

Toxicidad oral a 45 días del extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L. “cadillo” en ratas albinas

Oral toxicity 45 days of ethanolic extract of *Cenchrus echinatus* L. “cadillo” in albino rats

César B. Cisneros Hilario¹, Ingrid L. Loyola Lara¹, Freddy A. Miranda Aguilar¹

Resumen

El presente trabajo tuvo como finalidad demostrar la toxicidad oral a 45 días del extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L. “cadillo” en ratas albinas. El diseño es un estudio pre-clínico, desarrollado en la Escuela de Farmacia y Bioquímica, Facultad de Medicina Humana. Universidad San Pedro, Chimbote, Perú. Para lo cual se utilizó ratas albinas y extracto etanólico de *C. equinatus*. La muestra vegetal se recolectó en San José, (Santiago de Cao, Ascope, La Libertad). Se trabajó con dos grupos normales de ratas albinas machos y hembras que recibieron SSF 4mL/kg, y 2 grupos experimentales machos y hembras que recibieron el extracto a dosis de 100 mg/kg, los tratamientos se administraron diariamente por vía oral. Las principales medidas de la toxicidad fueron el aumento de peso corporal, alteraciones físicas y conductuales, pruebas hematológicas, homogeneidad de peso de los órganos blandos y fórmula leucocitaria. Se observó que no existe variación significativa entre los grupos que recibieron extracto y los controles. Se concluye que en condiciones experimentales, el extracto de *C. equinatus* no es tóxico cuando se administra en ratas albinas, durante 45 días por vía oral.

Palabras clave: toxicidad oral, extracto etanólico, *Cenchrus echinatus* L.

Abstract

The present work was to demonstrate oral toxicity 45 days of ethanol extract of *Cenchrus echinatus* L. “cocklebur” in albino rats. The design is a pre-clinical study, which was developed at the School of Pharmacy and Biochemistry, Faculty of Human Medicine. University of San Pedro, Chimbote, Perú. Which was used for albino rats and ethanol extract of *C. equinatus*. The plant sample was collected in San José (Santiago de Cao, Ascope, La Libertad). For this study considering two normal groups of albino rats (males and females) receiving 4mL/kg SSF, and 2 groups received extract (males and females) at doses of 100 mg / kg, treatments were administered daily by mouth. The main measures of toxicity included body weight gain, physical and behavioral changes, blood tests, homogeneity of soft organ weights and blood differential. It was observed that there is significant variation between the groups receiving extract and controls. It can be concluded that under experimental conditions, *C. equinatus* extract is not toxic when administered in albino rats for 45 days orally.

Keywords: oral toxicity, ethanol extract, *Cenchrus echinatus* L.

Introducción

La Organización Mundial de la Salud (OMS) posee un programa de medicina tradicional para asesorar y estimular el empleo de las plantas medicinales, en especial en la atención primaria. Según informes de esta organización el 80% de la población mundial usa las plantas con estos fines (Zang, 1996). Se estima en 5000 el número de especies vegetales estudiadas exhaustivamente para una posible aplicación médica, pequeña fracción del total estimado en 300.000 a 500.000 especies (Mukherjee, 2002).

El uso de las plantas como medicina alternativa es muy frecuente en nuestro país, no sólo por razones socioeconómicas, sino también por la larga tradición que existe heredada de nuestra cultura y la que agregaron los diversos grupos étnicos inmigrantes.

¹ Facultad de Medicina Humana, braulioqf_7179@hotmail.com

Recibido, 11 de julio de 2012

Aceptado, 16 de diciembre de 2012

No existe una estadística sobre el volumen de plantas, de fórmulas o de compras de productos naturales que diariamente se consumen, pero se supone que ésta es elevada, por las características anotadas y, además, por la búsqueda de medicinas alternativas y la proliferación de propaganda y tiendas naturistas (Fonnegra, 1999).

En los últimos años, los medicamentos naturales y los herbarios han ido alcanzando una posición importante, no sólo en países subdesarrollados sino también en los industrializados, todo esto gracias a numerosos institutos y empresas farmacéuticas que continúan intensamente su investigación (Discovery de salud, 2005).

La OMS considera esencial separar el mito de la realidad, que están estrechamente relacionados en medicina tradicional, ser capaces de distinguir las prácticas y los remedios válidos de los ineficaces o peligrosos, promoviendo esta actividad mediante métodos adecuados que garanticen los principios de seguridad, eficacia y calidad (Okerele, 1984; Erich, 2004). Esto no significa que se le pueda confiar a la sabiduría popular la seguridad y eficacia de las plantas, pues ellas poseen numerosas sustancias con actividad biológica capaces potencialmente de producir cualquier efecto indeseable, muchos de los cuales pueden pasar inadvertidos hasta en una investigación diseñada de manera adecuada. La población podría detectar aquellos que tengan frecuencias altas de aparición, pero los que se presentan de manera tardía podrían pasar inadvertidos (Moron, 2002).

El uso de las plantas medicinales como complementos o alternativas a los medicamentos estándares está yendo en aumento, esto se explica por los bajos costos, la disponibilidad y accesibilidad de estos productos. Además, existe la creencia errónea de que estos medicamentos naturales están exentos de efectos adversos. Por otra parte también son rechazados debido a que sus valores medicinales no han sido científicamente evaluados y su perfil de seguridad es incierta (Ernst, 2005).

El Perú, considerado el tercer país más mega diverso del planeta, ha efectuado importantes aportes de especies y variedades para el mundo gracias a los diversos pisos ecológicos y microclimas que presenta, contando con 84 zonas de vida de las 103 conocidas donde habría 50 mil especies vegetales (20% de las existentes en la Tierra) de las que 2,000 han sido utilizadas con fines curativos. Actualmente, esta riqueza de promisorios agentes terapéuticos vegetales aunada al conocimiento ancestral de su uso etnofarmacológico, constituye un valioso recurso por explotar adecuadamente mediante el desarrollo sostenible en beneficio de la humanidad y, especialmente, de las comunidades nativas que han preservado estos recursos hasta nuestros días (Li E, 2005).

La presencia de plantas medicinales fue muy notoria en todas las farmacopeas del mundo hasta los años 40–50, después los medicamentos sintéticos sobrepujaban fuertemente a las plantas medicinales en la terapéutica médica (Baumann, et al., 1986), sin embargo, hoy en día el 80% de la población mundial no tiene acceso al sistema moderno de salud, lo que ha conllevado a que las plantas medicinales se constituyan como una de las fuentes principales de tratamiento de enfermedades (Farnsworth et al., 1985).

En el 2000 la OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development) recomendó que es necesario la determinación de toxicidad aguda y la dosis letal media (DL50) para evaluar la toxicidad de productos para uso medicinal, si bien es cierto que muchos se comportan como protectores, otros poseen toxicidad aguda e interferencia con el crecimiento y desarrollo (Barra et al., 2007). Por otro lado se sabe que extractos vegetales poseen gran potencial terapéutico avalado científicamente que posibilitan su

empleo en diversas enfermedades, por lo que caracterizar su potencial tóxico es de gran importancia para ser empleado como agente terapéutico (Lagarto et al., 2008).

Cenchrus echinatus L. “cadillo” etimológicamente, proviene del griego Kenchros, nombre de mijo; vulgarmente conocida como pega-pega o rata-rata. Pertenece a la familia Gramineae. Presenta culmos cilíndricos, ascendentes desde una base geniculada, de 15 a 85 cm. de largo con pubescencia variable, láminas de glabras a pubescentes, de 4 a 26 cm de largo y de 3,5 a 11 mm. de ancho, se usa para tratar problemas digestivos, genitourinarios, infecciosos, problemas durante el embarazo, parto y puerperio, envenenamientos, (Cabrera, 1998), para combatir inflamaciones, úlceras y verrugas (Carrizo, 2009).

De ello crece la necesidad de realizar los estudios de seguridad a los productos naturales aplicando los modelos experimentales de validación farmacológica y toxicológica, a fin de garantizar su aplicación clínica en los pacientes, para evitarles riesgos innecesarios durante tiempo prolongado de tratamiento, de ello se propuso determinar la toxicidad oral a 45 días del extracto etanólico de *C. echinatus* “cadillo” en ratas albinas, por lo tanto se postuló la hipótesis: “La administración por vía oral del extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* “cadillo”, no es tóxica en ratas albinas cuando se administra durante 45 días, además se plantearon los siguientes objetivos: 1)Recolección, identificación taxonómica, obtención del extracto y estudio fitoquímico cualitativo del cadillo. 2) Determinar la toxicidad oral a 45 días del extracto de cadillo. 3) Observar los cambios físicos, conductuales y hematológicos.

Material y métodos

Las plantas de *Cenchrus echinatus* L. fueron recolectadas en el caserío de San José, Distrito de Santiago de Cao, Provincia de Ascope Departamento de la Libertad, Perú; durante los meses de enero – marzo del 2011.

La identificación taxonómica se realizó en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. La muestra vegetal (planta completa) fue estudiada y clasificada según el sistema de Cronquist (1988, p. 555).

Para la preparación del extracto alcohólico, la muestra (plantas completas) de *Cenchrus echinatus* L. fueron lavadas, deshidratadas en estufa a 40°C, luego se pulverizó en un molino de mano, y se maceró con etanol de 96°C durante de 7 días, lo cual se filtró y desecó en estufa a 40°C hasta peso constante. El residuo obtenido, llamado extracto etanólico, se conservó en un frasco de color ámbar a 4°C, lo cual se utilizará previa reconstitución utilizando como agente tensioactivo polisorbato de sodio 80°C al 5%. (CYTED, 1995).

El estudio fitoquímico del extracto etanólico de *C. echinatus* L. “cadillo” se realizó en el laboratorio de Química la Escuela Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad San Pedro, al cual se le practicó, las reacciones de Gelatina, Tricloruro Férrico, Dragendorff, Molisch, NaOH 10%, Vainillin sulfúrico, Liebermann, Shinoda y Ninhidrina, lo determinó la presencia y cantidad de metabolitos secundarios presentes en el extracto (Lock de Ugaz, 1994).

Para la evaluación de la toxicidad oral a 45 días del extracto etanólico de *C. echinatus* L.) en ratas (OECD, 2000), para lo cual se utilizó 20 ratas albinas cepa Holtzmann (10 de cada sexo), con 5 semanas de edad y un peso promedio de 150-170 g. Los animales fueron aclimatados durante 7 días recibiendo alimento balanceado y agua potable a libertad y, los cuales fueron divididos en 4 grupos experimentales (dos grupos de ratas

machos y dos de hembras) de 5 ratas cada uno, de los cuales un grupo de hembras y machos recibieron solución suero fisiológico (SSF) 4 mL/Kg y los otros dos grupos de hembras y machos extracto etanólico de cadillo 100 mg/kg, para dichas administraciones diarias por vía oral y durante 45 días se utilizó una cánula metálica.

Se efectuaron observaciones clínicas diarias, que consistieron en evaluar el peso de los animales por semana y grupo, al finalizar los 45 días se obtuvo una muestra de sangre de la vena radial de la cola de la rata, previo ayuno del espécimen, la cual se utilizará para realizar un frotis sobre una lámina portaobjetos y se procedió obtener los siguientes parámetros hematológicas: abastionados, segmentados, eosinófilos, basófilos, monocitos, linfocitos y leucocitos, además se anestesió a las ratas con pentobarbital sódico 30 mg/kg vía IP y se obtuvo la muestra sanguínea por punción cardiaca, la sangre se recolectó en tubos de ensayo de 10 mL y se centrifugó a 12 000 rpm durante 10 min., se extrajo el suero y se colocó en microtubos plásticos Eppendorf, lo cual sirvió para la obtención de los siguientes indicadores: Colesterol total, Lipoproteínas de alta densidad (HDL), Triglicéridos, Glucosa, Urea, Glutámico Pirúvico Transaminasa (TGP) y Fosfatasa alcalina.

El estudio anatomopatológico se realizó a todos los animales al finalizar el tratamiento, para llevar a cabo las correspondientes observaciones macroscópicas y un estudio microscópico, se procedió a eutanizar a los animales con sobredosis de pentobarbital (100 mg/kg vía IP). Posteriormente se procede a la extracción y pesaje de los siguientes órganos: estómago, bazo, riñón, hígado, pulmón, corazón y cerebro.

Para el análisis estadístico de los datos del efecto protector y seguridad del extracto etanólico de *C. echinatus* L. (cadillo) en ratas albinas, se empleó el programa SPSS versión 17 sobre Windows para determinar estadígrafos, y se evaluó diferencias y homogeneidad (prueba de Kolmogorov-Smirnov) entre grupos. La comparación de las medias se realizó con ayuda de la prueba t de Student, Chi-cuadrado, análisis de varianza, los valores promedios del peso corporal a dosis repetidas se compararon por un método no paramétrico, la prueba de la U de Mann-Whitney entre otras. Para los diferentes análisis se consideró la $p < 0,05$.

Resultados

Tabla 1: Marcha fitoquímica del extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L. (cadillo)

Reacción	Metabolito Secundario	Cantidad
Gelatina	Taninos	+++
Tricloruro férrico	Compuestos Fenólicos	+++
Dragendorff	Alcaloides	+++
Mayer	Alcaloides	+++
Hidróxido de sodio	Quinonas	++
Alfa naftol	Glicósidos	++
Liebermann	Esteroides y triterpenos	-
Shinoda	Flavonoides	+++
Ninhidrina	Aminoácidos libres	+++

Leyenda: (+++) = Abundante cantidad; (++)=Regular cantidad o positivo, (+)= Poca cantidad o trazas; (-)=Ausencia.

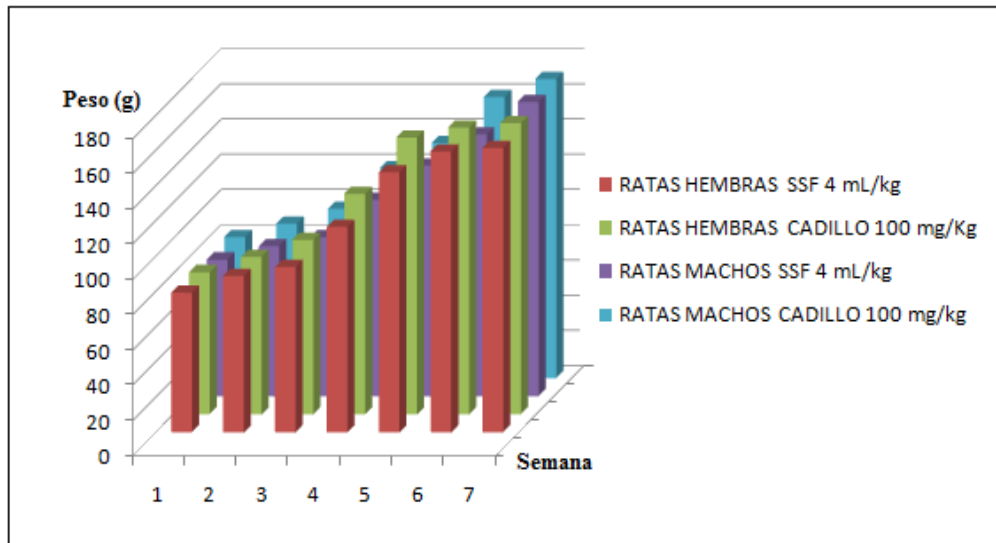


Figura 1: Pesos semanales promedio (g) de las ratas al evaluar la toxicidad oral a dosis repetidas con extracto de cadillo a 100 mg/kg durante 45 días en ratas machos

Tabla 2: Valores promedio de las pruebas de bioquímica sanguínea, tras la administración de extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L en ratas durante 45 días por vía oral.

Tratamiento	Colesterol		HDL		Triglicér		Glucosa		Urea		TGP		Fosfat alcalina	
	X	EE	X	EE	X	EE	X	EE	X	EE	X	EE	X	EE
Machos (SSF 2 mL/kg)	156,8	9,5	43,2	2,1	165,0	15,2	88,8	3,3	16,2	2,2	24,0	5,8	150,0	16,6
Machos (cadillo 100 mg/kg)	165,0	12,6	43,8	2,7	156,8	19,4	89,2	4,0	17,2	2,2	29,8	7,2	127,6	15,8
Hembras (SSF 2 mL/kg)	166,6	5,0	41,2	1,1	159,0	14,1	91,6	4,2	19,8	2,9	16,8	4,4	136,4	16,4
Hembras (cadillo 100 mg/kg)	173,0	9,8	40,4	2,5	142,4	14,6	93,2	5,0	17,8	3,2	23,4	2,7	138,6	4,3

Dónde: (x= valor medio, EE= error estándar)

Tratamiento	Abastionados		Segmentados		Eosinófilos		Basófilos		Monocitos		Linfocitos		Leucocitos	
	X	EE	X	EE	X	EE	X	EE	X	EE	X	EE	X	EE
Machos (SSF 2 mL/kg)	1,4	0,4	59,2	2,0	0,6	0,4	0,0	0,0	1,6	0,4	37,2	1,6	6434,0	549,3
Machos (cadillo 100 mg/kg)	2,4	1,0	57,4	3,9	2,4	0,9	0,0	0,0	0,6	0,2	37,2	3,4	7424,0	751,8
Hembras (SSF 2 mL/kg)	0,6	0,4	61,0	2,5	2,0	1,0	0,0	0,0	1,0	0,3	35,4	3,0	8060,0	951,1
Hembras (cadillo 100 mg/kg)	1,8	0,9	62,0	2,3	0,6	0,2	0,2	0,2	0,8	0,6	34,6	1,9	8308,0	1185,9

Dónde: (x= valor medio, EE= error estándar)

Tabla 3: Valores promedios de los pesos (g) de los órganos blandos de ratas, al evaluar la toxicidad del extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L durante 45 días por vía oral

Tratamiento	Estómago		Bazo		Riñón		Hígado		Pulmón		Corazón		Cerebro	
	X	EE	X	EE	X	EE	X	EE	X	EE	X	EE	X	EE
Machos (SSF 2 mL/kg)	9,3	0,8	1,7	0,4	2,0	0,2	10,0	0,4	2,1	0,3	1,0	0,1	1,7	0,0
Machos (Cadillo 100 mg/kg)	8,3	0,4	1,1	0,1	1,8	0,1	10,5	0,7	1,8	0,2	1,1	0,1	1,7	0,0
Hembras (SSF 2 mg/kg)	8,0	1,1	0,8	0,1	1,3	0,0	8,7	0,2	1,2	0,2	0,8	0,1	1,5	0,0
Hembras (Cadillo 100 mg/kg)	6,8	1,5	0,8	0,1	1,4	0,1	7,3	0,5	1,6	0,2	0,8	0,1	1,6	0,0

Dónde:(x= valor medio, EE= error estándar)

Discusión

En este trabajo se muestran los resultados de un estudio toxicológico realizado a un producto natural proveniente de una planta de amplia localización y uso tradicional en nuestro país. El estudio es novedoso ya que brinda información sobre las propiedades tóxicas de esta planta cuya especie ha sido poco estudiada en el mundo, dentro de los componentes fitoquímicos del extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L se ha reportado la presencia de taninos, compuestos fenólicos, alcaloides, flavonoides y aminoácidos libres en mayor proporción (+++), pero en menor cantidad quinonas y glicósidos (++) (tabla 1), lo cuales tendría implicancia sobre el grado de toxicidad de los productos vegetales.

Desde hace algunos años, el empleo de plantas medicinales y de productos derivados de las mismas está aumentando de manera importante, esto se debe a una serie de factores entre los cuales se destaca el conocimiento preciso, en muchos casos, de su composición química. En la actualidad el empleo de estas plantas está avalado por los ensayos farmacológicos tanto *in vitro* como *in vivo* así como por ensayos clínicos, de esta forma, el uso que se ha venido haciendo de una forma empírica y basada en la tradición de las especies vegetales medicinales tiene hoy una base científica (Villar, 1999).

La introducción de un nuevo medicamento o aplicación de una nueva tecnología, lleva implícito la realización de un conjunto de investigaciones previas que incluyen las relacionadas con aspectos de química farmacéutica, farmacología experimental (farmacocinética y farmacodinamia) y estudios toxicológicos, siendo estos últimos los que cumplen la finalidad de determinar la seguridad de su uso (Aleman, 1998).

El peso corporal es un indicador de gran importancia pues está involucrado en una serie de cambios orgánicos en diferentes etapas de la vida es por ello que una variación significativa en su comportamiento sugiere que algo no funciona correctamente. Este indicador, en este estudio tuvo un comportamiento normal para esta especie lo cual demostró la inocuidad de este producto en ese sentido (Universities Federation for Animal Welfare, 1999).

Las variaciones observadas en el consumo de alimento no están relacionadas con una disminución del peso corporal, se pudiera pensar que están justificadas debido a que los animales al inicio del ensayo contaban con 5 semanas de edad, por lo tanto estaban en etapa de crecimiento y el consumo se elevó bruscamente, posteriormente el consumo se

estabilizó y se observó un sostenimiento de los pesos (tabla 2, figura 1). Esta tendencia fue similar en los dos grupos y para ambos sexos acentuándose más en el grupo tratado, por otro lado este indicador a pesar de ser cuantificable depende mucho de la individualidad en la actividad de roer de cada animal y es a veces un tanto cualitativo ya que todo el alimento que el animal roe no lo ingiere, pues alguno se elimina en la bandeja y entonces se calcula un consumo no real, lo que se corroboró con la observación del comportamiento del peso corporal (Mosberg, 2000).

Los exámenes hematológicos y de química sanguínea son de gran valor en los ensayos toxicológicos a largo plazo ya que los mismos son indicativos del alcance y profundidad de un daño, además los resultados alcanzados pueden correlacionarse con los posibles daños sobre un órgano específico. Los valores obtenidos en los indicadores hematológicos y bioquímicos (tabla 2) no mostraron alteraciones importantes, las variaciones encontradas están dentro del rango establecido por el grupo control y por la literatura especializada. Todos los valores publicados en la literatura se encontraron dentro del rango establecido en el CENPALAB, 2010 para esta especie (Alemán, 1998).

Las variaciones encontradas en el peso relativo de los órganos blandos (tabla 3), a pesar de poseer significación estadística, no están relacionadas con la alteración de un marcador bioquímico específico, y es por ello que se consideró que carece de relevancia biológica, al no estar asociada a la administración del extracto etanólico (Mosberg, 2000).

Conclusiones

El extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L. no produjo alteraciones significativas en el peso corporal y el consumo de alimento de las ratas albinas, tampoco provocó alteraciones anatómicas atribuibles al efecto de la sustancia de ensayo sobre sistemas, órganos y tejidos.

Agradecimientos

A la Facultad de Medicina Humana de la Universidad San Pedro, por el apoyo incondicional con los ambientes de laboratorio, insumos y equipos.

Referencias bibliográficas

- Alemán C, Más R, Rodeiro I, Noa M, Hernández C, Menéndez R, et al (1998) Reference database of the main physiological parameters in Sprague Dawley rats from 6 to 32 months. *Lab Animals*; 32 (4): 457-66.
- Barra A, Coroneo V, Dess S, Cabras P, Angioni A. (2007). *Characterization of the volatile constituents in the essential oil Pistacia lentiscus L. from different origins and its antifungal and antioxidant activity. J. Agric. Chem*, 55: 7093-7098.
- Baumann D, Friedrich Ch, Seidlein HJ. (1986). *Arzneimittel und historischer Determinismus. Pharmazie*; 41 (11): 806 - 811.
- Cabrera T, Casas F, M. Rojas C, Viveros S. (1998). *Alimentos en la naturaleza. Algunas plantas comestibles, silvestres arvenses y ruderales. SEMARNAP. México, D.F.*
- Carrizo, E.,Palacio, M., Roic, L.(2005) *Plantas de uso medicinal en la flora de los alrededores de la ciudad de Santiago del Estero.(Argentina)*. Citado el 16 setiembre del 2009. Disponible en: <http://www.dominguezia.org.ar/volumen/articulos/18-3.pdf>

- Centro para la Producción de Animales de Laboratorio CENPALAB (2000). Cuba
- CYTED. (1995). Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Proyecto X-I. *Búsqueda de principios bioactivos de plantas de la región*. Manual de técnicas de investigación p. 220.
- Cronquist, A. (1988). *The evolution and classification of flowering plants*. New York: The New York Botanical Garden p.555.
- Discovery de salud (2005). *Intentan impedir el uso curativo de los productos naturales*. Citado el 5 de agosto del 2008 3. Disponible en: http://www.dsalud.com/numero56_1.htm
- Erich, D., Juliette, M., Yasmiany, P. (2004). *Regulaciones emitidas por el CECMED en el primer semestre de 2004*. Servicio informativo del centro para el control estatal de la calidad de los medicamentos citado el 01 diciembre del 2010. Disponible en: <http://www.cecmec.sld.cu/Docs/Infocecmec/Boleno48.pdf>
- Ernst E. (2005). *The efficacy of herbal medicine an overview*. Fundam. Clin. Pharmacol: 19: 405-409.
- Farnsworth NR, Akerele O, Bingel AS, Soejarto DD, Guo Z. (1985). *Medicinal Plants in Therapy*. Bull of the World Health Organization.; 63 (6), 965 - 981.
- Fonnegra R, Jiménez S. (1999). *Plantas medicinales aprobadas en Colombia*. Universidad de Antioquia.
- Lagarto A, Couret M, Guerra I, López R. (2008). *Toxicidad aguda oral y ensayos de irritación de extractos acuoso e hidroalcohólico de Momordica charantia L*. Rev Cubana Plant Med, vol.13, n.3. Citado 14 de diciembre del 2010. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102847962008000300005&lng=es&nrm=iso
- Li E.(2005). El Futuro de las Plantas Medicinales del Altiplano y los Valles Centrales de los Andes. Citado el 09 noviembre del 2010. Disponible en: http://www.unido.org/fileadmin/import/69934PERU_Informe_final_plantas_medicinales_2vf.pdf
- Lock de Ugaz, O. (1994). *Investigación Fitoquímica. Métodos de estudios de productos naturales*. 2º Edición. Lima: Fondo Editorial PUCP.
- Morón, F. (2002). *Plantas medicinales y medicamentos herbarios*. En: Morón FJ, Levy M. Farmacología general. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; p. 195-205.
- Mosberg AT, Hayes WA.(2000). Subchronic Toxicity Testing. In: Wallace Hayes A, editor. Principles and methods of toxicology.2 ed. New York: Raven Press, p.221-237.
- Mukherjee P. (2002). *Quality Control of Herbal Drugs*. Business Horizons (ed). New Delhi.
- OECD. (2000). *Guidelines for testing of chemicals. Acute oral toxicity. Acute Toxic Class Method. Organization for Economic Cooperation and Development. Guide No. 423*. Citado el 01 de diciembre del 2010. Disponible en: <http://www.oecd.org>.
- Okerele, O. (1984). *Programas de medicina tradicional: progresos y perspectivas*. Crónicas OMS; 38(2):83-8.
- Villar AM. (1999) Farmacognosia General. Madrid: Ed Síntesis.