
Evaluación de la acción citotóxica y embriotóxica del extracto metanólico de *Alchornea castaneifolia*

“HIPORURO”

EVALUATION OF THE CYTOTOTOXIC AND EMBRYOTOXIC ACTIONS OF METHANOLIC EXTRACT OF *Alchornea castaneifolia* “HIPORURO”

Castañeda Castañeda, Benjamín¹; Castro de la Mata, Ramiro¹; Manrique Mejía, Renán^{1,3}; Paredes Anaya, Mónica²; Ibáñez Vásquez, Lucy²

RESUMEN

Alchornea castaneifolia (WiU) Jussieu es una planta medicinal perteneciente a la familia Euforbiaceae, conocida con numerosos nombres populares y múltiples usos en la Medicina Tradicional. En el presente trabajo, se evaluó la acción citotóxica del extracto metanólico al 10% p/v, en modelos del CYTED, siguiendo la técnica de De la Torre y la evaluación de la acción embriotóxica por la técnica de Gustafson y Estus. Observamos un retardo en el desarrollo del ciclo celular de *Allium cepa* y un retardo del desarrollo embrionario del erizo de mar, a nivel de blástula y gástrula, así como un aumento significativo de la mortalidad.

En el análisis fitoquímico, de acuerdo a la Metodología de Ciulei, se pudo observar la presencia de: alcaloides, esteroides, triterpenos, azúcares reductores, saponinas, fenoles, taninos, quinonas, flavonoides, antocianidinas y principios amargos.

Palabras Claves: *Alchornea castaneifolia*, citotóxica, embriotóxica.

ABSTRACT

Alchornea castaneifolia (WiU) Jussieu is a medicinal plant of the Euforbiaceae family, known for its many popular names and use in Traditional Medicine. We evaluated the cytotoxic and embryotoxic action of the methanolic extract at 10% w/v on *Allium cepa* L cells and on sea urchin embryos, using CYTED models. We found cytotoxic action supported by the marked delay of cell cycle in *Allium cepa*. The embryotoxic action consisted mainly of blastula and gastrula-arrested embryos and a statistically increased mortality.

Phytochemical analysis was made using the Ciulei's method where alkaloids, steroids, phenols, saponines, flavonoids, quinines, antocyanidins and bitter principles were found.

Key Words: *Alchornea castaneifolia*, cytotoxic, embryotoxic.

INTRODUCCIÓN

Alchornea castaneifolia es un árbol mediano de hasta nueve metros de alto, corteza marrón clara, copa rala, ramificación distanciada, hojas pequeñas, curvinervadas, bordes levemente dentados, semicoriáceas, alternas, peciolo violáceo. Se distribuye en la Amazonía (Loreto) y en la Costa Norte. Su situación es la de arbusto silvestre. La corteza es utilizada como antidiarreica, y macerada en alcohol es utilizada como antiartrítica; como antirreumático se usa la maceración de la corteza en aguardiente, las hojas en infusión son utilizadas en diabetes y en dolores musculares se usan como emplasto. En Paludismo se usa el cocimiento de la corteza fresca (Brack, 1994)^{3,25,26,29}.

(1) Ph.D., M.D., Instituto de Investigación, Facultad de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres. Lima – Perú

(2) Ph.D., Instituto de Investigación, Facultad de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres. Lima – Perú

La búsqueda de nuevos agentes terapéuticos, sintéticos y de origen natural para combatir una serie de enfermedades como cáncer y SIDA se ha convertido en una preocupación que deriva en un esfuerzo emprendido por instituciones universitarias y compañías farmacéuticas, en el ámbito mundial. La búsqueda de productos naturales para la terapia del cáncer representa un área de gran interés, en la cual las plantas representan una fuente importante. Para llevar a cabo dicha búsqueda, los *screening* realizados de extractos o sustancias obtenidas de plantas, mediante ensayos de citotoxicidad, proveen datos (concentración, efecto, etc.) preliminares de gran valor para seleccionar las moléculas con propiedades antineoplásicas potenciales (Popoca et al, 1998)²³. La citotoxicidad es un parámetro que se define como: la toxicidad de cualquier molécula evaluada sobre diversas líneas celulares tumorales en cultivo (Suffnes and Dourus, 1982)²⁸. Los productos naturales son compuestos químicos elaborados por plantas, hongos, bacterias, protozoarios, insectos y animales.

La exposición humana a nuevas sustancias debe ser siempre acompañada por una valoración del riesgo / beneficio, teniendo en cuenta que este riesgo no puede ser evitado o predecido en forma absoluta; aún por el más cuidadoso y exhaustivo estudio científico experimental. La decisión para introducir una nueva molécula depende, en última instancia, del balance entre los riesgos y los beneficios. Por otra parte, está bien establecido que los bioensayos pueden manifestar propiedades adversas de una droga o sus metabolitos en varios sistemas biológicos y que la extrapolación puede ser realizada, considerando la cercanía filogenética del modelo biológico, en estudio con el ser humano^{6,9,10,11,14}.

El estudio de la acción citostática⁸ de cualquier sustancia puede realizarse por diversos métodos; considerando el modelo del ciclo celular. El estudio en *Allium cepa* es un modelo sencillo y de fácil implementación, sabiendo que la duración del ciclo celular en sus diferentes fases permanece constante, lo que permite realizar estudios de acción citotóxica *in vitro*, de tal manera que el número de células existentes en cada momento y en cada fase es también constante. Con los índices obtenidos se establecerán las duraciones relativas de los diferentes periodos del ciclo celular, con excepción de los interfásicos G1, S y G2.

Por otro lado, se puede evaluar la acción de diferentes sustancias sobre el desarrollo embrionario, considerando las distintas funciones que se llevan a cabo por el acto de fertilización: la primera tiene que ver con la iniciación de una complicada serie de cambios fisiológicos y morfológicos en el embrión. Estos cambios en las propiedades del embrión conducen al clivaje de la célula y el subsecuente desarrollo del embrión. Este aspecto de la fertilización es a menudo llamado activación.

Los cambios que acompañan a la unión del espermatozoide y el ovocito, incluyen la formación y regresión del cono de fertilización que está relacionado con la penetración del espermatozoide para formar la membrana de fertilización, que claramente se puede observar al microscopio en contraste de fase. La evaluación del efecto embriotóxico se realizó siguiendo la técnica de Gustafson 1971¹⁸ y Estus 1989¹⁵. En el presente caso, la utilizamos como un método indirecto para evaluar embriotoxicidad y teratogenicidad en el desarrollo embrionario de erizo de mar por considerar que, si hay un cambio en el proceso de diferenciación y desarrollo del embrión de erizo de mar, y si las condiciones ambientales son las mismas, lo único que diferencia al grupo tratado del grupo control es el extracto de la planta, por tanto, el extracto de la planta estaría afectando el material genético de este animal, causando problemas a nivel de la morfogénesis del mismo. Es importante señalar que el método de extracción y los metabolitos que forman parte del extracto (alcaloides, esteroides, triterpenos, azúcares reductores, saponinas, fenoles, taninos, quinonas y flavonoides, antocianidinas, principios amargos) pueden ser responsables, todos o algunos, del efecto del extracto metanólico del Hiporuro.

En el presente trabajo estudiamos el posible efecto citotóxico y embriotóxico de la *Alchomea casraneifolia*, utilizando erizo de mar y raíces de bulbo de cebolla (*Allium cepa*).

MATERIAL Y MÉTODO

Espécimen Botánico

Para la obtención del material biológico se solicitó al Instituto de Investigaciones Farmacéuticas Illary la muestra de hojas y corteza de *Alchomea casraneifolia*, la cual fue identificada taxonómicamente en el Museo de Historia Natural de la UNMSM. En el estudio usamos las técnicas de CYTED⁹.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMITÓTICA EN EL MODELO DE CICLO CELULAR DE ALLIUM CEPA:

Material

Raíces de bulbos de *Allium cepa*, beakers, portaobjetos, cubreobjetos, lápiz, papel de filtro, papel toalla, hoja de afeitar, pinzas finas, vidrios de reloj, goteros, microscopio, cámara fotográfica, orceína aceto-clorhídrica al 2% (55 ml de ácido acético se calientan hasta ebullición, se añaden 2 g. de orceína y se deja hervir durante siete a diez minutos, se enfría totalmente, se añaden 55 ml de agua destilada, se filtra. la solución de trabajo contiene por cada nueve partes, una de HC1 N).

Método de De la Torre⁹

Las raíces de bulbos de *Allium cepa* fueron colocados a germinar a 25°C a temperatura ambiente durante tres días, tiempo suficiente para que las raíces adquirieran el tamaño necesario y pueda existir un equilibrio celular dinámico con relación al ciclo celular de proliferación. Las raíces germinadas que alcanzaron en este tiempo 2-3 cm fueron colocadas en la solución del extracto metanólico de *Alclwmea casraneifolia* a las dosis de 2, 10, 15 y 20 µg/mL. Procediéndose a tomar cada dos, cuatro y seis horas, raíces de aproximadamente un centímetro de longitud, las cuales se cortaron con ayuda de pinzas finas y se colocaron en un vidrio de reloj que contenía el colorante de orceína aceto-clorhídrica al 2%.

Con pinzas espatuladas se sostuvieron las lunas de reloj con orceína y las raíces sumergidas se calentaron a la llama de un mechero de alcohol hasta el inicio de la salida de vapores. Se dejó enfriar y se repitió el proceso por dos veces más tanto el calentamiento como el enfriamiento. Luego se extrajo con una pinza cada raíz, colocándola sobre un portaobjetos. Se cortó tres milímetros desde el ápice, zona que incluye el meristemo. Luego, se añadió sobre este trozo una gota de orceína fría y se colocaron los cubreobjetos. Con la ayuda de la punta de un lápiz se presiona débilmente sobre el cubreobjetos, en la zona donde se encuentra el meristemo y, mediante golpes repetidos con la punta del lápiz, se va extendiendo el material radical. Posteriormente, se deja libre el cubreobjeto durante los golpes con el lápiz. Con un papel de filtro se retira el exceso de colorante, colocándolo sobre el cubreobjeto y presionándolo débilmente. El mismo papel y otro no empleado anteriormente se colocan sobre el cubreobjetos y con los dos pulgares se presiona fuertemente para efectuar el aplastado final y dar término a la preparación. Se lleva al microscopio y se observan las células en todas las fases de la mitosis y en interfase, comparando los índices mitóticos del control frente a las diferentes concentraciones del extracto de Hiporuro.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD EMBRIOTÓXICA EN ERIZO DE MAR (TETRAPIGUS NIGER):

Materiales

Erizos de mar (*Tetrapygus niger*), agua de mar (500mL), papel filtro, viales, portaobjetos y cubreobjetos, plataforma para placas petri (410x210x40), beakers, pipetas Pasteur, embudos de vidrio, microscopio compuesto, extracto metanólico de Hiporuro a diferentes concentraciones diluidos en agua de mar.

Procedimiento

Se siguió la técnica de Gustafson y Estus^{15,18}, para lo cual se pesó 100 mg del extracto y se diluyó en 1mL de agua de mar filtrada, más 10 µL de DMSO. A partir de esta solución stock se tomó: 2 µL, 10 µL, 15 µL y 20 µL del extracto de Hiporuro y se añadió a cada uno de los viales que contenían 1 mL de agua de mar doblemente filtrada. Para la fecundación se colocaron los erizos adultos en discos en petri, el esperma se tomó con la pipeta Pasteur evitando cualquier clase de contaminación usando una jeringa y aguja, los huevos granates fueron colectados tomando las gónadas y depositándolos en un beaker con 200 mL de agua de mar helada (10°C-12°C) para proceder a la obtención de los huevos. Los huevos fueron lavados decantando el agua sobrenadante y reemplazando con agua de mar helada fresca. Este procedimiento sirvió para remover el fluido celómico, espinas rotas y restos de superficie del cuerpo del agua. Estos huevos lavados estuvieron listos para la fertilización. Se necesitaron las gónadas femeninas de dos erizos de mar.

Los espermatozoides activos, a diferencia de los huevos, por ser solamente viables por un tiempo limitado en agua de mar, se colocaron en una placa petri, más las gónadas masculinas completas de dos erizos de mar sin maltratadas.

Se añadió a un beaker que contenía los 200 mL de agua de mar filtrada, más los ovocitos y 300 mL de agua doblemente filtrada para completar una c.s.p. 500 mL. Al mismo beaker se le añadió dos gotas de los espermatozoides obtenidos de la placa petri. Se agitó para que ocurriera la fecundación comprobada a través de la observación al microscopio de la membrana de fertilización. Se lavó por segunda vez retirando 200 mL de la mezcla y agregando nuevamente 200 mL de agua doblemente filtrada. Se marcaron los viales con las concentraciones respectivas del extracto de Hiporuro realizándose este procedimiento por triplicado, a cada vial se le agregó 2 mL de agua de mar doblemente filtrada y el extracto disuelto en 10 µL de DMSO. Luego se añadió 2 mL de agua de mar filtrada con los huevos previamente fecundados. Además, se dejó como control el beaker con los huevos fecundados a temperatura ambiente y con oxigenador.

Los viales con las diferentes concentraciones de extracto fueron colocados en una plataforma para placas petri y en un ambiente a temperatura de 15°C. Posteriormente, se contabilizaron 100 embriones por cada vial y se analizaron estadísticamente, mediante el análisis de varianza, usando el programa STATA 8.2 (Statistics/ Data Analysis).

RESULTADOS

En la Tabla N° 01 consignamos los datos de la determinación de los diferentes metabolitos del Hiporuro a través del estudio fitoquímico de acuerdo a la metodología de Culei⁵. Apreciamos la existencia predominante de; lactosas y coumarinas, triterpenos y/o esteroides, azúcares reductores, fenoles y taninos, quinonas, antocianinas y principios amargos; en menor proporción existen alcaloides, catequinas, saponinas y flavonoides.

TABLA N° 01

Resultados del estudio fitoquímico de Hiporuro

METABOUTOS	CUANTIFICACIÓN
Alcaloides	+
Lactonas y coumarinas	++
Triterpenos y/o esteroides	++
Catequizas	+
Azúcares reductores	++
Saponinas (de tipo esteroideal y triterpenoide)	+
Fenoles y taninos	++
Quinonas	++
Flavonoides	+
Antocianinas	++
Principios amargos	++

TABLA N° 02

Número de células en las diferentes fases del ciclo celular de *Allium cepa*

GRUPO	Tiempo	FASES DEL CICLO CELULAR					Total células
		Interfase	Profase	Metafase	Anafase	Telofase	
Control	2 hrs	2801	190	61	41	90	3183
	4 hrs	2841	294	65	45	98	3343
	6 hrs	1965	623	26	1	33	2648
Hiporuro 2µg/ml	2 hrs	2874	72	21	5	20	2992
	4 hrs	2367	344	14	7	29	2761
	6 hrs	2559	660	25	7	32	3283
Hiporuro 10µg/ml	2 hrs	2865	202	22	9	34	3132
	4 hrs	2212	674	37	3	41	2967
	6 hrs	3591	1294	54	5	48	4992
Hiporuro 15µg/ml	2 hrs	3056	98	15	8	6	3183
	4 hrs	2372	218	29	7	10	2636
	6 hrs	2636	678	18	5	27	3364
Hiporuro 20µg/ml	2 hrs	1602	50	16	4	4	1676
	4 hrs	2220	220	30	9	8	2487
	6 hrs	2585	668	31	0	10	3294

En las Tablas N° 02 y N° 03 presentamos el número y porcentaje de células, según las fases del ciclo celular. Se trabajó con cuatro dosis de Hiporuro: 2, 10, 15 Y 20 µL/mL, a dos, cuatro y seis horas.

Los datos de la Tabla N° 03 nos permiten apreciar una frecuencia mayor, estadísticamente significativa de células en interfase 2 µL a las dos y seis horas; 10 µL a las cuatro horas y a 15 y 20 µL, a las dos, cuatro y seis horas. Resultados similares observamos en profase en las cuatro dosis de Hiporuro, en los diferentes momentos.

TABLA N° 03

Número de células según ciclo celular, por grupos, en *Allium cepa*

GRUPO	Tiempo	FASES DEL CICLO CELULAR				
		Interfase	Profase	Metafase	Anafase	Telofase
Control	2 hrs	87.99	5.96	1.91	1.28	2.82
	4 hrs	84.94	8.52	1.88	1.30	2.84
	6 hrs	72.70	23.05	0.96	0.037	1.22
Hiporuro 2 µg/ml	2 hrs	94.84***	2.37***	0.69	0.16	0.66
	4 hrs	85.21	12.38***	0.50	0.25	1.04
	6 hrs	76.77***	19.8**	0.75	0.21	0.96
Hiporuro 10 µg/ml	2 hrs	88.61	6.26	0.68	0.27	1.054
	4 hrs	72.99***	22.24***	1.21	0.09	1.36
	6 hrs	71.82	25.88**	1.08	0.1	0.96
Hiporuro 15 µg/ml	2 hrs	94.73***	3.07***	4,71	0.25	0.188
	4 hrs	87.76***	8.06	1.07	0.259	0.37
	6 hrs	76.44***	19.66***	0.52	0.14	7.83
Hiporuro 20 µg/ml	2 hrs	94.51 ***	29.5***	0.94	0.23	0.23
	4 hrs	88.8***	8.8	1.2	0.36	0.32
	6 hrs	77.55***	20.04**	0.93	0	0.3

*** p < 0,001 (altamente significativo)

** p < 0,01 (muy significativo)

En las Tablas N° 04 y N° 05 consignamos el número y porcentaje de embriones, respectivamente, según el estadio evolutivo; observamos un retardo del desarrollo embrionario, a nivel de blástula y gástrula, estadísticamente significativo. Asimismo, una mayor mortalidad de embriones en caso de Hiporuro, pero no de anomalías embrionarias.

TABLA N° 04

Número de células según estadio de desarrollo, por grupos, en erizo de mar

GRUPO	ESTADIO DE DESARROLLO						
	Blástula	Gástrula	Prisma	Pluteus T	Muertos	Anómalos	Total
Control	11	90	11	138	18	21	289
Hiporuro 10µg/ml	18	52	12	103	32	8	225
Hiporuro 25µg/ml	13	21	29	107	13	3	186
Hiporuro 50 µg/ml	23	14	20	100	29	9	195

TABLA N° 05

Porcentaje de células según estadio de desarrollo, por grupos, en erizo de mar

GRUPO	ESTADIO DE DESARROLLO					
	Blástula	Gástrula	Prisma	Pluteus T	Muertos	Anómalos
Control	3.82	30.90	3.82	47.90	6.24	7.32
Hiporuro 10 µg/ml	8*	23*	5.3	45.3	14**	4
Hiporuro 25 µg/ml	7	11 ***	15.4***	57	7	2
Hiporuro 50 µg/ml	11.7***	7.14***	10.2**	51	14.8**	5

*** p < 0,001 (altamente significativo)

** p < 0,01 (muy significativo)

* p < 0,05 (significativo)

DISCUSIÓN

Los métodos utilizados para el estudio de la actividad citotóxica y embriotóxica de la *Alchomea castaneifolia* son ampliamente aceptados y utilizados en numerosos estudios de investigación preclínica, debido a su simplicidad y a su confiabilidad^{7,13,15,16,24}.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la prueba en *Allium cepa* a las dosis de 2, 10, 15 y 20 µL del extracto metanólico de Hiporuro, observamos una disminución de los porcentajes de células en las etapas de: meta fase, anafase y telofase aumentando, notoriamente, el porcentaje de células en interfase y profase (Tablas N° 02 y 03; Figuras N° 01, 02, 03 y 04), lo que nos indicaría que las dosis utilizadas en el presente trabajo son altas y, probablemente, estamos observando un efecto tóxico sobre las células de cebolla. En próximos trabajos utilizaremos dosis menores para poder apreciar mejor la acción antimutagénica. Estas diferencias son altamente significativas desde el punto de vista estadístico.

FIGURA N° 01
Control



FIGURA N° 02
Hiporuro dos horas 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$

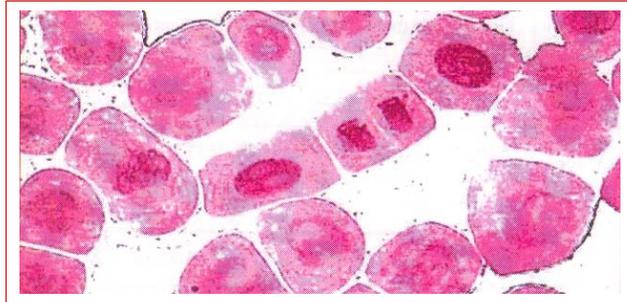


FIGURA N° 3
Hiporuro cuatro horas 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$

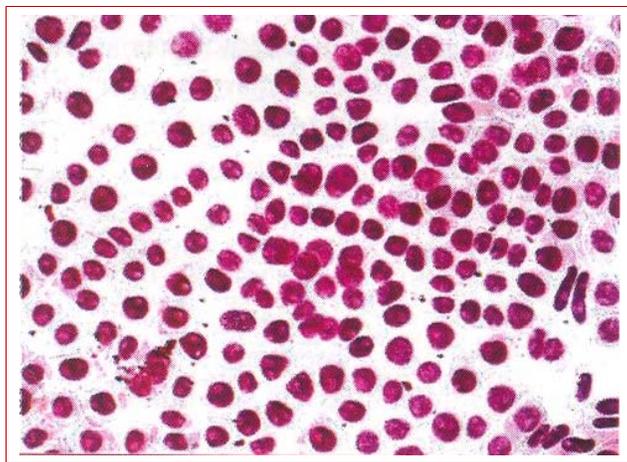
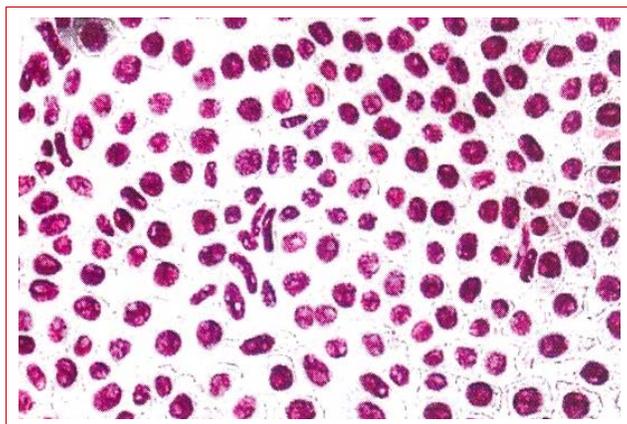


FIGURA N° 04
Hiporuro seis horas 20



Luego de analizar las células, se evidenciaron que al cabo de seis horas de tratamiento el índice mitótico de las células meristemáticas decreció, en relación al control, observándose el efecto citotóxico del extracto metanólico de Hiporuro. Otro aspecto interesante a considerar es el que el efecto citotóxico y embriotóxico de la *Alchomea castaneifolia*, no sea sólo porque se haya trabajado con dosis superiores a la DL50, sino que uno de los componentes, o varios de ellos, actuando en forma sinérgica, sean responsables de este resultado. Sería interesante aislar los principios activos

presentes en el extracto y volver a realizar estos ensayos rápidos y, de ser positivo, evaluar otro tipo de respuestas tales como: la inhibición de la síntesis de DNA, alteraciones del ciclo celular, etc., lo que permitiría determinar con exactitud las propiedades citotóxicas de dichas sustancias. Además, determinar los mecanismos moleculares (por ejemplo: apoptosis o detención del ciclo celular) involucrados en la respuesta citotóxica de estas moléculas, siendo de gran importancia realizar también estudios posteriores en modelos *in vivo* con algún tipo de carcinoma inducido.

En la evaluación del efecto embriotóxico de Hiporuro sobre los embriones del erizo de mar encontramos un claro retardo del desarrollo embrionario, bloqueando el pase del embrión de la fase de blástula a gástrula. Este mismo efecto ha sido observado por diferentes autores, con el estudio de fármacos antineoplásicos como el clorambucil y la fosfamida, retardando la primera división de la blástula a gástrula^{12,15}; igualmente, estos métodos han servido para evaluar el efecto teratogénico de la fenitoina¹⁵. Es importante mencionar que no apreciamos anomalías en los embriones, siendo éstas, incluso, menores que en el grupo control, lo que nos indicaría que el Hiporuro posee efecto embriotóxico pero no teratogénico. La mortalidad de los embriones fue estadísticamente mayor en relación al grupo control, evidencia del efecto embriotóxico.

Los estudios de citotoxicidad, mutagenicidad y embriotoxicidad forman parte de una estrategia del estudio de la actividad antitumoral de una serie de plantas medicinales peruanas, aprovechando el conocimiento etnofarmacológico existente sobre ellas.

Conocemos del amplio uso del Hiporuro dentro de la Medicina Tradicional, fundamentalmente como analgésico y antiinflamatorio; sin embargo, pocos trabajos científicos se han realizado para sustentar estas acciones. En la Facultad de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres, dentro de la línea de investigación de plantas con efecto analgésico y antiinflamatorio, hemos demostrado el excelente efecto antiinflamatorio y analgésico de esta planta, comparable al producido por el Diclofenaco, con la ventaja de que éste no lesiona la mucosa gástrica, sino que la protege de las lesiones producidas por la indometacina, en forma semejante como lo hace la Ranitidina (Castañeda, 2003)⁴. Estudios realizados con alcaloides de otras plantas han demostrado efecto antileucémico (alcaloides tropoloisoquinolínicos) y acción inhibitoria de los alcaloides bisbenzylisoquinolínicos en la producción de óxido nítrico por los macrófagos activados, lo que podría explicar el efecto antiinflamatorio y analgésico^{1,2,17,19,20,21,22,27,28}.

CONCLUSIONES

Del estudio realizado de la *Alchomea castaneifolia* (Hiporuro), podemos establecer las siguientes conclusiones:

1. Los métodos de estudio *in vitro*, utilizados en el presente trabajo, son de fácil implementación.
2. *Alchomea castaneifolia* posee acción tóxica sobre las células de *Allium cepa* L (Cebolla), retardando las fases del ciclo celular, fundamentalmente a nivel de la interfase y profase.
3. *Alchomea castaneifolia* posee acción embriotóxica en erizo de mar, retardando el clivaje de la células embrionarias en los estadios de blástula y gástrula, y al parecer carece de efectos teratogénos.

AGRADECIMIENTOS

Al profesor Fernando Retuerto de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM.

Al Lic. Jorge Medina Outiérrez, por los análisis estadísticos. Facultad de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres.

Ph.D., M.D., Benjamín Castañeda Castañeda
Facultad de Medicina Humana
Universidad de San Martín de Porres

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Anwer E, et al. *Studies in medicinal plants*. 3. *Protoberberine alkaloids from the roots of Cissampelos pareira* Linn. *Experientia*, October 15, 1968.
2. Basu D. K. *Studies on curariform activity of hayatinin methochlohide, an alkaloid of Cissampelos pareira*. *J. Pharmacol.* June, 1970.
3. Brack Egg Antoni. *Diccionario Enciclopédico de Plantas útiles en el Perú-Cuzco: Centro de Estudios Regionales Andinos "Bartolomé de las Casas"*. Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo, Cuzco Perú, 1999.
4. Castañeda, B. *Evaluación fotoquímica, toxicológica, analgésica y antiinflamatoria del extracto metabólico de Alchornea castaneifolia "Hiporuro", en animales de laboratorio*. *Cultur - 17*, año XXI, NQ 17, 2003: 13-21.
5. Ciulei I. *Metodología D' Analyse des Produit Vegetaux*. Mimeografa doi Facultade de Farmacia, Bucarest. Brasil, 1982.
6. Coelho Ferreira, M. *Les Plantes Medicinales a Manaus: Utilización et commercialisation*. Tesis. I.:Université Pierre et Marie Curie. Laboratoire de Botanique Tropicale, Paris, 1992.
7. Costa-Lotufo L. v., Ferreira M. A D., Lemos T. L. G., Pessoa O. D. L., Viana G. S. B., Cunha G. M. *A Toxicity to sea urchin egg development of the quinone fraction obtained from Auxemma oncocalyx*. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, Aug. 2002; 35(8): 927-930.
8. Cytel. *Programa Iberoamericano de Ciencia y tecnología para el Desarrollo. Manual de Técnicas de Investigación*. 1995; pág. 61-62.
9. De La Torre, C.; Gonzales-Fernández A., Jiménez Martin G. *Cell flow and its application to the estimate of cell cycle parameters in meristems*. *Biologisches Zentralblatt* 1971; 90: 707-710.
10. Desmarchelier C., Witting S. F *Sesenta Plantas Medicinales de la Amazonía Peruana*. Ecología, Etnomedicina y Bioactividad. 2000 ISBN: 9972-9186-0-2.
11. Desmarchelier C., Gurni A, Ciccía G., Giulietti, A M. *Ritual and medicinal plants of the Ese'ija of the Amazonian rainforest (Madre de Dios, Perú)*. *Journal of Ethnopharmacology* 1996a; 52: 45-51.
12. Desmarchelier C., Mongelli E., Coussio J., Ciccía G. *Studies on the cytotoxicity, antimicrobial and DNA-binding activities of plants used by the Ese' eja*. *Journal of Ethnopharmacology* 1996b
13. Desmarchelier C, Repetto M., Coussio J., Llesuy S., Ciccía G. *Total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) in medicinal plants used in Southwest Amazonía (Bolivia and Perú)*. *International Journal of Pharmacognosy* 1997; 35: 288-296.
14. Duke J. A, Vásquez R. *Amazonian Ethnobotanical Dictionary*. (CRC Press) Boca Raton, U.S.A 1994; pág. 13
15. Estus S., Blumer J. L. *Critical period of phenytoin teratogenic action in the sea urchin, Arbacia punctulata embryo*. *J Pharmaol Exp* Nov 1989; 251 (2): 782-9
16. Graillet C., Pagano G., Girand J. P. *Stage-specific effects of teratogens on sea urchin embryogenesis*. *Development*, Mar 1997; 124 (6): 1099-107
17. Hocquemiller R., Cave A., Fournet A *Sauylatine, a novel isoquinoline alkaloid from Abuta bullata*. *Journal of Natural Products* 1984; 47: 539-540.
18. Gustafson T. *How genes control morphogenesis*. *American Scientist*, 1971; 59: 452-462.
19. Kondo Y., et al. *Inhibitory effect of bisbenzylisoquinoline alkaloids on nitric oxide production in activated macrophages*. *Biochem Pharmacol* 1993; 46: 18 (87-92).
20. Kupchan S. M., et al. *Tumor inhibitors VI. Cissamparcine, new cytotoxic alkaloid from Cissampelos pareira. Cytotoxicity of bisbenzylisoquinoline alkaloids*. *J. Pharm. Sci.*, April, 1965.

21. Morita H., et al. *Conformation of tropolone ring in antileukemic tropoloisoquinoline alkaloids*. Chem Pharm Bull Tokyo, Aug, 1993
22. Mocita H., et al. *Structures and solid state tautomeric forms of two novel antileukemic tropoloisoquinoline alkaloids, parirubrines A and B, from Cissapelos pareira*. Chem Pharm Bull (Tokyo), August 14, 1993; 41:8 (18-22).
23. Popoca J., Aguilar A., Alonso D., Villareal M. L. *Cytotoxic activity of selected plants used as antitumorals in Mexican traditional medicine*. Journal of Ethnopharmacology 1998; 59: 173-177.
24. Retuerto Fernando De Los Santos Maxy; Barreto Teresa; Lezama Melchor. *Efectos citostáticos del extracto etanólico de Lepidium mellen W en células meristemáticas de Allium cepa*. Laboratorio de Biología Celular. Facultad de Ciencias Biológicas. Instituto de Química - Orgánica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM. 1996.
25. Schultes R. E., Raffauf R. F. *The Healing Forest*. Dioscorides Press, Portland, Oregon. 1990; pág. 303.
26. Soukup J. *Vocabulario de los nombres vulgares de la Flora Peruana*. Colegio Salesiano, Lima, Perú 1986; pág. 38
27. Steele J. C., et al. *Evaluation of the anti-plasmodial activity of bisbenzylisoquinoline alkaloids from Abuta grandifolia*. Planta Med. June 1999; 65(5): 413-416.
28. Suffnes M. y Dourus J. *Current status of the NCI plant and animal product program*. Journal of natural Products 1982; 45 (1): 1-14.
29. www.congreso.gob.pe/comisiones/1999/ciencia/cd/iiap/iiap2/capituloIII.htm.7k