



Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas

ISSN: 1870-0195

rmcf@afmac.org.mx

Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C.

México

Aoki M., Kazuko; Encarnación-Dimayuga, Rosalba; Cortés A., Alma Rosa
Evaluación toxicológica de productos naturales usando microtécnicas
Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, vol. 36, núm. 1, enero-marzo, 2005, pp. 11-17
Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C.
Distrito Federal, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57936103>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Trabajo científico

Evaluación toxicológica de productos naturales usando microtécnicas

Toxicological evaluation of natural products using microtechnics

Kazuko Aoki M.¹, Rosalba Encarnación-Dimayuga², Alma Rosa Cortés A¹.

¹Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana- Xochimilco

²Departamento de Agronomía, Universidad Autónoma de Baja California Sur

RESUMEN: dado que la toxicidad de las plantas medicinales usadas en la medicina tradicional necesita ser estudiada, se determinaron los efectos tóxicos de diferentes extractos obtenidos de cuatro productos naturales de Baja California Sur (México): *Lepechinia hastata* (Lamiaceae), *Haplopappus sonorensis* (Asteraceae), *Lophocereus schottii* (Cactaceae) y un animal marino *Lophogorgia rigida* (Gorgonaceae), por medio de microtécnicas, usando 2 microorganismos invertebrados: *Daphnia magna* (crustáceo) y *Panagrellus redivivus* (nematodo). Los resultados se compararon con la toxicidad determinada en ratones CFW, concluyendo que los micro-bioensayos pueden servir para explorar el grado de afectación o toxicidad de las muestras, o como una prueba adicional a las realizadas con los métodos clásicos, ya que los resultados analizados muestran que existe cierto grado de correlación entre la toxicidad determinada usando microtécnicas con respecto a la determinada en ratones CFW.

ABSTRACT: considering that the toxicity of many medicinal plants used in the traditional medicine needs to be studied in a cheap and quick way, the toxic effect of different extracts from four natural products from Baja California Sur (Mexico): *Lepechinia hastata* (Lamiaceae), *Haplopappus sonorensis* (Asteraceae), *Lophocereus schottii* (Cactaceae) and the marine animal *Lophogorgia rigida* (Gorgonaceae) were tested by two microtechnics bioassay using two microorganisms, the crustacean *Daphnia magna* and the nematode *Panagrellus redivivus*, which toxicity were compared with in CFW mouse. These bioassays help in prescreening studies and as additional test, seeing that it perceives some correlation of the toxic effect obtained using invertebrates and mammals.

Palabras clave: Microtécnicas, evaluación toxicológica, *Daphnia magna*, *Panagrellus redivivus*, ratones, extractos orgánicos, productos naturales.

Key words: Microtechnics, toxicological evaluation, *Daphnia magna*, *Panagrellus redivivus*, mice, organic extracts, natural products.

Introducción

Durante siglos, los humanos nos hemos auxiliado de la naturaleza para satisfacer las necesidades básicas como: vestimenta, uso de fertilizantes, condimentos, fragancias, alimentación y medicamentos. Las plantas han constituido la base para el desarrollo de la medicina tradicional aplicada desde hace miles de años en países como México.

El uso de plantas y de ciertos animales marinos en la práctica popular para la cura de enfermedades en Baja California Sur ha sido extensamente documentada y publicada en el año 1992 por Encarnación¹, y han jugado un papel importante en el Sistema de Atención de la Salud. Recientemente, su uso ha ido incre-

Correspondencia:

Alma Rosa Cortés A.
Departamento de Sistemas Biológicos,
Universidad Autónoma Metropolitana- Xochimilco,
Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud,
CP 04960, México, D.F.
Teléfono: 5483-7213 Fax: 54837237
Correo electrónico: cortesar@cueyatl.uam.mx

Fecha de recepción: 16 de diciembre de 2003

Fecha de aceptación: 27 de junio de 2004

mentándose tanto en los países en proceso de desarrollo como en aquellos desarrollados, por lo que ha surgido el interés y la urgencia por determinar tanto su eficacia real como su seguridad e inocuidad cuando son aplicados en la medicina tradicional de diferentes comunidades, por lo tanto, es importante llevar a cabo el estudio toxicológico de estos recursos.

Estudios publicados en décadas recientes, sugieren que un primer rastreo toxicológico pudiera llevarse a cabo con pruebas de toxicidad agudas empleando invertebrados², lo cual puede ser útil como un estudio preliminar en la evaluación de la toxicidad de nuevos y diferentes químicos en mamíferos. La mayor ventaja de aplicar estos bioensayos preliminares está relacionada con la reducción del número de mamíferos que normalmente son requeridos en la determinación de la toxicidad aguda empleando ratas o ratones, además de ser, por lo mismo, económico.

Por lo tanto, con base en lo antes expuesto es recomendable considerar el uso de invertebrados como *Daphnia magna*²⁻⁵ y micro-lombrices como *Panagrellus redivivus*^{6,7} en pruebas preliminares de toxicidad para posteriormente realizar los bioensayos finales de toxicidad con un número menor de mamíferos.

El uso de estos micrométodos toxicológicos con invertebrados representaría una reducción significativa en costo, tiempo, espacio y número de mamíferos como se mencionó anteriormente, por lo tanto, debería de implementarse también para propósitos de regulación de medicamentos.

Considerando que en algunos estados de la República Mexicana, como Baja California Sur (B.C.S.), se siguen utilizando tanto plantas como ciertos organismos marinos en la medicina tradicional, nos propusimos en este trabajo evaluar la toxicidad de algunas plantas medicinales: *Haplopappus sonorensis*, *Lepechinia hastata*, *Lophocereus schottii* y un organismo marino *Lophogorgia rigida* utilizando el crustáceo *Daphnia magna*, el nemátodo *Panagrellus rigida* y ratones CFW.

Las especies anteriores fueron seleccionadas debido a que son plantas popularmente empleadas en la medicina tradicional de B.C.S.,¹ que al someterse a pruebas de selección para evaluar su efecto farmacológico, mostraron actividad antimicrobiana y citotóxica,⁸⁻¹¹ por lo que es necesario determinar sus rangos de toxicidad para poder dar una mejor orientación sobre su empleo. Además, de ampliar el estudio de estos recursos que ha aportado interesantes resultados tanto farmacológicos como fitoquímicos publicados recientemente.

H. sonorensis es una planta medicinal cuyo té preparado con sus ramas hervida en agua, es tomado para la fiebre, espasmo, escalofríos, postemillas, tos, gripa y de la cual se han reportado la presencia de varias flavonas con actividad antimicrobiana;^{8,9} *L. hastata*, es utilizada popularmente como

remedio contra infecciones vaginales (no urinarias) contiene como compuesto mayoritarios carnosol, β -hidroxi-carnosol y metabolitos de estructura diterpenoide con una potente actividad antimicrobiana,¹⁰⁻¹² además de ácido ursólico cuya actividad antiinflamatoria ha sido reportada;¹³ *L. schottii*, conocida como senita o garambullo es empleado comúnmente para la diabetes, úlceras, llagas, malestares estomacales¹ y fue seleccionada por contener compuestos bioactivos como una tetrahidroisoquinolina denominada lofocina que presenta actividad anticancerígena;¹⁴⁻¹⁶ y el coral marino *L. rigida*, fuente de una potente neurotoxina, la lofotoxina, que tiene la propiedad de bloquear la trasmisión neuromuscular.^{17,18}

Material y métodos

Plantas

Se utilizaron 3 plantas medicinales de uso popular o común en la medicina tradicional de Baja California Sur: *Haplopappus sonorensis* (Asteraceae), *Lepechinia hastata* (Lamiaceae) y *Lophocereus schottii* (Cactaceae). *H. sonorensis* fue colectada en Cabo Pulmo, B.C.S., *L. hastata* en la Sierra de la Laguna, B.C.S. y *L. schottii* en La Ventana, B.C.S. Las plantas fueron clasificadas e identificadas por el M. en C. Jorge Agúndez Espinosa del Laboratorio Fanerogámico de la Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS) y sus respectivas muestras de referencia se encuentran depositadas en el Herbario Nacional del Instituto de Biología de la UNAM y en el Herbario Fanerogámico de la UABCS.

Animales

El coral blando *Lophogorgia rigida* (Gorgonaceae) fue colectado en Cabo Pulmo, B.C.S. e identificado por Martín Sánchez del Departamento de Biología Marina de la misma Universidad, de acuerdo a Verril.^{18,19}

Su muestra de referencia se encuentra depositado en el Laboratorio de Farmacognosia del Departamento de Agronomía, UABCS, México.

Preparación de los extractos

Dirigido hacia la búsqueda de los extractos conteniendo diferentes componentes, se realizó la extracción de las plantas con disolventes de distinta polaridad, comenzando las extracciones sucesivas con éter de petróleo que además de ser un solvente que ayuda a desgrasar y extraer algunos compuestos de naturaleza lipídica, favorece el que en las subsecuentes extracciones, con cloruro de metileno, etanol o cloroformo, se facilite la obtención de compuestos de diferente naturaleza.

La planta *H. sonorensis* (46T) fue sometida a extracción exhaustiva con éter de petróleo, CH_2Cl_2 y EtOH en un aparato Soxhlet, los extractos se identificaron como 46TF etéreo (Hs1), CH_2Cl_2 (Hs2) y EtOH (Hs3) respectivamente. El extracto crudo de esta planta, designado como 46TE EtOH (Hs4) se obtuvo macerando 10 gramos de material seco con 100 mL x 2 de EtOH.

L. hastata (65T) también fue exhaustivamente extraída en Soxhlet con éter de petróleo (*Lb1*), CHCl_3 (*Lb2*) y EtOH (*Lb3*), se filtraron y los solventes se evaporaron a presión reducida, obteniéndose los respectivos extractos denominados 65TF. *L. schottii* (443T), fue extraída por maceración con EtOH (10 g/100mLx² y el extracto crudo obtenido se identificó como 443T EtOH (*Ls1*) y finalmente, *L. rigida* (WF991) fue sometida a extracción sucesiva por maceración con CH_2Cl_2 y EtOH, dando los extractos respectivos: WF991F CH_2Cl_2 (*Lr1*) y WF991F EtOH (*Lr2*), los cuales se concentraron posteriormente en rotavapor a 40 °C, obteniéndose el material libre de solvente.

Animales de experimentación y evaluación toxicológica

El crustáceo, *Daphnia magna* se usó como organismo de prueba para investigar la toxicidad aguda. El medio de incubación utilizado para estos experimentos fue agua reconstituida con una dureza de 160 mg/L a 180 mg/L de CaCO_3 , pH entre 7.5 a 8.5, temperatura 20 °C \pm 2 °C, fotoperiodo 16 horas luz - 8 horas oscuridad, a una concentración de oxígeno mayor de 3 mg/L^{2, 5, 20}. Todos los animales usados para esta serie de experimentos fueron neonatos de hasta 24 horas de nacidos, los cuales se incubaron usando 5 diferentes diluciones de los extractos, 6.25, 12.5, 25, 50 y 100% de la concentración seleccionada para cada muestra según su actividad. Se calcularon los valores de CL_{50} a las 24 y 48 horas.

El otro animal de experimentación utilizado para este estudio fue un nemátodo silvestre, *Panagrellus redivivus*, cultivado en el laboratorio en condiciones estándares sobre un medio de harina de trigo y mantenido en placas de petri en medio M9-Y, alimentados cada 4-5 días con una suspensión de levadura.

Los extractos probados se disolvieron previamente en una cantidad mínima de dimetilsulfóxido y posteriormente en el medio M9-Y (1:100).

Para las pruebas de toxicidad se seleccionaron los nemátodos en la segunda etapa juvenil (J_2) en el medio M9-Y. Para la evaluación del efecto letal, los animales se dejaron crecer en un medio conteniendo 250 μg de extracto/mL, durante 96 horas a 22 °C, después de la cual se cuantificó el número de sobrevivientes en cada caso. Para el efecto subletal, se contó el número de nemátodos que se mantuvieron en las etapas segunda y tercera juvenil (J_2 o J_3) del crecimiento.

El porcentaje de animales que alcanzó la etapa adulta (maduración) y los que se mantuvieron en las diferentes etapas del crecimiento, se determinaron por medición al microscopio, de la longitud de los sobrevivientes^{6,7} y se clasificaron por el tamaño de los nemátodos en cada población experimental.

Ratones

Para los estudios toxicológicos preliminares en mamíferos se usaron ratones, cepa CFW, hembras de 20 a 25 gramos de peso corporal que fueron mantenidos en condiciones ambientales controladas a 18-22 °C con ciclos de luz/oscuridad de 12/12 horas y 5 cambios de aire por hora, alimentadas con dieta balanceada estándar Lab Diet 5P14 para roedor (Purina México S.A. de C.V.) y agua *ad libitum*. Se formaron 10 grupos de 9 ratones cada uno, 3 animales de cada grupo recibieron, por vía oral, dosis de 500, 793 y 1000 mg/kg de los extractos disueltos en agua conteniendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), en un volumen de 200 μL y se mantuvieron en observación durante 7 días, durante los cuales se registraron diariamente su aspecto físico, comportamiento y número de muertes. Los animales testigo recibieron únicamente la misma cantidad del vehículo.²¹ Estas pruebas se llevaron a cabo por duplicado y en algunos casos por triplicado.

Los animales fueron proporcionados por el bioterio local. Los procedimientos para el manejo y sacrificio de los animales cumplieron con los requisitos establecidos en la norma oficial NOM-062-ZOO-1999.

Análisis estadístico

Los resultados de mortalidad de *D. magna*, están expresados en términos de la concentración letal media, que mata el 50% de los organismos (DL_{50}), dichas concentraciones se calcularon mediante regresión logística en el programa SPSS v. 10.0.

El grado de afectación a los ratones se expresa con la mediana de una escala subjetiva gradual de 0 a 10, donde el 0 representa no-alteración y el 10 alteraciones notorias como la depresión severa y la muerte.

La asociación de los resultados en roedores e invertebrados se realizó mediante el coeficiente de correlación de Spearman. Se consideraron como significativos valores de p menores a 0.05.

Resultados y discusión

Como se muestra en la tabla 1, el extracto etanólico de *L. scottii* (*Ls1*) fue el más nocivo para *Daphnia magna*, con un valor de CL_{50} = 9.1 (μmL) a las 48 horas, seguida por los extractos de éter de petróleo de *H. sonorensis* (*Hs1*) con una CL_{50} = 33.9 ($\mu\text{g/mL}$)

y de *L. hastata* (*Lh1*) con una CL_{50} = 78.7 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) a las 48 horas. Sin embargo, según el rango de toxicidad en *D. magna* publicada en el año 2000 por Guilhermino y col.², ninguno de los extractos probados en este estudio puede considerarse tóxico, ya que los valores de CL_{50} obtenidos, se encuentran muy por encima de los considerados tóxicos, por ejemplo: la

concentración letal (CL_{50}) obtenida para *L. scottii* usando *D. magna* (que fue el más afectado) es comparable a los valores reportados por dichos autores para fenol (CL_{50} = 9.1 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)) y ácido acético (CL_{50} = 10.8 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)), mientras que para sustancias consideradas realmente tóxicas como el paratión, la CL_{50} es de 0.0022 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Tabla 1. Toxicidad de los extractos en *Daphnia magna*

Muestra	CL_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$) a las 24 horas	CL_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$) a las 48 horas
<i>H. sonorensis</i> (<i>Hs1</i>)	167.5	33.9*
<i>H. sonorensis</i> (<i>Hs2</i>) ⁺	242.6	103.2
<i>H. sonorensis</i> (<i>Hs3</i>) ⁺	---	602.7*
<i>H. sonorensis</i> (<i>Hs4</i>) ⁺	600.9	98.1
<i>L. hastata</i> (<i>Lh1</i>)	178.3	78.7*
<i>L. hastata</i> (<i>Lh2</i>)	---	169.0*
<i>L. hastata</i> (<i>Lh3</i>)	---	-----
<i>L. schottii</i> (<i>Ls1</i>)	342.9	9.1
<i>L. rigida</i> (<i>Lr1</i>)	---	585.0*
<i>L. rigida</i> (<i>Lr2</i>)	---	112.0*

n = 60 ó *30 por dosis

--- sin efecto a dosis de hasta 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$

* correlación significativa con el grado de afectación de ratones

En la tabla 2 se muestran los resultados de los efectos tóxicos de los extractos probados sobre el nemátodo *Panagrellus redivivus*. En esta prueba, los extractos más nocivos resultaron ser: el extracto etanólico de *L. rigida* (*Lr2*) que inhibió la maduración

del nemátodo en un 16% en estado juvenil J_2 y con el que sobrevivieron únicamente el 56%. Finalmente, la fracción clorofórmica de *L. hastata* (*Lh2*) inhibió la maduración de un 28% de nemátodos juveniles y permitió una sobrevivencia del 97%.

Tabla 2. Toxicidad de los extractos en *Panagrellus redivivus*, a concentración única de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Muestra	Maduración (%)	Sobrevivencia (%)
<i>H. sonorensis</i> (<i>Hs1</i>)	81.2	98
<i>H. sonorensis</i> (<i>Hs2</i>)	75.8*	100
<i>H. sonorensis</i> (<i>Hs3</i>)	80.9*	100
<i>H. sonorensis</i> (<i>Hs4</i>)	75.0*	100
<i>L. hastata</i> (<i>Lh1</i>) ⁺⁺	60.2	97
<i>L. hastata</i> (<i>Lh2</i>) ⁺	28.1*	97
<i>L. hastata</i> (<i>Lh3</i>)	48.2*	96
<i>L. schottii</i> (<i>Ls1</i>)	96.0	100
<i>L. rigida</i> (<i>Lr1</i>)	94.7*	100
<i>L. rigida</i> (<i>Lr2</i>)	16.4*	56

n = 100, *200, **300

* correlación significativa con el grado de afectación de ratones

Respecto al estudio en ratones, algunos de los extractos probados a las dosis administradas de 500 y 793 mg/kg, fueron ligeramente nocivos, ya que, en las primeras 24 y 48 horas de administrados los siguientes extractos: éter de petróleo de *H. sonorensis* (Hs1), éter de petróleo y de cloroformo de *L. hastata* (Lh1 y Lh2) y los extractos etanólicos de *L. scottii* y *L. rigida* (Ls1 y Lr2, respectivamente), les causaron una severa depresión de la cual llegaron a recuperarse completamente al final del experimento. Sin embargo, a la dosis máxima probada de 1000 mg/kg de peso corporal, se murieron algunos animales, en un porcentaje máximo del 20%. Debido a que no fue posible administrar dosis mayores por la baja solubilidad de los extractos, no se determinaron los valores de DL_{50} y el grado de afectación de los ratones se midió subjetivamente en una escala gradual de 0 a 10; donde el aumento en la escala representa un aumento en el daño físico observado en los animales, incluyendo la muerte de los que recibieron la dosis máxima (figura 1).

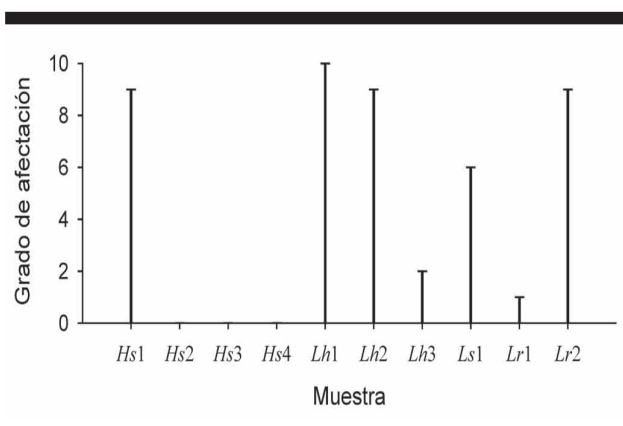


Figura 1. Grado subjetivo de afectación (usando una escala de 0 al 10) que sufren los ratones por administración oral de las diferentes muestras estudiadas. Los resultados muestran la respuesta global de las tres dosis empleadas para cada extracto en al menos 18 animales.

Al comparar los resultados mostrados en las tablas 1 y 2 con el grado de afectación observado en los ratones (Figura 1), se ve que las muestras que fueron nocivas para los invertebrados: Ls1, Hs1 y Lh1 para *Daphnia magna* y Lr2 y Lh2 para *Panagrellus redivivus*, resultaron ser los mismos que afectaron en mayor grado a los mamíferos. Se encontró que existe una correlación significativa en algunas de las muestras, las marcadas con asterisco en las tablas 1 y 2, con lo observado en los ratones; el coeficiente de correlación de Spearman fue de -0.82 ($p = 0.023$) y de -0.73 ($p = 0.031$) para *D. magna* y *P. redivivus*, respectivamente. La correlación mostrada con sólo algunas de las muestras concuerda con varias publicaciones que reportan la asociación únicamente para grupos específicos de compuestos.^{2,22}

Por otro lado, para *P. redivivus*, el extracto etanólico de *L. rigida* (Lr2) fue la muestra que mostró mayor efecto sobre su crecimiento y sobrevivencia como puede observarse en la tabla 2. Los resultados obtenidos con este nemátodo sugieren que tanto la inhibición de su crecimiento como su mortalidad pueden deberse a efectos sobre su material genético, como lo demuestran Samailoff y col.,^{6,7} lo que apoya el uso de esta técnica para identificar mutágenos y realizar ensayos posteriores específicos al respecto.

Finalmente, se puede advertir la necesidad por parte de los investigadores de encontrar métodos más baratos, simples y rápidos para la evaluación farmacológica y toxicológica de nuevos fármacos y compuestos químicos²³⁻²⁷ así como de productos naturales de uso medicinal.²⁸⁻³⁰

Conclusiones

El uso de animales invertebrados para la determinación preliminar de la toxicidad tanto de los extractos de fuentes naturales como de productos sintéticos, ofrece varias ventajas:

Se ha demostrado que se reduce significativamente el costo, tiempo y espacio requerido para la experimentación.

En varios casos existe una correlación significativa entre las pruebas toxicológicas en invertebrados y en mamíferos.

Lo anterior, debería de tomarse como un signo indicador de un posible efecto en mamíferos que hay que considerar para realizar un estudio toxicológico completo, aumentando dosis, tiempo de exposición, experimentos con administración múltiple, etc.

Además, la utilización de diferentes animales invertebrados para los estudios toxicológicos, puede ayudar a dilucidar posibles mecanismos de acción, como lo observado con *P. redivivus*, que parece afectar el material genético, en cuyo caso, se podrían planear experimentos para evaluar efectos teratogénicos.

Referencias Bibliográficas

- Encarnación D.R. 1992. *Medicina Tradicional y Popular de Baja California Sur*, Secretaría de Educación Pública y Artes Gráficas, UABCS, México, p.122.
- Guilhermino L., Diamantino T., Silva M.C. y Soares A.M. 2000. Acute toxicity test with *Daphnia magna*: an alternative to mammals in the prescreening of chemical toxicity? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 46:357-362.

3. Berglind R. y Dave G. 1984. Acute toxicity of chromate, DDT, PCP, TPBS, and zinc to *Daphnia magna* cultured in hard and soft water. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 33:63-68.
4. Deener J.W., Seinen W. y Hermens J.L. 1988. Growth of *Daphnia magna* exposed to mixtures of chemicals with diverse modes of action. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 15:72-77.
5. Hanazato T. 1998. Growth analysis of *Daphnia* early juvenile stages as an alternative method to test the chronic effect of chemicals. *Chemosphere*, 36:1903-1909.
6. Samailoff M.R., Schulz S., Jordan Y., Denich K. y Arnott E. 1980. A rapid simple long-term toxicity assay for aquatic contaminants using the nematode *Panagrellus redivivus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37:1167-1174.
7. Samailoff M.R. 1990. The Nematode toxicity assay using *Panagrellus redivivus*. *Toxicity Assessment*, 5:309-318.
8. Murillo J.I., Encarnación D.R., Malmstrom J., Christophersen C. y Franzblau S.G. 2003. Antimycobacterial flavones from *Haplopappus sonorensis*. *Fitoterapia*, 74:226-230.
9. Murillo-Alvarez J.I., Encarnación D.R. y Franzblau S.G. 2001. Antimicrobial and cytotoxic activity of some medicinal plants from Baja California Sur (México). *Pharmaceutical Biology*, 39:445-449.
10. Encarnación D.R., García K.S., Nielsen P.H. y Christophersen C. 1991. Traditional medicine of Baja California Sur (México) III. Carnosol: a diterpene antibiotic from *Lepechinia hastata*. *Journal of Ethnopharmacology*, 31:43-48.
11. Encarnación D.R., Almada G. y Virgen M. 1998. Minimum antimicrobial inhibitory concentration of carnosol and of the ethanol extract from *Lepechinia hastata*. *Phytomedicine*, 5:301-305.
12. Bruno M., Savona G., Piazzi F., Torre M.C. de la, Rodríguez B. y Marlier M. 1991. Abietane diterpenoids from *Lepechinia meyeri* and *Lepechinia hastata*. *Phytochemistry*, 30:2339-2343.
13. Ringbom, T., Segura, L., Noreen, Y., Perera, P. y Bohlin, L. 1998. Ursolic acid from *Plantago major*, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 catalyzed prostaglandin biosynthesis. *Journal of Natural Products*, 61:1212-1215.
14. Kircher H.W. 1969. The distribution of sterols, alkaloids and fatty acids in senita cactus, *Lophocereus schottii*, over its range in Sonora, Mexico. *Phytochemistry*, 8:1481-1488.
15. West L.G., Mc Laughlin J.L. y Earle W.H. 1975. Cactus alkaloids. Part XXV. Pilocereine from *Lophocereus schottii* formae monstrosus and mieckleyanus. *Phytochemistry*, 14:291-292.
16. Wani M.C., Thompson J.B., Taylor H.L., Wall M.E., Miller R.W. y Mc Phail A.T. 1980. X-ray crystal and molecular structure of the racemic dimeric tetrahydroisoquinoline alkaloid lophocine, probably an artifact, from *Lophocereus schottii*. *Journal of Chemical Research-S*, (1):15.
17. Atchinson W.D., Narahashi T. y Vogel S.M. 1984. Endplate blocking actions of lophotoxin. *British Journal of Pharmacology*, 82:667-672.
18. Encarnación D.R., Aoki M.K. y Cortés A.R. 1994. Effect of marine organism extracts on smooth muscle spontaneous contractility. *International Journal of Pharmacognosy*, 32:320-329.
19. Verril A.E. 1968. Review of the corals and polyps of the west coast of America. *Transaction of the Connecticut Academic of Art and Science*, 1(6):337-567.
20. SECOFI, NMX-AA-087-1995-SCFI. 1995. Norma mexicana para análisis de agua-Evaluación de toxicidad aguda con *Daphnia magna* Straus (Crustacea-Cladocera)-Método de prueba, México, Secretaría de Comercio y Fomento Industrial, p. 4-24.
21. Romero A., James G., Shibayama M., Aoki K. y Jiménez L. 2003. Toxicidad crónica en ratones del herbicida Dicamba y su derivado 2-metoxi-3,6-diclorobenzaldoxima. *Revista de la Sociedad Química de México*, 47:77-80.
22. Kaiser K.L. 1985. Correlation of metal ion toxicities to mice. *Science of the Total Environment*, 46:113-119.
23. Villegas N.A., Rosas L.E. y Reyes J.L. 2003. The heart of *Daphnia magna*: effects of four cardioactive drugs. *Comparative Biochemistry & Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 136:127-134.
24. Boyd W.A. y Williams P.L. 2003. Comparison of the sensitivity of three nematode species to copper and their utility in aquatic and soil toxicity tests. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22:2768-2774.
25. Chen J., Yu H., Liu Y., Jiang W., Jiang J., Zhang J. y Hua Z. 2004. Ecotoxicological evaluation of 4-aminobiphenyl using a test battery. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 58:104-109.
26. Davoren M. y Fogarty A.M. 2004. A test battery for the ecotoxicological evaluation of the agri-chemical Environ. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, (en prensa).

27. Von der Ohe P.C. y Liess M. 2004. Relative sensitivity distribution of aquatic invertebrates to organic and metal compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23:150-156.

28. Reguero M.T., Arteaga L., Rico C. y Torres G. 1998. Antimalarial activity and toxicity of *Abuta grandifolia*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 29:10-12.

29. García-Mateos R., Soto H.M, Martínez y V.M. 2000. Toxicidad de los extractos de las semillas de *Erythryna americana*. *Ciencia Ergosum*, 7:133-137.

30. Thomas F.L. y Gerd L. 2003. Cytotoxic and antitumoral activities of ethanolic extract of salt marsh plants from the lower saxonian wadden sea, Southern North sea. *Pharmaceutical Biology*, 41:293-300.

Agradecimientos

Los autores agradecen a CONACyT-SIMAC (Ref. 20000-106006) por el apoyo brindado para la realización de esta investigación, a las Biol. Sara Ramírez, Isabel Romero e I.B.Q. Jesús Iván Murillo por la asistencia técnica.