

# Comparación de la actividad antiviral de polifenoles presentes en las frutas; mora (*Rubus fruticosus* B.), Grapefruit (*Citrus paradisi* M.) y fresa (*Fragaria vesca* L.)

NORA MORALES, MARIA MARQUINA, TIBISAY PERNIA, DIOLIMAR BUITRAGO, GRECIA M CORAO. MIRIAN SOSA y LILIANA ARAUJO.

Grupo de Investigación en Cultivos Celulares. Facultad de Farmacia. Universidad de Los Andes. Mérida. C.P: 05101. Venezuela. gmendez@ula.ve. noralm31@hotmail.com

## RESUMEN

Una variada actividad farmacológica de *Citrus paradisi* M, *Rubus fruticosus* B y *Fragaria vesca* L ha sido reportada, relacionada principalmente a la presencia de polifenoles y sus cualidades como antioxidantes y barredores de radicales libres. La extracción acuosa de las frutas se sometió a separaciones cromatográficas en columnas de silicagel, seguidas por cromatografía de papel. La actividad antiviral fue reconocida mediante la aplicación de las fracciones a bacteriófagos de *Pseudomonas aeruginosa* 10116-195; luego del periodo de contacto, la mezcla fue añadida a las bacterias huésped e incubados a 37 °C por 24 y 72 horas. El modelo empleado, es comparable con modelos de virosis humanas. Los experimentos se realizaron con la adición de solución sulfato ferroso para evaluar si la actividad es potenciada por éste. En presencia de sulfato ferroso se encontró que los extractos crudos de las frutas inhibieron al fago a 24 y 72 horas, y todas las fracciones fueron activas a 72 horas. Las fracciones 5 de la mora y 2 de la grapefruit exhibieron actividad a las 72 horas en ausencia sulfato ferroso. Los ensayos se realizaron por cuadruplicado y los controles mostraron los resultados esperados. La inactivación del fago por las fracciones en presencia de sulfato ferroso, probablemente es debida a la producción de radicales libres.

## ABSTRACT

A variety of pharmacological activities of *Citrus paradisi* M, *Rubus fruticosus* B and *Fragaria vesca* L has been reported. This property is mainly related to the presence of polyphenols, and their abilities to act

as antioxidant and free radical scavengers. Chromatographic separation in silica gel column of aqueous extraction of the fruits, followed by paper chromatography was made. The antiviral activity was recognised by the application of fractions to *Pseudomonas aeruginosa* 10116-195 bacteriophage. After the contact period the mixture was added to the bacteria host and incubated at 37°C for 24 and 72 hours. This is a cheap, fast and specific model, analogous with human virosis models. The experiments were done also with the addition of ferrous sulphate solution to evaluate the enhancement of its antiviral activity. The raw extract in combination with ferrous sulphate inhibited the phage at 24 and 72 hours. All the fractions were active at 72 hours in presence of ferrous sulphate but only fractions 5 of the blackberry and 2 of the grapefruit exhibited activity at 72 hours in absence ferrous sulphate. The assays were carried out for quadruplicate and the controls presented the prospective results. The inactivation of the phage by the fractions in presence of ferrous sulphate is probably due to boosted free radicals production by polyphenols.

## PALABRAS CLAVE

Polifenoles, frutas, mora, grapefruit, fresa, actividad antiviral, bacteriófagos.

## AGRADECIMIENTO

Los estudios que se mencionan en el presente trabajo han sido posibles gracias al financiamiento del CDCHT Mérida, Venezuela, a quienes agradecemos altamente su contribución con el desarrollo de los proyectos: S-FA-11-01, S-FA-10-01 y S-FA-12-01.

## INTRODUCCIÓN

El grapefruit (*Citrus paradisi* M.) pertenece a la familia Rutaceae (León, 1974). Se le ha atribuido tanto al extracto de la pulpa, como a la semilla actividad bactericida, fungicida, antiviral y además ha sido utilizado en el tratamiento del HIV. Los ingredientes activos del extracto son la combinación natural de ácido ascórbico y bioflavonoides (Harich, 1995), de los cuales se ha reportado que el ácido ascórbico es efectivo contra varios microorganismos patógenos presentes en el organismo, y que inactiva una variedad de virus incluyendo: polio, herpes y hepatitis (Harich, 1995).

Los flavonoides poseen gran actividad como antioxidantes, por su habilidad para reducir la formación de radicales libres (Masaki *et al.*, 1995). El grapefruit contiene naringenina, la cual se presenta principalmente bajo su forma glucosilada naringina; ésta posee propiedades medicinales (León, 1974), inhibe la proliferación in vitro de células cancerígenas de mamas humanas, (So *et al.*, 1996) y también se ha reportado que la naringenina inhibe las enzimas citocromo P450 (Uwe y Anja, 1995).

La planta *Rubus fruticosus* B; mora o zarzamora, de la familia Rosaceae, muy común en las regiones europeas; también se cultiva en países latinoamericanos (Hoyos, 1983). Fue conocida y apreciada como planta medicinal desde tiempos remotos. (Fount, 1962).

La *Fragaria vesca* L; o fresa, de la familia Rosaceae, presenta actividad antioxidante, la cual puede ser importante para la función del cerebro, además se le atribuyen propiedades como, estimulante estomacal, depurativo, diurético, contra la diabetes, la obesidad y la gota (Fount, 1962). La importancia de los polifenoles en la prevención y curación de enfermedades ha sido reportada por diversos investigadores, los cuales reportan actividad farmacológica variada, por ejemplo: propiedad antiviral en jugos de frutas comerciales (Thresh, 1956) y en el jugo de toronja (Harich, 1995).

La actividad antioxidante de los polifenoles pareciera ser potenciada por soluciones de hierro (Langley-Evans, 2000), reportan que el té verde y el negro potencian su actividad antioxidante usando el poder reductor del hierro, al igual que los polifenoles de *Punica granatum* L., (Stewart, *et al.*, 1998 ; Corao, 2001).

En general parece que hay una conexión entre la actividad antimicrobiana de los polifenoles provenientes de diversas especies vegetales, la cual radica principalmente en su capacidad antioxidante, como es el caso del té según reporta (Langley-Evans, 2000) y en té, cacao y vino (Dreosti, 2000). La capacidad antioxidante de los flavonoles de *Ginkgo biloba* o de

las catequinas de *Camellia sinensis* L ha sido comparada con el compuesto antitumoral Trolox (Pietta, 1999),

El uso de las propiedades líticas de los fagos, a emplear en este trabajo, representa un modelo sencillo, rápido, barato, sensible, altamente específico y comparable con modelos en virus humanos (Maillard, *et al.*, 1993, 1994, 1995), además es aplicable para otros pares fago-bacteria causantes de enfermedad en humanos, como es el caso del virus de la tuberculosis (Graham, 1996). La actividad antioxidante de los polifenoles pareciera ser potenciada por soluciones de hierro, (Stewart, *et al* 1998; Corao, 2001) quienes reportan que los polifenoles de *Punica granatum* L., potenciaban la actividad antiviral, empleando la tecnología del ciclo lítico de fagos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Medios y cultivos

Los bacteriófagos *Pseudomonas aeruginosa* 10116-195 junto a su huésped relevante fueron adquiridos en ATCC. Todas las soluciones y medios fueron preparados en agua destilada y esterilizadas por autoclave a 121°C (15 psi) por 15 min. Se prepararon cultivos bacterianos en medio triptosa fosfato Broth (TPB; Oxoid) siguiendo las especificaciones del proveedor. Una vez incubada la bacteria por 18 horas a 37°C a 240 r.p.m., se sembraron en platos de Petri en triptosa fosfato Agar (TPA) los cultivos fueron conservados a 4°C y renovados semanalmente. Cada vez que se realizó un experimento, una colonia fue inoculada en 5 ml del medio apropiado e incubados por 18 horas a 37°C a 240 r.p.m.. El tamaño del inóculo se asumió de aproximadamente 10<sup>9</sup> cfu/ml. Los fagos se propagaron en su bacteria, se recogieron en buffer Lambda y se filtraron estérilmente en filtros 22 mm (Millipore), y los títulos del fago usado fue de 10<sup>9</sup> pfu/ml (Ausubel, *et al.*, 1999).

### Prueba antiviral

Se realizó el sondeo de actividad por cuadruplicado, mediante el tratamiento del fago con cada fracción una vez filtradas para esterilizar. Después del período de contacto del fago con la fracción (3 min), la bacteria huésped fue añadida y los platos se incubaron por 24 y 72 horas a 37 °C. Los cultivos se examinaron por el método novedoso 96WMA (Corao, 2001) comparado contra los controles con fagos no tratados.

### Preparación del extracto de los frutos

El jugo de grapefruit se extrajo al exprimir el fruto. Los jugos de mora y fresa se extrajeron al licuar en agua y metanol en proporción (5:5:5). Estos extractos se usaron para obtener las diferentes fracciones

posteriormente identificadas utilizando técnicas cromatográficas.

**Separaciones cromatográficas**

Los extractos obtenidos se mezclaron por separado con silicagel (tipo medio para columna, Merck) empacado en una columna de cromatografía de 5 cm de largo por 3 cm de diámetro, equilibrada con metanol. La columna se eluyó con una mezcla de polaridad creciente de metanol-agua y las diferentes fracciones recogidas se concentraron en un rotavapor a 45°C bajo atmósfera reducida.

**Cromatografía de papel**

Se corrieron las fracciones en cromatografía de papel para obtener el registro de valor Rf en diferentes solventes tales como butanol-ácido acético-agua (BAW) en proporción de 4:1:5, y ácido acético al 6% v/v en agua, utilizando cloruro férrico al 2 % en metanol como revelador (Schomburgk, 1998).

**Actividad potenciadora del sulfato ferroso**

La actividad antiviral se realizó a todas las fracciones añadiendo sulfato ferroso para investigar si la actividad es potenciada en su presencia (Stewart, et al 1998; Corao, 2001).

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En la tabla 1 se puede apreciar que los extractos crudos y todas las fracciones de las frutas inhibieron al fago a las 24 y 72 horas, en presencia del sulfato ferroso, la turbidez de los pozos son indicativo de que las bacterias no sufrieron lisis.

Las fracciones 5 de la mora y 2 de la grapefruit exhibieron actividad antiviral a las 72 horas en ausencia sulfato ferroso, este resultado sugiere que estas fracciones son activas por su propia naturaleza, y que su actividad se potencia cuando el sulfato ferroso es añadido.

Ninguna fracción mostró actividad antibacteriana en ausencia de sulfato ferroso ni a las 24 o 72 horas de incubación, solo se encontró una leve actividad antibacteriana con algunas fracciones en presencia de sulfato ferroso a las 24 horas de incubación, pero a las 72 horas de incubación no hubo actividad, sugiriendo que el sulfato ferroso *per se* retrasa el crecimiento bacteriano.

La actividad antibacteriana o antiviral no se altera por efecto del pH.

El Rf detectado en ácido acético como solvente de corrida y revelado con cloruro férrico de las fracciones 5 de la mora y 2 del grapefruit (79 y 81 respectivamente) mostraron un recorrido similar.

**Tabla 1. Resumen de los resultados obtenidos de la extracción de los polifenoles presentes extractos acuosos de las frutas; mora (*Rubus fruticosus* B.), grapefruit (*Citrus paradisi* M.) y fresa (*Fragaria vesca* L.), sus respectivos Rf, prueba para polifenoles, pH, actividad antibacteriana contra *Pseudomonas aeruginosa*. y actividad antiviral contra bacteriófagos de *Pseudomonas aeruginosa*.**

Muestra	Cromatografía de papel (RfX100)				-Polifenoles Prueba FeCl <sub>3</sub>	pH	Prueba antibacteriana (horas)				Prueba antiviral (horas)			
	UV		FeCl <sub>3</sub>	FeCl <sub>3</sub>			24	24	72	72	24	24	72	72
	B A W	Ac OH 6%	B A W	Ac OH 6%			+Fe -Φ	-Fe -Φ	+Fe -Φ	-Fe -Φ	+Fe +Φ	-Fe +Φ	+Fe +Φ	-Fe -Φ
*mora1			69	91	+	3,0	-	+	+	+	+	-	+	-
**2			75	14	+	4,0	-	+	+	+	+	-	+	-
**3			80		+	4,1	-	+	+	+	+	-	+	-
**4		79 18		88 16	+	3,1	-	+	-	+	+	-	+	-
**5				79 79	+	4,6	-	+	+	+	+	-	+	+
**6				18 91	+	2,9								
**7			81	95	+	3,0	+	+	+	+	+	-	+	-
*fresa1	45	99	86		+	9,4	+	+	+	+	+	-	+	-
**2	21	95			+	9,6	+	+	-	+	-	-	+	-
**3	18	92	45	88	+	9,5	+	+	+	+	+	-	+	-
**4	16	83			+	9,5	+	+	-	+	+	-	+	-
**5	14	70			+	9,5	+	+	-	+	+	-	+	-
**6	10	84			+	3,7	+	+	-	+	+	-	+	-
*grapefruit1	75				+	3,0								
**2	11	25	67	81	+	3,4	+	+	+	+	+	-	+	+
**3	11	34			+	4,1	-	+	+	+	+	+	+	-
**4					+	3,4	+	+	+	+	+	-	+	-
**5	19 29 53	61 82			+	6,1	+	+	+	+	+	-	+	-
**6	19 19 53	99 59 84 91			+	4,6	-	+	+	+	+	-	+	-
							-	+	-	+	+	-	+	-

Clave: \* Extracto crudo; \*\*Fracciones; - Prueba para polifenoles = FeCl<sub>3</sub> al 2 % p/v en metanol; Solventes de corrida = BAW (butanol: ácido acético: agua; 4:1:5), Ac-OH6% (ácido acético al 6 % v/v); Detección = UV (Luz ultravioleta), Spray FeCl<sub>3</sub> (FeCl<sub>3</sub> al 2 % p/v en metanol), Fe = FeSO<sub>4</sub>; Bacteriófago = F; + = Turbio; - = No turbio

## CONCLUSIONES

1. Los extractos crudos y las fracciones de las frutas presentan actividad antiviral en presencia del sulfato ferroso.
2. La inactivación del fago por las fracciones en presencia de sulfato ferroso, probablemente es debida a la producción de radicales libres.
3. Ninguna fracción ni extracto crudo, exhibió actividad antibacteriana. El sulfato ferroso *per se* retarda levemente el crecimiento bacteriano.
4. La actividad antibacteriana o antiviral no se altera por efecto del pH.
5. Las fracciones 5 de la mora y 2 del grapefruit representan un objetivo atractivo para la sucesiva extracción de sus constituyentes y para una posterior identificación.

## RECOMENDACIONES

1. Evaluar la actividad antiviral de los extractos y fracciones con técnicas de mayor sensibilidad.
2. Probar con otros pares bacteria-fago o en cultivos celulares *in vitro* con virus que afecten la salud del hombre.
3. Aislar e identificar los compuestos de las fracciones 5 de la mora y 2 de la grapefruit ya que mostraron mayor actividad
4. Realizar pruebas de citotoxicidad empleando los extractos crudos y las fracciones con actividad antiviral, evaluadas en el presente estudio.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D.D., Seidman, J., Smith, J. y Struhl, K. 1999. **Growing Lambda-derived vectors**. Curr Protol Mol Bio. Wiley Interscience, New York. P. 1121- 1123.

Corao, G. 2001. **Antiviral activity of ingredients in the fruit rind of Punica granatum L.** PhD Dissertation. School of Pharmacy and Biomolecular Sciences. University of Brighton. UK

Dreosti, I. 2000. **Antioxidant polyphenols in tea, cocoa and wine**. Nutrition. 16(7-8): 692-694

Fount, Q., 1962. **Plantas Medicinales**, Editorial Labor, Barcelona.España. P. 315-316

Graham, J. 1996. **Timely Test Spots TB "in hours"** New Scientist. 151:21.

Harich, J. 1995. **Antimicrobial grapefruit extract**. United States patent number 5,425,944.

Hoyos, J.1983. **Guía de árboles de Venezuela**, Editado por la sociedad de ciencia naturales, Caracas. Venezuela. P. 194.

Langley-Evans, S. 2000. **Antioxidant potential of green and black tea determined using the ferric reducing power (FRAP) assay**. Int J Food Sci Nutr. 51(3): 181-188.

León, A. 1974. **Flora de Cuba**. Editorial Otto Koeltz. Science Publishers Koenigstein. Tomo 1. P.105.

Maillard, J-Y., Beggs, T., Day, M., Hudson, R. y Russell, A.1994. **Effect of biocides on MS2 and K coliphages**. Appl Environ Microbiol . 2205-2206.

Maillard, J-Y., Beggs, T., Day, M., Hudson, R. y Russell, A. 1995. **The effect of biocides on the transduction of Pseudomonas aeruginosa PAO by F116 bacteriophage**. Lett Appl Bacteriol. 21: 215-218.

Maillard, J-Y., Beggs, T., Day, M., Hudson, R. y Russell, A. 1993. **Effect of biocides on Pseudomonas aeruginosa phage F116**. Lett Appl Bacteriol. 17: 167-170.

Masaki, H., Atsumi, T. y Sacurai, H.1995. **Protective activity of hamamelitannin on cell damage induced by superoxide anion radicals in murine dermal fibroblasts**. Biol Pharm Bull. 18 (1) 59-63.

Pietta, P. 1999. **Flavonoids as Antioxidants**. J Nat Res. 63: 1035-1042.

Rice-Evans, C. 1995. **Plant polyphenols: Free radical scavengers or chain-breaking antioxidants**. Biochem Society Sym 61: 103-116.

Schomburgk, S. 1998. **Polifenoles en cultivos y su importancia**. Facultad de Agronomía UCV. Maracay. Venezuela. P. 96-101.

So, F., Guthrie, N., Chambers, A., Moussa, M. y Carroll, K. 1996. **Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices**. Nutr Cancer. 26(2):167-81.

Stewart, G., Jassim, S., Denyer, S., Newby, P., Linley, K. y Dhir, V. 1998. **The specific and sensitive detection of bacterial pathogens within four hours using bacteriophage amplification**. Journal of Applied Microbiology. 84: 777-783

Thresh, J. 1956. **Some effects of tannic acid and leaf extracts which contain tannins on the infectivity of tobacco mosaic and tobacco necrosis virus**. Ann. Appl. Biol.; 44, 608-618.

Uwe, M. D. y Anja L. 1995. **The fate of naringin in humans**. Clin. Pharmacol Ther. 58:365-373.