P=0.011$ . CL<sub>50</sub> Concentración letal media. (IC fiducial de 95% inferior de 73.542 mg L<sup>-1</sup> y superior de 269.985 mg L<sup>-1</sup>). TL<sub>50</sub> tiempo letal medio.

La CL<sub>50</sub> acumulada a 96 h para las hembras fue de 153.74 mg L<sup>-1</sup>, 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). Por consiguiente, el extracto metanólico puede considerarse como ecológicamente seguro de aplicar como plaguicida botánico.

**Tabla 3.** Categorías toxicológicas para productos agrícolas en peces (Helfrich *et al.*, 2009).

Clase de toxicidad	CL <sub>50-96 h</sub> (mg L <sup>-1</sup> )
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

De Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos de las Naciones Unidas (ONU, 2019), un producto debe tener una categoría como Sustancia peligrosa para el medio ambiente acuático con peligro a corto plazo (agudo) si reporta CL<sub>50</sub> a 96h para peces  $\leq 100$  mg L<sup>-1</sup>. En el presente trabajo se encontraron CL<sub>50</sub> mayores a lo indicado.

Se requieren más estudios como una evaluación más completa de riesgo a diferentes comunidades de organismos no blanco de diferentes niveles tróficos a fin de garantizar una incorporación más segura de los productos en el manejo de plagas agrícola. Así también de extractos de diferente polaridad y de los compuestos

aislados en el pez guppy.

## CONCLUSIONES

El extracto metanólico de las partes aéreas de *Heterotheca inuloides* mostró actividad tóxica para machos y hembras con  $CL_{50}$  de 223.97 y 153.74 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Ambos clasificaron dentro de la categoría mínimamente tóxica para peces.

Esto permite decir que el extracto puede ser aplicado como insecticida botánico relativamente seguro para organismos acuáticos vertebrados

## BIBLIOGRAFÍA

Aguirre-Naranjo, M., Aguirre, S. M., Isaza M. J. H., Colmenares, D. A. J., Ocampo, C. D. M., Jaramillo, S. M. T., y Galvis, G. J. H. (2016). Actividad ictiotóxica de extractos de dos especies colombianas del género *Meriana* Swartz (melastomataceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(2): 203-214.

AnvariFar, H., Amirkolaie, A. K., Jalali, A. M., Miandare, H. K., Sayed, A. E. D. H., Üçüncü, S., Ouraji, H., Ceci, M. y 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.

Bouimeja, B., Yetongnon, K. H., Touloun, O., Berrougui, H., Laaradia, M. A., Ouanaimi, F., Chait, A. y Boumezzough, A. (2019). Studies on antivenom activity of *Lactuca serriola* methanolic extract against *Buthus atlantis* scorpion venom by in vivo methods. *South African Journal of Botany*, 125: 270-279.

Coballase-Urrutia, E., Pedraza-Chaverri, J., Camacho- Carranza, R., Cárdenas-Rodríguez, N., Huerta- Gertrudis, B., Medina-Campos, O. N., Mendoza-Cruz, M., Delgado-Lamas, G., Espinosa-Aguirre, J. J. (2010). Antioxidant activity of *Heterotheca inuloides* extracts and of some of its metabolites. *Toxicology*, 276(1): 41–48

Del Vitto, L. A. y Petenatti, E. M. (2015). Asteráceas de importancia económica y ambiental Segunda parte: Otras plantas útiles y nocivas. *Multequina*, 24: 47–74.

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

- [https://www.pubs.ext.vt.edu/content/dam/pubs\\_ext\\_vt\\_edu/420/420-013/420-013\\_pdf.pdf](https://www.pubs.ext.vt.edu/content/dam/pubs_ext_vt_edu/420/420-013/420-013_pdf.pdf); fecha de consulta: 27-II-2020.
- Medeiros-Neves, B., Teixeira, H. F., y von Poser, G. L. (2018). The genus *Pterocaulon* (Asteraceae) – A review on traditional medicinal uses, chemical constituents and biological properties. *Journal of Ethnopharmacology*, 224: 451–464.
- 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.
- OECD Organisation for Economic Co-operation and Development. (1992). Fish, acute toxicity test. *Guideline for the Testing of Chemicals*, 1–9.
- Paes, J. L., Faroni, L. R. D. A., Dhingra, O. D., Cecon, P. R., Silva, T. A. (2012). Insecticidal fumigant action of mustard essential oil against *Sitophilus zeamais* in maize grains. *Crop Protection*, 34: 56–58.
- Romero, J. y Johnson, C. D. (2000). Revision of the genus *Zabrotes* Horn of Mexico (Coleoptera: Bruchidae: Amblycerinae). *Transactions of the American Entomological Society*, 221-274.
- Sabarwal, A., Kumar, K. y Singh, R. P. (2018). Hazardous effects of chemical pesticides on human health– Cancer and other associated disorders. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 63: 103–114.
- Vásquez, L., Marzin, J., y Rodríguez González, N. (2017). Políticas públicas y transición hacia la agricultura sostenible sobre bases agroecológicas en Cuba: 189-232
- Villavicencio-Nieto M. A., Pérez-Escandón B. E. y Gordillo-Martínez A. J. (2010). Plantas tradicionalmente usadas como plaguicidas en el Estado de Hidalgo, México. *Polibotánica*, 30: 193-238