

Estudio fitotoxicológico preliminar de diez especies vegetales utilizadas en medicina tradicional

Carmen Lilia Gracia de G.*¹, Maritza Beltrán F.* y Edwar C. Martínez*

Resumen

Se realizó un análisis fitoquímico preliminar y un estudio de la letalidad sobre larvas de *A. salina* y toxicidad en *Daphnia magna*, de doce extractos etanólicos obtenidos de diez plantas utilizadas por algunas comunidades indígenas y campesinas de Colombia. Se encontró que todas poseen varios grupos de metabolitos secundarios y que la mayoría de los extractos, presentaron una alta toxicidad frente a los organismos de prueba, evidenciándose de esta forma la actividad biológica de las especies estudiadas y la posible correlación de las mismas con su uso en la medicina tradicional.

Palabras clave: Análisis fitoquímico preliminar – *Artemia salina* – *Daphnia magna*.

Summary

Phytotoxicological preliminary study of ten vegetal species employed in traditional medicine

It was accomplished a Preliminary phytochemicals screening and a study of the *Artemia salina* (brine shrimp) lethality as well as *Daphnia magna* toxicity of twelve ethanolic extracts obtained of ten plants used by some indigenous communities and peasants from Colombia. It was found that all possess several groups of secondary metabolites and most of the extracts, presented a high toxicity as compared to the test organisms, being evidenced in this way the biological activity of the studied species and the possible relation of the same with its use in the traditional medicine.

Key words: Phytochemical screening – *Artemia salina* – *Daphnia magna*.

Introducción

El éxito de cualquier sistema de salud depende de la disponibilidad y el uso adecuado de los medicamentos, las plantas medicinales juegan un papel clave en la salud mundial. Cerca de las tres cuartas partes de la población mundial que habita en los países en vía de desarrollo, utilizan plantas medicinales en la atención primaria de salud. Con relación a lo anterior la OMS en la conferencia de Alma-Ata, sobre cuidados en

salud primaria recomienda a los gobiernos dar prioridad a la utilización de la medicina tradicional, incorporando preparaciones de plantas medicinales dentro de sus políticas y legislaciones nacionales (1), que permitan enfrentar las necesidades básicas de salud de la población y promover el desarrollo económico mediante la creación de industrias nacionales.

Puede asegurarse que la mayor parte de los recursos útiles para afrontar las necesidades

Recibido para evaluación: octubre 4 de 2004

Aceptado para publicación: abril 22 de 2005

* Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia, AA 14490, Bogotá, D.C., Colombia.

1 E-mail: clgraciad@unal.edu.co

futuras de la sociedad, provienen de las plantas que han sido utilizadas por poblaciones indígenas y campesinas durante miles de años (2). Existen por lo menos 119 sustancias de origen vegetal, que pueden considerarse fármacos importantes, de estos 88 (74%) fueron descubiertos en estudios científicos de plantas bien conocidas y empleadas en la medicina tradicional (3), por lo tanto la investigación etnobotánica es la vía más apropiada en el estudio de los recursos vegetales y sirve como puente entre la ciencia moderna y la experiencia milenaria de las comunidades indígenas y campesinas. La búsqueda de nuevos recursos vegetales le plantea a la investigación etnobotánica dos tareas principales: la realización de inventarios de recursos disponibles y la exploración de aquellos recursos que posean un mayor valor económico promisorio (4).

Los estudios fitoquímicos preliminares permiten detectar los principales grupos de metabolitos secundarios presentes en las plantas y relacionarlos con su actividad biológica. Igualmente, los estudios de los extractos de las plantas sobre los biomodelos como *Artemia salina* y *Daphnia magna* es una estrategia para relacionarlos con citotoxicidad y otras bioactividades y se pueden utilizar para seleccionar especies vegetales como fuente de principios bioactivos o para utilizar estos organismos en pruebas de toxicidad para racionalizar los recursos existentes para la investigación, por ejemplo en la separación bioguiada de los componentes presentes en éstas (5,6,7).

En 1997 el Jardín Botánico realizó una investigación etnobotánica en la Comunidad Huitoto del Cabildo Isue San Martín, la Chorrera, departamento del Amazonas, con el propósito de estudiar la relación de los indígenas con la naturaleza y los usos medicinales y rituales dados a las plantas (8).

Como continuación de la investigación anterior en el presente estudio se evaluó la letalidad sobre larvas de *Artemia salina* y la efectividad sobre *Daphnia magna* que produjeron los extractos etanólicos de diez especies de plantas utilizadas en medicina tradicional por las comunidades indígenas Huitoto (Región Amazónica) y campesina (Páramo de Cruz Verde). Además se desarrollo sobre dichas especies un análisis fitoquímico preliminar. Estos resultados permitieron observar la relación que puede existir entre la letalidad sobre *A. salina*, efectividad sobre *D. magna* y la presencia de metabolitos secundarios en plantas utilizadas en medicina tradicional.

Es importante realizar estudios como el presente, puesto que los recursos biológicos, cobran valor a medida que se adquieren conocimientos que permitan conocer cuáles especies son utilizadas por las comunidades indígenas y campesinas en su medicina tradicional. Se debe también promover una cultura de conservación y uso racional de los recursos naturales renovables, con el propósito de asegurar que las generaciones futuras también los aprovechen, puesto que las plantas medicinales constituyen un motor importante para el desarrollo económico de países biodiversos como el nuestro (9,10).

Parte Experimental

Colección y tratamiento del material vegetal

Se trabajó con doce extractos de diez especies de plantas utilizadas por algunas comunidades indígenas y campesinas. Siete especies provenientes del Cabildo Isue San Martín La Chorrera, Amazonas (Colombia):

Albizzia subdimiata usada para tratamiento de alergias y otras afecciones de la piel como

sarna, *Bixa orellana* para infecciones por hongos y para hernias, *Lepidocarium tenue* para problemas oculares, *Mikania banisteriae* para la bronquitis, *Potalia amara* para tratamiento de la mordedura de serpiente, *Renalmia aromatica* para tratamiento de dolor en hernias, *Tabernaemontana undalata* para cataratas y molestias oculares. La recolección de estas plantas fue realizada por el Sr. Jair Martínez (indígena de la Comunidad Huitoto) y la información etnobotánica fue suministrada por el Sr. Víctor Martínez Cacique del Cabildo Isue de San Martín La Chorrera (11). Especies de la Región Andina, provenientes del páramo de Cruz Verde: *Lepechinia schiedeana* usada como hipotensor, *Niphogetum glaucescen* para molestias gastrointestinales y una especie proveniente del Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis: *Escallonia pendula* usada como analgésico y antiinflamatoria. El material de cada especie se secó en una estufa con aire circulante a 40 °C, se molió y se envasó en recipientes protegidos de la luz y de la humedad.

La identificación taxonómica fue realizada en el Herbario del Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis, donde se encuentra registrado un ejemplar de cada especie. Además la especie *Niphogetum glaucescens*, fue identificada en el Herbario Nacional Colombiano y se encuentra registrada con el No. COL = 425507.

Estudio fitoquímico preliminar

Fue efectuado con 50g de material vegetal molido para determinar los metabolitos secundarios de importancia biológica presentes en las especies en estudio: alcaloides, flavonoides, taninos, saponinas, naftoquinonas y/o antraquinonas, esteroides y triterpenoides, cardiotónicos, cumarinas y lactonas terpénicas. Para esto se siguió la metodología propuesta por Sanabria A. (12).

Estudios de toxicidad

Para la evaluación de la toxicidad se llevaron a cabo bioensayos con *Artemia salina* y *Daphnia magna* con el propósito de determinar la CL_{50} o CE_{50} respectivamente, de los extractos etanólicos obtenidos de las plantas estudiadas.

Obtención de los extractos etanólicos de las plantas

Los extractos se prepararon por maceración durante 24 horas de 20 gramos de material vegetal pulverizado con 250 mL de etanol al 95%. Se agitó en una placa de calentamiento con agitación magnética a 40 +/- 5 °C, por una hora, se dejó enfriar se filtró al vacío y el residuo se lavó con 30 mL de etanol, el filtrado se concentró hasta sequedad a 40 °C en un evaporador rotatorio, se rotuló y se guardó en un desecador al vacío.

Evaluación de la letalidad en *Artemia salina*

Se llevó a cabo de acuerdo a Gualdrón y Sanabria (13) y CYTED (14). Para obtener las larvas de *Artemia salina* se agregaron 50 mg de huevos por cada 500 mL de solución de sal marina (comercial) al 3,8% en agua destilada previamente oxigenada. Para la prueba se utilizaron nauplios obtenidos entre 48 y 72 horas después de iniciada la incubación de los huevos, se ensayaron las sustancias patrón y los extractos etanólicos de cada planta en concentraciones: 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 μ g/mL que fueron preparadas por dilución de una solución inicial (solución stock) de 10.000 μ g/mL, preparada a partir de 40 mg de sustancia (patrón o extracto), solubilizada en 4 mL de agua destilada; las sustancias insolubles se solubilizaron utilizando 500 μ L de Dimetilsulfóxido (DMSO) y completando luego a volumen con agua destilada.

Las pruebas se realizaron en tubos de ensayo de 10 mL, con cuatro réplicas de cada uno de los extractos, del blanco y el control del cosolvente, que se realizó adicionando 40 μ L de DMSO como reporta Gualdrón y Sanabria, en cada tubo de ensayo se colocaron 10 larvas, se adicionó el volumen calculado de la solución stock y se completó a 5 mL con la solución de sal de mar. El Bioensayo se dejó durante 24 horas y se realizó la medición de la respuesta contando el número de larvas muertas. Como patrones se utilizaron: Brucina, clorhidrato de Papaverina, Colchicina, Digoxina, y Fosfato de Codeína.

Evaluación de la toxicidad

en *Daphnia magna*

Se trabajó con un cultivo de *Daphnia magna* estandarizado y mantenido según Ortiz (6) y se siguió la metodología propuesta por Hernández (15), con algunas modificaciones. El ensayo con este organismo consta de dos pruebas:

Test preliminar. Permite determinar el intervalo en que la población presenta el 0% y el 100% de respuesta. La literatura recomienda establecer valores de crecimiento logarítmico, se escogieron concentraciones de: 1, 10, 100, 500 y 1000 μ g/mL. Este ensayo se realizó por duplicado, lo cual es permitido por la norma ISO-6341-1996 (16) y APHA (American Publish Health Association) (17). Los bioensayos se montaron en placas plásticas de 24 pozuelos, cada uno de 3 mL de capacidad, en cada pozuelo se colocaron 10 neonatos (Daphnias que nacieron durante las últimas 24 horas), se adicionó la cantidad de patrón y/o extracto requerido para la concentración determinada y luego se completó a volumen (3mL) con agua reconstituida, se tapó y se dejó en las mismas condiciones que las del cultivo.

Test definitivo. Por medio de este ensayo se determina la CE_{50} —24 horas. Para establecer el intervalo de concentraciones a emplear en este ensayo, se tienen como base los resultados del test preliminar, escogiéndose el intervalo de concentración en el que se inmovilizan o mueren entre el 10% y el 90% de los organismos, cada concentración se realizó por triplicado y la lectura se efectuó a las 24 horas contando el número de Daphnias muertas o inmovilizadas. Se preparó una solución Stock con 18 mg de extracto o sustancia patrón en agua para sustancias solubles o en 500 μ L de DMSO para no solubles y se completó a 3 mL (6.000 μ g/mL), para el test preliminar se tomaron las alícuotas para concentraciones de 10, 100, 500 y 1.000 μ g/mL y según el intervalo de toxicidad se establecieron las concentraciones para el test definitivo. También se realizaron por triplicado ensayos de los solventes de extracción (Etanol) y cosolventes (DMSO) en las siguientes concentraciones: 10,100, 500, 1000 y 10000 μ g/mL.

Sensibilidad del método. Se realizaron 15 bioensayos a lo largo de la fase experimental con un patrón de toxicidad conocida: dicromato de potasio que de acuerdo a la norma ISO-6341-1996 la CE_{50} para esta sustancia debe encontrarse entre 0.9 – 2.4 μ g/mL.

Validación de los resultados. Los resultados se consideran validados si cumplen las siguientes condiciones (15): - La concentración de oxígeno disuelto al final del bioensayo es mayor o igual a 2 mg/L; la que se consigue utilizando para el bioensayo agua de disolución previamente oxigenada por un período mayor de 24 horas. El porcentaje de inmovilización o muerte de los controles es menor o igual al 10%. Y el cálculo de CE_{50} - 24 horas de los patrones y el dicromato de potasio se mantienen dentro del intervalo reportado.

Tabla 1. Resultados del análisis fitoquímico preliminar y de los ensayos de letalidad sobre larvas de *Artemia salina* y de la toxicidad en *Daphnia magna*.

Planta Familia (Parte analizada)	Alc**	Flav	Tan	Naft Antr	Sap	Est. Trit	Lact Ter.	Cum.	Card	CL ₅₀ ug/mL Artemia	CE ₅₀ ug/mL Daphnia
<i>Albizia subdimitata</i> Mimosaceae (Corteza)	+++	+	-	-	+++	++	-	-	-	3.6	203
<i>Bixa orellana</i> Bixaceae (Hojas)	-	+++	+++	-	+	++	+	-	-	62.0	606
<i>Bixa orellana</i> Bixaceae (Semillas)	-	+	-	-	+++	+++	-	-	-	30.0	134
<i>Escallonia pendula</i> Escalloniaceae (Hojas)	-	+++	+++	-	+	+++	+	-	-	11.0	53.0
<i>Lepchinia schiedteana</i> Labiatae (Parte aérea*)	-	+++	+++	-	+	+++	+	-	-	50.0	114
<i>Lepidocarium tenue</i> Arecaceae (Hojas)	-	++	+++	-	+	++	-	-	-	50.0	456
<i>Mikania banisteriae</i> Asteraceae (Hojas)	-	+	+++	-	+	+++	+	-	-	32.0	85.0
<i>Niphogetum glaucescens</i> Apiaceae (Parte aérea)	+++	++	+++	-	+	+++	-	++	-	47.0	123
<i>Potalia amara</i> Loganiaceae (Hojas)	+++	++	+	-	+	++	-	-	-	60.0	780
<i>Potalia amara</i> Loganiaceae (Corteza)	-	++	+++	-	++	+	-	++	-	57.0	> 1000
<i>Renalmia aromatica</i> Zingiberaceae (Hojas)	-	++	++	-	+	++	-	-	-	25.0	32.0
<i>Tabernaemontana undulata</i> Apocynaceae (Hojas)	+++	++	+	-	+	++	-	-	-	450	490

* La parte aérea de la planta: hojas, flores y tallos tiernos.

** Para indicar la cantidad de metabolito secundario presente (desde el punto de vista cualitativo como intensidad de color, cantidad de precipitado etc.) criterios según Sanabria. A.: (++++) abundancia, (++) mediana cantidad, (+) pequeña cantidad, (-) Resultado negativo.

Alc. = Alcaloides; Flav. = Flavonoides; Tan = Taninos; Naft.Antr. = Nafto y/o Antraquinonas; Sap = Saponinas; Est. Trit = Esteroides y/o triterpenoides; Lact Ter. = Lactosas terpenicas; Cum. = Cumarinas; Card. = Cardiotónicos; CL₅₀ = Concentración mínima letal; CE₅₀ = Concentración efectiva.

Tratamiento estadístico

Para el análisis de los datos obtenidos en estos ensayos con el propósito de determinar para los extractos y patrones la CL_{50} - 24 h en *Artemia salina* y/o la CE_{50} -24h en *Daphnia magna* (como medida de toxicidad) se empleó el método estadístico de PROBIT, utilizando el programa FINNEY's en un computador personal. Las determinaciones se realizaron con un 95% de confianza.

Resultados y discusión

En términos generales al observar los resultados de la tabla 1, de acuerdo al análisis preliminar todas las especies presentaron la presencia de los siguientes compuestos: Flavonoides, saponinas, Esteroides y/o triterpenoides libres y taninos exceptuando *Albizzia subdimiata* en la que no se observó este último grupo de compuestos.

Cuatro presentan pruebas positivas para alcaloides, cuatro dieron reacción positiva para lactonas terpénicas y dos especies presentan cumarinas.

Los patrones presentaron frente a *Artemia salina* los siguientes valores de CL_{50} en $\mu\text{g/mL}$ (los valores encontrados por otros autores se dan entre paréntesis): Brucina 5.0; Clorhidrato de papaverina 17.0; Colchicina 3.4 (< 1.2 (13)); Digoxina 4.5 (9.0 (13)), >7 (5)); Fosfato de codeína 175.

Y frente a *Daphnia magna* los valores de CE_{50} en $\mu\text{g/mL}$ fueron (los valores encontrados por otros autores se dan entre paréntesis): Brucina 17.0; Clorhidrato de papaverina 4.5 (5.9 (15)); Colchicina 17.0; Digoxina 59.0; Fosfato de codeína 1019 (Morfina 481.9 (15)). La sensibilidad de *Daphnia magna* frente a dicromato de potasio es $1.7 \mu\text{g/mL}$.

Para poder establecer relación entre constituyentes químicos y letalidad sobre *Artemia*

salina o *Daphnia magna* se tomaron las recomendaciones del Cyted (14) para clasificar los extractos según su toxicidad en:

Extremadamente tóxico	1 – 10	$\mu\text{g/mL}$
Altamente tóxico	10 - 100	$\mu\text{g/mL}$
Moderadamente tóxico	100 – 500	$\mu\text{g/mL}$
Ligeramente tóxico	500 – 1000	$\mu\text{g/mL}$
Prácticamente no tóxico	1000 – 1500	$\mu\text{g/mL}$
Relativamente inocuo	> 1500	$\mu\text{g/mL}$

De las especies probadas frente a *Artemia salina* (ver tabla 1), el extracto de la corteza de *Albizzia subdimiata* resultó ser el más tóxico: categoría “extremadamente tóxico” con una $CL_{50} = 3.6 \mu\text{g/mL}$ (límites de confianza (95%) (2.61-4.63)) y frente a *Daphnia magna* $CE_{50} = 203 \mu\text{g/mL}$ (límites de confianza (95%) (174-229)) “moderadamente tóxico”, detectándose la presencia de alcaloides, flavonoides, saponinas y esteroides y/o triterpenoides.

También frente a *Artemia salina*, once extractos son altamente tóxicos (entre 10-100 $\mu\text{g/mL}$) mientras que el extracto etanólico de las hojas de *Tabernaemontana undalata* fue moderadamente tóxico con una $CL_{50} = 450 \mu\text{g/mL}$. De acuerdo a estos resultados se puede decir que todas las plantas manifiestan toxicidad sobre el organismo de prueba lo cual estaría correlacionado con los metabolitos secundarios presentes en ellas.

Frente a *Daphnia magna* los resultados de la CE_{50} - 24h de los extractos etanólicos se observa según la tabla 1, que el extracto más tóxico fue el de *Renealmia aromatica* ($CE_{50} = 32.0 \mu\text{g/mL}$), el extracto de *Potalia amara* (hojas) fue ligeramente tóxico ($CE_{50} = 780 \mu\text{g/mL}$), mientras que el extracto etanólico obtenido de la corteza es prácticamente no tóxico ($CE_{50} = >1000 \mu\text{g/mL}$), indica que la diferencia de la respuesta y/o sensibilidad del organismo a cada extracto se deba a la presencia de determinados metabolitos secundarios, de hecho como se presenta en la tabla 1, el extracto obtenido de

las hojas de esta planta presenta alcaloides en abundancia, mientras que en la corteza están ausentes; también es posible establecer este tipo de correlaciones (actividad vs. Metabolitos) en los extractos obtenidos de semillas y hojas de *Bixa orellana* en donde se encontró que el extracto etanólico de las semillas es moderadamente tóxico ($CE_{50} = 134 \mu\text{g/mL}$) con relación al de las hojas que es ligeramente tóxico ($CE_{50} = 606 \mu\text{g/mL}$).

Comparando los resultados de los patrones, se puede establecer que la *Artemia salina* es más sensible frente a brucina, colchicina, digoxina y fosfato de codeína que la *Daphnia magna*. El mismo análisis puede aplicarse a los resultados hallados para los extractos, puesto que frente a *Artemia salina* en 11 de 12 extractos la CE_{50} se encuentra en el intervalo de concentración 1-100 $\mu\text{g/mL}$; mientras que en *Daphnia magna* la mayoría de los extractos (9 de 12) la CE_{50} se encuentra en el intervalo de concentración de 100-1000 $\mu\text{g/mL}$, lo que indica que la *Artemia* es un organismo más sensible tanto a sustancias puras (según su naturaleza y concentración) como a extractos de plantas. Mientras en *Artemia salina* el extracto más tóxico fue el de la corteza de *Albizzia subdimiata* con una $CL_{50} = 3.6 \mu\text{g/mL}$, en *Daphnia magna* esta ocupó el 7° lugar de toxicidad con una $CL_{50} = 203 \mu\text{g/mL}$, y viceversa mientras en *Daphnia* el extracto de hojas de *Renealmia aromatica*, fue el más tóxico con una $CE_{50} = 32.0 \mu\text{g/mL}$ en *Artemia* ocupó la 3ª posición de toxicidad con una $CL_{50} = 25.0 \mu\text{g/mL}$, lo que indica que no hay correlación entre los resultados obtenidos por cada técnica.

En síntesis, se concluye que el ensayo con *Artemia salina* es más sensible que el de *Daphnia magna*, pero este último es más selectivo, frente a *Artemia* todas las especies merecerían estudios más profundos, mientras que en *Daphnia*, serían prioritarias las especies clasificadas como altamente tóxicas y moderadamente tóxicas, así las

siguientes especies ameritarían estudios más profundos: *Renealmia aromatica*, *Escallonia pendula*, *Mikania banisteriae*, *Lepechinia schiedeana*, *Niphogentum glaucescens*, *Bixa orellana*, *Albizzia subdimiata*.

Los resultados obtenidos con los biomodelos utilizados confirman que el estudio de plantas con el fin de encontrar metabolitos secundarios con actividad biológica, produce mejores resultados cuando se realizan teniendo en cuenta el conocimiento y la utilización que las comunidades indígenas y campesinas poseen y han dado a las plantas de su entorno, esto puede afirmarse del análisis de los resultados frente a *Artemia salina* en donde el 90% de las plantas analizadas se clasifican altamente tóxicas y el 10% en la categoría moderadamente tóxica, al mismo tiempo frente a *Daphnia magna* el 70% de las especies son también altamente y moderadamente tóxicas, además el análisis fitoquímico preliminar muestra que todas las especies poseen metabolitos secundarios de interés biológico.

Agradecimientos

Se agradece al Jardín Botánico de Bogotá "José Celestino Mutis" por la financiación para el presente trabajo como aporte al área Etnobotánica, coordinada por el Dr. David Rivera. También al Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia y a Colciencias a través del proyecto "Búsqueda de Principios Bioactivos en plantas superiores Colombianas". Al profesor Antonio Sanabria y al Cacique Víctor Martínez.

Bibliografía

1. O. Akerele, WHO's Traditional medicine program: Traditional herbal medicines around the Globe: Modern perspectives, *Swiss Pharma*, **13**, 57 (1991).

2. J.C. Sánchez, "Utilización industrial de plantas medicinales". ONUDI, Guatemala, 1993. P. 35, 36, 58, 59, 117-121.
3. N. Farnsworth, O. Akerele., A. Binge., D. Soejarto, Z. Guo, Las plantas medicinales en la terapéutica, *Bol. Ofic. Sanit. Panam.*, **107**, 314 (1989).
4. IV Congreso Latinoamericano de Botánica, Simposio de Etnobotánica, Instituto Colombiano para el Fomento de la Educación Superior (ICFES), Medellín, 1986. p. 53, 79, 88.
5. L. Lewan, M. Andersson y P. Morales-Gómez, The use of *Artemia salina* in toxicity testing, *ATLA*, **20**, 297 (1992).
6. G. Ortiz, "Ensayo de toxicidad de extractos vegetales en *Daphnia magna*". Tesis de Grado, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá, 1997.
7. A.B. Pimentel M., M. G. Pizzolatti y I.M. Costa Brighente, An application of the Brine Shrimp Bioassay for general screening of Brazilian medicinal plants, *Acta Farm. Bonaerense*, **21**, 175 (2002).
8. "Estudio de las especies utilizadas por la Comunidad Huitoto del cabildo Isue San Martín de La Chorrera (Amazonas)", Jardín Botánico de Bogotá: José Celestino Mutis, 1997.
9. M. Rodríguez, El desarrollo sostenible: ¿Utopía o realidad para Colombia?, En: "La política ambiental del fin del siglo", editor Manuel Rodríguez Becerra, Ministerio del Medio Ambiente, Santafé de Bogotá, 1994. Pp. 15-43.
10. A. Sanabria, De la especie vegetal al medicamento: Mito y realidad en Colombia, En: "La Biodiversidad en la obtención de moléculas activas", IV Congreso Colombiano de Fitoquímica, Medellín, 1997. pp. 231-255.
11. Víctor Martínez: Cacique del Cabildo Isue de San Martín La Chorrera, Comunicación personal (1999).
12. A. Sanabria, "Análisis fitoquímico Preliminar: Metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia *Compositae*", Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 1983.
13. A. Sanabria, S.I. López y R. Gualdrón, Estudio Fitoquímico preliminar y letalidad sobre *Artemia salina* de algunas plantas colombianas, *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.*, **26**, 15 (1997).
14. CYTED, "Manual de Técnicas de Investigación", Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, Bogotá, 1995. Pp. 45-49.
15. S. Hernández, "Evaluación de la toxicidad en *Daphnia magna* de diferentes fracciones de *Brugmansia sanguinea* y de algunos alcaloides", Tesis de Grado, Departamento de Farmacia- IBUN, Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá, 1998.
16. International Standard Organization, Water quality, Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Strauss (cladocera, crustacea), acute toxicity test. ISO-6341-1996. Ginebra, Suiza.
17. Standard methods for the examination of water and wastewater. 18 edition. Washington D.C. 1980. APHA, AWWA, WPCF. American Publish Health Association, American Public Works Association, Water Pollution Control Federation.