

INHIBICIÓN DEL TRÁNSITO INTESTINAL POR EL EXTRACTO METANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Annona muricata* L (GUANÁBANA) EN RATONES

Inhibition of intestinal transit by methanolic extracts of *Annona muricata* L. sheets (Soursop) in mice

Dorka I Salinas A¹, Juan C Araujo G², César B Cisneros H³, César A Villena N⁴, Dennis A Senosain T⁵, Cecilia V Huaracaya M⁶, Jorge L Arroyo A^{7,8}

¹ Centro Nacional de Control de Calidad, Instituto Nacional de Salud. Departamento de Físicoquímica. ² Dirección de Autorizaciones Sanitarias, Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas. ³ Farmacología de la Facultad de Medicina Humana, Universidad San Pedro, Chimbote. ⁴ Laboratorio Instituto Quimioterápico. ⁵ Dirección de Salud, Ministerio de Salud. ⁶ Departamento de Farmacia, Hospital Nacional Santa Rosa. ⁷ Instituto de Investigaciones Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. ⁸ Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

RESUMEN

Las hojas de *Annona muricata* L. (guanábana) son empleadas tradicionalmente para tratar la diarrea aguda; al respecto, no se ha encontrado información que valide su propiedad antidiarreica, por lo que se propuso evaluar experimentalmente dicha acción y su toxicidad aguda. Para esto se conformaron aleatoriamente 11 grupos, de 6 ratones machos Balb-C 56 cada uno. El grupo uno sirvió de control (1 mL solución salina), los grupos experimentales 2, 3, 4, 5, 6 y 7 recibieron extracto metanólico de *Annona muricata* L. en dosis de 10, 25, 50, 75, 100 y 200 mg/kg de peso corporal, respectivamente; el grupo ocho recibió loperamida 1 mg/kg y el grupo nueve aceite de ricino 10 mL/kg. Se empleó carbón activado como marcador del tránsito intestinal según el modelo *in vivo* en ratones. La dosis letal 50 para la muestra biológica fue 229 mg/Kg, con intervalo de confianza de 95% (límite superior 244,3 e inferior 220,9). Con dosis de 25 mg/kg del extracto de *Annona muricata* L. se observó una reducción del tránsito intestinal de 13,94 % ($p < 0,05$), similar al dado por loperamida (13,36 %). Se concluye que, en condiciones experimentales, el extracto metanólico de las hojas de *Annona muricata* L. inhibió el tránsito intestinal.

Palabras clave: antidiarreico, *Annona muricata* L., carbón activado.

SUMMARY

The leaves of soursop (*Annona muricata* L.) are traditionally used to treat acute diarrhea; the matter, has not found enough information to validate its property antidiarrheal, so was proposed to assess experimentally the action and acute toxicity. For that, 11 groups were formed randomly, 6 male mice Balb-C 56 each. Group one served as control (1 mL saline), the experimental groups 2, 3, 4, 5, 6 and 7 received methanol extract of *Annona muricata* L. in doses: 10, 25, 50, 75, 100 and 200 mg/kg body weight, respectively; the group eight received loperamide 1 mg/kg and the group nine castor oil 10 mL/kg. Activated carbon was used as a marker of intestinal transit by model *in vivo* in mice. The lethal dose 50 for the biological sample was 229 mg/kg, with a confidence interval of 95% (244,3 upper and lower 220,9). At doses of 25 mg/kg of *Annona muricata* L., a reduction of intestinal transit of 13,94% ($p < 0,05$), similar to that given by loperamide (13,36%). We conclude that in experimental conditions the methanol extract of leaves of *Annona muricata* L. inhibited the intestinal transit.

Keywords: antidiarrhoeal, *Annona muricata* L, activated charcoal.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial las enfermedades diarreicas son consideradas como una de las principales causas de morbilidad, con tasas que van desde 2 a 12 o más padecimientos por persona al año, los cuales representan un estimado de 12 600 muertes de niños por día en Asia, África y América Latina ⁽¹⁾.

La diarrea es una consecuencia de la alteración en el transporte de agua y sus electrolitos a nivel del intestino, dando como resultado un aumento en el volumen del agua neta desde la mucosa intestinal hasta el lumen, que se traduce en los siguientes síntomas: mayor frecuencia de evacuación, incremento del volumen de agua y mayor volumen de las heces ⁽²⁾. Todo esto propicia riesgos como: deshidratación y trastornos del equilibrio hidroelectrolítico ⁽³⁾. La alteración de la mucosa gastrointestinal, producto de un proceso inflamatorio subyacente, altera la permeabilidad y aumenta su motilidad ⁽⁴⁾.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda tratar la diarrea simple, en todas las edades, empleando medidas higiénico-dietéticas y sales de rehidratación oral, así como abstenerse de administrar cualquier otro medicamento por ser de eficacia dudosa o no demostrada y por el importante número y gravedad de efectos indeseables que pueden frecuentemente producir una relación riesgo/beneficio desfavorable ⁽⁵⁾.

El tratamiento racional de la diarrea infecciosa requiere del uso altamente selectivo de pruebas de laboratorio para determinar los agentes etiológicos ⁽⁶⁾.

Se han detectado y descrito varias sustancias endógenas relacionadas en el proceso desencadenante de la diarrea, las cuales incluyen la sustancia P, acetilcolina, taquininas NK₁ y NK₂, y mediadores como VIP y PAF ⁽⁷⁾.

En nuestro país la demanda asistencial contra esta patología nos exhorta a disponer de algún recurso terapéutico que ralentice la alteración en el transporte

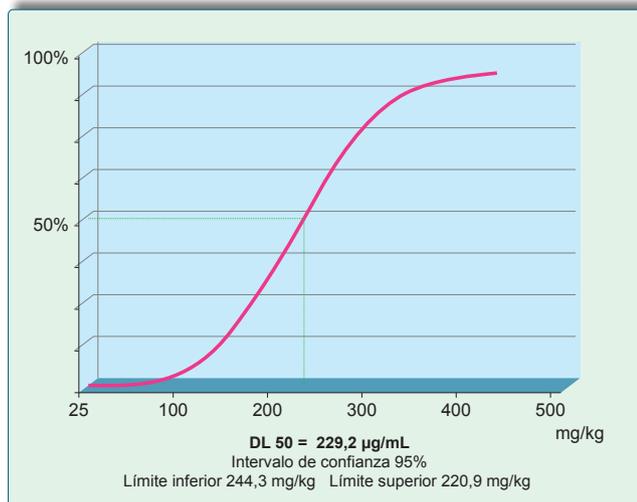


Figura 1. Curva de captación del radical superóxido producido por pirogalol de la vitamina C.

de agua y sus mediadores – endógenos y exógenos –, la sintomatología consecuente a nivel de la motilidad intestinal, y reducir los síntomas residuales; este efecto deseado se traduce en caracterizar las propiedades antidiarreicas del recurso fitoterapéutico *Annona muricata* L. ⁽⁸⁾.

La guanábana (*Annona muricata* L.) pertenece a la familia Anonaceae, cuyas especies se caracterizan por ser plantas leñosas de hojas enteras, sin estípulas; del árbol maduro brotan hojas perennes. La zona de mayor producción incluye el Caribe, Centro y Sudamérica. Filogenéticamente es similar a la chirimoya, por su fruto de cáscara verde y sabor muy dulce, además se cultiva como ésta ⁽⁶⁾. Todas las partes del árbol se han utilizado en la medicina tradicional y se le han atribuido diferentes propiedades contra diabetes, fiebre, hipertensión, indigestión, procesos inflamatorios, desórdenes hepáticos, parasitosis, tumores, úlceras, insomnio y diarrea ⁽⁹⁾.

En los últimos años, el extracto de hojas de guanábana ha llegado a ser popular debido a sus propiedades contra el cáncer. Componentes secundarios, como las acetogeninas, están presentes en el tejido leñoso de las anonáceas y son sustancias cerosas que resultan de la combinación de ácidos grasos de cadena larga (C₃₂ ó C₃₄) con una unidad de 2-propanol en el carbono 2 para formar una lactona terminal (dicha lactona queda al inicio de la cadena) ⁽¹⁰⁾.

Se ha reportado que las acetogeninas pueden inhibir selectivamente el crecimiento de células cancerígenas resistentes a la adriamicina, precursor del antineoplásico doxorubicina ^(10,11).

Estudios en el Caribe sugieren una relación entre el consumo de esta fruta y formas atípicas de la enfermedad de Parkinson, debido a la concentración muy alta de

Tabla 1. Identificación fitoquímica de *Annona Muricata* L.

Prueba	Identificación	Resultado
Gelatina	Taninos	(++)
Nihidrina	Aminoácidos libres	(-)
Tricloruro de hierro	Compuestos fenólicos	(++)
Dragendorff	Alcaloides	(+)
Mayer	Alcaloides	(+)
Hidróxido de sodio	Quinonas	(-)
Alfa-naftol (Molish)	Glicósidos	(+)
Shinoda	Flavonoides	(++)
Lieberman	Terpenos	(+)
Espuma	(-)	(-)

(-) negativo, (+) poca cantidad, (++) regular cantidad, (+++) abundante cantidad

Tabla 2. Determinación de la dosis letal 50 del extracto metanólico de las hojas de *Annona muricata* L. sobre ratones (n=6).

Grupos	Tratamiento (mg/kg)	Nº de ratones muertos
1	1000	6
2	250	5
3	235	3
4	225	2
5	210	1
6	200	0
7	100	0
8	75	0
9	50	0
10	25	0
11	10	0

Tabla 3. Efecto del extracto metanólico de hojas de *Annona muricata* L. y loperamida sobre el tránsito gastrointestinal del carbón activado en ratones (n=6).

Tratamiento	Dosis	Longitud intestinal media (cm)	Media del avance de C.A. (cm)	% inhibición del tránsito
S. F.	10 mL/kg	62,7	51,7	0,00
A.M.	10 mg/kg	64,2	52,5	0,48
A.M.	25 mg/kg	53,8	38,2	13,94
A.M.	50 mg/kg	60,8	35,7	27,01
A.M.	75 mg/kg	55,9	34,5	25,74
A.M.	100 mg/kg	59,7	29,8	38,37
A.M.	200 mg/kg	59,1	35,6	25,28
Loperamida	1 mg/kg	56,5	39,9	13,36
Aceite ricino	10 mL/kg	61,4	49,5	1,53

C.A. carbón activado, S.F. suero fisiológico, A.M. *Annona muricata*. Nivel de significancia: $p < 0,05$

annonacina (15 mg/Kg) ⁽¹²⁾, que es cien veces mayor que en el té elaborado a partir de sus hojas (140 µg/taza) ⁽¹³⁾.

El objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto inhibitorio sobre el tránsito intestinal del extracto metanólico de las hojas de *Annona muricata* L. en ratones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de las hojas y obtención del extracto

Las hojas de *Annona muricata* L. fueron colectadas en San José, distrito de Santiago de Cao, Provincia de Ascope,

Región La Libertad; lavadas y secadas en una estufa a 38 °C con aire circulante en el laboratorio de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Univerisad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM). El material seco fue pulverizado en un molino de cuchillas. El extracto metanólico de las hojas se preparó según la técnica del CYTED 1995 ⁽²¹⁾; se maceró con metanol durante ocho días a temperatura ambiente con movimientos diarios. Se filtró y desecó a 38 °C, en estufa hasta peso constante. El residuo seco se conservó en frasco color ámbar a 4 °C hasta su uso. Para la administración se resuspendió utilizando un agente tensoactivo, aceite de castor hidrogenado (CremoforR 4oS al 5%).

Estudio fitoquímico preliminar

En el extracto de las hojas de *Annona muricata* L. se evaluó la presencia de flavonoides, taninos, alcaloides, saponinas, glucósidos, y esteroides/tri-terpenos; usando los métodos de Odebiyi y Sofowora (1978) ⁽²²⁾.

Diseño experimental

Se utilizaron 120 ratones machos b (Balb-C 56) de 24±2 g de peso corporal procedentes del bioterio del Instituto Nacional de Salud (Chorrillos). Se les acondicionó por seis días en un ambiente de experimentación a 23 °C, con agua *ad libitum* y alimento balanceado estándar de ratón en pellet. Las consideraciones éticas se hicieron de acuerdo a los lineamientos del Departamento de Farmacología de la UNMSM y aspectos éticos de la experimentación con animales ⁽²³⁾.

a. Toxicidad aguda

Para LD₅₀ se usó el método descrito por Lorke, 1983, con una modificación en el número de animales. Se utilizaron ratones Balb-C 56, divididos en grupos de seis al azar, en total se hicieron once grupos.

El extracto reconstituido fue administrado a cada grupo por vía oral a dosis de: 1000, 250, 235, 225, 210, 200, 100, 75, 50, 10 y 2 mg/kg de peso corporal, respectivamente, registrándose la muerte de los animales desde las 24 horas y durante 14 días.

b. Efecto en el tránsito intestinal

Se formaron al azar nueve grupos de seis ratones cada uno, los cuales no recibieron alimento 12 horas antes de la experiencia, pero se les permitió tomar agua *ad libitum*. Al grupo control se le administró suero fisiológico vía oral, 10 mg/kg de peso corporal; a los grupos del 2 al 7 se les administró extracto metanólico a dosis de 10, 25, 50, 75, 100 y 200 mg/kg de peso corporal, respectivamente; el grupo 8 recibió 0,2 mL de solución de loperamida 0,04 mg/mL y el grupo 9 recibió aceite de ricino 0,2 mL mediante una cánula metálica. Una hora después se administró por vía oral 0,2 mL de suspensión de carbón activado en goma tragacanto 10 mg/mL como marcador. Una hora después de administrar el carbón activado, cada ratón fue sacrificado utilizando éter dentro de una campana extractora de gases; se diseccionó el abdomen y se procedió a eviscerar el

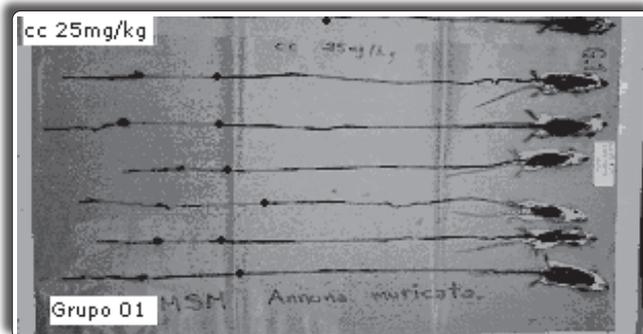


Figura 2. Gráfica del efecto del extracto metanólico de las hojas de *Annona muricata* L. a dosis de 25 mg/kg sobre el tránsito intestinal del carbón activado en ratones.

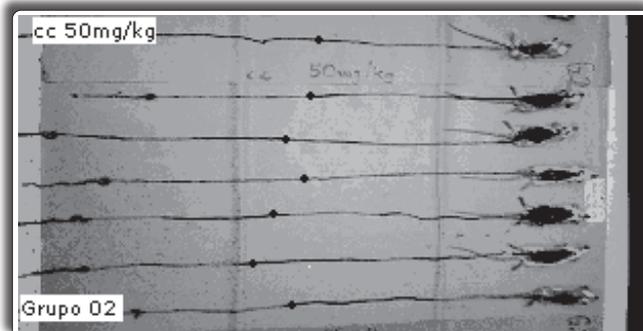


Figura 3. Gráfica del efecto del extracto metanólico de las hojas de *Annona muricata* L. a dosis de 50 mg/kg sobre el tránsito intestinal del carbón activado en ratones.

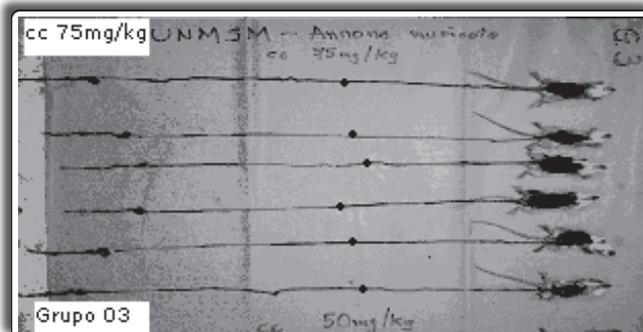


Figura 4. Gráfica del efecto del extracto metanólico de las hojas de *Annona muricata* L. a dosis de 75 mg/kg.

intestino, empezando por el borde del cardias hasta el ano para luego registrar las medidas tanto de la longitud total del intestino, así como del avance del carbón activado. Los porcentajes de inhibición de tránsito del carbón activado por la loperamida y por el extracto fueron calculados en función del grupo tratado con suero fisiológico (control negativo) usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = (N - n) / N \times 100$$

Donde:
 N: media del avance del carbón activado en el grupo control (suero fisiológico).
 n: diferencia entre N y el avance del carbón activado en el grupo con tratamiento.

Análisis estadístico

Variables

Toxicidad aguda: Se analizó por el método de Probits.

Tránsito intestinal: Se refiere a la distancia recorrida por la sustancia marcadora (carbón), siendo el 100% del recorrido la longitud del tubo digestivo que abarca desde el cardias hasta el ano. Se utilizaron promedios \pm error estándar, porcentaje y análisis de varianza utilizando $p < 0,05$ para valores estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Estudio fitoquímico

El extracto metanólico de las hojas de *Annona muricata* L. está constituido principalmente por taninos, compuestos fenólicos, flavonoides, alcaloides, glucósidos y terpenos (Tabla 1).

Estudios de seguridad: determinación de la dosis letal 50 en ratones

La dosis letal 50 para el extracto metanólico de las hojas de *Annona muricata* L. determinada en ratones y administrada por vía oral fue de 229,2 mg/kg con un intervalo de confianza al 95%, siendo el límite inferior 220,9 mg/kg y el superior de 244,3 mg/kg (figura 1 y tabla 2).

Efecto sobre el tránsito intestinal

Los resultados del efecto sobre el tránsito intestinal son mostrados en la tabla 3, donde se observa que el efecto provocado por el extracto metanólico de las hojas de *Annona muricata* L. administrado vía oral a dosis de 25 mg/kg es semejante al dado por la loperamida a 1 mg/kg; mientras que con las dosis de 50, 75, 100 y 200 mg/Kg de peso corporal, se redujo el tránsito significativamente ($p < 0,05$) al ser comparados con el grupo control.

DISCUSIÓN

La disminución del tránsito intestinal en ratones es un modelo farmacológico preclínico, que permite sustentar la hipótesis de que el extracto metanólico de las hojas de *Annona muricata* L. tiene acción antidiarreica; asimismo, el efecto obtenido comparado con la loperamida⁽¹⁴⁾ refuerza el resultado encontrado con el extracto metanólico, el cual disminuyó el tránsito intestinal del carbón activado administrado como marcador en ratones (tabla 3).

Los resultados (figura 2 y tabla 3) muestran el mayor efecto sobre el tránsito intestinal a dosis de 100 mg/kg (38,37%), mientras que a dosis de 25 mg/kg (13,94%) el efecto fue semejante al de loperamida a 1 mg/kg (13,36%).

Cabe precisar que si bien a dosis de 100 mg/kg de extracto se produce el mayor efecto antidiarreico, no lo sugerimos porque según los estándares farmacológicos no necesitamos llegar a utilizar dicha dosis.

Estos resultados también demostraron que el efecto antidiarreico no depende de la concentración del extracto, por cuanto a dosis mayores de 100 mg/kg el efecto sobre la motilidad intestinal disminuye.

El efecto global de inhibición del peristaltismo anormal que ejerce el extracto de las hojas de *Annona muricata* L. puede atribuirse a los compuestos fenólicos (taninos, flavonoides) con actividad antidiarreica, ya que existe información que indica la presencia de taninos en diversas variedades de plantas empleadas en el tratamiento de diarreas⁽¹⁵⁻¹⁷⁾.

Similar resultado obtuvieron Suleiman M, Dzenda T, Sani C, cuando compararon el efecto antidiarreico en ratones de *Annona senegalensis* con loperamida, que fue usada como control positivo⁽²⁾. La loperamida es un fármaco antidiarreico activo por vía oral, con actividad sobre el receptor μ , que disminuye la secreción y motilidad gástrica⁽¹⁸⁾.

Como se sabe, el aumento de las contracciones y el peristaltismo son producidos por la actividad colinérgica⁽¹⁹⁾, por lo que podemos deducir que uno de los probables mecanismos por el cual, el extracto de las hojas de *Annona muricata* L., ejerce su acción antidiarreica es actuando como un antagonista de la actividad colinérgica.

CONCLUSIONES

En condiciones experimentales, el extracto metanólico de las hojas de *Annona muricata* L. a dosis de 25 mg/kg demostró una marcada disminución del tránsito intestinal.

En el contexto de un enfoque toxicológico, se determinó que la dosis letal 50 (DL₅₀) del extracto metanólico de las hojas de *Annona muricata* L., administrado por vía oral en ratones normales, es de 229 mg/Kg.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Riverón R. Fisiopatología de la diarrea aguda. Rev. Cubana de Pediatría 1999; 71: 96-115.
2. Ossa G. Diarrea Aguda - Aspectos Patológicos y Epidemiológicos. Sociedad de Gastroenterología de Santiago de Chile 2005; 1: 3.
3. Suleiman M, Yusuf S. Antidiarrheal Activity of the Fruits of *Vitex doniana* in Laboratory Animals. Pharmaceutical Biology 2008; 46 (6): 387-92.
4. Morón F, Martínez M, Morón D. Disminución del tránsito intestinal en ratones por tintura de guayaba (*Psidium guajava* L.) oral. Rev Cubana Plant Med 1999; 4(2): 54-6.
5. Román E, Barrio J. Diarrea aguda. Protocolos de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición. Protocolos de la AEP. 2002. [En línea] Citado el 14 de diciembre 2008. Disponible en <http://www.aeped.es/protocolos/gastroentero/2.pdf>
6. Guerrant L, Hughes J, Lima N, Grane J. Diarrea in Developed and developing countries: magnitude, special setting and etiologies. Rev Infect Dis 1990; 12 Suppl 1: 41-50
7. Croci T, Landi M, Le Fur G, Manara L. Role of tachykinins in

- castor oil diarrhoea in rats. *British Journal of Pharmacology* 1977; 121(3): 375-80.
8. Márquez C, Caracterización Fisiológica, Físico-Química, Reológica, Nutraceútica, Estructural y Sensorial de la Guanábana (*Annona muricata* L.). Universidad Nacional de Colombia. 2009. [En línea] Citado el 20 de diciembre 2008. Disponible en <http://www.bdigital.unal.edu.co/1824/1/8740420.2009.pdf>
 9. Feras Q, *et al.* 1999. "Annonaceous acetogenins: Recent progress." *J Nat Prod* 62(3): 504-40.
 10. Stephen J, Horace G. Cutler. Thwarting resistance: annonaceous acetogenins as new pesticidal and antitumor agents. En *Biologically Active Natural Products: Pharmaceuticals*. CRC Press 2000; 4: 84-87.
 11. Schlie M, González A, Luna L. Las acetogeninas de annonaceae: Efecto antiproliferativo en líneas celulares neoplásicas. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 2009; 8: 245-57.
 12. Lannuzel A. The mitochondrial complex I inhibitor annonacin is toxic to mesencephalic dopaminergic neurons by impairment of energy metabolism. *Neuroscience* 2003; 121: 287-96.
 13. Champy P, Melot A, Guérineau V, Gleye C, Fall D. Quantification of acetogenins in *Annona muricata* linked to atypical parkinsonism in Guadeloupe. *Movement Disorders* 2005; 20: 1629-33.
 14. Hughes S, Higgs N, Turnberg L. Antidiarrhoeal activity of loperamide: Studies of its influence on ion transport across rabbit ileal mucosa *in vitro*. *Gut* 1982; 23: 974-79. [En línea] Cita el 20 de Setiembre de 2009. Disponible en <http://www.gut.bmj.com>
 15. Sagar L, Sehgal R, Ojha S. Evaluation of antimotility effect of *Lantana camara* L. var. acuelata constituents on neostigmine induced gastrointestinal transit in mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2005; 5: 18-19.
 16. Bouquet A, Debray M. *Plantes Médicinales de la Côte d'Ivoire*. Travaux et Documents N° 32. French Scientific Research Institute for Development Cooperation. Paris, 1974. p 231.
 17. Kerharo J, Adam J. *Pharmacopée Senegalaise Traditionnelle. Plantes Médicinales et Toxiques*. Vigot-Freres. Paris 1974. p 1016-21.
 18. Brunton L, Lazo, Parker, K. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 11ª Ed. McGraw-Hill Interamericana. México, 2005. p 350-6.
 19. Guyton & Hall, *Tratado de Fisiología Médica*, 11ª Ed. Elsevier. Madrid, 2006. p 787-90.
 20. McNeill P. *The Ethics and Politics of Human Experimentation*. Cambridge University Press. Cambridge, 1993. p 15-8.
 21. CYTED. *Manual de técnicas de investigación*. Madrid 1995.
 22. Odebiyi, A, Sofowora E. *Phytochemical screening of Nigerian medicinal plants Part II*. *Lloydia* 1978: 228-46.
 23. González D. Modelos animales de dolor y aspectos éticos de la experimentación animal. *Rev Soc Esp Dolor* 2000; 7(5):313 - 318
- Manuscrito recibido el: 26/11/2009
Aceptado para su publicación el: 14/04/2011
- Correspondencia:**
Nombres: Dorka Salinas Aramburú /
Jorge Luis Arroyo Acevedo
Dirección: Jr. Puno 1002 – Lima 01 - Perú
e-mail: dorissal@hotmail.com /
jorgeluis_arroyoacevedo@yahoo.es