Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela, 48 (1): 23-28 (2009); 1 Tab.

RESPUESTA FISIOLÓGICA DE *CYPRINODON DEARBORNI* (PISCES: CYPRINODONTIDAE), FRENTE A UN EXTRACTO METANÓLICO DE *FAGARA MONOPHYLLA* (RUTACEAE).

MARY ISABEL SEGNINI DE BRAVO.[1] & GUIDO PEREIRA[2]

[1.-] *Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.*
msegnini@gmail.com

[2.-] *Instituto de Zoología Tropical, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.*

RESUMEN: El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad piscicida de un extracto en metanol de la corteza del tallo de *Fagara monophylla* en la condición fisiológica de *C. dearborni*. Se realizaron bioensayos estáticos con seis peces, tres réplicas y dos controles, en acuarios de 5 l de capacidad tratados con una dosis subletal de 0,01 µg/ml, durante 72 horas. Después de este período, se decapitaron los peces y se les disecó parte del tejido muscular esquelético e intestinal. Luego, en estos tejidos, se evaluaron las concentraciones de ADN y ARN por el método fluorimétrico, así como las proteínas totales por el método colorimétrico. La condición fisiológica se estimó por la relación ARN/ADN. Los resultados obtenidos revelaron que el nivel de ácido desoxirribonucleico (ADN) aumentó significativamente ($p < 0,05$), mientras que los niveles del ARN, las proteínas totales y el cociente ARN/ADN disminuyeron significativamente ($p < 0,05$) en ambos tejidos, con relación a los peces no tratados con el extracto. Se concluye, que el uso de esta planta en etnomedicina debe hacerse con cautela, hasta no tener mayor información toxicológica.

Palabra clave: Toxicidad, tejidos muscular e intestinal, peces.

ABSTRACT: The study aimed to evaluate the activity of a methanolic extract of the crust of the stem of *Fagara monophylla* on the physiological condition of *C. dearborni*. Static bioassays with six fish, three replicates and two controls were done by using aquariums of 5 L of capacity with a sublethal dose, 0.01 ìg/mg of the extract, during 72 hours. After this period, the specimens were beheaded and dissected to obtain portions of the skeletal muscle and intestinal tissues. The tissue concentrations of DNA and RNA were evaluated by fluorometry, and total proteins through colorimetry. Physiological condition was determined in terms of RNA/DNA ratio. The results showed an increase of DNA levels ($p < 0,05$), whereas RNA levels, total proteins concentrations as well as the RNA/DNA ratio decreased in both tissues ($p < 0,05$), in relation to untreated fishes. It can be concluded that, this plant in etnomedicine must be used with caution, until greater toxicological information will be obtained.

Keywords: Toxicity, muscles and intestinal tissues, fish.

INTRODUCCIÓN

Las plantas sintetizan gran diversidad de metabolitos secundarios también llamados productos naturales. La habilidad para sintetizar metabolitos secundarios que puedan repeler o atraer otros organismos ha evolucionado como una estrategia de supervivencia de los seres vivos (BUTLER, 2005). El estudio de este tipo de productos ha tenido por mucho tiempo un alto valor biomédico, ya que algunos productos aislados a partir de estos organismos, se han usado en la etnofarmacología, siendo éste el primer paso para el descubrimiento de drogas, o en el caso de encontrar nuevos compuestos bioactivos con perfil fármaco-toxicológico pobre, éstos productos naturales podrían ser sometidos a modificaciones estructurales, sirviendo como base para la síntesis de nuevos fármacos. Es por ello, que el 85% de las ventas farmacéuticas anuales están constituidas por sustancias derivadas de productos naturales vegetales (BUTLER, 2005).

La actividad biológica está definida como la capacidad de un producto natural para interactuar con los sistemas bioquímicos y/o fisiológicos de otros organismos (MEBS, 2001). Dichos metabolitos, requieren pruebas de su bioactividad para llegar a tener un posible uso medicinal. Los métodos para evaluar esta actividad incluyen los bioensayos de toxicidad crónica en las primeras fases, siendo estas pruebas: sensibles, rápidas y económicas,

que permiten el descarte de productos sin actividad antes de realizar pruebas especializadas más costosas.

Al medir en los tejidos de *C. dearborni*, las concentraciones de ARN, ADN y proteínas se pueden obtener indicadores de crecimiento, estado de salud y condición fisiológica del pez en un momento preciso de tiempo. Estos aspectos bioquímicos del crecimiento constituyen una función de la constitución de las macromoléculas informacionales, ácidos desoxirribonucleico y ribonucleico. Este último está relacionado con la biosíntesis de proteínas, la cual puede variar dependiendo de las condiciones nutricionales u otros factores ambientales (SEGNINI DE BRAVO *et al.* 1997; CHUNG *et al.* 1998), mientras que el ADN es un indicador del tamaño celular en el cual los valores cuantitativos no cambian en respuesta a las alteraciones ambientales agudas en términos cortos de variación en condiciones adversas (BULOW, 1987).

La especie *Fagara monophylla* conocida en la etnobotánica como paneque, bosuga o bosúa, es un árbol que crece hasta 10 m de altura. Está distribuida en Uganda y otros países africanos (OGWAL-OKENG *et al.* 2003), en la América tropical y en algunos de las Antillas (SCHNEE, 1984). En Venezuela, junto con *F. pterota*, *F. chiloperone* y *F. caribea* constituyen el género *Fagara* (HUBER *et al.* 1998). Sus diversas aplicaciones son bien conocidas en las prácticas medicinales tradicionales. El extracto de la corteza de la raíz se utiliza para tratar la filariasis, el dolor de dientes, la impotencia sexual, la gonorrea, la malaria, la dismenorrea y el dolor abdominal. En Venezuela se usa en la oftalmía, para el tratamiento del romadizo o inflamación de la mucosa nasal y en la ictericia y, hasta el presente solo se ha reportado la actividad antimicrobiana de la corteza del tallo de esta especie (GÓMEZ-GUIÑÁN, 1997; SEGNINI DE BRAVO 2007).

El objetivo de este trabajo fue evaluar las respuestas más sensibles y tempranas a la exposición del extracto en metanol de la corteza del tallo de *F. monophylla* sobre la condición fisiológica del pez *C. dearborni*.

METODOLOGÍA

Recolección de las muestras**.**

Las muestras de *F. monophylla* se obtuvieron en la localidad de Sabana de Uchire, estado Anzoátegui y se trasladaron al Laboratorio de Fisiología y Ecología Química del Instituto Oceanográfico de Venezuela, Cumaná, estado Sucre, donde se limpiaron los epibiontes, antes de la obtención de los extractos.

Obtención de los extractos.

Las muestras de la planta se deshidrataron a temperatura ambiente (26 ± 3ºC) y a la sombra, la corteza del tallo fue pulverizada en un molinillo eléctrico, y maceradas en etanol, en frascos de vidrio de 5 l de capacidad a temperatura de 4°C. Posteriormente, se filtró a través de un papel de filtro Whatman Nº 41 y se concentró, bajo presión reducida, mediante un rota-evaporador, obteniéndose el extracto crudo, el cual se sometió a un proceso de partición utilizando agua y acetato de etilo (EtOAc) en una proporción de 1:2, respectivamente. Se separaron las fases orgánica y acuosa por decantación. A continuación, la fase orgánica se evaporó bajo presión reducida, y se fraccionó por la técnica de cromatografía líquida al vacío, CLV, utilizando como adsorbente sílica gel (malla 70-230) y solventes de diferentes polaridades como fase móvil (COLL & BOWDEN, 1986), obteniendo como resultando una fase metanólica. Posteriormente, a esta fracción se le realizaron pruebas fitoquímicas descritas por MARCANO & HASEGAWA (1991) para detectar la presencia de las familias de alcaloides, saponinas, esteroles insaturados, triterpenos pentacíclicos, flavonoides, polifenoles, taninos, antraquinonas y lactonas sesquiterpénicas.

Bioensayo de toxicidad.

Recolección de organismos.

Individuos juveniles de *C. dearborni* de 2,0 ± 0,5 cm de longitud y de cualquier sexo fueron recolectados en la playa de San Luis, Cumaná, en la boca de la laguna con salida al mar y transportados al Laboratorio de Fisiología y Ecología Química del Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, donde se desparasitaron. Luego, se escogieron 50 peces aparentemente sanos y se aclimataron a las condiciones del laboratorio en acuarios de 100 l de capacidad, pH 7,5, dureza entre 300-400 mg/l, aireación >90% de saturación de oxígeno, fotoperiodo 12/12, temperatura 24 ± 2 ºC y salinidad 10 PSU, y se les suministró alimento comercial para peces (contenido mínimo de proteínas: 61,56%; mínimo de grasa: 4,52%; mínimo de fibra: 4,5%) en cantidades suficientes, dos veces al día (8 a.m. y 6 p.m.). Además, cada día se succionaron del fondo de los acuarios los desechos fecales y se les cambió el 75% del agua.

Determinación de la actividad piscicida de *F. monophylla*:

Para el análisis de la toxicidad se realizaron bioensayos estáticos con seis peces, tres réplicas y dos controles, en acuarios de 5 l de capacidad tratados con una dosis subletal del extracto metanólico de *F. monophylla* de 0,01 µg/ml, durante 72 horas. La concentración subletal fue seleccionada tomando en cuenta resultados previos (Segnini de Bravo 2007). Los peces se mantuvieron en inanición por 24 h antes y durante el período de exposición, excepto los del control positivo.

Se analizaron peces sin acción del extracto, en abstinencia por 24 h (control de 24 h), peces en abstinencia por 72 h (control de 72h) y peces tratados con el extracto en abstinencia por 72h. Además de estos controles, hubo un grupo de peces sin abstinencia y sin acción del extracto (control positivo). Tanto en los grupos controles como en los sometidos al extracto se obtuvo una supervivencia del 100%.

Determinación de ácidos nucleicos:

Los niveles de ácidos nucleicos (ARN, ADN) fueron determinados en homogenados de músculo e intestino empleando el método fluorimétrico con bromuro de etidio y heparina (Karsten & Wollemberger, 1972 y 1977) longitudes de onda de excitación 585 nm y de emisión 360 nm. Las concentraciones de ADN y ARN se expresaron en µg/mg de peso húmedo.

Determinación de las proteínas:

Las proteínas se determinaron por el método de Bradford (1976), utilizando el reactivo de azul de *Coomassie* usando albúmina de suero de bovino como patrón. La extinción se registró a 595 nm y las proteínas se expresaron en µg/mg de peso húmedo.

Los resultados obtenidos fueron sometidos un análisis de varianza y una prueba *a posteriori* de Dunett, con el objeto de detectar posibles diferencias significativas entre las concentraciones de los ácidos nucleicos, índices ARN/ADN y proteínas totales obtenidas en los grupos controles y en los tejidos expuestos al extracto de la planta.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las pruebas fotoquímicas realizadas al extracto metanólico de *F. monophylla* revelaron la presencia de esteroles, triterpenos y alcaloides frente a los reactivos de Lieberman-Buchar y Dragendorff. Reportes previos en especies de *Fagara*, indican que en su composición química existe una diversidad de alcaloides (Chen & Teng, 2005). Específicamente, *F. monophylla* posee un alto contenido de alcaloides cuaternarios, en especial berberinas y piranoquinolinas zantofilinas (Ogwal-Okeng, *et al*. 2003). La identificación de estas familias de compuestos en el extracto, revela la posibilidad de poseer actividad biológica.

Los bioensayos mostraron que el extracto causa cambios cualitativos en la etología de *C dearborni*. Inicialmente, los peces en contacto con el extracto, se movían rápidamente de un lado a otro del acuario, de arriba hacia abajo, con movimientos acelerados, dando la impresión de espasmos musculares. Subsecuentemente, disminuyeron los movimientos bruscos, pero su comportamiento se mantuvo en condición de híper-excitación. Finalmente, permanecieron en el medio del acuario, con movimientos lentos, pero su perfusión continuó siendo rápida. Los peces controles no presentaron este tipo de comportamiento, indicando que el factor responsable de la híper-excitación es el extracto.

Tiwari & Singh (2004) sugirieron que el estado híper-excitación en peces se debe a la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE). Esta enzima está presente en la región sináptica y media. La transmisión de los impulsos nerviosos se realiza mediante la degradación de acetilcolina en ácido acético y colina. La acumulación excesiva de la acetilcolina en la región neural y neuromotora causa híper-excitación la cual, también puede cambiar los patrones de comportamiento (Gill *et al*. 1991; Stansely, 1993). Aunque en este trabajo no se determinó esta enzima, estudios previos, realizados con tejido muscular de esta misma especie, han señalado que el extracto metanólico de *F. monophylla* produce alteraciones morfológicas en los nervios motores. Estos exhibieron axonólisis y desmielinización, dificultándose la transmisión de los impulsos nerviosos (Segnini de Bravo 2007).

Con los resultados obtenidos se puede inferir que el estado de híper-excitación presentado por los peces tratados se debe posiblemente a la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa por los alcaloides presentes en el extracto. En tal sentido, compuestos anti-AChE atacan a muchas enzimas responsables de mecanismos metabólicos. Por lo tanto, es posible que los compuestos del extracto pudieran inhibir las enzimas involucradas en la síntesis del ARN y proteínas (Tiwari & Singh 2003).

Las concentraciones de ARN, ADN y proteínas totales en los tejidos muscular e intestinal de *C dearborni* se muestran en la Tabla 1. Se observa una concentración de ADN casi constante presentando valores de 4,65 y 4,75 µg/mg en músculo y de 14,90 y 15,15 µg/mg en intestino para los peces controles a las 24 y de 72 h, respectivamente, diferenciándose con respecto a los peces tratados ($p < 0,05$). En el tejido muscular de los peces tratados, los niveles de ADN aumentaron un 47 % con respecto al inicio. En el tejido intestinal, el ADN presentó un incremento de 18% en los organismos expuestos.

El ácido desoxirribonucleico (ADN) transportador de la información genética existe en una cantidad constante en las células somáticas, de tal manera que su contenido en un organismo es un índice del número de células. Así, el contenido relativo de ADN (peso seco de ADN) es un estimado del tamaño celular (DORTCH *et al*. 1983, CHUNG *et al*. 1998). Un aumento en las concentraciones de ADN indica un tamaño celular más pequeño, con un mayor número de células por unidad de peso (MUSTAFÁ & MITTAL 1982; BULOW 1987; SEGNINI DE BRAVO & CHUNG 1997; CHUNG *et al*. 1998). La alta concentración de ADN en el músculo de peces tratados con el extracto (87%) sugiere células más pequeñas en comparación con los controles, probablemente por un rápido metabolismo de sustancias intracelulares en situaciones de estrés. Además, esta situación tiene asociada un alto gasto energético para mantener el nivel homeostático, el cual se altera por la presencia de alcaloides, esteroles y triterpenos. Esta alteración quedó confirmada por una disminución en la relación ARN/ADN (Tabla 1), usada en este estudio como condición fisiológica (CHUNG *et al*. 1998; GIL *et al*. 2003; SEGNINI DE BRAVO 2003).

Las concentraciones de ARN, decrecieron aproximadamente en un 20% en el músculo de los peces controles y 65% en el músculo de los peces tratados ($p < 0,05$). La concentración de ARN en el intestino decreció un 65% en los peces tratados.

Las proteínas totales tuvieron el mismo comportamiento en ambos tejidos. Opuestamente a los resultados de las concentraciones de ARN no se encontraron diferencias entre los controles (24 y 72 h); pero sí para los peces tratados ($p < 0,05$). Los niveles proteicos decrecieron en un 80% en los peces expuestos, con relación al control de 24 h.

La disminución de los niveles de proteínas en el tejido muscular en los peces tratados puede deberse al uso de proteínas de reserva para recuperación de tejidos (mantenimiento) y gastos metabólicos (producto del estrés ocasionado por el extracto). SAMBASIVA (1999) y

TABLA 1. Valores promedio de las concentraciones de ARN, ADN, Proteínas (µg/mg de tejido húmedo) y relación ARN/ADN en el tejido muscular e intestinal de *C. dearborni* expuesto al extracto metanólico de *F. monophylla* (0,01 µg/ml) durante 72 horas.

TEJIDO	TRATAMIENTO	ARN± DE	ADN± DE	PROTEÍNAS± DE	ARN/ADN
Músculo	Control 24 h	12,46 ± 0,38	4,65 ± 0,20	4393,52 ± 75,02	2,68±0,24
	Control 72 h	9,52 ± 0,59*	4,73 ± 0,29^{NS}	4177,59 ± 316,29^{NS}	2,01±0,21^{NS}
	F. monophylla	4,10 ± 1,03*	6,75 ± 0,22*	3125,77 ± 410,04*	0,61±0,13*
Intestino	Control 24 h	23,90 ± 3,30	14,90 ± 0,41^{NS}	6538,80 ± 99,66	1,60±0,15
	Control 72 h	18,62 ± 1,73*	15,15 ± 0,47^{NS}	6259,14 ± 407,13^{NS}	1,23±0,12^{NS}
	F. monophylla	8,37 ± 1,08*	17,67 ± 0,36*	1317,16 ± 183,00*	0,47±0.07*

Tejido muestreado después de 24h sin alimento y antes del bioensayo (control 24h); Tejido muestreado después de 72h sin alimento y al final del bioensayo (control 72h); desviación estándar (DE); ácido desoxirribonucleico (ADN); ácido ribonucleico (ARN); No significativo (NS); * P<0,05.

Okechukwu & Auta (2006) señalan que en condiciones de estrés se produce una alta actividad hidrolítica de las proteínas debido al incremento de la actividad de la proteasa. Por otro parte, se conoce que el ARN está relacionado con la síntesis de las proteínas (Houlihan, 1991). En las células eucariotas aproximadamente un 80% del ARN es ribosómico, un 15% corresponde al ARN de transferencia y el 5% restante al ARN mensajero. Medir en el tejido el contenido de ARN proporciona una estimación del número de ribosomas presentes (Miglavs & Jobling 1989). Por tanto, en el proceso de síntesis proteica en el músculo se encuentran involucradas tanto la concentración como la actividad de los ribosomas, la cual, en estuvo comprometida por la acción de los alcaloides del extracto (Lied *et al*. 1983; Lowery & Somero 1990; Houlihan 1991; Foster *et al*. 1993; Wang *et al.* 1993; Arndt *et al*. 1996; Gil 2003).

En conclusión, según los resultados obtenidos en este estudio, el extracto metanólico de *F. monophylla* posee un efecto piscicida en *C. dearborni*, por lo que se debería tener cuidado en el uso de esta planta en etnomedicina hasta que no se conozcan bien sus efectos a largo plazo.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente y al CDCH de la Universidad Central de Venezuela por el soporte económico para esta investigación.

REFERENCIAS

Arndt, S.K.A., T.J. Benfey & R.A. Cunjak. 1996. Effect of temporary reductions in feeding on protein synthesis and energy storage of juvenile Atlantic salmon. *J. Fish Biol*. 49: 257-276.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of protein utilizing principles of protein dye binding. *Anal. Biochem***.** 72: 248-254.

Bulow, F.J. 1987. RNA-DNA ratios as indicators of growth in fish: A review. In*: The Age Growth of fish*. (Eds. R. C. Summerfelt, & G. E. Hall). The Iowa State Chapman & Hall, London, U.K. 45-71 pp.

Butler, M.S. 2005. Natural products to drugs: natural products derived compounds in clinical trials. *Nat. Prod. Rep*. 22: 162-195.

Chen, I. S. & C. M. Teng. 2005. Chemical and bioactive constituents from Formosan *Zanthoxylum* Species. *Frontiers Nat. Prod.Chem*. 1(1): 201-208.

Chung, K.S., M.I. Segnini de Bravo & E.M. Donaldson. 1998. Physiological condition of rainbow trout fry starved and fed. *Ital. J. Zool*. 65: 517-519.

Coll, J. C. & B. F. Bowden. 1986. The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene mixture. *J. Nat. Prod*. 49: 934-936.

Dortch Q., T. L. Roberts, J. R. Clayton & S. I Ahmed. 1983. RNA/DNA ratios and DNA concentrations as indicators of growth rate and biomass in planktonic marine organisms. *Mar. Ecol. Prog. Series*. 13: 61-71.

Foster, A. R., D. F. Houlihan & S. J. Hall. 1993. Effects of nutritional regime on correlates of growth rates in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*). Comparison of morphological and biochemical measurements. *Can. J. Fish. Aq. Sci.* 50: 502-512.

Gil, H., K. S. Chung, M. Lemus & D. Altuve . 2003. Relación ARN/ADN como índice de condición fisiológica del híbrido de la cachama (*Colossoma macropomum*) y el morocoto durante el desarrollo embrionario. *Rev. Biol. Trop*. 51 (4): 91-96.

Gómez-guiñán, Y., K. Gil, E. González & L. Farías. 2007. Actividad antifúngica de extractos orgánicos aislado de *Fagara monophylla*. *Rev. Biol. Trop*. 55 (3-4): 767-775.

Houlihan, D. F. 1991. Protein turnover in ectotherms and its relationship to energetics In: *Adv. Comp. Environ. Physiol*. Gilles R. (Ed). Springer-Verlag, Berlin, Germany. 7: 1-43.

Huber, O., R. Duno, R. Riina, F. Stauffer, L. Pappaterra, A. Jiménez, S. LLamozas & G. Orsini. 1998. Estado actual del conocimiento de la flora en Venezuela. Caracas, Venezuela. 153 pp.

Karsten, U. & A. Wollemberger. 1972. Determination of DNA and RNA in homogenized cells and tissues by surface fluorometry. *Anal. Biochem*. 46: 135 -148.

_____. & A. Wollemberger. 1977. Improvements in

the ethidium bromide method for a direct fluorometric estimation of DNA and RNA in cell tissue homogenates. *Anal. Biochem*. 77**:** 464 - 470.

LIED, E., G. ROSENLUND, B. LUND & A. VON DER DECKEN. 1983. Effect of starvation and refeeding on *in vitro* protein synthesis in white trunk muscle of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol*. 76B: 777-781.

LOWERY, M. S. & G. N. SOMERO. 1990. Starvation effects on protein synthesis in red and white muscle on the barred sand bass, *Paralabrax nebulifer*. *Physiol. Zool*. 63: 630-648.

MARCANO, D. & M. HASEGAWA. 1991. *Fitoquímica Orgánica*. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. 588 p.

MEBS, D. 2001. Toxicity in animals.Trends in evolution?. *Toxicol*. 39: 87-96.

MIGLAVS, I. & M. JOBLING. 1989. Effects of feeding regime on food consumption, growth rates and tissue nucleic acids in juvenile Arctic charr, *Salvelinm alpinus*, with particular respect to compensatory growth. *J. Fish Biol*. 34(6): 947-957.

MUSTAFA, S. & A. MITTAL. 1982. Protein, RNA and DNA values in liver and brain of starved catfish, *Clarias batrachus*. *Jap. J. Ichtyiol*. 28: 396-400.

OGWAL-OKENG, J. W., C. OBUA & W. W. ANOKBONGGO. 2003. Acute toxicity effects of the methanolic extract of *Fagara zanthoxyloides* (Lam.) root-bark. *Afr. Health Sci*. 3(3): 124-126.

OKECHUKWU, E. & J. AUTA. 2006. The effects of sub-lethal doses of lambda-cyhalothrin on some biochemical characteristic of African catfish *Clarias gariepinus*. *J. Biol Sci*. 7 (8): 1473-1477.

SAMBASIVA-RAO, K. R. S. 1999. Pesticide impact on fish metabolism. *Discov. Pub. House*, New Delhi, India. 66-70.

SCHNEE, L. 1984. *Plantas comunes de Venezuela. Facultad de Agronomía*. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. 882 pp.

SEGNINI DE BRAVO, M. I. 2003. Influence of salinity on physiological condition in mussels, *Perna perna* and *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae). *Rev. Biol. Trop*. 51: 153-158.

_____. & K. S. CHUNG. 1997. Influencia de los factores ambientales sobre el crecimiento instantáneo de peces tropicales evaluados por el seguimiento de la relación ARN/ADN. *Bol. Inst. Oceanog. Venezuela*. 36: 21-29.

_____. 2007. *Evaluación de la actividad biológica y determinación de los mecanismos de acción primaria de extractos orgánicos obtenidos de Eucheuma denticulatum (GIGARTINALES, RHODOPHYTA) y Fagara monophylla (RUTACEAE) en varios organismos* Trab. Grad. Dr. Ciencias, Zoología, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. 133 pp.

STANSELY, W. (1993). Field result using cholinesterase reactivation techniques to diagnose acute anticholinesterase poisoning in birds and fish. *Arch. Environ. Contam.* 42: 643-650.

TIWARI, S. & A. SINGH. 2003. Metabolic changes in the snake head fish *Channa punctatus* due to lattices of *Euphorbia royleana*. *Asian Fish. Sci*. 16: 147-155.

_____. & A. SINGH. 2004. Piscicidal activity of alcoholic extract of *Nerium indicum* leaf and their biochemical stress response on fish metabolism. *Afric. J. Trad., Compl. Altern. Med.* 1(1): 15-29.

WANG, S. Y., J. L. LUM, M. G. CARLS & S. D. RICE. 1993. Relationship between growth and total nucleic acids in juvenile pink salmon *Oncorhynchus gorbuscha*, fed crude oil contaminated food. *Can. J. Fish. Aq. Sci.* 50: 996-1001

RECIBIDO: Diciembre 2008
ACEPTADO: Mayo 2009