



Evaluación de la bioactividad de plantas medicinales cultivadas en el Perú usando la prueba de letalidad de *Artemia salina*

José Aranda-Ventura¹, Jorge Villacrés-Vallejo^{1,2}, Lener Núñez-Tuesta¹, Paul Marín-Sisley³, Luis Nonato-Ramírez⁴, German González-Aspajo^{1,5}

Información del artículo

Hist

Recibido: 15/12/18
Aprobado: 30/12/18

Autor correspondiente

José Aranda-Ventura
aranven9@yahoo.es

Financiamiento

El presente estudio fue financiado con presupuesto del Instituto de Medicina Tradicional (IMET) del Seguro Social de Salud (EsSalud).

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Citar como

José Aranda-Ventura, Jorge Villacrés-Vallejo, Lener Núñez-Tuesta, Paul Marín-Sisley, Luis Nonato-Ramírez, German González-Aspajo. Evaluación de la bioactividad de plantas medicinales cultivadas en el Perú usando la prueba de letalidad de *Artemia salina*. Rev Peru Med Integrativa.2018;3(3):132-7.

Resumen

Objetivo. Determinar la bioactividad de trece plantas medicinales peruanas a través de su capacidad citotóxica. **Materiales y métodos.** Se elaboraron extractos acuosos, hidroalcohólicos, o zumos liofilizados de las especies vegetales seleccionadas. La citotoxicidad *in vitro* fue evaluada usando la prueba de letalidad de *Artemia salina*, con la determinación de la concentración letal media (LC_{50}). El potencial citotóxico de las muestras de extractos evaluados, se clasificaron en: a) no tóxico: $LC_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$; b) baja toxicidad: $500 < LC_{50} \leq 1000 \mu\text{g/mL}$; c) toxicidad moderada: $100 < LC_{50} \leq 500 \mu\text{g/mL}$, y d) alta toxicidad: $LC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$. **Resultados.** Los diferentes extractos del rizoma de *Curcuma longa* mostraron una potente actividad citotóxica, con LC_{50} entre $20,67 \pm 7,04$ y $98,14 \pm 2,64 \mu\text{g/mL}$. Los extractos de rizoma de *Zingiber officinale*, del fruto de *Physalis angulata* y la planta entera de *Physalis angulata* también mostraron actividad citotóxica con LC_{50} de $87,15 \pm 18,17$, $323,48 \pm 18,85$ y $328,92 \pm 23,08 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. **Conclusión.** Se encontró actividad citotóxica en los extractos de los rizomas de *Curcuma longa*, *Zingiber officinale*, así como el fruto y planta entera de *Physalis angulata*. Futuros estudios podrán determinar si la flora cultivada en el Perú puede ser una fuente para el desarrollo futuro de agentes antitumorales.

Palabras clave: citotoxicidad; *Artemia*; *Curcuma longa*; *Zingiber officinale*; *Physalis* (Fuente: DeCS)

Bioactivity of medicinal plants cultivated in Peru using *Artemia salina* lethality test.

Abstract

Objective. To determine the bioactivity of 13 Peruvian medicinal plants through their cytotoxic capacity. **Material and methods.** Aqueous, hydroalcoholic extracts or lyophilized juices of the selected plant species were elaborated. *In vitro* cytotoxicity was evaluated using the *Artemia salina* lethality test, with the determination of the mean lethal concentration (LC_{50}). The cytotoxic potential of the samples of evaluated extracts was classified into: a) non-toxic: $LC_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$, b) low toxicity: $500 < LC_{50} \leq 1000 \mu\text{g/mL}$, c) moderate toxicity: $100 < LC_{50} \leq 500 \mu\text{g/mL}$, and d) high toxicity: $LC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$. **Results.** The different extracts of the *Curcuma longa*'s rhizome showed a potent cytotoxic activity, with LC_{50} between 20.67 ± 7.04 and $98.14 \pm 2.64 \mu\text{g/mL}$. *Zingiber officinale* rhizome, *Physalis angulata* fruit and *Physalis angulata* whole plant extracts, also showed cytotoxic activity with LC_{50} of 87.15 ± 18.17 , 323.48 ± 18.85 and $328.92 \pm 23.08 \mu\text{g/mL}$, respectively. **Conclusion.** Cytotoxic activity was found in the extracts of *Curcuma longa*, *Zingiber officinale* rhizomes, as well as *Physalis angulata* fruit and whole plant extracts. Future studies will be able to determine if the flora cultivated in Peru could be a source for future development of antitumoral agents.

Keywords: Cytotoxicity; *Artemia*; *Curcuma longa*; *Zingiber officinale*; *Physalis* (Source: MeSH).

¹ Instituto de Medicina Tradicional (IMET) – Seguro Social de Salud (EsSalud)

² Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP).

³ Centro de Medicina Complementaria (CAMEC). Red Asistencial Loreto – Seguro Social de Salud (EsSalud)

⁴ Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP).

⁵ Facultad de Enfermería. Universidad Peruana del Oriente (UPO).

Introducción

El Perú tiene una rica cultura en medicina tradicional, posee una gran biodiversidad de especies vegetales (aproximadamente 25 000 especies), muchas de las cuales son utilizadas como plantas medicinales; tiene 28 de los 32 climas existentes en el mundo y 84 de las 103 zonas de vida conocidas en la tierra ⁽¹⁾. La Estrategia de la Organización Mundial de la Salud sobre Medicina Tradicional (2014-2023) estimó que un 80% de la población en países de bajos ingresos usan plantas medicinales; mientras que en nuestro país se estima que un 30% de los pacientes en consulta externa usan plantas medicinales antes de acudir a los servicios de salud convencionales ^(2,3).

Estos usos tradicionales son, usualmente, el primer camino hacia la investigación etnobotánica, la que en muchos casos propicia el descubrimiento de nuevos principios activos procedentes de especies vegetales que se aplican en la farmacología y la medicina ⁽⁴⁾. Dentro de todos los posibles usos farmacológicos de las plantas medicinales, una de las enfermedades que más se ha favorecido de estos descubrimientos es el tratamiento del cáncer; es así que se ha estimado que más del 60% de todas las drogas comerciales anticancerígenas provienen de fuentes naturales ^(5,6).

Diversos productos de origen vegetal han mostrado potencial anticancerígeno, al exponer efectos biológicos como inducción de la apoptosis, bloqueo de angiogénesis, acumulación de p53, supresión de la activación NF- κ B, detención del ciclo celular, inhibición de la enzima topoisomerasa, prevención de la oxidación del ADN, activación del sistema de detoxificación de carcinógenos, entre otros mecanismos ⁽⁷⁾.

En ese contexto, es necesario investigar nuevas fuentes naturales con potencial eficacia anticancerígena. Una de las pruebas iniciales más útiles, con bajo costo y de fácil manejo para determinar especies vegetales y compuestos bioactivos promisorios en este campo, es la prueba de letalidad de *Artemia salina*; en la cual, para determinar la toxicidad de una molécula se expone un extracto de planta o la fracción de dicho extracto, contra este crustáceo ⁽⁸⁾. Sus resultados se interpretan dependiendo del contexto en que se plantea el objetivo de la investigación, si la sustancia evaluada no es citotóxica es un indicador que esta sustancia puede ser bien tolerada por un sistema biológico, y si la sustancia es citotóxica es un indicador que esta sustancia puede contener compuestos bioactivos con potencial efecto antitumoral ⁽⁹⁾.

Es importante señalar que un estudio desarrollado por el National Cancer Institute de los Estados Unidos mostró que existe una fuerte correlación entre la prueba de letalidad de *Artemia salina*, y la inhibición del crecimiento *in vitro* en líneas celulares de tumores sólidos humanos ⁽¹⁰⁾; estos resultados han servido para que, actualmente, varios estudios utilicen esta prueba para establecer un mecanismo de selección preliminar de especies vegetales con potencial anticancerígeno ^(11,12).

Hay escasos estudios que han empleado la prueba de letalidad de *Artemia salina* para la evaluación del efecto citotóxico de plantas medicinales cultivadas en Perú ⁽¹³⁾, por lo que el objetivo de esta investigación es determinar la bioactividad de trece plantas medicinales peruanas a través de su capacidad citotóxica evaluada por el mencionado examen.

Materiales y métodos

Material vegetal

Las muestras de las especies: *Abuta grandifolia*, *Berberis vulgaris*, *Physalis angulata*, *Opuntia ficus-indica*, *Myrciaria dubia*, *Schukuhia pinnata*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Phyllanthus niruri*, *Notholaena nivea*, *Tiquilia paronnychioides*, *Gentianella alborosea*, *Zingiber officinale*, *Curcuma longa*; fueron recolectadas de diferentes zonas del Perú entre los años 2016 a 2018. Su caracterización y codificación se realizó en el Herbarium Amazonense-AMAZ, ubicado en Iquitos-Loreto (Tabla 1).

Preparación de los extractos

Los extractos evaluados en este estudio fueron preparados basados en la información tradicional recogida en los lugares de recolección de las muestras. La mayoría fueron preparados como extracto acuoso de sus hojas, tallos, raíces, flores, corteza y/o rizomas, dependiendo de cada especie vegetal; estas muestras fueron lavadas y luego secadas a una temperatura entre 37 a 40 °C en un ambiente con deshumidificador durante 72 h; seguidamente fueron cortadas en fragmentos pequeños para luego realizar los extractos acuosos al 10%. Finalmente, la solución concentrada fue liofilizada o atomizada. En el caso del rizoma de *Zingiber officinale* se elaboró extracto hidroalcohólico y, con el rizoma de *Curcuma longa*, se elaboraron extractos acuosos e hidroalcohólicos que fueron atomizados. En el caso de los frutos de *Physalis angulata* y *Myrciaria dubia*, se extrajeron los zumos que luego fueron liofilizados; finalmente, en el caso de la paleta de *Opuntia ficus-indica* el proceso fue semejante.

Prueba de letalidad de *Artemia salina*

Los quistes de *Artemia salina* (huevos de camarón) se seleccionaron, se hidrataron y luego se incubaron en solución salina al 3%; los huevos eclosionaron en 24 h proporcionando un gran número de larvas (nauplios). Los extractos fueron evaluados a concentraciones de 1000, 100, 10 y 1 µg/mL. Se colocaron diez larvas por tubo y se mantuvieron entre 22-27 °C durante 24 h bajo iluminación constante. El dicromato de potasio, $K_2Cr_2O_7$ (100 µg/mL) se usó como control positivo y la solución salina 3% como control negativo. Pasadas las 24 h de exposición se contó el número de larvas muertas y sobrevivientes. La concentración letal media (CL_{50}) se define como aquella en la que el 50% de las larvas de *Artemia salina* murieron dentro de las 24 h de exponerse al extracto.

El potencial citotóxico de las muestras de extractos evaluados, se clasificaron según lo descrito por Meyer ⁽⁶⁾: a) no tóxico $CL_{50} > 1000$ µg/ mL; b) baja toxicidad $500 < CL_{50} \leq 1000$ µg/ mL; c) toxicidad moderada $100 < CL_{50} \leq 500$ µg/ mL, y d) alta toxicidad $CL_{50} < 100$ µg/ mL.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron usando el análisis Probit para determinar valores de CL_{50} con intervalos de confianza del 95%, con apoyo del programa Microsoft Excel 2016 ®.

Resultados

Los extractos que mostraron alta toxicidad en la prueba de letalidad de *Artemia salina* fueron: extracto hidroalcohólico de *Zingiber officinale* (CL_{50} : 87,15±18,17 µg/mL); extracto hidroalcohólico gelatinizado de *Curcuma longa* (CL_{50} : 27,65±4,18 µg/mL); extracto hidroalcohólico de *Curcuma longa* sin gelatinizar (CL_{50} : 25,85±12,26 µg/mL); rizoma pulverizado de *Curcuma longa* (CL_{50} : 20,67±7,04 µg/mL), y extracto acuoso gelatinizado al 0,5% de *Curcuma longa* (CL_{50} : 98,14±2,64 µg/mL) (Tabla 1)

Mientras que los extractos que mostraron moderada toxicidad fueron: extracto acuoso gelatinizado 0,3 % de *Curcuma longa* (CL_{50} : 135,22±13,01 µg/mL), extracto acuoso de la planta entera de *Physalis angulata* (CL_{50} : 328,92±23,08 µg/mL) y el zumo del fruto de *Physalis angulata* (CL_{50} : 323,48±18,85 µg/mL). El resto de extractos vegetales se clasificaron como no tóxicos, ya que su IC_{50} fue mayor de 1000 µg/mL.

Tabla 1. Concentración letal media (IC 50) de la prueba de letalidad de *Artemia salina* de extractos vegetales utilizados en medicina tradicional

N.º	Nombre común	Nombre científico	Procedencia	Parte de la planta	Tipo Extr	C. Herb.	C. IMET	IC50 ± D S (µg/mL)
1	Abuta	<i>Abuta grandifolia</i>	Loreto	Corteza, tallos y hojas	EAL	42448	AGACLCTH050216	>1000
2	Agracejo	<i>Berberis vulgaris</i>	Ancash	Hojas	EAL	43042	BVACLH180817	>1000
3	Bolsa mullaca	<i>Physalis angulata</i>	Loreto	Planta entera	EAL	33677	PAACLP030216	328,92±23,08
4	Bolsa mullaca	<i>Physalis angulata</i>	Loreto	Fruto	ZFL	33677	PAACPL300317	323,48±18,85
5	Tuna	<i>Opuntia ficus-indica</i>	Loreto	Paleta	ZPL	41527	OFACLH060216	>1000
6	Camu camu	<i>Myrciaria dubia</i>	Loreto	Fruto	ZFL	41696	MDLPL280817	>1000
7	Canchalagua	<i>Schukuhia pinnata</i>	Huánuco	Tallos y hojas	EAL	41842	SPACLTH200517	>1000
8	Canela	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Oxapampa	Corteza	EAL	41639	CZACLC230817	>1000
9	Chanca piedra	<i>Phyllanthus niruri</i>	Loreto	Planta entera	EAL	26397	PNACLPE090316	>1000
10	Cuti cuti	<i>Notholaena nivea</i>	Huaraz	Planta entera	EAL	41460	NNACLHT010216	>1000
11	Flor de arena	<i>Tiquilia paronnychioides</i>	Piura	Flores	EAL	41677	TPACFL200517	>1000
12	Hercampuri	<i>Gentianella alborosea</i>	Junín	Tallos y hojas	EAL	19492	GAACLTH100216	>1000
13	Kion	<i>Zingiber officinale</i>	Loreto	Rizoma	EHAA	33881	ZOOHARSO.5%G230218	87,15±18,17
14	Curcuma	<i>Curcuma longa</i>	Loreto	Rizoma	EAG 0,3%A	37428	CLACARSO.3%G230318	135,22±13,01
15	Curcuma	<i>Curcuma longa</i>	Loreto	Rizoma	EHAGA	37428	CLOHARSO.8%G020418	27,65±4,18
16	Curcuma	<i>Curcuma longa</i>	Loreto	Rizoma	EHAA	37428	CLOHARS230218	25,85±12,26
17	Curcuma	<i>Curcuma longa</i>	Loreto	Rizoma	EAG 0,5%A	37428	CLACARSO.5%G200418	98,14±2,64
18	Curcuma	<i>Curcuma longa</i>	Loreto	Rizoma	SP	37428	CLRS140518	20,67±7,04

EAL: extracto acuoso liofilizado. ZFL: zumo del fruto liofilizado. ZPL: zumo de paleta liofilizada. EHAA: extracto hidroalcohólico atomizado. EAG%A: extracto acuoso% de gelatina atomizado. EHAGA: extracto hidroalcohólico gelatinizado atomizado. SP: seco y pulverizado. Se muestra la media de tres repeticiones y su desviación estándar +/-

Discusión

Los extractos acuosos, en su mayoría, no mostraron toxicidad en la prueba de letalidad de *Artemia salina* ($IC_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$), excepto los extractos de *Physalis angulata*, tanto como planta total así como fruto exhibieron moderada toxicidad; los extractos del rizoma de *Curcuma longa*, mostraron moderada y alta toxicidad, en tanto que todos los extractos hidroalcohólicos evaluados de *Zingiber officinale* y de *Curcuma longa* mostraron alta toxicidad ($IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$). Los resultados evidenciados en la mayoría de los extractos acuosos, es acorde con los métodos de preparación tradicional, en donde más remedios son preparados como simples extractos acuosos, los cuales suelen evitar posibles efectos tóxicos ⁽¹³⁾.

Entre los diferentes extractos evaluados, los hidroalcohólicos del rizoma de *Curcuma longa* cultivada en Iquitos-Perú, y su rizoma seco y pulverizado mostraron una potente actividad citotóxica, con valores de IC_{50} : 27,65; 25,85 y 20,67 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente; que se podrían considerar comparables con la citotoxicidad de agentes quimioterápicos como ciclofosfamida IC_{50} : 4,35 $\mu\text{g/mL}$ ⁽⁷⁾ y doxorubicina IC_{50} : 2,58 $\mu\text{g/mL}$ ⁽¹⁴⁾; aunque menos citotóxico que la vincristina IC_{50} : 0,91 $\mu\text{g/mL}$ ⁽¹⁵⁾. Estas propiedades se han atribuido a la presencia de curcumina, un polifenol que modula múltiples vías de señalización celular, lo que podría mitigar o prevenir muchos tipos diferentes de cáncer como los cánceres de mieloma múltiple, colorrectal, pancreático, de próstata, de pulmón, de cabeza y cuello, según modelos animales ⁽¹⁶⁾.

El Instituto de Medicina Tradicional-IMET de EsSalud, viene realizando una serie de estudios con diferentes extractos de *Curcuma longa* cultivada en Iquitos-Loreto; por ejemplo, en un informe preliminar se encontró que uno de estos extractos contiene entre 6 a 8% de curcumina ⁽¹⁷⁾, mientras que en un estudio previo se mostró evidencia del efecto antioxidante y hepatoprotector de estos extractos de *Curcuma longa* ⁽¹⁸⁾.

Se resalta la importancia del origen de las especies vegetales estudiadas, debido a que se conoce que el tipo de tierra y otras condiciones ambientales donde se cultivan las plantas medicinales influyen en la presencia y concentración de determinados metabolitos secundarios o principios activos; por ejemplo, se reportó que el extracto hidroalcohólico de rizomas de *Curcuma longa* colectada de la región forestal de Gujarat (India) tuvo una IC_{50} 555 $\mu\text{g/mL}$ ⁽¹⁹⁾, mientras que los extractos hidroalcohólicos de la *Curcuma longa* colectada

en Iquitos-Loreto (Amazonía del Perú), evaluadas en el presente estudio, tuvieron IC_{50} de 25,85 y 27,65 $\mu\text{g/mL}$, es decir, mostraron un mayor efecto citotóxico.

El extracto hidroalcohólico del *Zingiber officinale*, también mostró un importante efecto citotóxico (CL_{50} : 87,15 $\mu\text{g/mL}$); al respecto hay estudios que refieren que uno de sus principios activos, relacionados con el cáncer es el [6]-gingerol. Esta molécula parece ser un compuesto quimioterápico y quimiopreventivo seguro y potente que actúa a través de la detención del ciclo celular y la inducción de apoptosis en células tumorales orales y cervicales humanas ⁽²⁰⁾. Con respecto a los extractos de *Physalis angulata*, que mostraron citotoxicidad moderada (CL_{50} : 328,92 $\mu\text{g/mL}$ y CL_{50} : 323,48 $\mu\text{g/mL}$), también son de importancia promisorio para desarrollar medicina herbal estandarizada con efecto anticancerígeno, dado que se ha reportado previamente que los principios activos de esta especie serían los witanólidos, uno de ellos la fisagulida P. Este compuesto ha mostrado poseer citotoxicidad significativa contra líneas celulares de osteosarcoma MG-63, hepatoma HepG-2 y cáncer de mama MDA-MB-231, con valores de IC_{50} 3,5; 4,22 y 15,74 μM respectivamente ⁽²¹⁾.

Por otro lado, la ausencia de citotoxicidad frente a *Artemia salina* es un indicador de que la parte de la planta evaluada puede ser bien tolerada por los sistemas biológicos; sin embargo, la constatación con mayor precisión del potencial toxicológico implica la necesidad de más estudios, como pruebas *in vivo*, para aclarar los aspectos relacionados con la toxicidad ⁽²²⁾. Adicionalmente, hay que considerar que la presencia de citotoxicidad implica la necesidad de estudiar la seguridad del uso de estos extractos derivados de plantas ⁽²³⁾. Por ende, el diseño de este estudio no puede afirmar totalmente que la administración de estas especies vegetales sea o no tóxica para las personas que lo consumen. Asimismo, la citotoxicidad *in vitro* mostrada por los extractos vegetales evaluados es un indicador inicial que abre la posibilidad de evaluar si existe o no actividad antitumoral en modelos *in vivo*, en donde se podría corroborar la actividad antitumoral haciendo, por ejemplo, un tamizaje en líneas celulares de cáncer y así detectar efectos citotóxicos específicos ⁽¹⁵⁾.

Finalmente, se concluye que se encontró actividad citotóxica en los extractos de los rizomas de *Curcuma longa*, *Zingiber officinale*, así como el fruto y planta entera de *Physalis angulata*. Futuros estudios podrán determinar si la flora cultivada en el Perú puede ser una fuente para el desarrollo futuro de agentes antitumorales.

Referencias bibliográficas

1. Lock O, Perez E, Villar M, Flores D, Rojas R. Bioactive Compounds from Plants Used in Peruvian Traditional Medicine. Nat Prod

- Commun [Internet]. 2016 Mar [cited 2019 Jan 23];11(3):315–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27169179>

2. Organización Mundial de la Salud. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023 [Internet]. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2013. Available from: <http://apps.who.int/medicinedocs/es/m/abstract/Js21201es/>
3. Mejía Gálvez JA, Carrasco R E, Miguel R JL, Flores S SA. Conocimiento, aceptación y uso de medicina tradicional peruana y de medicina alternativa/complementaria en usuarios de consulta externa en Lima Metropolitana. Rev Peru Med Integr [Internet]. 2017 Jul 18 [cited 2019 Jan 23];2(1):47. Available from: <http://rpm.pe/ojs/index.php/RPMI/article/view/44>
4. Mathur S, Hoskins C. Drug development: Lessons from nature. Biomed reports [Internet]. Spandidos Publications; 2017 Jun [cited 2019 Jan 23];6(6):612-4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28584631>
5. Cragg GM, Newman DJ. Nature: a vital source of leads for anticancer drug development. Phytochem Rev [Internet]. Springer Netherlands; 2009 Jun 24 [cited 2019 Jan 23];8(2):313-31. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11101-009-9123-y>
6. Monteiro JA, Ferreira Júnior JM, Oliveira IR, Batista FLA, Pinto CCC, Silva AAS, et al. Bioactivity and Toxicity of *Senna cana* and *Senna pendula* Extracts. Biochem Res Int [Internet]. Hindawi; 2018 Apr 2 [cited 2019 Jan 23];2018:1-10. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bri/2018/8074306/>
7. Ashraf A, Sarfraz RA, Rashid MA, Mahmood A, Shahid M, Noor N. Chemical composition, antioxidant, antitumor, anticancer and cytotoxic effects of *Psidium guajava* leaf extracts. Pharm Biol [Internet]. 2016 Oct 2 [cited 2019 Jan 23];54(10):1971-81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26841303>
8. Logarto Parra A, Silva Yhebra R, Guerra Sardíñas I, Iglesias Buela L. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. Phytomedicine [Internet]. 2001 Sep [cited 2019 Jan 23];8(5):395-400. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11695884>
9. Rajabi S, Ramazani A, Hamidi M, Naji T. *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. Daru [Internet]. Springer; 2015 Feb 24 [cited 2019 Jan 23];23(1):20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25888940>
10. Jacques Quignard EL, Nunomura SM, Pohlit AM, Alecrim AM, da Silva Pinto AC, Portela CN, et al. Median Lethal Concentrations of Amazonian Plant Extracts in the Brine Shrimp Assay. Pharm Biol [Internet]. Taylor & Francis; 2004 Jan 29 [cited 2019 Jan 23];42(3):253-7. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13880200490514186>
11. Lindamulage IKS, Soysa P. Evaluation of anticancer properties of a decoction containing *Adenanthera pavonina* L. and *Thespesia populnea* L. BMC Complement Altern Med [Internet]. BioMed Central; 2016 Feb 20 [cited 2019 Jan 23];16:70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26896952>
12. Joseph L, Aranjani JM, Pai KSR, Srinivasan KK. Promising anticancer activities of *Justicia simplex* D. Don . in cellular and animal models. J Ethnopharmacol [Internet]. 2017 Mar 6 [cited 2019 Jan 23];199:231-9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28163117>
13. Bussmann RW, Malca G, Glenn A, Sharon D, Nilsen B, Parris B, et al. Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern Peru. J Ethnopharmacol [Internet]. 2011 Sep 1 [cited 2019 Jan 23];137(1):121-40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21575699>
14. Khan I, Ahmad K, Khalil AT, Khan J, Khan YA, Saqib MS, et al. Evaluation of antileishmanial, antibacterial and brine shrimp cytotoxic potential of crude methanolic extract of Herb *Ocimum basilicum* (Lamiaceae). J Tradit Chinese Med = Chung i tsa chih ying wen pan [Internet]. 2015 Jun [cited 2019 Jan 24];35(3):316-22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26237837>
15. Ullah MO, Haque M, Urmi KF, Md. Zulfiker AH, Anita ES, Begum M, et al. Anti-bacterial activity and brine shrimp lethality bioassay of methanolic extracts of fourteen different edible vegetables from Bangladesh. Asian Pac J Trop Biomed [Internet]. 2013 Jan [cited 2019 Jan 24];3(1):1-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23570009>
16. Devassy JG, Nwachukwu ID, Jones PJH. Curcumin and cancer: barriers to obtaining a health claim. Nutr Rev [Internet]. 2015 Mar 1 [cited 2019 Jan 24];73(3):155-65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26024538>
17. La Molina Calidad Total Laboratorios. Informe de Ensayo N° 005639-2017. Determinación de Curcumina en muestras de Curcuma longa procedentes de Iquitos-Loreto. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina; 2017.
18. Canelo-Saldaña P, Mendoza-Gardini Y, Villacres Valjejo J, Aranda-Ventura J, Gonzalez-Aspajo G. Análisis fitoquímico, actividad antioxidante y hepatoprotectora del extracto acuoso liofilizado de *Curcuma longa* en lesiones hepáticas inducidas con tetraclorometano en ratas albinas. Rev Peru Med Integr [Internet]. 2017 Dec 19 [cited 2019 Jan 24];2(3):765. Available from: <http://www.rpmi.pe/ojs/index.php/RPMI/article/view/60>
19. Almeshdar H, Abdallah HM, Osman A-MM, Abdel-Sattar EA. In vitro cytotoxic screening of selected Saudi medicinal plants. J Nat Med [Internet]. 2012 Apr 28 [cited 2019 Jan 24];66(2):406-12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21953271>
20. Kapoor V, Aggarwal S, Das SN. 6-Gingerol Mediates its Anti Tumor Activities in Human Oral and Cervical Cancer Cell Lines through Apoptosis and Cell Cycle Arrest. Phyther Res [Internet]. 2016 Apr [cited 2019 Jan 24];30(4):588-95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26749462>
21. Gao C, Li R, Zhou M, Yang Y, Kong L, Luo J. Cytotoxic withanolides from *Physalis angulata*. Nat Prod Res [Internet]. 2018 Mar 19 [cited 2019 Jan 24];32(6):676-81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28617049>

22. Pereira EM, Leite Filho MT, Mendes F de A, Martins ANA, Rocha APT. Potencial toxicológico frente *Artemia salina* em plantas condimentares comercializadas no município de Campina Grande-PB. Rev Verde Agroecol e Desenvol Sustentável [Internet]. 2015 Mar 17 [cited 2019 Jan 24];10(1):52. Available from: <http://www.gvaa.com.br/revista/index.php/RVADS/article/view/3327>
23. Francisco D, Arrebola A, Alfredo L, Fernández R. Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia , algunas consideraciones y su utilidad . Rev Toxicol En Linea [Internet]. 2003;40–52.