

ESTUDIO DE TOXICIDAD A 28 DÍAS, DEL EXTRACTO ATOMIZADO DE RIZOMA DE *Curcuma longa* (A4R), FLORES DE *Cordia lutea* (A4F) Y HOJAS DE *Annona muricata* (A4L) EN UN MODELO MURINO

Jorge Arroyo-Acevedo^{1,2}; César Franco-Quino^{3,4}; Roberto Chávez-Asmat^{1,5}; Andrea Anampa-Guzmán⁶; Juan Rojas-Armas^{1,2}; José Cabanillas-Coral⁷

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo

Recibido: 08-02-16

Aprobado: 16-02-16

Autor Corresponsal

César Ivanovich Franco Quino
cesar.franco1@unmsm.edu.pe
+51 996517008

Financiamiento

Esfuerzo de los autores y apoyo de Sabell Perú S.A.C

Conflictos de interés

El presente artículo no presenta conflicto de intereses

Citar como

Arroyo-Acevedo J; Franco-Quino C, Chávez-Asmat R, Anampa-Guzmán A, Rojas-Armas J, Cabanillas-Coral J. Estudio de toxicidad a 28 días del extracto atomizado de rizoma de *Curcuma longa* (A4R), flores de *Cordia lutea* (A4F) y hojas de *Annona muricata* (A4L) en un modelo murino. Revista Peruana de Medicina Integrativa.2016;1(1):31-7.

RESUMEN

La asociación de las tres plantas ha sido aprobada por la Institución de Salud en Canadá, bajo la forma de extracto liofilizado, la cual ha demostrado poseer efectos terapéuticos. **Objetivos:** determinar la seguridad de la asociación del extracto atomizado del rizoma de *Curcuma longa* (A4R); flores de *Cordia lutea* (A4F) y hojas de *Annona muricata* (A4L) a una dosis repetida durante 28 días por vía oral en ratas. **Materiales y métodos:** diseño experimental, se utilizaron 40 ratas Holtzman (20 machos – 20 hembras); se siguió las directrices o normas de la Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) Norma 407; se administró el extracto atomizado durante 28 días por vía oral, se realizaron las observaciones, registro de signos y evolución semanal del peso corporal de los animales; al final, se extrajo muestra de sangre para estudio hematológico y bioquímico; posteriormente, fueron sacrificados para estudio anatomopatológico de hígado, riñón, corazón, médula, cerebro, páncreas, y bazo; se aplicó el ANOVA, considerando el valor $p < 0,05$ para la significancia. **Resultados:** al administrar la asociación en forma de extracto atomizado, se observó una evolución temporal homogénea del peso corporal. No hubo variación significativa en los niveles de glucemia, urea, colesterol, triglicéridos, bilirrubina indirecta, transaminasas (GPT–GOT), fosfatasa alcalina ni hemoglobina ($p > 0,05$); **Conclusiones:** los hallazgos demuestran que el extracto atomizado del rizoma de *Curcuma longa* (A4R), las flores de *Cordia lutea* (A4F) y las hojas de *Annona muricata* (A4L) no es tóxico en ratas, al ser administrado por un periodo de 28 días.

Palabras clave: Toxicidad aguda; *Curcuma longa*; *Cordia*, *Annona* (Descriptores DeCS)

STUDY OF TOXICITY TO 28 DAYS, OF THE ATOMIZED EXTRACT OF THE RHIZOME OF *Curcuma longa* (A4R), *Cordia lutea* FLOWERS (A4F) AND LEAVES OF *Annona muricata* (A4L) IN A MURINE MODEL

ABSTRACT

The therapeutic use of the combination of *Curcuma longa*, *Cordia lutea* and *Annona muricata* is approved in Canada, because of this combination has shown therapeutic effects. **Objective:** To determine the safety of a daily oral administration of the combination of the atomized extract of the rhizome of *Curcuma longa* (A4R), *Cordia lutea* flowers (A4F) and leaves of *Annona muricata* (A4L) in Holtzman rats during the period of 28 days. **Material and methods:** An experimental study. A total of 40 Holtzman rats (20 males - 20 females) were used according to the rule 407 of the guideline of the Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD). The atomized extract was orally administered for 28 days. Signs and weekly evolution of body weight of the animals were recorded. In the end, blood samples were obtained to assess the biochemical and hematological parameters. The animals were sacrificed and kidneys, heart, bone, brain, pancreas and spleen were extracted and studied. It was applied the ANOVA test, considering $p < 0,05$ value for significant. **Results:** A homogeneous temporal evolution of body weight was observed with the administration of atomized extract of the combination. There was no statistical signification in the levels of glucose, urea, total cholesterol, triglycerides, indirect bilirubin, transaminases (GPT-GOT), alkaline phosphatase and hemoglobin ($p > 0.05$). Conclusion: The findings show that the atomized extract from the rhizome of *Curcuma longa* (A4R), flowers of *Cordia lutea* (A4F) and leaves of *Annona muricata* (A4L) are innocuous when administered orally for 28 days in Holtzman rats.

Key words: acute toxicity; *Curcuma longa*; *Cordia*, *Annona*

¹ Laboratorio de Farmacología Experimental, Facultad de Medicina Humana, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú.

² Instituto de Investigaciones Clínicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú.

³ Laboratorio de Farmacología y Fisiología, Facultad de Odontología, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú.

⁴ Unidad de Posgrado, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú

⁵ Asociación para el Desarrollo de la Investigación de Estudiantes en Ciencias de la Salud (ADIECS), Lima, Perú.

⁶ Sociedad Científica de San Fernando (SCSF), Lima, Perú.

⁷ Investigador externo.

INTRODUCCIÓN

Las plantas son una fuente rica en metabolitos secundarios útiles para la preservación y el cuidado de la salud ⁽¹⁾, los extractos obtenidos de sus diversas partes poseen propiedades medicinales disponibles en variadas formulaciones farmacéuticas ⁽²⁾.

La medicina tradicional oriental utiliza con frecuencia la asociación de plantas para tratar enfermedades crónicas, como la hiperlipidemia y la obesidad ⁽³⁾. Idealmente, la asociación de diversos principios activos tiene como finalidad generar sinergismo para incrementar el efecto terapéutico y reducir los efectos adversos ⁽⁴⁾; sin embargo, si la asociación posee características farmacocinéticas similares podría generar toxicidad durante el metabolismo y la eliminación; el grado de toxicidad producido depende de las concentraciones plasmáticas, de la dosis y la duración de la terapia ⁽⁵⁾; las enfermedades crónicas como diabetes *mellitus*, enfermedad cardiovascular y cáncer representan un serio problema de salud ⁽¹⁾ que necesita terapias prolongadas, con lo que se incrementa el riesgo de producir toxicidad ⁽⁶⁾.

La *Curcuma longa*, conocida como palillo, pertenece a la familia Zingiberaceae, y es ampliamente cultivada en Asia y África ⁽⁷⁾; la curcumina es el principal metabolito, posee propiedades antiinflamatorias y antioxidantes demostrando eficacia en la prevención del cáncer y en la supresión del crecimiento de tumores ⁽⁸⁾; asimismo, presenta aceites esenciales, fenoles, taninos, flavonoides, terpenos y alcaloides ⁽⁹⁾; eficaces en el tratamiento de las infecciones ⁽¹⁰⁾; además, se ha demostrado que la *Curcuma longa* ha sido útil en el tratamiento de las hiperlipidemias, incrementando la HDL, y reduciendo la LDL y los triglicéridos ⁽¹¹⁾; asimismo, se le atribuye efecto protector hepático y renal sobre la toxicidad de metales ⁽⁷⁾, y efectos anticonvulsivantes atribuidos a los sesquiterpenos presentes ⁽¹²⁾.

La *Cordia lutea*, conocida como flor de overo, es utilizada para tratar trastornos gastrointestinales, respiratorios y dermatológicos ⁽¹³⁾; al igual que la *Cordia verbenácea*, posee actividad antitumoral *in vitro*, pues reduce la proliferación y viabilidad induciendo apoptosis, e incrementando el efecto citotóxico y antitumoral ⁽¹⁴⁾; sus aceites esenciales tienen efectos antiinflamatorios, por lo que se aconseja en la inflamación aguda ⁽¹⁵⁾.

La *Annona muricata*, conocida como guanábana, pertenece a la familia Annonaceae, se distribuye en regiones tropicales de América del Sur, América Central, África Occidental y el sureste de Asia ⁽¹⁾; en la planta se han identificado 220 componentes, principalmente flavonoides, taninos y glicósidos ⁽¹⁶⁾, acetogeninas y alcaloides ⁽¹⁾; algunos estudios indican efectos antipiréticos

y sedantes, útiles en el tratamiento de las enfermedades respiratorias, la malaria, los trastornos gastrointestinales, las alteraciones al hígado, corazón y riñones ^(1, 2, 16, 19); asimismo, posee actividad antiproliferativa en células tumorales de cáncer de próstata humana (célula PC-3) en estudios *in vitro* ⁽¹⁷⁾; e inducen la detención del ciclo G₁ y la apoptosis en células de cáncer de colon ⁽¹⁸⁾; conservan efecto quimioprotector en cáncer de mama inducido por DMBA ⁽¹⁹⁾, efecto hipoglucemiante para el tratamiento de la diabetes *mellitus*, actividad antioxidante *in vivo* y protector de células beta del páncreas ⁽²⁰⁾.

La asociación liofilizada del rizoma de *Curcuma longa*, flores de *Cordia lutea* y hojas de *Annona muricata*, es un producto que cuenta con la aprobación en Canadá para ser comercializado como nutraceutico desde el año 2012, así como en el alivio de los síntomas de enfermedades hepáticas, favorecer la cicatrización y mantener la salud del hígado ⁽²¹⁾; sin embargo, para la asociación atomizada no se cuenta con información preclínica sobre su seguridad.

El presente estudio tiene como objetivo determinar la seguridad de la asociación del extracto atomizado del rizoma de *Curcuma longa*, flores de *Cordia lutea*, y hojas de *Annona muricata*, a una dosis repetida durante 28 días por vía oral, en ratas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El rizoma de *Curcuma longa*, las flores de *Cordia lutea*, y las hojas de *Annona muricata* fueron procesadas mediante atomización; y almacenadas en frascos ámbar bajo refrigeración (5 °C).

La evaluación de toxicidad a dosis repetitiva durante 28 días por vía oral se realizó según las normas de la Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) Norma 407; se utilizó 40 ratas de la línea Holtzman de 7 meses, 20 machos y 20 hembras, con un peso promedio de 250±20 g y 175±20 g respectivamente, los cuales fueron adquiridos en el Instituto Nacional de Salud (INS, Lima-Perú) e instaladas, para su climatización durante 48 h, en el Bioterio de la Facultad de Medicina Humana-UNMSM, a una temperatura ambiente (22-26 °C), humedad de 60-70% con ciclos de luz/oscuridad de 12 h, se les suministró agua y alimentación *ad libitum*. Se formaron cuatro grupos de diez ratas (cinco machos y cinco hembras) de manera aleatoria: grupo I: SSF 2 mL/kg; los grupos II, III, IV: extracto atomizado del rizoma de *Curcuma longa*, flores de *Cordia lutea* y hojas de *Annona muricata* a la dosis de 100 mg/kg, 200 mg/kg y 400 mg/kg respectivamente, las cuales fueron administradas una vez al día por vía oral durante 28 días, el método de evaluación fue doble ciego.

Se evaluó la evolución del peso corporal a los 0, 7, 14, 21 y 28 días; además, de la modificación de signos clínicos que evidencien toxicidad: el reflejo de aprehensión fue determinado por la fuerza empleada para sujetarse a una superficie reticular; el reflejo de enderezamiento, por el tiempo en posición decúbico dorsal, los cuales fueron calificados como ausente, hiporreflexia, reflejos normales e hiperreflexia. Asimismo, se observó la actividad espontánea, desordenes gastrointestinales y cantidad de consumo de alimentos. El día 28, los animales fueron sometidos a anestesia general (Halatal® 10 mg/kg) para la extracción de sangre por punción intracardiaca y realizar estudios hematológicos y bioquímicos, como se indica en la Tabla 1; luego, los animales fueron sacrificados con sobredosis de pentobarbital (Halatal® 100 mg/kg) para el estudio anatomopatológico.

La descripción de variables se expresa en medias y desviación estándar; la comparación estadística de grupos, mediante ANOVA de una vía seguido de una prueba *post-hoc* de Tukey, se consideró significativo con un $p < 0,05$ al intervalo de confianza de 95%. Se utilizó el programa estadístico SPSS versión 17.

Para la realización de la presente investigación se contó con la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la UNMSM, Acta 0310 (04 de noviembre de 2015). Durante la realización del estudio se siguieron las especificaciones propuestas por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales (CICUA, ILAR), y se respetó la normativa vigente de la Ley de Protección de Animales (Ley 27265).

RESULTADOS

Los resultados muestran una tendencia al incremento del peso corporal de las ratas que recibieron la administración del extracto atomizado durante 28 días, observándose un incremento homogéneo en ambos géneros (Figura 1) con excepción de las ratas hembra del grupo II (100 mg/kg) que redujo el peso corporal durante la última semana; la evaluación de los signos clínicos no evidencian toxicidad aguda, mantienen reflejos protectores normales, reflejo de enderezamiento y actividad espontánea durante los 28 días; no presentan alteraciones gastrointestinales y el consumo de alimentos y agua fue homogéneo en todos los grupos, mostrando un patrón estable (Figura 2).

El análisis bioquímico y hematológico a los 28 días, determinó que no hubo variación significativa en los niveles de glicemia, urea, colesterol, triglicéridos, bilirrubina indirecta, aminotransferasa de alanina (GPT), aminotransferasa de aspartato (GOT), fosfatasa alcalina, hemoglobina, hematocrito, recuento de monocitos y linfocitos ($p > 0,05$); sin embargo, se observaron cambios significativos ($p < 0,05$) en el grupo II de las ratas hembra (100 mg/kg) pues presentaron disminución de los niveles de creatinina y las ratas macho (200 mg/kg), presentaron reducción de las lipoproteínas de alta densidad (HDL); asimismo, en el grupo II de ratas macho (100 mg/kg) se evidencia incremento de bilirrubina total y directa; del mismo modo, se evidencia leucocitosis para el grupo IV de las ratas macho (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros bioquímicos y hematológicos al evaluar la toxicidad aguda de la asociación de *Curcuma longa* (A4R), *Cordia lutea* (A4F) y *Annona muricata* (A4L) al ser administrado por vía oral durante 28 días en ratas Holtzman.

Parámetros	MACHOS				HEMBRAS			
	SSF 2mL/kg	ALC 100 mg/kg	ALC 200 mg/kg	ALC 400 mg/kg	SSF 2mL/kg	ALC 100 mg/kg	ALC 200 mg/kg	ALC 400 mg/kg
Glucosa (mg/dL)	85,2 ± 12,2	87,8 ± 16,2	90,4 ± 9,8	94,4 ± 7,7	87,6 ± 7,7	92,6 ± 11,7	85,2 ± 12,2	95,8 ± 9,5
Urea (mg/dL)	21,2 ± 6,3	20,2 ± 4,9	18,6 ± 5,5	20,2 ± 8,2	19,0 ± 6,4	16,0 ± 4,5	20,0 ± 5,9	21,2 ± 6,3
Creatinina (mg/dL)	0,8 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,2	0,6 ± 0,2	0,7 ± 0,1	0,5 ± 0,1 ^b	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1
Colesterol (mg/dL)	145,8 ± 37,1	193,4 ± 60,5	155,8 ± 32,4	172,2 ± 28,7	156,6 ± 21,9	168,8 ± 31,5	165,4 ± 20,1	174,6 ± 19,2
HDL (mg/dL)	58,6 ± 10,9	45,8 ± 12,1	43,4 ± 5,1 ^b	51,2 ± 10,5	47,2 ± 6,9	43,8 ± 4,3	43,8 ± 4,3	49,4 ± 11,7
Triglicéridos (mg/dL)	108,8 ± 20,2	136,0 ± 33,1	141,4 ± 44,3	152,6 ± 38,3	138,6 ± 23,1	166,6 ± 31,6	172,8 ± 44,4	133,0 ± 6,2
Bilirrubina total (mg/dL)	1,01 ± 0,3	2,19 ± 0,5 ^a	1,14 ± 0,7	1,39 ± 0,5	1,84 ± 0,8	1,21 ± 0,4	1,63 ± 0,3	1,06 ± 0,1
Bilirrubina directa (mg/dL)	0,77 ± 0,2	1,63 ± 0,2 ^a	0,79 ± 0,4	0,98 ± 0,3	1,30 ± 0,5	0,89 ± 0,2	1,09 ± 0,2	0,75 ± 0,1 ^b
Bilirrubina indirecta (mg/dL)	0,23 ± 0,1	0,56 ± 0,2	0,35 ± 0,3	0,42 ± 0,2	0,54 ± 0,3	0,32 ± 0,2	0,54 ± 0,1	0,31 ± 0,1
GPT (UI/L)	29,8 ± 9,7	33,6 ± 7,4	48,0 ± 21,6	27,8 ± 10,2	30,8 ± 12,5	31,2 ± 20,0	30,0 ± 10,2	28,8 ± 6,4
GOT (UI/L)	42,6 ± 11,6	47,6 ± 14,2	61,8 ± 37,3	42,4 ± 16,0	43,2 ± 16,4	34,6 ± 8,9	38,4 ± 12,5	40,2 ± 3,5
Fosfatasa alcalina (UI/L)	89,6 ± 16,7	85,2 ± 14,3	113,0 ± 42,2	101,4 ± 13,1	109,8 ± 18,7	117,0 ± 19,2	110,0 ± 44,0	92,0 ± 22,1
Hemoglobina (g/dL)	11,9 ± 0,8	12,5 ± 0,8	11,7 ± 0,7	12,7 ± 0,8	11,7 ± 0,9	12,7 ± 1,1	12,1 ± 0,7	12,2 ± 1,8
Hematocrito (%)	35,0 ± 2,9	36,4 ± 4,6	37,4 ± 1,5	38,0 ± 3,1	34,2 ± 1,9	39,2 ± 4,3 ^b	32,8 ± 4,8	35,6 ± 5,5
Leucocitos (x 10 ³ /μL)	6,8 ± 1,7	7,5 ± 2,0	8,1 ± 1,3	9,0 ± 0,4 ^b	6,7 ± 2,0	5,7 ± 1,2	6,0 ± 1,3	6,6 ± 0,9
Linfocitos (%)	35,8 ± 6,3	35,8 ± 8,9	34,4 ± 74,4	39,4 ± 11,1	34,4 ± 7,9	32,2 ± 11,7	41,2 ± 7,8	37,2 ± 7,4
Monocitos (%)	1,2 ± 1,3	1,2 ± 1,7	1,0 ± 1,7	0,2 ± 0,4	1,0 ± 0,7	1,8 ± 1,3	0,6 ± 0,8	1,4 ± 1,6

SSF: suero fisiológico. ALC: *Annona-Lutea-Curcuma*; Media ± DE. ANOVA, test de Tukey^a Vs Grupo SSF ($p < 0,01$) ^b Vs Grupo SSF ($p < 0,05$)

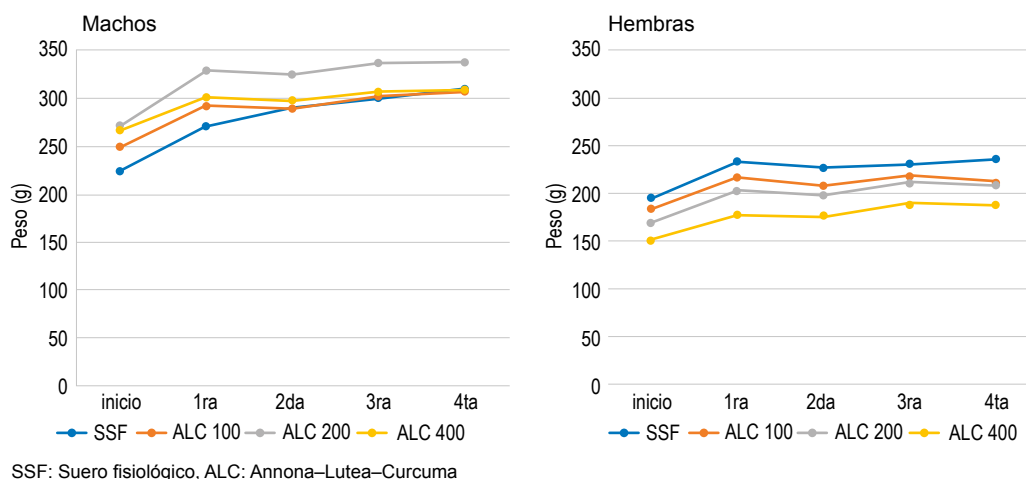


Figura 1. Variación del peso corporal de las ratas Holtzman que reciben la administración oral de la asociación atomizada de *Curcuma Longa* (A4R), *Cordia lutea* (A4F) y *Annona muricata* (A4L) durante 28 días

Las evaluaciones macroscópica e histopatológica no evidencian signos de toxicidad; se realizó la valoración de las gónadas, testículos y ovarios; hígado, bazo, corazón, y cerebro (Figura 3), observándose tejidos normales.

DISCUSIÓN

Desde tiempos antiguos, la medicina botánica representa una alternativa terapéutica, muchas agencias en el mundo han emitido regulaciones relacionadas con a la seguridad de los medicamentos herbarios, con el fin de proteger

y promover la salud pública ⁽²²⁾; estos medicamentos han demostrado diversos efectos: antiinflamatorios, antineoplásicos, protectores hepáticos, antioxidantes *in vitro* e *in vivo*, antimicrobianos, sedantes, hipnóticos, entre otros ⁽⁴⁾; las terapias prolongadas, necesarias para el tratamiento de las enfermedades crónicas, incrementan el riesgo de nefrotoxicidad y hepatotoxicidad ⁽²³⁾, además, en algunas enfermedades crónicas, como el tratamiento de neoplasias, el uso prolongado de fármacos estándares conlleva a la aparición de efectos adversos severos, como pérdida de cabello, anemia, trastornos gastrointestinales,

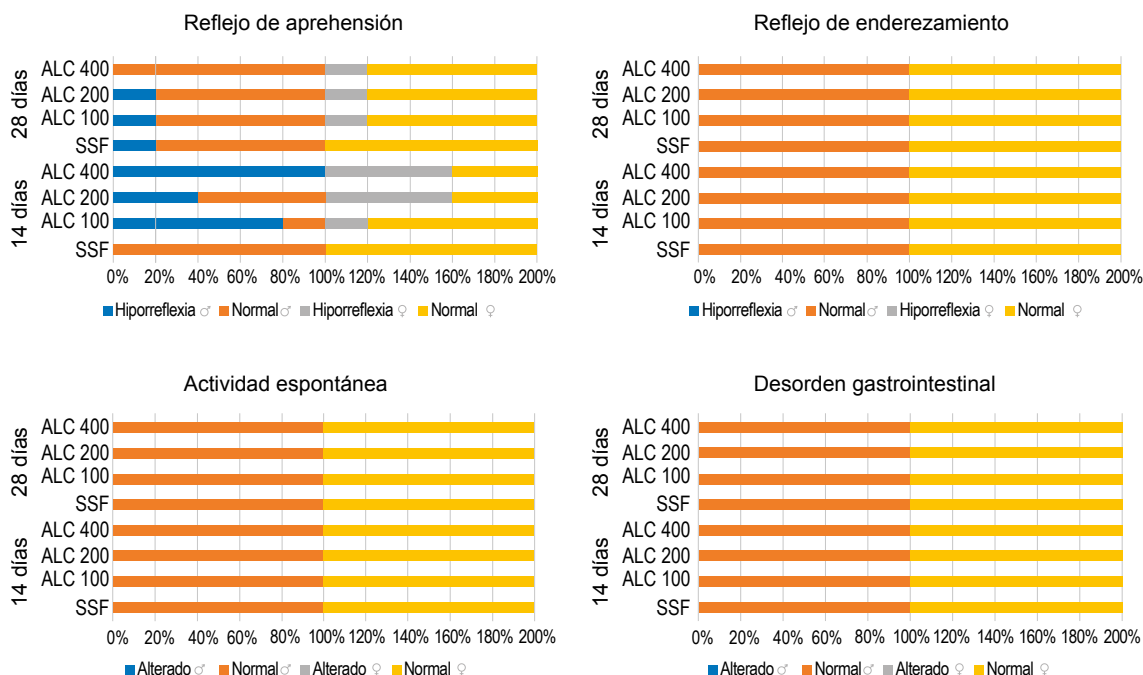
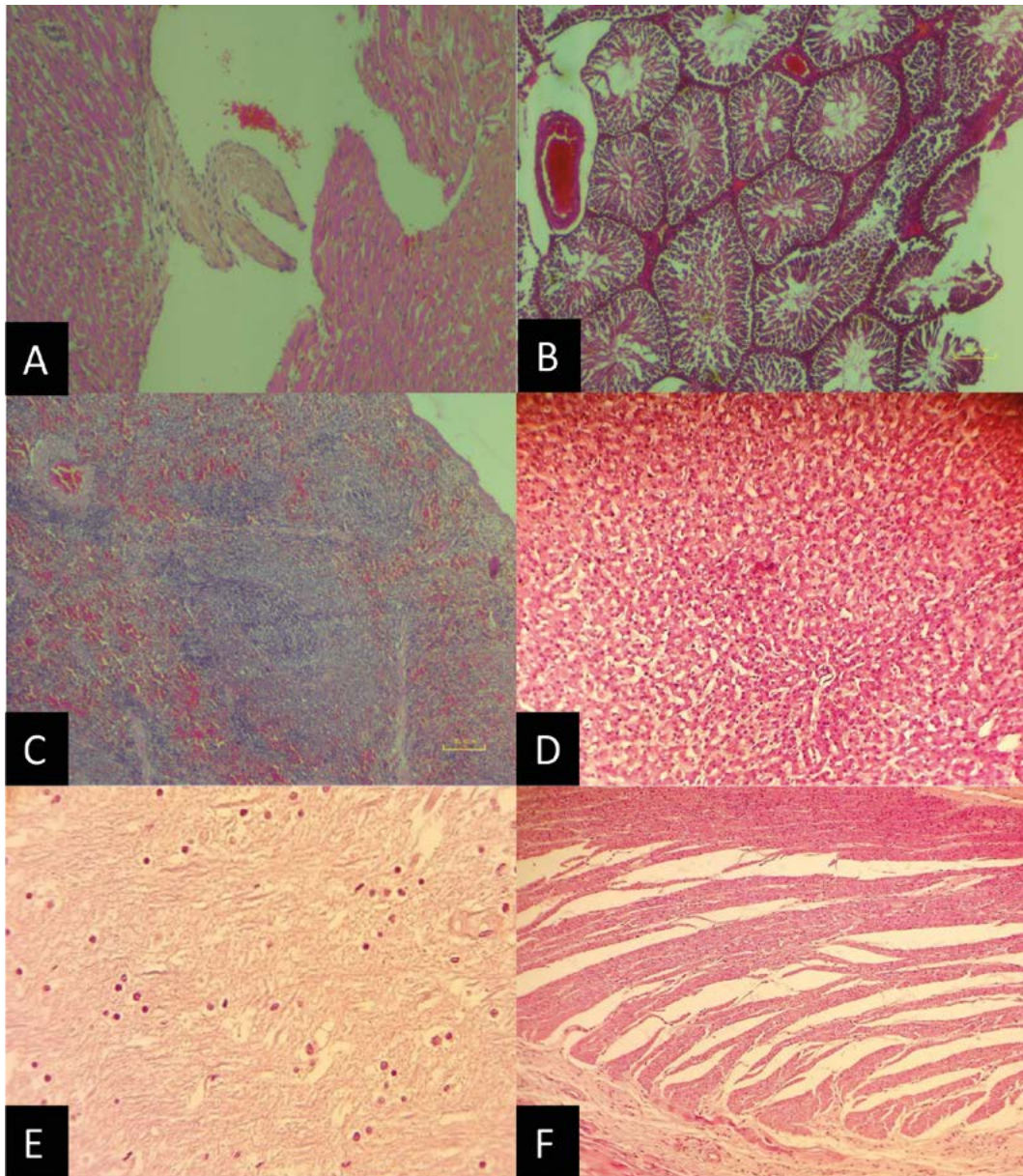


Figura 2. Manifestaciones clínicas de las ratas Holtzman que reciben la administración oral de la asociación de *Curcuma longa* (A4R), *Cordia lutea* (A4F) y *Annona muricata* (A4L) al ser administrado por vía oral durante a los 14 y 28 días.



A: Útero normal, B: Testículo normal, C: Bazo normal, D: Hígado normal, E: Cerebro normal, F: Corazón normal (100X)

Figura 3. Manifestaciones histológicas en las ratas Holtzman que reciben la administración oral de la asociación de *Curcuma longa* (A4R), *Cordia lutea* (A4F) y *Annona muricata* (A4L) al ser administrado por vía oral durante 28 días

leucemia, resistencia a los quimioterapéuticos ⁽⁶⁾; la demanda de estos productos ha llevado a la necesidad de evaluar no solo la eficacia, sino también los problemas de seguridad ⁽²⁴⁾.

Se ha realizado la investigación con el objetivo determinar la seguridad de la asociación del extracto atomizado del rizoma de *Curcuma longa*, flores de *Cordia lutea* y hojas de *Annona muricata*, administrado a ratas por vía oral una vez al día durante 28 días. Las observaciones indican que no hubo cambios significativos en el peso

corporal entre los grupos, ni tampoco cambios clínicos (Figura 1); la modificación en la ingesta de alimentos es considerado como un indicador de toxicidad ⁽²²⁾.

También se observa que los niveles de transaminasas no presentan diferencias significativas; se debe comentar de que el hígado es el órgano más afectado ante la presencia aguda o crónica de sustancias extrañas, que se exponen directamente luego de la absorción por vía oral mediante el fenómeno de primer paso hepático o luego por el metabolismo ⁽²²⁾; las plantas

en estudio contienen diversos metabolitos, útiles para el tratamiento de condiciones patológicas^(1, 7, 10, 11, 13-20), los flavonoides presentes en el extracto acuoso^(9, 16) son reportados como hepatoprotectores⁽²⁵⁾. Además, posiblemente en los niveles de dosis utilizados, los componentes químicos aportados por las tres plantas medicinales habrían mantenido un equilibrio importante, de manera tal que no indujo daños al hígado (Figura 3).

Los niveles de creatinina son considerados como marcadores de alteración renal, dependen de manera directa de la masa corporal^(22, 25); se evidencia que las ratas hembra del grupo II (100 mg/kg) redujeron los niveles de creatinina, y esto coincide con la pérdida de peso durante la última semana (Tabla 1). El sistema hematopoyético es muy sensible a las sustancias tóxicas⁽²⁶⁾; esto indica la seguridad de la asociación de A4R, A4F, A4L al no evidenciar cambios hematológicos. La evaluación de cambios patológicos, por macroscopía y microscopía, son indicadores de toxicidad⁽²⁷⁾, en el análisis macroscópico de los tejidos a todas las dosis probadas, no produjo cambios en los órganos vitales ni reproductivos de los animales tratados; asimismo, en el histopatológico, no hubo signos sugerentes de toxicidad, estos resultados coinciden con lo encontrado en los parámetros hematológicos y bioquímicos (Tabla 1, Figura 3).

Los ensayos de toxicidad sugieren realizar estudios en diferentes especies para predecir con precisión las propiedades farmacocinéticas y toxicológicas, con el fin de reducir los fracasos clínicos y el costo de la investigación⁽²⁸⁾; sin embargo, en el presente artículo solo se trabajó en un modelo murino debido a la legislación vigente que protege y limita el uso de especies más grandes.

Se concluye que la administración del extracto atomizado de rizoma de *Curcuma longa* (A4R), flores de *Cordia lutea* (A4F) y hojas de *Annona muricata* (A4L) en ratas durante 28 días, no presenta toxicidad aguda y subaguda, así lo evidencian los parámetros clínicos, hematológicos, bioquímicos e histopatológicos; demostrando así la seguridad del extracto atomizado a las dosis probadas.

Se recomienda continuar estudios según las normas de los organismos reguladores, como estudios de toxicidad crónica, toxicidad reproductiva, genotoxicidad, cambios endocrinos, entre otros, con el fin de evaluar la seguridad total para el uso en seres humanos.

Agradecimientos

A Sabell Perú S.A.C., por facilitar los bienes y otros, necesarios para ejecutar la investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Coria A, Moltalvo E, Yahia E, Obledo E. *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. *Arabian Journal of Chemistry*. 2016. In Press. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.01.004>
- Jamkhande P, Wattamwar A. *Annona reticulata* Linn. (Bullock's heart): Plant profile, phytochemistry and pharmacological properties. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 2015; 5:144-152. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtcme.2015.04.001>
- Jong-Min H, Jin-Seok L, Hyeong-Geug K, In-Chan S, Hwi-Jin I, Jung-Hyo C. *et al.* Synergistic effects of *Artemisia iwayomogi* and *Curcuma longa* radix on high-fat diet-induced hyperlipidemia in a mouse model. *Journal of Ethnopharmacology* 2015; 173:217-224. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.07.021>
- Efferth T. Perspectives for Globalized Natural Medicines. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 2011; 9(1):1-6. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1875-5364\(11\)60010-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1875-5364(11)60010-1)
- Ernst E. *Pharmaceutical Toxicology. Principles of Translational Science in Medicine (Second Edition)*. 2015. doi:10.1016/B978-0-12-800687-0.00028-1
- Barroso R, Santana L, Gagliato D, Mano M. Biological therapies in breast cancer: Common toxicities and management strategies. *The breast*. 2013; 22(6):1009-1018. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.breast.2013.09.009>
- Wang, H, Su G, Chen G, Bai J, Pei Y. H NMR-based metabonomics of the protective effect of *Curcuma longa* and curcumin on cinnabar-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Journal of Functional Foods*. 2015; 17:459-467. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.04.014>
- Cunha C, Marcelino P, Dos Santos E, De Ávila R, Simone C, Martins F, *et al.* Use of *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) and *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) to treat intestinal mucositis in mice: toxicopharmacological evaluations. *Toxicology Reports* 2016 doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.10.013>
- Freire, R, Vistel M Phytochemical characterization of *Curcuma longa* L. *Rev. Cubana Quím.* 2015;27(1):9-18.
- Gupta A, Mahajan S, Sharma R. Evaluation of antimicrobial activity of *Curcuma longa* rhizome extract against *Staphylococcus aureus*. *Biotechnology reports*. 2015; 6:51-55. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.btre.2015.02.001>
- Han Jong-Min, Lee Jin-Seok, Kim Hyeong-Geug, Seol In-Chan, Im Hwi-Jin, Cho Jung-Hyo, *et al.* Synergistic effects of *Artemisia iwayomogi* and *Curcuma longa* radix on high-fat diet-induced hyperlipidemia in a mouse model. *Journal of Ethnopharmacology*. 2015; 173:217-224. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.07.021>

12. Monserrath A, Serruis A, Afrikanova T, Maes J, Borggraeve W, Alen J, *et al.* Anticonvulsant activity of bisabolene sesquiterpenoids of *Curcuma longa* in zebrafish and mouse seizure models. *Epilepsy & Behavior*. 2012; 24(1):14-22. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2012.02.020>
13. Hernández T, Canales M, Terán B, Ávila O, Duran A, García A *et al.* Antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Cordia curassavica* (Boraginaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 2007; 111(1):137-141. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2006.11.002>
14. Parisotto E, Michielin E, Biscaro F, Ferreira S, Wilhelm D, Pedrosa R. The antitumor activity of extracts from *Cordia verbenacea* D.C. obtained by supercritical fluid extraction. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2012; 61:101-107. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2011.08.016>
15. Passos G, Fernandes E, Da Cunha F, Ferreira J, Pianowsky L, Campos M, *et al.* Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007; 110:323-333. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2006.09.032>
16. Arroyo J, Martine J, Ronceros G, Palomino R, Villareal A, Bonilla P, *et al.* Efecto hipoglicemiante coadyuvante del extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* L (guanábana), en pacientes con diabetes tipo 2 bajo tratamiento de glibenclamida. *An Fac med*. 2009; 70(3):163-7. doi: <http://dx.doi.org/10.15381/anales.v70i3.934>
17. Sun S, Liu J, Zhou N, Zhu W, Dou P, Zhou K. Isolation of Three New Annonaceous Acetogenins from Graviola Fruit (*Annona muricata*) and their Anti-Proliferation on Human Prostate Cancer Cell PC-3. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2015. IN PRESS. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.08.032>
18. Zorofchian S, Karimian H, Rouhollani E, Paydar M, Fadaeinsab M, Kadir H, *et al.* *Annona muricata* leaves induce G1 cell cycle arrest and apoptosis through mitochondria-mediated pathway in human HCT-116 and HT-29 colon cancer cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 2014;156:277-289. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.08.011>
19. Minari J, Okeke U. Chemopreventive effect of *Annona muricata* on DMBA-induced cell proliferation in the breast tissues of female albino mice. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 2014;15(4):327-334. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmhg.2014.05.001>
20. Florence NT, Benoit MZ, Jonas K, Alexandra T, Désiré DD, Pierre K, Théophile D. Antidiabetic and antioxidant effects of *Annona muricata* (Annonaceae), aqueous extract on streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol*. 2014; 151(2):784-790. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.09.021>
21. Cabanillas J. Composition for treating hepatitis containing an extract of *Cordia lutea* flowers, *Annona muricata* leaves, and *Curcuma longa* roots. [Internet]. . [Internet]. Canada: SABELL CORP; CA2701190 (A1), 2008. Available from: <http://europepmc.org/patents/PAT/CA2701190>.
22. Kandhare A, Bodhankar S, Moha V, Tukardesai P. Acute and repeated doses (28 days) oral toxicity study of glycosides based standardized fenugreek seed extract in laboratory mice. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2015; 72(2):323-334. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.05.003>
23. Saiful L, Ong Y, Zaaba N, Mohd R, Biau J, Sim Y. Anti-breast cancer properties and toxicity of *Dillenia suffruticosa* root aqueous extract in BALB/c mice. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2015; 5(12):1018-1026. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.09.008>
24. Ting Y, Chiou Y, Jiang Y, Lin Z, Huang Q. Safety evaluation of tangeretin and the effect of using emulsion-based delivery system: Oral acute and 28-day sub-acute toxicity study using mice. *Food Research International*. 2015; 74:140-150. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.031>
25. Da Silva A, Reginato F, Guex C, Figueredo K, Araldi I, De Freitas R, *et al.* Acute and sub-chronic (28 days) oral toxicity evaluation of tincture *Baccharis trimera* (Less) Backer in male and female rodent animals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2016;74:170-177. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.10.024>
26. Karenina G, Coelho J, Barros A, Alexandre M, Onofre W, Marquez R, *et al.* Acute and subacute (28 days) oral toxicity assessment of the oil extracted from *Acrocomia aculeata* pulp in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2014; 74:320-325. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2014.10.026>
27. Prabu P, Panchapak S, David C. Acute and Sub-Acute Oral Toxicity Assessment of the Hydroalcoholic Extract of *Withania somnifera* Roots in Wistar Rats. *Phytother. Res*. 2012. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.4854>
28. Novic E, Parekh A, Cho C, Pludwinski E, Freedman R. Hepatotoxicity of drug compounds in four species (human, dog, cynomolgus primate, and rat) in long-enduring, stable HµREL® hepatocyte co-culture models. *Toxicology Letters*. 2014;229:S139. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.06.489>