

Efecto Citotóxico del extracto acuoso del pericarpio de *Caesalpinia spinosa* "tara" en células meristemáticas de *Allium cepa* L. var. Arequipeña

José A. Aybar Ceferino¹; Fátima Zavala de la Cruz¹

¹ Laboratorio de Genética de Poblaciones de la Universidad Nacional de Trujillo
jaybar.jaac@gmail.com; fat_zdc@hotmail.com

Recibido: 14-07-2015

Aceptado: 04-05-2016

RESUMEN

Caesalpinia spinosa "tara" es un recurso natural nativo del Perú usado en la industria alimentaria, ampliamente utilizado en medicina popular por sus propiedades antiinflamatorias y antimicrobianas. En tal sentido, la presente investigación tuvo por objetivo determinar el efecto citotóxico del extracto acuoso del pericarpio de *C. spinosa* en células meristemáticas de *Allium cepa* con el propósito de verificar y explicar su propiedad curativa difundida en medicina popular. Para el efecto, se expusieron bulbos enraizados de *A. cepa* a 10 tratamientos obtenidos de la combinación de las concentraciones 0%, 0.42%, 0.83%, 1.25% y 1.67% del extracto acuoso y 8 y 24 horas de exposición en un diseño anidado completamente al azar. Se obtuvieron los preparados citológicos y se realizó el recuento de aproximadamente 3000 células, determinando luego, el Índice Mitótico (IM) y de Fases (IF), cuyos datos fueron procesados mediante análisis de varianza y comparación de medias. Los resultados mostraron diferencias significativas entre los tratamientos que disminuyen el IM en función al incremento de las concentraciones y tiempo de exposición, siendo el tratamiento de 0,42% durante 8 horas el que generó un IM menor respecto al control. Estas observaciones posiblemente se deban a compuestos tánicos con propiedades inhibitorias de las moléculas que intervienen y regulan el ciclo celular. Por tanto, el extracto acuoso del pericarpio de *C. spinosa* disminuye el Índice Mitótico en células meristemáticas de *A. cepa*, a las concentraciones y tiempos ensayados.

Palabras clave: Efecto citotóxico, *Caesalpinia spinosa*, Células meristemáticas, *Allium cepa*

ABSTRACT

Caesalpinia spinosa "tare" is a native natural resource of Peru used in the food industry, it is widely used in folk medicine for its anti-inflammatory and antimicrobial properties. In this sense, this research aimed to determine the cytotoxic effect of aqueous extract of the pericarp of *C. spinosa* in meristem cells of *Allium cepa* with the aim of explaining and to checking its curative property spread in popular medical. For this purpose, rooted bulbs of *A. cepa* were exposed to 10 treatments of 0%, 0.42%, 0.83%, 1.25% and 1.67% for 8 and 24 hours in a completely random nested design. Cytological samples were obtained and the count of approximately 3000 cells was performed, determining then the mitotic (MI) and Phase (IF) indexes, whose data were analyzed by variance analysis and mean comparison. The results showed significant differences between all treatments that reduce the IM according to the increase of concentration and exposure time, being the treatment of 0.42% for 8 hours which generated an IM lower compared to the control. These observations may be due to tannic compounds with inhibitory properties of the molecules involved and regulate the cell cycle. Therefore, the aqueous extract of the pericarp of *C. spinosa* mitotic index decreases in meristematic cells of *A. cepa*, tested at the concentrations and times.

Key words: Cytotoxic effect, *Caesalpinia spinosa*, Meristematic cells, *Allium cepa*.

I. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que un 80% de la población mundial depende de la medicina tradicional (Farnsworth y col., 1985) por atención primaria en salud, cultural y espiritual que generalmente involucra el uso de plantas con sustancias que se extraen y utilizan en la preparación de medicamentos populares, una práctica común en los países en desarrollo (Hoyos y col., 1992; Ishii y col., 1984). En la medicina popular, las plantas parecen abordar la causa de muchas enfermedades y tienen rendimientos superiores como resultados clínicos, por ello se consume como vegetal crudo, decocto, extracto, etc (Holetz y col., 2005).

En los últimos años, se han desarrollado diversas investigaciones en plantas de uso popular para precisar, comparar y clasificar sus diversas propiedades, encontrar los principios activos responsables de cortar, aliviar o curar las enfermedades, siendo una de ellas *Caesalpinia spinosa* (Lock, 1994).

C. spinosa, es una especie nativa del Perú, ampliamente distribuida en América Latina, abarcando diversas zonas áridas, en Venezuela, Colombia, Ecuador, Bolivia y el norte de Chile, siendo el Perú, el principal abastecedor de “tara” a nivel mundial debido a que posee climas y suelos que hacen posible el desarrollo de esta especie en varios departamentos del país como Apurímac, Ayacucho, Junín, Pasco, Huánuco, Cusco, Cajamarca, Huancavelica, Piura, Tacna y Ancash (Agrogestión, 2013; Dostert, 2009). Sin embargo, pese a su importancia económica y ecológica aún no existen estudios integrales acerca de las características bioquímicas y genéticas de este recurso (Villanueva, 2007).

Las vainas de *C. spinosa* contienen taninos hidrolizables (galotaninos) en un rango de 40% a 60% según las condiciones ecológicas y su hidrólisis conduce a la separación del ácido gálico, galato de etilo y cuatro galatos del ácido quínico correspondiendo a los ésteres metílicos de 4,5-di-O-galoilquínico y de 3, 4,5-tri-O-galoilquínico, y a los ácidos 3,4-di-O-galoilquínico y 3,4,5-tri-O-galoilquínico (Castillo y col., 2010). Estos metabolitos, junto con los flavonoides, tienen un efecto protector ante el daño oxidativo (García y col., 2010; De la Cruz, 2001).

Investigaciones realizadas “in vitro” determinaron actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de semillas de *C. spinosa* sobre la viabilidad de *Streptococcus* β hemolítico a concentraciones de 25% a 100% (Araujo y col., 2003). Del mismo modo, se ha demostrado que las vainas de *C. spinosa* tienen efecto antiinflamatorio cuando están constituidas en una pasta dental en el tratamiento de la gingivitis marginal crónica en niños (Rojas, 1998). También, presenta actividad antifúngica inhibiendo el crecimiento de *Fusarium solani* en 7,29 % a 33,83 % y *Phoma tarda* en 3,95 % a 32,20 % en el cultivo de café (Ferreira y col., 2005). Asimismo, Castañeda y col. (2012) determinaron una disminución significativa de la capacidad clonogénica de una colonia de células cancerígenas K562 (eritroleucemia humana) tratadas durante 6 horas con 20 ug/ml de un extracto de vainas con etil acetato y cultivadas durante 14 días.

La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a un daño en la célula (Arencibia y col., 2009) y para su evaluación se han utilizado diversos bioindicadores entre los que se encuentra *A. cepa* utilizado por Levan desde 1938, y que constituye un sistema de prueba eficiente que permite evaluar la citotoxicidad mediante la determinación del índice mitótico (Morais y Marin, 2009) ayudando a estimar la toxicidad potencial de extractos vegetales con fines medicinales (Repetto, 1995), razón por la que ha sido considerada en este estudio.

En tal sentido, el objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto citotóxico del extracto acuoso del pericarpio de *Caesalpinia spinosa* “tara” en células meristemáticas de *Allium cepa* L. var. Arequipeña .

II. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Vainas de *Caesalpinia spinosa* "tara"

Bulbos de *Allium cepa* var. arequipeña

2.2. LUGAR

Laboratorio de Genética de Poblaciones – Escuela de Ciencias Biológicas – Facultad de Ciencias Biológicas – Universidad Nacional de Trujillo.

2.3 MÉTODOS Y TÉCNICAS

2.3.1. Colección de frutos de *Caesalpinia spinosa*

Se recolectaron 8 kg de frutos de *C. spinosa* de árboles de 5 a 6 años de edad, en el margen izquierdo del río moche del distrito de Samne, Provincia de Otuzco, Departamento de la Libertad, a 1439 msnm (7° 59' 38.1"), con buenas condiciones fitosanitarias y morfológicas (color, tamaño, forma). Estos se almacenaron y fueron deshidratados a temperatura ambiente (20 °C) en sombra y aireación adecuada sobre hojas de papel absorbente con recambio interdiario durante una semana, con lo que se evitó la humedad y contaminación de los frutos.

2.3.2. Obtención del pericarpio de *Caesalpinia spinosa*

En la obtención del pericarpio se seleccionaron los frutos con un tamaño aproximado de 6 cm de longitud, luego se lavaron con agua potable y fueron llevados a una estufa a 45 °C, durante 15 minutos; posteriormente se procedió a aislar manualmente el pericarpio de las semillas.

2.3.3. Trituración del Pericarpio de *Caesalpinia spinosa*

La trituración del pericarpio deshidratado de *C. spinosa* se realizó en un molino casero, hasta obtener unidades de triturado de 0.03 mm de largo aproximadamente que fueron recepcionados en una Placa Petri.

2.3.4. Preparación de extractos acuosos de pericarpio de *Caesalpinia spinosa* (Lock, 1994).

Para la preparación de las infusiones del pericarpio de *C. spinosa* a 0%, 0.42%, 0.83%, 1.25%, 1.67%, se colocaron 1200 mL de agua mineral hervida a 100 °C en 4 vasos de precipitación de vidrio, luego, se agregaron los pericarpios triturados de 5 g., 10 g., 15 g., 20 g. respectivamente a cada vaso, agitándose con una varilla de vidrio para homogenizar y lograr un mejor extracción de los fitoconstituyentes hidrosolubles, posteriormente se dejó a enfriar hasta alcanzar temperatura ambiente (20 °C) y finalmente se filtró con papel Whatman N°01.

2.3.5. Obtención de raicillas de *Allium cepa* L. var. Arequipeña.

Para la obtención de las raicillas de bulbos de *Allium cepa*, se seleccionaron 100 bulbos de tamaño y forma similar; seguidamente se eliminaron manualmente las catáfilas y raicillas secas. Luego, se colocaron en vasos descartables de 300 cc de capacidad, sujetando los extremos del bulbo con palitos mondadientes, se agregó agua hasta cubrir el disco radicular, dejándolos enraizar en oscuridad y renovando el agua diariamente por tres días, hasta que se obtuvieron bulbos con raicillas de 2 a 3 cm de longitud.

2.3.6. Exposición y obtención de raicillas de *Allium cepa* L var. Arequipeña a cinco concentraciones de extractos acuosos del pericarpio de *Caesalpinia spinosa*.

La exposición de las raicillas de *Allium cepa* se llevó a cabo siguiendo un diseño anidado con 10 tratamientos; dentro de cada tratamiento se consideran tres bulbos enraizados y dentro de cada bulbo se eligieron al azar tres raicillas que fueron aislados de los bulbos al término de la exposición al tratamiento correspondiente y conservadas en solución Carnoy's en viales de vidrio hasta su posterior coloración (Anexo 1).

2.3.7. Obtención de los preparados citológicos

Para determinar el efecto de los extractos de *Caesalpinia spinosa* sobre el índice mitótico y el índice de fases de células meristemáticas de *A. cepa*, se realizaron los preparados citológicos en láminas portaobjetos mediante la técnica de Tjio y Levan (1956) (Anexo 2).

2.3.8. Recuento y análisis celular

Se analizaron aproximadamente 3000 células meristemáticas de *Allium cepa* de cada tratamiento, mediante la técnica de barrido en un microscopio Olympus, CX 00025, a un aumento de 40x registrándose el número de células y en cada una de ellas las fases del ciclo celular. Los índices mitóticos y de fases se calcularon por la ecuación 1 (Anexo 3).

2.3.9. Análisis estadístico de datos

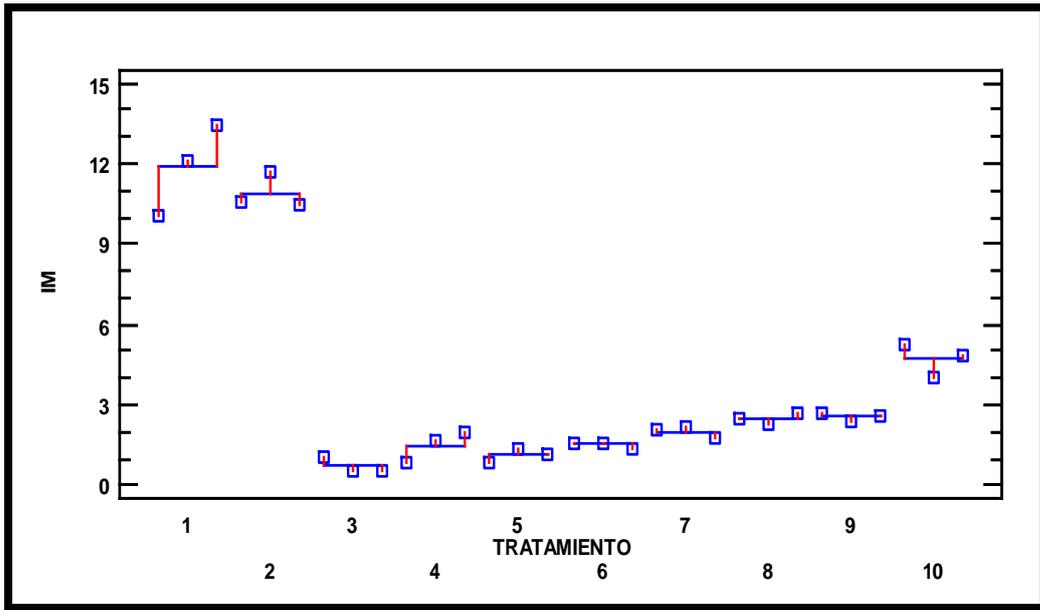
El análisis de los datos se realizó mediante el análisis de varianza (ANAVA), promedio, comparación de promedios, desviación estándar y coeficiente de variación, utilizando el programa STATGRAPHICS 5.1 (versión libre), para un diseño anidado.

III. RESULTADOS

Al evaluar el efecto del extracto acuoso del pericarpio de *Caesalpinia spinosa* “tara” a diferentes concentraciones y tiempos de exposición sobre células meristemáticas de *Allium cepa* L. var. Arequipeña, se observó disminución del índice mitótico (IM) en todos los tratamientos con extracto acuoso de *C. spinosa* en relación al control (Tabla 1, Fig. 1). Así mismo, el disminuido IM encontrado en los tratamientos que consideraron extracto mostró mayor frecuencia del índice profásico que los demás índices de fases con respecto al control (Fig. 2).

Tabla 1. Promedios de Índices mitóticos y de fases de células meristemáticas de *Allium cepa* expuestos a extractos acuosos del pericarpio de *Caesalpinia spinosa* “tara” a diferentes tiempos y concentraciones.

TRATAMIENTO		INDICE	INDICE	INDICE	INDICE	INDICE
%	Horas	MITOTICO ± D.E	PROFASICO ± D.E	METAFASICO ± D.E	ANAFASICO ± D.E	TELOFASICO ± D.E
0	8	11.9 ± 0.017	53.6 ± 0.12	17.5 ± 0.04	15.8 ± 0.04	13.1 ± 0.04
0	24	10.6 ± 0.012	61.2 ± 0.06	14.5 ± 0.03	11.6 ± 0.03	12.7 ± 0.03
0.42	8	0.7 ± 0.003	64.7 ± 0.12	6.7 ± 0.09	11.5 ± 0.08	17.1 ± 0.14
0.42	24	1.5 ± 0.005	48.2 ± 0.11	20.3 ± 0.06	16.3 ± 0.07	15.2 ± 0.07
0.84	8	1.2 ± 0.003	77.9 ± 0.03	12.2 ± 0.05	6.6 ± 0.02	3.3 ± 0.04
0.84	24	1.5 ± 0.004	66.7 ± 0.06	23.7 ± 0.04	7.0 ± 0.03	2.6 ± 0.03
1.25	8	2.0 ± 0.003	65.2 ± 0.08	24.9 ± 0.06	7.4 ± 0.03	2.5 ± 0.05
1.25	24	2.5 ± 0.004	60.9 ± 0.07	16.7 ± 0.04	10.6 ± 0.02	11.8 ± 0.02
1.67	8	2.6 ± 0.003	62.1 ± 0.05	17.5 ± 0.03	11.7 ± 0.08	8.7 ± 0.03
1.67	24	4.9 ± 0.007	60.4 ± 0.08	18.1 ± 0.02	11.6 ± 0.03	9.9 ± 0.02



$\alpha = 0.05$

Fig. 1. Diferenciación de grupos estadísticos de los tratamientos con extractos acuosos del pericarpio de *C. spinosa* "tara" a diferentes tiempos y concentraciones sobre el índice mitótico de *Allium cepa*.

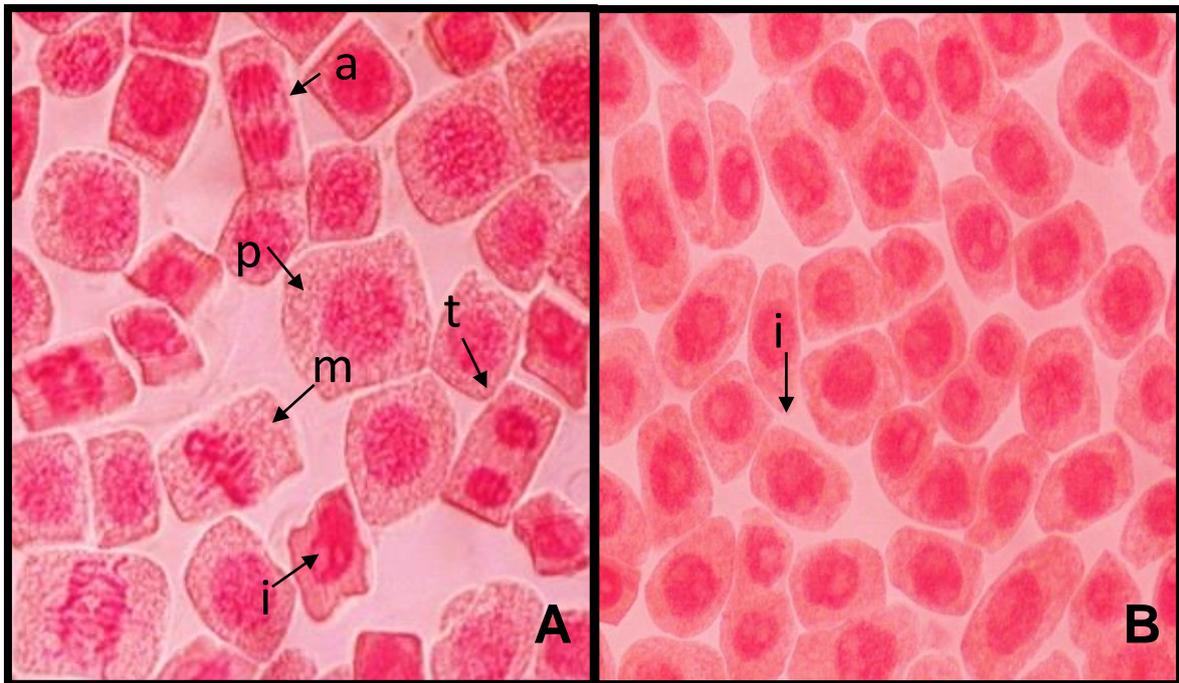


Fig. 2. Células meristemáticas de *Allium cepa* **A)** del tratamiento control a 0% durante 8 horas. Aumento 400 x **B)** expuestas al extracto de "tara" al 0.42 % durante 8 horas. Aumento 400x. (i) Interfase, (p) profase, (m) metafase, (a) anafase y (t) telofase.

IV. DISCUSIÓN

Al evaluar el resultado obtenido del Índice mitótico (IM) de raicillas de *A. cepa* expuestos al extracto acuoso de *C. spinosa*, se observó una disminución significativa del índice mitótico en todos los tratamientos con respecto al control (11.9 %), obteniéndose un valor de 0.7 % en el tratamiento de 0.42 % de extracto y 8 horas de exposición (Tabla 1; Figura 1). La disminución del IM de todos los tratamientos ensayados son similares a los reportados por Escobar (2008), quien observó disminución de la actividad de *Corynebacterium diphtherie* cuando las expuso a extractos alcohólicos de *C. spinosa* a una concentración del 25 %. Asimismo Huarino (2010), también observó disminución de la actividad bacteriana de la flora salival, cuando las enfrentó al extracto acuoso de vainas de *C. spinosaa* 12.5mg/ml.

Estos efectos probablemente se deban a la acción inhibitoria que ejercerían los fitoconstituyentes hidrosolubles del extracto acuoso de *C. spinosa* sobre la actividad de la topoisomerasa II, responsable de la modificación topológica de la molécula de ADN, afectando así los procesos de replicación y condensación cromosómica, por lo tanto, el proceso de división celular estaría inhibido con una consecuente disminución de la población celular mitótica (Alberts, 2002).

Al evaluar el resultado del Índice profásico (IP) de raicillas de *A. cepa* expuestos al extracto acuoso de *C. spinosa*, se observó un incremento del índice relativo de 77.9% en la concentración de 0.84% durante 8 horas con respecto al control con un valor de 53.6% (Tabla 1; Figura 2). Estos resultados muestran que la población celular mitótica se detiene en profase y comparándolas con las demás figuras mitóticas, presenta un mayor porcentaje. Sin embargo, este índice profásico relativo (IPR) es menor al índice profásico absoluto (IPA). Tales datos difieren con los reportados por Añanca (2009), quien observó actividad antibacteriana al inhibir el crecimiento de *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus*, cuando las enfrentó al extracto acuoso de vainas de *C. spinosaa* 13.7mg/ml y 16.25 mg/ml respectivamente.

Estos efectos probablemente se deban a que el extracto de *C. spinosa* inhibe la formación del complejo ciclina B – cdk1, el cual inicia la condensación del material genético y activa a un grupo de proteínas llamadas condensinas, encargadas del mantenimiento estructural de los cromosomas y de inducir el ensamble del huso mitótico, asegurando que los cromosomas se unan a este y consecuentemente a los procesos de condensación del material genético y polimerización de microtúbulos, por lo tanto las células no transitarían normalmente desde profase hacia metafase (Alberts, 2002).

Al evaluar el resultado obtenido del Índice metafásico, anafásico y telofásico de raicillas de *A. cepa* expuestos al extracto acuoso de *C. spinosa*, se observó una disminución estadísticamente significativa con un valor de 6.7%, 6.6% y 2.5%, respectivamente, a la concentración de 0.42% y 1.25% durante 8 horas con respecto al control con valores de 17.5%, 15.8% y 13.1%, respectivamente (Tabla 1), tales datos coinciden con los reportados por Liu, H (2002: 2), quien observó una disminución de la actividad bacteriana de *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, cuando las enfrentó extractos vegetales de cáscara de *C. spinosa*.

Con respecto a los valores observados en el índice metafásico, probablemente se deban a que el extracto de *C. spinosa* actuaría inhibiendo los procesos regulados por el complejo Ciclina B – Cdk1, el cual también estaría relacionado con la formación de los centros de organización de microtúbulos (COMT) que inducen el ensamblaje del huso mitótico; ello estaría desencadenando una serie de procesos moleculares que determinarían un cambio súbito en la funcionalidad de los cinetocoros, dejando de inducir la polimerización de microtúbulos que se elaboran perpendicularmente al eje mayor del cromosoma y se anclan por una de sus extremidades en el cinetocoro, por lo tanto lograrían transitar a metafase un número reducido de células (Alberts, 2002).

Con respecto al índice anafásico y telofásico, tales resultados se deban a la no degradación de la ciclina B, lo que traería como consecuencia que no se active el complejo promotor de la anafase (APC), el cual es responsable de activar moléculas como separasas, quinesinas y dineinas (MAPs) indispensables con los procesos de segregación cromosómica, por lo tanto algunas células no terminarían normalmente el proceso anafásico y telofásico (Alberts, 2002).

V. CONCLUSIONES

- El extracto acuoso del pericarpio de *Caesalpinia spinosa* "tara" tiene efecto citotóxico en células meristemáticas de *Allium cepa* al disminuir el Índice mitótico y de fases.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGROGESTIÓN. 2013. **Desarrollo de cultivos de kumquat y tara como alternativas agroindustriales de alto valor para la IV Región de Coquimbo**, PROYECTO FDI – CORFO.
- ALBERTS B. 2002. **Biología Molecular de la Célula**. 4º ed. Omega. Barcelona. 1020 – 1200.
- ARENCEBIA D, ROSARIO L, CURVECO D, 2009. **Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad**. Revista de toxicología en línea RETEL N° 19: 40-52. . (Fecha de acceso: 21 de Marzo del 2016). Disponible en:
http://www.sertox.com.ar/img/item_full/19003.pdf
- AÑANCA E. 2009. **Efecto antibacteriano in vitro del extracto acuoso de vainas de *Caesalpinia spinosa* (tara) en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes***. Tesis para optar el Título de Químico Farmacéutico. Fac Ciencias Médicas Escuela Académico Profesional de Farmacia y Bioquímica: Univ. Nac Jorge Basadre Grohmann. Tacna.
- ARAUJO J, CÓRDOVA B, RODRÍGUEZ M. 2003. **Cuantificación de la actividad antimicrobiana de *Caesalpinia spinosa* contra *Staphylococcus aureus***. II Congreso Peruano de plantas medicinales y fitoterapia. Lima- Perú.
- CASTAÑEDA D, POMBO L, UREÑA C, HERNÁNDEZ J, FIORENTINO S. 2012. **A gallotannin-rich fraction from *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze displays cytotoxic activity and raises sensitivity to doxorubicin in a leukemia cell line**. Complementary and Alternative Medicine 12:38
- CASTILLO, S.; CASTILLO V.; REYES A. 2010. **Estudio fitoquímico de *Plukenetia volubilis* y su efecto antioxidante en la lipoperoxidación inducida por Fe^{3+} ascorbato en hígado de *Rattus rattus var. Albinus***. Scientia. 2(1): 11 – 21.
- DE LA CRUZ, P. 2004. **Aprovechamiento integral y racional de la tara *Caesalpinia spinosa* – *Caesalpinia tinctoria***. Rev. Inst. investig. Fac. minas metal cienc. Geogr. v.7 n.14. 64 – 75.
- DOSTERT N. 2009. **Datos botánicos de Tara**. Edición 1º. Lima – Perú. (Fecha de acceso: 27 de Marzo del 2014). Disponible en:
http://www.biocomercioperu.org/admin/recursos/contenidos/Tara_factsheet_final.pdf
- ESCOBAR B. 2008. **Efecto in vitro de diferentes concentraciones de extracto alcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze, sobre la viabilidad de *Corynebacterium diphtheriae***. Rev. Med. Vallejiana. 5(1):28-37.
- FARNSWORTH, N.R., AKERELE, O.O., BINGEL, A.S., SOEJARTA, D.D. & ENO, Z. 1985. **Medicinal plants in therapy**. Bulletin World Health Organisation. 63, 965–98.
- FERREIRA J, CARDOSO M, ESTEVAO DE SOUZA P. 2005. **Inhibitory Effect of *Caesalpinia spinosa* Leaflets Crude Extract of *Fusarium solani* and *Phoma tarda***. J.ScientBiolgl. 27(2):185-188.
- GARCÍA, B.; GARCÍA, G.; ROJO, D.; SÁNCHEZ, G. 2001. **Plantas con propiedades antioxidantes**. Rev. Cubana Invest. Biomed. 20(3): 231-5.

- HOLETZ, R.B., NAKAMURA, T.U., FILHO, B.P.D., MELLO, J.C.P., DIAZ, J. A .M., TOLEDO, C.E.M. & NAKAMURA, C.V. 2005. **Biological effects of extracts obtained from *Stryphnodendronadstringens* on *Herpetomonas Samuel pessoai***. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 100, 4, 397-401.
- HOYOS, L.S., AU, W.W., HEO, M.Y., MORRIS, D.L. & LEGATOR, M.S. 1992. **Evaluation of the genotoxic effects of a folk medicine, *Petiveria alliacea* (anamu)**. Mutation Research, 280, 29- 34.
- HUARINO. 2011. **Efecto antibacteriano de *Caesalpinia spinosa* (tara) sobre flora salival mixta**. Tesis para optar el Titulo de Cirujano-Dentista. Fac. Odontol: Univ Nacional San Marcos Lima.
- ISHII, R., YOSHIKAWA, H., MINAKATA, N.T., KOMURA, K. &KADA, T. 1984. **Specificity of bioantimutagens in the plant kingdom**. Agricultural and Biological Chemistry, 48, 2587-2591.
- LIU H., LENGUA, L., LEÓN, G., LA TORRE, C., HUAPAYA, J., CHAUCA, J. 2002. **Evaluación de la Actividad Antibacteriana in vitro de los Extractos de *Caesalpinia spinosa* “tara” y *Eucalyptus sp.* “eucalipto”**. Revista Horizonte Médico; 2: 1,2.
- LOCK DE UGAZ O. 1994. **Investigación Fitoquímica, métodos en el estudio de productos naturales**. 2da ed. Lima – Perú: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú. 288 pág.
- Morais, D. y Marin-Morales, M. (2009). **Allium cepa test in environmental monitoring: A review on its application**. Mutation research 682: 71 – 81.
- REPPETO GRM. 1995. **Métodos alternativos: Estudios toxicológicos in vitro**. Madrid: Ediciones Díaz de Santos.
- ROJAS RJ. 1998. **Estudio clínico experimental del tratamiento de la gingivitis crónica con *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze- “Tara” – Centro de salud Max Arias Shereiber**. Tesis para optar el Titulo de Cirujano-Dentista. Fac Odontol: Univ San Martin de Porres. Lima.
- VILLANUEVA, C.2007. **La Tara, el oro verde de los incas**. Lima. Ed. AGRUM. Universidad Nacional Agraria La Molina. 163 pág.

ANEXO 1

Diseño anidado para determinar el efecto citotóxico del extracto acuoso del pericarpio de *Caesalpinia spinosa*, en células meristemáticas de *Allium cepa* L. var Arequipeña.

TRATAMIENTOS	TIEMPO (h)	CONCENTRACIONES []	RAICILLAS POR BULBO
T1	8h	[0%]	R1R1R1 R2R2R2 R3R3R3
T2	24h	[0%]	R1R1R1 R2R2R2 R3R3R3
T3	8h	[0.42%]	R1R1R1 R2R2R2 R3R3R3
T4	24h	[0.42%]	R1R1R1 R2R2R2 R3R3R3
T5	8h	[0.83%]	R1R1R1 R2R2R2 R3R3R3
T6	24h	[0.83%]	R1R1R1 R2R2R2 R3R3R3
T7	8h	[1.25%]	R1R1R1 R2R2R2 R3R3R3
T8	24h	[1.25%]	R1R1R1 R2R2R2 R3R3R3
T9	8h	[1.67%]	R1R1R1 R2R2R2 R3R3R3
T10	24h	[1.67%]	R1R1R1 R2R2R2 R3R3R3

ANEXO 2

Se realizaron 3 repeticiones para cada tratamiento. En cada uno se colocaron los meristemas de tres raicillas, se ubicaron las mismas en un portaobjeto con una gota del Orceína aceto-clorhídrica de acuerdo al método de Tjio y Levan (1950). Se observaron 3000 células por preparado con 400 x de aumento en un microscopio Olympus CX 000025, y se disgregaron mediante el uso de agujas de disección. Finalmente se aplicó la técnica de "squash". Los preparados se realizaron en forma temporal, de modo que fueron sellados con esmalte transparente.

ANEXO 3

Formula dada por Del Campo, para hallar el Índice Mitótico de células meristemáticas de *Allium cepa* a diferentes tiempos y concentraciones.

$$IM = \frac{\text{número de células en división}}{\text{Número total de células}} \times 100 \quad (1)$$