

Determinación de la actividad antiviral de los polifenoles presentes en el grapefruit (*Citrus paradisi* M.) contra bacteriófagos de *Pseudomonas aeruginosa*

Diolimar Buitrago, Nora Morales, Grecia Méndez de Corao, Liliana Araujo y Miriam Sosa*

Grupo de Investigación en Cultivos Celulares, Laboratorio de Bioquímica. Facultad de Farmacia. Universidad de los Andes. Apartado postal 5101. Mérida, Venezuela

Recibido: 22-02-02 Aceptado: 30-07-02

Resumen

Se cree que la actividad antiviral y antimicrobiana del grapefruit está relacionada con las propiedades antioxidantes de los polifenoles. A través de las técnicas convencionales, de cromatografía en columna y papel, se obtuvieron las fracciones a partir del extracto acuoso y posteriormente se evaluaron biológicamente, mediante el método del ciclo lítico en bacteriófagos de *Pseudomonas aeruginosa* en presencia de sus bacterias huéspedes. Cabe resaltar que este modelo experimental biológico es rápido, económico, específico y comparable con los modelos de estudio de virosis humana. Tanto el extracto crudo como la mayoría de las fracciones mostraron actividad antiviral.

Palabras clave: Antiviral; bacteriófagos; grapefruit; polifenoles.

Antiviral activity determination of polyphenols present in the grapefruit (*Citrus paradisi* M.) against *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage

Abstract

Antiviral and antibacterial activity of grapefruit (*Citrus paradisi* M.) is believed to be related to the antioxidant property of their polyphenols. The aqueous extract of the fruit was submitted to conventional chromatographic separation in silicagel column and paper. Fractions were studied for biological activity by the phage lytic cycle methodology in *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage and their respective bacteria host. This is a rapid, inexpensive, specific methodology and could be compared with human virus study models. The crude extract and most of the fractions showed antiviral activity.

Key words: Antiviral; bacteriophage; grapefruit; polyphenols.

* Autor para la correspondencia. E-mail: diolbui@ing.ula.ve, gmendez@ula.ve.

Introducción

El grapefruit (*Citrus paradisi* M.) pertenece a la familia Rutaceae (1). El extracto de la pulpa y la semilla de esta fruta tiene actividad como bactericida, fungicida, virucida y ha sido efectivo en el tratamiento del HIV infeccioso. Los ingredientes activos del extracto son la combinación natural de ácido ascórbico y bioflavonoides (2). El ácido ascórbico presente en el grapefruit es efectivo para varios microorganismos patógenos presentes en el organismo, ya que inactiva ciertos virus incluyendo el virus de polio, herpes y hepatitis (2).

Pietta (3) ha reportado, que los flavonoides poseen gran actividad como antioxidantes, por su habilidad en reducir la formación de radicales libres. El "grapefruit" contiene flavanonas glicosiladas tales como naringina, narirutina, hesperidina, neohesperidina, didimina, poncirina y flavonas polimetoxiladas como sinensetina, hexameto-xiflavona heptameto-xiflavona, nobiletina, escutelareina, tangeretina (4). De estos compuestos, los flavonoides cítricos naringenina y su forma glucosilada naringina, son los que poseen efecto citotóxico y tienen actividad anticancerosa al inhibir la proliferación de células de cáncer humano de mamas (5), además de producir inhibición de las enzimas citocromo P450 (6). Algunos de estos flavonoides se muestran en las Figuras 1 y 2 (4).

En general, parece que hay una conexión entre la actividad biológica de los polifenoles provenientes de diversas especies vegetales con su capacidad antioxidante, como es el caso del té según reportan Masaki y col.; Rice-Evan (7, 8) y del cacao y vino según Dreosti (9). La actividad antioxidante de los polifenoles parece ser potenciada por el poder reductor del hierro ferroso, caso que reporta Langley-Evans (10) del té verde y té negro. Por otra parte, Corao; Stewart y col. (11, 12) señalan que los polifenoles de *Punica granatum* L., potencian la actividad antiviral empleando soluciones de hierro,

mediante la tecnología del ciclo lítico de fagos.

El uso de las propiedades líticas de los fagos, aplicado en este trabajo, representa un modelo sencillo, rápido, barato, sensible, altamente específico y comparable con modelos en virus humanos (13-15), además es aplicable para otros pares fago-bacteria causantes de enfermedades en humanos, como es el caso de la tuberculosis (16).

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 esterilizados por autoclave a 121°C (15 psi) por 15 min. Se prepararon cultivos bacterianos en los medios triptosa fosfato Broth (TPB; Oxoid) siguiendo las especificaciones del proveedor. Una vez incubadas las bacterias 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 10⁹ cfu/mL. Los fagos se propagaron en su bacteria, recogidos en buffer Lambda y filtrados estérilmente en filtros 22 µm (Millipore), y los títulos del fago usado fueron de 10⁹ pfu/mL (17).

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 periodo de contacto del fago con la fracción, la bacteria huésped fue añadida y los platos se incubaron por 18 horas a 37°C. Los cultivos se monitorearon por el novedoso método 96WMA (11) comparado con los controles con fagos no tratados.

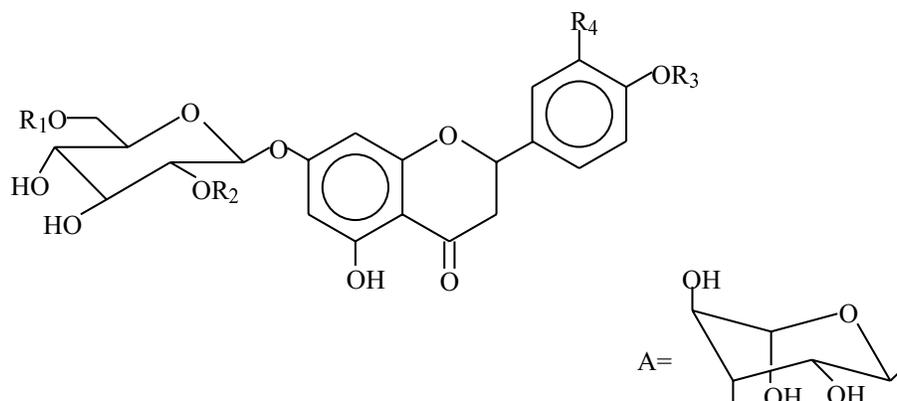


Figura 1. Flavanonas glicosiladas presentes en el grapefruit.

Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Narirutina	A	H	H	H
Naringina	H	A	H	H
Hesperidina	A	H	CH ₃	OH
Neohesperidina	H	A	CH ₃	OH
Didima	A	H	CH ₃	H
Poncirina	H	A	CH ₃	H

Preparación del extracto

500 mL de jugo extraído al exprimir el fruto de la "grapefruit" se filtró a través de una gasa. Luego este extracto se usó para obtener las diferentes fracciones posteriormente identificadas utilizando técnicas cromatográficas.

Separaciones mediante cromatografía en columna

El extracto obtenido se mezcló con 60 g de silicagel (tipo medio para columna, Merck) empacado en una columna de cromatografía de 50 cm de largo por 3 cm de diámetro. La columna se eluyó con una mezcla de hexano-agua en orden creciente de polaridad y las diferentes fracciones recogidas se concentraron a presión reducida a 45°C.

Cromatografía de papel

Se corrieron las fracciones en cromatografía de papel para obtener el registro de valor R_f en diferentes solventes tales como butanol-ácido acético-agua (BAW) en pro-

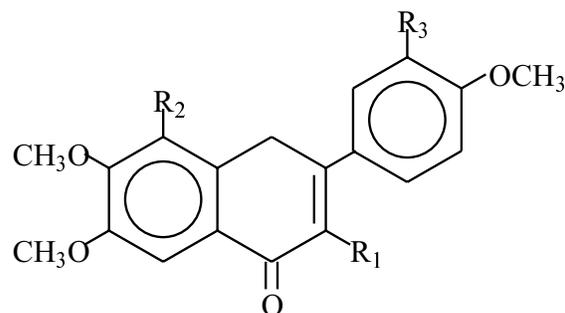


Figura 2. Algunas flavonas polimetoxiladas presentes en el grapefruit

Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃
Sinensetina	A	H	H
Hexametoxiflavona	H	A	H

porción de 4:1:5, y ácido acético al 6% v/v en agua, utilizando 1% cloruro férrico en metanol (18).

Tabla 1

Resumen de los resultados obtenidos de la extracción de los polifenoles presentes en los extractos acuosos del grapefruit (*Citrus paradisi* M.), sus respectivos Rf, prueba para polifenoles, pH y actividad antiviral contra bacteriófagos de *Pseudomonas aeruginosa*

Muestra	Cromatografía de Papel (Rfx100)				•polifenoles Prueba FeCl ₃	pH	Prueba Antiviral (horas)			
	UV BAW	UV AcOH %	FeCl ₃ BAW	FeCl ₃ AcOH 6%			24 -Fe +Φ	24 +Fe +Φ	72 -Fe +Φ	72 +Fe +Φ
*1	75				+	3,0	-	+	-	-
**2	11	25	67	81	+	3,4	-	+	+	+
**3	11	34	64	83	+	4,1	+	+	-	-
**4					+	3,4	-	-	-	+
**5	19									
	29	61			+	6,1	-	-	-	+
	53	82								
	93									
**6	19	99			+	4,6	-	-	-	-
**7	19	59								
	53	84			+	7,0	-	+	-	+
	96	91								

Clave: * Extracto crudo; **Fracciones; • Prueba para polifenoles = FeCl₃ al 2% p/v en metanol; Solventes de corrida = BAW (butanol: ácido acético: agua 4:1:5), AcOH 6% (Acido acético al 6% v/v); Detección = UV (Luz ultravioleta), Spray FeCl₃ (FeCl₃ al 2% p/v en metanol), Fe = FeSO₄; Bacteriófago = Φ; + = Turbio; - = No turbio

Actividad potenciadora del sulfato ferroso

A las fracciones obtenidas se le añadió sulfato ferroso para investigar si la actividad antiviral era potenciada (11, 12).

Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 1, en donde se observa que el extracto crudo de "grapefruit" en combinación con el sulfato ferroso mostró una clara inhibición del fago, ya que las bacterias crecieron normalmente porque sufrieron lisis.

Además, se observó que la fracción N° 3 fue la que presentó una mejor actividad antiviral, debido a que ésta se evidenció con o

sin la presencia de sulfato ferroso en un corto tiempo.

Solo las fracciones N° 2 y 7 que contenían sulfato ferroso, presentaron actividad a las 24 horas, lo que nos indica que la presencia de esta sustancia potenció la actividad.

La mayoría de las fracciones a las 72 horas en presencia de sulfato ferroso también inhibieron los bacteriófagos.

Conclusiones

Se confirmó que el extracto crudo y algunas de las fracciones de grapefruit (*Citrus paradisi* M.) presentan actividad antiviral, debido a que algunos de los polifenoles pre-

sentes se acomplejan selectivamente a las proteínas del fago.

De las fracciones obtenidas, la fracción que presentó una mejor actividad antiviral fue la N° 3. Debido a este resultado, creemos que es en esta fracción donde se encuentra una los polifenoles responsables de dicha actividad.

La actividad antiviral tanto del extracto como en la mayoría de las fracciones fue potenciada por la presencia de sulfato ferroso.

Agradecimiento

Al CDCHT por su apoyo en el financiamiento de este proyecto.

Referencias Bibliográficas

- ALAIN L. *Flora de Cuba*. Otto Koeltz Science Publishers, Koenigstein. Tomo 1. pp. 105, 1974.
- HARICH J. *United States Patent* 5: 425-944, 1995.
- PIETTA P. *J Nat Res* 63: 1035-1042, 1999.
- MOULY P., GAUDA E.M., AUFRAY A. *J Chromatogr* 800(2):171-179, 1998.
- SO F.V., GUTHRIE N., CHAMBERS A.F., MOUSSA M., CARROLL K.K. *Nutr Cancer* 26(2):167-181, 1996.
- UWE FUHR M.D. *Clin Pharmacol Ther* 58: 365-373, 1995
- MASAKI H., ATSUMI T., SACURAI H. *Biol Pharm Bull* 18 (1): 59-63, 1995.
- RICE-EVAN C. *Biochem Society Sym* 61: 103-116, 1995.
- DREOSTI I. E. *Nutrition* 16(7-8): 692-694, 2000.
- LANGLEY-EVANS. *Int J Food Sci Nutr* 51(3): 181-188, 2000.
- CORAO G. Antiviral activity of ingredients in the fruit rind of *Punica granatum* L. (PhD. Dissertation. School of Pharmacy and Biomolecular Sciences), University of Brighton. UK (England), pp. 154-170, 2001.
- STEWART G.S., JASSIM S.A.A., DENYER S.P., NEWBY P., LINLEY K., DHIR V.K. *J of Appl Microbiol* 84: 777-783, 1998.
- MAILLARD J.Y., BEGGS T.S., DAY M.J., HUDSON R.A., RUSSELL A.D. *Appl Environ Microbiol* 24: 2205-2206, 1994.
- MAILLARD J.Y., BEGGS T.S., DAY M.J., HUDSON R.A., RUSSELL A.D. *Lett Appl Bacteriol* 21: 215-218, 1995.
- MAILLARD J.Y., BEGGS, T.S., DAY M.J., HUDSON R.A., RUSSELL A.D. *Lett Appl Bacteriol* 17: 167-170, 1993.
- GRAHAM J. *New Scientist* 151: 21, 1996.
- AUSUBEL F.M., BRENT R., KINGSTON R.E., MOORE, D.D., SEIDMAN J.G., SMITH J A., STRUHL K. Growing Lambda-derived vectors. In: *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, New York (USA), pp 1121-112, 1999.
- SCHOMBURGK S.E. *Polifenoles en cultivos y su importancia*, Facultad de Agronomía UCV. Maracay (Venezuela), pp. 96-101, 1998.