

Polibotánica

ISSN electrónico: 2395-9525

polibotanica@gmail.com

Instituto Politécnico Nacional

México

<http://www.polibotanica.mx>

CITOTOXICIDAD Y ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE EXTRACTOS DE CHILES (*Capsicum* spp)

CYTOTOXICITY AND ANTIVIRAL ACTIVITY OF PEPPER EXTRACTS (*Capsicum* spp)

Ordaz-Trinidad, N.; L. Dorantes-Álvarez, J. Salas-Benito, B.L. Barrón-Romero, M. Salas-Benito, y M. De Nova-Ocampo.

CITOTOXICIDAD Y ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE EXTRACTOS DE CHILES (*Capsicum* spp).

CYTOTOXICITY AND ANTIVIRAL ACTIVITY OF PEPPER EXTRACTS (*Capsicum* spp).

CITOTOXICIDAD Y ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE EXTRACTOS DE CHILES (*Capsicum* spp)**CYTOTOXICITY AND ANTIVIRAL ACTIVITY OF PEPPER EXTRACTS (*Capsicum* spp)**

N. Ordaz-Trinidad,
L. Dorantes-Álvarez,
J. Salas-Benito,
B.L. Barrón-Romero,
M. Salas-Benito, y
M. De Nova-Ocampo

CITOTOXICIDAD Y
ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE
EXTRACTOS DE CHILES
(*Capsicum* spp)

CYTOTOXICITY AND
ANTIVIRAL ACTIVITY OF
PEPPER EXTRACTS
(*Capsicum* spp)

POLIBOTÁNICA

Instituto Politécnico Nacional

Núm. 46: 273-285. Julio 2018

DOI:

10.18387/polibotanica.46.18

N. Ordaz-Trinidad**L. Dorantes-Álvarez**/ ldoran@ipn.mx; lidiadorantesa@gmail.com

Departamento de Ingeniería Bioquímica

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional,
Unidad Profesional Adolfo López Mateos, Av. Wilfrido Massieu esquina cda. Manuel
L. Stampa. CP 07738. Del. Gustavo A. Madero. Ciudad de México, México.**J. Sala-Benito**

Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía

Instituto Politécnico Nacional

Guillermo Massieu Helguera 239, CP 07320.

Fraccionamiento La Escalera, Ticomán. Ciudad de México, México.

B.L. Barrón-Romero

Laboratorio de Virología Molecular.

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas

Instituto Politécnico Nacional, Carpio y Plan de Ayala,

CP 11340, Ciudad de México, México

M. Salas-Benito**M. De Nova-Ocampo**

Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía

Instituto Politécnico Nacional

Guillermo Massieu Helguera 239, CP 07320.

Fraccionamiento La Escalera, Ticomán. Ciudad de México, México.

RESUMEN: En este trabajo se evaluaron la citotoxicidad y la actividad antiviral en contra del virus herpes simplex tipo 1 (VHS-1) de extractos de chile jalapeño, serrano, guajillo, ancho, pimienta (*Capsicum annuum* L. var. *annuum*.) y habanero (*Capsicum chinense* Jacq.), así como de los fenilpropanoides, ácidos fenólicos y flavonoides puros que fueron identificados por HPLC-MS en los extractos de chile. La concentración que causa el 50% de toxicidad en células Vero fue determinada (CC₅₀) así como el potencial antiviral de los extractos de chiles y de los compuestos puros, expresado como la concentración inhibitoria del 50% (CI₅₀) en contra de los efectos citopáticos en células Vero infectadas con el virus. El índice de selectividad fue calculado como la relación de CC₅₀ entre CI₅₀. El extracto de pimienta mostró las más baja citotoxicidad (CC₅₀ = 9.82 ± 0.06 mg/mL) y la más alta actividad antiviral (IC₅₀ = 0.56 ± 0.02 mg/mL), con el mayor índice de selectividad de 17.5. Los extractos de chile ancho y guajillo mostraron también una alta capacidad antiviral. El extracto de chile habanero presentó la mayor citotoxicidad y el menor índice de selectividad. Los compuestos fenólicos presentes en los extractos también mostraron actividad antiviral, lo que sugiere que pueden ser estos compuestos los responsables de la actividad antiviral de los chiles.

Palabras clave: *Capsicum* spp., citotoxicidad, actividad antiviral, compuestos fenólicos.

ABSTRACT: In this work cytotoxicity and antiviral activity against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) were evaluated for the pepper extracts of jalapeño, serrano, guajillo, ancho and sweet pepper (*Capsicum annuum* L. var. *annuum*.) and habanero (*Capsicum chinense* Jacq.), as well as for pure phenylpropanoids and flavonoids previously identified in the peppers. The concentration causing 50% toxicity in Vero cells was also determined (CC₅₀). The antiviral potential of pepper extracts and pure compounds was expressed as the concentration required to achieve 50 % protection against cytopathic effects in Vero cells (IC₅₀) infected with HSV-1. The selective index was calculated as the ratio of the CC₅₀ to IC₅₀. The sweet pepper extract showed the lowest cytotoxicity (CC₅₀ = 9.82 ± 0.06 mg/mL) and the highest antiviral activity (IC₅₀ = 0.56 ± 0.02 mg/mL), with the highest selective index of 17.5. High antiviral capacities were also observed for ancho and guajillo. The habanero pepper extract presented the highest cytotoxicity and the lowest selective index. Phenolic compounds also showed antiviral activity and are probably responsible for the antiviral properties of pepper extracts.

Key words: *Capsicum* spp, cytotoxicity, antiviral activity, phenolic compounds.

INTRODUCCIÓN

Los chiles contienen una serie de fitoquímicos como: compuestos fenólicos, carotenoides, clorofilas, capsaicinoides, además de vitaminas C, A y E (Wahyuni et al., 2011). Los chiles han sido estudiados por presentar actividades biológicas, Oboh & Batista (2007) estudiaron la capacidad antioxidante de extractos acuosos de chile tepin (*Capsicum annuum*) y Habanero (*Capsicum chinense*) rojo y verde. Los extractos de chile tepin presentaron la mayor inhibición de la peroxidación lipídica-inducida por Fe²⁺ debido probablemente a la capacidad de quelación del Fe²⁺ por su alto contenido de compuestos fenólicos.

Dorantes et al. (2000) evaluaron el efecto de tres variedades de chile sobre la inhibición de bacterias patógenas, los extractos presentaron efecto inhibitorio sobre *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* Typhimurium, Moreno-Limón et al (2012) reportaron un efecto antifúngico de extractos etanólicos de chile piquín (*Capsicum annuum* L. var. *aviculare*) contra *Aspergillus flavus*.

Por otro lado, el virus herpes simplex tipo 1 (VHS-1), perteneciente a la familia *Herpesviridae*, es un virus de ADN lineal de doble cadena de 152 Kpb, envuelto, que causa una de las principales infecciones virales en humanos y puede provocar complicaciones como encefalitis y conjuntivitis (Roizman et al., 2007). Aunque existen compuestos antivirales como el aciclovir, penciclovir y valaciclovir, la emergencia de la resistencia de algunas cepas virales, particularmente en personas inmuno-comprometidas y neonatos, ha conducido a la investigación de algunos extractos y agentes anti-herpéticos alternativos. Considerando que los extractos de algunas variedades de *Capsicum* spp. han mostrado actividad antibacteriana y antifúngica, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la citotoxicidad y la actividad antiviral contra herpes simplex tipo 1 de extractos de seis variedades de chile.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los compuestos ácido gálico, ácido caféico, luteolina, ácido *para*-cumárico, ácido clorogénico, ácido ferúlico, ácido *trans*-cinámico, kaempferol, rutina, quercetina, suero fetal bovino y 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil bromuro de tetrazolio (MTT) fueron obtenidos de Sigma (St. Louis, MO, USA).

Obtención de los extractos

Las variedades de los chiles estudiados fueron: jalapeño, serrano, guajillo, ancho, pimiento (*Capsicum annuum* L. var. *annuum*) y habanero (*Capsicum chinense* Jacq). Los chiles fueron lavados y los pedúnculos se eliminaron; posteriormente todos los chiles fueron liofilizados

(Freezone 18, Labconco Co., Kansas City, MO). 100 g de cada uno de los chiles se molieron con 400 mL de etanol-agua (80:20) en un homogeneizador (Termomix, Mexico), después se agitaron durante 15 min a 60°C, posteriormente la mezcla se centrifugó a 10 000 rpm por 15 min. El sobrenadante fue colectado y filtrado con papel Whatman núm. 1. Los extractos fueron sometidos a evaporación para remover el etanol a 50°C en un rotavapor (Büchi R-205, Switzerland). Finalmente, los extractos fueron liofilizados y guardados a -20 °C hasta su uso.

Línea celular

Las células Vero (células de riñón de mono verde africano ATCC® CCL-81) fueron sembradas y mantenidas en medio de cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con 0.59% de solución buffer HEPES (4-(2-Hidroxietil)-1-piperazinaetansulfónico), 0.37% de bicarbonato de sodio, 2 mM de piruvato de sodio y 10% de suero fetal bovino, e incubadas a 37°C en atmósfera de 5% CO₂.

Virus herpes simplex tipo 1

Para la evaluación de la actividad antiviral se utilizó el virus herpes simplex tipo 1 (cepa viral de referencia KOS, ATCC® VR-1493).

Ensayo de citotoxicidad para determinar CC₅₀

Para determinar la citotoxicidad de los extractos de chile y los compuestos fenólicos se realizó el siguiente procedimiento: 1.5×10^4 células/pozo de células Vero fueron sembradas en una microplaca de 96 pozos, y se incubaron durante 24 h a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Una vez transcurridas las 24 horas, el medio fue retirado y sustituido por medio de cultivo adicionado con los extractos o compuestos fenólicos. Fueron evaluadas cinco concentraciones diferentes para los extractos (0.5, 1, 5, 10 y 15 mg/mL) y compuestos fenólicos (0.05, 0.1, 0.2, 0.4 y 0.8 mg/mL).

Se realizaron seis réplicas para cada concentración. La microplaca se dejó en incubación 24 h a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂. Como control positivo se agregaron 10 µL de buffer de lisis (incluido en el kit CytoTox 96®) a los pozos asignados como control de células lisadas y se incubó a 37°C por 45 minutos. Se utilizó el kit CytoTox 96® Promega G-1780, Madison, WI, USA. El kit mide la enzima lactato deshidrogenasa que es liberada durante la lisis celular. El ensayo por medio de un acoplamiento enzimático da como resultado la conversión de una sal de tetrazolio a formazan (color rojo). La cantidad de color formado es proporcional al número de células lisadas. Se tomaron 50 µL de cada sobrenadante y se traspasaron a microplaca. Se agregaron 50 µL/porozo del -Substrate Mix- del kit de Cytotox 96 y se incubó 30 min a temperatura ambiente protegido de la luz. Se agregaron 50 µL/porozo de la -Stop Solution- del kit y se incubó por 1 h. La absorbancia fue leída a 490 nm. La concentración citotóxica se informa como la concentración que causa el 50% de muerte celular (CC₅₀) esto derivado de una regresión no lineal a partir de las concentraciones evaluadas.

Ensayo de actividad antiviral para determinar CI₅₀

La actividad antiviral fue evaluada empleando el ensayo colorimétrico MTT (Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) de acuerdo a lo descrito por Savi, Barardi, & Simões (2006). En una microplaca de 96 pozos se sembraron: 1.5×10^4 células/pozo por 24 h a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Posteriormente el medio fue eliminado y cinco concentraciones (que previamente se evaluaron para dar una viabilidad de 80% o más), de extractos o compuestos fenólicos, se añadieron al igual que 100 TCID₅₀ (dosis infectivas del 50% de cultivo celular del virus). Los ensayos se realizaron con seis réplicas de cada concentración. La microplaca se dejó en incubación a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ por 72 horas. Después el medio fue retirado, 100 µL de una solución de MTT (1 mg/mL) fue agregada a cada pozo y la microplaca fue incubada durante 4 h a 37°C; la solución de MTT se eliminó y se añadieron 100 µL de dimetilsulfoxido para disolver los cristales de formazán. La absorbancia fue determinada usando un lector de placas a 540 nm. El porcentaje de inhibición de la infección fue calculada en base a la siguiente relación:

$$= \frac{\text{Abs}_{\text{muestra}} - \text{Abs}_{\text{control virus}}}{\text{Abs}_{\text{control celular}} - \text{Abs}_{\text{control virus}}} \times 100$$

Donde:

Abs muestra: corresponde a la absorbancia de la muestra evaluada (células, virus y muestra).

Abs control virus: absorbancia del control viral de VHS-1 (células infectadas con el virus).

Abs control celular: absorbancia del control células (células no infectadas).

Aciclovir fue utilizado como control positivo. La concentración inhibitoria al 50 % fue determinada por medio de una regresión no lineal obtenida a partir de la relación dosis-respuesta.

Índice de selectividad

El índice de selectividad fue calculado con base a la relación de la concentración citotóxica al 50% y la concentración inhibitoria al 50% (CC₅₀/CI₅₀).

Modo de acción de los extractos y compuestos

Con objeto de investigar en qué etapa del ciclo replicativo del virus actúan los extractos o compuestos fenólicos, se consideraron tres posibles modos de acción de acuerdo a lo descrito por Schnitzler et al. (2010), quienes estudiaron extractos de propóleo como antivirales. Los modos de acción investigados fueron: 1) pretratamiento celular, en el cual las células Vero se incubaron con el extracto o compuestos durante 1 h previo a la infección viral, 2) pretratamiento viral o, en el cual el extracto o compuestos fueron incubados junto con el virus durante 1 h previo a la infección viral, 3) en la fase de replicación del virus, donde se agregaron los extractos o compuestos postinfección. En todos los casos el porcentaje de inhibición fue determinado a partir del ensayo colorimétrico de MTT.

Efecto del tiempo de adición de los extractos

Otro de los aspectos que se consideraron en el presente trabajo fue el efecto de la adición de los extractos y compuestos a diferentes tiempos después de la infección (0.5, 1, 1.5, 2, 4 y 24 horas) de acuerdo a lo descrito por Chiang, Chiang, Liu, & Lin (2003). Después de 72 h el porcentaje de inhibición se determinó por el ensayo colorimétrico MTT previamente descrito.

Identificación de compuestos fenólicos por HPLC-MS-ESI

Los extractos fueron analizados utilizando un equipo de Cromatografía Líquida de Ultra-Alta Resolución marca Ultimate 3000 (Dionex Corp, CA, USA) acoplado a un espectrómetro de masas. El análisis cromatográfico se llevó a cabo por medio de una columna C18 fase inversa (longitud de 250 × 4.6 mm de diámetro y 5 µm de diámetro de partícula) a un flujo de 0.3 mL/min usando un volumen de inyección de 20 µL. La fase móvil consistió en: fase A (agua/ácido fórmico 99:1 v/v) y fase B (acetonitrilo) con el siguiente gradiente: 10-60% (B) de 0 a 10 min; 60-90% (B) de 10-15 min, 90-10% (B) de 15-17 min; y 10% (B) de 17-19 min. Los extractos fueron disueltos en metanol grado HPLC y filtrados en una membrana de 0.45 µm. El análisis de masas fue realizado en un espectrómetro de masas marca Bruker micrOTOF-Q II (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) con ionización por electrospray, con una temperatura de la fuente de 200°C y un flujo del gas de 11 L/min. El análisis de masa varió de 50 to 3000 m/z. Los compuestos fenólicos fueron analizados en modo negativo (ESI-). Las masas fueron procesadas usando el software Bruker Compass Data Analysis 4.0.

Análisis estadístico

Los resultados se reportan como el promedio de las réplicas ± su desviación estándar. Para el análisis de los resultados se realizó un análisis de varianza (ANOVA), las pruebas Tukey y Dunnet fueron usadas para comparar el promedio entre grupos usando el programa estadístico STATGRAPHICS Plus 6.0.

RESULTADOS

En el cuadro 1 se presentan los resultados de la concentración de extractos de *Capsicum* que causa el 50% de muerte en células Vero (CC_{50}). El extracto de chile habanero presentó los valores más altos de citotoxicidad con una $CC_{50} = 1.60 \pm 0.04$ mg/mL; los extractos de chile guajillo y ancho presentaron valores intermedios ($CC_{50} = 7.42 \pm 0.06$ y 6.38 ± 0.09 mg/mL, respectivamente). El extracto de pimiento fue el mejor tolerado por las células Vero, presentando una citotoxicidad de $CC_{50} = 9.82 \pm 0.06$ mg/mL. La citotoxicidad de los otros extractos de chiles estudiados fue: para el jalapeño 2.06 ± 0.08 mg/mL y para el serrano 2.11 ± 0.08 mg/mL.

Con respecto a la actividad antiviral, en el cuadro 1 se muestran los resultados obtenidos de la concentración de extractos de chile que causan el 50% de inhibición del virus en el cultivo celular. El extracto de pimiento presentó la mejor actividad antiviral con una $CI_{50} = 0.56 \pm 0.03$ mg/mL y un índice de selectividad de 17.5. El extracto de chile guajillo presentó una $CI_{50} = 1.03 \pm 0.02$ mg/mL, con índice de selectividad de 7.2, seguido por el extracto de chile ancho ($CI_{50} = 1.15 \pm 0.02$ mg/mL, IS = 5.5), jalapeño (IS = 0.9), serrano (IS = 0.9), y habanero (IS = 0.5).

Cuadro 1. Citotoxicidad y actividad antiviral de extractos de chile.

Extracto	CC_{50} (mg/mL)	CI_{50} (mg/mL)	IS
Pimiento	9.82 ± 0.06^a	0.56 ± 0.03^e	17.5 ^A
Guajillo	7.42 ± 0.06^b	1.03 ± 0.02^d	7.2 ^B
Ancho	6.38 ± 0.09^c	1.15 ± 0.02^c	5.5 ^C
Jalapeño	2.06 ± 0.08^d	2.43 ± 0.06^b	0.9 ^D
Serrano	2.11 ± 0.08^d	2.39 ± 0.03^b	0.9 ^D
Habanero	1.60 ± 0.04^e	2.97 ± 0.04^a	0.5 ^D
*Aciclovir	>0.1	0.03 ± 0.002	>30

CC_{50} (concentración citotóxica es la concentración que causa el 50% de muerte celular. CI_{50} es la concentración que inhibe la infectividad viral en el 50% de las células. IS (índice de selectividad) basada en la relación CC_{50}/CI_{50} . Los valores presentados representan el promedio de seis mediciones \pm desviación estándar. Letras diferentes en la misma columna indican valores significativamente diferentes ($p < 0.05$) de acuerdo a la prueba de Tukey.

Los resultados del modo de acción de los extractos se presentan en la figura 1. Cuando las células Vero fueron pretratadas con extractos antes de la infección viral, el extracto de pimiento presentó una inhibición del 52%, el extracto de chile guajillo de 31.1%, ancho de 18.3%, jalapeño de 17.4%, habanero de 14.8% y serrano de 10.1%. Cuando el virus se inoculó durante una hora con cada extracto de chile y después se añadió a las células se incrementó la inhibición, el extracto de pimiento presentó un porcentaje de inhibición de 98.2, guajillo 96.4%, ancho, 93.3% serrano 32.7%, jalapeño 29.1% y habanero 24.2%. En la fase de replicación no se presentó un efecto antiviral significativo en ningún extracto de chile evaluado.

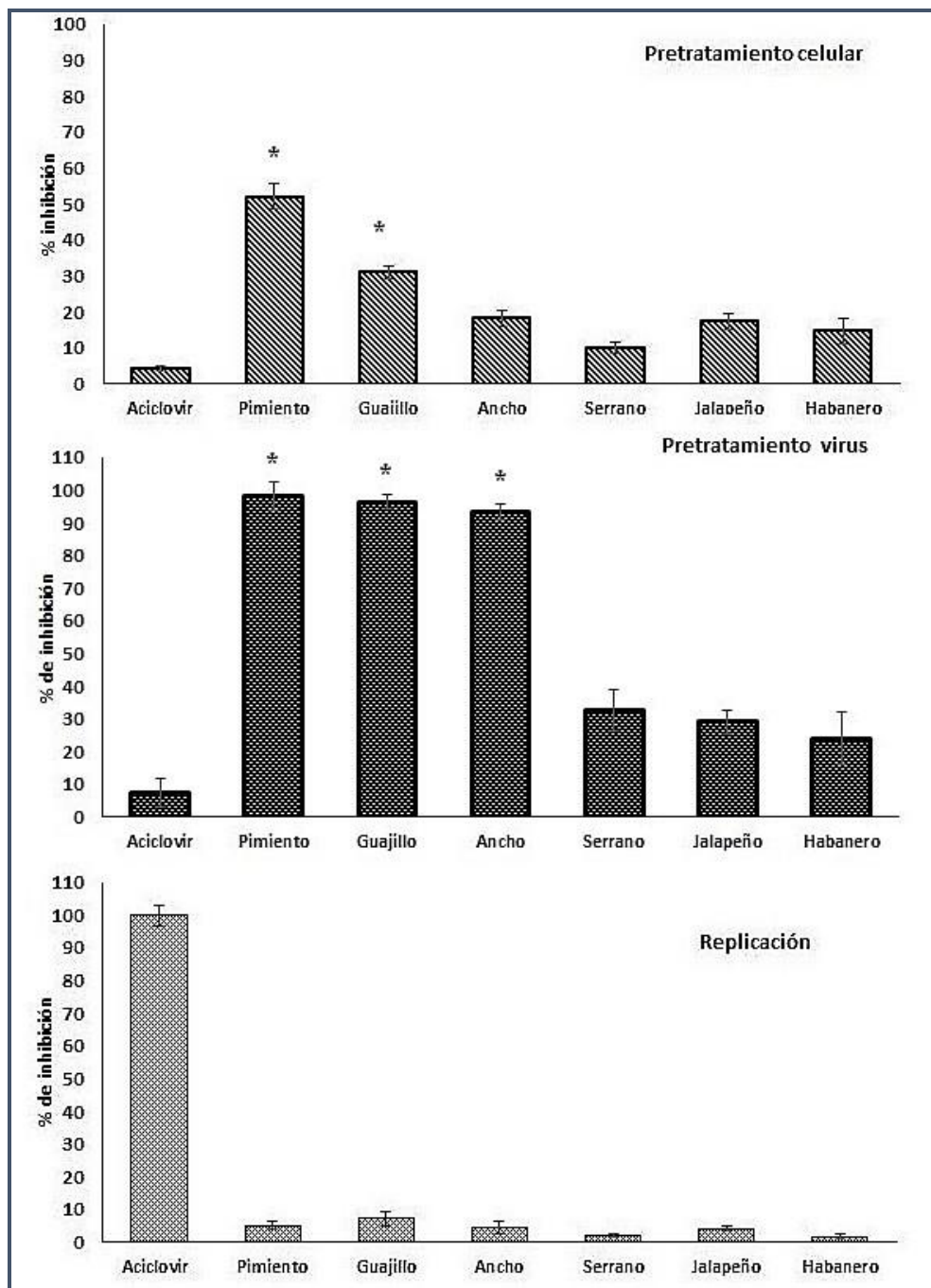


Fig. 1. Efecto inhibitorio de extractos de chile en el pretratamiento celular, pretratamiento del virus y en la replicación de HSV-1. Los datos presentados corresponden al promedio de seis réplicas \pm desviación estándar. Los asteriscos representan diferencia significativa en relación al control (células infectadas sin tratamiento) de acuerdo a la prueba de Dunnett ($p < 0.05$).

Con respecto a la adición de extractos de *Capsicum* a diferentes tiempos después de la infección se observó que fueron efectivos cuando se añadían a las 0.5, 1.0, 1.5, y 2 h postinfección; empleando las concentraciones de 0.9, 1.8 y 3.6 mg/mL de los extractos más eficientes, que fueron pimienta, guajillo y ancho. Con la menor concentración probada 0.9 mg/mL, el extracto de pimienta presentó una inhibición del 92.3%, a diferencia de los extractos de chile guajillo y ancho presentaron una inhibición de 52% y 48.3%, respectivamente. Cabe destacar que los extractos de los tres chiles en la concentración más alta de 3.6 mg/mL, inhibieron al 100% el virus herpes simplex tipo 1 (fig. 2). Los extractos de guajillo y ancho alcanzan un efecto inhibitorio mayor del 80% con una concentración de 1.8 mg/mL. En los tres casos después de las dos horas postinfección no se observa ningún efecto de los extractos de chiles, sobre la inhibición del virus VHS-1.

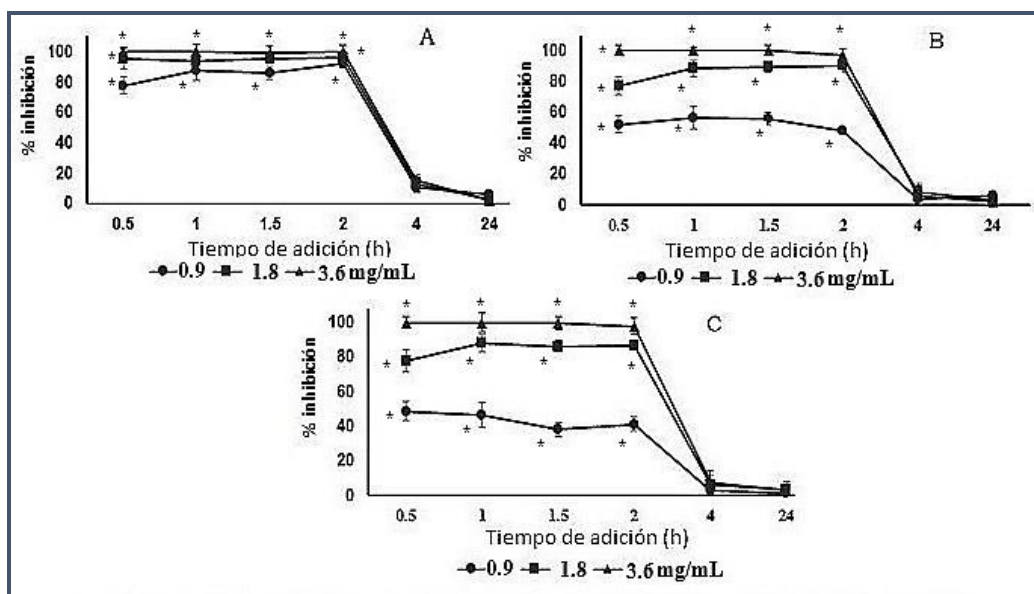


Fig. 2. Efecto inhibitorio de la adición de extractos de chiles a diferentes concentraciones (0.9, 1.8 y 3.6 mg/mL) y tiempos después de la infección (0.5, 1, 1.5, 2, 4 y 24 h) de HSV-1. A. pimienta. B. guajillo. C. ancho. Los datos presentados corresponden al promedio de seis réplicas \pm desviación estándar. Los asteriscos representan diferencia significativa en relación al control (células infectadas sin tratamiento) de acuerdo a la prueba de Dunnett ($p < 0.05$).

Con objeto de identificar los compuestos responsables de la actividad antiviral, presentes en los extractos de *Capsicum* se empleó cromatografía HPLC-MS. En el cuadro 2 se presentan los compuestos identificados para cada extracto. Los compuestos identificados en el extracto de pimienta (el cual presentó la mejor actividad antiviral), fueron: ácido *t*-cinámico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido caféico, quercetina, luteolina, kaempferol y rutina. Se observa que los ácidos caféico y ferúlico, así como los flavonoides kaempferol y quercetina fueron identificados en los seis extractos analizados.

La citotoxicidad y la actividad antiviral de los fenólicos y flavonoides identificados se muestran en el cuadro 3. La luteolina presentó la citotoxicidad más baja ($CC_{50} = 0.38 \pm 0.02$ mg/mL), seguido de la quercetina ($CC_{50} = 0.33 \pm 0.03$ mg/mL) y ácido *trans*-cinámico ($CC_{50} = 0.23 \pm 0.01$ mg/mL). Los dos compuestos que presentaron la mejor actividad antiviral fueron el ácido *t*-cinámico, el cual presentó la mayor actividad con una $CI = 0.015 \pm 0.003$ mg/mL e índice de selectividad de 15.4, seguido por la quercetina con una $CI_{50} = 0.034 \pm 0.003$ mg/mL y un índice de selectividad de 9.7.

Cuadro 2. Fenilpropanoides, ácidos fenólicos y flavonoides identificados en extractos de Chile por HPLC-MS-ESI.

Compuesto	Naturaleza	Fórmula	TR	m/z Exp [M-H] ⁻	m/z Calculado [M-H] ⁻	P	CH	CJ	CS	CG	CA
Ácido caféico	Ac. fenólico	C ₉ H ₈ O ₄	3.7	179.0528	179.035	x	x	x	x	x	x
Ácido <i>p</i> -cumárico	Ac. fenólico	C ₉ H ₈ O ₃	7.1	163.0387	163.0398	x	x		x	x	x
Ácido ferúlico	Ac. fenólico	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	8.3	193.0507	193.0501	x	x	x	x	x	x
Ácido <i>t</i> -cinámico	Fenilpropanoide	C ₉ H ₈ O ₂	9.1	147.0278	147.0459	x			x		
Kaempferol	Flavonoide	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	9.8	285.0761	285.0477	x	x	x	x	x	x
Rutina	Flavonoide	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	10.5	609.1438	609.1488	x	x	x		x	
Quercetina	Flavonoide	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	11.0	301.0672	301.2278	x	x	x	x	x	x
Luteolina	Flavonoide	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	12.4	285.231	285.236	x	x	x		x	x

Tiempo de retención (TR). m/z Experimental (m/z Exp).

Pimiento (P), Chile habanero (CH), Chile jalapeño (CJ), Chile serrano (CS), Chile guajillo (CG) y Chile ancho (CA).

Cuadro 3. Citotoxicidad y actividad antiviral de fenilpropanoides, ácidos fenólicos y flavonoides identificados.

Compuesto	CC ₅₀ (mg/mL)	CI ₅₀ (mg/mL)	IS
Fenilpropanoide			
Ácido <i>t</i> -cinámico	0.23 ± 0.01 ^b	0.015 ± 0.003 ^f	15.4 ^A
Ácidos fenólicos			
Ácido ferúlico	0.18 ± 0.02 ^c	0.076 ± 0.006 ^{cd}	2.4 ^C
<i>p</i> -ácido cumárico	0.16 ± 0.02 ^{cd}	0.086 ± 0.005 ^c	1.8 ^C
Ácido caféico	0.11 ± 0.03 ^d	0.149 ± 0.012 ^{ab}	0.8 ^C
Flavonoides			
Quercetina	0.33 ± 0.03 ^a	0.034 ± 0.003 ^{ef}	9.7 ^B
Luteolina	0.38 ± 0.02 ^a	0.157 ± 0.01 ^a	2.4 ^C
Kaempferol	0.12 ± 0.01 ^{de}	0.057 ± 0.05 ^{de}	2.1 ^C
Rutina	0.13 ± 0.01 ^{cd}	0.126 ± 0.02 ^b	1.1 ^C

CC₅₀ es la concentración citotóxica es la concentración que causa el 50% de muerte celular. CI₅₀ es la concentración que inhibe la infectividad viral en el 50% de las células. IS es el índice de selectividad basada en la relación CC₅₀/CI₅₀. Los valores presentados representan el promedio de seis mediciones ± desviación estándar. Letras diferentes en la misma columna indican valores significativamente diferentes ($p < 0.05$) de acuerdo a la prueba de Tukey.

Con el fin de aportar datos sobre el mecanismo de acción de los compuestos fenólicos en la inhibición del virus, se ensayaron diferentes condiciones para la actividad antiviral. Como en el caso de los extractos, los compuestos se añadieron: 1) en pretratamiento celular, 2) pretratamiento del virus y 3) replicación. En el caso de pretratamiento celular los ácidos fenólicos presentaron una inhibición de 18.5% para ácido *t*-cinámico, los flavonoides, como rutina presentaron 15.2% y quercetina 58.6%. El ácido *trans*-cinámico y la quercetina presentan una actividad significativa contra el virus herpes simplex cuando se incubaron en contacto

directo con el virus (pretratamiento virus). Una inhibición del 92.3% presentó el ácido *t*-cinámico y quercetina del 95.2%. Cuando los compuestos se añadieron en la fase de replicación, no se observó ningún efecto (fig. 3).

DISCUSIÓN

La infección de VHS-1 es una de las principales enfermedades virales a nivel mundial, la resistencia de algunas cepas a los fármacos de referencia ha llevado al estudio de otros compuestos con la propiedad de inhibir la infección. Extractos de plantas y sus partes (hoja, fruto, tallo, raíz) han sido evaluados sobre diferentes virus ya sea de ADN o ARN reportando efectos promisorios como alternativa de tratamiento. Como primer paso se evaluó la citotoxicidad de los seis extractos de Chile, esta prueba es determinante ya que con los resultados obtenidos se conoce la concentración no tóxica para las células y que puede ser utilizada en la evaluación de actividad antiviral.

La citotoxicidad de los extractos de los chiles pimienta, guajillo y ancho fue menor que la obtenida para ocho extractos de plantas, que reportan un valor de CC_{50} en el intervalo de 0.61 (*Sloanea guianensis*) y 3.00 (*Glycine max*) mg/mL en células Vero (Müller et al., 2007). Suárez et al. (2010) estudiaron la citotoxicidad de extractos de pulpa de manzana, en el caso de extractos acetónicos se reportó una $CC_{50} = 5.5$ mg/mL y para extractos metanólicos una $CC_{50} = 7.3$ mg/mL. Comparativamente, los extractos de pimienta, guajillo y ancho presentaron una menor citotoxicidad que los extractos de semilla de soja y de pulpa de manzana.

Los índices de selectividad obtenidos en este trabajo para los extractos de ancho, guajillo, y pimienta son similares a los reportados para otras plantas; como son: *Alamanda schottii* (hoja) IS = 2.6, *Alamanda schottii* (flores) IS = 2.4, *Sloanea guianensis* IS = 4.4, y *Moringa oleifera* IS = 8.8 (Lipipun et al., 2003; Müller et al., 2007). Además un índice de selectividad semejante ha sido reportado por Suárez et al. (2010) para el caso de los extractos metanólicos de pulpa de manzana, que presentaron un índice de selectividad de 9.5 (en herpes simplex tipo 1) y 11.6 (en herpes simplex tipo 2). Cabe destacar que el extracto de Chile pimienta comparativamente con todos los ejemplos anteriores mostró el mejor índice de selectividad como antiviral contra el virus del herpes simplex.

Los extractos de pimienta, ancho y guajillo presentaron una actividad significativa contra el VHS cuando se incuban en contacto directo con el virus (fig. 1). En el primer caso, los extractos parecen modificar la capacidad del virus para penetrar en las células huésped. Schnitzler et al. (2010) investigaron el efecto de extractos de propóleos (acuosos y etanólicos) contra herpes y obtuvieron un efecto antiviral cuando VHS-1 se incubó con los extractos antes de ser inoculado en las células, tampoco encontraron efectos significativos cuando se añadieron los extractos después de la penetración viral. A los compuestos identificados por HPLC-MS también se les realizaron ensayos de citotoxicidad y de actividad antiviral, siendo el ácido *trans*-cinámico y la quercetina los que presentaron mejores índices de selectividad, seguidos por luteolina, ácido ferúlico, kaempferol y rutina (fig. 3). Gravina et al. (2011) estudiaron *in vitro* la actividad antiviral de quercetina, morina y de ácido *trans*-cinámico contra el virus herpes equino tipo 1 (EHV-1). La quercetina mostró actividad virucida y presentó efecto en el ciclo replicativo a las primeras horas de la infección, los autores sugirieron que este compuesto tiene un efecto sobre receptores de las células mediante su desestabilización o actuando como un inhibidor competitivo para el virus.

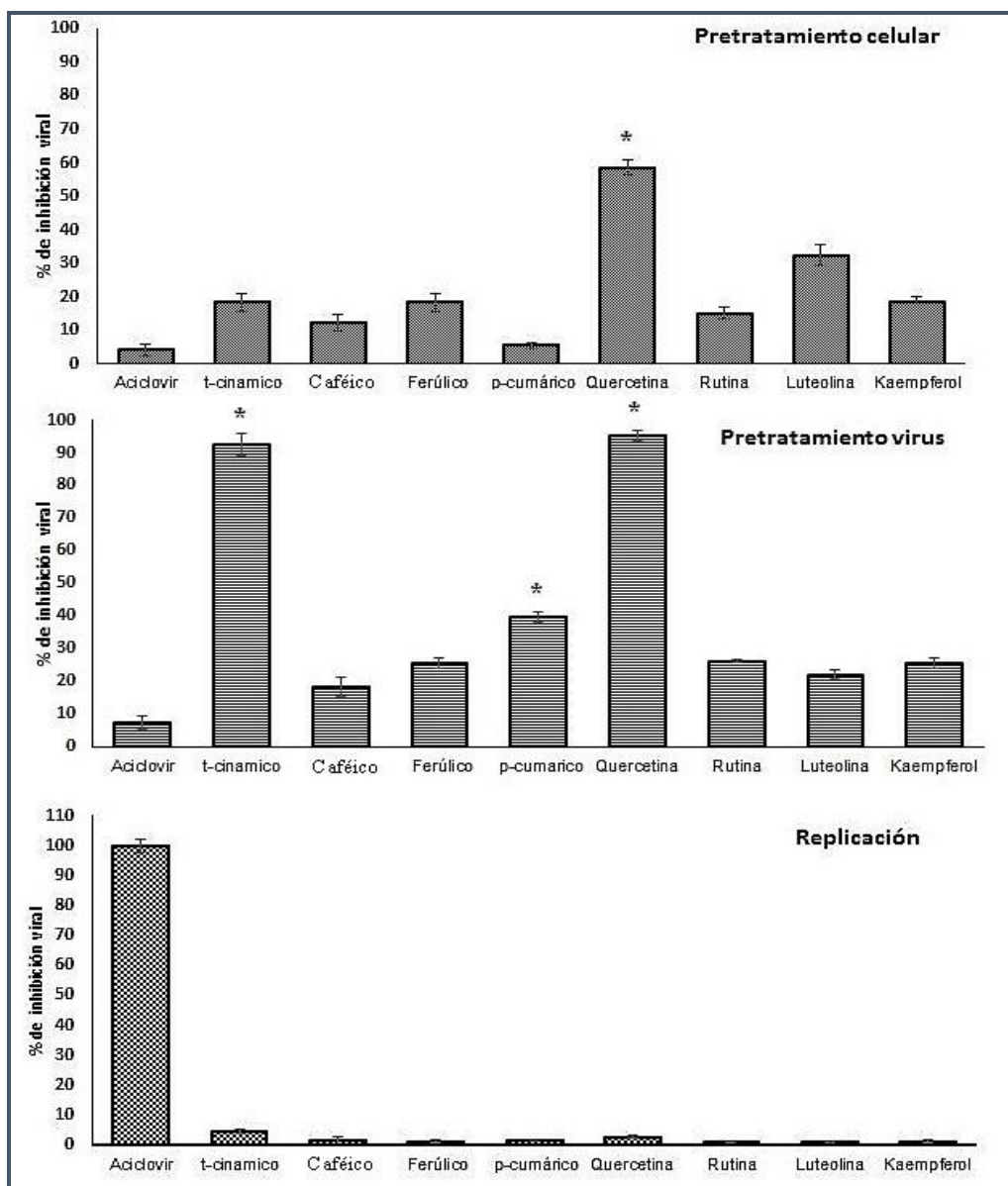


Fig. 3. Efecto inhibitorio de compuestos fenólicos en el pretratamiento celular, pretratamiento del virus y en la replicación de HSV-1. Los datos presentados corresponden al promedio de seis réplicas \pm desviación estándar. Los asteriscos representan diferencia significativa en relación al control (células infectadas sin tratamiento) de acuerdo a la prueba de Dunnett ($p < 0.05$).

Se observó que los compuestos estudiados tuvieron efecto antiviral en el pretratamiento viral y no tuvieron efecto en la etapa de replicación del virus, a diferencia del aciclovir, el cual fue utilizado como testigo positivo. Este hecho puede explicarse por la diferencia en la estructura molecular de los antivirales. El aciclovir es un análogo de nucleósido, y su mecanismo antiviral implica la inhibición de la ADN polimerasa, en la fase de replicación. En cambio, la actividad antiviral de los compuestos fenólicos, parece deberse a la capacidad de estos compuestos para unirse a las proteínas y formar complejos. La capacidad de los compuestos fenólicos para unirse a proteínas ha sido previamente estudiada; el grupo fenólico es un excelente donante de

hidrógeno, que forma enlaces de hidrógeno con los grupos carboxilo de las proteínas (Ozdal, Capanoglu, & Altay, 2013). Formica & Regelson (1995) encontraron que la actividad antiviral de quercetina también se relaciona con su capacidad para unirse a proteínas virales e interferir con la síntesis de ácido nucleico viral.

CONCLUSIÓN

El índice de selectividad del extracto de pimiento fue el más alto entre los extractos evaluados, además los extractos de guajillo y ancho mostraron una efectividad similar a la de extractos de otras plantas con efectos antivirales reportados anteriormente en la literatura. Se demostró que los compuestos quercetina y ácido *t*-cinámico presentes en los extractos fueron los más eficaces contra la infección del virus del herpes simplex tipo 1. Los resultados sugieren que estos compuestos, así como los tres extractos de chile (pimiento, ancho y guajillo) potencialmente pueden ser usados como agentes antivirales contra VHS-1.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de posgrado otorgada. Al Instituto Politécnico Nacional por las becas COFFA y EDI. A la SIP-IPN por el apoyo derivado de los proyectos 20181349, 20160927 y 20171016.

LITERATURA CITADA

- Chiang, L. C., Chiang, W., Liu, M. C., & Lin, C. C. (2003). In vitro antiviral activities of *Caesalpinia pulcherrima* and its related flavonoids. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(2), 194–8. <http://doi.org/10.1093/jac/dkg291>
- Dorantes, L., Colmenero, R., Hernandez, H., Mota, L., Jaramillo, M. E., Fernandez, E., & Solano, C. (2000). Inhibition of growth of some foodborne pathogenic bacteria by *Capsicum annum* extracts. *International Journal of Food Microbiology*, 57(1–2), 125–128. [http://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00216-6](http://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00216-6)
- Formica, J. ., & Regelson, W. (1995). Review of the biology of Quercetin and Related Bioflavonoids. *Food, Chemistry and Toxicology*, 33(12), 1061–1080.
- Gravina, H. D., Tafuri, N. F., Silva Júnior, A., Fietto, J. L. R., Oliveira, T. T., Diaz, M. A. N., & Almeida, M. R. (2011). In vitro assessment of the antiviral potential of *trans*-cinnamic acid, quercetin and morin against equid herpesvirus 1. *Research in Veterinary Science*, 91(3), e158-62. <http://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.11.010>
- Lipipun, V., Kurokawa, M., Suttisri, R., Taweechotipatr, P., Pramyothin, P., Hattori, M., & Shiraki, K. (2003). Efficacy of Thai medicinal plant extracts against herpes simplex virus type 1 infection in vitro and in vivo. *Antiviral Research*, 60(3), 175–180. [http://doi.org/10.1016/S0166-3542\(03\)00152-9](http://doi.org/10.1016/S0166-3542(03)00152-9)
- Moreno-Limón, S., Salcedo-Martínez, S. M., Cárdenas-Ávila, M. L., Hernández-Piñero, J. L., & Núñez-González, M. a. (2012). Efecto antifúngico de capsaicina y extractos de chile piquín (*Capsicum annum* L. var. aviculare) sobre el crecimiento in vitro de *Aspergillus flavus*. *Polibotánica*, 34, 171–184.
- Müller, V., Chávez, J. H., Reginatto, F. H., Zucolotto, S. M., Niero, R., Navarro, D., Simões, C. M. O. (2007). Evaluation of antiviral activity of South American plant extracts against herpes simplex virus type 1 and rabies virus. *Phytotherapy Research PTR*, 21(10), 970–974. <http://doi.org/10.1002/ptr>
- Oboh, G., & Batista, J. (2007). Polyphenols in red pepper [*Capsicum annum* var . aviculare (Tepin)] and their protective effect on some pro-oxidants induced lipid peroxidation in brain and liver, 239–247. <http://doi.org/10.1007/s00217-006-0410-1>
- Ozdal, T., Capanoglu, E., & Altay, F. (2013). A review on protein–phenolic interactions and

Recibido:
21/marzo/2017

Aceptado:
18/enero/2018

- associated changes. *Food Research International*, 51(2), 954–970. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.009>
- Roizman, B., Knipe, D.M., Whitley, R.J. 2007. Herpes simplex viruses. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*, 5th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 2501–2601
- Savi, L. A, Barardi, C. R. M., & Simões, C. M. O. (2006). Evaluation of antiherpetic activity and genotoxic effects of tea catechin derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(7), 2552–2557.
- Schnitzler, P., Neuner, A., Nolkemper, S., Zundel, C., Nowack, H., Sensch, K. H., & Reichling, J. (2010). Antiviral activity and mode of action of propolis extracts and selected compounds, 24, 20–28. <http://doi.org/10.1002/ptr>
- Suárez, B., Álvarez, Á. L., García, Y. D., Barrio, G. Del, Lobo, A. P., & Parra, F. (2010). Phenolic profiles, antioxidant activity and in vitro antiviral properties of apple pomace. *Food Chemistry*, 120, 339–342. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.073>
- Wahyuni, Y., Ballester, A.-R., Sudarmonowati, E., Bino, R. J., & Bovy, A. G. (2011). Metabolite biodiversity in pepper (*Capsicum*) fruits of thirty-two diverse accessions: variation in health-related compounds and implications for breeding. *Phytochemistry*, 72(11–12), 1358–70. <http://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.03.016>