

**de la Fuente Conti, Agustina
Micaela**

Martín, Delfina

Odelli Sosa, Milena Lourdes

**Estudio de la actividad
antiviral sobre Zika virus de
extractos de *Zanthoxylum*
coco y compuestos
obtenidos de esta especie**

**Tesis para la obtención del título de
grado de Farmacéutica**

Directora: Martínez, Florencia

Documento disponible para su consulta y descarga en Biblioteca Digital - Producción Académica, repositorio institucional de la Universidad Católica de Córdoba, gestionado por el Sistema de Bibliotecas de la UCC.



[Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Sin
Obra Derivada 4.0 Internacional.](#)

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CÓRDOBA

Facultad de Ciencias de la Salud



“Estudio de la actividad antiviral sobre Zika virus de extractos de *Zanthoxylum coco* y compuestos obtenidos de esta especie.”

Trabajo Final de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Católica de Córdoba
conforme a los requisitos para obtener el título de Farmacia.

por

de la Fuente Conti, Agustina Micaela;

Martin, Delfina;

Odelli Sosa, Milena Lourdes

Córdoba, Argentina

2024

Director

Dra. Florencia Martinez

Centro de Investigación y Desarrollo en Inmunología y Enfermedades Infecciosas (CIDIE)
UCC-CONICET

Co-director

Dra. Mariana Belén Joray

Centro de Investigación y Desarrollo en Inmunología y Enfermedades Infecciosas (CIDIE)
UCC-CONICET

Comisión Evaluadora:

Dr. Zaragoza, Mariano Hugo

Dra. Carpinella, María Cecilia



Florencia Martinez



Mariana Belén Joray

Agradecemos...

... a **nuestras familias** por estar siempre presentes, brindándonos su amor, cariño, sus consejos, y esa fuerza o “empujoncito” que necesitábamos cuando las cosas no salían como esperábamos. Ya que, sin su apoyo este logro no hubiera sido posible.

... a **Florencia y Belén**, directora y co directora, por guiarnos durante todo el proceso, por el tiempo que nos dedicaron y la confianza que nos dieron. Y, también, por permitirnos vivir la experiencia de trabajar en el campo de la investigación aplicada.

... a todos los **profesores y profesoras** de la **Universidad Católica de Córdoba** que nos acompañaron durante todo el camino y por la formación académica brindada.

... a nuestros **compañeros, compañeras y amistades** que estuvieron en los pasillos, en los mates compartidos, en los días eternos de cursada, en las instancias de examen y en ese abrazo después de cada logro, que con su compañía y palabras de aliento hicieron de estos años algo más que una carrera.

*“Camina hacia el futuro, abriendo nuevas puertas y probando cosas nuevas,
Sé curioso... porque nuestra curiosidad siempre
nos conduce por nuevos caminos.”*

Walt Disney

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	vi
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	x
RESUMEN	xi
PALABRAS CLAVE	xi
SUMMARY	xii
KEY WORDS	xii
1. Introducción	13
1.1 Zika Virus	13
1.2 Productos naturales: una fuente terapéutica emergente	14
1.3 <i>Zanthoxylum coco</i>	15
1.4 Actividad antiviral del género <i>Zanthoxylum coco</i>	16
1.5 β -fagarina	16
1.6 Alcances	17
2. Objetivos	17
2.1 Objetivo general	17
2.2 Objetivos específicos	18
3. Materiales y Métodos	18
3.1 Muestra	18
3.2 Reactivos y solventes	18
3.3 Obtención del extracto	18
3.4 Extracción de compuestos	18
3.4.1 Obtención de la fracción alcaloidal	19
3.4.2 Seguimiento de la purificación	19
3.4.3 Obtención de la β -fagarina a partir de la fracción alcaloidal	20
3.5 Cultivos celulares y medios de cultivo	20
3.5.1 Líneas celulares	20
3.5.2 Medios de cultivo	20
3.5.3 Cepa de virus ensayado	21
3.6 Ensayo de citotoxicidad	21
3.6.1 Evaluación de la alteración de morfología celular (AMC)	21
3.6.2 Evaluación de la viabilidad celular por reducción de MTT	22

3.7 Evaluación de reducción de unidades formadoras de placa	23
3.8 Ensayo de actividad antiviral	24
4. Resultados	24
4.1 Obtención de los compuestos	24
4.1.1 Purificación	24
4.2 Determinación de la pureza por HPLC	26
4.3 Evaluación de la actividad antiviral	27
4.4 Citotoxicidad en células Vero	28
4.5 Actividad antiviral de la β -fagarina	31
4.6 Citotoxicidad en células mononucleares de sangre periférica	32
5. Discusión	33
6. Conclusión	34
BIBLIOGRAFÍA	34

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

%I: porcentaje de inhibición.

AMC: alteración de la morfología celular.

BF: β -fagarina.

CC: control celular.

CC₂₀: concentración citotóxica 20.

CC₅₀: concentración citotóxica 50.

CE₅₀: concentración efectiva 50.

CH₂Cl₂: diclorometano

CSuT: concentración subtóxica.

c.s.p: cantidad suficiente para.

CV: control virus.

DMEM: Medio Eagle modificado de Dulbecco.

DMSO: dimetilsulfóxido.

DOC: densidad óptica de células controles sin tratamiento.

DOT: densidad óptica de células tratadas.

FA: fracción acuosa.

FAlc: fracción alcaloidal.

FE: fase estacionaria.

FM: fase móvil.

FO: fracción orgánica.

HCl: ácido clorhídrico.

HPLC: del inglés *high pressure liquid chromatography*.

IS: índice de selectividad.

MC: medio de crecimiento.

MCNC: máxima concentración no citotóxica.

MM: medio de mantenimiento.

MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazoil) 2,5-difeniltetrazólico.

PBMC: en inglés del término *células mononucleares de sangre periférica*.

PBS: buffer fosfato salino.

SFB: suero fetal bovino.

TLC: del inglés *thin liquid chromatography*.

UFP: unidades formadoras de placas.

ZIKV: Zika virus.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura química de la β -fagarina.

Figura 2: Esquema de extracción de la fracción alcaloidal.

Figura 3: Efectos observados sobre monocapas de células Vero post tinción con cristal violeta.

Figura 4: Imágenes de TLC reveladas bajo lámpara UV a 254 nm y 365 nm.

Figura 5: Imagen de TLC con reactivo Dragendorff.

Figura 6: Imagen de TLC con patrón de β -fagarina.

Figura 7: Perfil por HPLC del compuesto β -fagarina.

Figura 8: Perfil por HPLC del extracto etanólico de *Z.coco*.

Figura 9: Representación gráfica de placas de lisis. CV: control de virus. CM: control de medio. Los números corresponden a las concentraciones en μM .

Figura 10: Imágenes de células Vero tratadas con β -fagarina, donde se observan las alteraciones morfológicas celulares (AMC) a los 3 días de tratamiento. Los números corresponden a la concentración en μM .

Figura 11: Curva de viabilidad celular (%) vs. concentración del extracto etanólico de *Zanthoxylum coco* en células Vero. Cada resultado se expresa como $\bar{x} \pm \text{SD}$ de tres réplicas. Los resultados se ajustaron a una curva dosis-respuesta sigmoidea, $R^2 > 0,9$.

Figura 12: Curva de viabilidad celular (%) vs. concentración de β -fagarina. Cada resultado se expresa como $\bar{x} \pm \text{SD}$ de tres réplicas. Los resultados se ajustaron a una curva dosis-respuesta sigmoidea, $R^2 > 0,9$.

Figura 13: Actividad antiviral sobre ZIKV de la β -fagarina por el método de reducción de UFP.

Figura 14: Curva de viabilidad celular (%) vs. concentración del extracto etanólico de *Zanthoxylum coco* en células mononucleares de sangre periférica. Cada resultado se expresa como $\bar{x} \pm \text{SD}$ de tres réplicas. Los resultados se ajustaron a una curva dosis-respuesta sigmoidea, $R^2 > 0,9$.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Valores de citotoxicidad para las muestras ensayadas sobre células Vero, obtenidos por análisis de regresión mediante el método de reducción de MTT.

RESUMEN

En el año 2013 se detectó la aparición de virus Zika (ZIKV, perteneciente al género *Flavivirus*) en América Latina, región donde encontró condiciones favorables para expandirse debido a la susceptibilidad de la población. Desde entonces, la infección se ha relacionado con complicaciones neurológicas graves, sobre todo en bebés nacidos de madres que contrajeron la infección durante el embarazo. La ausencia de una vacuna preventiva y de tratamientos antivirales específicos convierten a esta infección en una gran amenaza a la salud pública, destacando la urgencia de desarrollar una terapia específica. El objetivo de este trabajo fue identificar los principios activos responsables de la actividad antiviral que denotó el extracto etanólico de *Zanthoxylum coco* sobre el virus Zika en estudios *in vitro*. Para ello, a partir del extracto etanólico de esta especie vegetal, se obtuvieron tres fracciones: acuosa, orgánica reducida en alcaloides y alcaloidal, confirmándose la presencia de alcaloides a través de cromatografía en capa delgada (TLC) con el reactivo de Dragendorff. Los ensayos de reducción de Unidades Formadoras de Placas (UFP) revelaron que solo la fracción alcaloidal mostró actividad antiviral significativa incluso a la concentración de 20 µg/mL, mientras que las fracciones acuosa y orgánica reducida en alcaloides no presentaron efecto inhibitorio de este virus. De la fracción alcaloidal se aisló mediante cristalización el compuesto β -fagarina. Se evaluó su citotoxicidad en las células hospedadoras (Vero) y en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y se evaluó su actividad antiviral sobre ZIKV por reducción de UFP. Su concentración citotóxica en células Vero fue de 40,9 µM y mostró efecto antiviral dosis dependiente sobre ZIKV a concentraciones no citotóxicas para estas células, con una concentración efectiva media 50 (CE₅₀) de 8,7 µM y un índice de selectividad de 4,7, lo que nos indica una mayor selectividad por inhibir el virus que por producir un daño en la célula hospedadora. Por último, no resultó citotóxico a la máxima contracción ensayada de 100 µM en células PBMC, sugiriendo una baja toxicidad sobre células humanas. La identificación de este compuesto bioactivo en *Zanthoxylum coco* abre nuevas perspectivas para el desarrollo de tratamientos antivirales basados en productos naturales

Palabras clave: *Zanthoxylum coco*; β -fagarina; Alcaloides; Efecto antiviral; Citotoxicidad.

SUMMARY

In 2013, the Zika virus (ZIKV, belonging to the *Flaviviridae* family) was detected in Latin America, a region that provided favorable conditions for its spread due to the population's susceptibility. Since then, ZIKV infection has been associated with severe neurological complications, particularly in infants born to mothers infected during pregnancy. The lack of a preventive vaccine and specific antiviral treatments makes this infection a significant public health threat, emphasizing the urgent need to develop targeted therapies. This study aimed to identify the active compounds responsible for the antiviral activity observed in the ethanolic extract of *Zanthoxylum coco* against ZIKV in in vitro assays. To achieve this, three fractions were obtained: an aqueous fraction, an alkaloid-reduced organic fraction, and an alkaloidal fraction. The presence of alkaloids was confirmed by thin-layer chromatography (TLC) using Dragendorff's reagent. Plaque reduction assays showed that only the alkaloidal fraction exhibited significant antiviral activity even at a concentration of 20 µg/mL whereas the aqueous and organic fractions had no inhibitory effect on the virus. The alkaloidal compound **β-fagarine** was isolated by crystallization from this active fraction. Its cytotoxicity was evaluated in both Vero cells and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), and its antiviral activity against ZIKV was assessed through plaque reduction assays. In Vero cells, its cytotoxic concentration was 40.9 µM, and it exhibited a dose-dependent antiviral effect at non-cytotoxic concentrations, with a 50% effective concentration (EC₅₀) of 8.7 µM and a selectivity index (SI) of 4.7, indicating greater specificity for viral inhibition than for host cell toxicity. Furthermore, it showed no cytotoxicity in PBMCs at the maximum assayed concentration of 100 µM, indicating low toxicity to human cells. The identification of this bioactive compound in *Zanthoxylum coco* opens promising avenues for the development of antiviral therapies based on natural products.

Key words: *Zanthoxylum coco*; **β-fagarin**; Alkaloids: Antiviral effect; Cytotoxicity.

1. Introducción

1.1 Zika virus

El virus Zika (ZIKV) es un virus ARN monocatenario de sentido positivo, perteneciente a la familia Flaviviridae, y al género *Flavivirus* (Wang *et al.*, 2017), es transmitido por artrópodos, arbovirus (*arthropod-borne virus* en inglés), junto con los virus Dengue y de la Fiebre amarilla, entre otros (Nhan & Musso, 2015). La principal forma de transmisión es la vectorial, es decir, por la picadura de mosquitos infectados del género *Aedes* spp. (Organización Mundial de la Salud, OMS, 2022).

Este virus, fue descubierto en Uganda en el año 1947. Durante 60 años, las infecciones por ZIKV se asociaban con enfermedades leves y esporádicas en África y Asia. Hasta que en el año 2007, adquirió relevancia, ya que provocó un gran brote de casos sintomáticos en Oceanía (Messina *et al.*, 2016). Desde entonces, ha causado brotes en varias partes del mundo. A principios de 2014 se presentaron los primeros casos en América del sur, específicamente en Brasil (Zanluca *et al.*, 2015), sin embargo, se estima que el virus fue introducido al continente entre mayo y diciembre del 2013 (Rodrigues Faria *et al.*, 2016). En Argentina, se detectaron brotes de ZIKV durante los veranos del 2016 y 2017 (Boletín Integrado de Vigilancia. Ministerio de Salud de la Nación).

La infección por este virus suele ser asintomática o presentar síntomas leves como fiebre, dolor articular y muscular, fatiga y erupción cutánea (Fong & Chu, 2022). Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS), una de cada cuatro personas infectadas desarrolla síntomas leves que pueden durar de 2 a 7 días (OPS, 2016). Estos síntomas no son específicos de una infección por ZIKV, por lo que pueden ser confundidos con la infección por otro arbovirus (Musso & Glubler, 2016). Sin embargo, desde su emergencia en América Latina en el año 2013, se han reportado casos graves en adultos y niños, acompañado de un incremento de complicaciones neurológicas, entre ellas el síndrome de Guillain-Barré (Lee *et al.*, 2019). Además, se reportaron casos de transmisión vertical (madre-feto) de ZIKV, provocando abortos espontáneos, muerte intrauterina, partos prematuros, y restricciones en el crecimiento fetal, que se pueden manifestar como microcefalia, anomalías oculares, ventriculomegalia y otras malformaciones cerebrales (Oliveira *et al.*, 2020). También se han reportado la transmisión del ZIKV a través de relaciones sexuales (Fong & Chu, 2022).

Dada la gravedad de esta infección a partir de su introducción en América, la OMS declaró la infección por ZIKV como una emergencia de salud pública de importancia

internacional, el 1 de febrero de 2016 (OMS, 2016; Fong & Chu, 2022). Hasta el momento los tratamientos se dirigen principalmente a los síntomas de la infección: paracetamol para la fiebre y algún antihistamínico en el caso que haya sarpullido pruriginoso (Musso & Glubler, 2016), sin contar tampoco con una vacuna para su prevención. El desarrollo de tratamientos antivirales específicos contra ZIKV, sería una gran estrategia útil para combatir esta infección, evitar las manifestaciones más graves y disminuir su transmisión.

1.2 Productos naturales: una fuente terapéutica emergente

Existen diversas causas para la falta de desarrollo de nuevos fármacos antivirales. Entre ellas, la dificultad de diseñar antivirales eficaces que ataquen enzimas virales o su replicación, sin resultar tóxicos para la célula hospedadora (Chattopadhyay *et al.*, 2009). Recientemente se han encontrado diversas investigaciones que se centran en la búsqueda de tratamientos innovadores para combatir infecciones virales, enfocándose en compuestos presentes en la naturaleza, especialmente en especies vegetales (Teixeira *et al.*, 2014). Se identificaron una gama de compuestos activos con potenciales efectos antivirales, dentro de los cuales se destacan los alcaloides, terpenos, flavonoides, cumarinas, lignanos, entre otros (Ponticelli *et al.*, 2023). Estos compuestos bioactivos demostraron una inhibición en la replicación viral, modulación inmunitaria y efectos antioxidantes (Pal & Lal, 2023).

La diversidad estructural de los compuestos naturales como resultado de una continua adaptación y evolución de los organismos dentro de los ecosistemas, aumenta la posibilidad de descubrir metabolitos secundarios con funciones aún no conocidas dentro del organismo, pero con estructuras químicas con la actividad biológica de interés (Martinez *et al.*, 2015). Si bien, muchos de los fármacos antivirales han sido descubiertos mediante fuentes sintéticas, originalmente se basaron en estructuras de un producto natural. Por lo tanto, extractos de plantas y sus metabolitos puros aislados son fuentes para tratar las infecciones virales actuales y muy útiles como moléculas líderes para futuros desafíos (Mohan *et al.*, 2020).

En Argentina, gracias a la variabilidad climática y gran extensión geográfica crecen una gran diversidad de plantas, lo que ofrece interesantes posibilidades de encontrar compuestos antivirales novedosos de origen natural (Visintini Jaime *et al.*, 2013). Sin embargo, la mayoría de la información a disposición es de plantas introducidas en el país (“caléndula”, “lavanda”, “romero”, “salvia”, entre otras) y generalmente se carece de

información exhaustiva (Alonso & Desmarchelier, 2005), especialmente para el caso de plantas autóctonas.

1.3 *Zanthoxylum coco*

El género *Zanthoxylum*, perteneciente a la familia Rutaceae, abarca especies que suelen crecer como árboles en bosques húmedos, generalmente a altitudes que no superan los 300 metros. A nivel mundial, es habitual encontrarlo asociado a formaciones forestales secundarias. Se puede encontrar en Asia, África y América. Y dentro del continente Americano, se extiende desde Argentina y Chile hasta Canadá (Macias *et al.*, 2007; Appelhans *et al.*, 2018).

Una de sus especies, *Zanthoxylum coco*, es autóctona de la provincia de Córdoba a la cual se le conoce vulgarmente como “coco”, “cochucho” o “coquito” que se encuentra ampliamente distribuida en Argentina, dentro de las Provincias de Jujuy, Tucumán, Salta, Catamarca, La Rioja, Córdoba y San Luis (Escalante, 1961). Es común en bosques en zonas de transición con el parque chaqueño y en filos de cerros y bordes de acequias de comunidades de fondo de valle (Juárez de Varela, 1994).

Investigaciones fitoquímicas realizadas en múltiples especies del género *Zanthoxylum* han evidenciado un contenido elevado de metabolitos secundarios entre los que se destacan alcaloides, terpenos, lignanos, esteroides, cumarinas y flavonoides. Estos compuestos se distribuyen a lo largo de toda la planta, aunque las mayores concentraciones se encuentran en corteza, raíces y hojas (Macias *et al.*, 2007). Los alcaloides constituyen la familia química más importante, ya que se encuentran presentes en casi la totalidad de las especies estudiadas del género *Zanthoxylum*; cerca del 90% de las publicaciones revisadas confirman la presencia de estos metabolitos en las distintas estructuras de la planta (Dieguez *et al.*, 2004).

Se observó que extractos procedentes de diversas especies *Zanthoxylum* fueron utilizados para combatir la fiebre, dolor de muela, disentería, diarrea, neumonía, reumatismo, tos, resfriados, bronquitis, asma y contra la mordedura de serpiente. Entre las actividades biológicas estudiadas se destacan la citotoxicidad, así como propiedades antifúngicas, antibacterianas, antitumorales y antiespasmódicas.

1.4 Actividad antiviral del género *Zanthoxylum*

Hay poca información disponible y escasos reportes de actividad antiviral de extractos del género *Zanthoxylum*. Extractos metanólicos de *Zanthoxylum piperitum* mostraron efecto antiviral sobre rinovirus y enterovirus humanos con concentraciones efectivas 50 (CE₅₀) de alrededor de 50 µg/mL (Choi *et al.*, 2016) y de flavonoides obtenidos de esta especie vegetal sobre influenza virus (Ha *et al.*, 2014). Algunos trabajos se enfocan en la fracción alcaloidal de especies de *Zanthoxylum*. Entre ellos, los alcaloides de *Zanthoxylum nitidum*: 5,6-dihidro-6-metoxinitidina, skimmianina (o β-fagarina) y 5-metoxidictamina demostraron efecto actividad *in vitro* sobre el virus de la hepatitis B a concentraciones de 200 µM (Yang & Chen, 2008). Por otro lado, la γ-fagarina, uno de los alcaloides aislados del género *Zanthoxylum* ha reportado actividad antiviral sobre el metapneumovirus humano a 200 µM (Li *et al.*, 2023). Sin embargo, hay escasos reportes de extractos de la especie *Zanthoxylum coco* con actividad antiviral.

1.5 β-fagarina

Dentro de la gran variedad de metabolitos secundarios de las plantas, se destacan los alcaloides de furoquinolina que presentan una amplia gama de efectos, lo que los convierte en candidatos potenciales para aplicaciones medicinales (Pęczek & Zewczyk, 2023). A raíz de trabajos sobre la biosíntesis de los alcaloides furoquinolínicos, se pudo demostrar que el anillo quinolínico se origina a partir de la condensación de una molécula de ácido antranílico con una de ácido acético, mientras que el anillo furánico deriva del ácido mevalónico (González *et al.*, 1971). La mayoría de estos compuestos y sus derivados presentan una gran variedad de actividades biológicas, entre las que se incluyen propiedades antitumorales, antiparasitarias, insecticidas, antituberculosas, antibacterianas y antifúngicas (Shang, *et al.*, 2022). Los alcaloides de fluoroquinolona también se han estudiado por su eventual actividad antiviral (Pęczek & Zewczyk, 2023).

Uno de los metabolitos secundarios de interés del *Zanthoxylum coco* es la β-fagarina (4,7,8-trimetoxi-furo(2,3-b) quinolina), también conocida como skimmianina. Este compuesto es un alcaloide furanoquinolínico que deriva de la combinación de ácido antranílico y malonato/acetato (The, 2023).

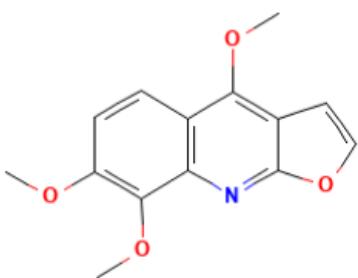


Figura 1. Estructura química de la β -fagarina. Imagen extraída de la página web PubChem.

Este compuesto se caracteriza por un anillo benzofurano fusionado a una lactona, lo que forma un núcleo cumarínico (2-H-1-benzopiran-2-ona) vinculado a un sistema de furano. Esta organización molecular, le otorga estabilidad y la capacidad de interactuar con diferentes enzimas y proteínas, lo que influye en sus propiedades biológicas, ya que facilita la interferencia en procesos celulares como la replicación viral.

Los reportes previos de actividad antiviral de β -fagarina, avalan la necesidad de investigar más a fondo su potencial como inhibidor de la replicación viral sobre otros modelos virales, como podría ser sobre ZIKV.

1.6 Alcances

Dado que hasta la fecha no existe un tratamiento antiviral específico para el ZIKV, y considerando la capacidad de *Zanthoxylum coco* para producir gran cantidad de metabolitos secundarios con posibles efectos antivirales, resulta de gran relevancia científica explorar el potencial de esta especie como una nueva fuente de agentes terapéuticos. Además, su distribución en Argentina y otros países sudamericanos refuerza su accesibilidad, lo que podría aportar nuevas soluciones, ofreciendo alternativas sostenibles y naturales en la lucha contra el ZIKV. El grupo de investigación en Productos Naturales del CIDIE (UCC-CONICET) cuenta con extractos de *Zanthoxylum coco*, que ya han mostrado poseer actividad inhibitoria sobre ZIKV, y este proyecto permitirá profundizar sobre los resultados previos, y obtener e identificar los principios activos responsables de este efecto.

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

El proyecto pretende identificar principios activos presentes en el extracto etanólico de *Zanthoxylum coco* con actividad antiviral sobre el virus Zika en estudios *in vitro*.

2.2 Objetivos Específicos

- 1) Preparar el extracto etanólico de *Zanthoxylum coco* y su fracción alcaloidal.
- 2) Evaluar la actividad anti-Zika virus del extracto y su fracción alcaloidal.
- 3) Purificar el o los principio/s activo/s presentes en *Zanthoxylum coco* y cuantificarlos por HPLC.
- 4) Evaluar la actividad antiviral del/de los alcaloides puros.
- 5) Evaluar la citotoxicidad del/de los compuestos sobre células Vero y células mononucleares de sangre periférica.

3. Materiales y Métodos

3.1 Muestra

Especie vegetal *Zanthoxylum coco*. *Zanthoxylum coco* Hook. F. & Arn. UCCOR 263.

La parte aérea de la especie vegetal fue recolectada en las Sierras de Córdoba, Argentina, con autorización del Ministerio de Agua, Ambiente y Servicios Públicos de la Provincia de Córdoba (CFP N°12289005371220) para la recolección y estudio.

3.2 Reactivos y solventes

Se utilizaron los siguientes reactivos: Dragendorff, violeta de genciana, Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich, USA) y cristal violeta (British drug houses, Inglaterra).

Se utilizaron los siguientes solventes: Dimetilsulfóxido (DMSO, grado HPLC, Sintorgan, Argentina). Formaldehído (Cicarelli, Argentina). Etanol (Alcohol etílico 96%, PORTA, Argentina). Diclorometano (Sintorgan). Ácido clorhídrico (HCl). Hidróxido de Amonio.

3.3 Obtención del extracto

Se dejó macerar 405,66 g de las hojas desecadas y trituradas de *Z. coco* en etanol en una proporción 2:1 durante 72 horas (hasta saturar el solvente), removiendo periódicamente durante el proceso. A continuación, la muestra se filtró y se eliminó el solvente utilizando un evaporador rotatorio (Buchi, Suiza) a presión y temperatura controlada.

3.4 Extracción de compuestos

Se disolvieron 6,121 g de extracto concentrado de *Z. coco* en 120 mL de diclorometano. A continuación, se realizaron cuatro extracciones sucesivas con 40 mL de una solución de HCl 5% m/v, en ampolla de decantación. Obteniéndose así:

- Fracción orgánica (FO) reducida en alcaloides.
- Fracción acuosa ácida

3.4.1 Obtención de la fracción alcaloidal

La fracción acuosa ácida resultante fue alcalinizada gota a gota con hidróxido de amonio hasta lograr un pH de 10, observándose la aparición de precipitado. A continuación, se realizó la extracción mediante ampolla de decantación con diclorometano (CH_2Cl_2), obteniéndose así:

- Fracción orgánica alcaloidal (FAlc).
- Fracción acuosa (FA).

Ambas fracciones se llevaron a sequedad por rotavapor.

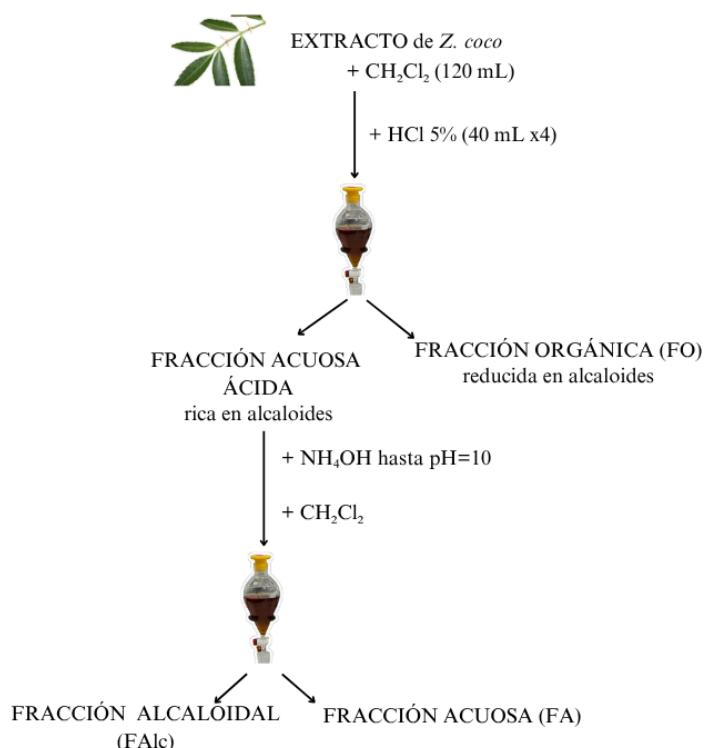


Figura 2. Esquema de extracción de la fracción alcaloidal.

3.4.2 Seguimiento de la purificación

Cromatografía en capa delgada: TLC

Se realizaron soluciones a una concentración de 1 mg/ml en tubos eppendorf de cada una de las fases obtenidas: acuosa, alcaloidal, orgánica y se incluyó también como referencia el extracto etanólico de partida. Las últimas tres se solubilizaron en DMSO, mientras que para la fase acuosa se utilizó agua destilada como disolvente.

Como fase estacionaria (FE) se usó sílica gel 6,6 x 4 cm y 10 mL de fase móvil (FM) para alcaloides, compuesta por 70:20:10; tolueno:acetato de etilo:dietilamina. La placa cromatográfica se visualizó bajo luz UV a 254 nm y 365 nm.

3.4.3 Obtención de β -fagarina a partir de la fracción alcaloidal

Se procedió a la purificación de la β -fagarina a partir de la fracción alcaloidal. Esto se realizó por cristalización. Para ello, la fracción se solubilizó utilizando etanol de grado HPLC, aplicando calor en baño maría para ayudar a la disolución. Luego se colocó en freezer a -20°C dando lugar a que la β -fagarina cristalice espontáneamente en frío. Se realizó una TLC utilizando una muestra patrón de β -fagarina como testigo, para controlar la purificación. Los cristales obtenidos fueron sometidos a una recristalización, y luego su pureza y rendimiento fueron determinados por HPLC.

3.5 Cultivos celulares y medios de cultivo

3.5.1 Líneas celulares

Se utilizaron células Vero E6 ATCC® C1008 (riñón de mono verde africano, *Cercopithecus aethiops*) y células mononucleares de sangre periférica (PBMC, de sus siglas en inglés). Las PBMC se obtuvieron de sangre heparinizada fresca de donantes voluntarios humanos y sanos (10 mL), los cuales dieron previamente su consentimiento informado para participar en el estudio que fue aprobado éticamente por la Junta de Ética de Investigación de la Universidad Católica de Córdoba. Las PBMC se separaron inmediatamente por centrifugación en gradiente de densidad usando Histopaque 1077. Todas las líneas celulares empleadas fueron mantenidas en estufa a 37 °C con atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

3.5.2 Medios de cultivo

Medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Gibco™, EE. UU.) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (v/v), L-glutamina (30 µg/mL) y gentamicina (50 µg/mL), se utilizó como medio de crecimiento (MC). La misma formulación con SFB al 2% se utilizó como medio de mantenimiento (MM).

3.5.3 Cepa de virus ensayado

Se utilizó la cepa ZIKV-INEVH116141, facilitada por el Dr. Bueno (IQUIBICEN-UBA-CONICET).

3.6 Ensayo de citotoxicidad

Para evaluar la actividad antiviral in vitro, es imprescindible establecer previamente las concentraciones de los compuestos que no generen citotoxicidad en las células hospedadoras. Esto asegura que cualquier efecto observado en las células sea causado exclusivamente por el virus y no por una acción citotóxica de los compuestos en estudio. La citotoxicidad se determinó evaluando las alteraciones en la morfología celular (AMC) y la viabilidad celular, en función de las concentraciones ensayadas.

Para ello, se utilizó un método colorimétrico basado en la reducción del bromuro de 3-(4,5 dimetil-2-tiazoil) 2,5-difeniltetrazólico (MTT) (Mosman, 1983). A partir de este ensayo, se estimaron la máxima concentración no citotóxica (MCNC), es decir, la concentración que mantiene el 90% de viabilidad, y la concentración citotóxica 50 (CC₅₀), que corresponde a la concentración que reduce al 50% la viabilidad celular (Liu *et al.*, 2009).

Para este procedimiento se estudió el extracto etanólico de *Zanthoxylum coco* (p-63) y el compuesto β -fagarina obtenido de la cristalización del extracto. Se realizaron diluciones de cada muestra en DMEM y se expuso al cultivo celular durante 72 horas.

3.6.1 Evaluación de la alteración de la morfología celular (AMC)

Se trata de un método cualitativo, en el cual se utilizaron placas de 96 pocillos con monocapas de células Vero preformadas durante 24 hs, con más del 90% de confluencia y una concentración aproximada de 2×10^5 células. Durante tres días consecutivos se observaron con microscopio óptico invertido (Carl ZeissTM Axio Vert.A1, Alemania) las monocapas de células incubadas con 200 μ L de DMEM contenido diferentes concentraciones de cada tratamiento (por triplicado). El rango de concentraciones utilizado fue de 35,1 a 400 μ g/mL para el extracto de *Z. coco* y de 8,8 a 100 μ M para la β -fagarina. Como control del sistema se dejaron células sin tratamiento. Fueron consideradas citotóxicas aquellas concentraciones que produjeron alteraciones morfológicas como redondeamiento, retracción de la membrana, lisis celular, lesiones nucleares o presencia de gránulos citoplasmáticos visibles al microscopio óptico invertido (Ooi *et al.*, 2004). Esta metodología se utilizó para constatar los resultados obtenidos por el método colorimétrico que miden viabilidad celular y se describen a continuación.

3.6.2 Evaluación de la viabilidad celular por reducción de MTT

Se implementó el método de reducción del colorante MTT, que mide el metabolismo mitocondrial de las células (Mosman, 1983). Se ensayaron las mismas concentraciones usadas en el ensayo del AMC y cada concentración se probó por triplicado. Se utilizaron monocapas de células Vero preformadas durante 24 h crecidas en placas de 96 pocillos, con más del 90% de confluencia y una concentración de aproximadamente 2×10^5 células. También se evaluó por este método la citotoxicidad del extracto y de la β -fagarina en células PBMC, como una aproximación al estudio de la toxicidad en células humanas. Para tener un control del sistema se dejaron pocillos con células sin tratar, que fueron identificados como controles celulares (CC), que equivalen al 100% de viabilidad celular (VC). Luego de 72 h de incubación a 37 °C en atmósfera con 5% de CO₂ con cada concentración del tratamiento, se agregó 20 μ L por pocillo de una solución del colorante MTT (5 mg/mL en buffer fosfato salin, PBS). Luego de 4 h de incubación la placa de células fue centrifugadas durante 2000 rpm durante 5 min, y los sobrenadantes fueron removidos y reemplazados por 100 μ L de DMSO para disolver los cristales de formazán que resultan de la reducción del MTT. Luego se midió la absorbancia a 595 nm en el lector de microplacas SynergyTM HTX (BioTek, USA). Para obtener el porcentaje de viabilidad celular (%VC) se calculó según la siguiente fórmula:

$$\%VC = DOT / DOC \times 100$$

Donde,

DOT: densidad óptica de células tratadas.

DOC: densidad óptica de células controles sin tratamiento.

Se confeccionaron curvas de viabilidad celular en función de la concentración de cada tratamiento. A partir de estas curvas se estimó la máxima concentración no citotóxica (MCNC), definida como la concentración que asegura más del 90% de VC y sin AMC, la concentración citotóxica 50 (CC₅₀) que corresponde a la concentración que reduce al 50% la VC (Liu *et al.*, 2009), y la concentración citotóxica 20 (CC₂₀) o subtóxica (CSubT) que representa la concentración a la cual la VC es del 80% (Cholewa *et al.*, 1994).

3.7 Ensayo de reducción de unidades formadoras de placa

Esta técnica se fundamenta en la capacidad que poseen ciertos virus para formar placas de lisis en cultivos celulares bajo medios semisólidos. Esto permite contar de manera

directa los viriones infecciosos mediante las placas visibles de muerte celular en el cultivo, conocidas como unidades formadoras de placas (UFP) y de esta manera es posible medir con precisión la actividad infecciosa del virus en cuestión. (del Barrio Alonso *et al.*, 2008). La metodología se basa en la infección de un cultivo celular y adicionar el medio de infección en fase semisólida. Para ello se utilizó una mezcla compuesta en partes iguales de agarosa (1%) y MM a doble concentración (MMX2), generando así un medio semisólido. Este medio semisólido limita la difusión del virus, ya que restringe la propagación de la progenie únicamente a células inmediatamente vecinas, y no a las alejadas. La placa se incubó a 37 °C en atmósfera con 5 % de CO₂, y al finalizar la incubación, las células se fijaron con formaldehído al 10 %, fueron coloreadas con cristal violeta (1 %). Se observaron las zonas no teñidas (placas de lisis), corresponden a las células destruidas por la partícula infecciosa inoculada y las nuevas partículas que ella produjo. Se estudió la actividad antiviral sobre ZIKV del extracto de *Z. coco*, su fracción acuosa, alcaloide y orgánica (reducida en alcaloides), y el compuesto purificado β -fagarina.

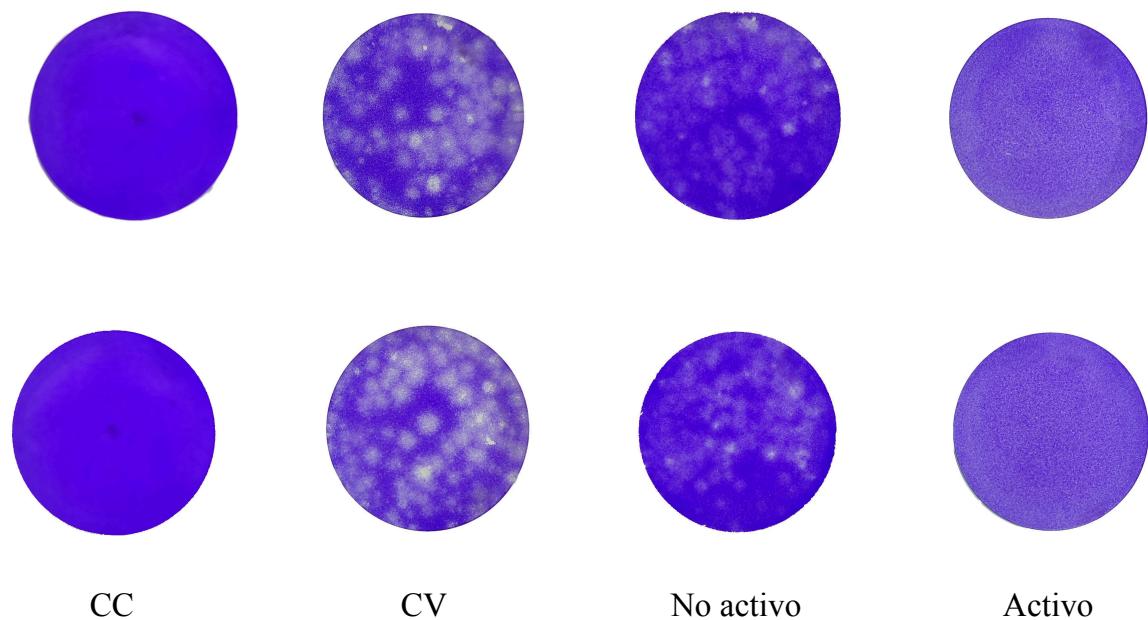


Figura 3. Efectos observados sobre monocapas de células Vero post tinción con cristal violeta. Las imágenes corresponden a control celular (CC), control viral (CV), compuesto no activo y compuesto activo.

3.8 Ensayo de actividad antiviral

La actividad antiviral cuantifica el efecto de un tratamiento sobre los virus una vez que estos han ingresado a la célula hospedadora. La concentración de extracto etanólico de *Z.*

coco y sus diferentes fracciones fue de 100 µg/mL, para evaluar el efecto sobre ZIKV. Monocapas confluentes de células se infectaron con ZIKV a una concentración de 100 UFP y se incubó 1 h (37 °C y 5% CO₂) para permitir la internalización de los viriones. Posteriormente, se colocó DMEM semisólido, conteniendo las concentraciones de cada tratamiento, los controles de virus (CV) sin tratar y control celular (CC, sin infectar y sin tratamiento), por duplicado.

Se cuantificó el virus residual (UFP) en cada una de las condiciones evaluadas por el método de reducción de UFP. La capacidad de inhibir se determinó por el cociente entre la producción viral en los cultivos tratados y la producción viral en los cultivos del CV (Cheng *et al.*, 2002). Además, se graficó el porcentaje de inhibición (%I) en función de la concentración del tratamiento, teniendo como referencia el CV como el 0 %I (Gescher *et al.*, 2011).

Porcentaje de inhibición (%I) = [1 – (número de UFP tratamiento/número UFP del CV)] x 100%

A partir de la curva de porcentaje de inhibición en función de la concentración de cada tratamiento se puede obtener la concentración efectiva 50 (CE₅₀), definida como la concentración del compuesto capaz de reducir en un 50% el número de partículas virales. Por último, se calculó el índice de selectividad (IS), un parámetro relativo para valorar un posible agente antiviral, ya que refleja la relación entre la concentración que ejerce efecto antiviral y aquella que resulta citotóxica para las células hospedadoras (Taborda *et al.*, 2007). El IS se calcula dividiendo la concentración citotóxica 50 (CC₅₀) por la concentración efectiva 50 (CE₅₀), según la fórmula: IS=CC₅₀/CE₅₀.

4. Resultados

4. 1 Obtención de los compuestos

4. 1. 1 Purificación

A partir de las partes aéreas secas de *Z. coco*, se obtuvo el extracto etanólico con un rendimiento del 5,45%. Dado que se conoce que esta especie vegetal posee alcaloides (Dieguez *et al.*, 2004), a partir del extracto se obtuvieron las diferentes fracciones: acuosa (FA), orgánica (FO, reducida en alcaloides) y alcaloidal (FAlc).

Mediante la TLC se logró visualizar los componentes presentes en las fracciones lo cual es esencial para el aislamiento y posterior estudio de los compuestos bioactivos. Además, la presencia de alcaloides se verificó mediante la tinción con el reactivo de Dragendorff, lo que confirmó la correcta purificación de estos compuestos. Utilizando un patrón de β -fagarina, se logró identificar la presencia de este alcaloide en la fracción alcaloidal, lo que confirma la importancia de esta fracción para el estudio de esta especie vegetal.

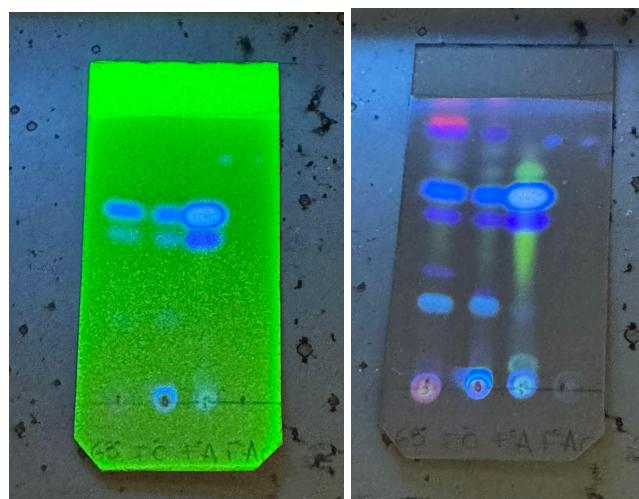


Figura 4. Imágenes de TLC reveladas bajo lámpara UV a 254 nm y 365 nm. Siembras de izquierda a derecha: extracto completo (p-63); fracción orgánica reducida en alcaloides (FO), fracción alcaloide (FA); fracción acuosa (FAC).

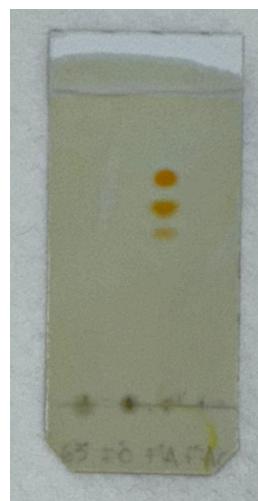


Figura 5. Imagen de TLC con reactivo Dragendorff. Siembras de izquierda a derecha: extracto completo (63); fracción orgánica reducida en alcaloides (FO), fracción alcaloide (FA); fracción acuosa (FAC).

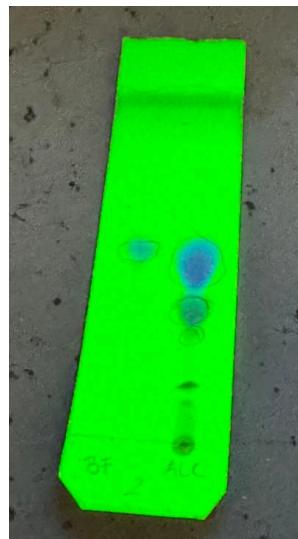


Figura 6. Imagen de TLC con patrón de β -fagarina (BF). Revelado bajo lámpara UV a 254 nm. Siembras de izquierda a derecha: β -fagarina (BF); fracción alcaloide (FA).

4.2 Determinación de la pureza por HPLC

Para determinar la pureza de los cristales obtenidos y el rendimiento de los mismos, utilizamos la cromatografía líquida de alta eficacia o HPLC. Para ello, realizamos las corridas tanto del compuesto activo puro (Figura 7) como del extracto etanólico de *Z. coco* (Figura 8). Utilizamos una fase móvil compuesta por: acetonitrilo, metanol y agua en proporción 30:17:53, respectivamente e hicimos la lectura a 244 nm.

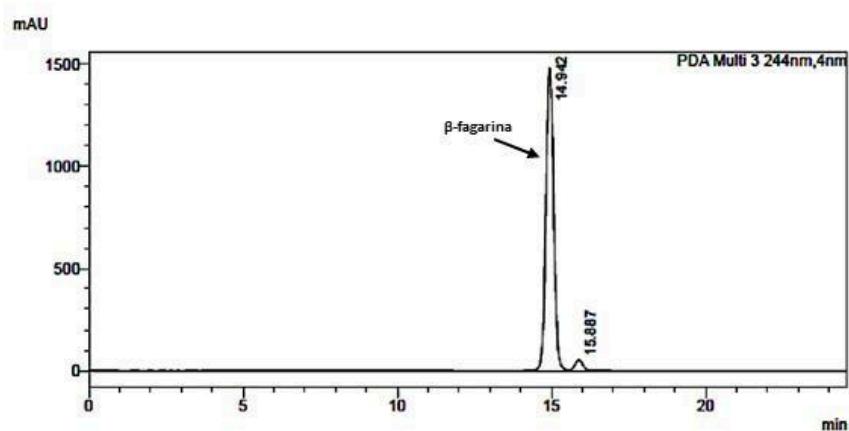


Figura 7. Perfil por HPLC del compuesto β -fagarina.

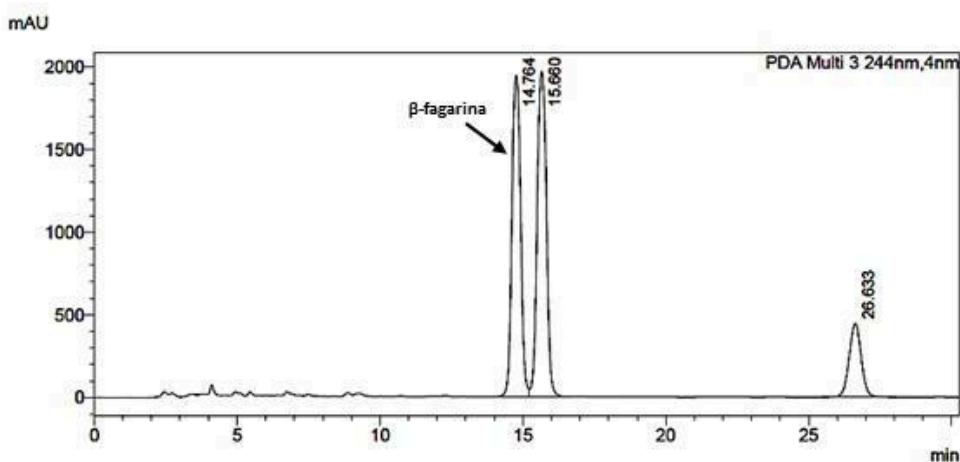


Figura 8. Perfil por HPLC del extracto etanólico de *Z. coco*.

Al comparar ambas corridas pudimos deducir que el compuesto β -fagarina es uno de los componentes mayoritarios de la planta. La pureza del compuesto activo puro fue del 96,6% y su rendimiento calculado fue de 0,69% m/m en el extracto etanólico y de 0,012% m/m referido al material vegetal seco y molido.

4.3 Evaluación actividad antiviral

Con el objetivo de identificar principios activos con actividad antiviral contra el ZIKV a partir de *Z. coco*, se procedió a evaluar las fracciones obtenidas (acuosa, orgánica, alcaloidal y el extracto) utilizando el método de reducción de UFP. De las fracciones evaluadas, el extracto y la fracción alcaloidal mostraron actividad antiviral significativa, evidenciada a partir de una concentración de 80 μ g/mL. La fracción alcaloidal mostró actividad antiviral incluso a una concentración de 20 μ g/mL. Las demás fracciones (acuosa y orgánica) no presentaron inhibición relevante en la formación de placas de lisis en los cultivos infectados con ZIKV.

A partir de los resultados, fue posible descartar aquellas fracciones que no mostraron actividad significativa, lo que facilitó la selección de los compuestos más prometedores. Por lo tanto, se continuó la purificación de la fracción alcaloidal, hasta la obtención de la β -fagarina.

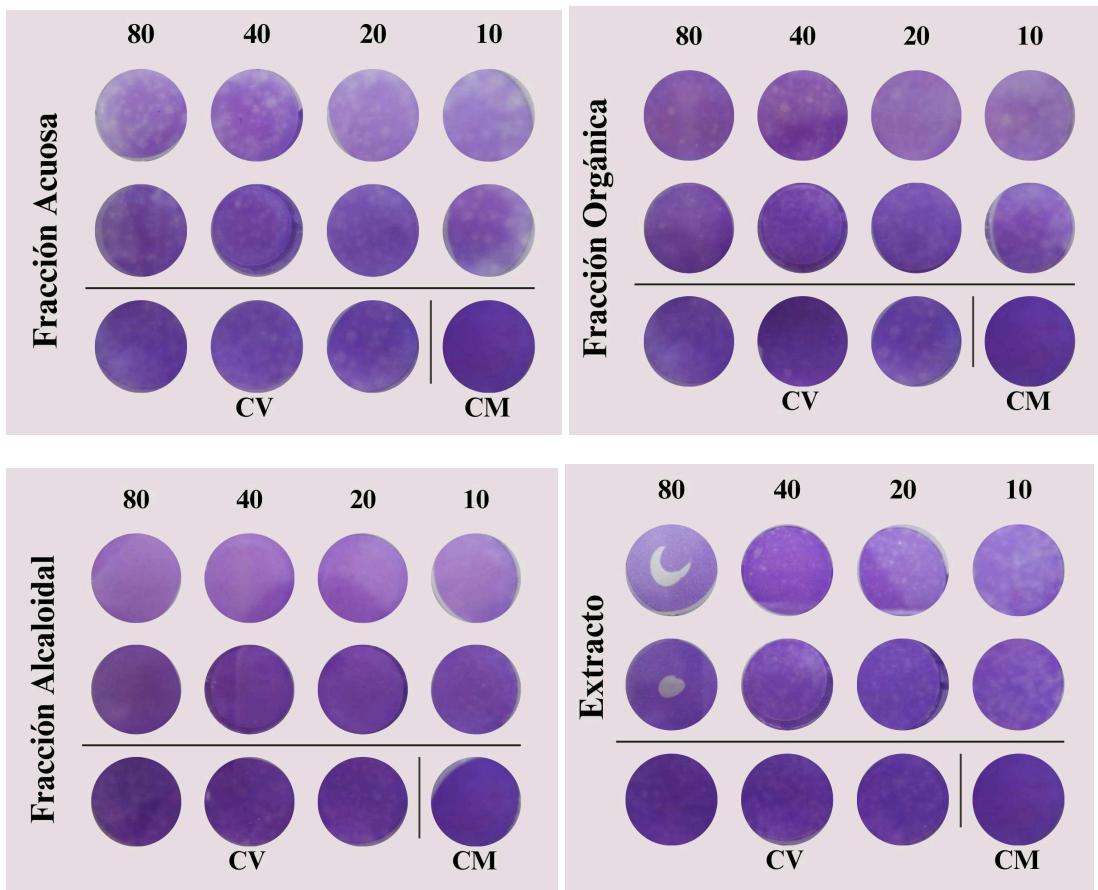


Figura 9. Representación gráfica de placas de lisis. CV: control de virus. CM: control de medio. Los números corresponden a las concentraciones en $\mu\text{g/mL}$.

4.4 Citotoxicidad en células Vero

Se evaluó la citotoxicidad del extracto de *Z. coco* y de la β -fagarina sobre las células Vero, que son las células hospedadoras de ZIKV en los ensayos realizados. Para poder ejemplificar el efecto sobre las células observadas al microscopio, se obtuvieron imágenes de las células tratadas con β -fagarina a diferentes concentraciones (Figura 10). En estas imágenes se puede apreciar que a partir de una concentración de $29,6 \mu\text{M}$ de este compuesto se comienzan a ver alteraciones morfológicas de las células, siendo máximo este efecto a la máxima concentración ensayada ($100 \mu\text{M}$).

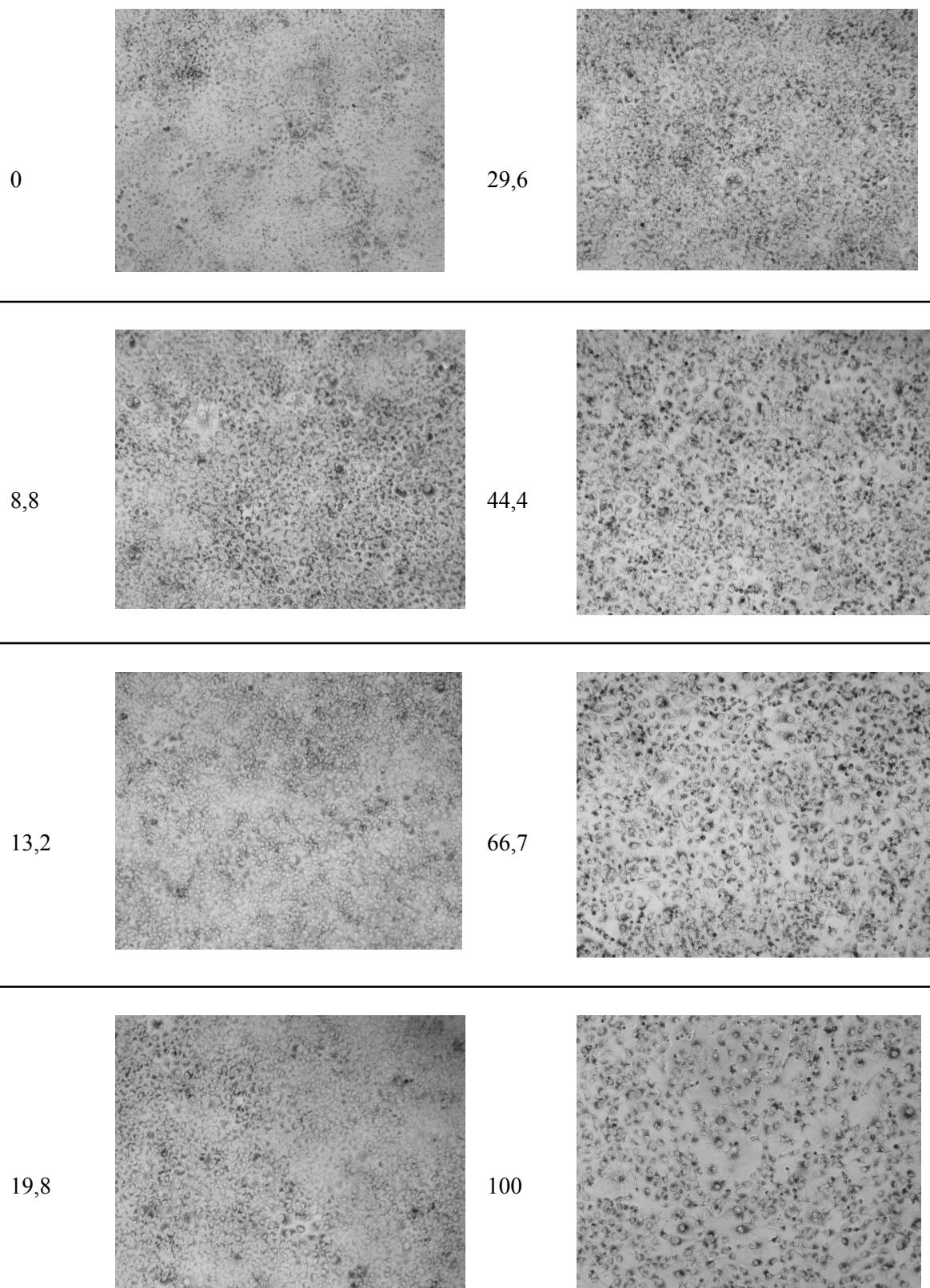


Figura 10. Imágenes de células Vero tratadas con β -fagarina. Se observan las alteraciones morfológicas celulares (AMC) a los 3 días de tratamiento. Los números corresponden a la concentración en μM .

Las observaciones al microscopio son concordantes con la evaluación de la citotoxicidad por el método de reducción de MTT, que es una medida del metabolismo mitocondrial de la célula y nos permite cuantificar la viabilidad celular. La absorbancia del MTT en cada una de las condiciones experimentales permitió calcular el porcentaje de viabilidad celular correspondiente a cada concentración evaluada del extracto de *Z. coco* (Figura 11) y de β -fagarina (Figura 12).

A partir de las curvas de viabilidad celular en función de la concentración de cada tratamiento, se calcularon parámetros de citotoxicidad como la MCNC, CC_{20} (CSubT) y CC_{50} para el extracto y para β -fagarina la sobre células Vero (Tabla 1).

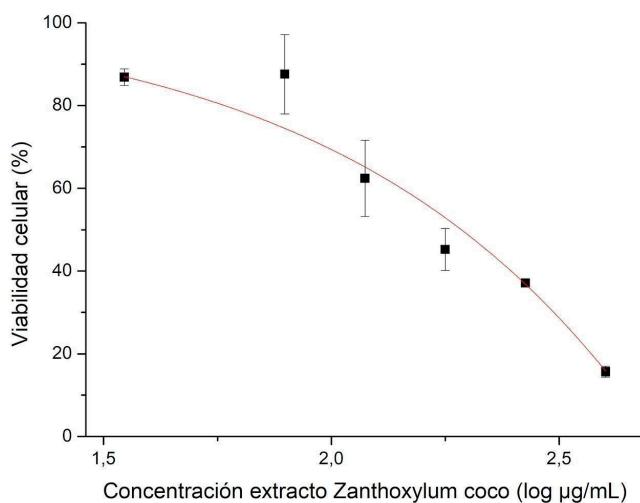


Figura 11. Curva de viabilidad celular (%) vs. concentración del extracto etanólico de *Zanthoxylum coco* en células Vero. Cada resultado se expresa como $\bar{x} \pm \text{SD}$ de tres réplicas. Los resultados se ajustaron a una curva dosis-respuesta sigmoidea, $R^2 > 0,9$.

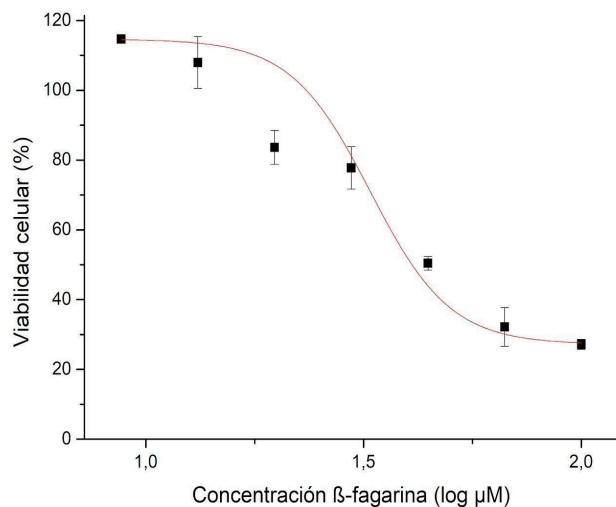


Figura 12. Curva de viabilidad celular (%) vs. concentración de β-fagarina. Cada resultado se expresa como $\bar{x} \pm \text{SD}$ de tres réplicas. Los resultados se ajustaron a una curva dosis-respuesta sigmoidea, $R^2 > 0,9$.

Tabla 1. Valores de citotoxicidad por el método de reducción de MTT para las muestras ensayadas sobre células Vero, obtenidos por análisis de regresión.

	Citotoxicidad sobre células Vero (μg/mL)		
	MCNC ^a	CSubT ^b	CC ₅₀ ^c
Extracto <i>Z. coco</i>	-	58,2 ± 0,9	192,8 ± 1,5
β-fagarina*	26,9 ± 0,8	29,9 ± 0,5	40,9 ± 0,8

*Resultados en μM. ^aMCNC: máxima concentración no citotóxica. ^bCSubT: Concentración subtóxica, concentración que reduce la viabilidad celular en un 20%. ^cCC₅₀: Concentración que reduce la viabilidad celular en un 50%. -: no pudo ser calculado

4.5 Actividad antiviral de la β-fagarina

La β-fagarina aislada de la fracción alcaloidal del extracto de *Z. coco* mostró un importante efecto antiviral sobre ZIKV, con una respuesta dosis dependiente, como se observa en la Figura 13.

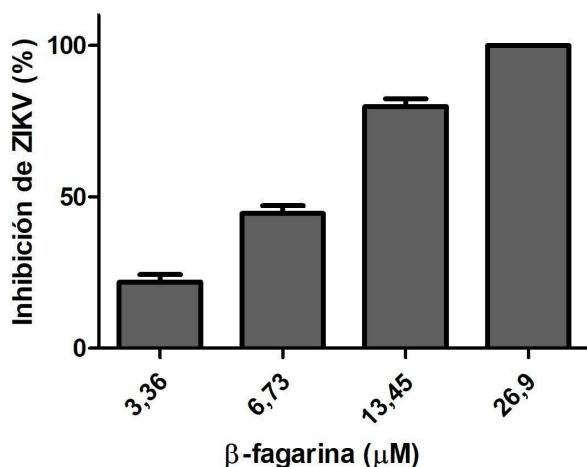


Figura 13. Actividad antiviral sobre ZIKV de la β -fagarina por el método de reducción de UFP.

A partir de la curva que representa el porcentaje de inhibición en función de las concentraciones de β -fagarina se determinó la concentración efectiva 50 (CE_{50}) que fue de 8,7 μM y el índice de selectividad de la β -fagarina para la inhibición de ZIKV en 4,7, lo que nos indica una mayor selectividad por inhibir el virus que por producir un daño en la célula hospedadora.

4.6 Citotoxicidad en células mononucleares de sangre periférica

Como una medida de la toxicidad de los compuestos se evaluó la citotoxicidad del extracto de *Z. coco* y la β -fagarina se ensayó su citotoxicidad en células de sangre periférica humana (PBMC). La curva de viabilidad celular en función de la concentración del extracto se muestra en la Figura 14, que nos permitió calcular una CC_{50} de 158,5 $\mu\text{g/mL}$ en estas células. La β -fagarina no mostró diferencias en viabilidad celular en comparación con el control celular sin tratamiento, siendo la concentración más alta evaluada de 100 μM . Por lo que podríamos decir que este compuesto no resulta tóxico para las células PBMC en las concentraciones donde este compuesto muestra efecto antiviral sobre ZIKV.

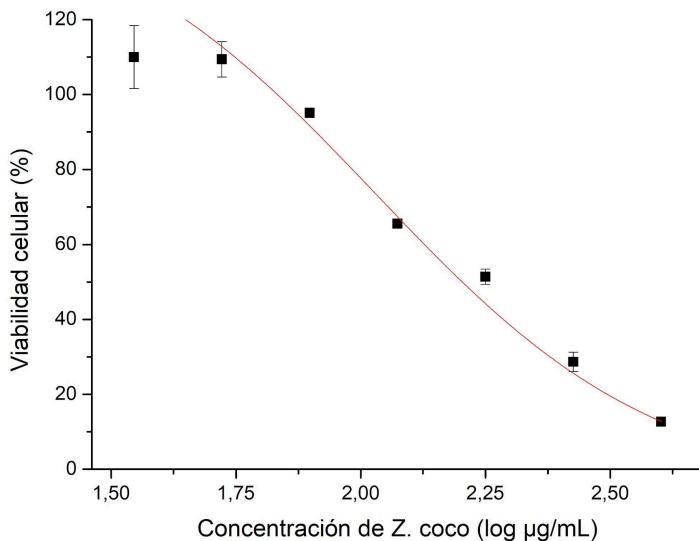


Figura 14. Curva de viabilidad celular (%) vs. concentración del extracto etanólico de *Zanthoxylum coco* en células mononucleares de sangre periférica. Cada resultado se expresa como $\bar{x} \pm \text{SD}$ de tres réplicas. Los resultados se ajustaron a una curva dosis-respuesta sigmoidea, $R^2 > 0,9$.

5. Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio evidencian la actividad antiviral del extracto etanólico de *Zanthoxylum coco* y los compuestos obtenidos de esta especie contra el Zika virus, confirmando nuestra hipótesis de que esta especie posee compuestos bioactivos con potencial terapéutico. En particular, se observó que la fracción alcaloidal presentó una actividad antiviral significativa a partir de la concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$. Este hallazgo se encuentra en concordancia con investigaciones previas que indican que los alcaloides presentes en especies de este género vegetal pueden tener propiedades antivirales. Luego, se realizó la purificación de la fracción alcaloidal por cristalización y se logró identificar el alcaloide principal que es la β -fagarina.

Por otro lado, las fracciones acuosa y orgánica reducida en alcaloides no presentaron actividad antiviral, lo que refuerza la idea de que la eficacia antiviral está relacionada con la composición química específica de la fracción alcaloidal. Esto sugiere que los metabolitos secundarios presentes en las fracciones no alcaloidales podrían no tener la estructura adecuada para interferir en la replicación del virus, lo que es congruente con estudios que destacan la importancia de la estructura molecular en la actividad biológica de los compuestos naturales. Aunque el extracto etanólico de *Zanthoxylum coco* no mostró actividad antiviral significativa,

esto podría atribuirse a que los metabolitos bioactivos no estén presentes en niveles suficientes para ejercer un efecto antiviral detectable en las condiciones del ensayo.

Además, es relevante señalar que, la β -fagarina mostró un efecto antiviral dosis dependiente sobre ZIKV a concentraciones no citotóxicas. Con una CE_{50} de 8,7 μM y un índice de selectividad para la inhibición de ZIKV de 4,7, lo que indica una mayor selectividad por inhibir el virus que por producir un daño en la célula hospedadora. Si bien su concentración citotóxica en células Vero fue de 40,9 μM , la β -fagarina no mostró diferencias en viabilidad celular en comparación con el control celular sin tratamiento en las células PBMC, siendo la concentración más alta evaluada de 100 μM . Por lo que podríamos decir que este compuesto no resulta tóxico para las células PBMC en concentraciones donde demostró tener efecto antiviral sobre ZIKV.

6. Conclusión

En conclusión, este estudio sienta bases para futuras investigaciones sobre el uso de plantas autóctonas, como el *Zanthoxylum coco*, en el desarrollo de tratamientos antivirales. La identificación de la β -fagarina como un potencial agente antiviral destaca la relevancia de explorar, también, los metabolitos secundarios de las plantas, no sólo en el contexto de este virus, sino también para otros virus emergentes.

BIBLIOGRAFÍA

- ALONSO, J., DESMARCHELIER, C. Plantas Medicinales Autóctonas de la Argentina. Ed. LOLA. Argentina. 2005.
- CHATTOPADHYAY, D., CHAWLA- SARKAR, M., CHATTERJEE, T., DEY, R.S., BAG, P., CHAKRABORTI, S., HASSAN KHAN, M.T. Recent advancements for the evaluation of anti-viral activities of natural products. New Biotechnololy, 2009, vol. 25, no5, p. 347–368.
- CHENG, H-Y.; LIN, C-C.; LIN, T-C. Antiherpes simplex virus type 2 activity of casuarinin from the bark of *Terminalia arjuna* Linn. Antiviral Research, 2002, vol. 55, p. 447–455.
- CHOI, H-J. Evaluation of Antiviral Activity of *Zanthoxylum* Species Against Picornaviruses, 2014, vol. 7, no 6, p. 400-403.

- CHOLEWA, M., LEGGE, G., WEIGOLD, H., HOLAN, G., BIRCH, C. The use of a scanning proton microprobe to observe anti-HIV drugs within cells. *Life Sciences*, 1994, vol. 54, p. 1607–1612.
- DEL BARRIO ALONSO, G., ÁLVAREZ RODRÍGUEZ, A.L., VALDÉS GARCÍA, S.M., PARRA FERNÁNDEZ, F. Metodología de pesquisa preclínica de actividad anti-herpesvirus a partir de productos naturales. *Revista Cubana de Farmacia* [online], 2008, vol. 42, no 2, p. 0-0.
- DIEGUEZ, R.; RIVAS, Y.; PRIETO, S.; GARRIDO, G.; MOLINA, J. Potencialidad del género *Zanthoxylum* como Fuente de Agentes con Actividad Biológica, 2004, vol. 23, no 2, p. 243–251.
- ESCALANTE, M. G. El género *Fagara* en la Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 1961, vol. 9, p. 303-305.
- FARIA, N.R.; AZEVEDO, R. DO S. DA S.; KRAEMER, M.U.G.; SOUZA, R.; CUNHA, M.S; HILL, S.C.; THÉZÉ, J.; BONSALL, M.B.; BOWDEN, T.A.; RISSANEN, I.; ROCCO, I.M.; NOGUEIRA, J.S.; MAEDA, A.Y.; VASAMI DA SILVA, F.G.; MACEDO, F.L. DE L.; SUZUKI, A.; RODRIGUES, S.G.; CRUZ, A. C.R.; NUNES, B.T.; MEDEIROS DE ALMEIDA, D.B.; RODRIGUES GUERREIRO, D.S.; QUEIROZ NUNES, A.L.; PINTO DA SILVA, E.V.; HENRIQUES, D.F.; TRAVASSOS DA ROSA, E.S.; SILVA DE OLIVEIRA, C.; MARTINS, L.C.; BALDEZ VASCONCELOS, H.; MEDEIROS, L.N.C.; DE BRITO SIMITH, D.; MESSINA, J.P.; ABADE, L.; LOURENÇO, J.; ALCANTARA, L.C.J.; DE LIMA, M.M.; GIOVANETTI, M.; HAY, S.I.; SANTOS DE OLIVEIRA, R.; DA SILVA LEMOS, P.; FREITAS DE OLIVEIRA, L.; PEREIRA SILVA DE LIMA, C.; PATROCA DA SILVA, S.; MOTA DE VASCONCELOS, J.; FRANCO, L.; FERREIRA CARDOSO, J.; DA SILVA, J.L.; GONÇALVES VIANEZ-JÚNIOR; MIR, D.; BELLO, G.; DELATORRE, E.; KHAN, K.; CREATORE, M.; COELHO, G.E.; DE OLIVEIRA, W.K.; TESH, R.; PYBUS, O.G.; NUNES, M.R.T.; VASCONCELOS, P.F.C. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science*, 2016, vol. 352, no 6283, p. 345-349.
- FONG, Y. D.; HANN CHU, J. J. Natural products as Zika antivirals. *Medicinal Research Reviews*, 2022, vol. 42, p. 1739-1780.

- GESCHER, K., KÜHN, J., HAFEZI, W., LOUIS, A., DERKSEN, A., DETERS, A., LORENTZEN, E., HENSEL, A. Inhibition of viral adsorption and penetration by an aqueous extract from *Rhododendron ferrugineum* L. as antiviral principle against herpes simplex virus type-1. *Fitoterapia*, 2011, vol. 82, no 3, p. 408–413.
- GONZÁLEZ, A. G.; DÍAZ CHICO, E.; LÓPEZ DORTA, H.; MEDINA, J. M.; RODRÍGUEZ LUIS, F. Biosíntesis de los alcaloides en Rutáceas y su ausencia de los endemismos canarios. *Anales de la Universidad de La Laguna* 1971, vol 9, p. 5-11 .
- HA, SY.; YOUN, H.; SONG, CS.; KANG, SC.; BAE, J.J.; KIM, H.T.; LEE K.M.; EOM, T.H.; KIM, I.S.; KWAK, J.H. Antiviral effect of flavonol glycosides isolated from the leaf of *Zanthoxylum piperitum* on Influenza Virus. *Journal of Microbiology*, 2014, vol. 52, no 4, p. 340–344.
- JUÁREZ, F. C. Flora del Valle de Lerma. Herbario MCNS Facultad de Ciencias Naturales Universidad Nacional de Salta, 1994, vol.2, no 24, p. 6-7.
- LEE, J.; LOE, M.W.C.; LEE, R.C.H.; CHU, J.J.H. Antiviral activity of pinocembrin against Zika virus replication. *Antiviral Research*, 2019, vol. 167, p. 13–24.
- LI, J.; ZHAO, Y.; DAI, Y.; ZHAO, J. Identification of γ -Fagarine as a novel antiviral agent against respiratory virus (hMPV) infection. *Virus Research*, 2023, vol. 336, p. 199-223.
- LIU, A.; SHU, S.; QIN, H.; LEE, S.; WANG, Y.; DU, G. . In vitro Anti-Influenza Viral Activities of Constituents from *Caesalpinia sappan*. *Planta Médica*, 2009, vol. 75, no 4, p. 337–339.
- MACIAS-VILLAMIZAR, V. E.; CUCA-SUÁREZ, L. E.; JIMENEZ, K. Usos en medicina folclórica, actividad biológica y fitoquímica de metabolitos secundarios de algunas especies del género *Zanthoxylum*. *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud Universidad del Magdalena*, 2007, vol. 4, no 2.
- MARTINEZ, J.P., SASSE, F., BRÖNSTRUP, M., DIEZ, J., MEYERHANS, A. Antiviral drug discovery: broad-spectrum drugs from nature. *Nat Prod Rep*, 2015, vol.32, no 1, p. 29-48.

- MOHAN S.; ELHASSAN TAHA M.M.; MAKEEN H.A.; ALHAZMI H.A.; AL BRATTY M.; SULTANA S.; AHSAN W.; NAJMI A.; KHALID A. Bioactive Natural Antivirals: An Updated Review of the Available Plants and Isolated Molecules. *Molecules*, 2020, vol. 25, no 21, p. 4878.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 1983, vol. 65, p. 55–63.
- MUSSO, D.; GUBLER, D.J. Zika Virus. *Clinical Microbiology Reviews*, 2016, vol. 29, no 3, p. 487–524.
- NHAN, T. X.; MUSSO, D. Emergence of Zika virus. *Virologie (Montrouge)*, 2015, vol. 19, no 5, p. 225–235.
- OLIVEIRA, M.B.S.; VALENTIM, I.B.; ROCHA, T.S.; SANTOS, J.C.; PIRES, K.S.N.; TANABE, E.L L.; BORBELY, K. S.C.; BORBELY, A.U.; GOULART, M.O.F. *Schinus terebenthifolius* Raddi extracts: From sunscreen activity toward protection of the placenta to Zika virus infection, new uses for a well-known medicinal plant. *Industrial Crops and Products*, 2020, vol. 152, p. 112503.
- OOI, L.S.M., WANG, H., LUK, C.W., OOI, V.E.C. Anticancer and antiviral activities of *Youngia japonica* (L.) DC (Asteraceae, Compositae). *Journal of Ethnopharmacology*, 2004, vol. 94, no 1, p. 117–122.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). Virus de Zika. Ginebra, 2022.
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). Zika. Washington, D.C, 2016.
- PAL, D.; LAL, P. Plants Showing Antiviral Activity with Emphasis on Secondary Metabolites and Biological Screening. *Anti-Viral Metabolites from Medicinal Plants*, 2023, p. 1-67.
- PĘCZEK, F.; SZEWCZYK, A. Furoquinoline Alkaloids: Insights into Chemistry, Occurrence, and Biological Properties. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, vol. 24, no 16, p.12811.
- PONTICELLI, M.; BELLONE, ML; PARISI, V.; IANNUZZI, A.; BRACA, A.; DE TOMMASI, N.; RUSSO, D.; SILEO, P.Q.; FREER, G.; PISTELLO&LUIGI, M. Specialized metabolites from plants as a source of new multi-target antiviral drugs: a systematic review. *Phytochemistry Reviews*, 2023, vol. 22, p.615-693.

- SHANG X-F.; MORRIS-NATSCHKE, S.L.; YING- QIAN, L.; LI, X-H.; ZHANG, J.-Y.; KUO- HSIUNG, L. Biology of quinoline and quinazoline alkaloids. *The Alkaloids: Chemistry and Biology*, 2022, vol. 88, p. 1-47.
- TEIXEIRA, R.R., PEREIRA, W.L., COSTA DA SILVEIRA OLIVEIRA, A.F., DA SILVA, A.M., ANDRÉ SILVA DE OLIVEIRA, LOPES DA SILVA, M., CÂNEDO DA SILVA, C., OLIVEIRA DE PAULA, S. Natural Products as Source of Potential Dengue Antivirals. *Molecules*, 2014, vol. 19, no 6, p. 8151–8176.
- VISINTINI JAIME, M.F., REDKO, F., MUSCHIETTI, L.V., CAMPOS, R.H., MARTINO, V.S., CAVALLARO, L.V. In vitro antiviral activity of plant extracts from *Asteraceae* medicinal plants. *Virol Journal*, 2013, vol. 10, p. 245.
- WANG, A.; THURMOND, S.; ISLAS, L.; HUI, K.; HAI; R. Zika virus genome biology and molecular pathogenesis. *Emergin Microbes & Infections*, 2017, vol. 6, no 3.
- YANG, G.; CHEN, D. Alkaloids from the roots of *Zanthoxylum nitidum* and their antiviral and antifungal effects. *Chemistry & Biodiversity*, 2008, vol. 5, no 9, p. 1718-1722.
- ZANLUCA, C.; DE MELO, V.C.A.; MOSIMANN, A.L.P.; DOS SANTOS, G.I.V.; DOS SANTOS, C.N.D.; LUZ, K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 2015, vol. 110, no 4, p. 569–572.

