

Evaluación preliminar del efecto antidiarreico de la cocción de semillas de *Theobroma cacao* (Malvaceae) en ratones *Mus musculus* (Rodentia, Muridae) cepa NIH

Julio Eduardo Aguilera Ortega^{1*} y Miguel Ángel Moreno Mendoza^{1,2}

1 Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Universidad de El Salvador. Ciudad Universitaria, Final Avenida Mártires y Héroes del 30 de Julio, San Salvador, El Salvador; jea1993@hotmail.es

2 Laboratorio de Experimentación Animal, Centro de Investigación y Desarrollo en Salud, Universidad de El Salvador. Ciudad Universitaria, Final Avenida Mártires y Héroes del 30 de Julio, San Salvador, El Salvador; miguel.moreno@ues.edu.sv

*Autor para correspondencia

Recibido: 22-IX-2015. Corregido: 06-V-2016. Aceptado: 23-V-2016.

Resumen: Evaluación preliminar del efecto antidiarreico de la cocción de semillas de *Theobroma cacao* (Malvaceae) en ratones *Mice Mus musculus* (Rodentia, Muridae) cepa NIH. Con el objetivo de evaluar la acción antidiarreica de una cocción de semillas de *Theobroma cacao* (árbol de Cacao, Cacaotero) se realizó un estudio *in vivo* con un modelo de diarreas inducidas con aceite de ricino en ratones (*Mus musculus*) de la cepa NIH. Se realizaron dos preparaciones utilizando semillas pulverizadas y sometidas a cocción, una al 2.48% p/v y otra al 1.24% p/v. Para ello se siguió el Protocolo Estandarizado (PFA001) descrito por el bioterio de la Universidad de Chimborazo, Ecuador. Se encontró que a concentración de 1.24% p/v la cocción de semillas de cacao aumentan el porcentaje de heces duras en los ratones comparado con los grupos controles. En cuanto al tiempo de la primera deposición no se encontró diferencia significativa entre los grupos. Estos resultados preliminares obtenidos muestran que la solución de cacao al 1.24% puede considerarse como un buen protector del epitelio intestinal disminuyendo los síntomas de la diarrea secretora.

Palabras clave: chocolate, modelo animal, aceite de ricino, diarrea, flavonoides.

La diarrea es la segunda mayor causa de muerte en niños menores de cinco años a nivel mundial, cobrando la vida de aproximadamente 760,000 millones cada año (Schuier et al. 2005). La falta de higiene, las malas prácticas culinarias y principalmente la ingestión de aguas contaminadas con organismos de origen fecal, como rotavirus o *Escherichia coli*, son las principales causas de diarrea en los países en desarrollo, registrándose 1,700 millones de casos clínicos al año (OMS 2013). El Salvador siendo un país con evidentes problemas de saneamiento y deficiencias en el servicio de agua potable forma parte sustancial de este problema; FESAL (2008) reportó que en El Salvador 15 de cada 100 niños menores de 5 años tuvieron diarrea al menos dos semanas previas a la entrevista, siendo la prevalencia de esta enfermedad mayor en las zonas rurales (15.9%) que en las zonas urbanas (11.50%).

Dentro de la cultura popular y especial-

mente en los conocimientos empíricos de nuestros antepasados Olmecas y Mayas se sabe de múltiples plantas medicinales con propiedades que pueden ayudar a combatir la diarrea, entre estas se destaca *T. cacao* L. (conocida comúnmente como cacao) que comercialmente se utiliza para la producción del chocolate (Dillinger et al. 2000; Schuier et al. 2005; Waizel-Haiat et al. 2012).

La acción antidiarreica del cacao es citada en múltiples documentos que datan desde del siglo XVI, donde se describe que las partes más utilizadas son las yemas, hojas y en especial las semillas (Dillinger et al. 2000; Waizel-Haiat et al. 2005). Se han llevado a cabo investigaciones *in vitro* tomando de base la naturaleza química del cacao que presenta altas cantidades de polifenoles (principalmente flavonoides) como: epicatequina, catequina, quercetina, clovamida y procianidina (Waizel-Haiat et al. 2005), a su vez se

ha encontrado que estos flavonoides tienen la capacidad de bloquear la estimulación de forskolina y el mediador de la secreción de Cl- CFTR, contribuyendo de esta manera a disminuir la diarrea secretora originada en el epitelio intestinal (Schuier et al. 2005; Vega-Briceño 2005). Otros estudios que evalúan la actividad antidiarreica de extractos de plantas muestran que los flavonoides y los taninos son los responsables de este efecto (Hammad et al. 1997; De la Paz et al. 2002, 2004; García 2005, Edwin et al. 2007, Robalino 2014).

Por lo tanto, el fácil acceso a la planta de cacao y la forma expedita de preparación del brebaje, hace de ésta una alternativa etnofarmacológica asequible para la mayoría de las comunidades rurales, las cuales no cuentan con acceso a agua potable, ni mucho menos a sistemas de tratamiento de aguas residuales, situación que las hace propensas a adquirir microorganismos de origen fecal, capaces de provocar infecciones diarreicas. Por ello, es importante tener conocimientos de métodos alternativos para el control de dicha enfermedad, mientras no se recibe asistencia médica.

No se ha encontrado estudios que utilicen modelos animales para comprobar los efectos antidiarreicos del *T. cacao*, por ello este estudio puede servir de base para futuras investigaciones en las que se realicen extractos más complejos (etanólicos, acuosos, acetónicos, etc.) y se evalúen otros órganos de la planta que en la literatura son citados dada su acción antidiarreica. A su vez, se pueden realizar variaciones de este ensayo combinando el cacao con otras plantas como *Castilla elastica* (árbol de hule) lo cual podría maximizar los efectos astringentes (Sahagún 1590 citado por Schuier et al. 2005).

En la presente investigación se evaluó el posible efecto antidiarreico *in vivo* de la cocción de semillas de *T. cacao* a dos concentraciones diferentes, 2.48% p/v y 1.24% p/v, comparándolo con un fármaco de acción antidiarreica conocida en ratones completamente sanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las concentraciones

Se pesaron 6.21g de semilla de *T. cacao* las cuales fueron pulverizadas en un mortero, esta cantidad corresponde al peso promedio de 5 semillas (según receta tradicional) las cuales se mezclaron en un vaso de precipitado conteniendo 250 ml de agua destilada, posteriormente fue llevada a cocción por 2 minutos utilizando una placa de calentamiento, obteniendo una solución oscura, la cual fue colada con una gaza estéril con el fin de eliminar cualquier sobrenadante o precipitado. El producto final de este procedimiento fue una solución al 2.48% p/v (concentración inicial). A continuación, se preparó una segunda solución a la mitad de la concentración inicial, mediante dilución con agua destilada estéril consiguiendo así una solución al 1.24% p/v.

Evaluación del efecto antidiarreico

Para realizar el experimento se utilizaron 20 ratones machos de la especie *M. musculus* (cepa NIH), entre 29 y 35 g; los especímenes fueron alojados bajo las siguientes condiciones ambientales: 22 ± 2 °C, humedad relativa de $50\% \pm 10\%$, ciclos de luz-oscuridad a razón de 10h -14h, respectivamente. Los ratones fueron alimentados con pienso comercial para roedores (alimentos Saram S.A. de C.V.) y agua *ad libitum* (acorde al protocolo farmacológico antidiarreico estandarizado PFA001, de la Universidad de Chimborazo (Robalino 2014).

Los ratones fueron separados en grupos de cinco (n=4). A cada uno de los grupos se les administraron las sustancias por la vía oral intragástrica como sigue: grupo investigativo 1 (T1) (1 ml de solución al 2.48% p/v), grupo investigativo 2 (T2) (1 ml solución al 1.48% p/v), control positivo (C+) (0.0068 mg de loperamida disuelta en 1 ml de agua), control negativo (C-) (1 ml de agua destilada), grupo control blanco (CB) (1 ml agua destilada). A cuatro de los grupos (salvo el grupo control blanco) 30 min después les fue canulado 1

ml de aceite de ricino con el fin de inducir la diarrea. Posteriormente, fueron trasladados a jaulas individuales colocando papel aluminio, previamente pesado, sobre el piso o fondo, con el fin de facilitar el pesado de las heces; luego, se observó el progreso del ensayo cada 30 minutos en un total de 4 horas. Se experimentó con cada uno de los grupos de forma separada y en distintos días.

Evaluación del Proceso Diarreico

Las variables a considerar son el tiempo de la primera deposición fecal, tipo de heces y características físicas de estas. Los datos se expresaron en porcentajes y promedios por grupo, por lo tanto, el porcentaje de heces duras, blandas (heces con mayor humedad y volumen que las duras) y diarreicas (heces con

aparición líquida o semilíquida). El tiempo de la primera deposición corresponde al total de lo generado por los cuatro individuos de cada grupo en experimentación.

Análisis Estadístico

Las datos de las variables fueron analizados mediante un test de normalidad (Shapiro-Wilk, $P < 0.05$). En el tiempo de la primera deposición fecal los datos no provienen de una distribución normal, por lo que se comparó los valores mediante la prueba de Kruskal-Wallis ($P < 0.05$). Las observaciones de los tipos de heces presentaron una distribución normal, en consecuencia se compararon las medias con ANOVA y la prueba *a posteriori* de Tukey ($P < 0.05$), para determinar si existen diferencias significativas entre los valores

TABLA
Tiempo medio de la primera deposición fecal \pm Error Típico por grupo experimental

Grupos	N	Media \pm ET	Mínimo	Máximo
Control Blanco (CB)	4	0:16 \pm 0:10	0:03	0:49
Control Negativo (C-)	4	0:11 \pm 0:01	0:08	0:16
Control Positivo (C+)	4	0:15 \pm 0:13	0:01	0:54
Tratamiento 1 (2.48% p/v) (T1)	4	0:43 \pm 0:26	0:02	2:00
Tratamiento 2 (1.48% p/v) (T2)	4	0:20 \pm 0:17	0:01	1:12
Total	20	0:21 \pm 0:06	0:01	2:00

registrados por los grupos investigativos versus los grupos control. Todos estos análisis fueron desarrollados de forma automatizada con el programa SPSS Statistics versión 21.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tiempo de la primera deposición fecal

Al realizar la prueba de Kruskal-Wallis se encontró que no existen diferencias significativas en la distribución de los datos dentro de esta variable (Kruskal-Wallis, $P = 0.556$), por lo tanto, se considera que el tiempo que tardaron en realizar la primera deposición es estadísticamente similar entre los grupos. Sin embargo, con base en los valores de las medias

(Tabla) se puede observar que probablemente hubo acción relajante del epitelio intestinal en los grupos tratados con la cocción de semillas de *T. cacao*, los cuales obtuvieron los tiempos medios más altos (T1= 0:43, T2= 0:20 min.), esto puede deberse a la disminución de la motilidad intestinal provocada por algunos flavonoides presentes en el cacao, cuya efectividad ha sido evaluada *in vitro* en epitelio del colon humano por Schuier et al. (2005), lo cual podría indicar un posible efecto antidiarreico en los sujetos de experimentación.

Porcentaje del tipo de heces

El aspecto de las heces en todos los grupos fue homogéneo. A su vez no se observó

presencia de sangre o mucosidad en las deposiciones y el color de estas varió entre verde oscuro, marrón claro y beige.

El grupo CB como era de esperar en animales sanos presentó un 100% de heces duras (Figura); por su parte, a los animales que se les indujo diarrea con aceite de ricino no correspondientes al grupo C- registraron 63% de heces diarreicas, 22% de heces blandas y 15% de heces duras; la presencia de estas dos últimas puede ser debido al tiempo en que tarda el agente patológico en causar su efecto. En cuanto al grupo C+ inducido a diarrea y tratado con Loperamida comercial (como fármaco de referencia) mostró 24% de heces diarreicas, 42% de heces duras y 34% heces blandas; estas últimas se consideran “normales”. Esto tiene sentido ya que se les aplicó un agente antidiarreico cuya función principal es proteger el epitelio intestinal contra la secreción excesiva de agua y electrolitos. En lo que respecta a los grupos inducidos a diarrea y tratados con la sustancia de estudio, se encontró que el Tratamiento 1 (solución al 2.48% p/v) presentó un total de 44% de heces duras, 18% de heces blandas contra 38% de heces diarreicas. Respecto al Tratamiento 2 (solución al 1.24% p/v), en que deposiciones duras corresponden a la mitad del total (50%), las heces blandas

representaron el 17%; mientras que las heces diarreicas 33%. Si analizamos la cantidad de heces normales (duras y blandas) en ambos grupos, estas corresponden a más de la mitad del total, lo que podría indicar un efecto antidiarreico. No obstante, el porcentaje de heces diarreicas en ambos tratamientos es considerable; esto puede deberse a la presencia de una concentración mayor de metabolitos secundarios en la solución que provoque una reacción de defensa para eliminarlo. Resultados similares fueron obtenidos en el ensayo de Robalino (2014), en el cual se encontró que a mayor concentración de la sustancia en estudio mayor era la cantidad de heces diarreicas.

La cantidad de heces duras producidas por los individuos pertenecientes al Tratamiento 2 son relativamente mayores a los reportados para el grupo tratado con el fármaco de referencia, aunque sus medias son estadísticamente iguales (ANOVA seguido de Tukey, $P=0.695$). Se aprecia, además, una controlada secreción de heces diarreicas en contraste con el Control Negativo, si bien esta diferencia no es significativa (ANOVA seguido de Tukey, $P=0.825$), posiblemente, debido al n utilizado en este estudio preliminar. Sin embargo, basándose en las medias porcentuales de los grupos tratados con la decocción de semi-

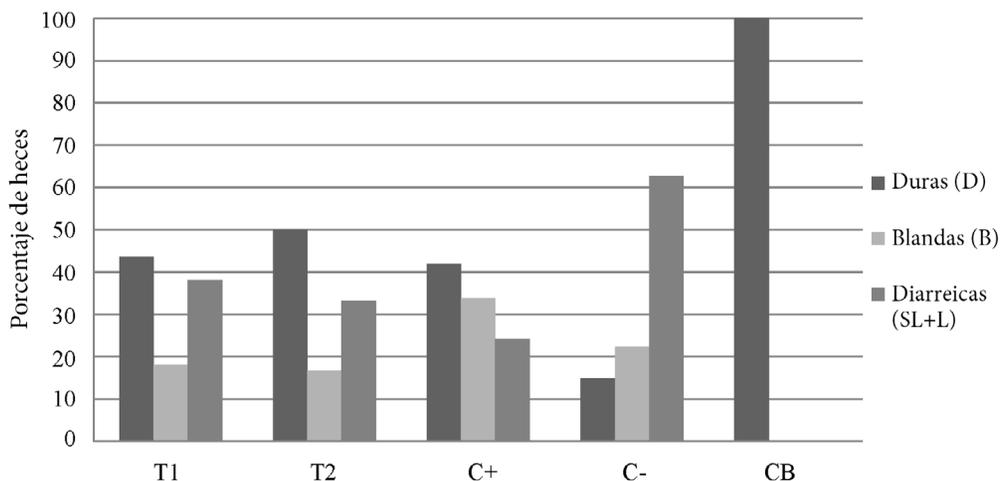


Figura. Porcentaje del tipo de heces (duras, blandas y diarreicas) por grupo experimental. T1= Tratamiento 1 (2.48% p/v); T2= Tratamiento 2 (1.48% p/v); C+= Control Positivo (0.0068 mg de Loperamida); C- = Control Negativo (agua destilada); CB= Control Blanco (agua destilada/no patología).

llas de *T. cacao*, se puede considerar su potencial efecto antidiarreico, puesto que actúa como protector del epitelio intestinal; esto, probablemente, debido a que los flavonoides del cacao tienen la capacidad de disminuir la secreción de Cl⁻ en el intestino y causar una relajación del íleo, disminuyendo así la motilidad intestinal y, por consiguiente, las secreciones diarreicas (Hammad et al. 1997, García 2005, Schuier et al. 2005, Vega-Briceño 2005).

ABSTRACT

Anti-Diarrheal Activity of *Theobroma cacao* (Malvaceae) in Mice *Mus musculus* (Rodentia, Muridae) NIH Strain. In order to evaluate the anti-diarrheal action of the seeds of *Theobroma cacao* (Cocoa Tree, Cocoa, chocolate) an *in vivo* study with a model of castor oil induced in mice (*Mus musculus* NIH strain) diarrhea was performed. Two substances using pulverized seeds and subjected to cooking, one at 2.48% p/v and the other 1.24% p/v were assayed. The antidiarrheal action was assessed following the standardized protocol (PFA001) described by the animal facility of the University of Chimborazo, Ecuador. It was found that at a moderate concentration (1.24% p/v) cooking cocoa beans increase the percentage of hard stools in mice compared to the control groups. As for the time of the first deposition no significant difference between groups was found. These preliminary results show that the solution of 1.24% cocoa can be seen as a good protector of the intestinal epithelium reducing the symptoms of secretory diarrhea.

Keywords: chocolate, animal model, castor oil, diarrhea, flavonoids.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- De la Paz J, Corral A, Martínez C, Martínez SM. 2004. Efecto antidiarreico de la tintura al 20 % de *Mentha piperita* Linn en ratas. Rev. Cub. Farm. 38(2).
- De la Paz J, Corral A, Martínez SM, Estévez M. 2002. Disminución del tránsito intestinal en ratones por tintura al 20% de *Mentha piperita* Linn. Rev Cubana Med Milit. 31(4).
- Dillinger TL, Barriga P, Escárcega S, Jiménez M, Salazar-Lowe D, Grivetti LE. 2000. Food of the Gods: Cure for Humanity? A Cultural History of the Medicinal and Ritual Use of Chocolate. J. Nutr. 130: 2057S-2072S.
- Edwin E, Sheeja E, Toppo E, Tiwari V, Dutt KR. 2007. Efecto antimicrobiano, antiulceroso y antidiarreico de las hojas de buganvilla (*Bougainvillea glabra* Choisy). Ars Pharm. 48(2):135-144.
- FESAL. 2008. Encuesta Nacional de Salud Familiar. Asociación Demográfica Salvadoreña. El Salvador. San Salvador, El Salvador.
- García B. 2005. Absorción *in vivo* de oligómeros de epicatequina. (Tesis Doctoral), Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona. España.
- Hammad HM, Abdalla SS. 1997. Pharmacological Effects of Selected Flavonoids on Rat Isolated Ileum: Structure-Activity Relationship. Gen. Phar. 28 (5):767-771.
- [OMS] Organización Mundial de la Salud. 2013. Nota descriptiva N°330. Disponible desde: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/es/>.
- Robalino CE. 2014. Evaluación del Efecto Antidiarreico y Cicatrizante de la Infusión y del Extracto Etanólico de *Cyclospermum leptophyllum* (Pers.) Sprague en Ratones (*Mus musculus*) y Conejos (*Oryctolagus cuniculus*) [tesis de licenciatura]. [Riobamba (EC)]: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Schuier M, Sies H, Illek B, Fischer F. 2005. Cocoa-Related Flavonoids Inhibit CFTR-Mediated Chloride Transport across T84 Human Colon Epithelia. J. Nutr. 135:2320-2325.
- Vega-Briceño LE. 2005. CFTR: Más que un canal de cloro. Neumología Pediátrica, ISSN 0718-3321.
- Waizel-Haiat S, Waizel-Bucay J, Magaña-Serrano JA, Campos-Bedoya P, Esteban-Sosa JE. 2012. Cacao y chocolate: seducción y terapéutica. An. Méd. 57 (3):236-245.