

Valoración de la capacidad antidiarreica del extracto acuoso liofilizado de partes aéreas de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (Asteraceae) en modelos animales

Mauricio R. Teves*, Jéssica D. Paredes, Bárbara A. Blanco, Graciela H. Wendel

Universidad Nacional de San Luis

* Autor a quien dirigir la correspondencia: maurote@unsl.edu.ar

Resumen

Conyza bonariensis (L.) Cronquist (Asteraceae) vulgarmente conocida como “rama negra” o “yerba carnícera”, es una hierba anual nativa referenciada como antidiarreica en la medicina popular. Nuestro objetivo fue valorar la potencial utilidad del extracto acuoso liofilizado de partes aéreas de *C. bonariensis* (EALCB) como antidiarreico mediante las técnicas de tránsito intestinal, acumulación de fluido intestinal (enteropooling) y diarrea inducida por aceite de ricino. El material vegetal fue recolectado en la provincia de San Luis. Se preparó una infusión en proporción 1:10 y el extracto acuoso fue concentrado y liofilizado. Los animales (ratones Balb/c y ratas Wistar) en cada experimentación se dividieron en 6 lotes: control negativo (vehículo; solución salina), control positivo [Fármacos de referencia: Sulfato de morfina (10 mg/kg, v.o.), Loperamida (10 mg/kg, v.o.) y Clorpromazina (10 mg/kg, i.p.), respectivamente para tránsito intestinal, acumulación de fluido intestinal y diarrea inducida por aceite de ricino] y un lote para cada dosis de EALCB (125, 250, 500 y 1000 mg/kg, v.o.). Los registros de cada lote se compararon vs. control negativo mediante 1-way ANOVA y posterior análisis por test de comparaciones múltiples de Dunnett. Los datos se expresaron como la Media±S.E.M. Se consideró significativa una probabilidad de $p < 0,05$. EALCB produjo una disminución estadísticamente significativa [$F_{(4,35)} = 6; p < 0,01$] del peristaltismo normal, sin embargo no produjo una variación estadísticamente significativa [$F_{(4,35)} = 1; p = ns$] en el enteropooling, peso y volumen del contenido intestinal. En la diarrea inducida por aceite de ricino, sólo las dos mayores dosis provocaron una disminución estadísticamente significativa en la gravedad de la diarrea inducida experimentalmente ($p < 0,05$ y $p < 0,001$, respectivamente). EALCB demostró un efecto protector frente a diarreas hipermotilíticas pero no frente a hipersecretoras. Varios metabolitos secundarios podrían ser responsables del efecto observado, aunque, son necesarias más investigaciones para determinar el mecanismo de acción específico y relacionar el efecto antidiarreico con un/os ingrediente/s activo/s.

Valuation of antidiarrheal capacity of aerial parts lyophilized aqueous extract from *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (Asteraceae) in animal models

Summary

Conyza bonariensis (L.) Cronquist (Asteraceae), commonly known as “rama negra” or “yerba carnícera”, is a native annual herb referenced as antidiarrheal in popular medicine. Our objective was to evaluate the potential usefulness of the aerial parts lyophilized aqueous extract from *C. bonariensis* (EALCB) as an antidiarrheal by the techniques of intestinal transit, intestinal fluid accumulation (enteropooling) and castor oil-induced diarrhea. Plant material was collected in the San Luis province. An infusion was prepared in a 1:10 ratio and the aqueous extract obtained was concentrated and lyophilized. The animals (Balb/c mice and Wistar rats) in each experiment were divided into 6 batches: negative control (vehicle; saline solution), positive control [Reference drugs: Morphine sulfate (10 mg/kg, p.o.), Loperamide (10 mg/kg, p.o.) and Chlorpromazine (10 mg/kg, i.p.), respectively for intestinal transit, intestinal fluid accumulation and castor oil-induced diarrhea] and one batch for each dose of EALCB (125, 250, 500 and 1000 mg/kg, p.o.). Records from each batch were compared vs. negative control by 1-way ANOVA and subsequent analysis by Dunnett’s multiple comparison test. Data were expressed as the Mean ± S.E.M. A probability of $p < 0,05$ was considered significant. EALCB produced a significant statistically decrease [$F_{(4,35)} = 6; p < 0,01$] of the normal peristalsis, however it did not produce a significant statistically variation [$F_{(4,35)} = 1; p = ns$] in the enteropooling, weight and volume of the intestinal content. In castor oil-induced diarrhea, only the two highest doses caused a significant statistically decrease in the severity of experimentally induced diarrhea ($p < 0,05$ and $p < 0,001$, respectively). EALCB demonstrated a protective effect against hypermotilitic diarrhea but not against hypersecretory diarrhea. Several secondary metabolites could be responsible for the observed effect, although more research is necessary to determine the specific action mechanism and relate the antidiarrheal effect to an active ingredient(s).

Palabras clave: *Conyza bonariensis* – actividad antidiarreica – modelos animales

Key words: *Conyza bonariensis* – antidiarrheal activity – animal models

Introducción

Las plantas utilizadas tradicionalmente con un propósito medicinal destacan dentro de los valores de la etnobotánica y de la etnomedicina, las cuales, desde épocas muy antiguas, han representado elementos naturales aprovechables para el tratamiento de variados problemas de salud. El correr del tiempo propició en el ser humano la sabiduría necesaria para discriminar aquellas especies útiles en la medicina de otras disponibles para un uso culinario, alimenticio, tintóreo o que entrañaban cierta toxicidad. La medicina tradicional tiene una larga historia y resulta de la acumulación de conocimientos, capacidades y prácticas fundamentadas en teorías, creencias y experiencias de diferentes culturas (Palma, 1973). Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud, aproximadamente el 50 % de personas habitantes de muchos países industrializados y un porcentaje mucho mayor de ciudadanos de países en vías de desarrollo, basa la atención de su salud en la práctica de alguna forma de Medicina Tradicional y Complementaria (World Health Organization, 2018), lo cual destaca la importante contribución social y económica de la fitomedicina para con la salud.

Las metodologías destinadas a la investigación y evaluación de la medicina tradicional deben avalar tanto la eficacia como la inocuidad de los procedimientos y de las medicinas herbarias (Organización Mundial de la Salud, 2013). El empleo del método científico permite validar un uso medicinal folklórico de una especie vegetal, e incluso, puede descubrirse una propiedad farmacológica o toxicológica que no le es atribuida. La validación de un uso popular involucra aportar un aval o una confirmación desde el campo científico respecto a las propiedades terapéuticas atribuidas, fundamentando con datos fidedignos la práctica médica (Araújo Firmo y col., 2011; Flórez, 2014). En tal sentido, la farmacología dispone de las técnicas y de los métodos necesarios para demostrar científicamente que una especie vegetal manifiesta una actividad biológica y que, como consecuencia de ello, se obtienen efectos beneficiosos para el hombre (Morales, 1996; Avendaño y Armijo, 2014; Rivera y Goodman Gilman, 2019).

La Organización Panamericana de la Salud denota que el principal precedente de morbimortalidad entre niños menores de 5 años habitantes de países menos desarrollados radica en las enfermedades diarreicas, representando un factor de desnutrición, disminución del crecimiento y deterioro del desarrollo cognitivo (OPS, 2008; Farthing y col., 2013). Por consulta de variadas fuentes bibliográficas, en la flora nativa de la República Argentina pueden registrarse numerosas especies vegetales que resultan referenciadas como antidiarreicas en la medicina popular de diferentes regiones de nuestro territorio, entre ellas, *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (Asteraceae) conocida vulgarmente como "rama negra" o "yerba carnífera" (Barboza y col., 2009; Hurrell y col., 2011; Martínez y Luján, 2011; Hurrell y Puentes,

2013; Alonso y Desmarchelier, 2015; Karlin y col., 2017; Martínez y col., 2021).

El objetivo de nuestro trabajo se basó en valorar la potencial utilidad del extracto acuoso liofilizado de las partes aéreas de *C. bonariensis* (EALCB) frente a diarreas hipersecretoras e hipermotílicas mediante la aplicación y ejecución de diferentes ensayos farmacológicos preclínicos en modelos animales.

Materiales y métodos

Material vegetal

El material vegetal fue recolectado en el establecimiento "Los Chañares", distante a aproximadamente 5 Km de la localidad "Fraga", Departamento "Coronel Pringles", provincia de San Luis (Argentina). El método de recolección se realizó con base en las directrices emanadas por la Organización Mundial de la Salud (Organización Mundial de la Salud, 2003). Se recolectaron aquellos ejemplares adultos en áreas distantes de sembradíos, zonas de pastoreo y carreteras.

La identificación botánica de la especie se determinó mediante la aplicación de métodos taxonómicos clásicos con uso de claves para su identificación (Anton y Zuloaga, 2019) y luego certificada por la Dra. Elisa Margarita Petenatti y el Dr. Luis Ángel Del Vitto del Herbario de la Universidad Nacional de San Luis (Herbario UNSL). Las muestras para futura referencia fueron recolectadas por triplicado; se prepararon y acondicionaron para su conservación y depósito en el Herbario UNSL, San Luis, Argentina, bajo el registro UNSL#561.

Animales de experimentación

Se utilizaron ratones Balb/c (25-30 g) y ratas Wistar (150-180 g) de ambos sexos suministradas por el Bioterio Central de la UNSL. Los protocolos para las actividades de investigación fueron evaluados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (Ord. 006-02) y aprobados según protocolos N° F-374/21, F-375/21 y F-376/21 incorporados en la Resolución del Consejo Directivo de la Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la UNSL N° 02 - 67 / 2022.

Los animales fueron alojados a una temperatura constante de 22 ± 3 °C (con ciclos periódicos de cambios de aire) y una humedad relativa del 50-60 %, con un ciclo día/noche de 12 horas (encendido de luces de 07:00 a 19:00 horas); siempre con libre acceso al agua de canilla suministrada en un bebedero adecuado y alimento para animales de laboratorio estándar.

El cuidado y los procedimientos efectuados con los animales de experimentación se realizaron en conformidad con la Disposición N° 6344/96 sobre guías de cuidado

de animales, emanada de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT, 1996).

Obtención del extracto vegetal

El material vegetal recolectado fue minuciosamente seleccionado, desechando todas aquellas unidades que presentaran ataques de insectos, plagas, cicatrices por golpes, mordedura de animales, etc. Los ejemplares seleccionados se secaron al aire hasta obtener un peso constante, se redujeron y posteriormente se molieron a polvo con una trituradora adecuada. Se preparó una infusión con agua destilada en proporción 1:10, siguiendo la metodología expuesta en la Farmacopea Nacional Argentina (Comisión permanente de la Farmacopea Argentina, 2013). El material vegetal agotado fue separado por filtración. El extracto acuoso obtenido fue concentrado y liofilizado.

Ensayos experimentales

Motilidad intestinal de ratones

La experiencia fue llevada a cabo según el método propuesto por Di Carlo y col. (1994), con modificaciones. Se utilizaron ratones Balb/c de 25-30 g de peso y con ayuno de 20 horas. Los animales se dividieron en 4 lotes experimentales (un lote para cada dosis del extracto vegetal), 1 lote control negativo (vehículo) y 1 lote control positivo ($n = 8$ animales cada uno). Los animales de cada lote experimental fueron pretratados con una única dosis del EALCB (125, 250, 500 o 1000 mg/kg) por vía oral, según el grupo de pertenencia; paralelamente, fue establecido un grupo control negativo, que, a diferencia de los lotes experimentales, a los animales se les administró el vehículo (solución salina; vía oral). En el grupo control positivo, se utilizó sulfato de morfina (dosis: 10 mg/kg; vía oral) como fármaco de referencia. A los 30 minutos posteriores, fue administrada oralmente una suspensión conteniendo carbón al 5 % en goma arábiga al 10 % (0,1 ml/10 g), la cual actúa como suspensión marcadora del tránsito intestinal. Luego de 20 minutos, los animales fueron eutanasiados por dislocación cervical; el intestino delgado fue rápidamente removido y colocado en un soporte adecuado que permitió su inspección. Se registró la longitud total del intestino delgado de cada animal y se determinó la medida de la distancia recorrida por la suspensión de carbón al 5 % desde el esfínter pilórico y hasta la posición más distal.

El índice del peristaltismo para cada ratón se expresó como una relación porcentual entre la distancia recorrida por la suspensión marcadora (suspensión de carbón en goma arábiga) y la longitud total del intestino delgado (Aye Than y col., 1989; Akah y Offiah, 1992; Akah y col., 1999; Abdullahi y col., 2001; Agbor y col., 2004), mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Distancia recorrida por la suspensión de carbón al 5\% [cm]}}{\text{Longitud total del intestino delgado [cm]}} \times 100$$

Diarrea inducida por aceite de ricino en ratones

La diarrea fue inducida por la administración oral de aceite de ricino (0.2 ml/animal) (Izzo y col., 1992). En similitud a lo detallado en el ensayo anterior, se trabajó con 6 lotes de $n = 6$ ratones de 20-30 g de peso, con un ayuno 12 horas previas al comienzo de la experimentación. Se utilizó loperamida (dosis: 10 mg/kg; vía oral) como fármaco anti-diarreico de referencia en el lote control positivo.

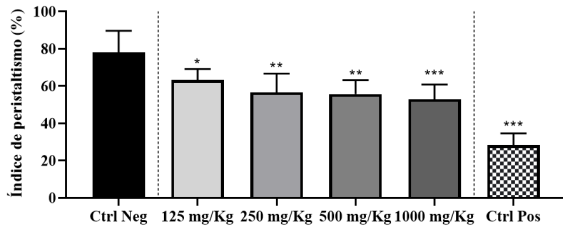
El EALCB (Lotes experimentales; dosis: 125, 250, 500 y 1000 mg/kg), loperamida (Control positivo) y la solución salina (Control negativo), se administraron oralmente y luego de 30 minutos se administró el aceite de ricino. A posteriori, los animales fueron colocados individualmente en cajas-hogar con el piso cubierto de un soporte adecuado (papel de filtro) y durante 2 horas se observó la severidad de la diarrea generada por el agente catártico en cada uno de los 6 lotes.

En base a la severidad de la diarrea presentada, los ratones fueron clasificados de acuerdo al siguiente índice: “++” aquellos que presentaron heces copiosas, “+” moderadas y “o” ausencia de heces. A los fines de cuantificar la severidad de la diarrea y establecer la protección porcentual de las distintas dosis del EALCB, conforme al índice utilizado, a cada ratón calificado con dos signos (++) se le asignaron 2 puntos, al calificado con un signo (+), 1 punto y ningún punto al calificado con “o” (Di Carlo y col., 1993). El porcentaje de protección fue referido al grupo control negativo (aceite de ricino).

Acumulación de fluido intestinal en ratas (*enteropooling*)

Se utilizó el método propuesto por Robert y col. (1976), evaluándose la acumulación neta de fluido en el lumen del intestino delgado por administración de aceite de ricino como agente estimulador de la secreción de líquido a nivel intestinal. Se utilizaron ratas Wistar (150-180 g) con un ayuno de 12 horas y con libre acceso al agua hasta una hora antes del comienzo del experimento. Se trabajó con 6 lotes de animales de $n = 8$ animales cada uno (discriminados de igual manera a lo detallado con anterioridad). Se utilizó clorpromacina (dosis: 10 mg/kg; vía intraperitoneal) como fármaco de referencia.

Inicialmente, los animales fueron administrados con una única dosis del EALCB (125, 250, 500 o 1000 mg/kg), Clorpromacina o vehículo, según lote de pertenencia, y, pasados 30 minutos, se administró por vía oral el aceite de ricino (2 ml/rata). Los animales fueron eutanasiados por inhalación de dióxido de carbono en una cámara especial a los 30 minutos posteriores a la administración del aceite de ricino. El intestino delgado se ligó y cortó a nivel del esfínter

Figura 1.- Efecto del extracto acuoso liofilizado de *C. bonariensis* (EALCB) sobre el tránsito intestinal normal

Efecto del extracto acuoso liofilizado de *C. bonariensis* (EALCB) administrado a las dosis de 125, 250, 500 y 1000 mg/kg sobre el tránsito intestinal normal de ratones Balb/c y su comparación con los registros del control negativo (Ctrl Neg) y control positivo (Ctrl Pos).

Cada valor representa la media ± SEM de n = 8 animales
Significancia vs. control negativo: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001

pilórico y de la válvula ileocecal para ser removido y pesado con el contenido intraluminal; luego, se vació el contenido intestinal y se pesó nuevamente. Por último, se midió la longitud. El fluido intraluminal (enteropooling) se calculó en mg/cm, utilizando la siguiente fórmula (Valle y col., 2000):

$$\frac{\text{Peso del intestino delgado [mg]} - \text{Peso del intestino delgado sin contenido luminal [mg]}}{\text{Longitud del intestino delgado [cm]}}$$

Tratamiento estadístico de los resultados

Se realizó utilizando el programa GraphPad Prism versión 8.0.1 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California, EE. UU., <https://www.graphpad.com/>).

Los registros obtenidos en cada lote experimental fueron comparados con los registros correspondientes al grupo control negativo mediante el análisis de varianza de una vía (1-way ANOVA) y con análisis posterior a través del test de comparaciones múltiples de Dunnett.

Todos los datos se expresaron como la media ± S.E.M. (Error estándar de la media). Una probabilidad de p < 0,05 fue considerada estadísticamente significativa.

Los gráficos fueron creados con el programa GraphPad Prism 8.0.1.

Resultados

Motilidad intestinal de ratones

En el grupo control negativo, la distancia alcanzada por la suspensión de carbón al 5 % fue de 78,08 ± 5,16 % de la longitud total del intestino delgado. Las cuatro concentraciones

Tabla 1.- Efecto del extracto acuoso liofilizado de *C. bonariensis* (EALCB) sobre el tránsito intestinal normal

Grupo	Índice de peristaltismo (%)	Inhibición (%)
Control negativo	78,08 ± 5,16	-
EALCB 125 mg/kg	63,12 ± 2,70*	19,16
EALCB 250 mg/kg	56,52 ± 4,11**	27,62
EALCB 500 mg/kg	55,64 ± 3,04**	28,74
EALCB 1000 mg/kg	52,87 ± 3,53***	32,29
Control positivo	28,18 ± 2,85***	63,91

Cada valor representa la media ± SEM de n = 8 animales

Significancia vs. control negativo: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001

del EALCB disminuyeron el tránsito de la suspensión de carbón a través del intestino delgado de una manera dependiente de la dosis (Tabla 1 y Figura 1).

El análisis realizado por 1-way ANOVA indicó que el tratamiento produjo una modificación estadísticamente significativa [$F_{(4,35)} = 6$; p < 0,01] en el peristaltismo normal del intestino delgado en ratones Balb/c en comparación con el grupo control negativo.

Diarrea inducida por aceite de ricino en ratones

La administración de las dos menores dosis del EALCB (125 y 250 mg/kg) no modificó la cantidad de heces copiosas ni la severidad de la diarrea inducida por aceite de ricino, no habiéndose registrado animales con heces normales en tales grupos experimentales. Sin embargo, con las dos mayores dosis del EALCB (500 y 1000 mg/kg) se registró una reducción estadísticamente significativa de la diarrea inducida experimentalmente por el aceite de ricino (Tabla 2 y Figura 2).

El análisis realizado por 1-way ANOVA indicó que la intervención experimental ocasionó una modificación estadísticamente significativa [$F_{(4,25)} = 8,5$; p < 0,001] en la severidad de la diarrea inducida por el aceite de ricino en ratones Balb/c de ambos sexos en comparación con el grupo control negativo.

Acumulación de fluido intestinal en ratas (enteropooling)

Con la administración oral del EALCB a las cuatro dosis ensayadas se registró un incremento sin significancia estadística en el valor de enteropooling en comparación con el grupo control negativo; además, los valores del peso y volumen del contenido intestinal en los grupos tratados

Figura 2.- Cuantificación de la diarrea inducida por el aceite de ricino en los animales



El grupo control negativo (Ctrl Neg), control positivo (Ctrl Pos) y grupos tratados con el extracto acuoso liofilizado de *C. bonariensis* (EALCB) a las dosis de 125, 250, 500 y 1000 mg/kg
Significancia vs. control negativo: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

con EALCB resultaron superiores en todas las dosis frente al control negativo (Tabla 3).

El análisis realizado por 1-way ANOVA indicó que la administración del extracto vegetal no produjo una modificación estadísticamente significativa [$F_{(4,35)} = 1$; $p = ns$] en los valores del enteropooling de ratas Wistar en su comparación con el grupo control negativo.

Discusión y Conclusiones

El intestino delgado tiene una participación muy activa en la regulación de los procesos de secreción y absorción de agua y electrolitos (Camilleri y Murray, 2016), equilibrio necesario para un correcto funcionamiento fisiológico. Toda alteración en este equilibrio de la función normal y que desencadene un aumento de la secreción o una disminución del proceso de absorción, ocasionará la expulsión de heces no formadas anormalmente líquidas o diarrea. Desde el punto de vista clínico, en algunos acontecimientos diarreicos sucede el predominio de una actividad secretora, mientras que en otros se determina una característica hipermotilidad (Yadav y Tangpu, 2007).

Pobladores de diferentes regiones del mundo basan la atención primaria de su salud en el uso de plantas medicinales, y particularmente, en la terapia antidiarreica, numerosas de ellas son destinadas a tal fin. Entre varias otras especies vegetales, en nuestro medio, *Bixa orellana* L. (Bixaceae), *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae), *Croton lachnostachyus* Baill. y *C. urucurana* Baill. (Euphorbiaceae), son utilizadas como tales en la medicina popular argentina, encontrándose validado científicamente su uso popular como antidiarreico (Barboza y col., 2009). Por otra parte, la especie nativa *C. bonariensis*, de amplia distribución en el territorio argentino, se incluye dentro de las plantas antidiarreicas que cuenta con referencias folclóricas que denotan su uso como tal (Barboza y col., 2009; Hurrell y col., 2011; Martínez y Luján, 2011; Hurrell y Puentes, 2013; Alonso y Desmarchelier, 2015; Karlin y col., 2017; Martínez y col., 2021), sin

Tabla 2.- Cuantificación de la diarrea inducida por el aceite de ricino

	++	+	0	AT	P
Normal	-	-	6	0	-
Control negativo	6	-	-	12	-
EALCB 125 mg/kg	6	-	-	12	0 %
EALCB 250 mg/kg	6	-	-	12	0 %
EALCB 500 mg/kg	3	3	-	9*	25 %
EALCB 1000 mg/kg	1	5	-	7***	41,66 %
Control positivo	-	1	5	1***	91,66 %

AT: Actividad total; P: Protección; ++: heces copiosas; +: heces moderadas; 0: ausencia de heces.
Significancia vs. control negativo: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

embargo, no se registra información propiciada desde el campo de la investigación científica que avale y certifique tal aplicación en el campo de la medicina tradicional.

Dentro de los procedimientos experimentales *in vivo* de la investigación científica preclínica más empleados para calificar la capacidad antidiarreica de una sustancia, se destacan aquellos en los que se emplea carbón activado como agente de marcación del tránsito intestinal, seguidos de los ensayos en los que se induce experimentalmente la diarrea por administración de aceite de ricino (Astudillo-Vázquez y col., 2009). Los modelos experimentales basados en el uso de un marcador del peristaltismo permiten valorar la modificación del tránsito intestinal normal de animales de laboratorio, siendo aquellas sustancias que produzcan una reducción en la motilidad o un retraso en el tránsito intestinal, potenciales agentes antidiarreicos (Akah, 1996). Por su parte, los procedimientos que utilizan aceite de ricino como agente inductor de la diarrea, tienen sus principios en las propiedades irritativas e inflamatorias de la mucosa intestinal de este agente, con inducción de la producción y liberación de prostaglandinas, desencadenando un aumento de la motilidad y secreción (Rouf y col., 2003). En la intervención farmacoterapéutica de los cuadros diarreicos, los agentes que disminuyen la motilidad y los antisecretores siguen constituyendo las principales alternativas para contrarrestar los cambios fisiopatológicos aparejados (McQuaid, 2019).

La reducción de la motilidad intestinal es uno de los mecanismos por los cuales pueden actuar los agentes antidiarreicos (Rang, 2012; Flórez y Esplugues, 2014; Kumpf, 2019). Morfina es un alcaloide natural obtenido a partir de *Papaver somniferum* L. (Papaveraceae) que ejerce su acción activando principalmente al receptor opioide μ en el sistema nervioso central y su efecto a nivel gastrointestinal se manifiesta con

Tabla 3.- Efecto de la administración del extracto acuoso liofilizado de *C. bonariensis* (EALCB) sobre la acumulación de fluido intestinal (*enteropooling*)

Grupo	Enteropooling (mg/cm)	Peso del contenido intestinal (g)	Volumen del contenido intestinal (ml)
Control negativo	20,93 ± 1,44	1,98 ± 0,14	1,25 ± 0,13
EALCB 125 mg/kg	21,09 ± 0,98	1,97 ± 0,18	1,83 ± 0,21
EALCB 250 mg/kg	22,11 ± 2,13	2,10 ± 0,32	1,87 ± 0,28
EALCB 500 mg/kg	21,67 ± 3,70	2,08 ± 0,34	1,90 ± 0,25
EALCB 1000 mg/kg	21,42 ± 1,79	2,05 ± 0,21	1,88 ± 0,16
Control Positivo	13,79 ± 2,85	1,03 ± 0,36	0,91 ± 0,28

una desaceleración de la motilidad, retraso que favorece la absorción de agua y electrolitos (Flórez y Esplugues, 2014; Woo y Shaffer, 2020). En nuestra experimentación, la administración oral del EALCB ocasionó una reducción dosis-dependiente del tránsito intestinal normal en ratones Balb/c del 19,16 %, 27,62 %, 28,74 % y 32,29 %, respectivamente para las dosis de 125, 250, 500 y 1000 mg/kg de peso. Aunque si bien, estadísticamente tal variación resultó ser significativa en su comparación vs. el grupo control negativo, dicha reducción en el tránsito intestinal fue claramente menor a la observada con sulfato de morfina (63,91 %), lo que denota una baja potencia antimotilica del extracto vegetal según el modelo experimental desarrollado. Ensayos preliminares de investigación fitoquímica en *C. bonariensis* han demostrado la presencia de taninos (Lahitte y col., 1998; Fusco y col., 1999), metabolitos secundarios vegetales que actúan como agentes antidiarreicos por su capacidad de precipitar las proteínas presentes en la mucosa intestinal (Evans, 2009; Ashok y Upadhyaya, 2012; Pizzi, 2021). Además, se ha informado la presencia de ácidos fenólicos, flavonoides, heterósidos cardiotónicos, cumarinas, antraquinonas, alcaloides y terpenos (Ferraro y col., 1988; Fusco y col., 1999; Barboza y col., 2009; Alonso y Desmarchelier, 2015). Alcaloides, terpenoides, flavonoides y taninos se refieren en la literatura científica como compuestos con actividad antiespasmódica (Ghayur y col., 2007; Martínez-Pérez y col., 2018) y su presencia se ha identificado en plantas con probada actividad antidiarreica (Chitme y col., 2004; Yadav y Tangpu, 2007; Brijesh y col., 2009). Por otra parte, ciertas lactonas sesquiterpénicas se han referenciado como antidiarreicas (Wendel y col., 2008). Específicamente, para los flavonoides apigenina y quercetina identificados en la especie (Fusco y col., 1999) se refieren efectos reductores de la motilidad intestinal (Di Carlo y col., 1993; 1994), por cuanto, la reducción en el tránsito intestinal registrada pueda ser debida a un efecto sinérgico inhibidor de los diferentes fitoconstituyentes de la especie.

El aceite de ricino es uno de los agentes más utilizados en las pruebas *in vivo* para evaluar la capacidad protectora de extractos de plantas medicinales frente a diarreas hipersecretoras e hipermotilicas inducidas experimentalmente (Bafna y Bodhankar, 2003; Ayele y col., 2023). Los inhibidores de la calmodulina, entre los que se incluye clorpromazina, han probado ser efectivos protectores frente al aumento de la secreción de fluido intestinal provocada por diversos agentes en modelos animales experimentales (Zavec y col., 1982; Fondacaro y col., 1990; Woo y Shaffer, 2020). En el ensayo de acumulación de fluido intestinal en ratas por aceite de ricino, los valores registrados de *enteropooling*, peso y volumen del contenido intestinal en los lotes de animales que recibieron el pretratamiento con el EALCB fueron mayores que los registros obtenidos en el grupo control negativo (pretratamiento con solución salina), lo que demuestra que la administración del extracto vegetal no interfiere o no brinda protección frente al efecto hipersecretor del aceite de ricino. En la comparativa del volumen del contenido intestinal, detallamos que, en los lotes de animales pretratados con el EALCB los registros resultaron ser mayores que los obtenidos en el grupo control negativo; lo cual podría ser consecuencia del efecto reductor del tránsito intestinal por el extracto vegetal y que motiva una reducción en la exteriorización de las heces líquidas.

En el ensayo de la diarrea inducida por aceite de ricino en ratones, se utilizó loperamida como antidiarreico de referencia, un fármaco opioide que, a diferencia de morfina, no atraviesa la barrera hematoencefálica y por ende sus acciones se circunscriben a la activación de receptores de opioides localizados en los nervios entéricos, células epiteliales y células del músculo liso de la pared intestinal prolongando el tiempo de tránsito del contenido (Burks, 1998; Woo y Shaffer, 2020). Conjuntamente a su acción antimotilica, loperamida actúa como agente antisecretor debido a la inhibición de la calmodulina y el bloqueo de los canales de calcio voltaje-dependientes (Daly y Harper, 2000). El modelo desarrollado demostró

ser efectivo merced a la observación de heces diarreicas en los 6 animales del grupo control negativo (administrados con aceite de ricino) y a la presencia de heces normales en los 6 ratones del lote denominado "normal" (no administrados con aceite de ricino). Ante los registros obtenidos por aplicación de este modelo experimental, observamos que solo las dos mayores dosis de EALCB (500 y 1000 mg/kg de peso del animal) demostraron una relativa protección frente a este modelo de estudio (25 y 41,66 % vs. control negativo, respectivamente). La menor exteriorización de heces diarreicas en estos dos lotes de animales puede ser motivadas por las mismas circunstancias que las detalladas anteriormente, el retraso en el tránsito intestinal.

En base a los resultados obtenidos en la prueba de modificación de la motilidad intestinal de ratones, de la diarrea inducida por aceite de ricino en ratones y en la acumulación de fluido intestinal en ratas, podemos concluir que la administración oral del extracto acuoso liofilizado de las partes aéreas *C. bonariensis* (L.) Cronquist (Asteraceae) puede prestar utilidad en las diarreas hipermotílicas pero no frente a aquellos cuadros diarreicos con predominio de secreción intestinal.

Bibliografía

- Abdullahi, A.L.; Agho, M.O.; Amos, S.; Gamaniel, K.S.; Wambebe, C. (2001). "Antidiarrhoeal activity of the aqueous extract of *Terminalia avicennoides* roots". *Phytotherapy Research* 15 (5): 431-434.
- Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (1996). *Disposición N° 6344/96*. Buenos Aires, Argentina.
- Agbor, G.A.; Léopold, T.; Jeanne, N.Y. (2004). "The antidiarrhoeal activity of *Alchornea cordifolia* leaf extract". *Phytotherapy Research* 18 (11): 873-876.
- Akah, P.A. (1996). "Antidiarrheal Activity of *Kigelia africana* in Experimental Animals". *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants* 4 (2): 31-38.
- Akah, P.A.; Aguwa, C.N.; Agu, R.U. (1999). "Studies on the antidiarrhoeal properties of *Pentaclethra macrophylla* leaf extracts". *Phytotherapy Research* 13 (4): 292-295.
- Akah, P. A.; Offiah, V. N. (1992). "Gastrointestinal effects of *Allamanda cathartica* leaf extracts". *International Journal of Pharmacognosy* 30 (3): 213-217.
- Alonso, J.; Desmarchelier, C. (2015). *Plantas medicinales autóctonas de la Argentina. Bases científicas para su aplicación en atención primaria de la salud*. Corpus Libros Médicos y Científicos, Buenos Aires, Argentina: 748.
- Anton, A.M.; Zuloaga, F.O. (directores) (2019). "Flora Argentina" [en línea]. Disponible en URL: <http://www.floraargentina.edu.ar>. [Consulta: noviembre de 2021]
- Araújo Firmo, W.da C.; Menezes de Menezes, V.de J.; Castro Passos, C.E.; Dias, C.N.; Lima Alves, L.P.; Lopes Dias, I.C.; Santos Neto, M.; Gallegos Olea, R.S. (2011). "Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais". *Cadernos de Pesquisa* 18: 90-95.
- Ashok, P.K.; Upadhyaya, K. (2012). "Tannins are Astringent". *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 1 (3): 45-50.
- Astudillo-Vázquez, A.; Mata, R.; Navarrete, A. (2009). "El reino vegetal, fuente de agentes antiespasmódicos gastrointestinales y antidiarreicos". *Revista latinoamericana de química* 37 (1): 7-44.
- Avendaño, C.; Armijo, J.A. (2014). "Desarrollo y autorización de medicamentos. Ensayos clínicos. Farmacoepidemiología" en Flórez, J. (dir.) *Farmacología humana* Cap 11. Elsevier Masson. Barcelona, España (6° ed): 193-205.
- Aye Than, H.J.; Kulkarni, W.H.; Tha, S.J. (1989). "Anti-diarrhoeal Efficacy of Some Burmese Indigenous Drug Formulations in Experimental Diarrhoeal Test Models". *International Journal of Crude Drug Research* 27 (4): 195-200.
- Ayele, T.M.; Abebe, E.C.; Muche, Z.T.; Agidew, M.M.; Yimer, Y.S.; Addis, G.T.; Baye, N.D.; Kassie, A.B.; Alemu, M.A.; Yiblet, T.G.; Tiruneh, G.A.; Dagneu, S.B.; Moges, T.A.; Tadesse, T.Y.; Zelalem, A.E. (2023). "In vivo antidiarrheal activity of the crude extract and solvent fractions of *Rhamnus prinoides* (Rhamnaceae) leaves". *Heliyon* 9 (6): e16654
- Bafna, P., Bodhankar, S. (2003). "Gastrointestinal effects of Mebarid®, an ayurvedic formulation, in experimental animals". *Journal of Ethnopharmacology* 86: 173-176.
- Barboza, G.E.; Cantero, J.J.; Núñez, C.; Pacciaroni, A.; Ariza Espinar, L. (2009). "Medicinal plants: A general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine Flora". *Kurtziana* 34 (1-2): 7-365.
- Brijesh, S.; Daswani, P.; Tetali, P.; Antia, N.; Birdi, T. (2009). "Studies on the antidiarrhoeal activity of *Aegle marmelos* unripe fruit: Validating its traditional usage". *BMC Complementary and Alternative Medicine* 9 (47): 1-12.
- Burks, T.F. (1998). "Gastrointestinal drugs" en: Brody, T.M.; Larner, J.; Minneman, K.P. (eds). *Human pharmacology. Molecular to clinical*. Cap. 62. Mosby, St. Louis Missouri, USA (3° ed.): 827-841.
- Camilleri, M.; Murray, J.A. (2016). "Diarrea y estreñimiento" en Kasper, D.L.; Hauser, S.L.; Jameson, J.L.; Fauci, A.S.; Longo, D.L.; Loscalzo, J. (eds). *Harrison. Principios de Medicina Interna*, Vol 1. Mc Graw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V, México D.F. (19° ed.): 264-274.
- Chitme, H.R.; Chandra, M.; Kaushik, S. (2004). "Studies on anti-diarrhoeal activity of *Calotropis gigantea* R.Br. in experimental animals". *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* 7 (1): 70-75
- Comisión permanente de la Farmacopea Argentina (2013). *Farmacopea Argentina*, 8° ed., 1° Vol. Ministerio de Salud de la Nación; Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos; Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT), Instituto Nacional de Medicamentos (INAME), Buenos Aires, Argentina.
- Daly, J.W.; Harper, J. (2000). "Loperamide: novel effects on capacitative calcium influx". *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences* 57: 149-157.
- Di Carlo, G.; Autore, G.; Izzo, A.A.; Maiolino, P.; Mascolo, N.; Viola, P.; Diurno, M.V.; Capasso, F. (1993). "Inhibition of intestinal motility and secretion by flavonoids in mice and rats: structure-activity relationships". *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 45 (12): 1054-1059.

- Di Carlo, G.; Mascolo, N.; Izzo, A.; Capasso, F.; Autore, G. (1994). "Effects of quercetin in the gastrointestinal tract in rats and mice". *Phytotherapy Research* 8: 42-45.
- Evans, W.C. (2009). *Trease and Evans Pharmacognosy*, 16° ed. Elsevier Saunders Ltd., London, United Kingdom: 603.
- Farthing, M.; Salam, M.A.; Lindberg, G.; Dite, P.; Khalif, I.; Salazar-Lindo, E.; Ramakrishna, B.S.; Goh, K.L.; Thomson, A.; Khan, A.G.; Krabshuis, J.; LeMair, A. (2013). "Acute Diarrhea in Adults and Children. A Global Perspective. WGO (World Gastroenterology Organization) Guideline". *Journal of Clinical Gastroenterology* 47 (1): 12-20.
- Ferraro, G.E.; Broussalis, A.M.; Van Baren, C.M.; Muschiatti, L.V.; Coussio, J.D. (1988). "Compuestos polifenolicos aislados de *Conyza bonariensis* (Compositae)". *Revista Latinoamericana de Química* 19: 141-143.
- Flórez, J. (2014). "Farmacología: concepto y objetivos" en Flórez, J. (dir.) *Farmacología humana* Cap 1. Elsevier Masson. Barcelona, España (6° ed): 1-4.
- Flórez, J.; Esplugues, J.V. (2014). "Farmacología de la motilidad gastrointestinal" en Flórez, J. (dir.) *Farmacología humana* Cap 43. Elsevier Masson. Barcelona, España (6° ed): 689-707.
- Fondacaro, J.D.; Kolpak, D.C.; Burnham, D.B.; McCafferty, G.P. (1990). "Cecetomized rat: A model of experimental secretory diarrhea in conscious animals". *Journal of Pharmacological Methods* 24 (1): 59-71.
- Fusco, M.del R.; Ruiz, R.E.L. de; Ruiz, S.O. (1999). "Flavonoides y lactonas sesquiterpénicas de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (Asteraceae)". *Acta Farmacéutica Bonaerense* 18 (4): 295-298.
- Ghayur, M.N.; Khan, H.; Gilani, A.H. (2007). "Antispasmodic, Bronchodilator and Vasodilator Activities of (+)-Catechin, a Naturally Occurring Flavonoid". *Archives of Pharmacol Research* 30 (8): 970-975.
- Hurrell, J.A.; Puentes, J.P. (2013). "Medicinal and aromatic species of Asteraceae commercialized in the conurbation Buenos Aires-La Plata (Argentina)". *Ethnobiology and Conservation* 2:7.
- Hurrell, J.A.; Ulibarri, E.A.; Arenas, P.M.; Pochettino, M.L. (2011). *Plantas de herboristería: plantas medicinales que se comercializan en herboristerías de la ciudad de Buenos Aires*. L.O.L.A., Buenos Aires, Argentina: 242.
- Izzo, A. A.; Nicoletti, M.; Giannattasio, M.; Capasso, F. (1992). "Antidiarrhoeal activity of *Terminalia sericea* Burch ex DC extracts" en: Capasso, F., Mascolo, N. (eds.) *Natural drugs and the digestive tract*. EMSI, Roma: 223-230.
- Karlin, M.S.; Arnulphi, S.A.; Karlin, U.O.; Bernasconi Salazar, J.R.; Accietto, R.H.; Cora, A. (2017). *Plantas del centro de Argentina*. Ecoval Editorial, Córdoba, Argentina: 353.
- Kumpf, V. J. (2019). "Antidiarrheals, Antisecretory Agents, Pancreatic Enzymes" en: Corrigan, M.L.; Roberts, K.; Steiger, E. (eds.) *Adult Short Bowel Syndrome: Nutritional, Medical, and Surgical Management* Cap 12. Academic Press: 165-176.
- Lahitte, H.B.; Hurrell, J.A.; Belgrano, M.J.; Jankowski, L.S.; Haloua, M.P.; Mehlreter, K. (1998). *Plantas medicinales rioplatenses*. L.O.L.A., Buenos Aires, Argentina: 240.
- Martínez, G.J., Audisio, C.; Luján, M.C. (2021). "Las plantas medicinales, patrimonio natural y cultural de la Reserva Hídrica Natural y Recreativa Bamba, La Calera, Córdoba, Argentina". *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 20 (3): 270-302.
- Martínez, G.J.; Luján, M.C. (2011). "Medicinal plants used for traditional veterinary in the Sierras de Córdoba (Argentina): An ethnobotanical comparison with human medicinal uses". *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 7: 23
- Martínez-Pérez, E.F.; Juárez, Z.N.; Hernández, L.R.; Bach, H. (2018). "Natural Antispasmodics: Source, Stereochemical Configuration, and Biological Activity". *BioMed research international*: Article ID 3819714, 32 pages.
- McQuaid, K.R. (2019). "Fármacos usados en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales" en Katzung B.G. (ed) *Farmacología básica y clínica* Cap 62. Mc Graw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V, México D.F. (14° ed.): 1087-1119.
- Morales, R. (1996). "Farmacología y farmacognosia como fuentes de validación y contraste en etnobotánica". *Monografías del Real Jardín Botánico de Córdoba* 3: 93-98.
- Organización Mundial de la Salud (2003). *Directrices de la OMS sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección (BPAR) de plantas medicinales*. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza: 79.
- Organización Mundial de la Salud (2013). *Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023*. Organización Mundial de la Salud, Hong Kong SAR, China: 75.
- Organización Panamericana de la Salud (2008). *Tratamiento de la diarrea: Manual Clínico para los Servicios de Salud*. Organización Panamericana de la Salud, Washington D.C., EE.UU.: 66.
- Palma, N.H. (1973). *Estudio antropológico de la medicina popular de la puna argentina*. Cabargon, Buenos Aires, Argentina: 130.
- Pizzi, A. (2021). "Tannins medical/pharmacological and related applications: A critical review". *Sustainable Chemistry and Pharmacy* 22: 100481
- Rang, H.P.; Dale, M.M.; Ritter, J.M.; Flower, R.J.; Henderson, G. (2012). *Rang y Dale Farmacología*. 7° ed. Elsevier España, S.L., Barcelona, España: 777.
- Rivera, S.M.; Goodman Gilman, A. (2019). "La invención de fármacos y la industria farmacéutica" en Brunton, L.L., Hilal-Dandan, R., Knollmann, B.C. (eds.) *Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica* Cap 1. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V., México (13° ed): 3-11.
- Robert, A.; Nezamis, J.; Lancaster, C.; Hanchar, A.; Klepper, M. (1976). "Enteropooling assay: a test for diarrhea produced by prostaglandins". *Prostaglandins* 11 (5): 809-828.
- Rouf, A.S.S.; Islam, M.S.; Rahman, M.T. (2003). "Evaluation of antidiarrhoeal activity *Rumex maritimus* root". *Journal of Ethnopharmacology* 84: 307-310.
- Valle, L.; Puig, M.; Pol, O. (2000). "Effects of mu-opioid receptor agonists on intestinal secretion and permeability during acute intestinal inflammation in mice". *European Journal of Pharmacology* 389 (2-3): 235-242.
- Wendel, G.H.; María, A.O.M.; Guzmán, J.A.; Giordano, O., Pelzer, L.E. (2008). "Antidiarrheal activity of dehydroleucodine isolated from *Artemisia douglasiana*". *Fitoterapia* 79 (1): 1-5.
- Woo, M.; Shaffer, S. (2020). "Diarrhea; Anti-Diarrheal Drugs" en: Kuipers, E.J. (ed.) *Encyclopedia of Gastroenterology*, Academic Press (2° ed): 13-18.
- World Health Organization (2018). *Traditional and Complementary Medicine in Primary Health Care*, Technical series on primary health care. World Health organization, Geneva, Switzerland: 11.

Yadav, A.K.; Tangpu, V. (2007). "Antidiarrheal Activity of *Lithocarpus dealbata*. and *Urena lobata*. Extracts: Therapeutic Implications". *Pharmaceutical Biology* 45 (3): 223-229.

Zavec, J.H.; Jackson, T.E.; Limp, G.L.; Yellin, T.O. (1982). "Relationship between anti-diarrheal activity and binding to calmodulin". *European Journal of Pharmacology* 78 (3): 375-377.