

Actividad antiviral contra el virus de la fiebre amarilla, cepa vacunal 17D, de extractos de hojas de *Taraxacum officinale* GH Weber ex Wiggers

[Phytochemical and antiviral activity against yellow fever virus, 17D vaccine strain, of extracts from leaves of *Taraxacum officinale* GH Weber ex Wiggers]

Morella RODRÍGUEZ-ORTEGA^{1,2}, Zuriely CHUMPITAZ¹, Santiago RÍOS³, Mónica MÉNDEZ³,
Jeannette MÉNDEZ³ & Gustavo CABRERA³

¹Laboratorio de Virología, Instituto de Biomedicina, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

²Laboratorio de Virología, Servicio Autónomo Instituto de Biomedicina, Ministerio de poder popular para la Salud.

³Laboratorio de Productos Naturales, Facultad de Química, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

Contactos / Contacts: Morella RODRÍGUEZ-ORTEGA - E-mail address: mrodriguezortega@gmail.com

Abstract

Taraxacum officinale leaves were collected at two and 5 months of growth, for antiviral activity against flavivirus, using the 17D vaccine strain of yellow fever virus as a model. Using spectroscopy technique, a total of twelve (12) compounds were identified in the chloroform (C) and hexane (H) extracts of two and five months (2M and 5M) of recollection. The antiviral activity against the yellow fever 17D virus was evaluated with the plaque assay and the concentrations used (50 - 1,5 µg/mL) were no cytotoxic to Vero cells as determined using the MTT(3-(4,5-Dimetiltiazol-2yl)-2,4-difenilbromuro de tetrazolium) assay. The phytochemical composition of leaves growing for 5 months is different and more complex than leaves growing for 2 months. From the four extracts, only C5M inhibited the viral replication in a dose depend manner, with 100% viral inhibition at 50 µg/mL ($p=0,0124$) and the effective doses 50 (ED_{50} : $10,2 \pm 8,7$ µg/mL), meanwhile, ED_{50} of C2M extract was $93,5 \pm 23,5$ µg/mL, thus, the extract C5M is 8 times more effective than extract C2M. The identified compounds in extract C5M were: Ψ taraxasteryl acetate, caffeic acid, taraxasteryl acetate, taraxerol, taraxerilo acetate and Ψ -taraxasterol. One of these compounds or the combinations of them is responsible for the reported high antiviral activity.

Keywords: *Taraxacum officinale*, phytochemistry, antiviral

Resumen

Las hojas de *Taraxacum officinale* fueron colectadas a dos y cinco meses de crecimiento, para determinar actividad antiviral contra flavivirus, utilizando como modelo el virus de fiebre amarilla cepa vacunal 17D. Se identificaron por métodos espectroscópicos, un total de doce (12) compuestos provenientes de los extractos de hexano (H) y cloroformo (C) a dos y cinco meses (2M y 5M) de recolección. La actividad antiviral se determinó mediante un ensayo de placa y las concentraciones de extractos utilizadas (50-1,5 µg/mL) fueron no citotóxica en células Vero, determinadas por el método colorimétrico del MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2yl)-2,4-difenilbromuro de tetrazolio). La composición fitoquímica de los extractos de 5 meses es distinta y más compleja que la de dos meses de crecimiento. De los cuatro extractos sólo el C5M inhibió la replicación del virus en una manera dosis dependiente, con una inhibición del 100% a 50 µg/mL ($p=0,0124$) y una dosis efectiva 50 (DE_{50}) de $10,2 \pm 8,7$ µg/mL, mientras que el DE_{50} del extracto C2M es de $93,5 \pm 23,5$ µg/mL, lo que hace al extracto clorofórmico de 5 meses aproximadamente 8 veces más efectivo que el C2M. Los compuestos presentes en el extracto C5M son Ψ taraxasterilo, ácido cafeico, acetato de taraxasterilo, taraxerol, acetato de taraxerilo y Ψ -taraxasterol. Uno o más de estos compuestos son responsables de alta actividad antiviral reportada.

Palabras Clave: *Taraxacum officinale*, fitoquímica, antivirales

Recibido | Received: 1 de Agosto 2012.

Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form: 5 de Enero de 2013.

Publicado en línea | Published online: 31 de Julio de 2013.

Declaración de intereses | Declaration of interests: El presente trabajo se realizó bajo el auspicio del PG 09-006589-2006 del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela.

Este artículo puede ser citado como / This article must be cited as: M Rodríguez-Ortega, Z Chumpitaz, S Ríos, M Mendez, J Mendez, G Cabrera. 2013. Actividad antiviral contra el virus de la fiebre amarilla, cepa vacunal 17D, de extractos de hojas de *Taraxacum officinale* GH Weber ex Wiggers. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat* 12(4): 346 - 355.

INTRODUCCIÓN

En la búsqueda de potenciales agentes medicinales, los productos naturales derivados de plantas desempeñan un papel importante. Originalmente se utilizaban pócimas y brebajes para tratar un amplio espectro de enfermedades, muchas de esas enfermedades ahora sabemos que son de origen viral (Vanden *et al.*, 1986). *Taraxacum officinale* GH Weber ex Wiggers (familia Asteraceas); conocida comúnmente como Diente de León, tiene un largo historial de uso en la medicina tradicional, avalada por los estudios *in vitro* e *in vivo* de los extractos de esta planta, los cuales muestran su relevancia farmacológica como anti-inflamatorio (Jeon *et al.*, 2008), antioxidantes (Lozek *et al.*, 2007, Ung-Kyn *et al.*, 2010), hipolipidémico (Ung-Kyn *et al.*, 2010), usado efectivamente contra diabetes (Onal *et al.*, 2005, Akhtar 1985) y como tratamiento para la colitis (Chakurski *et al.*, 1980) y el cáncer (Kensuke *et al.*, 1981, Takasaki *et al.*, 1999).

Ácidos fenólicos y flavonoides se han extraído y caracterizado de la raíz y hojas *T. officinale* (Schütz *et al.*, 2006), y se conoce que los esteroides presentes en las hojas de esta planta fluctúan dependiendo de la estación climatológica (Westerman and Roddick 1981), sin embargo, no existe información sobre la variación fitoquímica de las hojas de *T. officinale* durante su crecimiento.

Recientemente, se ha reportado que el extracto acuoso de Diente de León inhibe la replicación del virus Influenza (He *et al.*, 2011) y la del Virus de la inmunodeficiencia de Humanos (VIH), con una disminución dosis dependiente de la actividad de la transcriptasa reversa y de la replicación viral (Han *et al.*, 2011). Los virus pertenecientes al género flavivirus de la familia Flaviviridae, son responsables de importantes enfermedades infecciosas en humanos como el Dengue, el virus de la encefalitis Japonesa, el virus del occidente del Nilo y el virus de la fiebre amarilla, estos virus presentan estrategias de replicación muy similares (Perera *et al.*, 2008), lo que nos permite utilizar la cepa vacunal 17D del virus de fiebre amarilla como una herramienta eficaz y sencilla, en el estudio de posibles compuestos con actividad antiviral contra virus del género flavivirus (Neyts *et al.*, 1996).

El presente trabajo está enmarcado en la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas a las enfermedades flaviviricas utilizando extractos de hojas de *T. officinale*, recolectadas a diferentes tiempos de crecimiento, sobre la replicación del virus de la Fiebre

amarilla cepa vacunal 17D. En el estudio fitoquímico se identificaron los componentes presentes en los extractos.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal

Las semillas de *Taraxacum officinale* fueron certificadas por el Dr. Stephen Tillet, curador del herbario Ovalles de la Facultad de Farmacia (Universidad Central de Venezuela) fueron plantadas en el Jardín Botánico de esta Facultad, las hojas fueron colectadas a los dos y cinco meses después de la germinación, y secadas a temperatura ambiente.

Obtención de los extractos e identificación de sus componentes

El material vegetal seco (540 g) hojas de dos y cinco meses se extrajo con n-hexano (H2M, H5M) en un Soxhlet durante 48 h y sucesivamente por percolación con cloroformo (C2M, C5M), hasta que el solvente no mostraba coloración. Para la percolación se utilizaron solventes destilados, y para las cromatografías solventes grado reactivo.

Agente revelador: solución concentrada de Sulfato Cérico en Ácido Sulfúrico, diluida al 10% en metanol, una coloración morada fue indicativa de la presencia de triterpenos.

Todos los experimentos de RMN fueron registrados en espectrómetros JOEL de 270 MHz. Como solvente se usó CDCl₃, en un equipo CG-MS marca HP5890 Serie II, con una columna capilar de metil siloxano de 25 m de longitud de 0,25 mm de diámetro interno, de espesor de película 0,11 μm. Helio (He) fue el gas de arrastre utilizado; la temperatura del detector y el inyector fue de 280 °C; la programación de temperatura se realizó a partir de 70 °C hasta 300 °C a razón de 8 °C por minuto. Se usó un método de inyección Split-less mediante una jeringa Hamilton, y tolueno para la dilución de las muestras. El espectrómetro de masas funcionó con un detector para trampa de iones a modo de impacto electrónico, con un potencial de 70eV.

Para cromatografía de columna se utilizó como fase estacionaria sílica gel Aldrich 60 Å, de 500 m²/g de área superficial y 0,75 cm³/g de volumen; 70-230 Mesh. Se utilizaron placas analíticas de sílica gel 0,25 mm de espesor en placas de aluminio, Merck DC-60F254. Los extractos de hexano y cloroformo fueron purificados mediante cromatografía de columna, usando solventes de polaridad creciente. Las

fracciones colectadas fueron evaporadas a sequedad al vacío y analizadas por cromatografía de capa fina. Se agruparon aquellas con igual Rf y nuevamente fueron purificadas por cromatografía de columna o por cromatografía de placas preparativas.

Peso de los extractos: Hexano: H2M: 2,88 g (0,53%) H5M: 12,86 g (2,4%) y los extractos de Cloroformo: C2M: 1,44 g (0,27%) y C5M: 10,34 g (1,91%). Las técnicas cromatografías empleadas no permitieron la obtención de los compuestos con el grado de pureza necesaria para los ensayos biológicos. Los compuestos identificados en los distintos extractos fueron los siguientes:

H2M: β -amirina (1) y acetato de β -amirina (2).

H5M: β -sitosterol (3), Taraxasterol (4), Lupeol (5), ácido graso insaturado (6) y acetato de β -amirina (2).

C2M: β -amirina(1) y β -sitosterol(3).

C5M: Acetato de Ψ -taraxasterilo (7), Ácido cafeico (8), Acetato de Taraxasterilo (9), Taraxerol (10), Acetato de Taraxerilo (11), Ψ -Taraxasterol (12).

La identificación de los compuestos se llevó a cabo por métodos espectroscópicos $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ y DEPT y espectrometría de masa por comparación con datos de la literatura (Reynolds *et al.*, 1985; Dibi and Bitan 2012; Albuquerque *et al.*, 2006; Deng *et al.*, 2004; Jin *et al.*, 2007, Mahato and Kundu, 1994).

β -Amirina (1):

EM $m/z = 426 [M^+]$; 218; 207; 189. $^1\text{H NMR}$ (270 MHz; CDCl_3): 3,19 (1H, m, H-3 α); 5,16 (1H, s, H-12); 1,00 (3H, s, Me); 0,77 (3H, s, Me); 0,94 (3H, s, Me); 0,98 (3H, s, Me); 1,13 (3H, s, Me); 0,83 (3H, s, Me); 0,86 (3H, s, Me); 0,85 (3H, s, Me). $^{13}\text{C RMN}$ (67,5 MHz; CDCl_3): 38,82 (C-1); 27,20 (C-2); 79,09 (C-3); 42,10 (C-4); 55,35 (C-5); 18,36 (C-6); 32,80 (C-7); 42,10 (C-8); 47,71 (C-9); 37,00 (C-10); 23,70 (C-11); 118,77 (C-12); 145,29 (C-13); 41,80 (C-14); 26,05 (C-15); 27,10 (C-16); 32,88 (C-17); 47,27 (C-18); 46,95 (C-19); 30,80 (C-20); 34,93 (C-21); 37,49 (C-22); 28,05 (C-23); 15,45 (C-24); 15,60 (C-25); 16,97 (C-26); 26,11 (C-27); 28,43 (C-28); 33,40 (C-29); 23,73 (C-30).

Acetato de β -Amirina (2):

EM $m/z = 468 [M^+]$; 218; 249; 189. $^1\text{H NMR}$ (270 MHz; CDCl_3): 2,01 (3H, s, OMe); 4,45 (1H, m, H-3 α); 5,15 (1H, s, H-12); 0,87 (3H, s, Me); 0,86 (3H, s, Me); 0,95 (3H, s, Me); 0,94 (3H, s, Me); 1,09 (3H, s, Me); 0,82 (3H, s, Me); 0,85 (3H, s, Me); 0,84 (3H, s, Me). $^{13}\text{C RMN}$ (67,5 MHz; CDCl_3): 37,93 (C-1); 24,06 (C-

2); 81,72 (C-3); 38,65 (C-4); 54,28 (C-5); 18,97 (C-6); 32,90 (C-7); 38,98 (C-8); 49,32 (C-9); 37,56 (C-10); 23,74 (C-11); 117,88 (C-12); 144,53 (C-13); 42,09 (C-14); 26,15 (C-15); 26,96 (C-16); 33,18 (C-17); 46,87 (C-18); 47,00 (C-19); 31,70 (C-20); 35,06 (C-21); 36,79 (C-22); 27,95 (C-23); 15,75 (C-24); 15,80 (C-25); 17,07 (C-26); 26,21 (C-27); 28,55 (C-28); 32,34 (C-29); 23,82 (C-30); 20,15 (MeCOO); 171,64 (OCOMe).

β -sitosterol (3):

$^1\text{H RMN}$ (270 MHz, CDCl_3): 3,50 (1H, m, H-3 α); 5,27 (1H, m, H-6); 0,56 (3H, s, Me); 1,02 (3H, s, Me); 0,90 (3H, d, 6,4 Hz, Me); 0,80 (3H, d, 6,5 Hz, Me); 0,88 (3H, d, 6,5 Hz, Me); 0,85 (3H, t, 7,4 Hz, Me). $^{13}\text{C RMN}$ (67,5 MHz, CDCl_3): 37,2 (C-1); 31,2 (C-2); 72,5 (C-3); 41,4 (C-4); 141,2 (C-5); 120,7 (C-6); 32,0 (C-7); 32,1 (C-8); 52,1 (C-9); 36,5 (C-10); 21,0 (C-11); 38,9 (C-12); 42,3 (C-13); 56,9 (C-14); 24,4 (C-15); 28,8 (C-16); 56,1 (C-17); 10,5 (C-18); 20,0 (C-19); 36,7 (C-20); 18,3 (C-21); 33,2 (C-22); 35,9 (C-23); 46,1 (C-24); 28,9 (C-25); 19,7 (C-26); 19,1 (C-27); 22,9 (C-28); 12,3 (C-29).

Taraxasterol (4):

EM $m/z 426 [M^+]$; 218; 207; 189. $^1\text{H RMN}$ (270 MHz; CDCl_3): 3,19 (1H, m, H-3 α); 4,59 (2H, m, H-30); 0,97 (3H, s, Me); 0,77 (3H, s, Me); 0,83 (3H, s, Me); 1,01 (3H, s, Me); 0,93 (3H, s, Me); 0,85 (3H, s, Me); 1,00 (3H, d, 6,4 Hz, Me). $^{13}\text{C RMN}$ (67,5 MHz; CDCl_3): 38,89 (C-1); 27,47 (C-2); 79,04 (C-3); 38,85 (C-4); 55,37 (C-5); 18,39 (C-6); 34,14 (C-7); 40,89 (C-8); 50,52 (C-9); 37,00 (C-10); 21,49 (C-11); 26,22 (C-12); 39,24 (C-13); 42,10 (C-14); 26,70 (C-15); 38,41 (C-16); 34,57 (C-17); 48,71 (C-18); 39,42 (C-19); 154,83 (C-20); 25,76 (C-21); 38,89 (C-22); 28,16 (C-23); 15,46 (C-24); 16,91 (C-25); 15,71 (C-26); 14,81 (C-27); 19,59 (C-28); 25,56 (C-29); 107,23 (C-30).

Lupeol (5):

$^1\text{H NMR}$ (270 MHz; CDCl_3): 1,66 (3H, s, Me); 3,17 (1H, m, H-3 α); 4,54 (1H, m, H-29a); 4,69 (1H, m, H-29b); 0,95 (3H, s, Me); 0,74 (3H, s, Me); 0,83 (3H, s, Me); 1,01 (3H, s, Me); 0,92 (3H, s, Me); 0,77 (3H, s, Me). $^{13}\text{C RMN}$ (67,5 MHz; CDCl_3): 38,51 (C-1); 27,49 (C-2); 79,04 (C-3); 39,85 (C-4); 55,37 (C-5); 18,35 (C-6); 34,34 (C-7); 40,46 (C-8); 50,43 (C-9); 37,22 (C-10); 20,53 (C-11); 25,24 (C-12); 38,16 (C-13); 41,67 (C-14); 27,49 (C-15); 34,93 (C-16); 43,05 (C-17); 48,36 (C-18); 48,01 (C-19); 150,90 (C-20); 29,77 (C-21); 40,15 (C-22); 28,04 (C-23); 14,65 (C-

24); 16,61(C-25); 16,08 (C-26); 14,20 (C-27); 19,82 (C-28); 110,03 (C-29); 19,82 (C30).

Ácido graso insaturado (6):

¹H RMN (270 MHz, CDCl₃): 11,32 ba; 5,30 m; 0,92 t.
¹³C RMN (67,5 MHz, CDCl₃): 181,15 (-COOH); 129,71 y 129,14 (C=C), 12,87 (Me).

Acetato de Ψ -taraxasterilo (7):

¹H RMN (270 MHz, CDCl₃): 2,13 (3H, s, MeO); 4,21(3H, m, H-3 α); 5,52 (1H, m, H-21). ¹³C RMN (67,5 MHz, CDCl₃): 38,76 (C-1); 24,33 (C-2); 80,15 (C-3); 37,52 (C-4); 54,56 (C-5); 19,01(C-6); 34,92 (C-7); 42,87 (C-8); 50,01 (C-9); 36,21 (C-10); 21,39 (C-11); 27,15 (C-12);40,12 (C-13); 41,39 (C-14); 26,34 (C-15); 36,01 (C-16); 34,43 (C-17); 48,12 (C-18); 32,18 (C-19); 145,34 (C-20); 122,67 (C-21); 41,69 (C-22); 14,91 (C-23); 27,92 (C-24); 16,69 (C-25); 16,12 (C-26); 15,57 (C-27); 17,42 (C-28); 22,39 (C-29); 23,97 (C-30); 22,16 (MeCOO); 171,57 (OCOMe).

Ácido cafeico (8):

¹H RMN (270 MHz, MeOH-d₄): 6,18 (1H, d, H-8, $J=15$ Hz), 6,76 (1H, d, H-5, $J= 8,1$ Hz), 6,94 (1H, dd, H-6, $J= 8,1, 2,2$ Hz); 7,02 (1H, d, H-2, $J=2,2$ Hz); 7,40 (1H, d, H-7, $J=15$ Hz); ¹³C RMN (67,5 MHz, MeOH-d₄): 124,63 (C-1); 113,32 (C-2); 145,61 (C-3); 147,94 (C-4); 115,23 (C-5); 121,17 (C-6); 144,47 (C-7); 115,29 (C-8); 169,11 (C-9).

Acetato de Taraxasterilo (9):

¹H RMN (270 MHz; CDCl₃): 2,02 (3H, s, OMe); 4,43 (3H, m, H-3 α); 4,57 (2H, m, H-30). ¹³C RMN (67,5 MHz; CDCl₃): 38,50 (C-1); 23,40 (C-2); 81,12 (C-3); 37,80 (C-4); 55,41 (C-5); 18,28 (C-6); 34,11 (C-7); 40,15 (C-8); 50,35 (C-9); 37,10 (C-10); 21,39 (C-11); 26,20 (C-12); 39,14 (C-13); 42,23 (C-14); 26,65 (C-15); 38,50 (C-16); 34,49 (C-17); 48,73 (C-18); 39,35 (C-19); 154,70 (C-20); 25,71 (C-21); 38,79 (C-22); 27,96 (C-23); 16,67 (C-24); 16,34 (C-25); 15,71 (C-26); 14,73 (C-27); 19,45 (C-28); 25,47 (C-29); 107,20 (C-30), 21,77 (MeCOO); 172,05 (OCOMe).

Taraxerol (10):

EM m/z 426 [M⁺]; 302; 287; 204. ¹H-NMR: 3,15 (1H, m, H-3 α); 5,55 (1H, s, H-15) 0,81 (3H, s, Me); 0,85 (3H, s, Me); 0,91 (3H, s, Me); 0,94 (3H, s, Me); 0,95 (3H, s, Me); 1,00 (3H, s, Me); 1,05 (3H, s, Me); 1,07 (3H, s, Me). ¹³C RMN (67,5 MHz; CDCl₃): 37,97 (C-1); 27,11 (C-2); 79,02 (C-3); 38,90 (C-8); 48,78 (C-9); 37,88 (C-10); 17,49 (C-11); 35,70 (C-12); 38,77 (C-13); 158,10 (C-14); 117,72 (C-15); 36,61(C-16); 37,53

(C-17); 49,25 (C-18); 41;05 (C-19); 29,36 (C-20); 34,01 (C-21); 33,14 (C-22); 27,99 (C-23); 15,55 (C-24); 15,45 (C-25) ; 30,02 (C-26); 25,89 (C-27); 39,71 (C-28); 33,34 (C-29); 21,33 (C-30).

Acetato de Taraxerilo (11):

¹H NMR (270 MHz; CDCl₃): 2,02 Me-COO; 4,45(3H, m, H-3 α); 5,52 (1H, s, H-15). ¹³C RMN (67,5 MHz; CDCl₃): 37,53 (C-1); 23,96 (C-2); 80,83 (C-3); 38,52 (C-4); 55,18 (C-5); 18,87 (C-6); 33,40 (C-7); 38,92 (C-8); 49,47 (C-9); 37,73 (C-10); 17,87 (C-11); 36,45 (C-12); 37,81(C-13); 158,31 (C-14); 116,91 (C-15); 33,88 (C-16); 36,09 (C-17); 48,96 (C-18); 41,57 (C-19); 29,15 (C-20); 35,41(C-21); 37,62 (C-22); 28,12 (C-23); 16,83 (C-24); 14,97 (C-25); 25,91 (C-26); 30,22 (C-27); 30,64 (C-28); 33,62 (C-29); 21,43 (C-30); 20,48 (MeCOO); 170,34 (OCOMe).

Ψ -Taraxasterol (12):

¹H RMN (270 MHz, CDCl₃): 3,24 (1H, m, H-3 α); 5,50 (1H, m, H-21); 0,74 (3H, s, Me); 0,76 (3H, s, Me); 0,85 (3H, s, Me); 0,95 (3H, s, Me); 0,96 (3H, s, Me); 1,01 (3H, m, Me); 1,05 (3H, s, Me); 1,13 (3H, s, Me). ¹³C RMN (67,5 MHz, CDCl₃): 38,35 (C-1); 28,01 (C-2); 79,75 (C-3); 39,11 (C-4); 55,44 (C-5); 18,99 (C-6); 35,02 (C-7); 42,10 (C-8); 49,94 (C-9); 37,22 (C-10); 21,56 (C-11); 26,99 (C-12); 39,67 (C-13); 42,25 (C-14); 27,33 (C-15); 35,98 (C-16); 34,33 (C-17); 47,52 (C-18); 31,98 (C-19); 144,14 (C-20); 121,22 (C-21); 41,79 (C-22); 14,40 (C-23); 28,01 (C-24); 16,32 (C-25); 16,02 (C-26); 15,12 (C-27); 17,65 (C-28); 22,23 (C-29); 23,80 (C-30).

Ensayo antiviral

Los extractos 1mg/mL se disolvieron en 200 μ L de Dimetilsulfoxido (Rodríguez-Ortega *et al.*, 2006); el ensayo de placa se realizó en las concentraciones (50-1,55 μ g/mL) no citotóxicas sobre células Vero, determinado mediante el ensayo del MTT (bromuro de tetrazolio-3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil, Sigma Chemical Company) (Paredes *et al.*, 2003).

El efecto de los extractos sobre la replicación del virus de la Fiebre amarilla se llevó a cabo utilizando un ensayo de inhibición de placa (Paredes *et al.*, 2003). Se sembraron $2,5 \times 10^5$ células/pozo de células Vero en placas de 24 pozos, cuando se formó la monocapa de células se agregaron 50 μ L de virus (40 unidades formadoras de placas PFU/mL) y 50 μ L de los extractos; dos controles fueron utilizados, el control celular (células con medio) y control viral (células con virus), ambos en ausencia de extractos. Después de 2 horas de incubación a 37 °C, CO₂ al 5%,

se agregó 500 µL/pozo de gel de superposición (MEM 50% 2X, FBS 1%, glutamina 1%, 40 µg/ml gentamicina 1%, NaHCO₃ 7,5%, 3% de carboxilcelulosa). Después de 4 días las células se tiñeron por 20 minutos con azul negro de naftol (0,05 gr azul negro de naftol, 0,68 gr acetato de sodio, 3 ml de ácido acético (99,8%) y 47 ml de agua estéril). Las placas se lavaron tres veces con agua y las placas líticas se contaron visualmente. Se calculó el porcentaje de inhibición de la replicación viral con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Reducción de placas} = (A-B)/A \times 100$$

Donde:

A = Número de placas promedio del control de infección

B = Número de placas promedio de células tratadas.

Se graficó % de reducción de placas vs concentración utilizada

Análisis Estadístico

La DE₅₀ se determinó utilizando el programa ED₅₀ plus v1.0. El análisis estadístico se realizó por diferencia de proporciones con un Epi table de Epi Info 6 versión 6.04.

RESULTADOS

La estación climática es importante para la recolección de *T. officinale* en su uso medicinal y varía según la parte de la planta que se requiera, las hojas se recolectan en primavera, las raíces a finales de verano o comienzo del otoño, esta práctica en el uso de la planta nos sugiere que existe un cambio fitoquímico asociado al periodo de crecimiento y la estación climática (Sterwart-Wade et al., 2002).

En este contexto nos planteamos estudiar el efecto sobre la replicación de flavivirus de extractos de hojas de diente de león con diferentes tiempos de recolección (2 y 5 meses). Se identificaron un total de 12 compuestos de las hojas

recolectadas a diferentes tiempos de crecimiento (Figura N° 1). Sus estructuras fueron determinadas mediante técnicas espectroscópicas, especialmente RMN y por comparación con estos datos con los de la literatura. Los compuestos identificados en los extractos de hexano y cloroformo se muestran en la tabla 1, donde se puede observar que las hojas de 2 meses de crecimiento del extracto cloroformo se identificaron dos compuestos, mientras que en las hojas de 5 meses se identificaron seis (6) compuestos, distintos a los obtenidos en las hojas de 2 meses. Similares resultados se obtuvieron con el extracto hexánico, donde el extracto de cinco meses de crecimiento se identificaron 5 compuestos de los cuales cuatro son distintos a los identificados en el extracto de dos meses (Tabla N° 1). Estos resultados demuestran que la complejidad fitoquímica de las hojas recolectadas a los 5 meses es mucho mayor que la de dos meses; las estructuras de los compuestos identificados en cada extracto se muestran en la Figura N° 1.

Para evaluar la actividad antiviral sobre el virus de la fiebre amarilla cepa vacunal 17D se utilizaron solo los rangos de concentraciones donde el extracto era inocuo a las células Vero. En el ensayo de reducción de placas, los extractos H5M, H2M y C2M inhibieron la replicación del virus de fiebre amarilla entre un 20 - 30% a la mayor concentración utilizada y solo el extracto clorofórmico de hojas de 5 meses inhibió la replicación viral de manera dosis dependiente, alcanzando 100% de inhibición a la concentración más alta utilizada, con un DE₅₀: 10,2 ± 8,7 µg/mL, mientras que el DE₅₀ de C2M es de 93,5 ± 23,5 µg/mL, lo que hace al extracto clorofórmico de 5 meses aproximadamente 8 veces más efectivo que el C2M (Figura N° 2). La diferencia entre los extractos es estadísticamente significativa a las concentraciones más altas utilizadas 50 y 25 µg/mL con probabilidades ($p = 0,0124$; $p = 0,0037$) respectivamente, mientras que en el rango de concentraciones de 12,5 - 1,5 la diferencia no es significativa ($p = 0,15 - p = 0,99$).

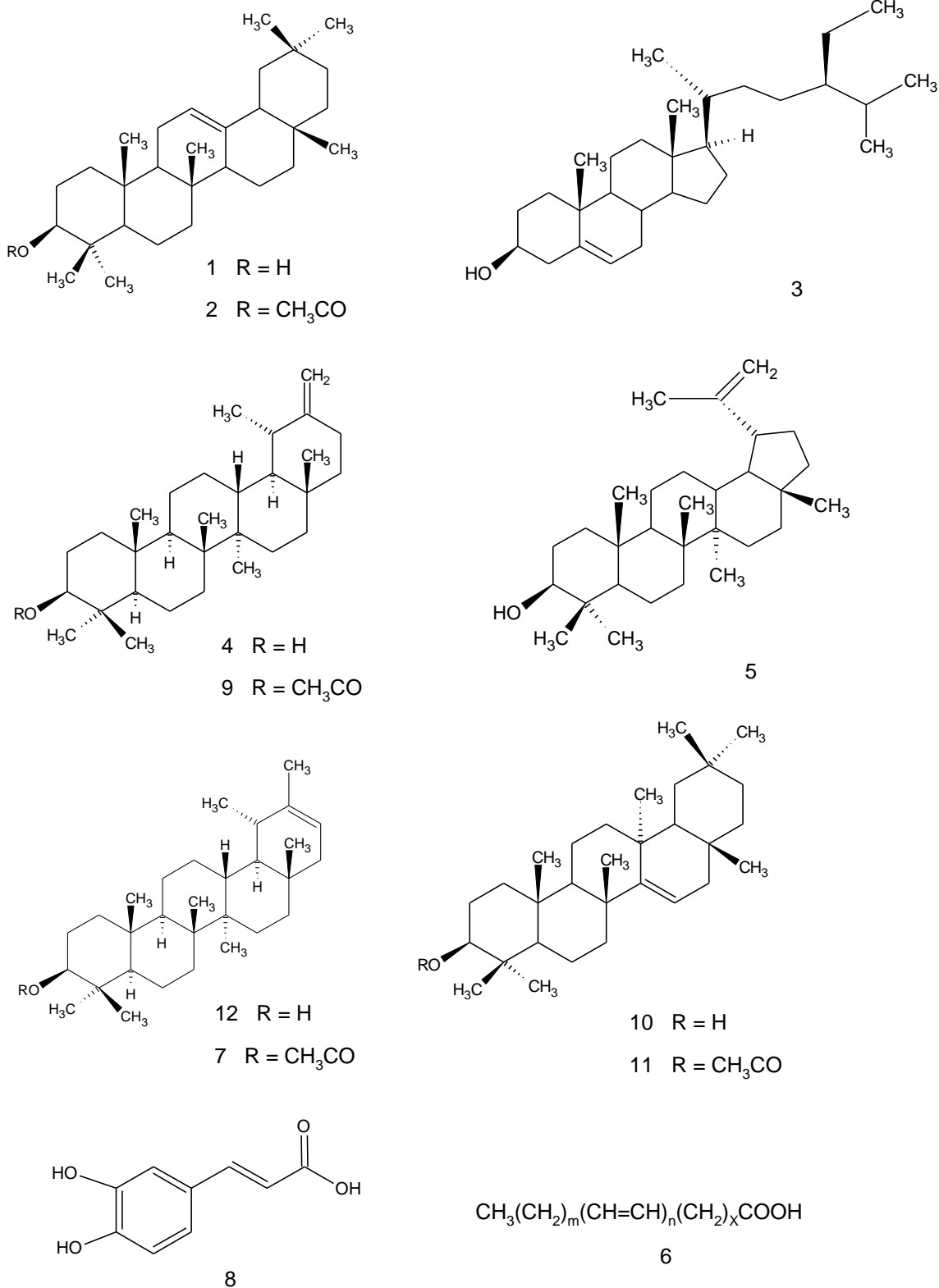


Figura N° 1
Estructuras de los compuestos identificados en los extractos de *T. officinale*

Los compuestos presentes en el extracto C2M (sin actividad antiviral) son β -amirina (1) y β -sitosterol (3), mientras que en el extracto C5M (alta actividad antiviral), los compuestos presentes son Ψ -

taraxasterilo (7), ácido cafeíco (8), acetato de taraxasterilo (9), taraxerol (10), acetato de taraxerilo (11), Ψ -taraxasterol (12).

Tabla N° 1
Compuestos identificados en los extractos de hojas de *T.officinale*

Extractos			
H2M	H5M	C2M	C5M
β -Amirina(1)	β -Sitosterol (3)	β -Amirina (1)	Acetato de ψ - Taraxasterilo (7)
Acetato de β -Amirina (2)	Taraxasterol (4)	β -Sitosterol (3)	Ácido cafeíco (8)
	Lupeol (5)		Acetato de Taraxasterilo (9)
	Ácido graso insaturado (6)		Taraxerol (10)
	Acetato de β -Amirina (2)		Acetato de Taraxerilo (11)
			Ψ -Taraxasterol (12)

H2M: extracto hexano hojas de 2 meses de crecimiento, H5M: extracto hexano de hojas 5 meses de crecimiento, C2M: extracto cloroformo de hojas 2 meses de crecimiento, C5M: extracto cloroformo de 5 meses

DISCUSIÓN

Taraxacum officinale como planta etnomedicinal ha sido utilizadas para el tratamiento contra un amplio espectro de enfermedades (Schütz *et al.*, 2006), sin embargo el número de reportes de actividad antiviral de esta planta son muy escasos (Han *et al.*, 2011, He *et al.*, 2011), siendo éste el primer reporte de la inhibición de la replicación de un virus perteneciente al género flavivirus de la familia Flaviviridae.

Los resultados obtenidos con el ensayo de placa muestran que el C5M es el único extracto que inhibió la replicación del virus de fiebre amarilla 17D. Al determinar la naturaleza química de los compuestos presente en los distintos extractos, observamos que éstos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y algunos presentan actividad biológica conocida; como la β -amirina (1) que está presente sólo en las hojas de 2 meses de crecimiento, cuyos extractos (H2M, C2M) no mostraron actividad antiviral, sin embargo se ha reportado la actividad

antimicótica de β -amirina (1) aislada de las hojas *Melia azedarach* (Jabeen *et al.*, 2011) así como de derivados sintéticos de este triterpeno pentacíclico (Johann *et al.*, 2007). Estos reportes junto con nuestros resultados evidencian la importancia del tiempo de recolección de la planta asociado a su actividad biológica, así para el uso de la planta como antimicótico deberían utilizarse hojas con dos meses de crecimiento. El saber el tiempo de crecimiento de la planta podría potenciar su actividad biológica.

De los compuestos presentes en el extracto con actividad antiviral; el ácido cafeíco (8), es el único con actividad antiviral reportada, inhibe la replicación del virus del virus herpes simples-1 *in vitro* (Ikeda *et al.*, 2011) y el ester feniletil del ácido cafeíco, bloquea la integración del ADN viral a la célula infectada con HIV (Fesen *et al.*, 1993). El ácido cafeíco (8) también inhibe la replicación del ADN del virus de la Hepatitis B, y la producción de su antígeno, tanto *in vitro*, como en el modelo animal utilizado (Wang *et al.*, 2009).

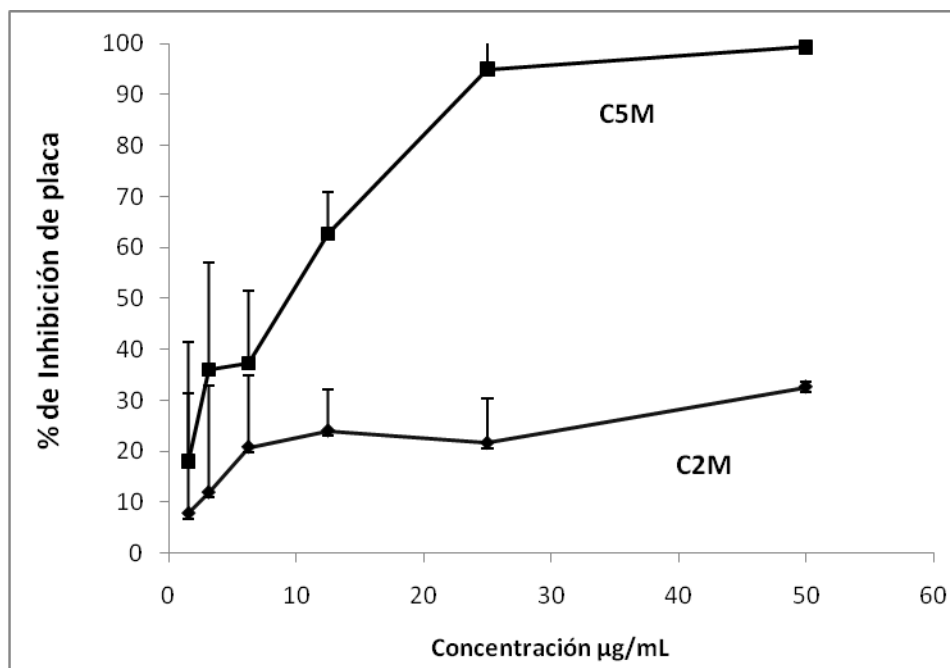


Figura N° 2

Porcentaje de reducción de placas

Monocapa de células Vero fueron infectadas con virus de la fiebre amarilla cepa 17D después de una hora de infección se agregaron los extractos cloroformo de ♦ 2 meses y ■ 5 meses. A los 5 días incubación se contaron las placas y se determinó el % de inhibición como esta descrito en materiales y métodos. Estos datos son el resultado de tres experimentos independientes.

Taraxasterol (10) es uno de los compuestos más estudiados, presente en árnica, chicori y diente de león, inhibe la peroxidación de fosfatidilcolina (Gallová *et al.*, 2005), además presenta actividad hipolipidémica (Ung-Kyn *et al.*, 2010), estas actividades reportadas para este compuesto pueden ser importante para explicar la inhibición de la replicación viral obtenida, ya que los virus pertenecientes al género flavivirus dependen del metabolismo de lípidos para su replicación (Zaitseva *et al.*, 2010, Syed *et al.*, 2010); como es el caso de la naringenina que es hipolipidémico e inhibe la replicación del virus de la hepatitis C (Nahmias *et al.*, 2008). Estos resultados incentivan a la realización de estudios no sólo para determinar cuál de los compuestos identificados es el responsable de la actividad antiviral, sino que estimula las investigaciones que conduzcan a determinar a qué paso de la replicación viral ocurre esta inhibición.

CONCLUSIÓN

En conclusión el extracto cloroformico de hojas de 5 meses muestra una alta inhibición de la replicación del virus de la fiebre amarilla, cepa vacunal 17D sobre células Vero. Basado en los bibliográficos de los seis

compuestos identificados en este extracto, taraxasterol y ácido cafeico podrían ser los responsable de esta actividad, sin descartar los otros componentes del extracto. En la continuidad de esta investigación es necesario determinar si es un compuesto el responsable de la actividad inhibitoria *in vitro*, o si esta es debida a un sinergismo de dos o más compuestos presentes.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó bajo el auspicio del PG 09-006589-2006 del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela. Los autores agradecen al Dr. Rafael Borges por su apoyo en el estudio estadístico de los resultados.

REFERENCIAS

Akhtar MS, Khan QM, Kaliq T. 1985. Effects of *Portula caoleracae* (kulfa) and *Taraxacum officinale* (Dhudhal) in normoglycaemic and alloxan-treated hyperglycaemic rabbits. *J Pak Med* 35: 207 - 210.

- Albuquerque MR, Jane R, Andreza M, Pires L, Deusdênia O, Pessoa L, Silveira ER. 2006. Terpenoids, flavonoids and other constituents of *Eupatorium betonicaeforme* (Asteraceae). **J Braz Chem Soc** 17: 68 - 72.
- Chakurski I, Matev M, Koichev A, Angelova I, Stefanov G. 1988. Treatment of chronic colitis with an herbal combination of *Taraxacum officinale*, *Hipericum perforatum* *Melissa officinale*, *Calundula officinalis* and *Foeniculum vulgare*. **Vutr Boles** 20: 51 - 54.
- Deng YR, Song AX, Wang HQ 2004. Chemical Components of *Seriphidium santolium* Poljak. **J Chinese Chem Soc** 51: 629 - 636
- Dibi A, Bitam F. 2012. **Phytochemical study of the plant *Launaea arborescens*. International Conference on Chemical, Environmental and Biological Sciences (ICCEBS) 2012 (Penang, Malaysia 11-12 February).**
- Fesen MR, Kohn KW, Leteurtre F, Pommier Y. 1993. Inhibitors of human immunodeficiency virus integrase. **Proc Natl Acad Sci** 90: 2399 - 2403.
- Gallová J, Balgaví P, Uhriková D, Grancái D, Mucáji P, Funary SS. 2005. The effect of triterpeno taraxasterol on the phase behavior of Dipalmitoylphosphatidylcholine. **Acta Fac Pharm Univ Comen** 52: 108 - 115.
- Han H, He W, Wang W, Gao B. 2011. Inhibitory effect of aqueous Dandelion extract on HIV replication and reverse transcriptase activity. **BMC Complement Altern Med** 11: 112 - 122.
- He W, Ham H, Wang H, Gao B. 2011. Anti-influenza virus effect of aqueous Dandelion extract. **J Virol** 8: 538 - 549.
- Ikeda K, Tsujimoto K, Uozaki M, Nishide M, Suzuki Y, Koyama AH, Yamasaki H. 2011. Inhibition of multiplication of herpes simplex virus by caffeic acid. **Int J Mol Med** 28: 595 - 598.
- Jabeen K, Javaid A, Ahmad E, Athar M. 2011. Antifungal compounds from *Melia azedarach* leaves for management of *Ascochy tarabiei*, the cause of chickpea blight. **Nat Prod Res** 25: 264 - 276.
- Jeon HJ, Kang HJ, Jung HJ, Kang YS, Lim CJ, Kim YM. 2008. Anti-inflammatory activity of *Taraxacum officinale*. **J Ethnopharmacol** 115: 82 - 88.
- Jin WY, Xing Fu Cai X, Na M, Lee J, Bae K. 2007. Triterpenoids and Diarylheptanoids from *Alnus shirsuta* Inhibit HIF-1 in AGS Cells. **Arch Pharm Res** 30: 412 - 418.
- Johann S, Soldi C, Lyon JP, Pizzolatti MG, Resende MA. 2007. Antifungal activity of the amyrrin derivatives and in vitro inhibition of *Candida albicans* adhesion to human epithelial cells. **Lett Appl Microbiol** 45: 148 - 153.
- Kensuke B, Shigeru A, Denichi M. 1981. Antitumor activity of hot water extract of Dandelion, *Taraxacum officinale*: Correlation between antitumor activity and timing of administration. **J Ethnopharmacol** 101: 538 - 543.
- Lozek O, Vendeli M, Burdovay M. 2007. Antioxidant capacity changes and phenolic profile of *Echinacea purpurea*, Nettle (*Urticadioica* L.) and Dandelion (*Taraxacum officinale*) after application of polyamine and phenolic biosynthesis regulators. **J Am Chem Soc** 55: 5689 - 5696.
- Mahato S, Kundu A. 1994. Review article 98 ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids a compilation and some salient features. **Phytochemistry** 27: 1515 - 1575.
- Nahmias Y, Goodwasser J, Casali M, van Poll D, Wakita T, Chung RT, Yasmush ML. 2008. Apolipoprotein B-dependent hepatitis C secretion is inhibited by a grapefruit flavonoid naringenin. **Hepatology** 47: 1437 - 1445.
- Neyts J, Meerbach A, Mckenna P, De Clercq E. 1996. Use of yellow fever vaccine strain 17D for the study of strategies for the treatment of yellow fever virus infections. **Antiviral Res** 30: 125 - 132.
- Onal S, Timar S, Okutucu B, Zihnioglu F. 2005. Inhibition of alpha-glucosidase by aqueous extracts of some potent antidiabetic medicinal herbs. **Prep Biochem Biotechnol** 35: 29 - 36.
- Paredes A, Alzuru M, Mendéz J, Rodríguez-Ortega M. 2003. Anti-Sindbis activity of flavanones hesperetin and naringenin. **Biol Pharm Bull** 26: 108 - 109.
- Perera R, Khaliq M, and Kuhn R. 2008. Closing the door on flaviviruses: Entry as a target for antiviral drug design. **Antiviral Res** 80: 11 - 22.
- Reynolds WF, Sawyer JF, Enriquez RG, Escobar L, Chavez M, Shoolery JN. 1985. Total assignment of the ¹³C spectrum of taraxasteryl acetate by C-C connectivity experiments and determination of the stereochemistry of

- taraxasterol by X-ray diffraction. **Can J Chem** 63: 1048 - 1054.
- Rodríguez-Ortega M, Luna D, Canónico Y, Carvajal Z, Méndez J, Briceño L. 2006. Extracts from *Pera glabrata* (Schott) and *Pera distichophylla* with anti-parasite and antiviral activity. **Ciencia** 14: 492 - 497.
- Schütz K, Carle R, Schieber A. 2006. Taraxacum a review on its phytochemical and pharmacological profile. **J Ethnopharmacol** 107: 313 - 323.
- Sterwart-Wade S, Nemen S, Collins L, Bland G. 2002. The biology of Canadian weeds 117, *Taraxacum officinale* G.H. Weber ex Wiggers. **Plant Sci** 82: 825 - 844.
- Syed GH, Amako Y, Siddigui A. 2010. Hepatitis C hijacks host lipid metabolism. **Trends Endocrinol Metab** 21: 33 - 40.
- Takasaki M, Konoshima T, Tokuda H, Masuda K, Arai Y, 1999. Anti-carcinogenic activity of Taraxacum plant I. **Biol Pharm Bull** 22: 602 - 605.
- Vanden B. DA, Vlietinck AJ, Vanhoof L. 1986. Plant products as potential antiviral agents. **Bull Inst Pasteur** 84: 101 - 147.
- Wang GF, Ren YD, Liu QF, Zhang RJ, Zhu FH, He PL, Tang W, Tao PZ, Li C, Zhao WM, Zuo JP. 2009. Anti-Hepatitis B activity of chlorogenic acid, quinic acid and caffeic acid in vivo and in vitro. **Antiviral Res** 83: 186 - 190.
- Westerman L, Roddick G. 1981. Annual variations in sterol levels in leaves of *Taraxacum officinale* Weber. **Plant Physiol** 68: 872 - 875.
- Ung-kyn C, Ok-Hwan L, Joohyuk Y, Chang-Won C, Young KR, Seong-II L, Young-Chang K. 2010. Hypolipidemic and antioxidant effects of Dandelion (*Taraxacum officinale*) root and leaf on cholesterol-fed rabbits. **Int J Mol Sci** 11: 67 - 78.
- Zaitseva E, Yang ST, Melikov K, Pourmal S, Chernomordik L. 2010. Dengue virus ensures its fusion in late endosome using compartment-specific lipids. **Plos Pathog** 6: e-1001131.