

Artículo original

# Evaluación de la toxicidad *in vitro* e *in vivo* del extracto etanólico de las hojas de *Calotropis gigantea* (L.) W. T. Aiton.

## *In vitro* and *in vivo* toxicity evaluation of *Calotropis gigantea* (L.) W. T. Aiton ethanolic leaf extract.

Roa Ana<sup>1\*</sup>, Perozo Maricarmen<sup>2</sup>, Crespo Andrys<sup>3</sup>, Fraile Silvia<sup>4</sup>, Rojas Janne<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biopatología, Facultad de Odontología. Universidad de Los Andes. Mérida, 5101. Venezuela

<sup>2</sup>Laboratorio Clínico, Hospital II El Vigía. Mérida, 5145. Venezuela

<sup>3</sup>Laboratorio Clínico Crespo. Ciudad Bolivia, Barinas, 5214. Venezuela.

<sup>4</sup>Centro de Biofísica y Bioquímica, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Altos de Pipe, Caracas. 1204. Venezuela

<sup>5</sup>Grupo de Investigación "Biomoléculas Orgánicas", Instituto de Investigaciones. Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes. Mérida, 5101. Venezuela

Recibido: 09 de septiembre de 2024 –Aceptado: 25 de enero de 2025

### RESUMEN

Las plantas poseen potencial curativo de ciertas dolencias y enfermedades, sin embargo, ellas también podrían ocasionar toxicidad y en casos extremos hasta la muerte. El presente trabajo tiene como objetivo evaluar la toxicidad *In Vitro* e *In Vivo* del extracto etanólico de las hojas de *Calotropis gigantea* (L.) W.T.Aiton (extEtOHCg). Dicha actividad se evaluó en células de riñón de mono Rhesus (MA-104 ATCC N° CRL-2378) tratadas con diferentes concentraciones del extracto (desde 5 a 500 µg/mL), usando el método colorimétrico de microtitulación para el crecimiento celular *In Vitro*. Además, se evaluó la toxicidad aguda oral, *In Vivo*, en ratas macho Bio:Wistar con la administración intragástrica a las dosis de 500, 2000 y 5000 mg/kg del ext EtOHCg aplicando el protocolo de Toxicidad Aguda (anexo 2d) de la OCDE N° 423. A los animales se les determinaron los signos tóxicos evidentes iniciales, tales como: mortalidad, efecto sobre el peso corporal y daño hepático mediante la determinación de enzimas séricas, la observación macroscópica y análisis histopatológico del tejido de hígado. Los resultados revelaron que la citotoxicidad fue menor al 20% de muerte celular, nivel considerado no citotóxico aún en la dosis máxima administrada. Ninguna de las dosis ensayadas provocó mortalidad en los animales, no se observó cambios significativos en el comportamiento, el peso corporal y daño hepático evidente en ratas albinas macho Bio:Wistar tratados

con dosis única hasta el nivel de 5000 mg/kg de peso corporal. Por lo tanto, se puede considerar que fue bien tolerado y no fue tóxico en las condiciones evaluadas.

### PALABRAS CLAVE

Citotoxicidad, ratas Bio:Wistar, toxicidad aguda, hepatotoxicidad, *Calotropis gigantea*, extracto etanólico.

### ABSTRACT

Plants possess the potential to heal certain ailments and diseases, however, they may also cause toxicity and in extreme situations even death. The aim of this work is to evaluate the *In Vitro* and *In Vivo* toxicity of ethanolic extract of *Calotropis gigantea* (L.) W. T. Aiton leaves (extEtOHCg). This activity was evaluated in rhesus monkey kidney cells (MA-104 ATCC No. CRL-2378) treated with different concentrations of the extract (from 5 to 500 µg/mL) using the colorimetric microtiter method for cell growth *In Vitro*. Furthermore, the acute oral toxicity was evaluated, *In Vivo*, in male Bio:Wistar rats with the intragastric administration at dose levels of 500, 2000 and 5000 mg/kg of extEtOHCg applying the Acute Toxicity protocol (annexed 2d) of OECD No. 423. Initial evident toxic signs were evaluated in experimental animals, such as: mortality, the effect on body

weight and liver damage by determining serum enzymes, macroscopic observation and histopathological analysis of the liver tissue. Results revealed that cytotoxicity was lower than 20% of cell death, level considered as non-cytotoxic even at the highest doses administrated. Likewise, none of the doses tested caused mortality in the experimental animals.

## KEY WORDS

Cytotoxicity, Bio:Wistar rats, acute toxicity, hepatotoxicity, *Calotropis gigantea*, ethanolic extract.

## INTRODUCCIÓN

Remedios a base de hierbas y plantas medicinales representan la sabiduría y el conocimiento acumulados por los pueblos originarios, los cuales han sido utilizados popularmente para el autocuidado de la salud, prevención y tratamiento de enfermedades [1, 2]. Aunque el estudio de la química de los productos herbarios ha dado origen al desarrollo de fármacos modernos, uno de los problemas actuales más frecuentes asociados a las plantas de interés medicinal es el uso de modo indiscriminado, la ausencia de evidencias farmacológicas, toxicológicas y clínicas que avalen su eficacia e inocuidad, así como los factores bióticos y abióticos que pueden afectar la concentración de los metabolitos secundarios bioactivos [3]. Durante la pandemia (COVID-19) en Pakistán, así como a nivel mundial la mayoría de pacientes prefirieron utilizar remedios a base de hierbas medicinales, plantas enteras o parte de ellas, para tratar sus afectaciones por el coronavirus, mostrando gran confianza en la medicina herbal [4].

Además, la información no validada científicamente circulante por las redes sociales, contribuye al uso indiscriminado de plantas a las que se les atribuyen propiedades medicinales [5]. Hay que considerar que, así como las plantas tienen el potencial curativo de ciertas dolencias y enfermedades, también poseen la capacidad de producir daño, toxicidad y muerte, debido a las diferentes concentraciones y variedad de metabolitos químicos presentes en el material vegetal. Algunas plantas medicinales son intrínsecamente tóxicas, otras también pueden provocar reacciones adversas si se utilizan de forma inadecuada [6-8]. En relación a lo anterior, la Organización Mundial de la Salud [2] en la primera cumbre mundial llevada a cabo en agosto de 2023, sobre medicina tradicional, promovió la integración en los sistemas de salud a las intervenciones que con evidencias científicas demuestren ser eficaces y seguras.

Dentro de las especies herbólicas que han sido utilizadas por la medicina tradicional se encuentra la familia

Apocynaceae (antiguamente denominada, Asclepiadaceae). Esta familia se compone de alrededor de seis especies de arbustos distribuidos en la zona tropical y subtropical (Figura 1). Dos de ellos, *Calotropis gigantea* y *Calotropis procera*, han sido localizados en Venezuela y en diferentes países de América [9]. En Venezuela, *C. gigantea* crece de manera xerófila y silvestre en climas áridos y semiáridos de los estados Apure, Distrito Capital, Cojedes, Falcón, Guárico y Mérida [10, 11]. *C. gigantea* comúnmente conocido como algodón de seda, es un arbusto grande que crece alrededor de 4 m de altura con tallos lechosos. Posee racimos de flores cerosas compuestas cada una de 5 pétalos opuestos, sus colores pueden ser blanco o lavanda, y sus hojas son de 10 cm de largo y 8 cm de ancho [12].

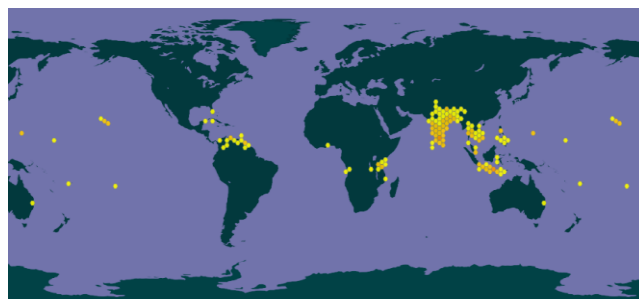


Fig. 1. Distribución geográfica de *Calotropis gigantea* (Fuente: <https://www.gbif.org/es/species/8159169> Consultado el 19/06/2023)

*C. gigantea* tiene varios usos en la medicina tradicional. Las hojas, las flores y el latex han sido utilizadas en el tratamiento de parálisis, fiebre, inflamación, como purgante y emético; las raíces han sido empleadas en el tratamiento de infecciones cutáneas, ulceración, parásitos intestinales y tos [13, 14]. Por otro lado, estudios han mostrado el potencial como fuente de productos fitoquímicos con usos farmacoterapéuticos tales como saponinas, flavonoides, glucósidos, uscaridinas, calotropinas, frugósidos, calotropósidos,  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina, taraxasterol,  $\beta$ -sitosterol, entre otros constituyentes [15-19]. No obstante, las evidencias científicas que demuestren la inocuidad de la administración del extracto de hojas de *C. gigantea* en organismos vivos son limitadas. El presente estudio tiene como objetivo evaluar la toxicidad *In Vitro* e *In Vivo* del extracto etanólico de hojas de *Calotropis gigantea* (extEtOHCg) sobre células de riñón de mono Rhesus (MA-104 ATCC N° CRL-2378) y en ratas albinas macho Bio:Wistar. En las células se estimó el porcentaje de muerte celular y a los animales se les determinó los signos tóxicos evidentes iniciales, la mortalidad (toxicidad aguda), el efecto sobre el peso corporal y el daño hepático.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

El material vegetal, constituido de hojas frescas de *C. gigantea*, se recolectó en la estación Hato Piñero a una altitud entre 50-100 m.s.n.m, ubicado en el municipio Girardot, Estado Cojedes, República Bolivariana de Venezuela. El reconocimiento, la recolección e identificación de la especie vegetal fue realizada por el Ing. Ángel Fernández y Reina Gonto (botánicos del Herbario del Proyecto Biomedicinas del Bosque Tropical (HPBBT), adscrito al Laboratorio de Fisiología Gastrointestinal del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas) y un espécimen de comprobación se depositó, bajo el número de registro 02085RG, en el Herbario (HPBBT). El material vegetal fresco fue acondicionado inmediatamente en el sitio de recolección. La porción de material destinado para la preparación de los extractos se colocó en frascos previamente pesados los cuales contenían un litro (1L) de etanol (EtOH) al 95 % de grado técnico.

### Preparación del extracto.

El extracto se preparó tal como se describe en la metodología propuesta por Taylor y cols., (2012) [20] con las modificaciones siguientes: se recolectaron 1550g de hojas frescas, inmediatamente en el lugar de recolección, se colocaron en frascos con etanol (EtOH) y se cerraron herméticamente. Al llegar al laboratorio se les ajustó el volumen de EtOH al 95 % en una proporción 1:3 (p/v), se procesó en una trituradora industrial, seguidamente se dispusieron en frascos con cierre hermético y se dejaron macerar en oscuridad durante 5 días a temperatura ambiente. El macerado se filtró, se concentró a presión reducida en un rotavaporador marca Büchi R-205, se secó por liofilización y se conservó a -20 °C en frascos color ámbar debidamente rotulados. El rendimiento del extracto seco liofilizado fue del 3,1%. Para el análisis de toxicidad *In Vitro* se preparó una solución patrón de 100 mg/mL en dimetilsulfóxido (DMSO) al 100%, y para evaluar la toxicidad *In Vivo* se preparó una solución patrón de 1000 mg/mL en agua destilada estéril, inmediatamente antes de su uso.

### Evaluación de la actividad citotóxica *In Vitro*

La citotoxicidad se determinó por el método de microtitulación para el crecimiento celular *In Vitro* [21, 22] tal como se describió en Nuñez y cols., (2013) [23]. Se utilizó la línea celular derivada de riñón de embrión de mono Rhesus (MA-104 ATCC N° CRL-2378), la cual fue cultivada y mantenida en frascos Falcon® de 25 mL en medio Mínimo Esencial Eagle's (MEM) suplementado con 10% de suero fetal de bovino (SFB) inactivado y una mezcla de antibióticos [penicilina® (100.000 UI/L), anfotericina B® (2,5 mg/L) y gentamicina® (40 mg/L)]. Los cultivos se

incubaron en condiciones estables de temperatura (37 °C), en una atmósfera húmeda con 5 % de CO<sub>2</sub>, hasta obtener cultivos en monocapas confluentes (4 a 5 días).

A partir del cultivo celular de mantenimiento se sembró en platos de 96 pozos con un inóculo de 200.000 células (mL/pozo) en MEM y se incubó hasta obtener monocapas confluentes. El medio de cultivo fue retirado y se depositaron 150 µL/pozo de las diferentes concentraciones del extracto (5, 25, 50, 100, 250 y 500 µg/mL) preparados en medio MEM, sin suero y sin antibióticos, a partir de la solución patrón de 100 mg/mL en dimetilsulfóxido (DMSO). Como control se utilizaron pozos que contenían solo medio de cultivo con DMSO a la misma concentración que en la dilución del extracto de prueba. Después de 24 horas de incubación en las condiciones estándar se retiró el medio y las monocapas celulares se lavaron con buffer fosfato salino. Seguidamente, se adicionó la mezcla del reactivo de detección MTS/PMS diluido en medio de cultivo celular según las indicaciones del fabricante [22], a todos los pozos, tanto de las células tratadas como las de control. Inmediatamente, se realizó la medida de absorbancia en un lector para placas de ELISA a 515 nm, con la finalidad de determinar el valor basal (DO<sub>t0</sub>) de interferencia generado por las células más los reactivos y se incubó nuevamente a 37 °C durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, se midió la absorbancia (DO<sub>t2</sub>) del Formazán, un producto de la bioreducción del sustrato MTS/PMS por parte de enzimas deshidrogenasas mitocondriales de células metabólicamente activas. El ensayo para cada concentración del extracto fue realizado por triplicado. La absorbancia generada como ruido se dedujo de la absorbancia generada por las células expuestas metabólicamente activas. La citotoxicidad fue expresada como el porcentaje de muerte celular calculado con la siguiente fórmula:

$$\text{Citotoxicidad (\%)} = 100 - \left[ \frac{(\text{DO}_{t2} \text{ ext} - \text{DO}_{t0} \text{ ext})}{\text{DO}_{t2} \text{ control} - \text{DO}_{t0} \text{ control}} \times 100 \right]$$

Donde DO<sub>t0</sub> control y DO<sub>t0</sub> ext corresponden con la medición de la densidad óptica en el tiempo cero, inmediatamente después de la adición del medio reactivo para el ensayo bajo condiciones de control o tratamiento con extracto, respectivamente. Los valores DO<sub>t2</sub> control y DO<sub>t2</sub> ext corresponden con las medidas después de 2 h de reacción. El extracto se consideró citotóxico a partir de la concentración en la cual es capaz de inducir el 20% de muerte celular [24].

### Evaluación de la toxicidad aguda y de los efectos tóxicos *In Vivo*

#### Animales de experimentación

Se utilizaron 11 ratas BIO:Wistar adultas macho de ocho semanas de vida que pesaron entre 180 y 240 gramos, las

cuales procedieron del Bioterio de la Universidad de Los Andes (BIOULA), Venezuela. El presente estudio fue aprobado por la Comisión de Bioética de BIOULA con el aval N° CEBIOULA/095 y los procedimientos experimentales se llevaron a cabo atendiendo los lineamientos de la normativa del BIOULA y de la OCDE N° 423 [25, 26]. Los animales se mantuvieron en condiciones estándar de laboratorio, temperatura 24 °C, ciclos de luz/oscuridad de 12 horas con libre acceso de alimento y agua, humedad relativa de 45 %. Los animales fueron agrupados de manera aleatoria, en 3 grupos y marcados para permitir la identificación individual: grupo (1) control de 4 ratas, grupo (2) experimental de 6 ratas, grupo (3) experimental de 1 rata.

#### **Esquema de administración del tratamiento con el extracto**

El estudio de toxicidad oral aguda del extracto etanólico de hojas de *C. gigantea* se realizó según las Directrices de la Organización para la Economía de Cooperación y Desarrollo (OCDE) 423 (anexo 2d) [26], con las siguientes modificaciones: se usó 2000 mg/kg como dosis límite de prueba de inicio, el extracto se administró por vía oral con sonda gástrica a la dosis de 2000 mg/kg al grupo 2, como no hubo muertos en el grupo 2 se administró de 5000 mg/kg al grupo 3, el grupo 1 control recibió sólo agua estéril. El ensayo tuvo una duración de 14 días.

Los animales se observaron individualmente posterior a la dosificación, durante los primeros 30 minutos, luego durante las primeras 4 horas, y diariamente hasta los 14 días del experimento, para registrar las siguientes variaciones de los síntomas clínicos: cambios en la piel y el pelo, los ojos, las membranas mucosas, el aparato respiratorio, temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargo, sueño y coma. En todos los grupos se registró diariamente el peso de los animales antes y después del tratamiento con el extracto, el consumo de agua y de alimento. El día 14 del experimento, los animales fueron sacrificados con una sobredosis de halotano, se les realizó la necropsia y de cada grupo se eligió al azar un animal para extraer el hígado.

#### **Obtención de la muestra sanguínea**

Los días 1 y 7 se tomaron muestras sanguíneas de cada animal del grupo control y experimental, bajo anestesia con una mezcla de ketamina HCl (50mg/mL) USP/ xilacina (al 10%) relación 5:1 a la dosis de 0,2 mL/100 g de peso por vía intraperitoneal, con capilar sin anticoagulante en zona retro-orbital, para cuantificar enzimas séricas ( $\gamma$ -GT, ALT y AST).

#### **Cuantificación de enzimas séricas**

Cada muestra de sangre se colocó en un tubo de ensayo de 12x75 mm sin heparina, se centrifugaron a 3.000 rpm durante 10 minutos, para separar el suero, el mismo se

colocó en viales Eppendorf e inmediatamente se les determinó Alanina Aminotransferasa (ALT), Aspartato Aminotransferasa (AST) y Gama-Glutamil transferasa ( $\gamma$ -GT) siguiendo las instrucciones del kit de diagnóstico de laboratorio de la casa comercial.

**Para la detección de Alanina Aminotransferasa (ALT)** se utilizó el Kit diagnóstico de la Casa Comercial ELITech Clinical Systems. En un vial Eppendorf se mezcló 200  $\mu$ L del Reactivo 1, con 50  $\mu$ L del Reactivo 2, luego se esperó 25 segundos. Seguidamente, se agregó 25  $\mu$ L de la muestra de suero, se mezcló y después de 50 segundos de incubación a 37°C se midió el cambio de absorbancia por minuto (A/min) durante 150 segundos en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 340 nm. Antes de realizar la medición se ajustó el equipo contra 0 de agua destilada. Este procedimiento se realizó por triplicado.

**En la detección de Aspartato Aminotransferasa (AST)** se utilizó el Kit diagnóstico de la Casa Comercial ELITech Clinical Systems. En un vial Eppendorf se mezcló 200  $\mu$ L del Reactivo 1, con 50  $\mu$ L del Reactivo 2, luego se esperó 25 segundos. Seguidamente, se agregó 25  $\mu$ L de la muestra de suero, se mezcló y después de 50 segundos de incubación a 37°C se midió el cambio de absorbancia por minuto (A/min) durante 150 segundos en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 340 nm. Antes de realizar la medición se ajustó el equipo contra 0 de agua destilada. Este procedimiento se realizó por triplicado.

**Para la cuantificación de Gama-Glutamil transferasa ( $\gamma$ -GT)** se utilizó el Kit diagnóstico de la Casa Comercial Wiener lab. En un vial Eppendorf se mezcló el Reactivo 1 y el Reactivo 2 del Kit diagnóstico. Posteriormente, se pre-incubó dos minutos y se agregó 100  $\mu$ L de la muestra de suero. Rápidamente, se mezcló y se prosiguió a incubación por 3 minutos a 37°C. Se registró la absorbancia a los 1, 2 y 3 minutos en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 405 nm a 37°C. Antes de realizar la medición se ajustó el equipo contra 0 de agua destilada. Para finalizar se determinó la diferencia promedio de absorbancia ( $\Delta A$ ) restando cada lectura de la anterior y promediando los valores, y se utilizó este promedio para los cálculos, tomando la siguiente ecuación:  $\gamma$ -GT (U/L) =  $\Delta A/\text{min} \times 1,158$ . Donde  $\gamma$ -GT (U/L) es cantidad de enzima que convierte 1  $\mu$ mol del sustrato por minuto en condiciones estándar,  $\Delta A/\text{min}$  es el cambio de absorbancia por minuto y 1,158 es el factor de conversión a 37 °C.

#### **Análisis macroscópico, procesamiento y evaluación histológica del Hígado**

El día 14 del estudio de toxicidad aguda se sacrificaron los animales en investigación utilizando sobredosis de halotano. Posteriormente, se realizó la necropsia a todos los animales y se seleccionó una rata al azar de cada uno de los

grupos para extraer el hígado y observarlo macro y microscópicamente.

El hígado completo fue perfundido en solución salina, fijado 10 días con formaldehído al 10% y deshidratado con alcohol etílico a concentraciones crecientes (70, 80 y 95%) durante 9 días. Posteriormente, el tejido se aclaró con acetona en dos lavados de 1 y ½ hora respectivamente. Se colocaron hasta el fondo en una base cuadrada de metal, y la parafina caliente (54°C) se vació en esta base, se enfrió por refrigeración para solidificar y formar los cubos o bloques de parafina. Una vez formados se colocaron en un micrótopo y se realizaron cortes de 5 µm. El corte se pasó a un recipiente con agua a una temperatura de 45 °C, lo que permitió la máxima extensión del tejido sin desintegración. Una vez extendido el tejido de manera correcta con un porta objetos esmerilado se obtuvieron 3 muestras de tejido del mismo hígado y se dejaron en una bandeja de metal para enfriar. Para la tinción, los cortes se desparafinaron e hidrataron sumergiéndolos en Xilol, Etanol, Etanol 70%, y agua destilada.

Seguidamente se colorearon con hematoxilina de Mayer durante 10 minutos. Enseguida, las láminas con el tejido hepático se lavaron con agua de chorro y agua destilada durante al menos 1 minuto. A continuación, los cortes se colocaron en una solución con alcohol ácido al 1%, se lavaron con agua destilada y luego se cambiaron a agua amoniacal. De nuevo, los cortes se lavaron con agua destilada y alcohol para posterior coloración con eosina durante 3 minutos. Las láminas con los cortes se deshidrataron y aclararon con Etanol y Xilol. Finalizada la tinción se colocó sobre el portaobjetos una gota de resina sintética y se cubrió con un cubreobjetos. La valoración microscópica de los tejidos se realizó con un microscopio óptico Medilux-12 con objetivo de 20 y 40X. Esta parte del estudio se llevó a cabo en el Servicio de Microscopia de Luz del Centro de Biofísica y Bioquímica (CBB) adscrito al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), bajo la supervisión del MSc. Víctor Salazar).

#### **Análisis Estadístico**

El conjunto de datos obtenidos fue procesado mediante el software estadístico SPSS versión 15. Se compararon los grupos control y experimental, para lo cual se realizaron pruebas de distribución normal mediante el test de Kolmogórov-Smirnov y se comprobó la homogeneidad de varianza por el test de Levene. Cuando se cumplieron estas condiciones, se utilizó el ANOVA de una vía y las diferencias se determinaron por método HSD de Tukey para muestras independientes. Se estableció un nivel de significancia estadística de  $p < 0.05$ .

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Actividad citotóxica *In Vitro***

El primer paso para explorar la importancia de cualquier planta medicinal es conocer sus datos de uso etnomedicinal, su actividad tóxica, así como la presencia de compuestos fitoquímicos. *C. gigantea* es una planta herbácea xerófila con potencial uso farmacológico por la presencia de diversos compuestos bioactivos en sus diferentes partes. Las hojas son las que contienen la mayor parte de estos compuestos, entre ellos alcaloides, saponinas, glucósidos, tocoferol, taninos, esteroides, flavonoides, terpenos, lignanos y fenoles [14, 15, 27-30]. La presencia mayoritaria de alguno de estos metabolitos secundarios puede conferir ciertas propiedades medicinales, así como también citotoxicidad, tal como es el caso de los glucósidos cardenólidos [31].

En el presente estudio se observó que las concentraciones menores o iguales a 100 µg/mL del extEtOHCg no mostraron citotoxicidad significativa sobre la línea celular MA-104 ATCC N° CRL-2378 luego de 24 horas exposición (Figura 2). La máxima concentración utilizada del extracto (500 µg/mL) indujo una muerte celular del 18 %. Sin embargo, este efecto no fue suficiente para clasificar al extracto como tóxico según el criterio de Taylor y cols., (2006) [26]. No obstante, un ligero efecto citotóxico observado con la máxima concentración evaluada, sugiere un efecto dosis dependiente. Lo que es consistente con los hallazgos de Nguyen y cols., (2017) [30], quienes a partir del extracto de hojas de *C. gigantea* aislaron un lignano con actividad citotóxica, el cual inhibió significativamente la formación de colonias de células PANC-1 de manera dependiente de la concentración. Por otro lado, estos resultados difieren de estudios previos que muestran una elevada citotoxicidad del extracto de hojas. *C. gigantea* en células cancerosas [19, 20, 30, 32], en células primarias de pulpa dental humana [33], en larvas de *P. xylostella* y nauplios de *Artemia salina* [29, 34].

### **Actividad tóxica *In Vivo***

Para evaluar la toxicidad aguda del extEtOHCg, se empleó el método OECD 423, y debido a que los resultados mostrados en la Figura 2 sugieren que el extEtOHCg no es tóxico para la línea celular MA-104 bajo las condiciones evaluadas, se optó por la prueba límite del anexo 2d. Tras administrar dosis de 2000 y 5000 mg/kg a ratas albinas Bio:Wistar, no se observó ninguna mortalidad durante las primeras 24 horas ni en los 14 días posteriores (Figura 3). Estos resultados indican que la DL50 es superior a 5000 mg/kg, clasificando al extracto en la categoría 5 (no tóxico) según la OECD 423. Además, se constató una buena tolerancia a las 24 horas post-tratamiento. Estos resultados,

respaldados por estudios previos [35-37], sugieren un amplio margen de seguridad para extractos de diferentes partes de esta planta. Se registró diariamente el peso corporal y se monitorearon los síntomas de intoxicación. Los síntomas clínicos observados durante las primeras 4 horas posteriores al tratamiento se detallan en la Tabla 1. Durante los primeros 30 minutos todos los animales presentaron el mismo comportamiento de acicalarse, sin presentar cambios en pelo, piel, ojos y mucosas. Solo el grupo que recibió tratamiento con 5000 mg/kg mostró temblores, estornudos e intranquilidad durante las 4 horas post tratamiento. Estos síntomas iniciales observados sugieren toxicidad, sin embargo, por la pronta recuperación de los animales se traduce como una intoxicación ligera o leve debido a la dosis elevada administrada del extEtOHCg. Todos los animales usados en este experimento se recuperaron satisfactoriamente al finalizar el estudio. Se administró agua estéril al grupo control. Durante el período de observación, solo se detectó un estado de estrés atribuible a la manipulación del animal.

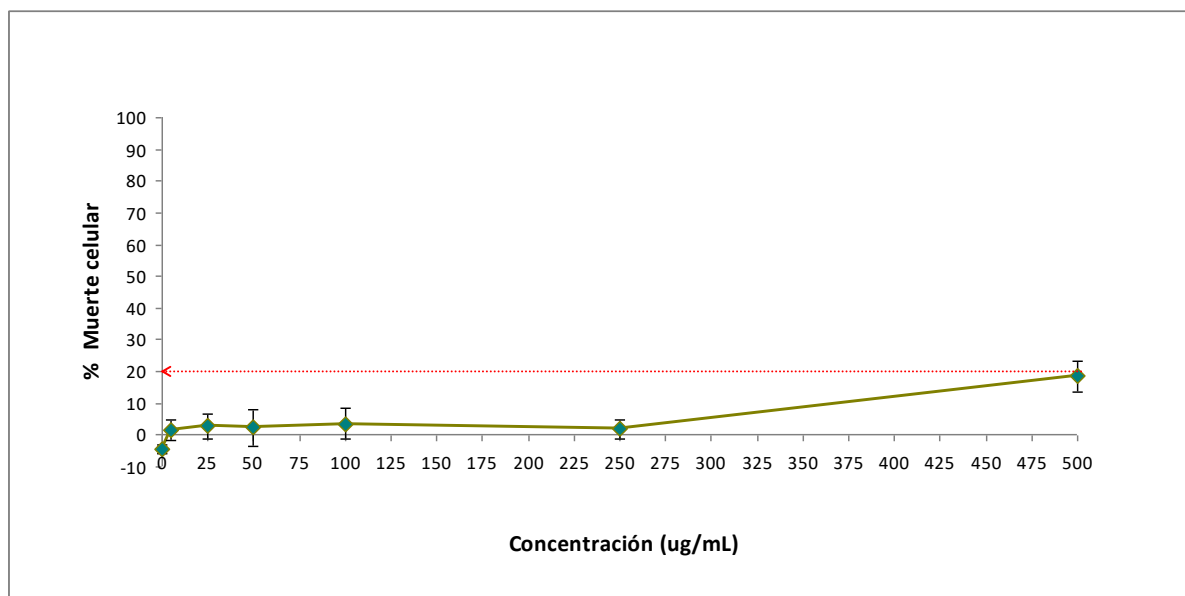
Para determinar si el tratamiento afectaba significativamente el peso corporal, se realizaron análisis estadísticos. Se comprobó la normalidad de los datos (prueba de Kolmogorov-Smirnov) y la homogeneidad de las varianzas (prueba de Levene). A continuación, se aplicó un ANOVA para comparar las medias de los grupos. Los resultados mostraron que no existen diferencias estadísticamente significativas en el peso corporal entre los grupos (Tablas 2, 3 y 4).

En esta investigación ninguno de los animales presentó pérdida del peso corporal, no obstante, se observó una ganancia del mismo a lo largo de los días, este comportamiento fue similar al observado por Hasballah y cols., (2018) [37]. Los resultados son presentados en la Tabla 2 y la Figura 4 en donde se muestra un aumento progresivo del peso corporal en el grupo control y en el grupo tratado con 2000 mg/kg. Mientras que el grupo tratado con 5000 mg/kg presentó un peso constante durante los primeros 3 días antes de seguir el patrón de aumento.

El aumento de peso observado en los grupos es consistente con la tasa de crecimiento normal para ratas Wistar macho de esta edad [38]. La fase de peso constante inicial en el grupo tratado con 5000 mg/kg podría atribuirse a la movilización de reservas energéticas para enfrentar los procesos de desintoxicación, como sugieren otros estudios [39].

### Cuantificación de enzimas séricas

El análisis de la cuantificación de las enzimas indicadoras de la función hepática (AST, ALT y  $\gamma$ -GT), realizado a los animales, un día antes y una semana después del tratamiento, demostraron que el extEtOHCg no causó alteraciones en los hepatocitos (Tabla 5). En este sentido, los análisis estadísticos realizados (Tabla 6) revelan que la distribución de los datos en ambos grupos (experimental y control) es estadísticamente similar ( $p > 0.05$ ).



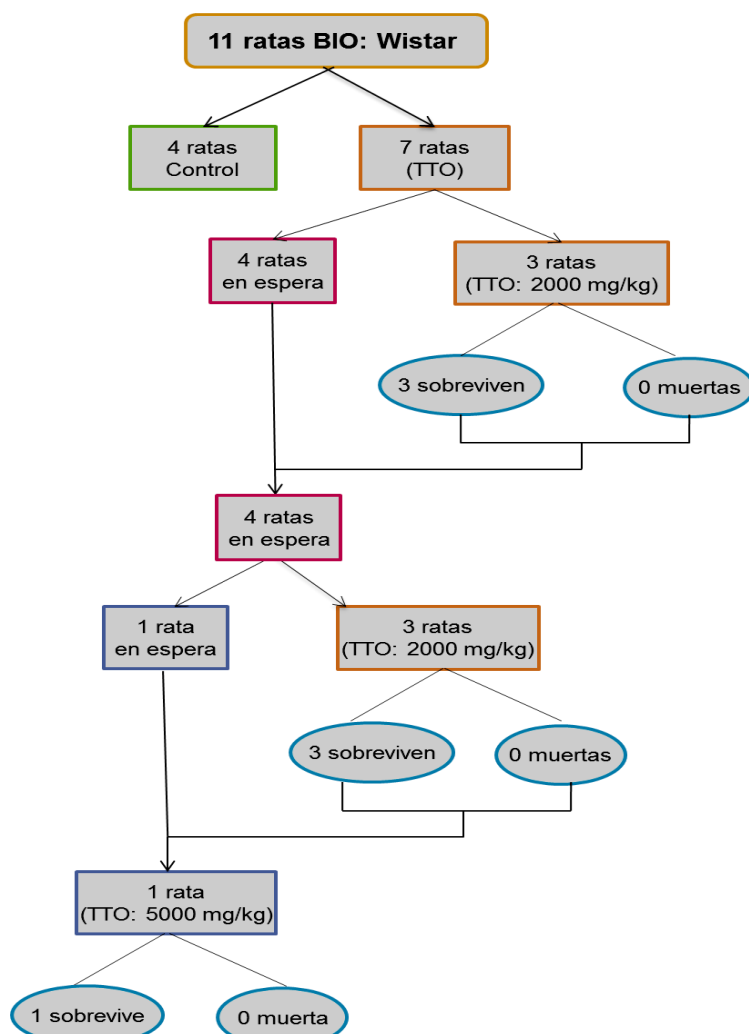
**Fig. 2.** Citotoxicidad del extracto etanólico de hojas de *Calotropis gigantea* sobre células MA-104 ATCC N° CRL-2378. Monocapas de células fueron cultivadas por 24 horas en presencia de diferentes concentraciones del extracto. Se determinó la absorbancia producto de la bioreducción del sustrato MTS-PMS por parte de células metabólicamente activas. El extracto se consideró citotóxico a partir de la concentración en la cual es capaz de inducir un valor  $\geq 20\%$  de muerte celular (línea roja punteada). La gráfica muestra el resultado de 3 réplicas del experimento realizado en fechas diferentes ( $n=6$ ).

**Tabla 1.**

Síntomas clínicos observados en ratas albinas macho BIO:Wistar en los primeros 30 minutos hasta las 4 horas después de la administración del extracto etanólico de hojas de *C. gigantea*.

| Grupos             | 30 minutos  |                 |                     | 4 horas                |                                     |           |           |                                 |
|--------------------|-------------|-----------------|---------------------|------------------------|-------------------------------------|-----------|-----------|---------------------------------|
|                    | Somnolencia | Hábitos de aseo | Respiración agitada | Cambios en piel y pelo | Cambios en ojos y membranas mucosas | Temblores | Estornudo | Comportamiento (intranquilidad) |
| Control            | -           | +               | -                   | -                      | -                                   | -         | -         | -                               |
| Grupo 2: 2000mg/kg | +           | ++              | +                   | -                      | -                                   | -         | -         | -                               |
| Grupo 3: 5000mg/kg | +           | ++              | +                   | -                      | -                                   | +         | +         | +                               |

Presente (+); Ausente (-)



**Fig. 3.** Supervivencia encontrada en ratas albinas macho BIO:Wistar tratadas con extracto etanólico de hojas de *C. gigantea*, aplicando el protocolo de Toxicidad Aguda (anexo 2d) de la OCDE 423

**Tabla 2.**

Estadísticos descriptivos según el día del experimento en ratas albinas macho BIO:Wistar control y tratadas con extracto etanolico de hojas de *C. gigantea*.

| Días                  | N | Mínimo | Máximo | Media $\pm$ DE     |
|-----------------------|---|--------|--------|--------------------|
| <b>Día 0</b>          |   |        |        |                    |
| Grupo Control         | 4 | 211,00 | 233,00 | 226,50 $\pm$ 10,50 |
| Grupo Experimental 01 | 6 | 195,00 | 214,00 | 201,60 $\pm$ 7,56  |
| Grupo Experimental 02 | 1 | 210,00 | 210,00 | 210,00             |
| <b>Día 1</b>          |   |        |        |                    |
| Grupo Control         | 4 | 226,00 | 263,00 | 244,25 $\pm$ 18,94 |
| Grupo Experimental 01 | 6 | 201,00 | 227,00 | 211,80 $\pm$ 10,32 |
| Grupo Experimental 02 | 1 | 208,00 | 208,00 | 208,00             |
| <b>Día 2</b>          |   |        |        |                    |
| Grupo Control         | 4 | 231,00 | 273,00 | 251,50 $\pm$ 21,56 |
| Grupo Experimental 01 | 6 | 203,00 | 233,00 | 220,60 $\pm$ 12,42 |
| Grupo Experimental 02 | 1 | 208,00 | 208,00 | 208,00             |
| <b>Día 3</b>          |   |        |        |                    |
| Grupo Control         | 4 | 234,00 | 280,00 | 257,75 $\pm$ 23,12 |
| Grupo Experimental 01 | 6 | 200,00 | 242,00 | 222,60 $\pm$ 15,02 |
| Grupo Experimental 02 | 1 | 209,00 | 209,00 | 209,00             |
| <b>Día 7</b>          |   |        |        |                    |
| Grupo Control         | 4 | 235,00 | 292,00 | 265,50 $\pm$ 26,58 |
| Grupo Experimental 01 | 6 | 207,00 | 252,00 | 234,40 $\pm$ 17,32 |
| Grupo Experimental 02 | 1 | 225,00 | 225,00 | 225,00             |
| <b>Día 14</b>         |   |        |        |                    |
| Grupo Control         | 4 | 251,00 | 319,00 | 286,75 $\pm$ 31,28 |
| Grupo Experimental 01 | 6 | 227,00 | 272,00 | 254,40 $\pm$ 16,84 |
| Grupo Experimental 02 | 1 | 240,00 | 240,00 | 240,00             |

Grupo Control: 0 mg/kg. Grupo Experimental 01: 2000 mg/kg. Grupo Experimental 02: 5000 mg/kg.

**Tabla 3.**

ANOVA, para la variable peso.

|              | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F     | Sig.  |
|--------------|-------------------|----|------------------|-------|-------|
| Inter-grupos | 2352,100          | 2  | 1176,050         | 1,502 | 0,231 |
| Intra-grupos | 44639,63          | 57 | 783,151          |       |       |
| Total        | 46991,73          | 59 |                  |       |       |

**Tabla 4.**  
Comparaciones múltiples(a) Variable Peso, método HSD de Tukey

| (I) Grupos      | (J) Grupos      | Diferencia de medias (I-J) | Error típico    | Sig.            | Intervalo de confianza al 95 % |                 |
|-----------------|-----------------|----------------------------|-----------------|-----------------|--------------------------------|-----------------|
|                 |                 | Límite inferior            | Límite superior | Límite inferior | Límite superior                | Límite inferior |
| Control         | Experimental 01 | 12,88333                   | 7,663           | 0,221           | -5,559                         | 31,32           |
|                 | Experimental 02 | 2,08333                    | 12,773          | 0,985           | -28,654                        | 32,82           |
| Experimental 01 | Control         | -12,88333                  | 7,663           | 0,221           | -31,326                        | 5,559           |
|                 | Experimental 02 | -10,80000                  | 12,515          | 0,666           | -40,916                        | 19,31           |
| Experimental 02 | Control         | -2,08333                   | 12,773          | 0,985           | -32,821                        | 28,65           |
|                 | Experimental 01 | 10,80000                   | 12,515          | 0,666           | -19,316                        | 40,91           |

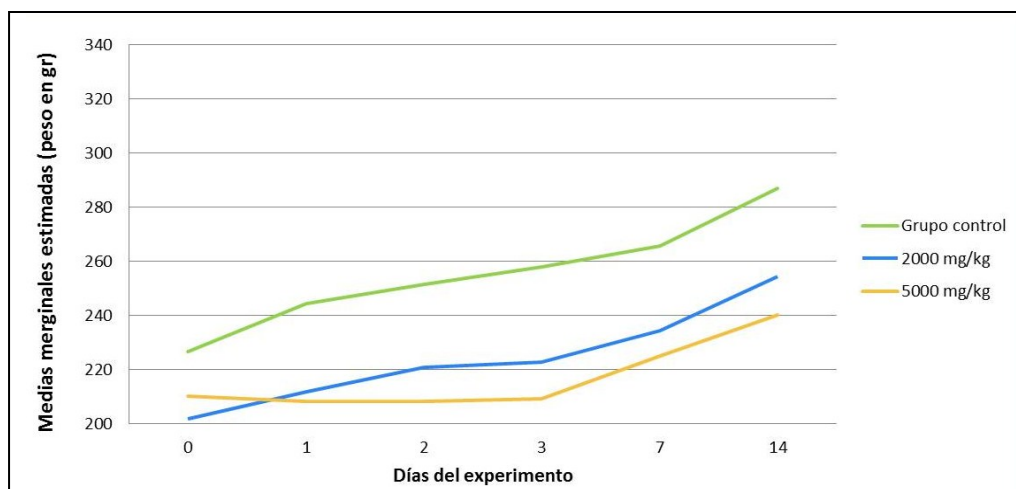
**Tabla 5.**  
Variaciones de la química sanguínea de ratas BIO:Wistar control y tratadas vía intragástrica con extracto etanólico (2000 y 5000 mg/kg) de *C. gigantea*.

|                    | N | ALT           | AST            | y-GT          |
|--------------------|---|---------------|----------------|---------------|
| <b>Día 1</b>       |   |               |                |               |
| Grupo Control      | 4 | 38,54 ± 13,91 | 139,02 ± 28,81 | 6,20 ± 1,80   |
| Grupo Experimental | 7 | 40,84 ± 11,12 | 118,78 ± 26,70 | 6,59 ± 1,73   |
| <b>Día 7</b>       |   |               |                |               |
| Grupo Control      | 4 | 39,44 ± 2,89  | 160,47 ± 24,75 | 36,48 ± 17,55 |
| Grupo Experimental | 7 | 47,34 ± 4,47  | 138,16 ± 34,04 | 42,80 ± 12,83 |

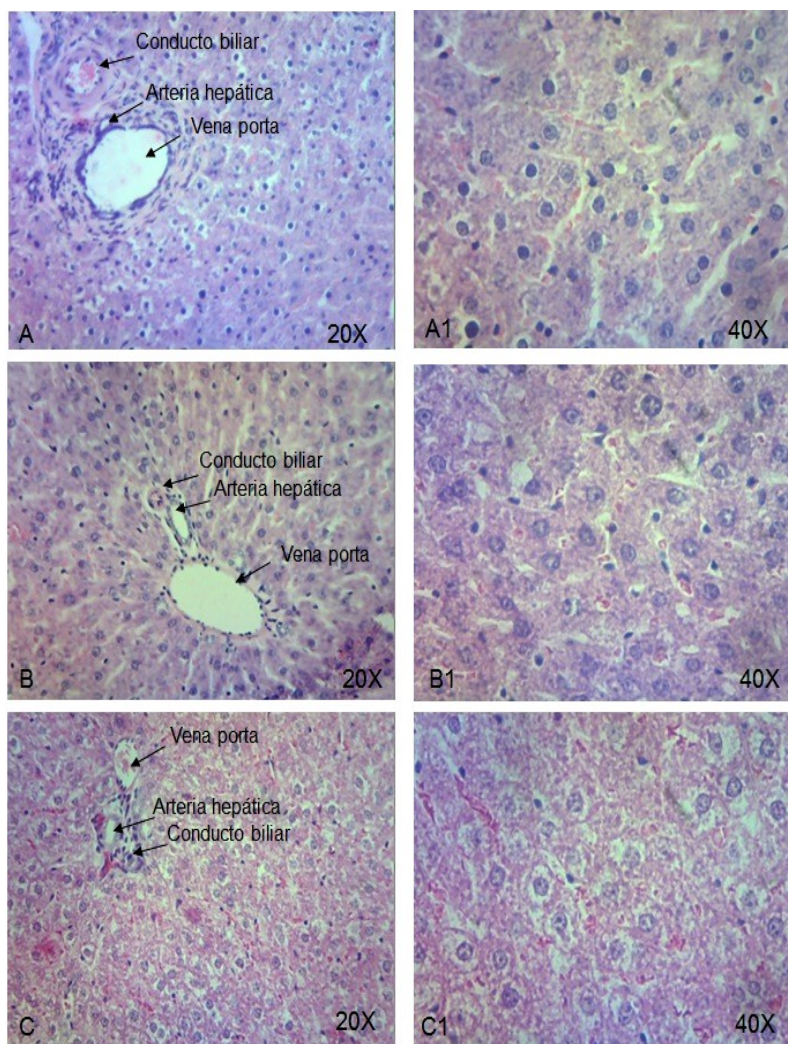
**Tabla 6.**  
Estadísticos de contraste(a), Prueba H de Kruskal-Wallis.

|               | ALT <sub>1</sub> | ALT <sub>2</sub> | AST <sub>1</sub> | AST <sub>7</sub> | GGT <sub>1</sub> | GGT <sub>7</sub> |
|---------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Chi-cuadrado  | 4,782            | 6,178            | 3,385            | 2,513            | 5,131            | 6,533            |
| Gl            | 3                | 3                | 3                | 3                | 3                | 4                |
| Sig. asintót. | 0,188            | 0,103            | 0,336            | 0,473            | 0,162            | 0,163            |

Variable de agrupación: DOSIS. ALT<sub>1</sub>: Alanina aminotransferasa día 1. ALT<sub>7</sub>: Alanina aminotransferasa día 7. AST<sub>1</sub>: Aspartato aminotransferasa día 1. AST<sub>7</sub>: Aspartato aminotransferasa día 7. GGT<sub>1</sub>: Gamma-glutamyl tranferasa día 1. GGT<sub>7</sub>: Gamma-glutamyl tranferasa día 7.



**Fig. 4.** Comportamiento del peso corporal por grupo según el día del experimento en ratas albinas macho Bio:Wistar control y tratadas con extracto etanolico de hojas de *C. gigantea*.



**Fig. 5.** Fotomicrografía del parénquima hepático del hígado de rata albina macho BIO:Wistar teñido con Hematoxilina-Eosina. A y A1 corresponde al control. B y B1 corresponde al tejido de hígado de rata tratado con 2000 mg/kg del extracto de hojas de *C. gigantea*. C y C1 corresponde al tejido de hígado de rata tratado con 5000 mg/kg de peso.

Esto indica que el tratamiento con el extracto etanólico de hojas de *C. gigantea* no provoca cambios significativos en los parámetros evaluados, lo que sugiere una excelente tolerancia del compuesto en ratas albinas BIO:Wistar, incluso a dosis de hasta 5000 mg/kg de peso corporal. AST, ALT y  $\gamma$ -GT son enzimas que se encuentran predominantemente en el citoplasma y a menudo se emplean como biomarcadores de la función hepática debido a su mayor presencia en el torrente sanguíneo después del daño de las células hepáticas [40,41]. Estos resultados corroboran la inocuidad del extracto extEtOHCg y respaldan su potencial uso medicinal.

### Evaluación histológica de Hígado

Se evaluó el efecto de diferentes dosis de extracto de hojas de *Calotropis gigantea* en el tejido hepático de ratas albinas macho Bio:Wistar. Al finalizar el estudio, no se observaron alteraciones macroscópicas ni microscópicas en el hígado de las ratas tratadas con el extracto etanólico de *C. gigantea*, incluso a la dosis más alta (5000 mg/kg). El análisis histopatológico a través de tinción de hematoxilina-eosina y análisis microscópico reveló que el tejido hepático de los animales tratados no presentó signos de daño celular, como necrosis o inflamación, en comparación con el grupo control (Figura 5). En detalle, se observó que con la dosis administrada de 2000 mg/kg no se evidenciaron alteraciones histológicas significativas en comparación con el grupo control, sugiriendo una buena tolerancia a esta dosis (Figura 5: B, B1), y con la dosis administrada de 5000 mg/kg se observaron cambios histológicos caracterizados por hepatocitos aumentados de tamaño, con aspecto esponjoso y núcleos claros, también se puede apreciar una leve hiperemia (aumento del flujo sanguíneo) (Figura 5: C, C1), lo que podría indicar una mayor actividad fisiológica del órgano para metabolizar el compuesto, en lugar de un signo de daño grave. Esta interpretación se ve respaldada por la ausencia de alteraciones en los biomarcadores enzimáticos, que son indicadores sensibles de daño celular. Estos resultados son comparables con hallazgos previos, los cuales tampoco reportaron efectos adversos en la histología del hígado tras la administración del extracto etanólico del látex [36] y del extracto metanólico de corteza de raíz [37] de *C. gigantea*.

### CONCLUSIONES

En conjunto, los datos obtenidos en el presente estudio mostraron que el extracto etanólico de hojas de *Calotropis gigantea* no produjo efectos adversos en las condiciones evaluadas, no indujo toxicidad significativa sobre la línea

celular MA-104 ATCC N° CRL-2378, no se observó muerte ni cambios significativos en el comportamiento, el peso corporal y daño hepático evidente en ratas albinas macho Bio:Wistar tratados con dosis única hasta el nivel de 5000 mg/kg de peso corporal. Por lo tanto, se puede considerar que fue bien tolerado y no fue tóxico en las condiciones evaluadas.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores de este trabajo reconocen y agradecen al MSc. Victor Salazar del IVIC por su colaboración.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Traditional Herbal Remedies for Primary Health Care. Nueva Delhi, Oficina Regional de la OMS para Asia Sudoriental. [Página Web] 2010 [acceso: 11 de septiembre de 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789290223825>. ISBN 978 92 9 022382 5.
- [2] Organización Mundial de la Salud. 1° Cumbre Mundial sobre Medicina Tradicional. Gandhinagar (India). [Página Web] 2023 [acceso: 03 de marzo de 2023]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/noticias/28-8-2023-cumbre-mundial-oms-sobre-medicina-tradicional-destaca-evidencias-cientificas>.
- [3] Van-Wyk AS, Prinsloo G. Health, safety and quality concerns of plant-based traditional medicines and herbal remedies. S. Afr. J. Bot. 2020; 133: 54-62.
- [4] Aljowaie R, Andleeb S, Kangal A, Al-Ghamdi A, Rehman K, Javed R, Mahmood A, Eisa Y. Prospect of herbal medication as prevention against COVID variants. J. King Saud Univ. Sci. 2023; 35: 102360.
- [5] Günelan E, Cebioglu IK, Çonak Ö. The popularity of the dietary supplements and functional foods in the coronavirus pandemic among the Google users in the USA, UK, Germany, Italy and France. Complement. Ther. Med. 2021; 102682.
- [6] Mensah M, Komlaga G, Forkuo AD, Firempong C, Anning AK, Dickson RA. Toxicity and safety implications of herbal medicines used in Africa Chapter 5. Herb. Med. 2019: 63-86.
- [7] Salinas PJ. Plantas tóxicas en el estado Mérida. Primera Parte. MedULA. 2010; 19: 59-68.
- [8] Cano CE, Cano OA, Cano OA. Plantas prohibidas o restringidas por su toxicidad: flora psicotrópica. Instituto de Estudios Giennenses. 2009; 73-123.
- [9] Wang Z, Wang M, Mei W, Han Z, Dai H. A New Cytotoxic Pregnanone from *Calotropis gigantea*. Molecules. 2008; 13: 3033-3039.

- [10] Tezara W, Colombo R, Coronel I, Marin O. Water relations and photosynthetic capacity of two species of *Calotropis* in a tropical semi-arid ecosystem. *Ann. Bot.* 2011; 107, 397-405.
- [11] Colombo R, Marín O, Irazábal S, Tezara W. Relaciones hídricas, fotosíntesis, y anatomía foliar de dos especies del género *Calotropis*. *Interciencia.* 2007; 32, (11).
- [12] Bairagi S, Ghule P, Gilhotra R. Pharmacology of Natural Products: A recent approach on *Calotropis gigantea* and *Calotropis procera*. *Ars Pharm.* 2018; 59 (1): 37-44.
- [13] Joseph B, George J, Jeevitha MV, Charles S. Pharmacological and biological overview on *Calotropis gigantea*: a comprehensive review. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 2013; 3 (5): 219-223.
- [14] Jahan N, Mushir A, Ahmed A. A review on Phytochemical and biological properties of *Calotropis gigantea* (Linn) R.Br. *Discovery Phytomedicine.* 2016; 3(2): 15-21.
- [15] Kulkarni S, Gaikwad A, Bhoi N, Hade A, Kokwar M, Gulwade M. Isolation, purification and structure elucidation of eight saponin compounds from *Calotropis gigantea*. *Nat. Prod. Res.* 2024; 1-12.
- [16] Rahman R, Rahman F, Shashank B, Rajasshekar S, Gangadhar B, Chandrashekhar S. Evaluation of *Calotropis gigantea* root in experimental diarrhoea. *IJPIR.* 2012; 2(1):10-15.
- [17] Al Sulaibi M A, Thiemann C, Thiemann T. Chemical constituents and uses of *Calotropis procera* and *Calotropis gigantea* – A review (Part I – the plants as material and energy resources). *Open Chem. J.* 2020; 7: 1-15.
- [18] Devanesan S, AlSalhi M. Identification, evaluation the source of natural bioactive compounds from *Calotropis gigantea* L. flowers and their anticancer potential. *J. King Saud Univ. Sc.* 2024; 36: 103-110.
- [19] Rani R, Sharma D, Chaturvedi M, Yadav JP. Phytochemical analysis, antibacterial and antioxidant activity of *Calotropis procera* and *Calotropis gigantea*. *Nat. Prod. J.* 2018; 9: 47–60.
- [20] Taylor P, Arsenak M, Abad MJ, Fernández A, Milano B, Gonto R, Ruiz MC, Fraile S, Taylor S, Estrada O, Michelangeli F. Screening of Venezuelan medicinal plant extracts for cytostatic and cytotoxic activity against tumor cell lines. *Phytother. Res.* 2012. 27 (4): 530-539.
- [21] Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer comm.* 1991; 3: 207-212.
- [22] Technical bulletin, cell proliferation assay. 1997. Promega corporation, Madison, USA, 1-13.
- [23] Nuñez R, Rojas J, Lucena M, Roa A, Meléndez P. Evaluación de la actividad antibacteriana y efecto citotóxico de extractos obtenidos de la especie *Vismia guianensis* (Aubl.) Pers. (Hypericaceae). *Rev Fac Farm.* 2013; 55 (2): 29-34.
- [24] Taylor P, Cesari IM, Arsenak M, Ballen D, Abad MJ, Fernández A, Milano B, Ruiz MC, William B, Michelangeli F. Evaluation of Venezuelan Medicinal Plant Extracts for Antitumor and Antiprotease Activities. *Pharm. Biol.* 2006; 44 (5): 349–362.
- [25] Duran R. Bioterio (Animales de Laboratorio). [Página Web] [acceso: 28 de mayo de 2023] Disponible en: <http://www.ciens.ula.ve/bioterio/bioterio/index.php>.
- [26] OCDE. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico. [Página Web] 2001. [acceso: 27 de febrero de 2016] Disponible en: [https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd\\_gl423.pdf](https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd_gl423.pdf).
- [27] Alafnan A, Sridharagatta S, Saleem H, Khurshid U, Alamri A, Ansari SH, Abidin SA, Ansari SA, Alamri AS, Ahemad N, Anwar S. Evaluation of the phytochemical, antioxidant, enzyme inhibition, and wound healing potential of *Calotropis gigantea* (L.) dryand: A source of a bioactive medicinal product. *Front. Pharmacol.* 2021; 12: 1622.
- [28] Thampy R, Thomas B, Chacko A. Preliminary Phytochemical and GC-MS Profiling of Ethanolic Extract of Leaves of *Calotropis gigantea* Linn. (Asclepiadaceae). *Ijppr.Human*, 2018; 12 (4): 211-220.
- [29] Khasanah N, Martono E, Trisyono A, Wijonarko A. Toxicity and Antifeedant Activity of *Calotropis gigantea* L. Leaf Extract Against *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae). *IJDNE.* 2021; 16(6): 677-682.
- [30] Nguyen KDH, Dang PH, Nguyen HX, Nguyen MTT, Awale S, Nguyen NT. Phytochemical and cytotoxic studies on the leaves of *Calotropis gigantea*. *Bioorg Med Chem Lett.* 2017; 27(13): 2902-2906.
- [31] Seeka C, Sutthivaiyakit S. Cytotoxic Cardenolides from the leaves of *Calotropis gigantea*. *Chem Pharm.* 2010; 58, (5), 725-728.
- [32] Mutiah R, Sukardiman S, Widyawaruyanti A, Zulaikah S. Comparison of ethanol extract from roots, leaves, and flowers of *Calotropis gigantea* as anticancer on T47D breast cancer cell lines. *ALCHEMY.* 2018; 5(1). 1-14.
- [33] Ningsih D, Idroes R, Bachtiar B, Khairan K, Tallei T, Muslem M. In vitro cytotoxicity of ethanolic extract of the leaf of *Calotropis gigantea* from le Jue geothermal

area, Aceh-Indonesia, and its mouthwash formulation against dental pulp cells. J. Appl. Pharm. Sci. 2022; 12(02): 133-143.

- [34] Fahim S, Islam S, Parvin S, Shams T, Fahim M, Islam A, Mostofa G, Sayeed M. Antimicrobial Screening and Brine Shrimp Lethality Bioassay of *Calotropis gigantea* (Fam: Asclepiadaceae). Sch. Res. 2012; 2 (1): 49-59.
- [35] Deshmukh T, Fernández J, Atul A, Toppo E. Wound healing activity of *Calotropis gigantea* root bark in rats. J. Ethnopharmacol. 2009; 125, 178–181.
- [36] Sanyal S, Maity P, Pradhan A, Bepari M, Kanta Dey S, Roy T, Maiti Choudhury S. Sub-Acute Toxicity Study of *Calotropis gigantea* Latex Extracts in Male Swiss Albino Mice. Toxicol Forensic Med Open J. 2016; 1, (2), 54-64.
- [37] Hasballah K, Sarong M, Rusly R, Tantri K, Mulia V.D. Acute Toxicity and Hepatotoxicity Evaluation of Methanol Extract of Root Bark of *Calotropis gigantea* in Rats. Dhaka Univ. J. Pharm. Sci. 2018: 243-250.
- [38] Cossio M, Gómez R, Vargas R, Hochmuller R, Arruda, M. Curvas de referencia para valorar el crecimiento físico de ratas machos Wistar. Nutr. Hosp. 2013; 28, (6), 2151-2156.
- [39] Moreno-Mendoza M., Parada-Palacios E., Mejía-Valencia J., Espinoza-Madrid P. Toxicología subcrónica de infusión de *Chenopodium ambrosioides* (epazote) por administración oral en ratones NIH. Rev. Cuba. Plant Med. 2013; 18 (1) 157-170.
- [40] Abbas M, Jawad Z. Hepatoprotective Effect of Alcoholic Extract of *Ficus carica* Leaves Against Cypermethrin-Induced Liver Toxicity in Male Albino Rats. Iraqi J. Vet. Med. 2023; 47(2): 64-72.
- [41] Kumar A, Yogesh M. *Calotropis procera* leaf extract against paracetamol induced hepatotoxicity in Rats by regulating JNK/ASK-1 Signaling Pathway. Res. J. Biotechnol. 2023; 18 (12):121-129.

**Roa López, Ana Agustina:** Farmacéutica, MSc. en Microbiología mención Alimentos, Doctora en Ciencias mención Microbiología, profesora Titular contratada adscrita al Departamento de Biopatología de la Facultad de Odontología, Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela. Correo electrónico: anaroa.lopez@gmail.com. Orcid, ID: Roa, <https://orcid.org/0009-0003-5235-6797>

**Perozo V, Maricarmen:** Licenciada en Bioanálisis. Bioanalista contratada al servicio del Laboratorio del Hospital II El Vigía, Mérida-Venezuela. Correo electrónico: marivivas022@gmail.com. Orcid, ID: Perozo, <https://orcid.org/0009-0001-4788-3934>

**Crespo Fernández, Andrys Karlana:** Licenciada en Bioanálisis. Directora del Laboratorio Clínico Crespo, Municipio Pedraza, Barinas-Venezuela. Correo electrónico: Andrysk20@gmail.com. Orcid, ID: Crespo, <https://orcid.org/0009-0000-9411-820X>

**Fraile Estrada, Silvia:** Farmacéutica, Profesional Asociado al Área de Investigación F2, Laboratorio de Fisiología Gastrointestinal, Centro de Biofísica y Bioquímica, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Altos de Pipe, Caracas-Venezuela. 1204. Correo electrónico: sfraille@ivic.gob.ve. Orcid, ID: Fraile, <https://orcid.org/0009-0000-0769-8999>

**Rojas Vera, Janne:** Farmacéutica, MSc. en Química de Medicamentos, PhD. en Fitoquímica, profesora Titular adscrita al Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela. Coordinadora del grupo de investigación “Biomoléculas Orgánicas”. Correo electrónico: janne.rojas24@gmail.com. Orcid, ID: Rojas, <https://orcid.org/0000-0001-5161-6778>