



“Estudio comparativo de la actividad antiviral y antibacteriana de extractos de *Melia azedarach* L”

Trabajo de Tesis para optar por el título de Licenciado en Ciencias Biológicas

Autor: Carlos Andrés Montalbetti

Directora: Dra. Erina Petrera

Lugar de trabajo: Laboratorio de Virología: agentes antivirales y citoprotectores, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Marzo 2021

AGRADECIMIENTOS

A Erina por su dirección y tutela. Por la paciencia, consejos y su buena onda. Por el tiempo y el esfuerzo que dedicó durante estos tiempos de pandemia para que la consumación de la tesis fuera posible.

A la Dra. Laura Alché por darme el espacio para realizar mi tesis y por todo el esfuerzo para brindarme la oportunidad de continuar mi formación en su laboratorio.

A mi familia, a mis padres, mis abuelos y mis tíos por su apoyo y sacrificio. Por darme la oportunidad de continuar mis estudios

A la gente de Exactas, que fueron primero compañeros, luego amigos y familia. Por las risas, mates y estrés por el estudio compartidos. Por esos momentos en la biblioteca, en el almuerzo y en el pastito tomando sol que hicieron este recorrido inolvidable.

A Cynthia, por estar siempre ahí, en las buenas y en las malas, por darme la fuerza para enfrentar todos estos desafíos.

A Francisco Noriega, que siempre supo que me gustaba la biología, por ayudarme a encontrar esta carrera y brindarme la oportunidad de estudiarla.

A Juanma, que junto con Francisco fueron mis *roommates* durante los primeros años de carrera. Por estar presentes en esa etapa de mi vida, por los momentos de alegría, tensiones incluso penas compartidas.

A “los chicos de concepción” quienes hicieron que vivir en Buenos Aires no se sintiera tan lejos de casa.

A esos amigos, que estuvieron siempre, por acompañarme en todos los tropiezos, por aligerarme el día después de estar cargado de la facultad, por las birras y asados compartidos.

A todos, de corazón se los agradezco.

RESUMEN

Estudio comparativo de la actividad antiviral y antibacteriana de extractos de *Melia azedarach* L.

El presente trabajo de Tesis de Licenciatura fue desarrollado con el objetivo de explorar la bioactividad presente en distintos extractos de *Melia azedarach* L. En particular, comparar las bioactividades según el solvente de extracción utilizado.

Se obtuvieron 9 extractos de distintas partes del árbol: hojas (EH), frutos (EFr), semillas (ES), flores (EFloA, EFloMp y EFloMv), raíces de plantines (ER) y frutos verdes (EFruvA y EFruvM); algunos realizados con metanol (EFloMp, EFloMv, ER y EFruvM) y otros con acetato de etilo (EH, EFr, ES, EFloA y EFruvA).

La citotoxicidad de estos preparados fue evaluada en células Vero, durante 48 o 72 horas, determinándose los valores de CC_{50} . La mayoría de los extractos presentaron muy baja toxicidad, los valores de CC_{50} obtenidos fueron mayores a la concentración más elevada utilizada, a excepción de los extractos EFloA y EFruvA, cuyos valores son 3,28 mg/mL y 22,9 mg/mL respectivamente. Se evaluó la actividad antiviral de los extractos mediante la inhibición de la acción citopática (ACP) del herpesvirus humano tipo 1 (HHV-1) encontrándose que todos los extractos protegen a las células Vero de la infección. Los valores de EC_{50} obtenidos oscilaron entre 4 y 403 μ g/mL, siendo los extractos EH, EFr y ES los más efectivos.

Por otro lado, se estudió la acción antibacteriana contra *E. coli*, *S. aureus* y *S. epidermidis*, mediante los ensayos de difusión en agar, Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y Concentración Bactericida Mínima (CBM). Los resultados obtenidos evidencian que EFloMp y EFruvA inhiben las tres bacterias por acción bactericida. Los valores de CIM y CBM de EFloMp coinciden en 7,5 mg/mL (para *E. coli* y *S. aureus*) y 1,88 mg/mL (para *S. epidermidis*); las CIM y CBM de EFruvA también con 7,1 mg/mL (para *E. coli* y *S. aureus*) y 1,78 mg/mL (para *S. epidermidis*). Además, se observó que ER tiene un efecto inhibitorio en estas cepas (CIM 17,8 mg/mL) y que EFloA inhibe a los dos estafilococos con acción bactericida en concentraciones más elevadas (CBM 50 mg/mL).

Las bioactividades ensayadas en este trabajo no varían con el solvente utilizado, lo que parecería tener mayor influencia es el material de partida para obtener el extracto. Para poder observar diferencias deberían utilizarse otros solventes.

ABSTRACT

Comparative study of antiviral and antibacterial properties of *Melia azedarach* L extracts.

The present work was developed with the objective of exploring the bioactivity present in different extracts of *Melia azedarach* L. In particular, comparing the bioactivities according to the extraction solvent used.

Nine extracts were obtained from different parts of the tree: leaves (EH), fruits (EFr), seeds (ES), flowers (EFloA, EFloMp and EFloMv), roots of seedlings (ER) and green fruits (EFruvA and EFruvM); some made with methanol (EFloMp, EFloMv, ER and EFruvM) and others with ethyl acetate (EH, EFr, ES, EFloA and EFruvA).

The cytotoxicity of these preparations was evaluated in Vero cells, for 48 or 72 hours, determining the CC_{50} values. Most of the extracts presented very low toxicity, the CC_{50} values obtained were higher than the highest concentration used, with the exception of the EFloA and EFruvA extracts, whose values were 3.28 mg/mL and 22.9 mg/mL respectively. The antiviral activity of the extracts was evaluated by inhibiting the cytopathic effect (CPE) of human herpesvirus type 1 (HHV-1), finding that all extracts protect Vero cells from infection. The EC_{50} values obtained ranged between 4 and 403 μ g/mL, with the EH, EFr and ES extracts being the most effective.

On the other hand, the antibacterial effect against *E. coli*, *S. aureus* and *S. epidermidis* was studied by means of agar diffusion tests, Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC). The results obtained show that EFloMp and EFruvA inhibit the three bacteria by bactericidal action. The MIC and CBM values of EFloMp coincide in 7.5 mg/mL (for *E. coli* and *S. aureus*) and 1.88 mg/mL (for *S. epidermidis*); the MIC and CBM of EFruvA also with 7.1 mg/mL (for *E. coli* and *S. aureus*) and 1.78 mg/mL (for *S. epidermidis*). Furthermore, it was observed that ER has an inhibitory effect in these strains (MIC 17.8 mg / mL) and that EFloA inhibits the two staphylococci with bactericidal action at higher concentrations (CBM 50 mg/mL).

The bioactivities tested in this work do not vary with the solvent used, what seems to have the greatest influence is the starting material to obtain the extract. In order to observe differences, other solvents should be used.

ABREVIATURAS

ACP: Acción citopática

ATCC: American Type Culture Collection

CBM: Concentración Bactericida Mínima

CC₅₀: Concentración Citotóxica 50

CE₅₀: Concentración efectiva 50

CIM: Concentración Inhibitoria Mínima

DO: Densidad óptica

EFloA: Extracto de flores con acetato

EFloMp: extractos de flores con metanol "purpura"

EFloMv: extracto de flores con metanol "verde"

EFr: Extracto de frutos

EFruvA: Extracto de frutos verdes con acetato

EFruvM: Extracto de frutos verdes con metanol

EH: Extracto de hojas

ER: Extracto de raíz

ES: Extracto de semillas

HHV: Virus del herpes humano

IS: Índice de selección

m.i.: Multiplicidad de infección

MDR: del inglés multiresistente a drogas (MultiDrug-Resistant)

MEM: Medio esencial mínimo

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

p.i.: Post infección

INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	2
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
ABREVIATURAS.....	5
INTRODUCCIÓN	8
Las plantas en la medicina.	8
Actividad antiviral en extractos de plantas.	9
Actividad antibacteriana en extractos de plantas.....	11
<i>Melia azedarach</i> L	12
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	16
MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
Elaboración de extractos de <i>Melia azedarach</i> L.	17
Extracto de hojas:.....	17
Extracto de frutos maduros:	17
Extracto de semillas:	17
Extracto de flores:	18
Extracto de raíz:.....	18
Extracto de frutos verdes:	19
Cultivos celulares.....	19
Virus	19
Citotoxicidad	20
Ensayo con MTT	20
Ensayo con Cristal Violeta	20
Actividad antiviral.....	21
Inhibición de la acción citopática viral	21
Actividad antibacteriana	22
Ensayo de difusión en agar	22
Ensayo de Concentración Inhibitoria Mínima	22
Ensayo de Concentración Bactericida Mínima.....	22
RESULTADOS	24
Obtención de los extractos.	24
Citotoxicidad	25
Actividad antiviral.....	30

Inhibición de la acción citopática viral	30
Actividad Antibacteriana.....	35
Ensayo de difusión en agar	35
Ensayo de Concentración Inhibitoria Mínima	37
Ensayo de Concentración Bactericida Mínima.....	38
DISCUSIÓN.....	42
CONCLUSIÓN	47
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

INTRODUCCIÓN

Las plantas en la medicina.

Los seres humanos han utilizado a las plantas como recurso desde sus orígenes, para la obtención de alimento, elaboración de ropas, como materia prima para la construcción y también medicinalmente. Además, las plantas se han usado para curar y/o aliviar enfermedades y lesiones físicas desde tiempos remotos. Tal es así que se han hallado descripciones sobre el uso medicinal de hierbas en antiguos manuscritos unani, papiros egipcios y escritos chinos, que evidencian que culturas europeas, mediterráneas y asiáticas las usaron durante más de 4000 años. Las hierbas también formaron parte de rituales de curación en algunas culturas indígenas de África y América, mientras por otro lado fueron la base en las terapias de sistemas médicos tradicionales, tales como el unani, ayurveda y la medicina china.

En 1985 la Organización Mundial de la Salud estimó que el 80% de la población de los países en desarrollo utilizaba medicina tradicional como fuente de primeros auxilios (Farnsworth *et al.*, 1985), la que consiste principalmente en extractos de plantas o en sus principios activos, es decir, las sustancias que poseen actividad biológica. Es por ello que la medicina tradicional es un recurso de salud importante con muchas aplicaciones, especialmente en la prevención y manejo de enfermedades crónicas relacionadas con el estilo de vida, y en alcanzar las necesidades de las poblaciones envejecidas. Debido a esto muchos países están buscando expandir la cobertura de los servicios de salud esenciales, en tiempos en los que las expectativas por el cuidado de la salud y los costos asociados incrementan, sumados los desafíos que enfrenta la medicina en el siglo XXI, el número de estados que están trabajando en políticas y regulaciones sobre el uso de la medicina tradicional y plantas medicinales ha ido en aumento (Figura 1).

Las plantas ofrecen un nicho de recursos terapéuticos de las que se han aislado compuestos bioactivos para uso directo como medicamentos, tales como la morfina y el Taxol®; también para producir compuestos bioactivos semisintéticos, con mayor actividad y/o menor toxicidad, a partir de nuevas o ya conocidas estructuras moleculares, como la metformina, oxicodona y nabilona; y para preparar remedios herbales con partes de plantas, como los realizados con echinaceas (Fabricant and Farnsworth, 2001).

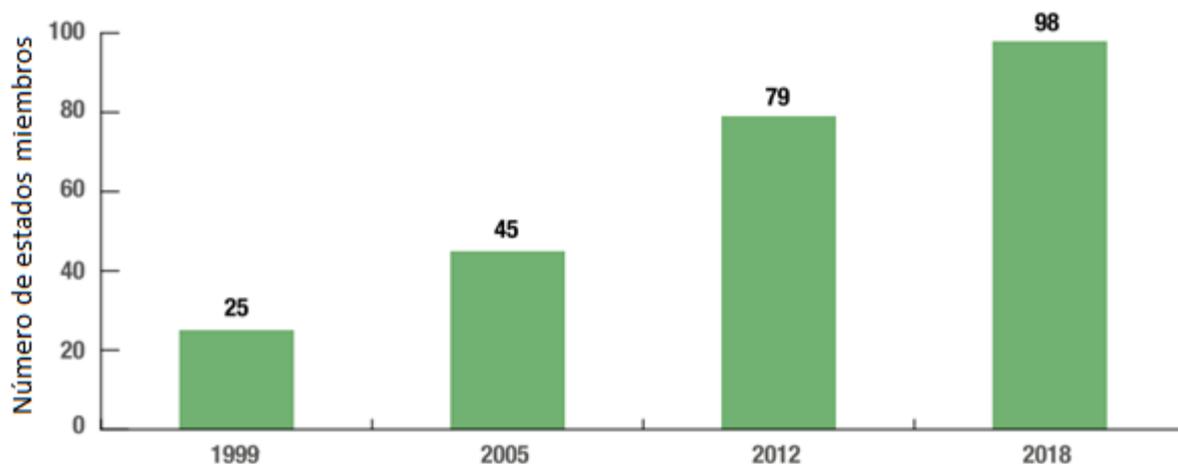


Figura 1: Crecimiento en el número de estados miembros de la ONU respecto a la regulación de hierbas medicinales desde 1999 a 2018 (WHO, 2019).

A pesar de que la ciencia ha logrado identificar, extraer y aislar cientos de principios activos, la obtención de dichos compuestos es un proceso laborioso y consume mucho tiempo y recursos, por lo que es necesario desarrollar métodos más efectivos y selectivos para la elaboración de productos medicinales de origen natural.

Teniendo en cuenta que en las últimas dos décadas el uso y reconocimiento del valor clínico, farmacéutico y económico de la medicina herbal se ha incrementado, surge la necesidad de profundizar la investigación de plantas utilizadas en la etnomedicina. La investigación científica permite garantizar su seguridad y eficacia e implementar regulaciones sobre su uso y el de los extractos obtenidos a partir de ellas.

Actividad antiviral en extractos de plantas.

Los antivirales son medicamentos utilizados para tratar infecciones virales, la mayoría de estos tienen como blanco a virus específicos. Son drogas que inhiben algún paso del ciclo de multiplicación del virus, generalmente actuando sobre proteínas blanco involucradas en sus ciclos de replicación. Es por ello que gran parte de los antivirales son diseñados para tener como blanco genes virales (De Clercq, 2002), lo que les confiere una mayor especificidad y menor toxicidad, sin embargo, la selección de mutantes resistentes es un riesgo, razón por la que es necesario mejorar las terapias actuales y obtener nuevos agentes antivirales para hacer frente a esta problemática.

Obtener compuestos nuevos para el desarrollo de drogas requiere búsquedas y análisis exhaustivos. La cantidad de sustancias bioactivas que ofrecen las plantas las convierte en candidatas prometedoras en este desarrollo. El ritmo en que surgen nuevos medicamentos

antivirales de origen natural ha experimentado un aumento sustancial en la última década (Mohan *et al.*, 2020). Se muestran a continuación algunos ejemplos de estudios que evalúan la actividad antiviral presente en extractos vegetales.

Extractos etanólicos de *Arisaema tortuosum*, planta carnívora nativa de India, presentaron actividad antiviral contra los virus humanos del herpes tipos 1, 2 (HHV-1 y HHV-2) y una cepa resistente a aciclovir de HHV-2 (Rittà *et al.*, 2020). Preparaciones con partes aéreas de la planta amazónica *Marcetia taxifolia* también tienen actividad in vitro anti HHV-1, además los mismos presentaron actividad contra el virus de la hepatitis B (HBV) y polio virus (Ortega *et al.*, 2019). Asimismo, los extractos acuosos de *Nerium oleander* (laurel rosa) poseen actividad contra la cepa de polio virus Sabin tipo 1 (Sanna *et al.*, 2019). El extracto acuoso de raíces de *Glycyrrhiza glabra* (regaliz) fue activo contra HHV-1, mientras que los extractos alcalinos de las mismas lo fueron contra HIV (Fukuchi *et al.*, 2016).

En cuanto a los virus que causan hepatitis, podemos mencionar el extracto obtenido del árbol oriundo de la India, Java y Filipinas, *Cananga odorata* que posee actividad contra HBV (Indrasetiawan *et al.*, 2019). Con un enfoque diferente, la nanoemulsión de poliprenoles realizada a partir del extracto de hojas de *Ginkgo biloba* presentó actividad no sólo contra HBV sino también contra influenza serotipo H3N2 (Wang *et al.*, 2015). El macerado con etanol de *Ruta agustifolia* exhibió actividad potencial contra el virus de la hepatitis C (HCV) y además la combinación de este con antivirales anti-HCV mostró un efecto sinérgico (Wahyuni *et al.*, 2020).

Relacionado a enfermedades transmisibles por mosquitos, se señalan algunos trabajos al respecto. Por ejemplo, se encontró que extractos acuosos de hojas de *Carica papaya* poseen actividad contra el virus del dengue serotipo 2 (DENV-2) y previenen la trombocitopenia característica de la enfermedad (Sharma *et al.*, 2019). Por otro lado, extractos de *Phyllanthus phillyreifolius* inhiben los cuatro serotipos del virus (DENV-1-4) y ejercen un efecto antiviral contra las cepas africana y asiática del virus del Zika (ZIKV) (Haddad *et al.*, 2020). Los extractos de las partes aéreas de *Psiloxylon mauritianum* inhiben la adsorción del ZIKV y también poseen actividad contra los cuatro serotipos de DENV (Clain *et al.*, 2019). Así mismo, extractos metanólicos de las plantas *Myristica fatua*, *Cymbopogon citratus*, y *Acorus calamus* usadas medicinalmente en Indonesia, demostraron tener actividad contra el dengue (Rosmalena *et al.*, 2019).

En lo referente a afecciones respiratorias, estudios realizados con extractos de semillas de *Aesculus hippocastanum* L dieron buenos resultados respecto a su capacidad virucida y antiviral contra el virus respiratorio sincitial (RSV), además de reducir la inflamación en

pulmones en un modelo in vivo (Salinas *et al.*, 2019). Por otro lado, se encontró que las partes aéreas y las raíces de *Echinacea purpurea*, planta nativa de Norteamérica, poseen una potente actividad virucida contra varios virus involucrados en enfermedades respiratorias tales como Rinovirus, Influenza, RSV y coronavirus murino (Hudson, 2012). Existe un preparado comercial llamado Echinaforce® realizado a partir de extractos de esta misma planta, el cual se utilizó en un estudio sobre su efecto en coronavirus, arrojando resultados prometedores respecto al efecto virucida contra el coronavirus humano HCoV-229E, uno de los responsables del resfriado común. El efecto de este preparado no se restringe a este último, ya que también SARS-CoV-1 y MERS-CoV fueron inactivados, al igual que el agente de la COVID-19, SARS-CoV-2 (Signer *et al.*, 2020).

Actividad antibacteriana en extractos de plantas.

Las bacterias se encuentran presentes en todos los hábitats y rincones de la Tierra. Son tan abundantes que se estima que se pueden encontrar cerca de 40 millones de células bacterianas en un gramo de tierra y un millón de células bacterianas en un mililitro de agua dulce (William B. Whitman, David C. Coleman, 1998). Sin embargo, algunas son causantes de enfermedades, las denominadas patógenas que generan afecciones debido a la producción de toxinas, la invasión de tejidos o ambas. Además, algunas pueden desencadenar procesos inflamatorios afectando distintos órganos. Los antibióticos son fármacos usados para combatirlos, sin embargo, la resistencia a los antimicrobianos ha ido en aumento (Alanis 2005) y representa una alerta para la salud y la medicina. Esto se debe a la emergencia, dispersión y persistencia de bacterias MDR (del inglés MultiDrug-Resistant). Para abordar este problema es esencial descubrir nuevas estrategias y drogas que puedan vencer estos patógenos.

Las plantas son conocidas por producir gran variedad de compuestos químicos, como mecanismo de defensa ante diversos patógenos, es de esperar entonces, que sus extractos puedan contener principios activos con acción antimicrobiana. Teniendo en cuenta la relevancia de obtener métodos para combatir los organismos MDR, podemos nombrar varios extractos que han tenido actividad contra este tipo de bacterias. Por ejemplo, se encontró que extractos alcohólicos de plantas usadas comúnmente en la medicina tradicional de la India pudieron inhibir distintas bacterias, incluso algunas con resistencia a múltiples drogas (Ahmad and Beg, 2001). La actividad contra bacterias MDR también se halló en extractos obtenidos de las hojas de *Cyathea gigantea* (Alsófila gigante), helecho arbóreo nativo del noreste de India, cuyos extractos además revelaron efectos sinérgicos con algunos antibióticos (Nath *et al.*, 2019).

Precisamente, la acción sinérgica de compuestos bioactivos provenientes de plantas en conjunto con antibióticos puede ralentizar o incluso revertir el desarrollo de resistencia a antibióticos en bacterias (Ayaz *et al.*, 2019). Este es el caso de las semillas de *Amburana cearensis* (roble criollo), cuyos extractos crudos tuvieron un efecto sinérgico al reducir considerablemente la CIM (Concentración Inhibitoria Mínima) de un grupo de antibióticos en bacterias multirresistentes como *S. aureus* (SA10) y *E. coli* (EC06) (Oliveira *et al.*, 2020). Otro caso es el de extractos crudos provenientes de plantas de la región de Tavush, usadas en la medicina tradicional armenia, que redujeron la CIM de los antibióticos empleados en cepas de *E. coli* resistentes a kanamicina y ampicilina (Ginovyan and Trchounian, 2019).

Por otro lado, extractos realizados con partes aéreas de plantas de la familia *Poaceae* (gramíneas) provenientes de Bahawalpur, Pakistán, mostraron potencial antimicrobiano contra nueve microorganismos (Fatima, Kanwal and Mahmood, 2019). Otro estudio realizado sobre preparados de hojas de *Syzygium antisepticum* demostró capacidad inhibitoria y bactericida contra *S. aureus* y la cepa resistente a meticilina (Yuan and Yuk, 2018). Además, un extracto realizado a partir de la mezcla de múltiples plantas: *Juglans regia* (nogal), *Myrtus communis* (mirto), *Matricaria chamomilla* (manzanilla), *Urtica dioica* (ortiga), y *Rosa damascena* (rosa de damasco), presentó fuertes efectos antiinflamatorios y actividad antimicrobial contra *Propionibacterium acnés* (Kiliç *et al.*, 2019).

***Melia azedarach* L**

Linneo, famoso naturalista sueco, fue quien propuso el género *Melia* para este árbol porque era el nombre que los romanos le daban al fresno de flor (*Fraxinus ornus*), cuyas hojas son parecidas. El epíteto *azedarach* era el nombre con el que se conocía antes al cinamomo y proviene del persa *azad-darakht* que significa árbol libre.

Cinamomo, piocha, granillo, lila, lila de china, lila de las Indias, paraíso chino, son algunos de los nombres españoles que posee. Sin embargo, en Argentina es más bien conocido como paraíso. Es un árbol caducifolio de la familia Meliaceae, el cual se introdujo en América y Europa occidental con propósitos ornamentales y como árbol de sombra, por su copa amplia y tupida, por lo que es común encontrarlo en áreas verdes, plazas y parques.

Puede crecer hasta 18 metros de alto, pero por lo general mide alrededor de 10 metros o menos, posee un tronco de hasta 40 cm de diámetro, hojas bipinnadas, de 20 a 50 cm de largo incluyendo el pecíolo y unos 15 a 25 cm de ancho; flores aromáticas con sépalos ovados a

lanceolados, de unos 2 mm de largo; pétalos blanquecinos o rosados a color violeta, de 8 a 10 mm de largo (Figura 2); los frutos son drupas lisas, de color verde y amarillas en la maduración (Figura 2), que cuelgan de manera llamativa en grupos, globosas, carnosas, de 1 a 1,5 cm de diámetro, conteniendo en cada lóculo una sola semilla alargada (Calderón de Rzedowskii and Germán Ramírez, 1993).



Figura 2: Frutos y flores de *M. azedarach* L (© 2007 Luigi Rignanese)

Originario de la India y sudeste de Asia, se ha cultivado desde épocas muy antiguas como excelente árbol de sombra. Éste puede tolerar heladas ligeras, es resistente a la sequía y se adapta a los suelos ácidos o alcalinos y a la salinidad de las costas, lo que le ha permitido propagarse y naturalizarse en las zonas cálidas y templadas de todo el mundo (Figura 3).

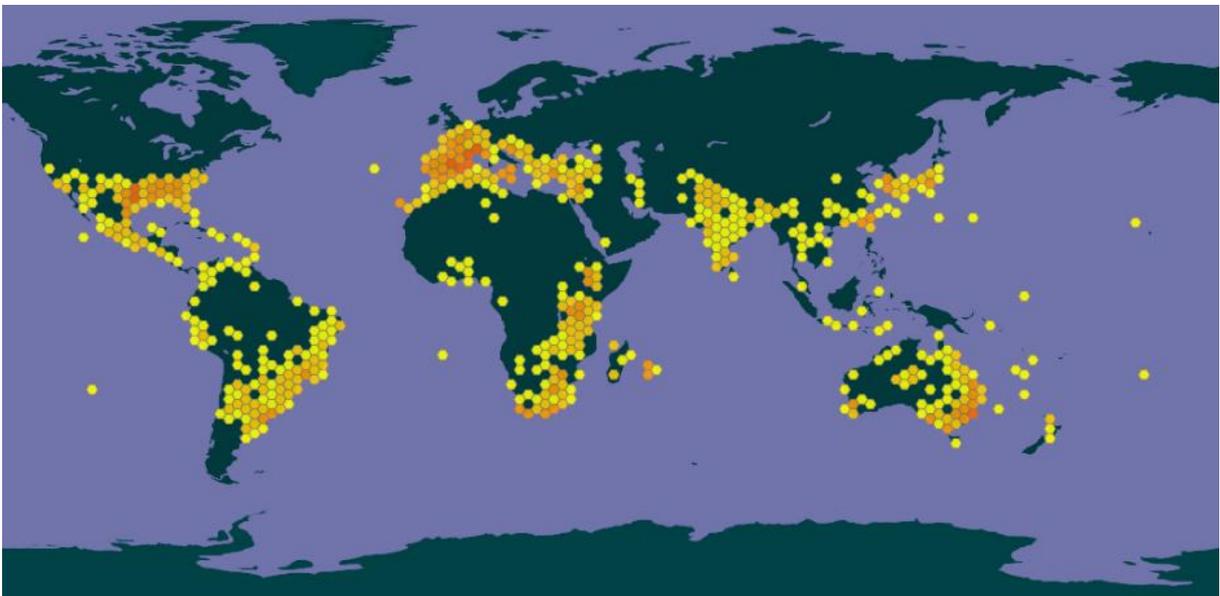


Figura 3: Distribución de *M. azedarach* L a lo largo del mundo (*Melia azedarach* L. in GBIF Secretariat 2019).

En la india se cultiva por su madera, la cual tiene gran parecido a la caoba y por ello se utiliza de manera ornamental, también para confección de muebles ya que es una madera fuerte y soporta bien la humedad, y en la fabricación de papel.

Este árbol tiene una larga historia de uso medicinal en Asia, sus hojas son usadas como diurético; para tratar parásitos intestinales y como antilítico. Las hojas junto a las flores se han utilizado como antipirético y sedante. En otros lados, es conocido por sus propiedades insecticidas, por ejemplo, en Vietnam las hojas de *M. azedarach* se guardan entre la ropa para prevenir el daño por polillas; la pulpa del fruto se ha usado para eliminar piojos de manera natural. Estas propiedades insecticidas y repelentes se deben al alto contenido de alcaloides en esta planta. *M. azedarach* posee propiedades medicinales e insecticidas que han hecho que sea el centro de varias investigaciones respecto a sus componentes y las actividades biológicas que estos presentan. Al ser muy usada en la Ayurveda se ha investigado el uso medicinal de las diferentes partes del árbol, su composición fitoquímica y las propiedades farmacológicas (Sharma and Singla Dr., 2013). Entre esas propiedades, se observó que componentes de las hojas inhiben el crecimiento de los virus influenza A y B (Nerome *et al.*, 2018).

Por otra parte, es sabido que los frutos son venenosos para los humanos si son ingeridos (Phua *et al.*, 2008) y también para los animales de ganado (Méndez *et al.*, 2002). Además, se ha encontrado que sus extractos poseen actividad inhibitoria contra flavivirus y *Mycobacterium tuberculosis* (Sanna *et al.*, 2015). Los extractos de raíz y corteza también inhiben fuertemente el crecimiento de *M. tuberculosis* (Choi and Lee, 2016).

En cuanto al potencial insecticida, los extractos etanólicos de hojas tienen efecto pediculicida (Rutkausis *et al.*, 2015). Mientras que los extractos metanólicos de hojas, ramas y frutos verdes de *M. azedarach*, exhibieron actividad insecticida contra larvas de *S. littoralis*, una especie de polilla (Bohnenstengel *et al.*, 1999). Por otro lado, extractos realizados a partir de las frutas maduras mostraron efectos repelentes contra *Triatoma infestans*, el principal vector del *Trypanosoma cruzi*. Además, extractos con éter de petróleo y etanol de las mismas, tuvieron un efecto acaricida contra huevos y ninfas de garrapatas de la familia Ixodidae (Abdel-Ghany *et al.*, 2019).

Los extractos metanólicos crudos de hojas de este árbol, poseen actividad antibacteriana contra algunas bacterias patógenas para el humano, en particular los extractos realizados con acetato de etilo, metanol y el extracto acuoso muestran un amplio espectro de efectividad (Khan *et al.*, 2008). Por otro lado, se mostró que los extractos etanólicos de las hojas también poseen actividad antibacteriana contra patógenos de humanos (Norela *et al.*, 2012)

tales como *Streptococcus mutans*, bacteria involucrada en el desarrollo de las caries dentales (Della Bona and Nedel, 2015).

Investigando otras bioactividades, se encontró que preparados hidroalcohólicos de raíces demostraron tener un efecto antiinflamatorio y analgésico en ratas, comparables a los producidos por ibuprofeno y aspirina (Vishnukanta and Rana, 2010). Por otro lado, extractos de hojas presentaron efectos antidiabéticos en ratones *Lep^{ob}*, modelo de diabetes tipo 2 mellitus, mejorando la homeostasis de la glucosa y reduciendo el peso (Seifu *et al.*, 2017).

La presente tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Virología: agentes antivirales y citoprotectores del Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Este laboratorio trabaja desde hace varios años investigando la actividad antiviral de extractos vegetales y de compuestos tanto de origen natural como de síntesis. En particular, el estudio de extractos semipurificados de hojas del árbol *Melia azedarach* L con muy buenos resultados, obteniendo actividad antiviral contra diversos tipos de virus tanto *in vitro* como *in vivo* (Alché *et al.*, 2000; Paula Pifarré *et al.*, 2002; Petrera and Coto, 2009; Petrera, 2015).

Por este motivo, se propone en esta tesis evaluar las actividades antivirales y antibacterianas de los extractos de distintas partes del árbol *M. azedarach* L, obtenidos mediante la utilización de distintos solventes con el objetivo de comparar sus bioactividades.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Teniendo en cuenta el marco teórico y los antecedentes presentados se desprende la siguiente hipótesis de trabajo de esta Tesis de Licenciatura.

Hipótesis

La bioactividad presente en los extractos de *Melia azedarach* L obtenidos de material procedente del árbol o de plantines varía según el solvente utilizado en la extracción.

Objetivos

- 1.** Obtener extractos de hojas, frutos, flores y semillas del árbol *Melia azedarach* L, así como también de las raíces de plantines micropropagados.
- 2.** Evaluar la citotoxicidad y la actividad antiviral de los extractos obtenidos
- 3.** Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos obtenidos

MATERIALES Y MÉTODOS

Elaboración de extractos de *Melia azedarach* L.

Extracto de hojas:

Se colocaron 50 gramos de hojas de *M. azedarach* L, previamente machacadas, en una botella de 1L con 700 ml de buffer de extracción durante 24 horas a temperatura ambiente. Luego se filtró el extracto acuoso con una gasa y posteriormente se centrifugó en frío durante 30 min para decantar las partículas en suspensión y obtener un sobrenadante limpio. Posteriormente, al extracto acuoso se le realizó una extracción con solvente 1:1 en volumen con acetato de etilo y la fase orgánica se llevó a evaporación en el rotaevaporador a 40°C, hasta evaporar todo el solvente. Se resuspendió el residuo de la evaporación en 1 mL de metanol y se evaporó en savant hasta obtener el extracto seco.

Se obtuvieron 30,8 mg de extracto seco, los cuales se resuspendieron con 100 µL de metanol y 900 µL de MEM sin antibióticos para elaborar el extracto de hojas (EH) de una concentración aproximada de 30 mg/ml.

Extracto de frutos maduros:

Se pesaron 50 g de frutos maduros de *Melia azedarach* L. Se separaron las semillas las cuales fueron utilizadas para elaborar otro extracto. La pulpa y piel de los frutos se machacó en el mortero hasta formar una pasta, la cual fue reservada en un frasco con 300 ml de buffer de extracción por 24 horas. Posteriormente se filtró con una gasa y el filtrado se centrifugó en frío por 30 min a 8000 rpm para decantar los restos. Luego se realizó la extracción orgánica con acetato de etilo volumen 1:1, se evaporó el solvente en el rotaevaporador a 40°C. El residuo se resuspendió en 1 mL de metanol que luego se secó en savant. No se logró evaporar completamente, por lo tanto, se obtuvieron 150 mg de peso húmedo. Lo obtenido se resuspendió con 100 µL de metanol y 900 µL de medio (MEM 5% sin antibióticos) para obtener el extracto de los frutos maduros (EFr), se realizó una dilución al décimo con la que se trabajó asumiendo 15 mg/mL de concentración.

Extracto de semillas:

Las semillas obtenidas de los 50 gramos de frutos maduros, se trituraron con una pinza y posteriormente se machacaron con el mortero hasta desmenuzar en trozos pequeños, luego se maceraron en un frasco con 200 mL de buffer de extracción durante 24 horas a temperatura ambiente. Se filtró con gasa y posteriormente se realizó la extracción orgánica 1:1 con acetato

de etilo procediendo de la misma manera que en los extractos anteriores. No se logró evaporar totalmente y se obtuvieron 150 mg de peso húmedo. Se obtuvo la solución madre de la cual se realizó una dilución al décimo para trabajar, asumiendo una concentración de 15 mg/mL (ES).

Extracto de flores:

Se realizaron dos extracciones de flores, una con acetato de etilo y otra con metanol. Para la extracción con acetato de etilo se procesaron 50 g de flores con minipimer y se reservaron en un frasco con 300 mL de buffer de extracción durante 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó una centrifugación en frío y al sobrenadante se le realizó la extracción con solvente 1:1 con acetato de etilo, posteriormente se prosiguió del mismo modo que en los extractos anteriores. Se obtuvieron 100 mg de extracto seco con el cual se elaboró el extracto madre de flores con acetato 100 mg/mL (EFloA).

Para obtener el extracto con metanol también se pesaron 50 g de flores, las cuales se procesaron y se dejaron macerar en 300 mL de metanol durante 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se filtró con gasa y después se volvió a filtrar con papel de filtro, este filtrado se llevó a evaporación en el rotaevaporador a 40°C. Luego de evaporar el solvente quedaron dos fases en el balón; una líquida, de color púrpura a morado y otra fase sólida, de color verde, adherida a las paredes del balón. Éstas se trataron como extractos distintos.

La fase púrpura se llevó a evaporar en savant. Se obtuvo una masa de 600 mg que luego se resuspendió en 500 µL de metanol y 1500 µL de medio (MEM 5% sin antibiótico) obteniéndose el extracto de flores con metanol “púrpura” (EFloMp), de una concentración de 300 mg/mL. Mientras que la fase verde fue resuspendida en metanol y luego evaporada en savant. Se obtuvo una masa de 140 mg que se resuspendió en 100 µL de metanol y 900 µL de medio (MEM 5% sin antibiótico). Obteniéndose el extracto flores metanol “verde” (EFloMv) de 140 mg/mL

Extracto de raíz:

Se machacaron 2,28 g de raíces de plantines de *Melia azedarach L.* que se dejaron macerar en 200 mL de metanol por 24 horas a temperatura ambiente. Luego se filtró la suspensión con papel y se evaporó el solvente en el rotaevaporador a 40°C, se resuspendió en 4 mL de metanol que fueron evaporados en savant. Se obtuvo un peso seco de 35,5 mg que se resuspendió en 100 µL de metanol y luego se le agregaron 900 µL de medio (MEM 5% sin antibiótico) obteniéndose el extracto de raíces con metanol 35,5 mg/mL (ER).

Extracto de frutos verdes:

Se realizó un extracto con metanol y otro con acetato de etilo. Para obtener el extracto con metanol se machacaron 50 g de frutos verdes con ayuda de un mortero, luego se procesaron con minipimer y se los maceró durante 24 horas en 300 mL de metanol a temperatura ambiente. Se filtró el metanol con papel de filtro y se llevó al rotaevaporador para evaporar el solvente a 40°C. Debido al alto contenido de agua, no se pudo evaporar todo el solvente y el residuo del rotaevaporador se tomó como extracto madre de frutos verdes con metanol (EFruvM).

Se pesaron otros 50 g de frutos verdes y se dejaron macerar 24 horas en 300 mL de buffer de extracción a temperatura ambiente. Se realizó la extracción con acetato de etilo 1:1, la fase orgánica se evaporó en el rotaevaporador a 40°C de temperatura, luego se prosiguió del mismo modo que con los extractos anteriores. Se resuspendió en 100 µL de metanol y 900 µL de medio (MEM 5% sin antibiótico) obteniendo el extracto frutos verdes acetato (EFruvA) de una concentración de 28,4 mg/mL.

Cultivos celulares

Se utilizaron células Vero provenientes de riñón de mono verde africano (obtenidas del ATCC) que fueron cultivadas en botellas T25, con medio mínimo esencial de Eagle (MEM), suplementado con 5% de suero fetal bovino inactivado (MEM 5%) y 50 µg/mL de gentamicina. Las células fueron incubadas a 37°C y mantenidas luego de alcanzar la monocapa en MEM suplementado con 1,5% de suero fetal bovino (MEM 1,5%).

Virus

En el trabajo se utilizó HHV-1 (Human herpesvirus 1, ICTV 2019), cepa KOS. Para realizar los stocks virales se infectaron monocapas de células Vero crecidas en botellas T25 con un inóculo de 1 mL de virus con una m.i. = 0,01. Se dejó adsorber durante 1 hora en estufa gaseada a 37°C, agitando cada 15 minutos. Luego, se descartó el inóculo y se agregaron 5 mL de MEM 1,5%. Se incubó a 37°C y 4% CO₂ durante 48hs. Al finalizar el período de incubación, se realizaron dos ciclos de congelamiento y descongelamiento para lisar las células. Se cosechó el virus total y se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante obtenido se tituló por el método de unidades formadoras de placas y se fraccionó para su almacenamiento a -70°C.

Citotoxicidad

Ensayo con MTT

La citotoxicidad de los extractos fue evaluada en células Vero, éstas se incubaron en microplaca de 96 pocillos durante 48 horas con diluciones seriadas al medio de los extractos provenientes de *M. azedarach* L. Como control celular se dejaron pocillos sin tratar. Luego del periodo de incubación se realizó el ensayo del MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) el cual es un compuesto de color amarillo que es reducido por enzimas a un compuesto de color azul violáceo y su densidad óptica se puede medir a 590 nm. Se asume que la reducción del compuesto es debido a la actividad metabólica, es decir a la cantidad de células viables. Se agregaron 10 µL de MTT (5 mg/mL) a cada pocillo y luego se incubó por 2 horas. Se removió el medio de cada pocillo y resuspendió el precipitado de la sal de tetrazolio con 100 µL etanol 96% antes de medir la densidad óptica en el lector de microplaca. Para cada dilución de los distintos extractos se calculó el porcentaje de viabilidad comparando la DO media con el control de células, que se tomó como el 100% de viabilidad.

En los casos en que el valor obtenido fue mayor a 100, se informó un porcentaje de viabilidad del 100%. Para cada extracto se realizó un gráfico del porcentaje de viabilidad vs concentración y se estimó la Concentración Citotóxica 50 (CC₅₀) por interpolación, mediante una regresión lineal. Para los compuestos en que la viabilidad celular fue mayor al 50% en todas las concentraciones ensayadas, se informó que la CC₅₀ es mayor a la máxima concentración utilizada en cada caso.

Ensayo con Cristal Violeta

Células Vero crecidas en microplaca de 96 pocillos, fueron incubadas en presencia de diluciones seriadas de los distintos extractos durante 72 horas. Al finalizar la incubación, se retiró el medio y se fijaron las células con formol al 10%. Luego de fijarlas se descartó el formol y se realizaron lavados con agua corriente, para teñir con una solución de cristal violeta 0,05%. Se retiró el exceso de cristal violeta y nuevamente se lavó exhaustivamente con agua, dejando secar la microplaca al aire. Posteriormente se resuspendió el colorante ya fijado con una solución 50% etanol 0,1% de ácido acético en agua, para proceder a leer la DO. Solo se tiñen las células que han quedado fijadas a la superficie del pocillo, la lectura de la DO nos devuelve un valor proporcional a esa cantidad de células, las que mueren en el tratamiento no quedan adheridas a la placa y se pierden en los lavados.

Con los datos obtenidos de las lecturas de DO se estimó la Concentración Citotóxica 50 (CC₅₀) mediante un ajuste lineal. Para los compuestos en que la viabilidad celular fue mayor al 50% en todas las concentraciones ensayadas, se informó que la CC₅₀ es mayor a la máxima concentración utilizada en cada caso.

Actividad antiviral

Inhibición de la acción citopática viral

El ensayo fue realizado en placa de 96 pocillos con células Vero crecidas hasta confluencia, 10⁵ células por pocillo. Se retiró el medio de crecimiento y se inocularon 25 µL de una suspensión de HHV-1 en MEM 1,5% con una m.i. de 0,06 UFP/célula. Se dejó adsorber durante 1 hora a 37°C en estufa gaseada. Luego se agregaron 100 µL de las diluciones seriadas al medio del extracto a evaluar, por triplicado. Como control viral se dejaron pocillos infectados sin tratar y como control celular, también sin tratar y sin inóculo viral. Las microplacas fueron incubadas a 37°C durante 48 hs post infección (p.i.) en estufa gaseada. Al finalizar el periodo de incubación, las células se fijaron con formol 10% y se tiñeron con cristal violeta 0,05%, luego se leyó la DO en el lector de microplacas.

Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de inhibición de la ACP para cada extracto usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición de ACP} = \frac{\overline{DO}_x - \overline{DO}_{CV}}{\overline{DO}_{CC} - \overline{DO}_{CV}} \times 100$$

Donde \overline{DO}_x es la DO media de las células infectadas y tratadas con una dilución determinada de un extracto, \overline{DO}_{CV} es la DO media del control de virus y \overline{DO}_{CC} es la DO media del control de células. Cuando el valor obtenido fue mayor a 100, se informó que el porcentaje de inhibición de la ACP fue del 100% y en el caso en que el valor obtenido fuera negativo, se informó un 0% de inhibición de la ACP.

Con estos resultados, se realizaron los gráficos del porcentaje de inhibición de la ACP en función de la concentración para los distintos extractos. A partir de estos gráficos, se determinó la Concentración Efectiva 50 (CE₅₀) para cada uno. Este parámetro representa la concentración de una sustancia que reduce al 50% el efecto citopático del virus.

Actividad antibacteriana

Para determinar la actividad antibacteriana de los distintos extractos, se realizaron ensayos utilizando los siguientes microorganismos: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus epidermidis*, provenientes del ATCC.

Ensayo de difusión en agar

Partiendo de cultivos *over night* en caldo nutritivo, se realizó un hisopado en placa de Petri con agar nutritivo. Luego, en distintos puntos de la placa, se agregaron los diferentes extractos. Se colocaron 4 gotas de 10 μ L por extracto de manera de que se absorban en la placa en un mismo punto sin dispersarse. Como control se agregaron gentamicina y metanol. Este procedimiento se realizó para cada uno de los microorganismos. Luego de administrar los extractos y los controles las placas se incubaron, sin invertir, en estufa a 37°C durante 24 horas. Al finalizar la incubación, se observaron los halos de inhibición y se midió el diámetro de los mismos en los casos que se pudieron apreciar.

Ensayo de Concentración Inhibitoria Mínima

Los valores de CIM para las cepas bacterianas fueron determinadas por microdilución en caldo. Las cepas fueron inoculadas en caldo nutritivo e incubadas *over-night* a 37°C para obtener cultivos frescos. Las suspensiones de cada microorganismo fueron ajustadas con caldo nutritivo a una densidad de 0,5 correspondiente a la escala de McFarland. La microplaca de 96 pocillos fue preparada agregando 95 μ L de caldo nutritivo y 5 μ L del inóculo de bacteria. Luego se le añadieron 100 μ L de las diluciones seriadas al medio de los distintos extractos, de gentamicina como control de inhibición y de MEM 5% sin antibiótico como control de crecimiento. Además, se dejó una columna de pocillos sin inocular, con 100 μ L de caldo y 100 μ L de diluciones seriadas al medio de MEM 5% sin antibiótico como blanco de absorbancia. Las microplacas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas en cámara húmeda. El crecimiento de las bacterias fue determinado por absorbancia a 600 nm en un lector de microplacas. Los valores de CIM fueron determinados como la mínima concentración de extracto que inhibió el crecimiento de los microorganismos.

Ensayo de Concentración Bactericida Mínima

A partir del ensayo de la CIM, se tomaron 10 μ L de aquellas suspensiones correspondientes a la CIM o a los tratamientos con concentraciones mayores a ésta. Estos inóculos fueron dispensados en placas con agar nutritivo que se incubaron durante 24 horas a

37°C. Al finalizar la incubación, se observó la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano. Se determinó la CBM como la concentración más baja que eliminó más del 99,9% de microorganismos.

RESULTADOS

Obtención de los extractos.

Para contar con los distintos extractos utilizados en este trabajo de tesis, la materia prima fue recolectada de árboles de *Melia azedarach* L de la Ciudad de Buenos Aires. Debido a que se trabajó con distintas partes del árbol para la elaboración de los extractos, la recolección de las mismas se llevó a cabo en distintos períodos del año. Las hojas fueron recolectadas en el mes de noviembre, como se ha publicado previamente (Wachsman *et al.*, 1984). Los frutos verdes se recogieron en febrero, mientras que los frutos maduros fueron recolectados a fines de julio, debido a que maduran durante el invierno cuando el árbol pierde las hojas. De estos frutos se apartaron las semillas para la realización del extracto de semillas. Las flores se obtuvieron en primavera, entre los meses de septiembre y octubre. Cabe destacar que las raíces provenían de plantines de *Melia azedarach* L. producidos en el laboratorio con anterioridad.

Teniendo en cuenta los resultados previos obtenidos en el laboratorio y sabiendo que al realizar la extracción con acetato de etilo se observa actividad antiviral (Alché *et al.*, 2000), utilizamos este solvente y metanol con el fin de comparar las bioactividades resultantes al realizar la extracción con distintos solventes.

Siguiendo el procedimiento informado en materiales y métodos se lograron obtener 9 extractos de las distintas partes de la planta. Los extractos de hojas, frutos, frutos verdes, semillas, flores y raíces obtenidos se detallan en el Cuadro 1.

Cuadro 1: Extractos obtenidos de *Melia azedarach* L

Parte de la planta	Solvente	Abreviatura
Hojas	Acetato de Etilo	EH
Frutos	Acetato de Etilo	EFr
Semillas	Acetato de Etilo	ES
Raíces	Metanol	ER
Flores	Acetato de Etilo	EFloA
Flores (púrpura)	Metanol	EFloMp
Flores (verde)	Metanol	EFloMv
Frutos verdes	Acetato de Etilo	EFruvA
Frutos verdes	Metanol	EFruvM

Resumen de los extractos obtenidos con el solvente utilizado para la extracción y abreviatura con la que se referirá a los mismos.

La obtención de los extractos se llevó a cabo según el protocolo obteniendo muy buenos resultados, aunque cabe aclarar algunos detalles:

Al evaporar el solvente en el macerado de flores con metanol, se observaron dos fases, una líquida, color púrpura y otra sólida de color verde. Al ver las diferencias, en cuanto a la solubilidad de las mismas y su color, se decidió tratarlos como dos extractos distintos con el fin de observar si las sustancias extraídas difieren en sus propiedades antivirales y antibacterianas, es por ello que hay dos extractos metanólicos de flores, el púrpura (EFloMp) y el verde (EFloMv).

En cuanto al extracto de raíces de plantines, debido a que la masa era escasa, sólo 2,28 gramos, se realizó la extracción con metanol únicamente, ya que la extracción con acetato de etilo conlleva más pasos y como es inevitable perder algo de masa en el proceso, el rendimiento final sería menor. Por lo tanto, se optó por dejar macerar en metanol y luego evaporar el solvente.

Al realizar el extracto de frutos verdes se observó que éstos contienen mucha agua y al dejar macerar en metanol se formó una emulsión que no se pudo evaporar completamente en el rotaevaporador, quedando un gran volumen de residuo (9,5 mL) posiblemente con alto contenido de metanol. Este residuo fue el que se denominó como EFruvM y a partir del cual se realizaron diluciones con las que se trabajó.

Citotoxicidad

Habiendo obtenido los extractos, se procedió a evaluar la citotoxicidad *in vitro* para conocer el rango de concentraciones en las cuales son tóxicos en las condiciones a utilizar en nuestro laboratorio. Además, esta información resulta útil para los ensayos de actividad antiviral. La evaluación de los extractos se realizó en células Vero mediante la técnica del MTT que involucra el clivaje de la sal de tetrazolio (Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol).

Resumidamente, las células Vero crecidas en monocapa fueron tratadas con diluciones seriadas al medio de los distintos extractos provenientes de *Melia azedarach* L. Éstas fueron incubadas durante 48hs y luego se procedió con el ensayo del MTT, el cual relaciona la cantidad de células viables con el nivel de formazan producido (Denizot and Lang, 1986). Al finalizar las dos horas de incubación con MTT, se retiró el medio y se resuspendió la sal con etanol 96% para posteriormente realizar la lectura de DO en el lector de microplacas. Con estos resultados se calculó el porcentaje de viabilidad comparando contra un control sin tratamiento el cual se asumió como 100% de viabilidad.

Debido a las regulaciones respecto al acceso a los laboratorios de la facultad por los motivos de la pandemia por COVID-19, para poder cumplir con el tiempo de los turnos provistos,

la evaluación de la citotoxicidad de los extractos EFruvM, EFruvA y ER se realizó mediante el ensayo de viabilidad por tinción con cristal violeta. Este cambio se introdujo teniendo en cuenta que con este método al no ser necesario incubar con ningún reactivo porque las células se fijan y se tiñen, se reduce notablemente el tiempo del ensayo. La restricción impuesta por los turnos llevó, además, a que en estos casos la citotoxicidad se evaluara a las 72 horas de incubación a diferencia de los demás extractos que fueron evaluados a las 48 horas.

Brevemente, en el ensayo de viabilidad por tinción con cristal violeta, luego de cumplido el tiempo de incubación de las células con las distintas diluciones de los extractos, se descarta el medio y se fijan las células con formol 10%. Luego de retirar el formol y lavar con agua corriente, las células se tiñen con cristal violeta 0,05%. Se retira el exceso de cristal violeta y nuevamente se realizan lavados exhaustivos con agua, dejando secar al aire. Se resuspende el colorante, con una solución 50% etanol 0,1% de ácido acético en agua, para proceder a leer la DO. Solo se tiñen las células que han quedado fijadas a la superficie del pocillo, la lectura de la DO arroja un valor proporcional a esa cantidad de células, las que mueren en el tratamiento no quedan adheridas a la placa y se pierden en los lavados.

A partir de los datos obtenidos se realizaron los gráficos de las Figuras 3, 4 y 5 de los cuales se estimó la Concentración Citotóxica 50 (CC_{50}), que es un parámetro indicador de toxicidad y señala la concentración a la cual el extracto reduce la viabilidad celular en un 50%. Este parámetro se obtuvo mediante un ajuste lineal. En el cuadro 2 se muestran los valores de CC_{50} calculados.

Los primeros extractos evaluados fueron EH, EFr y ES (Figura 3), cuya concentración más alta fue de 1,5 mg/mL. Dado que no se observó efecto citotóxico en ellos a esas concentraciones, se decidió aumentar las cantidades a ensayar para los siguientes extractos, siempre que fuera posible, con el objetivo de encontrar el rango de diluciones donde se aprecie el efecto citotóxico, aun así, se observa que la mayoría de los extractos (EH, ES, EFr, ER, EFloMp y EFloMv) no resultaron tóxicos en las dosis evaluadas.

Es de saber popular que los frutos del paraíso son venenosos, de ahí que se refieren a ellos como “venenitos”, es por eso que se esperaba que el extracto de frutos (EFr) resultara tóxico (Figura 3B), sin embargo, las concentraciones utilizadas no muestran citotoxicidad. A pesar de ello, hay estudios publicados que evalúan la toxicidad de los frutos, y demuestran que los frutos maduros son más venenosos que los verdes, además señalan que es la pulpa la parte de la fruta que es tóxica a diferencia de las semillas que no lo son (Méndez *et al.*, 2002). Como ya se mencionó, el extracto de frutos no resultó tóxico, el valor obtenido de CC_{50} es mayor a 1,5

mg/mL, mientras que, al ensayar un rango de concentraciones más amplio con el extracto de frutos verdes con acetato (EFruvA) se obtuvo el valor de CC_{50} , de 22,9 mg/mL indicando también una baja toxicidad. Además, los resultados obtenidos con el extracto de semillas también coinciden con el reporte mostrando que éste no fue tóxico en las condiciones ensayadas. Cabe aclarar que la toxicidad se evaluó sobre células Vero mientras que en el estudio mencionado evaluaron la toxicidad por ingestión *in vivo*.

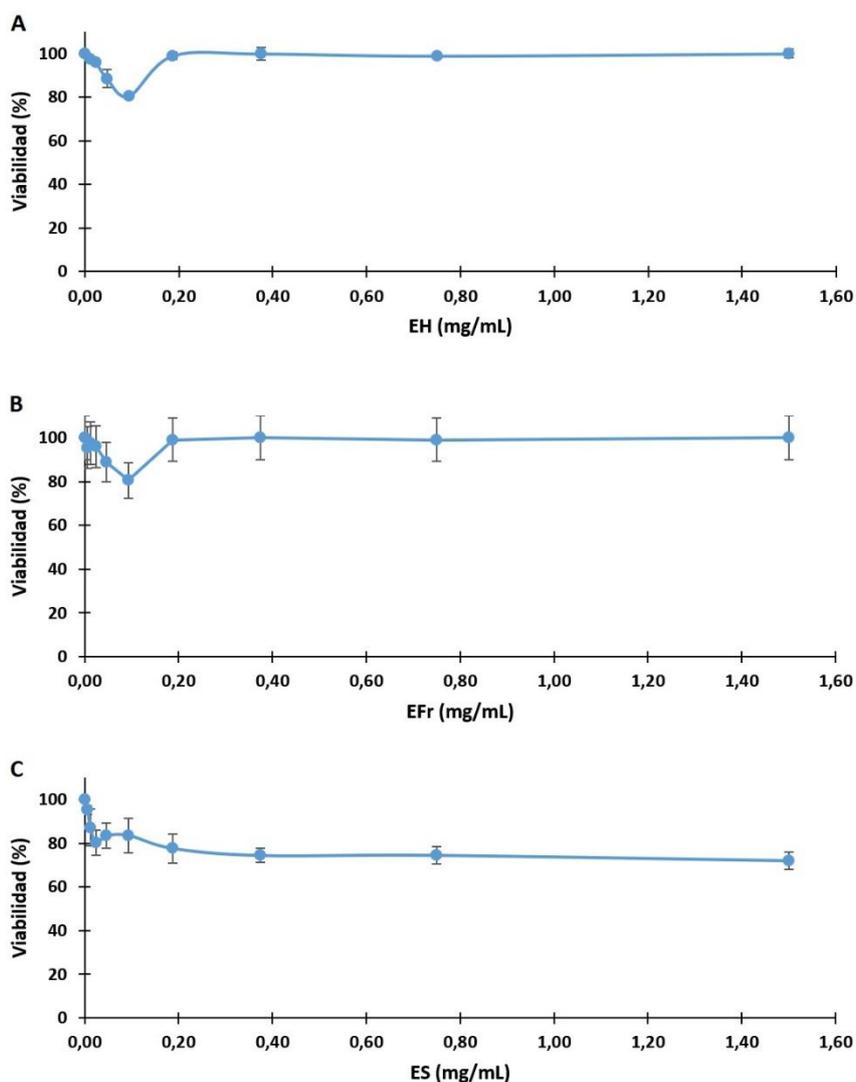


Figura 3: Citotoxicidad de los extractos de hojas (A), frutos maduros (B) y semillas (C). Viabilidad luego de 48 horas de tratamiento con distintas concentraciones de extracto. Cada valor se obtuvo del ensayo de viabilidad celular con MTT comparado contra el control de células el cual representa el 100%. En la Figura se muestran el promedio y desvío estándar de tres réplicas.

Ninguno de los extractos de flores obtenidos con metanol resultó tóxico en la evaluación, los valores de CC_{50} obtenidos son mayores a la concentración más elevada, mientras que el obtenido con acetato de etilo (Figura 4) dio una CC_{50} de 3,28 mg/mL. Para poder comparar la citotoxicidad es necesario realizar nuevamente el ensayo utilizando concentraciones mayores

de los extractos para poder determinar las CC_{50} y compararlas y determinar cuál de todos los extractos es el más tóxico. Del gráfico de la Figura 4C se desprende que, de todos los extractos evaluados, el EFloA es el más tóxico, llegando a un 80% de mortalidad al usar una concentración de 5 mg/mL.

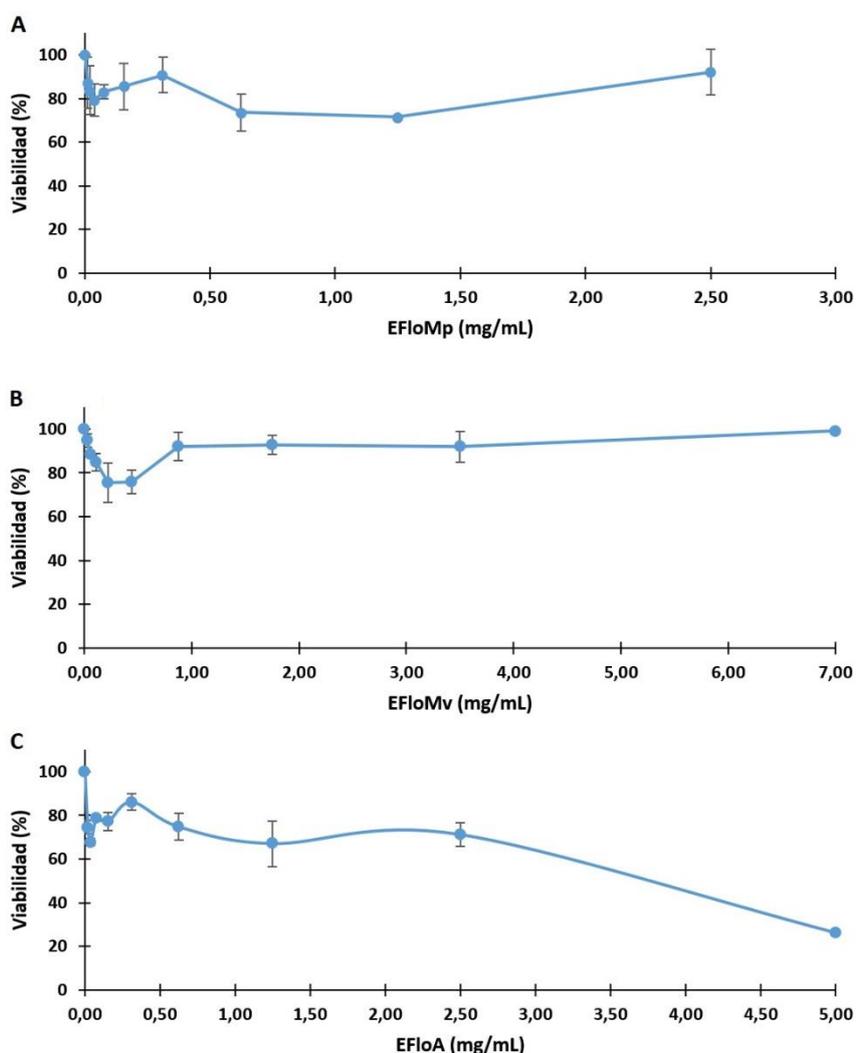


Figura 4: Citotoxicidad de los extractos de flores con metanol (**A y B**) y acetato de etilo (**C**). Viabilidad luego de 48 horas de tratamiento con distintas concentraciones de extracto. Cada valor se obtuvo del ensayo de viabilidad celular con MTT comparado contra el control de células el cual representa el 100%. En la Figura se muestran el promedio y desvío estándar de tres réplicas.

En el ensayo con EFruvA (Figura 5B) se pudo observar la reducción en la viabilidad a una concentración más de 10 veces mayor que la de EFr, pero debido a que el tiempo de exposición fue mayor (72 horas en vez de 48), y siendo que no se obtuvo el valor exacto de CC_{50} de EFr, no es posible comparar directamente y establecer si un extracto es más tóxico que otro. Por otro lado, es probable que al aumentar el tiempo de incubación de EFr a 72 horas, se observe el efecto tóxico a una concentración menor que EFruvA.

Como se mencionó antes, al realizar el extracto de frutos verdes metanol (EFruvM) no se logró evaporar todo el solvente, quedando un gran volumen residual de líquido, unos 9,5 mL. Es este líquido el cual tomamos como extracto madre, del cual se desconoce la cantidad de metanol que contiene. En la Figura 5C se puede ver como disminuye la viabilidad a medida que la concentración aumenta, de la dilución 1/1280 a 1/320, cayendo por debajo del 20% de viabilidad, lo que prueba que es muy tóxico a esa dilución. Sin embargo, a partir de la dilución 1/160 y hasta la más concentrada, la viabilidad “aumenta”. Es probable que en esas diluciones la cantidad de metanol presente haya fijado las células a la microplaca y al medir la DO se observan estos valores altos, enmascarando la posible toxicidad del extracto. Dado que de EFruvM no se obtuvo su peso seco, y que es probable que contenga mucho metanol, el cual es tóxico para las células, no fue posible estimar la CC_{50} del extracto.

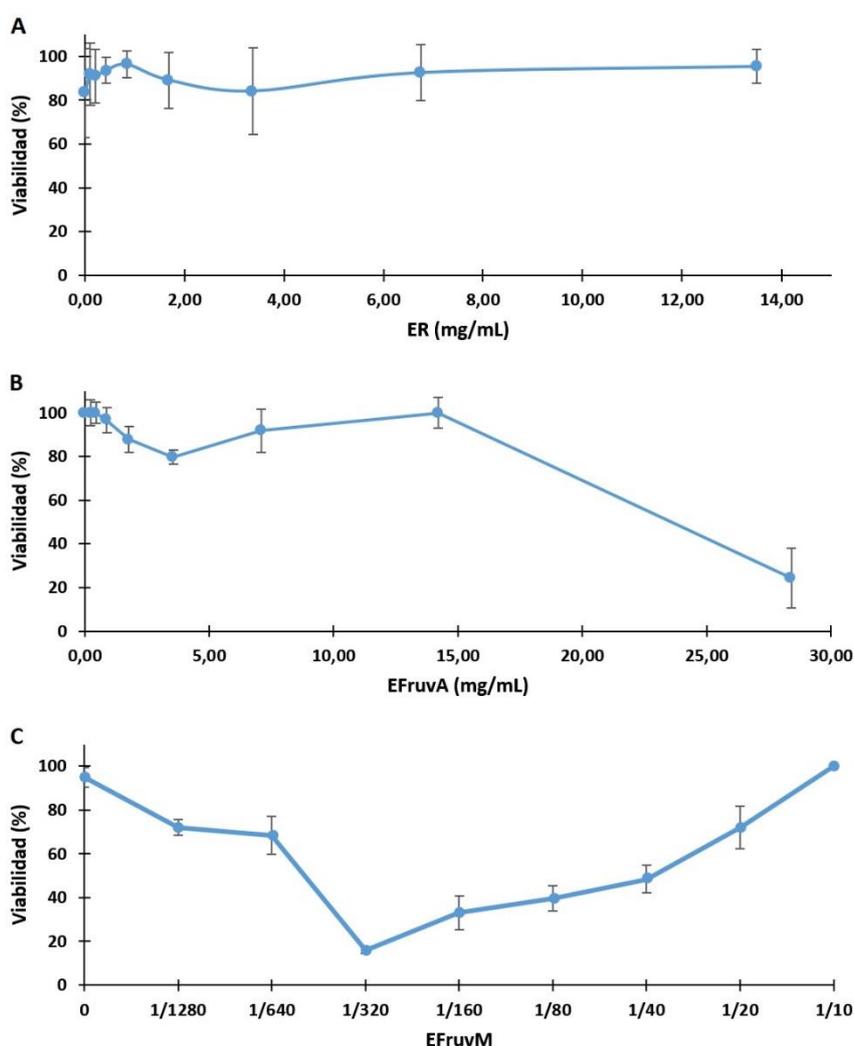


Figura 5: Citotoxicidad de los extractos de raíz (A) y frutos verdes con acetato de etilo (B) y metanol (C). Viabilidad luego de 72 horas de tratamiento con distintas concentraciones de extracto. Cada valor se obtuvo del ensayo de viabilidad celular con cristal violeta comparado contra el control de células el cual representa el 100%. En la Figura se muestran el promedio y desvío estándar de tres réplicas.

Cuadro 2: Citotoxicidad de los extractos obtenidos de *Melia azedarach L*

Extracto	Solvente	CC ₅₀ (mg/mL)
EH	Acetato de etilo	>1,5
EFr	Acetato de etilo	>1,5
ES	Acetato de etilo	>1,5
EFloA	Acetato de etilo	3,28
EFloMp	Metanol	>2,5
EFloMv	Metanol	>7
EFruvA	Acetato de etilo	22,9
EFruvM	Metanol	-
ER	Metanol	>13,5

Valores de CC₅₀ obtenidos mediante interpolación a partir de los gráficos de porcentaje de viabilidad vs concentración del extracto. En los casos en los cuales la viabilidad fue mayor al 50% para todas las diluciones ensayadas se informa la CC₅₀ como mayor a la concentración más alta utilizada.

Actividad antiviral

Inhibición de la acción citopática viral

A partir de los datos obtenidos de las pruebas de citotoxicidad, se estableció el rango de concentraciones no citotóxicas a utilizar de los distintos extractos en los ensayos de inhibición de la ACP. Este ensayo permite conocer la capacidad de los extractos de inhibir el efecto citopático, el cual es causado por la replicación viral. De inhibirse, se observaría un mayor número de células vivas en presencia del extracto al comparar con aquellas infectadas con el virus y sin tratar.

Las células Vero crecidas en monocapa fueron infectadas con HHV-1 a una m.i. de 0,06, luego de una hora de adsorción fueron tratadas con diluciones de los distintos extractos e incubadas por 48 horas, y en algunos casos por 72 horas. Esta diferencia en los tiempos se debe a la disposición de los turnos otorgados por la Facultad, por motivos de la pandemia por COVID-19. Al finalizar la incubación, las células fueron fijadas con formol 10% y teñidas con cristal violeta 0,05%. Luego de resuspender el colorante se leyó la DO en un lector de microplacas y se calculó el porcentaje de inhibición usando la ecuación detallada en materiales y métodos.

En las Figuras 6, 7 y 8 se muestran los gráficos de los porcentajes de inhibición en función de la concentración del extracto utilizado. A partir de estos se calculó, mediante un ajuste lineal, la Concentración Efectiva 50 (CE₅₀) de cada extracto, parámetro que indica la concentración necesaria para reducir al 50% el efecto citopático producido por el virus. En el cuadro 3 se muestran los valores de CE₅₀ obtenidos y el Índice de Selectividad (IS) de los extractos. Este último, es un parámetro que relaciona la actividad antiviral de un extracto con su citotoxicidad.

Surge del cociente entre la CC_{50} y la CE_{50} , cuanto mayor es este cociente más efectivo es el extracto contra el virus a concentraciones poco tóxicas para las células, y por ende más selectivo.

A medida que aumenta la concentración de EFr (Figura 6B), desde 0,4 mg/mL en adelante, se observa que disminuye la inhibición de la ACP, sin embargo, el extracto a esas concentraciones no resultó tóxico. En cambio, EH mantuvo un porcentaje de inhibición mayor al 90% en todas las concentraciones y ES un promedio cercano al 80% de inhibición en todas las diluciones.

Los extractos de la Figura 6 son los que mayor actividad antiviral mostraron, en concentraciones bajas presentaron una inhibición de la ACP mayor al 80% y acorde a las CE_{50} obtenidas, alcanzan el 50% de inhibición a una concentración menor que el resto. Con una CC_{50} mayor a 1,5 mg/mL y un efecto inhibitorio cercano al 90% a una concentración más de 100 veces menor, son los que poseen el índice de selectividad más alto, lo que los convierte en los mejores candidatos para continuar investigando su posible aplicación a futuro.

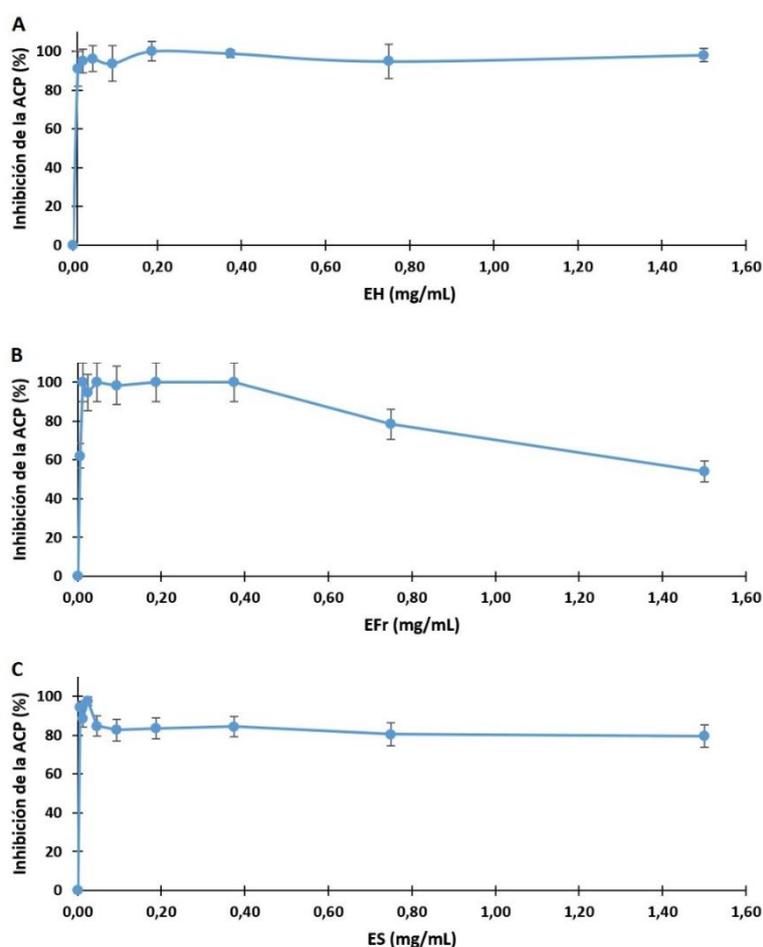


Figura 6: Actividad antiviral de los extractos de hojas (A), frutos maduros (B) y semillas (C), determinada por inhibición de la ACP. Los valores mayores o iguales a 100 se representan como el 100% de inhibición. El ensayo se realizó con una m.i. de 0,06 UFP/célula y a 48 hs p.i. Se muestran el promedio y desvío estándar de tres réplicas.

De los tres extractos de flores (Figura 7), el que mayor porcentaje de inhibición de la ACP presentó es EFloMp, inclusive a concentraciones bajas. Mientras que EFloMv en promedio no supera el 65% de inhibición en todas sus concentraciones. Teniendo en cuenta que ambos extractos se obtuvieron a partir de una misma extracción con metanol, la diferencia de actividad antiviral observada podría deberse a que los compuestos responsables de esta actividad biológica estén presentes principalmente en el líquido púrpura que se obtuvo en el balón luego de evaporar el solvente. Por otro lado, EFloA en promedio tiene valores de inhibición apenas superiores a EFloMv en las concentraciones más altas, y en las más bajas alcanza porcentajes de inhibición del 80% mientras que EFloMv no supera el 70% de inhibición. Los valores de CE_{50} obtenidos fueron similares, dentro del mismo orden, para los tres extractos de flores, pero entre ellos EFloMp presenta mayor inhibición en todas las concentraciones. Dado que los tres extractos presentan actividad antiviral, esta no parece verse afectada por el tipo de solvente utilizado, es probable que las diferencias que se aprecian se deban al origen del material de la planta del que provienen.

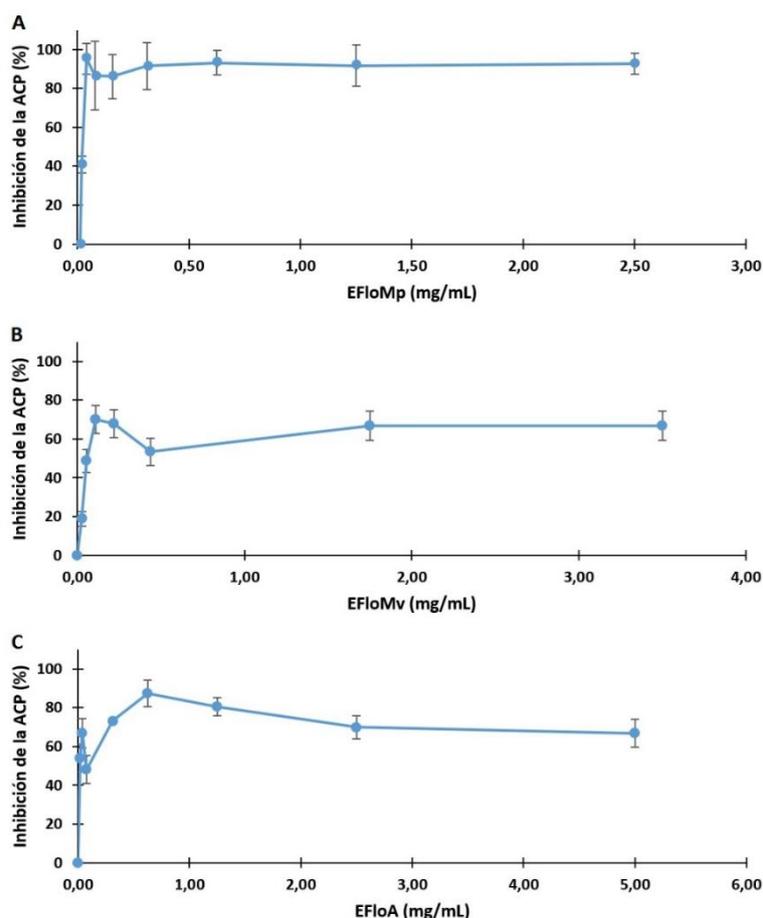


Figura 7: Actividad antiviral de los extractos de flores con metanol (A y B) y acetato de etilo (C) determinada por inhibición de la ACP. El ensayo se realizó con una m.i. de 0,06 UFP/célula y a 48 hs p.i. Se muestran el promedio y desvío estándar de tres réplicas.

Se puede observar en la Figura 8B que el extracto ER muestra valores de inhibición cercanos a los de frutos verdes con acetato (EFruvA), pero los de este último a concentraciones altas disminuyen, mientras que se observa que las diluciones de EFruvM no presentan una inhibición de la ACP mayor al 40% (Figura 8C), es posible que el efecto inhibitorio del 50% se consiga diluyéndolo menos, pero esto cae dentro del rango de concentraciones citotóxicas. Como fue mencionado antes, esta toxicidad puede estar siendo ocasionada por un alto contenido de metanol. Éste forma una mezcla con el agua de los frutos difícil de evaporar, para lograrlo es necesario elevar mucho la temperatura lo que podría destruir los compuestos con actividad biológica. Es por ello que para obtener mejores resultados se debería realizar el extracto nuevamente secando/deshidratando los frutos previamente en una estufa a 37°C durante el tiempo necesario y luego macerándolos en metanol.

Según los valores de CE_{50} obtenidos, los extractos que poseen menor efectividad son ER y EFruvA. Dado que el extracto de raíces de plantines se obtuvo únicamente con metanol, se desconoce si la utilización de acetato de etilo como solvente hubiera dado mejores resultados. En vistas de que los que han tenido mejor actividad antiviral fueron realizados con este solvente, queda pendiente su realización para comparar las bioactividades.

Por otra parte, a pesar de que los ensayos de frutos y frutos verdes fueron realizados a distintos tiempos de incubación, se observó actividad inhibitoria en ambos. Viendo que también las flores mostraron capacidad de inhibir la ACP de HHV-1, es probable que estos compuestos en las flores sean los mismos en los frutos o muy similares.

Al comparar si variaba la bioactividad al usar distintos solventes para extraer, y distintas partes del árbol se observa que, todos presentan actividad antiviral, en mayor o menor medida. Si bien con el n utilizado no se puede hacer un estudio estadístico robusto, nuestros resultados muestran que, mientras que el extracto de semillas es el de menor valor de CE_{50} (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$), el extracto de hojas es el que mayor actividad presenta, cercana a un 95% de inhibición en todas las concentraciones utilizadas en las condiciones ensayadas.

Para determinar qué solvente extrae mejor el o los principio/s activos con actividad antiviral, es necesario realizar nuevos extractos para comparar, ya que no todas las partes de *Melia azedarach* L utilizadas fueron extraídas por ambos solventes. Lo que no permite distinguir si las diferencias observadas son por el solvente usado o por la parte de la planta del cual provienen.

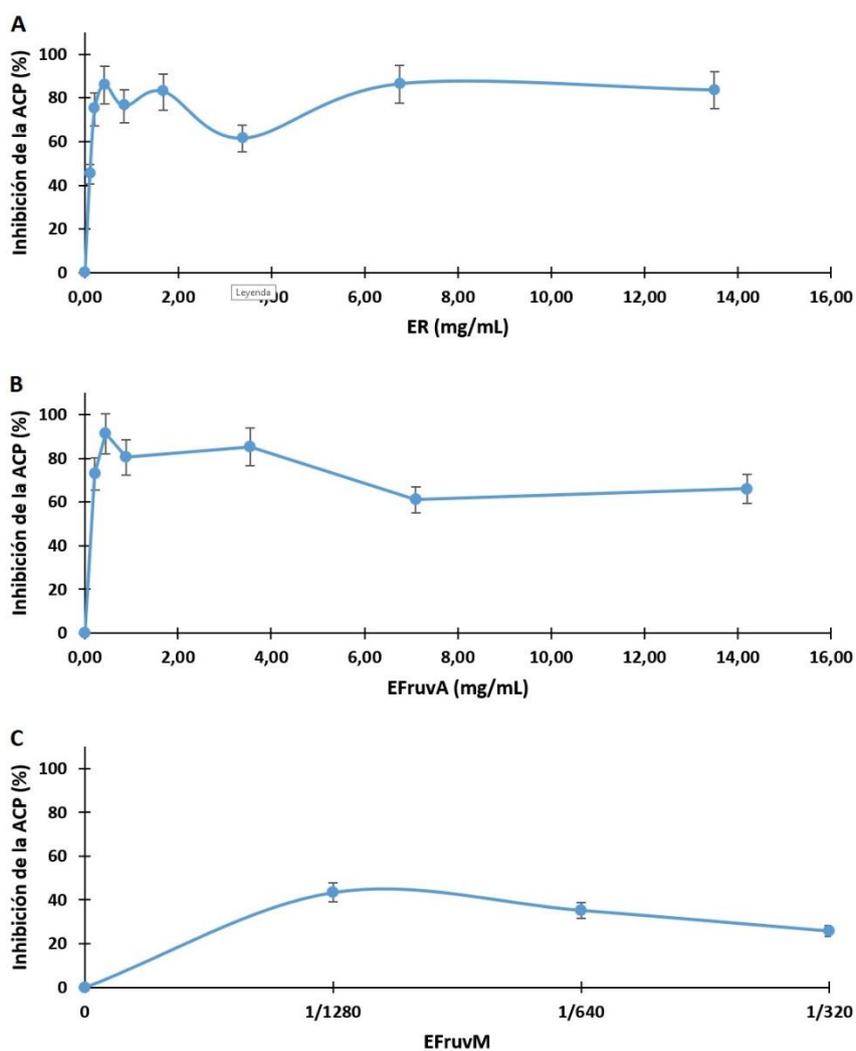


Figura 8: Actividad antiviral de los extractos de raíz (A) y frutos verdes con acetato de etilo (B) y metanol (C). Determinada por inhibición de la ACP. El ensayo se realizó con una m.i. de 0,06 UFP/célula y a 72hs p.i. Se muestran el promedio y desvío estándar de tres réplicas.

Cuadro 3: Efecto antiviral de los extractos de *Melia azedarach* L.

Extracto	CE ₅₀ (µg/mL)	CC ₅₀ (µg/mL)	IS
EH	8	>1500	>187,5
EFr	6	>1500	>250
ES	4	>1500	>375
EFloA	50	3280	65,6
EFloMp	24	>2500	>104,2
EFloMv	71	>7000	>98,6
EFruvA	403	22900	56,8
EFruvM	-	-	-
ER	177	>13500	>76,3

Valores de CE₅₀ obtenidos de la inhibición de la ACP, CC₅₀ e IS para los distintos extractos.

Actividad Antibacteriana

Ensayo de difusión en agar

Con el fin de evaluar la actividad antibacteriana de los extractos, se realizó un ensayo de difusión en agar con las siguientes bacterias: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, y *Staphylococcus epidermidis*. Se hisoparon placas con agar nutritivo con cada una de estas cepas provenientes de cultivos *over-night* en caldo nutritivo, luego se agregaron 40 μ L de cada extracto, dispensados en 4 gotas de 10 μ l y ubicados en puntos distantes para que el extracto se absorba en un punto y no se derrame sobre la placa. Se realizó el mismo procedimiento con gentamicina como control de inhibición y con metanol como control de toxicidad del solvente respectivamente. Luego se incubaron las placas sin invertir a 37°C por 24 horas.

Los resultados se muestran en la Figura 9. Los extractos se utilizaron en la concentración más alta obtenida con el fin de aumentar la probabilidad de evidenciar la acción antibacteriana. Luego de 24 horas de incubación, se observó que no hubo suficiente crecimiento bacteriano en las placas. La placa inoculada con *E. coli* (Figura 9C) fue la que mayor crecimiento de bacterias tuvo, ya que aparecieron colonias muy cercanas asemejándose a un “césped”, suficiente como para notar la aparición de halos de inhibición en los puntos 4 y 8 (EFloMp y EFruvA). Mientras que *S. epidermidis* (Figura 9A) y *S. aureus* (Figura 9B) no crecieron lo suficiente para ser visibles.

Como se puede observar en la Figura 9, algunos extractos parecen estar contaminados ya que presentan mayor crecimiento bacteriano en el lugar donde se aplicaron. Esta contaminación en presencia de *E. coli* y *S. epidermidis* pudo crecer sin problemas, pero en presencia de *S. aureus* se ve reducida. Teniendo en cuenta la morfología de colonia parecería tratarse del mismo tipo de bacteria la que se encuentra presente en todos los extractos. Como de los 9 extractos, en 7 se observa el crecimiento de una bacteria contaminante, es probable que provenga de la materia prima o del proceso de extracción ya que los materiales utilizados al principio de la extracción no eran estériles. Sin embargo, en los sitios donde se colocó EFloMp y EFruvA (4 y 8) no hay presencia de colonias contaminantes. En las placas inoculadas con *E. coli* se ve un halo de inhibición de 1,4 cm de diámetro, limpio sin crecimiento de ningún tipo y en las placas inoculadas con las otras cepas no se ve crecimiento en los mismos lugares, a pesar de que en los otros extractos creció el contaminante. Este podría ser un indicio de una acción antibacteriana con un posible efecto bactericida.

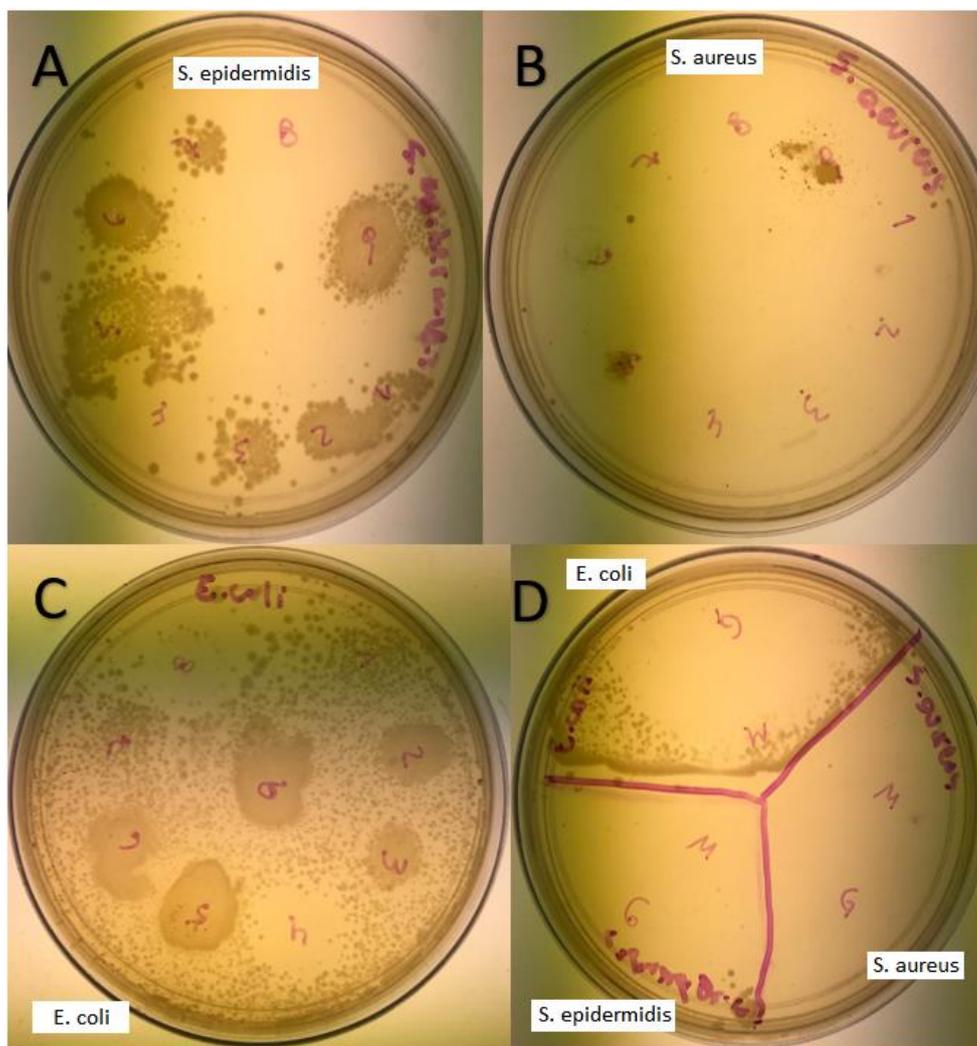


Figura 9: Ensayo de difusión en agar con extractos de *Melia azedarach* L. Placas de agar nutritivo inoculadas con *S. epidermidis* (A), *S. aureus* (B), *E. coli* (C). Controles con gentamicina y metanol para las tres bacterias (D).

Cuadro 4: Nomenclatura de los extractos y controles de la Figura 9.

	Extracto	Concentración (mg/mL)
1	EH	15
2	EFr	15
3	EFloMv	140
4	EFloMp	30
5	EFloA	100
6	ER	35,5
7	EFruvM	-*
8	EFruvA	28,4
9	ES	15
G	Gentamicina	0,05
M	Metanol	-*

Nombres y nomenclatura de los extractos y controles con la concentración aplicada en cada caso.

*Dilución 1/100 del extracto y metanol puros.

En ambos extractos, EFloMp y EFruvA, la concentración es similar, 30 mg/mL y 28,4 mg/mL respectivamente, a pesar de que fueron realizados con distintos solventes, estos muestran una potencia de acción similar mostrando que la actividad antibacteriana no varía por el solvente usado. Es probable que el o los compuestos con actividad antibacteriana sean los mismos y se encuentren en concentraciones similares en las flores y los frutos. Que ambos contengan los mismos compuestos puede deberse a que en el proceso a partir del cual la flor da fruto, los compuestos presentes en la flor se mantengan durante el desarrollo y perduren en el fruto, quizás luego sean degradados o sufran transformaciones químicas al madurar el fruto, perdiendo la capacidad antibacteriana, dado que en EFr, no se vio este efecto.

Ensayo de Concentración Inhibitoria Mínima

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el ensayo de difusión en agar, se procedió a determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de los extractos, mediante un ensayo de microdilución en caldo utilizando las mismas bacterias. Como previamente se observó la presencia de contaminantes en todos los extractos, antes de proceder se les realizó una centrifugación para decantar las bacterias presentes y trabajar con el sobrenadante. Como control se tomaron alícuotas de los extractos que se incubaron en caldo nutritivo por 24 horas, tiempo al que no se observó crecimiento alguno.

El ensayo se realizó en multiplaca de 96 pocillos de la siguiente forma: se agregaron 95 μ L de caldo nutritivo a todos los pocillos, luego 5 μ L del inóculo de bacteria, proveniente de un cultivo fresco ajustado a una densidad de 0,5 en la escala de McFarland y por último 100 μ L de diluciones seriadas al medio de los distintos extractos para un volumen final de 200 μ L. Como control positivo, se agregó el mismo volumen de diluciones de gentamicina y como negativo diluciones de MEM 5% sin antibiótico, además se dejó una columna sin inocular, con 100 μ L de caldo y 100 μ L de diluciones de MEM 5% sin antibiótico como blanco de absorbancia. Luego se incubaron las microplacas a 37°C durante 24 horas en cámara húmeda y se determinó el crecimiento de las bacterias por absorbancia a 600 nm en un lector de microplacas. Los resultados se detallan en los cuadros 5, 6 y 7.

Como se vio en el ensayo de difusión, los extractos EFloMp y EFruvA mostraron actividad contra *E. coli* y la CIM obtenida de los mismos es de 7,5 mg/mL y 7,1 mg/mL respectivamente. Además, estos extractos también mostraron actividad inhibitoria contra las otras cepas, con valores de CIM para *S. aureus* de 7,5 mg/mL (EFloMp) y 7,1 mg/mL (EFruvA) y para *S. epidermidis* de 1,88 mg/mL (EFloMp) y 1,78 mg/mL (EFruvA). Con las tres bacterias ensayadas se ve que las CIM de los extractos de flores y frutos son muy similares, lo que reafirma la hipótesis de que

podrían ser los mismos compuestos los que poseen actividad antibacteriana y que se encontrarían en las mismas proporciones en estos extractos.

Por otra parte, ER también tuvo efecto contra los tres microorganismos, con valores de CIM más altos que los anteriores, de 17,75 mg/mL en todas las cepas. Se esperaba encontrar actividad antibacteriana en el extracto de raíz, por el hecho de ser la parte de la planta con estrecho contacto con la microbiota del suelo, aunque en el ensayo de difusión no se pudo percibir. El hecho de que fuera un cultivo líquido es probable que haya permitido que difunda mejor el extracto que en el agar, lo que permitió que en este ensayo se perciba esta actividad. Además, se observó que EfloA, aunque no inhibe el crecimiento de *E. coli*, puede inhibir a ambos estafilococos con valores de CIM de 25 mg/mL.

Ensayo de Concentración Bactericida Mínima

Para corroborar si la inhibición se debe a un efecto bactericida o no, se tomaron 10 µL de aquellas diluciones en las que se determinó la CIM de los extractos y de las diluciones anteriores más concentradas. Se inocularon placas con agar nutritivo, que se incubaron durante 24 horas a 37°C. Al finalizar la incubación se determinó la CBM como la concentración más baja en la que no se observó crecimiento de los microorganismos. Los resultados se informan en los cuadros 5, 6 y 7.

Cuadro 5: Resultados obtenidos a partir de los ensayos de CIM y CBM con los extractos de *M. azedarach* L. contra *Escherichia coli*.

Extracto	Concentración (mg/mL)	Crecimiento	CIM (mg/mL)	Crecimiento	CBM (mg/mL)
EH	7,50	Si	-	-	-
	3,75	Si		-	
	1,88	Si		-	
	0,94	Si		-	
EFr	7,50	Si	-	-	-
	3,75	Si		-	
	1,88	Si		-	
	0,94	Si		-	
ES	7,50	Si	-	-	-
	3,75	Si		-	
	1,88	Si		-	
	0,94	Si		-	
EFloMp	15,00	No	7,50	No	7,50
	7,50	No		No	
	3,75	Si		-	
	1,88	Si		-	
EFloMv	70,00	Si	-	-	-
	35,00	Si		-	
	17,50	Si		-	
	8,75	Si		-	

Cuadro 5: Continuación

Extracto	Concentración (mg/mL)	Crecimiento	CIM (mg/mL)	Crecimiento	CBM (mg/mL)
EFloA	50,00	Si	-	-	-
	25,00	Si		-	
	12,50	Si		-	
	6,25	Si		-	
EFruvM ^a	1/200	Si	-	-	-
	1/400	Si		-	
	1/800	Si		-	
	1/1600	Si		-	
EFruvA	14,20	No	7,10	No	7,10
	7,10	No		No	
	3,55	Si		-	
	1,78	Si		-	
ER	17,75	No	17,75	Si	-
	8,88	Si		-	
	4,44	Si		-	
	2,22	Si		-	
CP ^b	0,008	No	0,004	No	0,004
	0,004	No		No	
	0,002	Si		-	
	0,001	Si		-	

^a La concentración de EFruvM se informa como la dilución utilizada. ^b Control positivo: Gentamicina.

Cuadro 6: Resultados obtenidos a partir de los ensayos de CIM y CBM con los extractos de *M. azedarach* L. contra *Staphylococcus aureus*.

Extracto	Concentración (mg/mL)	Crecimiento	CIM (mg/mL)	Crecimiento	CBM (mg/mL)
EH	7,50	Si	-	-	-
	3,75	Si		-	
	1,88	Si		-	
	0,94	Si		-	
EFr	7,50	Si	-	-	-
	3,75	Si		-	
	1,88	Si		-	
	0,94	Si		-	
ES	7,50	Si	-	-	-
	3,75	Si		-	
	1,88	Si		-	
	0,94	Si		-	
EFloMp	15,00	No	7,50	No	7,50
	7,50	No		No	
	3,75	Si		-	
	1,88	Si		-	
EFloMv	70,00	Si	-	-	-
	35,00	Si		-	
	17,50	Si		-	
	8,75	Si		-	
EFloA	50,00	No	25,00	No	50,00
	25,00	No		Si	
	12,50	Si		-	
	6,25	Si		-	
EFruvM ^a	1/200	Si	-	-	-
	1/400	Si		-	
	1/800	Si		-	
	1/1600	Si		-	

Cuadro 6: Continuación

Extracto	Concentración (mg/mL)	Crecimiento	CIM (mg/mL)	Crecimiento	CBM (mg/mL)
EFruvA	14,20	No	7,10	No	7,10
	7,10	No		No	
	3,55	Si		-	
	1,78	Si		-	
ER	17,75	No	17,75	Si	-
	8,88	Si		-	
	4,44	Si		-	
	2,22	Si		-	
CP ^b	0,008	No	0,004	No	0,004
	0,004	No		No	
	0,002	Si		-	
	0,001	Si		-	

^a La concentración de EFruvM se informa como la dilución utilizada. ^b Control positivo: Gentamicina.

Cuadro 7: Resultados obtenidos a partir de los ensayos de CIM y CBM con los extractos de *M. azedarach* L. contra *Staphylococcus epidermidis*.

Extracto	Concentración (mg/mL)	Crecimiento	CIM (mg/mL)	Crecimiento	CBM (mg/mL)
EH	7,50	Si	-	-	-
	3,75	Si		-	
	1,88	Si		-	
	0,94	Si		-	
EFr	7,50	Si	-	-	-
	3,75	Si		-	
	1,88	Si		-	
	0,94	Si		-	
ES	7,50	Si	-	-	-
	3,75	Si		-	
	1,88	Si		-	
	0,94	Si		-	
EFloMp	15,00	No	1,88	No	1,88
	7,50	No		No	
	3,75	No		No	
	1,88	No		No	
EFloMv	70,00	Si	-	-	-
	35,00	Si		-	
	17,50	Si		-	
	8,75	Si		-	
EFloA	50,00	No	25,00	No	50,00
	25,00	No		Si	
	12,50	Si		-	
	6,25	Si		-	
EFruvM ^a	1/200	Si	-	-	-
	1/400	Si		-	
	1/800	Si		-	
	1/1600	Si		-	
EFruvA	14,20	No	1,78	No	1,78
	7,10	No		No	
	3,55	No		No	
	1,78	No		No	
ER	17,75	No	17,75	Si	-
	8,88	Si		-	
	4,44	Si		-	
	2,22	Si		-	
CP ^b	0,008	No	0,001	No	0,001
	0,004	No		No	
	0,002	No		No	
	0,001	No		No	

^a La concentración de EFruvM se informa como la dilución utilizada. ^b Control positivo: Gentamicina.

Como se mencionó en el ensayo de difusión, el hecho de que no se observara la presencia de contaminantes en las placas donde se colocó EFloMp y EFruvA parecía un indicio de una posible acción bactericida. Esto se corroboró en este ensayo, obteniendo valores de CBM iguales a la CIM, de 7,5 mg/mL (EFloMp) y 7,1 mg/mL (EFruvA) en *E. Coli* y *S. aureus*, mientras que de 1,88 y 1,78 mg/mL respectivamente en *S. epidermidis*. Los extractos de raíz inhibieron a las tres cepas, pero mostraron que no poseen capacidad bactericida ya que se observó crecimiento de las mismas en las placas con agar. Por otro lado, EFloA fue bactericida contra los estafilococos a una concentración mayor a la CIM, con una CBM de 50 mg/mL. EFloMp y EFruvA fueron realizados con distintos solventes y obtuvieron resultados similares, ER fue realizado con metanol y EFloA con acetato de etilo. Los extractos con ambos solventes muestran actividad antibacteriana, lo que parece tener más impacto sobre esta actividad, es qué parte del árbol se usó en la elaboración del extracto y no el solvente.

DISCUSIÓN

La medicina herbal ha sido utilizada a lo largo de milenios. En primera instancia su implementación se basó en los resultados empíricos, sin un conocimiento de las actividades farmacológicas, mecanismos y constituyentes activos. Es recién a principios del siglo XIX cuando comenzó el uso racional de las medicinas provenientes de plantas, cuando el alemán Friedrich Sertürner logra aislar un agente analgésico e inductor de sueño de la amapola real (*Papaver somniferum*), al cual nombró *morphium* en referencia al dios griego de los sueños (Sertürner, 1817). El interés por los productos naturales fue en aumento, y se ideó la manera de producirlos mediante síntesis química para mejorar la calidad y reducir costos. Es así como en 1853 se logra elaborar por síntesis química el primer compuesto natural: el ácido acetilsalicílico (Kaiser, 2008). A pesar de los avances en la síntesis orgánica y química combinatoria, en las últimas décadas los productos naturales continúan teniendo un gran papel en el descubrimiento de nuevas drogas (Newman and Cragg, 2020).

Uno de los hallazgos más importantes en esta materia fue el obtenido a partir de la corteza del árbol *Taxus brevifolia*, el paclitaxel el cual fue aislado en 1966 y años más tarde comercializado bajo el nombre Taxol[®]. Este compuesto se ha convertido en un medicamento indispensable en la farmacoterapia moderna para el tratamiento de diversos tipos de cáncer.

La gran cantidad de grupos funcionales y centros quirales de los compuestos que ofrecen las plantas, representan una complejidad estructural que dificulta la tarea de replicarlos mediante la síntesis orgánica. Por este motivo, la extracción y aislamiento de compuestos naturales ha cobrado gran importancia.

La elaboración de extractos vegetales es un proceso demandante, y hay diversas maneras de llevarla a cabo, según distintas fuentes (Zhang, Lin and Ye, 2018). La forma elegida en la presente tesis, descrita en materiales y métodos, surgió en base a estudios previos (Alché *et al.*, 2000; Paula Pifarré *et al.*, 2002; Petrera and Coto, 2009; Petrera, 2015), los materiales y herramientas disponibles y el tiempo que implicaba su ejecución.

Puesto que el objetivo general era realizar una comparación de bioactividades presentes en extractos de *Melia azedarach* L, no se analizó el contenido fitoquímico de los mismos. Pensando en elaborar un fitomedicamento de uso tópico, es necesario realizar los estudios para conocer la composición química detallada y poder estandarizar un protocolo de extracción. Sin embargo, llevar a cabo esto supera el trabajo de una tesis de licenciatura por lo que se mantiene como un proyecto a futuro.

La ventaja de realizar extractos, es que, en estos el efecto observado es probable que se deba a la acción conjunta de varios componentes. Como fue mencionado en la introducción, existe el problema de la resistencia antibiótica y a los antivirales, si bien de extractos vegetales pueden obtenerse nuevos compuestos, al purificarlos y utilizarlos como droga, se genera nuevamente una presión de selección y existe el riesgo de desarrollar resistencia. En cambio, la acción conjunta de varios compuestos reduce este riesgo. Por otro lado, la realización de extractos también posee la ventaja de un menor costo en comparación a aislar y purificar compuestos de origen vegetal. El aislamiento de productos naturales puros es un desafío, para esto se emplean diversas técnicas, por ejemplo, cromatografía en columna o HPLC preparativas, que aumentan el costo monetario y de tiempo invertido en la realización de los mismos. Además, el rendimiento final de la purificación suele ser bajo ya que, al atravesar tantos procesos se pierde gran parte de la materia prima.

El objetivo original de esta tesis era comparar las actividades de los extractos realizados con distintos solventes a partir de distintas partes de *Melia azedarach* L y de plantines micropropagados de la misma, sin embargo, por problemas en la producción de los plantines no se pudo realizar y se dejó para más adelante. Luego, con la llegada de la pandemia solo se pudo realizar el extracto de las raíces de plantines, las cuales teníamos reservadas, quedando pendiente los experimentos con plantines micropropagados.

La obtención de los extractos fue exitosa, se obtuvieron nueve extractos a partir de hojas, frutos, flores, y las raíces de plantines. Los obtenidos son: el extracto de hojas (EH), de frutos maduros (EFr), de semillas (ES), los cuales fueron realizados con acetato de etilo únicamente. De las flores se obtuvieron tres extractos, dos con metanol (EFloMp y EFloMv) y uno con acetato de etilo (EFloA). Además, a partir de frutos verdes se obtuvieron dos, uno con metanol (EFruvM) y otro con acetato de etilo (EFruvA), el último por mencionar es el realizado con las raíces de plantines (ER), el cual se obtuvo con metanol.

Habiendo obtenido los extractos se evaluó la citotoxicidad de los mismos sobre las células Vero. En las dosis ensayadas EH, ES, EFr, ER, EFloMp y EFloMv no resultaron tóxicos. Sin embargo, varios de los extractos no pudieron ser evaluados en altas concentraciones debido al rendimiento obtenido. La concentración más alta utilizada en algunos casos resultó ser baja, 1,5 mg/mL para EH, Es y EFr y 2,5 mg/mL para EfloMp respectivamente. Debido a esto, al ensayar con concentraciones superiores a las mencionadas, quizás se logre alcanzar el valor de la CC_{50} de estos extractos y de esta manera comparar entre todos los extractos cual es más tóxico. Dado

que cabe la posibilidad de que la Concentración Citotóxica 50 de alguno de estos mencionados sea menor que la de EFloA (3,28 mg/mL).

El extracto de raíces de plantines resultó poco tóxico ya que posee un valor CC_{50} superior a 13,5 mg/mL. Del mismo modo, de los extractos de frutos verdes, el realizado con acetato de etilo también dio una CC_{50} alta, de 22,9 mg/mL, pese a que hay estudios que afirman que los frutos son venenosos (Méndez *et al.*, 2002). Mientras que del extracto obtenido con metanol no se pudo estimar ningún parámetro, ya que contenía mucho solvente. Como fue mencionado antes, los problemas que tuvo este extracto se habrían solucionado de haber secado los frutos antes de macerarlos. Teniendo en cuenta esta experiencia, la materia prima de futuros extractos será secada de manera apropiada.

Por otra parte, la citotoxicidad fue evaluada sobre células Vero, posiblemente no sea una buena aproximación a la toxicidad *in vivo*, con el objetivo en mente de obtener un fitomedicamento de acción tópica sería más apropiado realizar los ensayos en un modelo animal. Además, sería interesante observar si el producto obtenido luego de la evaporación del solvente orgánico, el cual se solubilizaba en 100 μ L de metanol y 900 μ L medio, se podría solubilizar en propilenglicol (propano-1,2-diol) el cual también es un alcohol de bajo peso molecular pero muy poco tóxico, y que es muy usado como humectante en productos farmacéuticos y cosméticos.

Previamente se ha reportado que extractos de *Melia azedarach* L han tenido un efecto inhibitorio contra los virus Junin, Pichinde, Tacaribe, Sindbis, y VSV en cultivos celulares (Wachsman *et al.*, 1984). En particular, extractos de hojas presentaron actividad antiviral contra HHV-1, previniendo el desarrollo de queratitis estromal herpética causada por este virus en ratones (Alché *et al.*, 2000) y con efecto terapéutico contra la infección genital producida por herpes (Petrera and Coto, 2009). En este trabajo de tesis se pudo observar esta acción antiviral contra HHV-1 en los extractos de *M. azedarach* L, no sólo en los realizados con hojas sino también, en mayor o menor medida, con las demás partes de la planta y con ambos solventes utilizados, con valores de CE_{50} entre 4 y 403 μ g/mL (Cuadro 3). Además de probar la capacidad inhibitoria de estos extractos, hubiera sido interesante también ensayar si poseen un efecto sinérgico al utilizarlos en conjunto a drogas anti herpéticas como el Aciclovir. También estudiarlos contra cepas de HHV-1 resistentes y determinar si logran un efecto sinérgico con los antivirales a los que resisten.

Por otro lado, la actividad antibacteriana de los extractos no fue ubicua, solo se vio en 4 extractos, siendo estos el de raíz (ER), de flores con acetato (EFloA), flores metanol purpura

(EFloMp) y el de frutos verdes con acetato (EFruvA). De estos, ER, EFloMp y EFruvA tuvieron efecto contra los tres microorganismos ensayados: *S. epidermidis*, *S. aureus* y *E. coli*. Del extracto de raíz se esperaba que presentara actividad por el hecho de ser la parte de la planta en estrecho contacto con la microbiota del suelo, aun así, fueron concentraciones muy elevadas las necesarias para generar inhibición en las tres bacterias (CIM 17,75 mg/mL). En cambio, EFloMp y EFruvA presentaron acción bactericida con valores de CBM de 7,5 mg/mL (EFloMp) y 7,1 mg/mL (EFruvA) en *E. coli* y los mismos valores en *S. aureus*. Mientras que con *S. epidermidis* se obtuvieron valores de CBM de 1,88 mg/mL (EFloMp) y 1,78 mg/mL (EFruvA). El cuarto extracto que presentó actividad fue EFloA, pero solo contra ambos estafilococos, y también fue bactericida, pero a concentraciones más elevadas (CBM 50 mg/mL).

Los extractos de frutos con acetato y de flores con metanol “purpura” poseen actividad bactericida contra las tres bacterias, actividad antiviral y una toxicidad relativamente baja. Lo que los convierte en posibles candidatos de futuras investigaciones. Si bien ER también cumple con la actividad antiviral y antibacteriana, esta última aparece en concentraciones que son tóxicas para las células Vero.

Se observó que las actividades antibacteriana y antiviral entre los extractos no varía substancialmente por el solvente usado, lo que influye más es origen del material utilizado, aun así, para determinar con mayor precisión cómo el uso de diferentes solventes afecta las bioactividades, se necesitarán realizar nuevos extractos y ensayos, teniendo el mismo número de extractos con acetato de etilo que con metanol para comparar en igualdad de condiciones.

Las plantas medicinales han sido identificadas como alternativas seguras y efectivas para el tratamiento de enfermedades inflamatorias dermatológicas, reemplazando drogas convencionales como corticoesteroides y antiinflamatorios no esteroideos (Bralley *et al.*, 2008; Maldini *et al.*, 2009; Fucina *et al.*, 2016). Por ejemplo, a partir del propóleo, material resinoso que las abejas recolectan de varias fuentes vegetales, se realizó un extracto etanólico, purificado, estandarizado y patentado en Canadá bajo el nombre de Propolis Extract ACF[®], el cual al 3% de concentración es la sustancia activa de un ungüento tópico comercial usado contra el herpes labial (Bankova *et al.*, 2014).

En los últimos años, los extractos de la planta de cannabis y su uso medicinal han cobrado gran importancia. Debido a sus componentes principales, los cannabinoides Delta-9-Tetrahidrocannabinol (THC), Cannabidiol (CBD) y demás compuestos no cannabinoides como los terpenos y flavonoides que poseen diversas propiedades. En ensayos clínicos se han utilizado extractos de esta planta a modo de tratamiento tópico para el pioderma gangrenoso,

enfermedad poco común de la piel de causas desconocidas, con resultados favorables (Maida and Corban, 2017).

Respecto a *M. azedarach* L, extractos metanólicos de las flores mostraron una potente acción antibacteriana en conejos que sufrían infecciones de la piel (Saleem *et al.*, 2002). Mientras que una crema conteniendo el extracto de flores estandarizado fue testeado en pruebas clínicas con pacientes con enfermedades de la piel con resultados exitosos, comparables al efecto del antibiótico neomicina (Saleem *et al.*, 2008).

Los resultados presentados en este trabajo de tesis muestran que los extractos obtenidos a partir de distintas partes del árbol *Melia azedarach* L podrían ser una buena fuente de partida para la obtención de extractos con uso fitomédico. Las mejoras en la estandarización del proceso de extracción permitirán aumentar el rendimiento y la reproducibilidad de los resultados. Además, es necesario e interesante analizar los perfiles químicos en un futuro próximo, para saber la composición porcentual de los distintos compuestos químicos.

El trabajo de esta Tesis sienta una base como línea de partida para la realización de un medicamento de acción tópica con actividad antiviral y antibacteriana a partir de extractos de *Melia azedarach* L.

CONCLUSIÓN

Las plantas han sido fuente para la obtención de medicamentos durante mucho tiempo y lo seguirán siendo en un futuro. Investigar aquellas que han sido utilizadas medicinalmente permite darles un respaldo científico a las que realmente son beneficiosas y a la vez desmitificar aquellas que no poseen ningún efecto o que incluso pueden llegar a ser nocivas.

Los extractos de hierbas medicinales poseen un bajo costo en comparación al aislamiento y purificación de compuestos fitoquímicos, la acción terapéutica de los mismos se debe a un efecto sinérgico entre la diversidad de moléculas presentes. Además, estos extractos no presentan los efectos adversos de las drogas convencionalmente usadas y son por lo general, más aceptados por el público ya que la medicina herbal suele estar asociada al folklore. Debido a que en los extractos de plantas medicinales puede que se encuentren nuevos tratamientos, resulta de gran importancia ampliar y continuar estas investigaciones.

Los resultados obtenidos en el trabajo de esta Tesis muestran que los extractos de *Melia azedarach* L presentan actividad antiviral y antibacteriana. Se observó que la actividad antiviral está presente en todos los extractos y no se ve afectada por el tipo de solvente usado. Asimismo, la actividad antibacteriana se encontró solo en cuatro extractos, pero tampoco se ve afectada por el solvente usado, siendo que dos de ellos fueron realizados con metanol y los otros dos con acetato de etilo. Esta actividad antibacteriana parece estar más relacionada con la parte de la planta de la cual se realizó el extracto.

El trabajo de esta Tesis sienta una base como línea de partida para la realización de un medicamento de acción tópica con actividad antiviral y antibacteriana a partir de extractos de *Melia azedarach* L.

Carlos A. Montalbetti

Dra. Erina Petrera

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Ghany, H. S. M. *et al.* (2019) 'In vitro acaricidal effect of Melia azedarach and Artemisia herba-alba extracts on Hyalomma dromedarii (Acari: Ixodidae): embryonated eggs and engorged nymphs', *Journal of Parasitic Diseases*, 43(4), pp. 696–710. doi: 10.1007/s12639-019-01149-9.
- Ahmad, I. and Beg, A. Z. (2001) 'Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens', *Journal of Ethnopharmacology*, 74(2), pp. 113–123. doi: 10.1016/S0378-8741(00)00335-4.
- Alché, L. E. *et al.* (2000) 'Treatment with meliacine, a plant derived antiviral, prevents the development of herpetic stromal keratitis in mice', *Journal of Medical Virology*, 61(4), pp. 474–480. doi: 10.1002/1096-9071(200008)61:4<474::AID-JMV10>3.0.CO;2-K.
- Ayaz, M. *et al.* (2019) 'Synergistic interactions of phytochemicals with antimicrobial agents: Potential strategy to counteract drug resistance', *Chemico-Biological Interactions*, 308(October 2018), pp. 294–303. doi: 10.1016/j.cbi.2019.05.050.
- Bankova, V. *et al.* (2014) 'Chemical composition of Propolis Extract ACF® and activity against herpes simplex virus', *Phytomedicine*, 21(11), pp. 1432–1438. doi: 10.1016/j.phymed.2014.04.026.
- Bohnenstengel, F. I. *et al.* (1999) 'Insecticidal meliacarpins (C-seco limonoids) from Melia azedarach', *Phytochemistry*, 50(6), pp. 977–982. doi: 10.1016/S0031-9422(98)00644-X.
- Della Bona, A. and Nedel, F. (2015) 'Evaluation of Melia azedarach extracts against Streptococcus mutans', *Journal of Medicinal Food*, 18(2), pp. 259–263. doi: 10.1089/jmf.2013.0181.
- Bralley, E. E. *et al.* (2008) 'Topical anti-inflammatory activity of Polygonum cuspidatum extract in the TPA model of mouse ear inflammation', *Journal of Inflammation*, 5, pp. 1–7. doi: 10.1186/1476-9255-5-1.
- Calderón de Rzedowskii, G. and Germán Ramírez, M. T. (1993) 'Fascículo 11, Meliaceae', *Flora del Bajío y regiones adyacentes*, (11), pp. 1–22.
- Choi, W. H. and Lee, I. A. (2016) 'The anti-tubercular activity of Melia azedarach L. and Lobelia chinensis Lour. and their potential as effective anti-Mycobacterium tuberculosis candidate agents', *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(10), pp. 830–835. doi: 10.1016/j.apjtb.2016.08.007.
- Clain, E. *et al.* (2019) 'The polyphenol-rich extract from psiloxylon mauritianum, an endemic medicinal plant from reunion island, inhibits the early stages of dengue and zika virus infection', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8), pp. 1–16. doi: 10.3390/ijms20081860.
- De Clercq, E. (2002) 'Strategies in the design of antiviral drugs', *Nature Reviews Drug Discovery*, 1(1), pp. 13–25. doi: 10.1038/nrd703.
- Denizot, F. and Lang, R. (1986) 'Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability', *Journal of Immunological Methods*, 89(2), pp. 271–277. doi: 10.1016/0022-1759(86)90368-6.
- Fabricant, D. S. and Farnsworth, N. R. (2001) 'The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery', *Environmental Health Perspectives*, 109(November 2000), p. 69. doi: 10.2307/3434847.

- Farnsworth, N. R. *et al.* (1985) 'Medicinal plants in therapy', *Bulletin of the World Health Organization*, 63(6), pp. 965–981. doi: 10.1016/0378-8741(87)90016-x.
- Fatima, I., Kanwal, S. and Mahmood, T. (2019) 'Microbiostatic, antioxidative and cytotoxic potentiation of some grasses of Bahawalpur, Pakistan', *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 39(4), pp. 482–491.
- Fucina, G. *et al.* (2016) 'Topical anti-inflammatory phytomedicine based on *Sphagneticola trilobata* dried extracts', *Pharmaceutical Biology*, 54(11), pp. 2465–2474. doi: 10.3109/13880209.2016.1160249.
- Fukuchi, K. *et al.* (2016) 'Antiviral and antitumor activity of licorice root extracts', *In Vivo*, 30(6), pp. 777–785. doi: 10.21873/invivo.10994.
- Ginovyan, M. and Trchounian, A. (2019) 'Novel approach to combat antibiotic resistance: evaluation of some Armenian herb crude extracts for their antibiotic modulatory and antiviral properties', *Journal of Applied Microbiology*, 127(2), pp. 472–480. doi: 10.1111/jam.14335.
- Haddad, J. G. *et al.* (2020) 'The geraniin-rich extract from reunion island endemic medicinal plant *phyllanthus phyllireifolius* inhibits zika and dengue virus infection at non-toxic effect doses in zebrafish', *Molecules*, 25(10), pp. 1–17. doi: 10.3390/molecules25102316.
- Hudson, J. B. (2012) 'Applications of the phytomedicine *Echinacea purpurea* (purple coneflower) in infectious diseases', *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012. doi: 10.1155/2012/769896.
- Indrasetiawan, P. *et al.* (2019) 'Antiviral activity of *cananga odorata* against hepatitis B virus', *Kobe Journal of Medical Sciences*, 65(2), pp. E71–E79.
- Kaiser, H. (2008) 'Von der pflanze zur chemie - Die frühgeschichte der "rheumamittel"', *Zeitschrift für Rheumatologie*, 67(3), pp. 252–262. doi: 10.1007/s00393-008-0257-x.
- Khan, a V *et al.* (2008) 'In Vitro Antibacterial Potential of *Melia azedarach* Crude Leaf Extracts Against Some Human Pathogenic Bacterial Strains', 2, pp. 67–70.
- Kılıç, S. *et al.* (2019) 'Efficacy of two plant extracts against *acne vulgaris*: Initial results of microbiological tests and cell culture studies', *Journal of Cosmetic Dermatology*, 18(4), pp. 1061–1065. doi: 10.1111/jocd.12814.
- Maida, V. and Corban, J. (2017) 'Topical Medical Cannabis: A New Treatment for Wound Pain—Three Cases of Pyoderma Gangrenosum', *Journal of Pain and Symptom Management*, 54(5), pp. 732–736. doi: 10.1016/j.jpainsymman.2017.06.005.
- Maldini, M. *et al.* (2009) 'Screening of the topical anti-inflammatory activity of the bark of *Acacia cornigera* Willdenow, *Byrsonima crassifolia* Kunth, *Sweetia panamensis* Yakovlev and the leaves of *Sphagneticola trilobata* Hitchcock', *Journal of Ethnopharmacology*, 122(3), pp. 430–433. doi: 10.1016/j.jep.2009.02.002.
- Méndez, M. D. C. *et al.* (2002) 'Experimental intoxication by the leaves of *Melia azedarach* (Meliaceae) in cattle', *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 22(1), pp. 19–24. doi: 10.1590/s0100-736x2002000100005.
- Mohan, S. *et al.* (2020) 'Bioactive Natural Antivirals: An Updated Review of the Available Plants and Isolated Molecules', *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(21), pp. 1–35. doi: 10.3390/molecules25214878.

- Nath, K. *et al.* (2019) 'Cyathea gigantea (Cyatheaceae) as an antimicrobial agent against multidrug resistant organisms', *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19(1), pp. 1–8. doi: 10.1186/s12906-019-2696-0.
- Nerome, K. *et al.* (2018) 'Functional growth inhibition of influenza A and B viruses by liquid and powder components of leaves from the subtropical plant *Melia azedarach* L.', *Archives of Virology*, 163(8), pp. 2099–2109. doi: 10.1007/s00705-018-3830-x.
- Newman, D. J. and Cragg, G. M. (2020) 'Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019', *Journal of Natural Products*, 83(3), pp. 770–803. doi: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285.
- Norela, J. *et al.* (2012) 'Actividad antibacteriana de extracto de hojas de *Melia azedarach* L. Antibacterial activity of leaf extract *Melia azedarach* L.', *Revista Colombiana de Biotecnología*, XIV(1), pp. 224–232.
- Oliveira, M. T. A. *et al.* (2020) 'Serine protease inhibition and modulatory-antibiotic activity of the proteic extract and fractions from *Amburana cearensis*', *Food and Chemical Toxicology*, 135(November), p. 110946. doi: 10.1016/j.fct.2019.110946.
- Ortega, J. T. *et al.* (2019) 'Antiviral activity of flavonoids present in aerial parts of *Marcetia Taxifolia* against hepatitis b virus, poliovirus, and herpes simplex virus In Vitro', *EXCLI Journal*, 18, pp. 1037–1048. doi: 10.17179/excli2019-1837.
- Paula Pifarré, M. *et al.* (2002) 'Therapeutic Action of Meliacine, a Plant-derived Antiviral, on HSV-induced Ocular Disease in Mice', *Experimental Eye Research*, 75(3), pp. 327–334. doi: 10.1006/exer.2002.2027.
- Petrera, E. (2015) 'Antiviral and Immunomodulatory Properties of Meliaceae Family', *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 5(4), pp. 241–254. doi: 10.1080/22311866.2015.1081569.
- Petrera, E. and Coto, C. E. (2009) 'Therapeutic effect of meliacine, an antiviral derived from *Melia azedarach* L., in mice genital herpetic infection', *Phytotherapy Research*, 23(12), pp. 1771–1777. doi: 10.1002/ptr.2850.
- Phua, D. H. *et al.* (2008) 'Human *Melia azedarach* poisoning', *Clinical Toxicology*, 46(10), pp. 1067–1070. doi: 10.1080/15563650802310929.
- Rittà, M. *et al.* (2020) 'Antiviral Activity of a *Arisaema Tortuosum* Leaf Extract and Some of its Constituents against Herpes Simplex Virus Type 2', *Planta Medica*, 86(4), pp. 267–275. doi: 10.1055/a-1087-8303.
- Rosmalena, R. *et al.* (2019) 'The antiviral effect of indonesian medicinal plant extracts against dengue virus in vitro and in silico', *Pathogens*, 8(2), pp. 1–11. doi: 10.3390/pathogens8020085.
- Rutkauskis, J. R. *et al.* (2015) 'Pediculicidal treatment using ethanol and *Melia azedarach* L', *Parasitology Research*, 114(6), pp. 2085–2091. doi: 10.1007/s00436-015-4394-2.
- Saleem, R. *et al.* (2002) 'Antibacterial Effect of *Melia azedarach* Flowers on Rabbits', *Phytotherapy Research*, 16(8), pp. 762–764. doi: 10.1002/ptr.1044.
- Saleem, R. *et al.* (2008) 'Effect of cream containing *Melia azedarach* flowers on skin diseases in children', *Phytomedicine*, 15(4), pp. 231–236. doi: 10.1016/j.phymed.2008.02.002.

- Salinas, F. M. *et al.* (2019) 'Aesculus hippocastanum L. seed extract shows virucidal and antiviral activities against respiratory syncytial virus (RSV) and reduces lung inflammation in vivo', *Antiviral Research*, 164, pp. 1–11. doi: 10.1016/j.antiviral.2019.01.018.
- Sanna, G. *et al.* (2015) 'Limonoids from Melia azedarach Fruits as Inhibitors of Flaviviruses and Mycobacterium tuberculosis', *PLoS ONE*, 10(10), pp. 1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0141272.
- Sanna, G. *et al.* (2019) 'Anti-poliovirus activity of Nerium oleander aqueous extract', *Natural Product Research*, 0(0), pp. 1–4. doi: 10.1080/14786419.2019.1582046.
- Seifu, D. *et al.* (2017) 'Antidiabetic and gastric emptying inhibitory effect of herbal Melia azedarach leaf extract in rodent models of diabetes type 2 mellitus', *Journal of Experimental Pharmacology*, 9, pp. 23–29. doi: 10.2147/JEP.S126146.
- Sertürner, F. (1817) 'Ueber das Morphinum, eine neue salzfähige Grundlage, und die Mekonsäure, als Hauptbestandtheile des Opiums', *Ann. Phys.*, 25, pp. 56–90.
- Sharma, D. and Singla Dr., Y. P. (2013) 'Preliminary and pharmacological profile of Melia azedarach L.: An overview', *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(12), pp. 133–138. doi: 10.7324/JAPS.2013.31224.
- Sharma, N. *et al.* (2019) 'Evaluation of anti-dengue activity of Carica papaya aqueous leaf extract and its role in platelet augmentation', *Archives of Virology*, 164(4), pp. 1095–1110. doi: 10.1007/s00705-019-04179-z.
- Signer, J. *et al.* (2020) 'Author Correction: In vitro virucidal activity of Echinaforce®, an Echinacea purpurea preparation, against coronaviruses, including common cold coronavirus 229E and SARS-CoV-2 (Virology Journal, (2020), 17, 1, (136), 10.1186/s12985-020-01401-2)', *Virology Journal*, 17(1), pp. 1–11. doi: 10.1186/s12985-020-01439-2.
- Vishnukanta and Rana, A. C. (2010) 'Evaluation of Hydroalcoholic Extract of Melia Azedarach Linn Roots for Analgesic and Anti-Inflammatory Activity', *International Journal of Phytomedicine*, 2(3), pp. 341–344. doi: 10.5138/ijpm.2010.0975.0185.02047.
- Wachsman, M. *et al.* (1984) 'Actividad antiviral asociada a una fracción polipeptídica obtenida de extractos de Melia azedarach L.', *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 3(1), pp. 27–31.
- Wahyuni, T. S. *et al.* (2020) 'Synergistic anti-hepatitis C virus activity of Ruta angustifolia extract with NS3 protein inhibitor', *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 30(6), pp. 1–8. doi: 10.1515/jbcpp-2019-0348.
- Wang, C. Z. *et al.* (2015) 'Antiviral activity of a nanoemulsion of polyphenols from ginkgo leaves against influenza A H3N2 and hepatitis B virus in vitro', *Molecules*, 20(3), pp. 5137–5151. doi: 10.3390/molecules20035137.
- WHO (2019) *WHO Global report on traditional and complementary medicine 2019*, World Health Organization. Available at: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/312342/9789241515436-eng.pdf?ua=1>.
- William B. Whitman, David C. Coleman, and W. J. W. (1998) 'Prokaryotes: The unseen majority', *National Academy of Sciences*, 95(12), pp. 6578–6583. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.95.12.6578>.
- Yuan, W. and Yuk, H. G. (2018) 'Antimicrobial efficacy of Syzygium antisepticum plant extract against Staphylococcus aureus and methicillin-resistant S. aureus and its application potential

with cooked chicken', *Food Microbiology*, 72, pp. 176–184. doi: 10.1016/j.fm.2017.12.002.

Zhang, Q. W., Lin, L. G. and Ye, W. C. (2018) 'Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review', *Chinese Medicine (United Kingdom)*, 13(1), pp. 1–26. doi: 10.1186/s13020-018-0177-x.