

Universidad de La Habana. Facultad de Biología  
Departamento de Microbiología y Virología

## ESTUDIO COMPARATIVO DE LA CAPACIDAD INACTIVANTE DE DISTINTAS COLECTAS DE LA PLANTA *PHYLLANTHUS* *ORBICULARIS*

*Dra. Gloria del Barrio Alonso,<sup>1</sup> Lic. Annele Roque Quintero<sup>1</sup> y Lic. Martha Arias<sup>1</sup>*

### Resumen

Se estudió la inactivación del AgsHB por extractos de 2 colectas de *Phyllanthus orbicularis* realizadas en diferentes épocas del año (Marzo/94 y Octubre/94) en 34 sueros positivos a este marcador, y se compararon estos resultados con los obtenidos para la colecta Agosto/93, con el objetivo de conocer la influencia de la época de colecta en la presencia de la actividad anti-hepatitis B de la planta. Todas las concentraciones ensayadas (100, 50 y 25 mg/mL) disminuyeron los valores de absorbancia en los sueros, y se logró una seroconversión a negativos estadísticamente significativa, con excepción de lo ocurrido para las concentraciones de 25 y 12,5 mg/mL de la colecta Octubre/94. La cantidad de sueros negativos fue proporcional a las concentraciones utilizadas. Se observaron diferencias estadísticas entre las colectas Agosto/93 y Octubre/94. Estos resultados sugirieron que podían ocurrir alteraciones en la presencia o concentración de los posibles componentes activos de *P. orbicularis* producto de la influencia de factores externos como lo son las condiciones climáticas.

DeCs: EXTRACTOS VEGETALES/uso terapéutico; PLANTAS MEDICINALES; MEDICINA HERBARIA; ANTIGENOS DE LA HEPATITIS B; VIRUS DE LA HEPATITIS B/efectos de drogas; HEPATITIS B/quimioterapia.

### Summary

The authors studied the inactivation of AgsHB by extracts from 2 harvests of *Phyllanthus orbicularis*, carried out at different times of the year (March/94 and October/94) in 34 positive sera at this marker. These results were compared with those obtained for the harvest of August/93 to know the influence on harvesting time on the presence of the anti-hepatitis B activity of the plant. All the assayed concentrations (100, 50, and 254 mg/mL) reduced the absorbency values in sera, achieving a statistically significant seroconversion to negatives, excepting what happened for concentrations of 25 and 12,5 mg/mL of the harvest of October/94. The quantity of negative sera was proportional to the concentrations used. There were statistically differences between the harvests of August/93 and October/94. These results suggested that alterations may occur in the presence or concentration of the possible active components of *P. orbicularis* due to the influence of external factors, such as the climatic conditions.

Subject headings: PLANT EXTRACTS/therapeutic use; PLANTS, MEDICINAL; MEDICINE, HERBAL; HEPATITIS B ANTIGENS; HEPATITIS B VIRUS/drug effects; HEPATITIS B/drug therapy.

El virus de la hepatitis B (VHB) es uno de los agentes causantes de la hepatitis e infecta a más de 300 millones de personas en el mundo, con alto riesgo de desarrollar cirrosis y carcinoma hepatocelular.<sup>1</sup> Es por ello que el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos presenta gran importancia para el manejo de estos pacientes.

La actividad anti-hepatitis de plantas del género *Phyllanthus* ha sido estudiada por diferentes investigadores,<sup>2-4</sup> destacándose los trabajos realizados con la especie *Phyllanthus amarus*, cuyo extracto acuoso inhibe la actividad DNA polimerasa endógena del VHB e interfiere en la unión del AgsHB con el anticuerpo correspondiente.<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Profesora Titular.

En Cuba, se han estudiado algunas especies *Pyllanthus* endémicas, cuyos extractos etanólicos son capaces de inactivar al antígeno de superficie del VHB (AgsHB).<sup>6</sup>

En el presente trabajo se estudió la inactivación del AgsHB por el extracto proveniente de 2 colectas de *P. orbicularis*, realizadas en diferentes épocas del año y se compararon estos resultados con los obtenidos para la colecta Agosto/93 con el objetivo de conocer la importancia relativa de la época de colecta en la presencia de actividad anti-hepatitis B de la planta.

## Métodos

### COLECTA DE PLANTAS

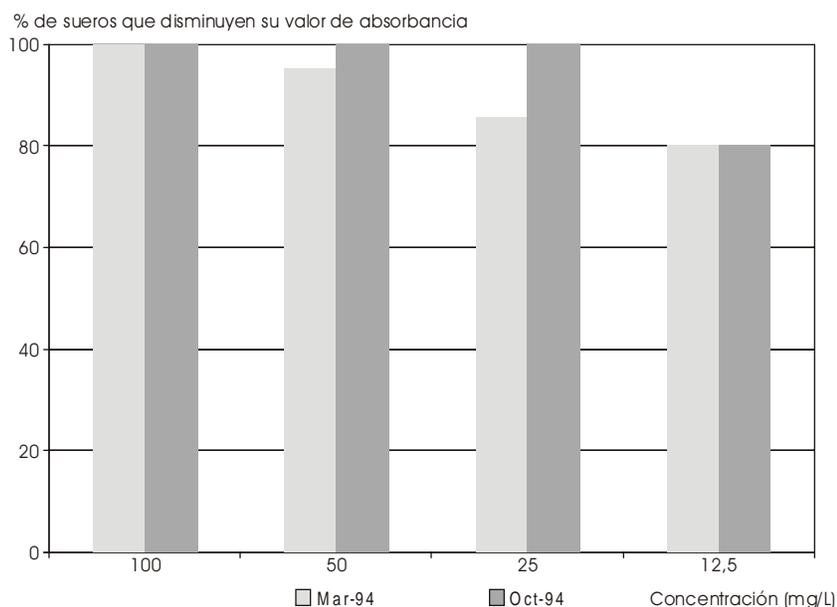
En los meses de marzo y octubre de 1994 se colectaron las plantas de *P. orbicularis* con la ayuda de la Dra. *Rosalina Berazaín*, especialista del Jardín Botánico Nacional, quien contribuyó a la localización e identificación de las mismas.

### PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS

Se prepararon extractos acuosos a partir de cada colecta (Marzo/94 y Octubre/94) de *P. Orbicularis* y se empleó la parte aérea de las plantas. La extracción se realizó a 100 °C durante 4 h y posteriormente la mezcla se filtró y centrifugó a 1 000 rpm por 10 min. a 25 °C. El sobrenadante se liofilizó y se conservó a temperatura ambiente hasta su uso.

### ENSAYO DE INACTIVACIÓN *IN VITRO*

El liofilizado de cada extracto se resuspendió en PBS (solución *buffer* fosfato de sodio, pH-7,2) a concentraciones



**Fig 1.** Comportamiento de la disminución de los valores de densidad óptica de los sueros tratados con diferentes concentraciones de los extractos de colectas marzo/94 y octubre/94.

de 100, 50, 25 y 12,5 mg/mL. Cada colecta fue evaluada frente a 34 sueros positivos al AgsHB, procedentes del Instituto de Gastroenterología y al Centro Provincial de Higiene y Epidemiología de Ciudad Habana; para ello se mezcló cada una de las concentraciones con igual volumen de suero positivo al AgsHB y se incubó a  $35 \pm 1$  °C durante 48 h.

En todos los ensayos se emplearon controles de suero, consistentes en la mezcla de iguales volúmenes de suero y PBS, así como de controles de extracto, mezcla de iguales volúmenes de extracto y PBS, para cada colecta a cada una de las concentraciones empleadas.

La detección del AgsHB se realizó mediante ELISA tipo *sandwich*, a través de los estuches diagnósticos de la Empresa de Productos Biológicos "Carlos J. Finlay".

La capacidad inactivante se manifiesta como un decremento en la absorbancia a 492 nm de la muestra con respecto al control. Se consideraron negativas las muestras de sueros tratados cuyos valores de absorbancia están por debajo del valor límite establecido para la placa.

### ENSAYO ESTADÍSTICO

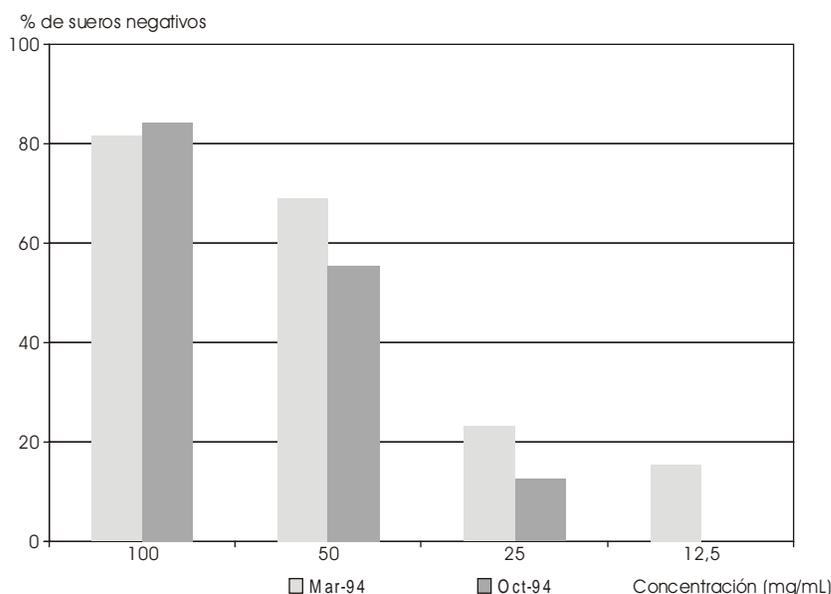
Los resultados fueron procesados a través del *test* de G para tablas de contingencia.<sup>7</sup>

## Resultados

La presencia del AgsHB se evaluó para cada uno de los tratamientos realizados con las colectas de Marzo/94 y Octubre/94.

Los resultados obtenidos mostraron un comportamiento similar en el por ciento de sueros que disminuyen su valor de absorbancia (> 85 %), al ser tratados con las 3 concentraciones, para ambas colectas mayores, (figura 1).

El por ciento de sueros negativos también difiere para ambas colectas con las diferentes concentraciones empleadas (figura 2). En todos los casos, con excepción de la con-



**Fig 2.** Seroconversión a negativos de los sueros tratados con los extractos de las colectas de marzo/94 y octubre/94 de *Phyllanthus orbicularis*.

centración 12,5 mg/mL de la colecta Octubre/94, hubo sueros negativos, observándose los mayores por cientos para la concentración 100 mg/mL de ambas colectas, 82,3 % para Marzo/94 y 85,3 % para Octubre/94.

A partir de estos resultados se realizó el análisis estadístico de los mismos, se comparó el grupo control de sueros no tratados con el número de sueros positivos y negativos para cada concentración, en ambas colectas, mediante el *test G* (tabla 1). Para Marzo/94 se observaron que todas las concentraciones difieren estadísticamente del grupo control, mientras que para Octubre/94 las 2 concentraciones menores no presentan diferencias significativas con respecto al grupo control (tabla 1).

**TABLA 1.** Comparación por *test G* del número de sueros negativos y positivos en cada concentración con respecto a los controles.

Comparación	Marzo/94 Valor de G	Octubre/94 Valor de G
Control Vs C1	53,748***	57,484***
Control Vs C2	41,051***	26,281***
Control Vs C3	8,168***	2,672 ns
Control Vs C4	3,935*	0,000 ns

C1-100 mg/mL C2-50 mg/mL C3-25mg/mL C4-12,5 mg/mL

El análisis estadístico de los resultados obtenidos para cada colecta por separado, mediante *test G* ( $G = 49,894^{***}$  para Marzo/94 y  $G = 79,904^{***}$  para Octubre/94), permitió conocer que existían diferencias altamente significativas en cuanto a la frecuencia de obtención de individuos seronegativos, de un total de 34, entre las diferentes concentraciones para ambos casos.

La comparación de cada par de concentraciones (tabla 2) mostró que solo no existían diferencias significativas entre

las concentraciones de 100 y 50 mg/mL y 25 y 12,5mg/mL para Marzo/94 y entre 25 y 12,5 mg/mL para Octubre/94.

**TABLA 2.** Comparación por *test G* de las concentraciones para determinar dónde se encuentran diferencias significativas en ambas colectas.

Comparación	Marzo/94 Valor de G	Octubre/94 Valor de G
C <sub>1</sub> Vs C <sub>2</sub>	0,739 n.s	7,105**
C <sub>1</sub> Vs C <sub>3</sub>	22,615***	37,537***
C <sub>1</sub> Vs C <sub>4</sub>	30,935***	57,484***
C <sub>2</sub> Vs C <sub>3</sub>	13,759***	11,931***
C <sub>2</sub> Vs C <sub>4</sub>	20,662***	26,281***
C <sub>3</sub> Vs C <sub>4</sub>	0,382ns	2,672ns

C1-100 mg/mL C2-50 mg/mL C3-25 mg/mL C4-12,5 mg/mL

Posteriormente se realizó una comparación entre los resultados obtenidos con estas 2 colectas y los correspondientes a Agosto/93, que habían sido previamente evaluados (en publicación).

El análisis por *test G* de la obtención de sueros negativos con el objetivo de determinar en cada concentración dónde se encuentran las diferencias entre las colectas (tabla 3), mostró que no existen diferencias estadísticas entre las mismas cuando se emplean 100 mg/mL del extracto, por otro lado la colecta Agosto/93 no difiere de las otras cuando se utiliza 12,5 mg/mL, mientras que Octubre/94 y Marzo/94 solo se diferencian significativamente a esta concentración. Al comparar el comportamiento total de las 3 colectas entre sí, se observa que sólo hay diferencias significativas entre Agosto/93 y Octubre/94.

**TABLA 3.** Test para analizar en cada concentración dónde se encuentran las diferencias entre las colectas

Comparación	Valores de G				
	C1	C2	C3	C4	Conjunto
Agosto Vs Marzo	0,117 ns	7,613*	4,103*	0,142 ns	3,121 ns
Agosto Vs Octubre	0,000 ns	17,313***	10,388**	2,362 ns	9,599*
Octubre Vs Marzo	0,000 ns	1,564 ns	0,919 ns	3,935*	7,495 ns
Conjunto	0,472 ns	20,662***	12,919**	7,395*	12,95*

C1-100 mg/mL C2-50 mg/mL C3-25 mg/mL C4-12,5 mg/mL

## Discusión

El presente trabajo contribuye al estudio de la actividad biológica de especies del género *Phyllanthus*, e indica la presencia de compuestos capaces de inactivar el AgsHB *in vitro* en el extracto acuoso de la especie *Phyllanthus orbicularis*, lo que coincide con lo reportado por Thyagarajan y otros, en 1982, Mehrota y otros, en 1991 y Del Barrio y otros., en 1995, para otras especies del género<sup>2,8,9</sup> así como por este mismo autor para el extracto alcohólico de esta especie.<sup>6</sup>

Los resultados obtenidos demuestran que todas las concentraciones ensayadas son capaces de disminuir los valores de absorbancia en los sueros, lográndose una seroconversión a negativos estadísticamente significativa en todos los casos, con excepción de las concentraciones 25 mg/mL y 12,5 mg/mL de la colecta Octubre/94.

Se observó una relación entre la cantidad de sueros negativos y las concentraciones del extracto, siendo 100 y 50 mg/mL las más efectivas para ambas colectas, lo que coincide con lo obtenido en la investigación para Agosto/93. El análisis estadístico de los resultados obtenidos con estas concentraciones muestra que existen diferencias muy significativas entre las correspondientes a Octubre/94, mientras que las de Marzo/94 no difieren estadísticamente, similar a lo que sucede con Agosto/93.

El estudio estadístico realizado permitió conocer en la comparación de las 3 colectas, que existen diferencias significativas, cuando se evalúan los resultados totales, entre Agosto/93 y Octubre/94, lo que no ocurre cuando se compara cada uno de ellos con Marzo/94. Estas diferencias, debida a las concentraciones de 50 y 25 mg/mL, fundamentalmente, así como las observadas entre Agosto/93 y Marzo/94 para las mismas concentraciones, pueden deberse a alteraciones en el metabolismo de las plantas producto de la influencia de factores internos y/o externos, como su edad fisiológica, los componentes nutritivos del suelo, la época del año en que se realiza la colecta. Estos aspectos podrían afectar la proporción de compuestos químicos en la planta o la presencia de alguno(s) de ellos.

Para este trabajo se tomaron plantas de la misma zona y similar estado fisiológico, por lo cual se evita la interferencia de los 2 primeros factores en los resultados.

Los datos meteorológicos correspondientes a las fechas de colecta (datos no publicados) muestran variaciones en las condiciones climáticas, por lo que esto pudiera influir sobre

el extracto, alterando, quizá, algún metabolito o su acumulación. Tamizajes fitoquímicos preliminares de estos extractos (datos no publicados), muestran la existencia de iguales compuestos químicos en los 3 casos, es por ello que se considera la influencia de la concentración del posible compuesto activo como uno de los factores fundamentales que han intervenido en estos resultados.

Si bien el mecanismo de acción del extracto sobre el virus no se puede determinar por estudios *in vitro*, mediante los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede afirmar que el extracto acuoso de la planta *Phyllanthus orbicularis* posee actividad inactivante frente al AgsHB, puesto que en todas las colectas hubo efectividad.

Es recomendable continuar la evaluación de esta especie mediante estudios *in vitro* e *in vivo* que permitan el análisis del comportamiento de otros marcadores virales, así como conocer el principio activo para obtener compuestos con fines terapéuticos.

## Referencias bibliográficas

1. Hoofnagle JH, Milla PJ. Therapy of viral hepatitis. *Digestion* 1998;59:563-78.
2. Thyagarajan SP, Thiruneelakantan K, Subramanian S, Sundaravelu T. *In vitro* inactivation of HBsAg by *Eclipta alba* Hassk and *Phyllanthus niruri* Linn. *Indian J Med Res* 1982;76(Suppl): 124-30.
3. Thamlikitkul U, Wasuwat S, Kanchanape P. Efficacy of *Phyllanthus amarus* for eradication of hepatitis B virus in chronic carriers. *J Med Assoc Thai* 1991;74:381-5.
4. Wang M, Cheng H, Li Y. Herbs of the genus *Phyllanthus* in the treatment of chronic Hepatitis B: observations with three preparations from different geographic sites. *J Lab Clin Med* 1995;126:350-2.
5. Venkateswaran PS, Millman I, Blumberg BS. Effects of an extract from *Phyllanthus niruri* on hepatitis B and Woodchuck hepatitis B viruses *in vitro* and *in vivo* studies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:274-8.
6. Barrio G del, Caballero O. Efecto de extractos de *Phyllanthus orbicularis* sobre el AgsHB del virus de la hepatitis B. *Rev Avanz Biotecnol Mod* 1994;2:236.
7. Sigarrosa A. Biometría y diseño experimental 1ª y 2ª parte. La Habana: Editorial Pueblo y Educación, 1985.
8. Mehrota R, Rawat S, Kilshrestha DK, Goyal P, Patnaik GK, Dhawan BN. *In vitro* effect of *Phyllanthus amarus* on hepatitis B virus. *Indian J Med Res* 1991;93:71-3.
9. Barrio G del, Caballero O, Chevalier P. Inactivación *in vitro* del AgsHB por extractos de plantas del género *Phyllanthus*. *Rev Cubana Med Trop* 1995;47:127-30.

Recibido: 24 de noviembre de 1999. Aprobado: 4 de enero del 2001. Dra. Gloria del Barrio Alonso. Universidad de La Habana. Facultad de Biología y Virología.