

Acción virucida directa sobre el virus influenza de un extracto de *Punica granatum* L (granada)

Direct virucidal action against influenza virus of an extract of *Punica granatum* L (granada)

DrC. Blanca del Rosario Peña Núñez,^I Lic. Abel Duménigo González,^{II}
MSc. Ioanna Martínez Hormaza ^{II}

^I Facultad de Ciencias Médicas "Salvador Allende". Cerro, La Habana, Cuba.

^{II} Laboratorio Central de Farmacología. Facultad de Ciencias Médicas "Salvador Allende". Cerro, La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: la especie vegetal *Punica granatum* L. se conoce en Cuba como granada. A esta planta se le atribuye acción anticatarral en la medicina tradicional, entre otras propiedades. En estudios previos realizados al extracto hidroalcohólico liofilizado preparado con el fruto de esta planta, se informaron la presencia de numerosos componentes químicos, la mayoría flavonoides. Estos compuestos, unidos a la variedad de metabolitos secundarios detectados, le confieren a este liofilizado la posibilidad de poseer acción antiinfluenza, tal como ha sido demostrado en estudios previos del mismo.

Objetivo: evaluar la acción virucida directa del extracto hidroalcohólico liofilizado de *P. granatum* frente a la cepa Influenza A/Mississippi/1/85 (H3N2), con diferentes variantes de tratamiento.

Métodos: las variantes de tratamiento directo se realizaron en 27 combinaciones de las variables; tiempo de contacto de: 60, 30 y 15 minutos; concentración del extracto de: 1000, 200 y 125 µg/mL y temperatura de incubación de la mezcla extracto-virus: 4, 25 y 37 °C. La presencia o no de la hemaglutinina del virus influenza en cada una de las muestras tratadas, se midió por la titulación de la Inhibición de la Hemaglutinación (IHA) y el título infectivo viral (DIE₅₀).

Resultados: la concentración mínima efectiva para ejercer el extracto liofilizado, la acción virucida directa, *in vitro*, fue 125 µg/mL, a los 15 minutos. La acción virucida directa de éste extracto estuvo siempre presente en las diferentes temperaturas y tiempos de exposición ensayados.

Conclusiones: la variante de ensayo que utilizó 125 µg/mL, con independencia del tiempo y la temperatura de tratamiento, resultó suficiente efectiva para reducir la presencia de hemaglutinina del virus influenza.

Palabras clave: *Punica granatum* L., virus influenza, extracto hidroalcohólico liofilizado, acción virucida, Inhibición de la Hemaglutinación, Dosis Infecciosa Media por Embrión (DIE₅₀).

ABSTRACT

Introduction: *Punica granatum* L. is known in Cuba as grenade. In traditional medicine, among other properties, antifu action is attributed to this plant. In previous studies with the hydroalcoholic lyophilized extract, prepared with the fruit of this specie, several chemical compounds were reported, specially the presence of flavonoids. The variety of secondary metabolites detected for this lyophilized extract, added to a flavonoid fraction confers a high possibility of anti-influenza activity, as has been demonstrated in previous studies.

Objective: to evaluate the virucidal activity of the hydroalcoholic lyophilized extract of *P. granatum* against Influenza A/Mississippi/1/85 (H3N2), with different schemes of treatments.

Methods: the different schemes of treatments included 27 variants of the variables such as contact time of 60, 30 and 15 minutes; extract concentration of 1000, 200 and 125 µg/mL; an incubation temperature of the mix extract-virus of 4, 25 and 37 °C; and the corresponding replicas. The presence or not of hemaglutinin of influenza virus in each one of the treated samples, was measured by titration of Hemaglutination Inhibition (HAI) and the Embryo Infection Doses (EID₅₀).

Results: the minimal effective concentration to show in the hydroalcoholic lyophilized extract the direct virucidal action *in vitro* was 125 µg/mL, in 15 minutes of contact. This virucidal action was always present in the different assessed temperature and time exposures.

Conclusions: the treatment of 125 µg/mL, regardless of time and temperature of treatment, was effective enough to reduce the presence of hemaglutinin of the influenza virus.

Key words: *Punica granatum* L, influenza virus, lyophilized hydroalcoholic extract, virucidal activity, Hemaglutination Inhibition, Embryo Infection Doses (EID₅₀).

INTRODUCCIÓN

Los virus influenza son los agentes causales de la "influenza" o gripe en el humano, enfermedad infecciosa que afecta al sistema respiratorio. En Cuba y otros países, las infecciones respiratorias agudas y la influenza, tienen alta incidencia y mortalidad. La influenza constituye un serio problema de salud pública, al incrementar la demanda de los servicios médicos, las incapacidades laborales y escolares, así como las muertes en los grupos de los extremos de la vida.^{1,2} Esta situación justifica la búsqueda de formas eficaces de tratamiento y control de esta enfermedad.

Los virus influenza, familia Orthomyxoviridae, son un grupo de agentes con genoma ácido ribonucleico (ARN) de cadena sencilla, segmentado, polaridad negativa y con envoltura lipoproteica. Se dividen en los tipos A, B y C. Los tipos se subdividen en subtipos, de acuerdo a las diferencias antigénicas de las glicoproteínas de superficie: la Hemaglutinina y la Neuraminidasa.³

La hemaglutinina de los virus influenza, constituye el principal determinante antigénico, está representada de forma mayoritaria en el virión y está implicada de manera directa con el proceso de infección.³ Esta glicoproteína posee la propiedad de aglutinar glóbulos rojos de diferentes especies animales *in vitro* y éste fenómeno, llamado hemaglutinación, se utiliza para detectar y cuantificar al virus. Su inhibición (IHA) es utilizada en los ensayos antivirales.⁴

Numerosos extractos naturales con actividad antiinfluenza son de origen vegetal. El principio activo, responsable de la acción contra el virus, es por lo general algunos de los compuestos detectados en el tamizaje fitoquímico. El empleo de plantas medicinales y medicamentos herbarios ha tenido un marcado y ascendente auge en el ámbito mundial a partir de que la Organización Mundial de Salud (OMS), llamó en 1997, a introducir recursos medicinales tradicionales, ya que el uso de las plantas es una de las formas de la medicina tradicional más universal, pues aparece en todas las culturas.⁵ Numerosas compañías privadas y corporaciones, protegen los resultados de sus investigaciones e invenciones sobre principios activos, así como los procesos de preparación y las formulaciones farmacéuticas a partir de los extractos vegetales.

Punica granatum L. es una especie vegetal que pertenece a la familia de las *Punicaceae*, orden *Myrtales*. Sus nombres vernáculos, son: granada (fruto y el árbol), granadero, granado (árbol), pomegranate (árbol) entre otros. El fruto de la granada es globoso, de 6 a 14 cm, cubierto de una corteza delgada con coloraciones que van del amarillo-verdoso a rojizo que contienen una pulpa carnosa y jugosa de sabor agridulce con 5 a 8 compartimentos donde se encuentran las semillas.⁶

El estudio fitoquímico de un extracto liofilizado de *P. granatum*, mostró una amplia gama de compuestos, en el que predominaron los taninos, las antocianinas y los flavonoides; estos últimos compuestos resultaron el componente mayoritario en el referido extracto.⁷ En este tamizaje fitoquímico del liofilizado, se detectaron la mayoría de los compuestos contenidos en el extracto hidroalcohólico de partida, utilizado también, para preparar el liofilizado normalizado previo.⁸ La composición química y la baja toxicidad demostradas para este liofilizado en estudios anteriores,⁹ permiten investigar la acción antiinfluenza directa de un extracto preparado con el fruto de *P. granatum* para confirmar su acción antiviral.

MÉTODOS

Extracto liofilizado de granada

Se partió de frutos maduros de *P. granatum* (granada) obtenidos de plantas en estado adulto, colectados en los meses de julio y agosto, los cuales se conservaron congelados a 20 °C hasta su procesamiento. Una muestra de esta especie vegetal radica en el herbario del Jardín Botánico Nacional (HAJB 40619). El procedimiento para la obtención del extracto hidroalcohólico se realizó como ha sido reportado antes.⁷ El extracto hidroalcohólico obtenido, utilizado en la preparación del

lío-filizado, fue sometido a un proceso de rotoevaporación y liofilización cuyo procedimiento estandarizado fue descrito con anterioridad.⁸

Cepa viral

Se empleó la cepa de virus influenza A/Mississippi/1/85(H₃N₂), procedente del cepario del Instituto Finlay, Cuba. Para su mantenimiento y preparación se siguieron los procedimientos estándares recomendados para este fin.⁴

Titulación Viral

El Título Hemaglutinante Viral (u HA) se realizó con el micro método que utiliza como sistema indicador una suspensión de glóbulos rojos de gallo al 5 % en solución salina de fosfato (PBS). La Inhibición de la Hemaglutinación (IHA) se calculó de acuerdo a los procedimientos normalizados y el título infectivo viral (DIE₅₀) se verificó en los líquidos alantoideos de embriones de pollo, infectados con el virus influenza A/Mississippi/1/85(H₃N₂), de acuerdo al método recomendado para estudios antivirales.⁴

Ensayo antiviral

La evaluación de la acción virucida directa del extracto hidroalcohólico liofilizado de *P. granatum* se realizó bajo diferentes condiciones de tratamiento, para determinar el efecto de la interacción de las variables tiempo, concentración del extracto y temperatura, involucrados en la acción virucida estudiada. La tabla 1, refiere los valores y variantes de tratamiento ensayadas. La presencia o no, de la hemaglutinina del virus en cada una de las muestras tratadas, se midió por la técnica IHA, lo que permitió calcular los valores medios de los títulos hemaglutinantes encontrados en las réplicas respectivas. La reducción de la infectividad viral en las muestras tratadas y controles se realizó para verificar si en la variante más efectiva de tratamiento directo *in vitro* se modificaba el poder infeccioso de 10 DIE₅₀ del virus influenza empleado en el reto. Esto permitirá encontrar la variante de tratamiento que manifestó la acción virucida más efectiva del extracto.

Procesamiento estadístico

Para el análisis estadístico, se empleó un Análisis de Varianza Trifactorial, modelo fijo. En la comparación múltiple de medias se utilizó la prueba de Rangos Múltiples de Duncan. Como parte del análisis exploratorio de los datos se comprobó la normalidad por la Prueba de *Kolmogorov-Smirnov* y la homogeneidad de las varianzas por la Prueba de *Bartlett*.

Tabla 1. Variantes de ensayo de la acción virucida directa (*in vitro*) del extracto liofilizado de granada frente a la Influenza A/Mississippi/ 1/85 (H₃N₂)*

TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN (µG/ML)	TIEMPO (MINUTOS)	TEMPERATURA (° C)
1	1 000	60	TA
2	1 000	60	37
3	1 000	60	4
4	1 000	30	TA
5	1 000	30	37
6	1 000	30	4
7	1 000	15	TA
8	1 000	15	37
9	1 000	15	4
10	200	60	TA
11	200	60	37
12	200	60	4
13	200	30	TA
14	200	30	37
15	200	30	4
16	200	15	TA
17	200	15	37
18	200	15	4
19	125	60	TA
20	125	60	37
21	125	60	4
22	125	30	TA
23	125	30	37
24	125	30	4
25	125	15	TA
26	125	15	37
27	125	15	4

Leyenda: TA: temperatura ambiente (25± 1 °C).

RESULTADOS

Los valores medios de los títulos hemaglutinantes encontrados indicaron la acción virucida del extracto. En la [figura](#) aparecen los resultados de la acción virucida directa del extracto con el virus. La región de la curva con valores de concentración entre 50 µg/mL y 125 µg/mL; muestra una relación lineal de esta acción con respecto a la concentración del extracto, con un coeficiente de correlación de -0,9471. Se deduce, con estos resultados que la reducción del título hemaglutinante del virus influenza, está en dependencia directa con la concentración del extracto liofilizado de *P. granatum*. Este dato será de utilidad para realizar estudios

preclínicos y clínicos futuros, así como para la posible formulación del extracto como medicamento para el tratamiento de la gripe.

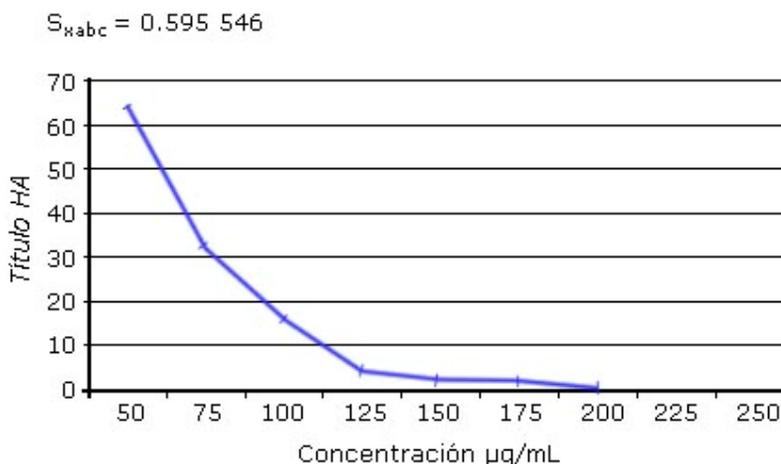


Fig. Título hemaglutinante del virus influenza A en relación con las diferentes concentraciones del extracto liofilizado de granada (37 °C, 60 minutos).

A partir de los resultados mostrados en la [figura](#), se concluyó que la variante de ensayo que utilizó 125 µg/mL del extracto, resultó efectiva para reducir la presencia de hemaglutinina del virus influenza A/Mississippi/1/85(H₃N₂), ya que se aproxima a cero el número de partículas capaces de producir la hemaglutinación.

La [tabla 2](#), informa acerca del tiempo mínimo para ejercer la referida acción virucida directa del extracto de granada, que resultó ser de 15 minutos, aspecto que habla a favor de sus potencialidades para recomendar su suministro en una formulación que pudiese mantener su presencia en zonas del tracto respiratorio superior, en los que pueden estar presentes partículas infecciosas del virus, durante el proceso clínico de la influenza. No menos importantes son los resultados que notifican la acción virucida directa del extracto, en todas las temperaturas incluidas en las variantes de estudio.

A modo de confirmar el efecto que, sobre la infecciosidad del virus influenza ejerció este extracto de granada, los resultados del ensayo para verificar el cambio en esta importante capacidad del virus *in vivo*, indicaron que en la variante que utilizó 125 µg/mL, el índice de reducción de la infectividad de la cepa de influenza por la acción directa del extracto, fue mayor de cien, ya que el título infectivo disminuyó dos veces el Log₁₀ DIE₅₀, en todos los tratamientos, tal como aparece en la [tabla 3](#). El índice de reducción de la infectividad alcanzado fue de 457,10 para la variante que utilizó 125 µg/mL, con independencia de la temperatura y el tiempo de tratamiento aplicados.

Tabla 2. Variantes de tratamiento con acción virucida directa del extracto de granada capaces de inhibir la hemaglutinación de la cepa Influenza A/Mississippi/1/85(H₃N₂)

VARIANTE	COMBINACIÓN DE TRATAMIENTO	INVERSO (MEDIA) TÍTULO IHA	DUNCAN
1	1000 µg/mL, TA, 60 min	2,000 000	a
2	1000 µg/mL, 37 °C, 60 min	2,000 000	a
15	200 µg/mL, 4 °C, 30 min	1,227 778	b
12	200 µg/mL, 4 °C, 60 min	1,666 670	b
13	200 µg/mL, TA, 30 min	1,055 556	b, c
10	200 µg/mL, TA, 60 min	1,000 000	b, c
18	200 µg/mL, 4 °C, 15 min	1,000 000	b, c
3	1000 µg/mL, 4 °C, 60 min	0,888 889	c
14	200 µg/mL, 37 °C, 30 min	0,777 778	c
4	1000 µg/mL, TA, 30 min	0,777 778	c
5	1000 µg/mL, 37 °C, 30 min	0,777 778	c
8	1000 µg/mL, 37 °C, 15 min	0,777 778	c
7	1000 µg/mL, TA, 15 min	0,722 222	c
17	200 µg/mL, 37 °C, 15 min	0,722 222	c
9	1000 µg/mL, 4 °C, 15 min	0,666 667	d
16	200 µg/mL, TA, 15 min	0,666 667	d
6	1000 µg/mL, 4 °C, 30 min	0,666 667	d
11	200 µg/mL, 37 °C, 60 min	0,555 556	d
19	125 µg/mL, TA, 60 min	0,180 556	e
25	125 µg/mL, TA, 15 min	0,972 222	e
26	125 µg/mL, 37 °C, 15 min	0,902 778	e
22	125 µg/mL, TA, 30 min	0,868 056	e
20	125 µg/mL, 37 °C, 60 min	0,763 889	e
23	125 µg/mL, 37 °C, 30 min	0,763 889	e
21	125 µg/mL, 4 °C, 60 min	0,659 722	e
27	125 µg/mL, 4 °C, 15 min	0,590 278	e
24	125 µg/mL, 4 °C, 30 min	0,555 556	e

*Leyenda:*TA: temperatura ambiente (25±1 °C).

Tabla 3. Reducción de la infectividad en embriones de pollo del virus influenza control y tratado con el extracto de granada una hora posterior a la infección

CEPA A/ MISSISSIPPI /1/85 (H ₃ N ₂)	1/LOG DEL TÍTULO INFECTIVO (DIE ₅₀)	ÍNDICE DE REDUCCIÓN
Control (10DIE ₅₀) + PBS, 37°C, 60 minutos	4,97	----
Tratada con 125 µg/mL del extracto, 37°C, 60 minutos	2,31	457,10

DISCUSIÓN

En los últimos años, la especie vegetal *P. granatum*, ha sido muy investigadas; son valiosas y variadas las propiedades farmacológicas referidas.^{10,11} Los estudios de estos autores han indicado la potente acción protectora frente al estrés oxidativo de los extractos preparados con la fruta de esta especie, a la que le ha sido atribuido un elevado poder antioxidante. Reciente, fue publicada una valiosa revisión en la que se destacan las diversas acciones farmacológicas, demostradas para esta especie vegetal.¹² Estos autores le confieren a diversas partes de la granada (pomegranate), refiriéndose al árbol, la capacidad tanto profiláctica como terapéutica, para varios factores de riesgo involucrados en los niveles elevados de presión arterial, colesterol, glicemia y procesos inflamatorios de diferentes causas.

Se destaca en particular su acción favorable ante el estrés oxidativo que se instala a punto de partida de numerosas enfermedades. Se señala en este artículo, que el poder antioxidante y antitumoral de los polifenoles presentes, en el jugo del fruto de *P. granatum*, es mucho mayor que el encontrado para el vino tinto y el té verde.

Los extractos procedentes de plantas que poseen propiedades antivirales, son de gran interés, debido a que en lo general los fitofármacos presentan menos toxicidad y son más baratos que los productos de síntesis química. El extracto liofilizado de granada, que se empleó en este estudio, tiene como aval los trabajos previos en que se ha determinado que el mismo es rico en flavonoides, y que estos compuestos constituyen el componente mayoritario de este extracto.^{7,8}

Para tener una idea de las bondades y potencialidades del uso del fruto de la granada en la búsqueda de fármacos antivirales, un excelente ejemplo lo constituye el estudio desarrollado por Reddy y colaboradores, con el fin de desarrollar estrategias más efectivas para el tratamiento antiviral de la Hepatitis C¹³. Estos autores estudiaron moléculas extraídas de la corteza del fruto de la granada, en este caso elagitaninos y punicalagin, ambos taninos presentes en esta parte del fruto, a los que se les atribuyen importantes propiedades biológicas; en particular encontraron que estos compuestos poseen una potente acción antiviral en cultivo de células y que en los estudios *in vitro*, también son capaces de inhibir la actividad de la proteasa NS3/4A de este virus. Dada la variada composición química del extracto de granada aquí investigado, quizás ésta no sea la única vía por la que ejerce la acción antiinfluenza encontrada.

Es importante tener en cuenta que el liofilizado de *P. granatum* que se usó en este estudio, partió del fruto completo para la preparación del extracto hidroalcohólico, de ahí la riqueza de principios activos que de manera sinérgica pudieran contribuir al efecto virucida, en este caso frente al virus influenza.⁷ Es así, que basados en estos antecedentes, en este trabajo quedó demostrada la acción bloqueadora de la hemaglutinina, una proteína de superficie que posee el virus influenza, acción que fue verificada por dos técnicas virológicas diferentes y que son recomendadas para la búsqueda de antivirales con actividad frente al referido virus.⁴

Si se tiene en cuenta el criterio de que la hemaglutinina de los virus influenza es la glicoproteína encargada de contactar con los sitios receptores en la célula a infectar, su bloqueo estérico por el componente mayoritario del extracto en estudio, estaría involucrado como causa directa de la inhibición comprobada de la hemaglutinación *in vitro*. Este aspecto es clave en la evaluación de la actividad antiinfluenza y está bien fundamentado en la literatura científica especializada.^{3,4,14}

En general, los flavonoides han sido encontrados con marcada acción antiinfluenza por numerosos estudios en extractos vegetales.^{15,16} Vale destacar el estudio realizado por *Shimamura y Hara*, en el que se identificó y patentó un componente del té negro capaz de prevenir la infección con el virus influenza. Este compuesto no mostró efectos colaterales adversos y fue efectivo a bajas concentraciones. El principio activo aislado fue un polifenol del tipo de las catequinas y flavonas, que reveló la capacidad para desactivar la hemaglutinina y la neuraminidasa del virus.¹⁷

Se concluye que la acción virucida directa observada en este estudio y relacionada con la molécula de hemaglutinina, afectó la infecciosidad del virión de manera irreversible, dependiente de la concentración del extracto (>125 µg/mL), pero independiente del tiempo de contacto y de la temperatura de tratamiento. Los datos obtenidos con este estudio podrían ser de gran utilidad para la posible formulación de un medicamento herbario con actividad antiinfluenza, sobre todo si se tiene en cuenta que muchos de estos fármacos pueden ser administrados de forma directa en la región del tracto respiratorio superior, lo que facilitaría la acción farmacológica de los principios activos presentes en este extracto, con acción antiinfluenza directa.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Osterholm M. Preparing for the next pandemic. *Engl J Med.* 2005;352:1839-42.
2. Anuario Estadístico de Salud. Dirección de Registros Médicos y Estadísticas de Salud. La Habana, Cuba: MINSAP; 2013.
3. Fauquet C. *Virus Taxonomy: Clasification and Nomenclature of viruses: eighth report of International Committe on Taxonomy Viruses*: Academic Press Inc; 2005.
4. Burleson F, Chambers T, Wiedbrauk D. *Virology: A Laboratory Manual*. California USA: Academic Press Inc; 1992.
5. Morón F. Plantas medicinales y medicamentos herbarios. In: Morón F, Levi M, editors. *Farmacología General*. La Habana, Cuba: Editorial Ciencias Médicas; 2002.
6. *Fitoterapia: Vademécum de prescripción*. Barcelona: Masson; 2003.

7. Peña B, Morejón Z, García A, Morón F. Estandarización y tamizaje fitoquímico de extractos de frutos de *Punica granatum* L. Rev Cubana Plant Med. 2008;13(4).
8. Pendás J, Moreira T, Guerra O, Peña B, Fernández J. Water relationship in *Phyllanthus orbicularis* and *Punica granatum* L. antiviral extracts and their influence on stability after freezing and freeze-drying. Cryoletters. 2001;22(1):5-12.
9. Vidal A, Fallarero A, Peña B, Medina M, Gra B, Rivera F, et al. Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruits extracts. J of Ethnopharmacol. 2003;89(2-3):295-300.
10. Noda Y, Kaneyuka T, Mori A, Packer L. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2002;50(1):166-71.
11. Sánchez Á, Cozzi R, Cundari E, Fiore M, Ricordy R, Gensabella G, et al. Extracto de frutos enteros de *Punica granatum* L. como agente protector del daño inducido por el peróxido de hidrógeno. Rev Cubana Plant Med. 2005;10(2).
12. Zarfeshany A, Asgary S, Javanmard S. Potent health effects of pomegranate. Adv Biomed Res. 2014;3(100).
13. Reddy B, Mullick R, Kumar A, Sudha G, Srinivasan N, Das S. Small molecule inhibitors of HCV replication from Pomegranate. Scientific Reports. 2014;4(5411):1-10.
14. Lentz T. The recognition event between virus and host cell receptor: a target for antiviral agents. J Gen Virol. 1990;71:751-66.
15. Serkedjieva J, Manolova N. Plant polyphenolic complex inhibits the reproduction of influenza and herpes simplex viruses. Basic-Live-Sci. 1992;59:705-15.
16. Nagai T, Moriguchi R, Tomimori T, Susuki Y, Yamada H. Mode of action of the anti-influenza virus activity of plant flavonoid, 5, 7, 4' - trihydroxy-8-methoxyflavone, from the roots of *Scutellaria baicalensis*. Antiviral - Res. 1995;26(1):11-25.
17. Shimamura T, Hara M. Preventive of Influenza virus infection patent. FPO; 1991.

Recibido: 4 de febrero de 2015.

Aprobado: 14 de mayo de 2015.

Blanca del Rosario Peña Núñez. Facultad de Ciencias Médicas "Salvador Allende".
Cerro, La Habana, Cuba.
Correo electrónico: charitorp@infomed.sld.cu