

***Hymenocallis caribaea* (L); una planta con potencial agroindustrial, medicinal y farmacológico**

(Hymenocallis caribaea (L); a plant with agro-industrial, medicinal and pharmacological potential)

Eva Salas Olivet^{1*}, Jenny Ruiz Cardona², Jhunió Abrahán Marcía Fuentes²

¹Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, La Habana, Cuba.

²Facultad de Ciencias Tecnológicas, Universidad Nacional de Agricultura, Catacamas, Olancho.
evaso@ifal.uh.cu, cardona15jenny@gmail.com, jmarcía@unag.edu.hn

Resumen: *Hymenocallis caribaea* L., conocida comúnmente como Lirio de San Juan, es una especie de planta geófito perteneciente a la familia de las amarilidáceas, se encuentra distribuida en Centroamérica y en Cuba, además es considerada medicinal. Por lo anterior, esta investigación tuvo como objetivo evaluar la toxicidad aguda dérmica y oral de los extractos acuosos e hidroalcohólicos a partir de las hojas y los bulbos de esta planta, para su potencial aprovechamiento agroindustrial, medicinal y farmacológico. Para su alcance se empleó estudios in vivo a partir de ratas Wistar, empleando dosis límite de 2000 mg/kg. Los resultados indicaron que existió una tendencia al incremento del peso de las ratas durante la experimentación, además no se observó mortalidad, ni cambios en la conducta en los animales, lo que sugiere la ausencia de efectos tóxicos sistémicos. Asimismo, estos resultados demostraron la inocuidad de esta planta cuando se aplica de forma aguda por las vías ensayadas.

Palabras clave: *Hymenocallis caribaea*, toxicidad aguda dérmica, toxicidad aguda oral, ensayos in vivo.

Abstract: *Hymenocallis caribaea* L., commonly known as Lirio de San Juan, is a species of geophyte plant belonging to the family of amarillidaceae, is distributed in Central America and in Cuba, and is also considered medicinal. Therefore, this research aimed to evaluate the acute toxicity dermal and oral aqueous and hydroalcoholic extracts from the leaves and bulbs of this plant, for their potential agro-industrial, medicinal and pharmacological use. For its scope, in vivo studies were used from Wistar rats, using a limit dose of 2000 mg/kg. The results indicated that there was a tendency to increase the weight of rats during the experiment, in addition there was no mortality or changes in behavior in animals, suggesting the absence of systemic toxic effects. Also, these results demonstrated the safety of this plant when applied acutely by the tested routes.

Keywords: *Hymenocallis caribaea*, acute dermal toxicity, acute oral toxicity, in vivo tests.

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas del género *Hymenocallis*, de manera general, son geófitas, herbáceas o caducifolias. Su nombre genérico proviene del griego, que significa membrana hermosa, aludiendo a la morfología de la corona estaminal de las flores, característica que constituye su rasgo más sobresaliente [1]-[3]. En él se agrupan aproximadamente 82 especies de plantas

bulbosas. Este género se considera nativo de México y Centroamérica, tomando como base la gran diversidad de especies colectadas y que han sido descritas en este país que alcanzan alrededor de 30 especies [3].

La especie *Hymenocallis caribaea* L. (*H. caribaea*) representa una de las plantas más empleadas en la decoración de parques, plazas y avenidas [4].

En estudios realizados, se han encontrado evidencias de que muchos médicos europeos en la antigüedad la utilizaban junto con *H. amancaes*, en Venezuela y las Antillas, para tratar los tumores y la inflamación [5], [6]. Además, sus bulbos triturados con aceite de olivo se usan para aliviar los dolores de oído y algunas llagas complicadas. Por otra parte, en las Antillas Francesas la decocción de los bulbos se utiliza como emético y contra las afecciones pectorales, por lo que tiene utilidad para tratar el asma. Esta misma especie en el Caribe se ha usado como suavizante en los dolores de orquitis, hemorroides, gota, quemaduras, tumores, y en las convulsiones violentas. Los bulbos secos son diuréticos, y se usan externamente en cataplasmas contra los tumores inflamatorios, abscesos, furúnculos, llagas inflamadas y conjuntivitis [7].

La caracterización y los ensayos de seguridad de productos derivados de las plantas son pruebas importantes dentro de la ruta crítica de cualquier compuesto que se pretenda utilizar como fármaco. De ahí que el desarrollo de nuevos medicamentos o fitomedicamentos impone la necesidad de evaluar su potencial tóxico en modelos experimentales. Esto es posible gracias a la realización de estudios toxicológicos en diferentes especies de animales que permiten identificar la toxicidad intrínseca, así como los órganos y tejidos diana de la toxicidad relacionada con el compuesto en evaluación. Asimismo, el uso de plantas con características nutricionales y medicinales proveniente de Centroamericana y Cuba para su aprovechamiento en regímenes especiales de alimentación y potencial nutraceuticos ha crecido en estos últimos años [8]-[10].

Por lo anterior, esta investigación tuvo como objetivo evaluar la toxicidad aguda dérmica y oral de los extractos acuosos e hidroalcohólicos a partir de las hojas y los bulbos de esta planta, para su potencial aprovechamiento agroindustrial, medicinal y farmacológico.

2. TRABAJOS RELACIONADOS

Existen diversas investigaciones que se refieren a la caracterización de la *Hymenocallis caribaea* tales como:

Salas y colaboradores [11]; desarrollaron un estudio farmacognóstico de la *H. caribaea*, determinando la presencia de fenoles, flavonoides, saponinas y alcaloides, a quienes se les atribuye actividad antitumoral, antiviral, antipalúdica e inhibidora de inmunoestimulantes. Otras investigaciones reportadas por el programa de investigación aplicada a la medicina popular del Caribe, expresan que el extracto etanólico (95%) de bulbo (0.5 g/persona), mediante vía oral en 300 asmáticos adultos de ambos sexos, mostró actividad antiasmática e inhibió la bronco constricción inducida por alérgenos inhalados [12]. Sin embargo, el Instituto de Investigación de Recursos Biológicos “Alexander von Humboldt”, recomienda antes del uso de la *H. caribaea*, desarrollar análisis de toxicidad para garantizar su inocuidad [13].

Existen estudios que atribuyen la toxicidad de extractos obtenidos a partir de especies pertenecientes a la familia Amaryllidaceae frente a *Artemia salina*, a la existencia de metabolitos como saponinas y alcaloides [8].

Otras investigaciones con plantas que se encuentran en Centroamérica y Cuba, como la *Cassia grandis*, han demostrado su efecto medicinal, nutricional y farmacológico, por la presencia de fitoquímicos con alta actividad antioxidante, contenido carotenoides y moléculas bioactivas,

convirtiéndose en una alternativa para la producción agroindustrial, como fuentes de alimentos potencialmente funcionales [14]-[16].

3. METODOLOGÍA

Los materiales vegetales de la especie *H. caribaea* fueron recolectados en el mes de junio del 2020, en San Agustín, municipio La Lisa, provincia La Habana. En el momento de la recolección la especie se encontraba en estado vegetativo, además no presentaba alteraciones morfológicas visibles, ni signos de daños causados por hongos, insectos, ni quemaduras por el sol. Posteriormente se realizó la identificación botánica de la especie, para ello, la misma se herborizó y registró (Nº.90077) en el herbario “Johannes Bisse” (HAJB) de la Universidad de La Habana. Del material recolectado se emplearon las hojas y los bulbos. Estos fueron lavados con abundante agua potable, seguidamente se sumergieron en hipoclorito de sodio al 1 % por un tiempo de 5 minutos e inmediatamente se lavaron nuevamente con agua potable. Con el objetivo de favorecer el proceso de secado se decidió cortar los materiales en trozos pequeños utilizando tijeras de corte estériles.

3.1. Procedimiento

Los pasos a seguir para evaluar la toxicidad aguda dérmica y oral de los extractos acuosos e hidroalcohólicos a partir de las hojas y los bulbos de *H. caribaea*, fueron los siguientes:

Secado y obtención de la droga de *H. caribaea*: Tanto los bulbos como las hojas, fueron sometidos a un proceso de secado en una estufa (YLD-6000 AISET, China) a una temperatura de 40 °C con recirculación de aire. En el estudio se utilizaron 200 g de muestra por cada réplica, que se colocaron esparcidas dentro de la estufa en bandejas esmaltadas. Se registraron las observaciones de la droga, relacionadas con la proliferación de hongos, moho y ennegrecimiento. Se realizaron pesadas sucesivas cada 24 horas. Se tomaron en consideración los siguientes parámetros: número de días que demoraba la droga en alcanzar peso constante (tiempo de secado) y pérdida en peso por desecación promedio de tres réplicas. El proceso culminó cuando se obtuvieron tres pesadas consecutivas del material vegetal constantes y se comprobaron tanto la fragilidad desmenuzable; así como en forma visual, la ausencia de hongos, mohos o ennegrecimiento. Los materiales secos se redujeron a un tamaño de partícula menor de 2 mm, en un molino de cuchilla (FUMAR, Italia). Posteriormente, se almacenaron en recipientes de cristal de color ámbar, cerrados herméticamente a 25 ± 3 °C y se colocaron en una desecadora provista de sílica gel activada hasta el momento de su utilización.

Obtención de los extractos: Los extractos se prepararon a partir de 20 g de las hojas y los bulbos, previamente secos y molidos. A partir de las hojas se obtuvo un extracto hidroalcohólico, mientras que a partir de los bulbos fue acuoso. Ambos extractos se conservaron a temperatura ambiente y protegidos de la luz. Para la obtención del extracto hidroalcohólico el método de extracción utilizado fue la maceración durante 7 días a una temperatura de 30 ± 2 °C. El material vegetal se extrajo con 100 mL de etanol al 50 % (v/v) [17]-[19]. El método de extracción que se empleó para la obtención del extracto acuoso fue la decocción, durante 30 minutos. Se utilizó como disolvente 120 mL de agua destilada y una plancha de calentamiento (IKAC-MAG, Alemania) a una temperatura de 80 °C [20].

Evaluación preclínica de los extractos de *H. caribaea* (L): Para la evaluación preclínica de la especie, se emplearon ratas albinas Winstar. Para la evaluación del potencial tóxico dérmico se utilizaron ratas hembras y machos con un peso aproximado de 180 a 238 gramos, mientras que para el potencial tóxico agudo oral, solo hembras con un peso de 160 a 204 gramos. Los animales de experimentación fueron suministrados por el Centro para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), Bejucal, La Habana. Durante todo el ensayo los animales

permanecieron bajo temperatura controlada (20 ± 3 °C), humedad (30 - 70 %), ciclo alternativo luz/oscuridad de 12 horas, así como alimentación y agua ad libitum. Todos los animales empleados recibieron el cuidado y la atención según las normativas internacionales establecidas, siguiendo la Guía para los cuidados y el empleo de los animales de laboratorio establecida por la Comunidad Económica Europea [21] y aprobadas por el Centro de Estudios para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas (CEIEB).

3.2. Diseño experimental para ensayos de toxicidad aguda

Para evaluar la seguridad de los extractos, acuoso de los bulbos e hidroalcohólico al 50 % de las hojas, se realizaron los ensayos de toxicidad aguda dérmica [22] y de vía oral [23], establecidas en el Centro de Estudios para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas (CEIEB). Los ensayos tuvieron una duración de 19 días (5 de aclimatación y 14 de ensayo), para ambos extractos [24].

Vía dérmica: Se confeccionaron dos grupos tratados (machos y hembras) que recibieron los extractos en estudio. Los grupos estaban compuestos por cinco animales cada uno. Se empleó para ambos extractos una dosis de 2000 mg/kg de peso corporal; como ensayo límite, usando la vía de administración tópica.

Las ratas, 24 horas antes del inicio del ensayo, fueron rapadas en un área del 10 % de la superficie corporal en el dorso de la misma. Posteriormente se aplicó de forma directa el extracto y se cubrió con una almohadilla de gasa atada de forma segura a la piel y toda la región fue cubierta con una banda de goma elástica hipoalergénica, enrollada en la región media del cuerpo para de esta manera evitar que el animal pudiera lamerse la zona de aplicación y por ende se alteraran los resultados. La sustancia en estudio se dejó en contacto con la piel por un tiempo de 24 horas, transcurrido este se removió la cubierta y el agente residual fue eliminado por lavado con solución de Cloruro de Sodio al 0.9 % con la ayuda de una almohadilla de gasa estéril.

Las pesadas de las ratas se realizaron (al inicio y final del ensayo) en los tiempos siguientes: 1, 7 y 14 días. Se evaluaron en ellos, signos clínicos y conductuales, la ganancia de peso y se examinaron varios órganos (pulmones, corazón, bazo, riñones y estómago) siguiendo lo establecido en los procedimientos normalizados de operación vigentes en el Centro de Estudio para la Investigación y Evaluación Biológica (CEIEB) CODIGO: IR/PI/2018. Al final del ensayo se procedió a sacrificar los animales empleando para ello una sobredosis de barbitúrico (tiopental sódico), evitando en lo posible que el animal sufriera y siguiendo los procedimientos que se emplean actualmente en la Toxicología Alternativa, [22].

Vía oral: Se confeccionó primero un grupo tratado (Hembra 1) con una dosis de 2000 mg/kg de tres animales que recibieron los extractos en estudio. Se estableció que entre el primer día y los 14 días que duró el ensayo; si no había más de una muerte, se repetía el mismo procedimiento en un grupo de otros tres animales del mismo sexo (Hembra 1). De encontrarse dos o más muertos, se disminuía la dosis según lo indicado [21] y se desarrollaba el mismo procedimiento. El volumen administrado fue de no más de 4 mL/200g aplicando directamente el extracto sin vehículo; con PH de $4.65 \pm 0.04^{\circ}$. Después de la administración se realizaron las observaciones, y se registraron sistemáticamente en los registros individuales para cada animal, varias veces durante el primer día y al menos una vez al día para los 13 restantes.

Atendiendo a que la vía de administración fue la oral (se desarrolló la metodología descrita por la OECD TG 423 y establecida en el CEIEB). Se incluyeron los signos de toxicidad oral retardada. Las pesadas de las ratas, evaluación de los diferentes parámetros indicativos de signos tóxicos y sacrificio de los animales se realizaron de igual manera a lo explicado anteriormente para la vía dérmica.

3.3. Análisis estadístico

En los ensayos toxicológicos los datos se procesaron usando el programa estadístico SPSS, para Windows versión 8.0 y se obtuvieron las medias y las desviaciones estándar, a través del análisis de varianza simple Anova, posteriormente fueron comparados utilizando las pruebas Student, Newman y Keuls ($p < 0,05$) [11].

4. RESULTADO Y DISCUSIÓN

4.1. Ensayos de toxicidad aguda dérmica y oral

Dentro de los estudios farmacognósticos encaminados a establecer la calidad de una droga cruda se encuentra el método de secado. Se considera que es uno de los métodos principales, ya favorece la estabilidad y conservación de la misma, debido a que evita la proliferación o activación de procesos enzimáticos o fermentativos que modifiquen las estructuras y propiedades de las células vegetales y por consiguiente los principios activos, además de la contaminación microbiana de la planta [20]. Durante el proceso, se pudo constatar que las hojas alcanzaron su peso constante a las 120 horas, es decir, a los cinco días, con una pérdida en peso de agua de 76.07 %. En el caso de los bulbos, se secaron completamente a los diez días (240 horas) después de iniciado el proceso, con una pérdida en peso de agua de 88.16 %. Las diferencias observadas entre los órganos vegetales, tanto en el tiempo de secado como en la pérdida por desecación, pudieran asociarse a las características de los mismos.

Como se puede observar en la Tabla 1, la administración de los extractos por vía dérmica produjo ganancia en peso en los dos grupos de animales (hembras y machos). Durante el estudio, este incremento en el peso fue más marcado en aquellos grupos tratados con el extracto obtenido a partir de los bulbos que en el que recibió el extracto de las hojas [24], [25].

Tabla 1. Variación en el peso corporal (gramos) de los animales en el ensayo de toxicidad aguda dérmica de los extractos de *H. caribaea*

Grupos	Peso corporal de los animales (g) (Media \pm Desviación estándar)		
	Tiempo (días)		
	1	7	14
Hojas			
Hembras	211.2 \pm 7.5a	217.6 \pm 2.9a	232.8 \pm 7.0b
Machos	226.0 \pm 8.0a	255.2 \pm 11.8b	284.4 \pm 8.7c
Bulbos			
Hembras	187.2 \pm 7.2a	223.2 \pm 5.7b	234.8 \pm 10.4bc
Machos	222.0 \pm 11.1a	231.6 \pm 7.5a	278.0 \pm 11.8b

Letras iguales indican que no existen diferencias significativas y letras diferentes que sí existen diferencias significativas para $p < 0.05$.

En la Tabla 2, los animales de experimentación no presentaron signos clínicos (ojo, mucosa, piel y otros conductuales) y no se evidenció mortalidad durante los 14 días de estudio.

Al final del ensayo se procedió a sacrificar los animales empleando para ello una sobredosis de barbitúrico, evitando en lo posible que el animal sufriera y cumpliendo de esta manera con el principio de las 3 ERRES, establecido por la Toxicología Alternativa.

Tabla 2. Observaciones realizadas durante el ensayo de toxicidad aguda dérmica a los extractos

Signos clínicos (hembras y machos)	Días de ensayo													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Ojos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mucosas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sistema Respiratorio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sistema Circulatorio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sistema Autónomo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sistema Nervioso Central	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mudanza de pelo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Temblores	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Convulsiones	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salivación	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Piel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sedación	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Somnolencia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Muerte	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-: No presentan signos clínicos.

Las muestras tomadas de los principales órganos (pulmones, corazón, bazo, riñones y estómago) no evidenciaron anomalías perceptibles desde el punto de vista macroscópico, por lo que se decidió no efectuar la toma de las mismas para su estudio histopatológico.

Por otra parte, el estudio toxicológico de los extractos por la vía oral (Tabla 3) mostró un comportamiento idéntico en lo referente a los signos clínicos de acuerdo a los datos presentados en relación al de la vía dérmica, observándose un incremento de peso dependiente del origen del sustrato comenzando a los 7 días cuando es de origen bulbo y a los 14 días cuando es de origen hojas. Sin embargo, de forma oral esta diferencia ya no existe, el incremento de peso es independiente del extracto y además es siempre a partir del día 7.

Tabla 3. Variación en el peso corporal (gramos) de los animales en el ensayo de toxicidad aguda oral de los extractos de *H. caribaea*

Grupos	Peso corporal de los animales (g) (Media ± Desviación estándar)		
	Tiempo (días)		
	1	7	14
	Hojas		
Hembras 1	193.3 ± 18.5a	195.0 ± 12.7a	205.0 ± 7.0a
Hembras 2	202.6 ± 1.1a	212.0 ± 8.7b	217.3 ± 1.1b
	Bulbos		
Hembras 1	168.0 ± 5.2a	205.3 ± 10.2b	210.0 ± 10.0b
Hembras 2	176.0 ± 13.8a	209.3 ± 8.3b	212.0 ± 13.8b

Letras iguales indican que no existen diferencias significativas y letras diferentes que sí existen diferencias significativas para $p < 0,05$.

Al igual que en el estudio de toxicidad aguda dérmica, las observaciones de los signos clínicos y órganos analizados no manifestaron signos de toxicidad alguna durante los 14 días del estudio a los dos grupos de animales.

Los extractos de *H. caribaea* evaluados, no produjeron toxicidad aguda por las vías de administración empleadas (dérmica y oral) en los animales de experimentación a dosis límite de

2000 mg/kg. Según lo anteriormente planteado los extractos de *H. caribaea* (L.) quedan catalogados como “Sin clasificar”, según la Unión Europea [20], por lo que no resulta necesario estudiar los mismos a dosis superiores. Ambos extractos se consideran prácticamente inocuos para los humanos, cuando se aplican de forma aguda por las dos vías ensayadas.

5. CONCLUSIONES

Los extractos de *H. caribaea* evaluados, demostraron ser inocuos a partir de una dosis límite de 2000 mg/kg de peso corporal del animal, mediante ensayos in vivo con ratas Winstar. Por lo que su implementación como potencial ingrediente funcional es una alternativa para la agroindustria y la industria farmacéutica, ya que contiene fitoquímicos de interés y que posiblemente no cause efecto adverso en la salud humana, siendo una alternativa para el desarrollo de suplementos nutricionales y el desarrollo de alimentos fortificados en personas con regímenes especiales de alimentación.

AGRADECIMIENTOS: A los estudiantes de la Licenciatura de Química Farmacéutica del Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de La Habana, Cuba, por su colaboración en el desarrollo de esta investigación.

REFERENCIAS

- [1] E. García, P. Herrera, “Flora, vegetación y modificaciones ecólogo paisajísticas del Archipiélago de los Canarreos”, Cuba. Acta Botánica Cubana, 209, pp. 1-24. 2010.
- [2] E. Tapia, JM. Rodríguez, M. Revuelta, B. Van, “Mexican Geophytes II. The general *Hymenocallis*, *Sprekelia* and *Zephyranthes*”, *Floriculture and Ornamental Biotechnology*, vol. 6, no. 1, pp. 129-139. 2012
- [3] MP. Flores, “Micropropagación de *Hymenocallis harrisiana* (Herb.)”, Tesis de Licenciatura para optar por el título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Autónoma de México. 2016.
- [4] J. Soto, D. Pacheco, M. Ramírez, O. Zambrano, G. Sthormes, “Aspectos florísticos y fitosanitarios de las áreas verdes de la parroquia Santa Lucía, Maracaibo, estado Zulia”, *Rev. Fac. Agron*, vol. 1, pp. 365-383. 2014
- [5] A. Evidente, AS. Kireev, AR. Jenkins, AE. Romero, WF. Steelant, S. Van, A. Kornienko, “Biological evaluation of structurally diverse Amaryllidaceae alkaloids and the ir synthetic derivatives: discovery of novel leads for anticancer drug design”, *Planta Médica*, vol. 75, no. 5, pp. 501-507. 2009
- [6] J. Bastida, “Els alcaloides de les Amaryllidaceae com a font de molècules d'importancia farmacològica”, *Seminari de Recerca de Facultat de Farmàcia (Seminari 5)*. 2010
- [7] HA. Liogier, “Plantas Medicinales de Puerto Rico y del Caribe”, Iberoamericana de Ediciones Inc., San Juan, Puerto Rico. 441. 1990
- [8] F. Santos, L. Ricardo, ZN. Juárez, “Evaluaciones preliminares de algunas bioactividades del extracto clorofórmico de bulbos de *Sprekelia formosissima* (lirio azteca)”. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, vol. 21, no. 2, pp. 95-102. 2018
- [9] J. Marcía Fuentes, L. Chavarría Carrión, & H. Zumbado. (2019). Analysis of the process of yuca flour, on the sensory and nutritional properties of the casabe. *Nexo Revista Científica*, 32(1), 88-93. <https://doi.org/10.5377/nexo.v32i01.7992>.

- [10] J. Marcía Fuentes, I. Montero Fernández, S. Saravia, I. Varela, C. Silva, F. Hernández, E. Cruz, B. Castro, H. Zumbado y M. Álvarez, “Physical-Chemical Evaluation of the *Cassia grandis* L. as Fortifying Egg Powder”, *Journal of Agricultural Science*, vol. 12, no. 8, pp. 277-282. 2020. doi:10.5539 / jas.v12n8p277.
- [11] E.O. Salas, D. de la Caridad Sánchez-Milán, A. Cuéllar Cuéllar, R. Mangas Marín, J.A. Arencibia, and J.A. García-Beltrán, “Estudio Farmacognóstico de *Hymenocallis caribaea* (Amaryllidaceae)”, *Revista del Jardín Botánico Nacional* 41, pp. 109–17. <https://www.jstor.org/stable/26975233>. 2020
- [12] Programa de investigación aplicada a la medicina popular del Caribe, TRAMIL. *Hymenocallis caribaea* (en línea). 2021. Obtenido en <http://www.tramil.net/es/plant/hymenocallis-caribaea>.
- [13] Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Repositorio Institucional de Documentación Científica (en línea). 2021. Obtenido en http://repository.humboldt.org.co./discover?scope=%2F&query=toxicidad+oral&submit=&filtertype_0=subject&filter_relational_operator_0=equals&filter_0=Medicamentos+tradiciones.
- [14] J.A. Marcía Fuentes, I.M. Fernández, H. Fernández, J. Sánchez, R. Santos Alemán, M. Navarro-Alarcon, I. Borrás-Linares, S. Saravia Maldonado, “Quantification of Bioactive Molecules, Minerals and Bromatological Analysis in Carao (*Cassia grandis*)”, *J. Agric. Sci.* vol. 12, pp. 88–94. 2020. <https://doi.org/10.5539/jas.v12n8p277>.
- [15] J.A.M. Fuentes, L. López-Salas, I. Borrás-Linares, M. Navarro-Alarcón, A. Segura-Carretero, J. Lozano-Sánchez, “Development of an Innovative Pressurized Liquid Extraction Procedure by Response Surface Methodology to Recover Bioactive Compounds from Carao Tree Seeds”. *Foods*, vol. 10, no. 2. 2021. doi: 10.3390/foods10020398. PMID: 33670327; PMCID: PMC7917923.
- [16] J. Marcía-Fuentes, R. Santos-Aleman, I. Borrás-Linares, J.L. Sánchez, “The Carao (*Cassia grandis* L.): Its Potential Usage in Pharmacological, Nutritional, and Medicinal Applications”, en: Maddela N.R., García L.C. (eds) *Innovations in Biotechnology for a Sustainable Future*. Springer, Cham. 2021. https://doi.org/10.1007/978-3-030-80108-3_19.
- [17] A. Rivadeneira, A. Cedeño, U. Manso, E. Cortés, R. Rodríguez, M. Donato, M. PuróN, “Análisis fitoquímico y de seguridad de los extractos de *Chuquiraga jussieui*” *JF Gmell. Centro Agrícola*, vol. 41, no. 2, pp. 79-84. 2014.
- [18] NRSP 312. Norma Ramal. Medicamentos de origen vegetal. Extractos fluidos y tinturas. Métodos de ensayos, 15-19. 1992.
- [19] Farmacopea, MERCOSUR. (2016). Métodos de farmacognosia. MERCOSUR/GMC/RES. No. 17/16. Montevideo, Uruguay. 21 pp.
- [20] M.M. Miranda, A.C. Cuellar (2000). *Manual de Prácticas de Laboratorio Farmacognosia y Productos Naturales*. Instituto de Farmacia y Alimentos. CH: Edit. Félix Varela, 34-48; 51; 62-66; 112-113.
- [21] García G. Los estudios toxicológicos de primera barrera y la toxicología alternativa. Tesis para optar por el grado académico de Maestro en Ciencias. La Habana. 2000.
- [22] Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo. (OECD). *Guidelines for testing of chemical*. Paris. 423. 2001.
- [23] Hayes W. *Principles and Methods of Toxicology. Principles and Methods for Acute Toxicity and Eye Irritancy*. Ed. Raven Press, Ltd. N.Y. 2004: 169-220.

- [24] Informe final de resultados PI/2018/Determinación de la Toxicidad Aguda Oral del producto LB perteneciente al proyecto: Estandarización de productos naturales como Fitomedicamentos procedentes del Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL). La Habana, 4 de enero del 2018. Centro de estudio para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas (CEIEB)
- [25] Informe final de resultados PI/2018/Determinación de la Toxicidad Aguda dérmica del producto LB perteneciente al proyecto: Estandarización de productos naturales como Fitomedicamentos procedentes del Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL). La Habana, 4 de enero del 2018. Centro de estudio para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas (CEIEB)