

Efectos citotóxicos producidos por el extracto de *Angostura trifoliata* (Willd) T.S. Elías-Rutaceae en células Vero

Cytotoxic effects produced by the extract of *Angostura trifoliata* (Willd) T.S. Elías Rutaceae in Vero cells

Gimón, Yenys; Padrón-Nieves, Maritza

 Yenys Gimón

yenngim@yahoo.com

Farmacéutico. MSc. en Toxicología, Prof. Asistente Cátedra de Farmacología y Toxicología. Escuela “Luis Razetti”, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Sección de Investigaciones Cardio-renales-IME. Caracas, Venezuela

 Maritza Padrón-Nieves

mpadron43@gmail.com

Biólogo. Dra. en Farmacología, Prof. Titular Cátedra de Farmacología y Toxicología. Escuela “Luis Razetti”, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Sección de Investigaciones Cardio-renales-IME. Caracas, Venezuela

Revista Digital de Postgrado
Universidad Central de Venezuela, Venezuela
ISSN-e: 2244-761X
Periodicidad: Cuatrimestral
vol. 14, núm. 2, e421, 2025
revistadpgmeducv@gmail.com

Recepción: 02 de marzo de 2025
Aprobación: 18 de junio de 2025

DOI: <https://doi.org/10.37910/RDP.2025.14.2.e421>

Cómo citar: Gimón Y, Padrón-Nieves M. Efectos citotóxicos producidos por el extracto de *Angostura trifoliata* (Willd) T.S. Elías-Rutaceae en células Vero. Rev. Digit Postgrado 2025;14(2): e421.doi:10.37910/RDP.2025.14.2.e421

Resumen: El objetivo de este estudio fue determinar los efectos citotóxicos producidos por el extracto de la corteza AT en células Vero. Métodos: Se realizó un estudio experimental utilizando el extracto AT obtenido por el método de Soxhlet, desecado y diluido en buffer fosfato salino. La viabilidad celular se determinó con metil tetrazolio (MTT) y en presencia del extracto AT a 10, 20, 30, 50 y 55 µg/ ml que fueron probadas en una densidad de 4.000 células por pozo. Para establecer alteraciones morfológicas se utilizó la coloración May-Grunwald/Giemsa a 10, 20 y 30 µg/µL en una densidad de 200.000 células/mL. Se incubaron durante 24 y 48 horas de exposición y se comparó con el grupo control respectivo. Se analizaron los datos obtenidos con el programa Graph PadPrism versión 5.0. Resultados: El extracto produjo disminución de la viabilidad celular significativa ($P<0,05$) con respecto al grupo control, que se evidenció por la formación de vacuolas y expansión nuclear proporcional al tiempo y a la concentración utilizada. Conclusión: el extracto de AT puede ser considerado como citotóxico.

Palabras clave: *Angostura Trifoliata*, Citotóxico, Citotoxicidad.

Abstract: The objective of this study was to determine the cytotoxic effects produced by the extract of the AT cortex in Vero cells. Methods: An experimental study was carried out using the AT extract obtained by the Soxhlet method, dried and diluted in salt phosphate buffer. Cell viability was determined with methyl tetrazolium (MTT) and in the presence of the AT extract at 10, 20, 30, 50 and 55 µg/ml that were tested at a density of 4,000 cells per well. To establish morphological alterations, the May-Grunwald/Giemsa stain at 10, 20 and 30 µg/µL at a density of 200,000 cells/mL was used. They were incubated for 24 and 48 hours of exposure and compared with the respective control group. The data obtained with the Graph PadPrism version 5.0 program were analyzed. Results: The extract produced a significant decrease in cell viability ($P<0.05$) with respect to the

control group, which was evidenced by the formation of vacuoles and nuclear expansion proportional to time and concentration used. Conclusion: AT extract can be considered as cytotoxic.

Keywords: *Angostura trifoliata*, Cytotoxic, Cytotoxicity, Células Vero.

INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud, ha publicado que el 80% de la población mundial, utiliza plantas medicinales para su atención primaria en salud principalmente por la creencia en: su efectividad, que todo lo natural es inocuo, la escasez de literatura sobre los efectos adversos que pueden producir, el bajo costo y la falta de regulación para su adquisición.⁽¹⁾

En Venezuela, el uso de plantas medicinales con fines curativos ha generado algunos casos de intoxicación tanto en niños como en adultos^(2,3), sin embargo, existe una tendencia cada día mayor al uso de plantas para la atención primaria en salud, entre ellas, la *Angostura trifoliata* (Willd) T.S. Elías (Rutaceae) (AT) que ha sido utilizada para el manejo de ciertas enfermedades como: la diabetes tipo II, la malaria, la tuberculosis e incluso para perder peso.⁽⁴⁾

En Latinoamérica, ha sido utilizada para: dispepsia, anorexia, gastritis, asma, tuberculosis, tosferina y para el tratamiento de la diabetes.⁽⁵⁾ En Europa, se ha utilizado como antipirético, antipalúdico, digestivo, para fiebres intermitentes, disentería, diarreas crónicas y tuberculosis.⁽⁶⁾

El árbol *Angostura trifoliata* (Willd) T.S. Elías, es muy frondoso, pudiendo alcanzar hasta 20 metros de altura, pertenece a la familia Rutaceae y al género Angostura. Sus hojas son trilobuladas de color verde, corteza parda amarillenta y flores de color blanco. Tradicionalmente es conocida como: quina de Guayana, quina de Nueva Andalucía, Angostura verdadera, cuspa, cusparea, cascarillo, quina blanca, quina amarilla.⁽⁷⁾ Cabe aclarar que no está presente en la bebida aromática y carminativa “Amargo de Angostura”.

De la corteza de *Angostura trifoliata* han sido aislados alcaloides del tipo quinolínicos tales como: angosturina, galipeína, cuspareína, galipenina, N-metil-4- hidrox-3-(2',3'-epoxi-isobutil)-2-quinolona, candicina y allocuspareína, los cuales han mostrado actividad contra el *Mycobacterium tuberculosis*.^(8,9)

En la actualidad, la búsqueda de la cura de ciertas enfermedades, sobre todo las enfermedades crónicas, ha impulsado a una gran parte de la población mundial a la utilización de plantas medicinales y mediante la información etnobotánica los investigadores reúnen datos sobre el uso de plantas medicinales, pero se requiere la validación de dichos usos, mediante, una investigación rigurosa que arroje resultados como, la veracidad o no de efectos terapéuticos de la planta y los diversos efectos tóxicos que puedan producir.

En este sentido, por investigaciones previas realizadas por la autora con el extracto de esta planta, usando una dosis única por vía intraperitoneal, se demostraron efectos: neurotóxicos, hiperglucémico, hiperkalémico y de hiperosmolaridad en ratones de la cepa INH (Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”)⁽¹⁰⁾, quedando pendiente realizar otros estudios preclínicos con el propósito de detectar posibles efectos tóxicos posteriores a su administración. Considerando estos aspectos, se planteó como objetivo de esta investigación el determinar los efectos citotóxicos producidos por el extracto de *Angostura trifoliata* (Willd) T.S. Elías. (Rutaceae) en células Vero.

MÉTODOS

Tipo de estudio: Este estudio se enmarca en la investigación básica y fue experimental.

Material vegetal: Las cortezas de *Angostura trifoliata* (Willd) T.S. Elías utilizadas para la presente investigación fueron recolectadas en el río Cuyuní, Sierra de Imataca del estado Bolívar. La identificación botánica de la planta fue realizada por el Dr. Stephen Tillett y la profesora Giovannina Orsini, en el Herbario

Ovalles de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela. Se dejó una muestra de referencia bajo el código de registro MYF 20936.

Las cortezas de *Angostura trifoliata* (Willd) T.S. Elías fueron desecadas a temperatura ambiente, una vez secas, fueron finamente molidas y sometidas a una extracción continua en la cámara de Soxhlet con etanol al 95% por 48 h a 80° C. El extracto obtenido fue filtrado para eliminar los residuos, luego se concentró a presión reducida hasta peso constante (eliminando el etanol) y guardado en un frasco ámbar herméticamente cerrado para evitar su descomposición química o contaminación microbiológica.

El extracto AT fue preparado a una concentración de 1 mg/mL en buffer fosfato salina (PBS), esterilizado mediante filtración por una membrana de 0,20 µm (Millipore®) y luego se conservó a temperatura ambiente bajo condiciones de esterilidad.

Línea celular Vero: La línea celular establecida fue la heteroploide Vero, obtenida del Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”. Son células aneuploides procedentes de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Esta línea fue iniciada en 1962, y son de amplio uso en cultivo celular como un buen modelo para realizar estudios toxicológicos, (11) debido a que son susceptibles a efectos de sustancias tóxicas; presentan características que las hacen óptimas para la realización de estudios morfológicos, como son la presencia de fibroblastos, citoplasma amplio y plano, y la elevada densidad de organelos citoplasmáticos. ⁽¹²⁾

Determinación de la viabilidad celular mediante el método de MTT: El método del metil tetrazolio (MTT) es un ensayo colorimétrico basado en la incubación de células con bromuro de este compuesto (3-(4,5-dimetiltiazol – 2- il) 2,5 – difenitetrazolio) que es de color amarillo soluble en agua, y cuando es captado por células vivas por endocitosis se reduce por la acción de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenada (SDH), al romper el anillo de tetrazolium, se convierte en un compuesto insoluble de color morado. Este compuesto es llamado formazán, que se acumula en los lisosomas y es transportado a la superficie celular mediante un proceso de exocitosis. ⁽¹³⁾

El formazán obtenido, fue disuelto con dimetil sulfóxido (DMSO) y la absorbancia fue leída con un lector de placas de ELISA a 570 nm, ya que es directamente proporcional al número de células metabólicamente activas (vivas). Este método permite además, cuantificar el crecimiento celular por medición de la absorbancia, y puede ser aplicado tanto sobre una monocapa celular confluyente como semiconfluyente, lo que nos permitió detectar como afecta o no el crecimiento celular, ^(14,15) por lo que se utiliza como un indicador directo de la viabilidad celular y es adecuado para determinar proliferación de células en muestras frescas o congeladas hasta por tres semanas a -70 °C. ⁽¹⁶⁾ Si bien se considera que la reducción del MTT se produce en las mitocondrias, se ha descrito también la reducción de este compuesto en otros compartimientos celulares.

Las células Vero se sembraron en placas fondo plano de 96 pozos a una densidad de 4.000 células/pozo fueron incubadas en una atmosfera húmeda de 5 % de CO₂ a 37 °C por 48 horas, verificando las características del cultivo mediante un microscopio invertido a ciertos intervalos de tiempo hasta confluencia en monocapa. Transcurrido este tiempo, se cambió el medio de cultivo y fueron incorporadas diferentes concentraciones del extracto AT a evaluar (10, 20, 30, 50 y 55 µg/ mL). Se incubaron por 24 y 48 horas, tiempo en el cual fue retirado por inversión energética y se adicionó 50 µL de MTT diluido en solución buffer fosfato (PBS) a una concentración de 0,4 mg/mL en cada pozo. Las placas fueron incubadas por 3 horas a 37 °C y 5 % CO₂. Posteriormente, se descartó el MTT y se agregó 100 µL DMSO para solubilizar el formazán y realizar la respectiva lectura en un lector de ELISA a una longitud de onda 570 nm para la determinación de la concentración citotóxica media o concentración citotóxica cincuenta (CC₅₀).

Evaluación morfológica del cultivo de células Vero: Para analizar alteraciones morfológicas y el comportamiento in vitro, las células fueron cultivadas en tubos de Leighton a una densidad de 200.000 células/mL, incubadas en medio nutritivo en una atmosfera húmeda de 5 % de CO₂ a 37 °C para permitir su adherencia de las células a las laminillas por 24 horas. Pasado este tiempo, se expusieron las células con el extracto AT a concentraciones de 10, 20 y 30 µg/mL por 24 y 48h, luego fueron fijadas con metanol para su evaluación morfológica mediante coloración de May-Grunwald/Giemsa. Para obtener buenos resultados se realizó la tinción durante las dos horas siguientes a la preparación del colorante. También, se tuvo el

cuidado con la homogeneidad de las células incubadas en las laminillas para obtener una mejor fijación del colorante.

Para la coloración de las células se siguieron las siguientes fases: se cubrieron las laminillas con 2 mL del colorante May-Grünwald y se dejó actuar durante 5 min; después, se retiró el exceso de colorante inclinando el portaobjetos y se lavó ligeramente con agua destilada, seguidamente, se cubrió con Giemsa recién diluido en una proporción 1:18 con agua tamponada a un pH entre 7,0 – 7,2 y se dejó en contacto por 20 min. Luego se lavó con el agua tamponada y se dejó secar a temperatura ambiente; seguidamente se lleva a cabo la deshidratación de las laminillas haciéndolas pasar rápidamente por una mezcla de soluciones de acetona-xileno. Finalmente, se montaron con bálsamo de Entellam en un porta-objetos perfectamente limpio y se dejaron secar al aire, para su posterior lectura al microscopio óptico con aumento 100x.

Consideraciones éticas: Este trabajo recibió el aval del Comité de Bioética del Instituto de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UCV (CB-IME) en enero del 2021.

Análisis estadístico: Los datos fueron expresados como la media más o menos el error estándar de la media a un 95 % de confianza, donde “n” se corresponde al número de determinaciones realizadas por cada grupo. Todos estos resultados fueron analizados y graficados mediante el programa Graph PadPrism versión 5.0, considerándose como diferencia estadísticamente significativa entre los grupos cuando $P < 0,05$.

RESULTADOS

A la concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ del extracto AT, las pruebas de viabilidad celular por el método de MTT muestran diferencias significativas con respecto al control a 24 y 48 horas, observándose un porcentaje de 85,4 % promedio de células viables que representa una tasa de muerte celular de 12,6 % ($p < 0,05$). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos de células tratadas con el extracto AT a esa dosis ($p > 0,05$). Por otra parte, la toxicidad aumentó al incrementar la concentración del extracto AT, a 55 $\mu\text{g/mL}$ se encontró que el porcentaje de viabilidad cayó a 76,2 % a las 48 horas de exposición correspondiéndose a una tasa de muerte del 26,8 %, valor que fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$) respecto al grupo control, pero no respecto a la misma dosis a las 24 horas, como se observa en la Figura 1.

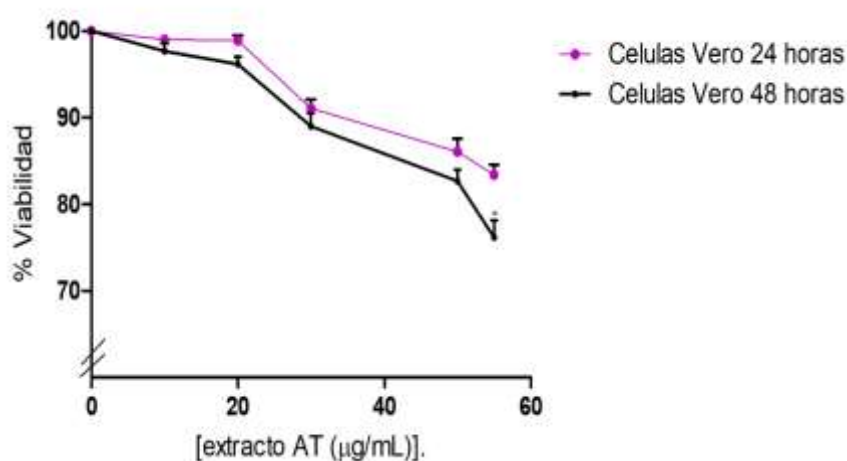


FIGURA 1.

Efecto del extracto de *Angostura trifoliata* (Willd) T.S. Elías sobre la viabilidad de la línea celular renal Vero a concentraciones crecientes del extracto. - = Expuestas durante 24h. -- = Expuestas durante 48 h. * = Diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Por otro lado, se evaluó el efecto del extracto de *Angostura trifoliata* (Willd) T.S. Elías a concentraciones de 10, 20 y 30 $\mu\text{g/mL}$ a 24 h y 48 horas, respectivamente, con respecto al grupo control, sobre la morfología de la línea celular renal Vero. En las Figuras 2 y 3 se observan imágenes de las estructuras de células, obtenidas por microscopía óptica de contraste de fase (CF) a diferentes amplitudes desde 10x a 40x. A cada grupo se le asignó una letra: serie A, para las muestras control; serie B: células tratadas con 10 $\mu\text{g/mL}$; serie C: células tratadas con el extracto 20 $\mu\text{g/mL}$ y serie D: células tratadas con 30 $\mu\text{g/mL}$.

Las células Vero control presentaron la morfología fibroblástica característica de esta línea celular, con un citoplasma amplio y plano en el que se observaron gran cantidad de organelos y se identificaron con claridad el núcleo y los nucléolos, sin cambios significativos que describir. Por su parte, en las células tratadas con el extracto AT, se produjeron cambios morfológicos, observándose formación de múltiples vacuolas en el citoplasma, directamente proporcional a la concentración del extracto y al tiempo de exposición. De igual manera, en las láminas incubadas por 48 horas, se observó una expansión del núcleo significativa a la concentración de 30 $\mu\text{g/mL}$.

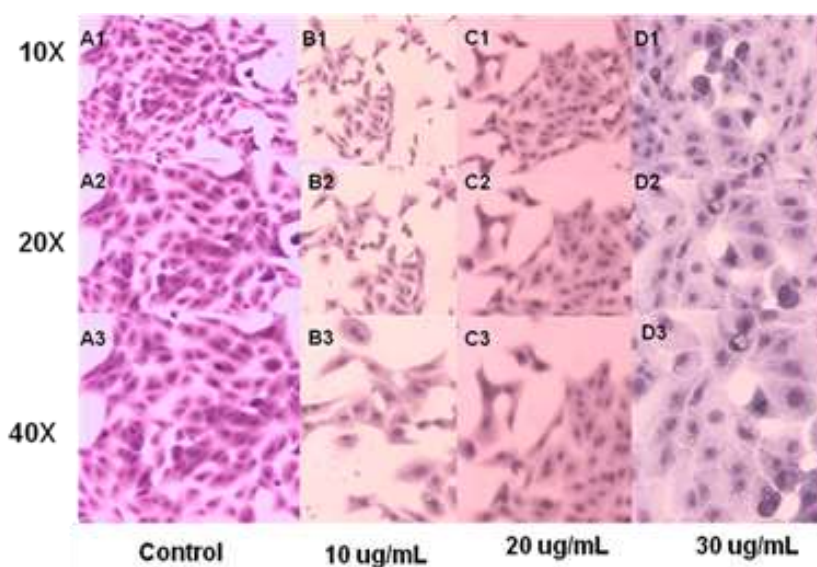


FIGURA 2.

Efectos de concentraciones crecientes del extracto *Angostura trifoliata* (Willd) T.S. Elías (Rutaceae) sobre la morfología de células Vero durante 24 horas. Control=A1 a 10X, A2 a 20X, A3 a 40X. Células tratadas con el extracto 10 $\mu\text{g/mL}$ = B1 a 10X, B2 a 20X, B3 a 40X. Células tratadas con el extracto 20 $\mu\text{g/mL}$ = C1 a 10X, C2 a 20X, C3 a 40X. Células tratadas con el extracto 30 $\mu\text{g/mL}$ = D1 a 10X, D2 a 20X, D3 a 40X. La morfología celular general se analizó a través de la observación directa de células vivas mediante microscopía óptica de contraste de fase (CF).

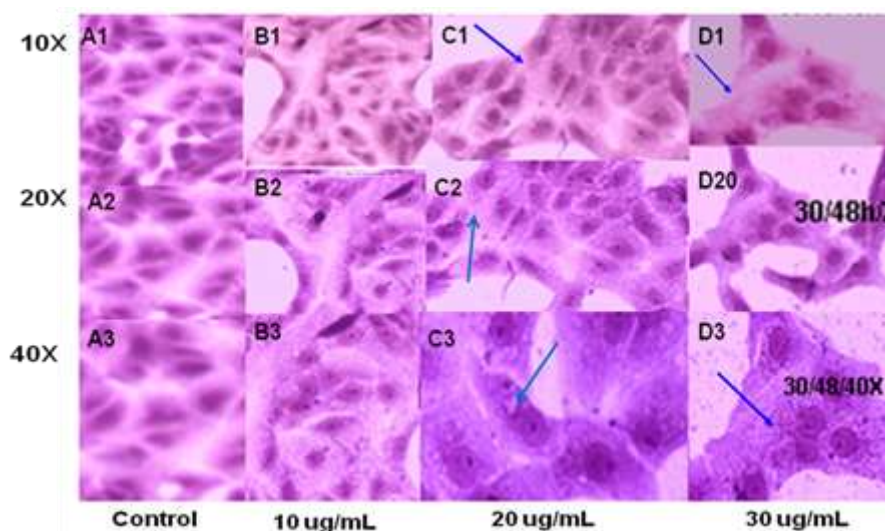


FIGURA 3.

Efectos de concentraciones crecientes del extracto *Angostura trifoliata* (Willd) T.S. Elías (Rutaceae) sobre la morfología de células Vero durante 48 horas. Control: A1 a 10X, A2 a 20X, A3 a 40X. Células tratadas con el extracto 10 ug/mL: B1 a 10X, B2 a 20X, B3 a 40X. Células tratadas con el extracto 20 ug/mL: C1 a 10X, C2 a 20X, C3 a 40X. Células tratadas con el extracto 30 ug/mL: D1 a 10X, D2 a 20X, D3 a 40X. La morfología celular general se analizó a través de la observación directa de células vivas mediante microscopía óptica de contraste de fase (CF).

DISCUSIÓN

El uso etnobotánico de plantas medicinales tiene, un innegable aceptación por parte de la población en general, y son utilizadas tanto para enfermedades crónica como la diabetes,⁽¹⁷⁾ así como para el tratamiento de enfermedades agudas tan compleja y reciente como el COVID-19^(18, 19) de ahí la importancia de realizar sus respectivos estudios de validación, los cuales deben transitar con la realización de pruebas de toxicidad, cuyos resultados tendrán en todo caso una utilidad científica importante. Siendo la citotoxicidad una de las pruebas iniciales usadas para evaluar la utilidad de una sustancia como herramienta farmacológica, debido a que mide el nivel de toxicidad de una determinada sustancia cuando interactúa directamente con las células. Dentro de las pruebas de citotoxicidad, los métodos de MTT y la coloración de May- Grunwald/Giemsa son muy fiables para determinar los efectos tóxicos a nivel celular de extractos de plantas medicinales.

En cuanto a la citotoxicidad, se utilizó el ensayo de reducción del MTT, que analiza principalmente el metabolismo oxidativo. Ya que este método determina la capacidad de las células de reducir la sal de tetrazolio a formazán después de su exposición a un compuesto presumiblemente tóxico, lo que permite obtener información acerca de la toxicidad ocasionadas en rutas metabólicas o en la integridad estructural, pudiendo estar o no relacionadas directamente con la muerte celular.⁽²⁰⁾

En este trabajo no se obtuvo la concentración tóxica cincuenta (CT₅₀), pero al comparar con el grupo control, se logró observar una disminución moderada de la viabilidad celular que fue proporcional al tiempo de exposición. Con una concentración de 55 µg/mL, la caída de la viabilidad celular fue del 12,6 % a las 24 horas y 26,8 % a las 48 horas. Por lo tanto, se puede afirmar que el extracto AT produce citotoxicidad basal cuantitativa sobre las células Vero.

Estos efectos se correlacionan con los hallazgos morfológicos observados en el estudio de coloración de May- Grunwald/Giemsa que permitió revisar en forma muy detallada las estructuras subcelulares,⁽²¹⁾ y se pudo distinguir que el extracto AT produjo la formación de múltiples vacuolas en el citoplasma en cantidad directamente proporcional a la concentración del extracto y al tiempo de exposición. De igual manera, en las láminas incubadas por 48 horas, se observó una expansión del núcleo significativo a la concentración de

30 µg/mL, demostrando que el extracto AT ejerce efectos citotóxicos sobre blancos intracelulares específicos de las células Vero con cambios morfológicos en la integridad del núcleo de estas células y al producir la disminución de la viabilidad celular observadas por el método del MTT quiere decir que también se ven afectadas las mitocondrias y los lisosomas. Las células muertas y aquellas que presentan daños en su membrana plasmática o una disfunción mitocondrial como consecuencia de la acción citotóxica de un xenobiótico no pueden reducir el MTT y, por lo tanto, no producen formazán.

Estos hallazgos de citotoxicidad, ya habían sido reportados para la línea celular PC-12 y en cultivo primario de células cerebrales de feto de ratón ⁽²²⁾. Así mismo, otros autores como Houghton et al. ⁽²³⁾ han demostrado que el extracto de la corteza de *Angostura trifoliata* contiene alcaloides quinolínicos e isoquinolínicos con actividad citotóxica para el *Mycobacterium Tuberculosis*.

Además, la autora ⁽²⁴⁾ encontró que el extracto AT en el tejido hepático causó: pérdida parcial de su arquitectura, binucleación, vasos congestivos con elementos inflamatorios, núcleos hiperclomáticos, espacios de Disse dilatados con hematíes y áreas de necrosis, mientras que, en el riñón, originó congestión vascular en los tubos contorneados proximales y distales, concomitante con ruptura y necrosis de la membrana basal.

Por lo tanto, aunque los sistemas experimentales son diferentes, y no se conozcan los mecanismos moleculares responsables, es posible que el extracto AT ejerza su efecto sobre diferentes estructuras esenciales para la supervivencia, la proliferación y/o la función celular, incluyendo la integridad de la membrana plasmática y del citoesqueleto, el metabolismo, la síntesis y degradación de constituyentes celulares, la regulación de iones y la división celular.

A pesar de que no se puede realizar una extrapolación entre los resultados obtenidos en ensayos in vitro y los in vivo se pudo observar, que el extracto AT produjo alteraciones en las células Vero a nivel morfológico cuyos efectos se ven reflejados en la disminución de células viables, lo que apoya el efecto deletéreo o histotóxico observado en el hipocampo, cerebelo y corteza cerebral de los ratones a quienes se le administró una dosis del extracto en trabajos. ⁽¹⁰⁾ Esto concuerda con numerosos estudios que muestran una buena correlación entre pruebas de citotoxicidad basal y valores de toxicidad aguda in vivo. ⁽²⁵⁾ Por lo tanto, se puede inferir que los componentes del extracto AT pueden interactuar directamente con ciertas estructuras celulares induciendo cambios importantes a nivel celular y subcelular en forma rápida en cuanto a sus estructuras y función.

CONCLUSIONES

Los hallazgos citológicos del estudio demuestran que *Angostura trifoliata* (Willd) T.S. Elías (Rutaceae) posee propiedades citotóxicas. Las alteraciones celulares observadas, como la formación de vacuolas, la expansión nuclear y la disminución de la viabilidad celular, sugieren que sus componentes interactúan directamente con estructuras celulares esenciales. Estos efectos se vieron reflejados en las pruebas de MTT y May-Grunwald/Giemsa, confirmando la toxicidad basal del extracto.

REFERENCIAS

1. World Health Organization (WHO). Quality Control methods for medicinal plant. 2011 Cañadas D, Parrón T, Sánchez C, Bonillo A. Benefits of kangaroo mother care on the physiological stress parameters of preterm infants and mothers in neonatal intensive care. International journal of environmental research and public health [Internet]. 2022 [consultado 14 de marzo de 2024];19(12):1-15. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9223087/>
2. Guerrero Y, Omaña B, Rodríguez A. Sobre un caso de intoxicación por el uso de la planta de estropajo o tusa (*Luffa cylindrica*) en Venezuela. VFT. Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica 2015; 34(4):58-61.
3. Tomat M, Salinas B, Ramírez M, Tropiano D. Ingestión de plantas en niños menores de 5 años con diarrea aguda infantil. Salus. 2010; 14(3):7-12.

4. Gimón Y, Guevara B, Collman T. Uso etnobotánico de la corteza de *Angostura trifoliata* (Willd) T.S. Elías en mercados populares en Anaco, Mérida y Bolívar. Libro de resúmenes del Primer Congreso Venezolano de Ciencia Tecnología e Innovación en el marco de la LOCTI-PEII. 2012; (2):278.
5. Gupta M. Plantas Medicinales Iberoamericana. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo “cyted”. Subprograma de química farmacéutica; Secretaría Ejecutiva Permanente del Cnvenio Andrés Bello. Santafé de Bogotá. 1995 p. 617.
6. Houghton PJ, Woldemariam TZ, Watanabe Y, Yates M. Activity against *Mycobacterium tuberculosis* of alkaloid constituents of *Angostura* bark, *Galipea officinalis*. *Planta Med.* 1999; 65(3):250-254.
7. Lindorf H. Un botánico francés en la Venezuela del siglo XVII. *Acta Bot Venez.* 2001; 24(2): 203-213.
8. Jacquemond I, Hannedouche S, Fourasté I, Moulis C. Novel quinoline alkaloid from trunk bark of *Galipea officinalis*. *Fitoterapia.* 2000; 71(5): 605–606.
9. Yang PY, Zhou YG. The enantio selective total synthesis of alkaloid galipeine. *Tetrahedron Asymmetry.* 2004; (15):1145–1149.
10. Gimón Y. Neurotoxicidad y cambios en la glicemia producidos por el extracto de *Angostura trifoliata* (Willd) T.S. Elías (Rutaceae) en roedores. Tesis de Maestría en Toxicología. 2011. Universidad Central de Venezuela. Caracas- Venezuela.
11. Fernández P, Peropadre A, Pérez JM, Herrero O, Hazen MJ. An integrated cellular model to evaluate cytotoxic effects in mammalian cell lines. *Toxicol. Vitro.* 2009; (23): 1553–1558.
12. Ammerman N, Beier-Sexton M, Azad A. “Growth and Maintenance of Vero Cell Lines,” *Current Protocols in Microbiology.* 2008;11(1).
13. Liut Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D. Mechanism of Cellular 3-(4,5- Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT). *J Neurochemistry.* 2002; 69(2): 581–593.
14. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol Methods.* 1983; (65):55–63.
15. Slotkin TA, MacKillop EA, Ryde IT, Tate CA, Seidler FJ. Screening for developmental neurotoxicity using PC12 cells: comparisons of organophosphates with a carbamate, an organochlorine, and divalent nickel. *Environ Health Perspect.* 2007; 115(1):93-101.
16. Bautista C, Acosta E, Toledo I. Evaluación de bioensayo MTT para determinar la proliferación in vitro de linfocitos de bovino, frescos y congelados. *Vet Méx.* 2000; 31(2).
17. Rezaei A, Farzadfard A, Amirahmadi A, Alemi M, Khademi M. Rezaei A, et al. Diabetes mellitus and its management with medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 2015; 4 (175):567-616.
18. Mirzaie A, Halaji M, Safarpour F, Ranjbar R, Noorbazargan H. A narrative literature review on traditional medicine options for treatment of corona virus disease 2019 (COVID-19). *Complementary Therapies in Clinical Practice.* 2020; 40(101214).
19. Ang L, Song E, Won Lee H, Lee M. Herbal Medicine for the Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J Clinical Medicine.* 2020; 9(5). DOI:10.211147.
20. Jiménez M, Martínez M. *Camellia sinensis* liver toxicity. *J Hepatol* 2007; (47):297– 298.
21. Hazen MJ, Fernández Freire P, Pérez Martín JM, Peropadre A, Herrero O, et al. The importance of microscopic analysis for accurate interpretation of chemical induced cytotoxicity. En: *Microscopy science technology applications and education.* Formatex. 2010; pp. 1–9.
22. 22. Gimón Y, Guevara B, Collman T, Gianguerotti C. Toxicidad Aguda en Ratones y Citotoxicidad Sobre Células Cerebrales de Fetos de Ratones INH y CÉLULAS PC-12 de Extracto de la Corteza de *Angostura trifoliata* (Willd) T.S Elías. XXI Congreso de Etnomedicina Italo Latinoamericano. Paestum- Italia 2012.
23. Houghton PJ, Woldemariam TZ, Watanabe Y, Yates M. Activity against *Mycobacterium tuberculosis* of alkaloid constituents of *Angostura* bark, *Galipea officinalis*. *Planta Med.* 1999; 65(3):250-54.
24. Gimón Y. Efectos histológicos hepático, renal y citotóxico relacionados con la hiperglicemia producida por el extracto de *Angostura trifoliata* (Willd) T.S. Elías (Rutaceae). Trabajo de ascenso para optar a la categoría de profesor asistente. 2022. Universidad Central de Venezuela. Caracas.

25. Clemenson C, Nordin M, Bjerregaard H, Clausen J, Forsby A, Gustafsson H, et al. Development of an in vitro test battery for the estimation of acute human systemic toxicity: An outline of the EDIT project. Evaluation-guided. *Altern. Lab Anim.* 2002; 30(3):313-21.