



Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

# **Evaluación de la actividad antiviral *in vitro* de extractos de hojas de *Ilex paraguariensis*, yerba mate**

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

Autor: Gonzalo Gabriel Moreno  
Directora: Dra. Erina Petrera

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

Marzo de 2024

# Agradecimientos

A la Universidad de Buenos Aires, el lugar donde pude hacer mi carrera universitaria. No solo me proporcionó una educación de calidad, sino que también me brindó un entorno repleto de oportunidades para crecer tanto personal como profesionalmente. Estoy eternamente agradecido por haber tenido el privilegio de formar parte de esta institución.

A mi directora de tesis, Erina Petrera, por su guía, su paciencia y su apoyo constante a lo largo de este proyecto. Sus sugerencias y comentarios han sido fundamentales para dar forma a este trabajo y llevarlo a buen término.

A mis padres, Edgardo Moreno y Vanesa Romano, por acompañarme en todas las etapas de mi vida, brindándome su amor, comprensión y aliento en todo momento, incluso cuando sentía que ya no podía más. Siempre me impulsaron a seguir adelante siendo un pilar fundamental que me brinda seguridad. También a mi hermana Brenda y a mi sobrino Bastian por su constante apoyo y cariño.

A Salomé, Simón, François y Margarita por estar presentes siempre, su constante ayuda y sus consejos me ayudaron siempre a mejorar en todos los aspectos de mi vida.

A Norma Cuevas y a toda la familia Gallo, que a pesar de no compartir lazos sanguíneos siempre me hicieron sentir como parte de su familia, alentándome a seguir adelante y preocupándose siempre por mí.

A mis amigos de exactas por hacer de la universidad una experiencia inolvidable, por cada mate, cada risa, cada llanto y todas esas vivencias que tuvimos juntos a lo largo de este recorrido que si lo hubiese hecho solo, probablemente hubiera sido una tarea imposible.

Por último, a los amigos siempre estuvieron, por escucharme y ayudarme a ponerme de pie en cada caída. Compartiendo esos momentos de asados y guitarreadas que siempre me alegraron.

Les agradezco muchísimo a todos desde lo más profundo de mi corazón.

# Resumen

## **Evaluación de la actividad antiviral *in vitro* de extractos de hojas de *Ilex paraguariensis*, yerba mate**

En el presente trabajo se buscó evaluar la actividad antiviral *in vitro* de los extractos de las hojas de *Ilex paraguariensis*.

Se obtuvieron tres extractos a partir de hojas de yerba mate: hojas frescas de la planta sin tratamiento adicional (YF), hojas que fueron sometidas a un proceso de secado (YS), y yerba mate comercial (YC).

La citotoxicidad de los extractos en células Vero fue evaluada durante 24 hs mediante el uso de las técnicas de MTT y tinción con cristal violeta. Todos los extractos presentaron valores de  $CC_{50}$  superiores a la mayor concentración testeada (>2 mg/ml). Posteriormente, se evaluó la actividad antiviral de los extractos, en concentraciones no citotóxicas, contra distintas cepas del virus herpes 1 (HSV-1) y el virus del Zika mediante un ensayo de rendimiento viral, y se realizó la comparación de los extractos utilizando los índices de  $CE_{50}$  e IS. Todos los extractos fueron capaces de inhibir tanto las cepas KOS y B2006 de HSV-1, como también la cepa INEVH116141 del virus del Zika.

Por otra parte, la inhibición de la replicación de HSV-1 se confirmó mediante la observación de la expresión del virus HSV-1 cepa YK608 utilizando microscopía de fluorescencia.

Todos los extractos presentaron actividad antiviral contra los virus evaluados.

Este estudio confirma la acción antiviral de los extractos de hojas de *Ilex paraguariensis* contra HSV-1 y presenta resultados alentadores contra el virus del Zika.

Los resultados respaldan el potencial terapéutico de la yerba mate y ofrecen perspectivas para futuras investigaciones.

# Abstract

***In vitro* assessment of the antiviral activity of extracts from leaves of *Ilex paraguariensis*, yerba mate.**

The aim of the present study was to assess the *in vitro* antiviral activity of extracts from the leaves of *Ilex paraguariensis*. Three extracts were obtained from yerba mate leaves: fresh leaves from the plant without further treatment (YF), leaves that were subjected to a drying process (YS), and commercial yerba mate (YC).

The cytotoxicity of the extracts in Vero cells was evaluated for 24 hours using MTT and crystal violet staining techniques. All extracts showed  $CC_{50}$  values greater than the highest concentration used ( $>2$  mg/ml). Subsequently, the antiviral activity of the extracts was evaluated at non-cytotoxic concentrations against different strains of herpes virus 1 (HSV-1) and Zika virus using a viral yield assay and the comparison of the extracts was performed through the  $EC_{50}$  and SI indices. All extracts were able to inhibit both KOS and B2006 strains of HSV-1, as well as the INEVH116141 strain of the Zika virus.

Furthermore, the inhibition of HSV-1 replication was confirmed by observing the expression of the HSV-1 YK608 strain using fluorescence microscopy. All extracts exhibited antiviral activity against the evaluated viruses.

This study confirms the antiviral action of *Ilex paraguariensis* leaf extracts against HSV-1 and presents encouraging results against the Zika virus. The findings support the therapeutic potential of yerba mate and provide prospects for future research.

# Índice

<b>Agradecimientos</b> .....	<b>2</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>3</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>4</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>6</b>
Las plantas en la medicina.....	6
Virus de importancia médica.....	8
Virus Herpes.....	8
Virus del Zika.....	11
Actividad antiviral en extractos de plantas.....	14
<i>Ilex paraguariensis</i> .....	16
<b>Hipótesis y objetivos</b> .....	<b>21</b>
<b>Materiales y Métodos</b> .....	<b>22</b>
Elaboración de extractos de <i>Ilex paraguariensis</i> .....	22
Cultivos Celulares.....	23
Virus.....	23
Citotoxicidad.....	24
Ensayo de MTT.....	24
Ensayo con cristal violeta.....	25
Actividad antiviral.....	25
Ensayo de rendimiento viral.....	25
Microscopía de Fluorescencia.....	26
<b>Resultados</b> .....	<b>27</b>
Obtención de los extractos.....	27
Citotoxicidad.....	28
Actividad antiviral contra el virus herpes.....	31
Evaluación antiviral contra el virus del Zika.....	40
<b>Discusión</b> .....	<b>44</b>
<b>Conclusión</b> .....	<b>48</b>
<b>Referencias bibliográficas</b> .....	<b>49</b>

# Introducción

## Las plantas en la medicina

A lo largo de la historia de la humanidad las plantas han desempeñado un rol fundamental en la vida de los seres humanos en cuanto a alimentación, refugio, vestimenta, salud, sabores y fragancias. Con respecto a las plantas para usos medicinales, a través de los años se han acumulado amplias evidencias de diversas fuentes que denotan una conexión con el ser humano como documentos escritos y monumentos conservados (Barboza et al., 2009).

Se considera planta medicinal a aquella que contiene, en sus órganos, compuestos utilizables con propósitos terapéuticos o que sirven como precursores para la síntesis de medicamentos (Sofowora et al., 2013). La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a las plantas medicinales tradicionales como materiales vegetales naturales que se utilizan para el tratamiento de enfermedades, a nivel local o regional, ya sea en su forma natural o tras haber sido sometidas a algún procesamiento industrial. (Jamshidi-Kia et al., 2018)

El alivio a través del uso de plantas medicinales tiene sus raíces en tiempos antiguos. Las personas buscaban instintivamente medicamentos en la naturaleza, basándose únicamente en la experiencia personal, ya que carecían de conocimientos suficientes sobre las causas de las enfermedades y cómo emplear ciertas plantas con fines curativos. Esta práctica, en gran medida empírica, representaba un método de supervivencia en el que la observación y la tradición eran fundamentales.

Con el tiempo, a lo largo de muchas décadas de lucha contra enfermedades, aumentó la comprensión del uso de plantas medicinales. Los seres humanos comenzaron a explorar las propiedades curativas que se encontraban en diversas partes de las plantas, como cortezas, semillas, frutos y hojas (Petrovska, 2012)

Sin lugar a dudas, hay una riqueza en la historia de las plantas medicinales. La evidencia escrita más antigua de su uso con fines medicinales se encuentra en una antigua tabla de arcilla sumeria en Nagpur, que data de hace aproximadamente 5000 años (Kelly, 2009). Este hallazgo nos habla de la relación que el ser humano ha mantenido con las plantas a lo largo de su existencia. También se conocen registros de plantas medicinales en civilizaciones como la china, la india y la egipcia que datan de hace unos 4000 años. Estas culturas también reconocieron el valor terapéutico de las plantas y dejaron un legado de conocimiento que aún se aprecia en la medicina tradicional, sin mencionar que otras civilizaciones del mundo como los griegos también tenían conocimiento de las plantas

medicinales, un ejemplo de esto es que figuras como Hipócrates, el padre de la medicina, utilizó activamente estas plantas en sus tratamientos médicos (Jamshidi-Kia et al., 2018). Entonces, a través de estos momentos históricos, se destaca claramente la relevancia de las plantas medicinales en diversas culturas a lo largo de la historia y cómo estas influenciaron significativamente el desarrollo de la medicina. Su papel no solo perdura en la medicina tradicional, sino que también sigue siendo objeto de investigación y estudio en la medicina moderna (Petrovska, 2012)

Cuando observamos la evolución de la medicina en la actualidad, podemos identificar momentos significativos como el empleo de glucósidos de digitalis en el siglo XVIII para tratar afecciones cardiovasculares (Sen T. y Samanta S., 2014). Del mismo modo, la corteza de sauce se convirtió en un recurso popular para aliviar el dolor y tratar la fiebre (Shara et al., 2015) . A lo largo de los siglos, la búsqueda de nuevas terapias derivadas de fuentes naturales ha resultado en descubrimientos fundamentales, incluyendo antibióticos, agentes anticancerígenos, compuestos antiinflamatorios y analgésicos. (Sen T. y Samanta S., 2014)

Las plantas terrestres representan un recurso único y sostenible para la identificación de biomoléculas innovadoras con propiedades terapéuticas, gracias a la variedad estructural y biológica de sus componentes. Hasta el momento, solo se ha analizado una pequeña fracción del reino vegetal en busca de usos medicinales. Las técnicas más recientes de química combinatoria y el cribado de productos vegetales, así como el diseño *de novo*, son ahora un pilar fundamental para el descubrimiento de nuevos medicamentos.

Es relevante destacar que las principales compañías farmacéuticas investigan activamente extractos de plantas y compuestos sintéticos. A menudo, los productos naturales proporcionan compuestos líder que sirven de base para su modificación química con el fin de obtener medicamentos más eficaces.

Según la OMS, aproximadamente el 80 % de la población mundial recurre a tratamientos con medicina herbal o extractos vegetales. (Sen T. y Samanta S., 2014)

En la actualidad, la investigación científica y la tecnología nos brindan herramientas para explorar aún más las propiedades curativas de las plantas. Las terapias basadas en la medicina herbal y los extractos vegetales continúan ganando popularidad en todo el mundo, a medida que avanzamos, aumenta nuestra comprensión de las propiedades medicinales de las plantas.

## Virus de importancia médica

Los virus están presentes en nuestras vidas, nos encontramos en contacto con ellos de manera constante y en muchos casos afectan a gran parte de la población hasta llegar a una escala de distribución global. Tal es el caso del virus herpes, destacado por su capacidad de establecer infecciones persistentes en el organismo humano, con manifestaciones clínicas que varían desde lesiones cutáneas hasta complicaciones sistémicas. Se estima que, alrededor del mundo, aproximadamente 3,700 millones de personas menores de 50 años, padecen la infección por el virus del herpes simplex de tipo 1 (HSV-1). Además, se calcula que alrededor de 491 millones de personas de la población mundial de entre 15 y 49 años, sufren la infección por el virus del herpes simplex de tipo 2 (HSV-2). Adicionalmente, es relevante señalar que la infección causada por este virus incrementa el riesgo de contraer y transmitir infecciones por HIV (OMS, 2023 ). Estas cifras demuestran el impacto de las infecciones por virus herpes en la salud global, así como su interrelación con otras enfermedades infecciosas.

Por otro lado, también es de interés el virus del Zika (ZIKV) que ha emergido como una amenaza a nivel mundial debido a su asociación con malformaciones congénitas y otros trastornos neurológicos. Tal es así, que fue declarado emergencia de salud pública global en respuesta a la identificación de casos de microcefalia en recién nacidos cuyas madres fueron afectadas por el virus del Zika durante el embarazo, así como a la observación de casos de síndrome de Guillain-Barré, los cuales también se asociaron temporalmente con la transmisión de esta enfermedad en ciertos entornos. A pesar de que los casos de la enfermedad experimentaron una reducción a nivel mundial a partir de 2017, la transmisión persiste en niveles bajos en varios países incluyendo a la Argentina (OMS, 2022).

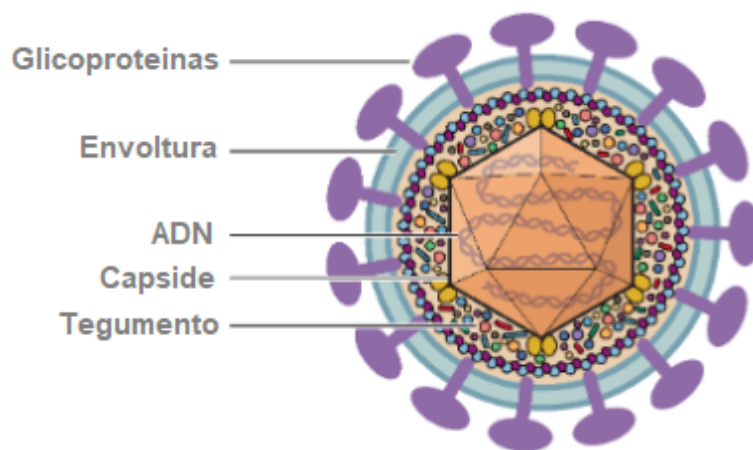
Debido al impacto directo sobre la salud pública, en esta tesis se decidió trabajar con los virus Herpes y Zika.

### Virus Herpes

La familia de los *Herpesviridae* incluye un extenso grupo de virus de ADN de doble cadena con la capacidad de infectar a diversas especies animales. Estos virus muestran una especificidad de huéspedes estrecha, lo que indica una coevolución con el respectivo huésped. En el caso de los herpesvirus humanos (HSV), se han identificado nueve tipos distintos que se clasifican en tres subfamilias según su organización genómica, tropismo

celular y características de crecimiento: los *alphaherpesvirinae*, *betaherpesvirinae* y *gammaherpesvirinae*.

Los *alphaherpesvirinae* (Figura 1) incluyen el herpes simplex tipo 1 y tipo 2 , y el virus de la varicela zoster (VZV). Los *betaherpesvirinae* comprenden el citomegalovirus humano (CMV), HHV-6A, HHV-6B y HHV-7. Los *gammaherpesvirinae* albergan el virus de Epstein-Barr (EBV) y el herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi (KSHV) (Schalkwijk et al., 2022).



**Figura 1:** Estructura del virión del HSV. En el núcleo del virión se encuentra el ADN lineal de doble cadena, protegido por la cápside icosaédrica. El tegumento, compuesto por diversas proteínas virales y celulares, rodea la cápside y establece la conexión con la envoltura. Adaptado de Zhu S. y Viejo-Borbolla A., 2021.

Las infecciones causadas por HSV-1 y HSV-2 son un problema de salud pública altamente prevalente en todo el mundo. Aproximadamente el 67% de la población mundial está infectada con HSV-1 y alrededor del 13% con HSV-2 . La transmisión de ambos tipos de herpes ocurre a través del contacto cercano y una vez que se tiene la infección, se mantiene de por vida. La mayoría de las personas adquieren HSV-1 en una etapa temprana de la vida, generalmente a través de la mucosa orolabial, mientras que las infecciones por HSV-2 suelen ocurrir más tarde, normalmente a través de la transmisión sexual.

Es importante destacar que la infección con un tipo específico de herpes generalmente confiere inmunidad contra futuras infecciones con el mismo tipo de herpes, pero no contra el otro tipo. La gravedad de la infección con HSV-1 y HSV-2 puede variar desde ser asintomática o leve hasta potencialmente mortal. La mayoría de las personas sanas experimentan síntomas leves o no tienen síntomas en absoluto. Sin embargo, en algunos

casos, especialmente en aquellos con sistemas inmunológicos debilitados puede causar enfermedades graves. Las enfermedades asociadas a este virus incluyen desde las llagas en los labios y los genitales (dependiendo el tipo de herpes), hasta condiciones más graves como la queratitis herpética, enfermedades diseminadas en recién nacidos, meningitis y encefalitis herpética (Zhu S. y Viejo-Borbolla A., 2021).

Durante la infección inicial, el virus herpes invade las células epiteliales de la mucosa o la piel y se establece en un estado latente en las neuronas, principalmente en el sistema nervioso periférico (SNP). La infección del sistema nervioso central (SNC) puede desencadenar una infección aguda y una inflamación que se asocian con un alto grado de morbimortalidad. La infección a través de la piel generalmente requiere daño previo en las capas más externas de este órgano, si ocurre en la piel o la mucosa se acompaña de inflamación y daño tisular, lo que provoca la aparición de las ampollas características.

El contagio por el virus herpes da lugar a dos posibles tipos de replicación: la replicación lítica y la latencia. Durante la replicación lítica, se produce una expresión coordinada de genes virales que conduce a la producción de virus infecciosos. Por otro lado, durante la latencia, la expresión génica es limitada y no se producen partículas virales. Sin embargo, el genoma viral está capacitado para la reactivación, lo que conduce a la producción de viriones infecciosos bajo el estímulo apropiado (Zhu S. y Viejo-Borbolla A., 2021).

Para el tratamiento de este tipos de afecciones en la clínica se utiliza el aciclovir (ACV) [9-(2-hidroxi-etoximetil)guanina] que es un análogo acíclico de la guanosina y en su forma activa está fosforilado con tres grupos fosfatos obteniendo el trifosfato de aciclovir (ACV-TP). El ACV se ha convertido en el antiviral de primera línea para la profilaxis y el tratamiento de las infecciones por el virus herpes.

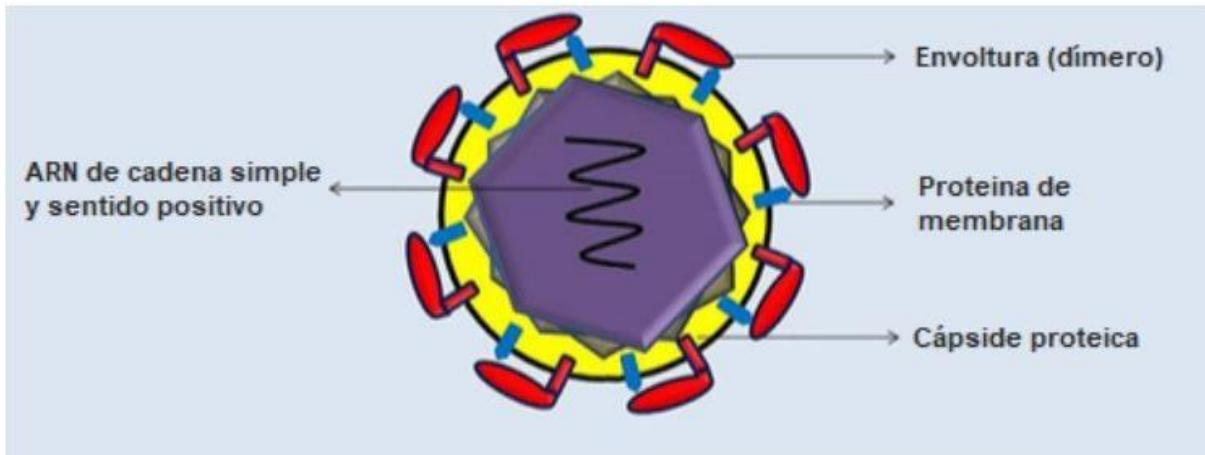
Se sabe que ACV-TP compite con el desoxiguanosina trifosfato (dGTP) como sustrato de la polimerasa de ADN viral (ADN pol) y se incorpora en la cadena de ADN resultando en la terminación de la síntesis (Schalkwijk et al., 2022). La principal limitación del ACV es su baja biodisponibilidad oral (10 a 20 %), probablemente debido a una absorción inadecuada del medicamento. Por lo tanto, se ha desarrollado el profármaco valaciclovir (VACV), un L-valil-éster de ACV, con una biodisponibilidad de tres a cinco veces mayor que la del ACV.

El problema con este antiviral reside en que su uso frecuente ha aumentado la incidencia de infecciones por el virus herpes resistente al mismo. Este tipo de resistencia plantea una preocupación importante en los huéspedes inmunocomprometidos, ya que a menudo requieren terapias antivirales a largo plazo, lo que, combinado con la replicación viral continua, aumenta el riesgo de la aparición de resistencia a los medicamentos (Schalkwijk et al., 2022).

La limitada cantidad de antivirales disponibles en el mercado para el tratamiento de las infecciones por el virus herpes, hace que el manejo de la resistencia a los medicamentos en la clínica sea un desafío y requiere la búsqueda de nuevas alternativas viables para suplir el medicamento o realizar una terapia complementaria al aciclovir.

## Virus del Zika

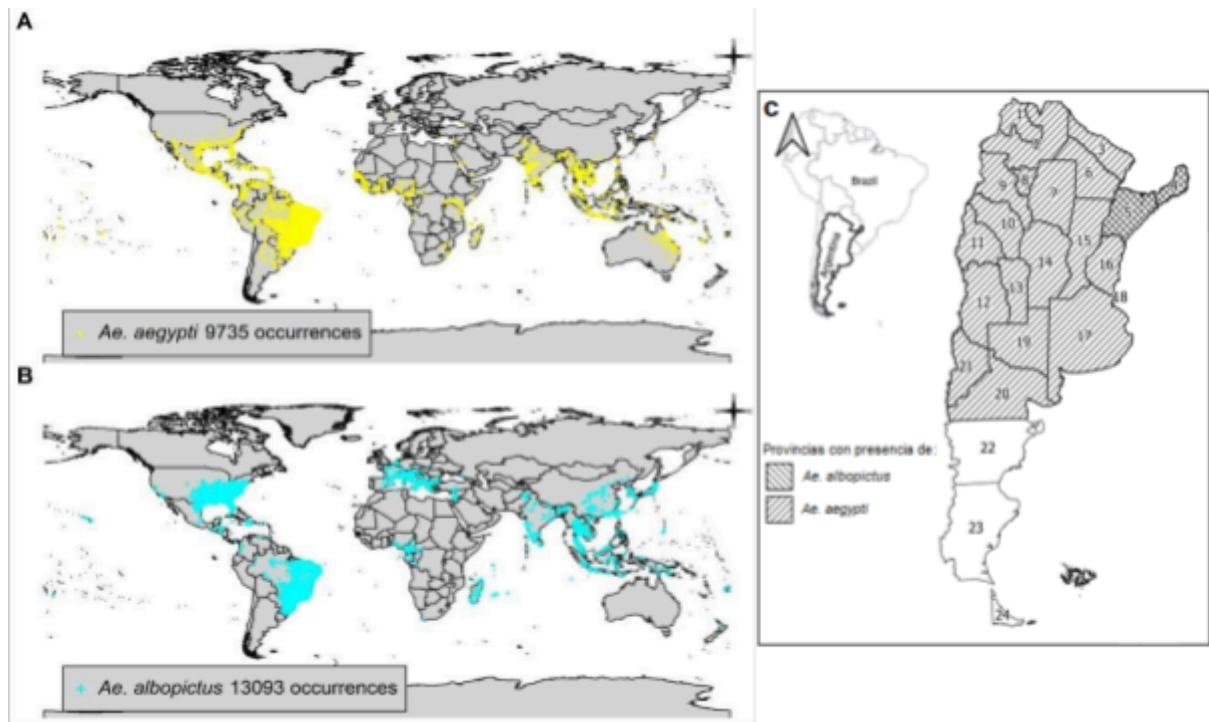
El virus del Zika es un virus de ARN de simple cadena, envuelto, que pertenece al género *Flavivirus*, de la familia *Flaviviridae* y es un virus transmitido por mosquitos (Figura 2). El virus fue identificado por primera vez en las regiones africanas en Kampala, Uganda, en el bosque Zika en 1947 en un mono rhesus y en un lapso de cinco años se extendió por todo el continente africano. Posteriormente, migró a Asia en la década del 80 como una cepa diferente a la africana, esta variante asiática desencadenó epidemias en diferentes partes del mundo, lo que resultó en una oleada de contagios en la Polinesia Francesa durante 2007, 2013 y 2014. El mayor brote del ZIKV de la historia se alcanzó en mayo de 2015 originándose en el noreste de Brasil, propagándose rápidamente y convirtiéndose en una pandemia que afectó a más de 70 países y se estima que infectó a alrededor de 1,62 millones de personas en las regiones del Pacífico, las Américas y las costas de África Occidental (Pielnaa et al., 2020). En la Argentina el primer caso del ZIKV fue registrado en febrero del 2016 (Bonica et al., 2019). El 1 de febrero de 2016, la OMS declaró al ZIKV como "una emergencia de Salud Pública de Importancia Internacional", en consecuencia, se hizo hincapié en la necesidad de tomar medidas drásticas para reducir su propagación, especialmente en mujeres en edad fértil y mujeres embarazadas (Pielnaa et al., 2020).



**Figura 2:** Esquema del virus del Zika. Posee ARN de cadena simple y positiva con 11 Kb de tamaño. El diámetro del virión es de aproximadamente 50-60 nm y su cápside proteica está dispuesta en simetría icosaédrica . Adaptado de Javed et al., 2018.

El virus del Zika necesita de vectores para realizar la proliferación viral, por lo que al igual que otros flavivirus se transmite por la picadura de mosquitos, principalmente del género *Aedes*, se han implicado varias especies de *Aedes*, incluyendo *Ae. aegypti*, *Ae. africanus*, *Ae. hensilli* y *Ae. albopictus*. Los mosquitos *Aedes* tienen una amplia distribución global, y la mayoría de estos habitan en regiones cálidas tropicales y subtropicales (Figura 3). Algunas especies tienen una distribución limitada, mientras que otras abarcan una amplia geografía (Plourde A. y Bloch E., 2016). Se considera que el *Aedes aegypti* es el vector predominante en la transmisión del virus, probablemente porque está estrechamente asociada con los humanos en áreas urbanas (Bonica et al., 2019).

Diferentes hallazgos han comprobado que ZIKV tiene otras vías de transmisión además de la picadura de mosquitos, pudiendo transmitirse por contacto sexual, perinatal y por transfusión de sangre (Musso D. y Gubler D., 2016)



**Figura 3:** A: Distribución global de *Ae. aegypti*. B: Distribución global de *Ae. albopictus*. C: Distribución en Argentina de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*. Adaptado de Laporta et al., 2023 y Lizuain et al., 2022.

La infección por el virus del Zika generalmente se cursa de manera asintomática o con síntomas leves. Sin embargo, cuando ocurre durante el embarazo, puede tener consecuencias graves, como la microcefalia congénita, el síndrome de Guillain-Barré, mortinatos y abortos. Además, se ha observado una asociación entre el contagio por el ZIKV y trastornos neurológicos, incluyendo el aumento de la presión intraocular que daña los nervios ópticos, lo que a su vez se relaciona con el desarrollo de glaucoma. Aproximadamente el 20-25% de los pacientes infectados con el ZIKV experimentan síntomas que pueden incluir erupciones cutáneas, dolor de cabeza, fiebre, dolores articulares y conjuntivitis. Estos síntomas suelen aparecer después de un período de incubación de alrededor de una semana. Algunos pacientes también pueden presentar vómitos, diarrea, enrojecimiento de los ojos, debilidad, edema, dolor abdominal, pérdida de apetito e incluso hematospermia.

El virus tiene como blanco a los cerebros inmaduros, como las células progenitoras neurales humanas específicas del prosencéfalo, las células embrionarias del feto y los organoides cerebrales embrionarios, lo que conduce a la necrosis celular y la desregulación del ciclo celular (Pielnaa et al., 2020).

En lo que respecta al manejo de las infecciones por el ZIKV, es importante destacar que hasta ahora no se ha desarrollado una vacuna específica ni un tratamiento efectivo para combatir este virus. Además, los esfuerzos de control de vectores no han logrado detener adecuadamente su propagación (Huang et al., 2023). Por lo que, es de suma importancia destacar la necesidad de búsqueda de un tratamiento, ya sea, por la prospección de antivirales a partir de diversas fuentes, creación de vacunas o la creación de alguna terapia efectiva que permita mitigar los síntomas causados por la infección y contener la propagación del virus.

## Actividad antiviral en extractos de plantas

Los virus están involucrados en diversas patologías humanas convirtiéndolos en un objeto de investigación, no solo el estudio del virus en sí mismo sino también aspectos relevantes de cómo limitar su propagación a través del desarrollo de distintas estrategias como el avance de terapias antivirales. En un mundo con una población en aumento constante, rápida urbanización y brotes infecciosos, la salud pública se enfrenta a una amenaza crítica debido a la falta de vacunas preventivas y terapias antivirales efectivas. En este contexto, los medicamentos a base de hierbas y productos naturales se presentan como recursos viables para el desarrollo de nuevos fármacos antivirales. Numerosos estudios han revelado que los extractos de plantas contienen una gran variedad de compuestos bioactivos, entre ellos, flavonoides, terpenoides, polifenoles, alcaloides y muchos otros. Estos compuestos han demostrado tener aplicaciones terapéuticas en el tratamiento de una amplia variedad de afecciones, incluidas las enfermedades virales, mostrando su eficacia contra virus de diversa índole (Perera et al., 2021). A continuación, se presentan algunos estudios de la actividad antiviral de extractos de plantas en los virus de interés.

Se han realizado pruebas con extractos etanólicos de *Eucalyptus globulus* en los cuales se aislaron diferentes compuestos que mostraron actividad antiviral contra HSV-1 y HSV-2, algunos de estos mostraron una actividad superior al medicamento estándar aciclovir (Brezáni et al., 2018).

Del mismo modo, se testeó la actividad antiviral de los extractos acuosos de *Caesalpinia pulcherrima* y se ha comprobado que aquellos obtenidos a partir de diferentes partes de la planta mostraron actividad antiviral contra HSV-1 y HSV-2 (Chiang et al., 2003).

También, se ha evaluado la actividad antiherpética de extractos de 47 especies de plantas del género *Euphorbia* para inhibir la actividad del HSV-2. Los resultados mostraron que

cinco de los extractos tenían actividad antiherpética, destacando que los más efectivos fueron los de las plantas *E. cotinifolia* y *E. tirucalli*, que además no mostraron citotoxicidad (Betancur-Galvis et al., 2002).

De la misma manera, los componentes del pericarpio del fruto de *Punica granatum* (Granada), han demostrado tener actividad antiherpética contra el herpes genital al inactivar el virus y bloquear su adsorción a las células (Zhang et al., 1995). Por otra parte, el extracto metanólico de brotes de frijol mungo tiene la capacidad de reducir significativamente la replicación de HSV-1 demostrando tener una potente actividad antiviral comparable a la del aciclovir (Hafidh et al., 2015).

En nuestro laboratorio, demostramos que extractos semipurificados obtenidos a partir de hojas de *M. azedarach* L. inhiben *in vitro* la multiplicación de virus DNA y RNA, en ausencia de citotoxicidad (Petrera E, 2015; Alché L.E et al., 2002; Barquero A.A. et al., 1997; Barquero AA et al., 2004). El principio antiviral presente en los extractos semipurificados que, además, es capaz de inducir un estado refractario a la infección en cultivos celulares, se denominó meliacina (MA). Se demostró que MA inhibe la síntesis de proteínas tardías que participan en la replicación del genoma y en el ensamblado del HSV-1 impidiendo su propagación (Alché L.E. et al., 2002). MA potencia la acción antiherpética del aciclovir y del foscarnet, e inhibe a una cepa mutante de HSV-1 TK-, sugiriendo que presenta un blanco de acción diferente al ACV (Barquero A.A et al., 1997). En condiciones *in vivo*, MA impide el desarrollo de la queratitis herpética estromal en ratón disminuyendo significativamente la aparición de los signos de enfermedad, la detección de infectividad en los ojos y la severidad de las lesiones oculares causadas por la respuesta inmunopatológica inducida por el HSV-1 (Alché L.E. et al., 2000; Pifarré M.P. et al., 2002). Por otra parte, al evaluar el efecto terapéutico de MA en un modelo de infección genital de ratones hembra con el HSV-2 y la posterior administración tópica de MA por vía intravaginal, se encontró que la sobrevida aumenta, la severidad de la enfermedad disminuye así como la diseminación viral en los fluidos vaginales, los cuales presentan niveles de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  más elevados que los de los ratones infectados sin tratar (Petrera E. y Coto C.E, 2009). En el año 2003 se aisló e identificó, a partir del extracto de hojas de *Melia azedarach* L., el tetranortriterpenoide 1-cinamoil- 3,11-dihidroxi meliacarpina (CDM), que presenta actividad antiviral frente a los virus VSV y HSV-1 en condiciones *in vitro* (Alché L.E. et al., 2003). Actualmente estamos estudiando la actividad antiviral de extractos de plantines de *Melia azedarach* L. micropropagados *in vitro* con muy buena actividad antiherpética. (Montalbetti et al., 2021 y 2023).

Con respecto al virus del Zika, se han identificado ciertos compuestos naturales capaces de inhibir al virus, que incluyen a la curcumina y la pinocembrina, que se encuentran en la cúrcuma, así como en extractos de té de las plantas *Hedyotis diffusa* y *Artemisia capillaris*. Además, los extractos de plantas como *Aphloia theiformis* y *Psiloxylon mauritianum* han demostrado inhibir la adherencia del virus a las superficies celulares (Mohanty et al., 2023). Asimismo, el extracto de *Psiloxylon mauritianum* exhibe actividad antiviral contra diferentes cepas africanas y asiáticas del virus del Zika y los ensayos revelaron que se debería a la interferencia con la unión de las partículas virales a las células huésped (Clain et al., 2019)

### *Ilex paraguariensis*

El género *Ilex* forma parte de la familia Aquifoliaceae, que tiene una distribución global y abarca aproximadamente 500 especies. *Ilex paraguariensis* es un árbol nativo de América del Sur y se encuentra en una región de 540.000 km<sup>2</sup> comprendiendo el noreste de Argentina, el este de Paraguay y el sur de Brasil (Figura 4). Sus hojas se consumen tradicionalmente en forma de infusión caliente (mate) o infusión fría (tereré) (Pullaiah, 2023)



**Figura 4:** Área de distribución natural de la yerba mate. Adaptado de Croge et al., 2021.

*Ilex paraguariensis* es un árbol que puede alcanzar alturas de 8 a 15 metros. Sus hojas, que son de tipo perennes y alternas, tienen una textura coriácea y varían en forma desde obovadas hasta elípticas, con márgenes ligeramente dentados, ápice obtuso y base en forma de cuña. Los pecíolos pueden medir hasta 15 mm de longitud. En su entorno natural, la floración tiene lugar entre octubre y diciembre, y las inflorescencias consisten en pistilos agrupados con flores monoicas que a menudo se presentan en las axilas de las hojas, con pétalos redondeados (Figura 5). Los frutos son drupas que van desde el rojo al negro, de forma ovalada a globosa, con un diámetro de 4,5 a 6,5 mm y contienen cuatro o cinco semillas (Bracesco et al., 2011)



**Figura 5:** Yerba mate. A) árbol; B) floración; C) hojas y ramas (Croge et al., 2021)

Para su desarrollo óptimo, *Ilex paraguariensis* necesita que las temperaturas medias anuales estén en el rango de 17°C a 21°C y precipitaciones regulares, con niveles elevados de humedad tanto en el aire como en el suelo. Esta planta prospera en el estrato del sub-bosque, preferentemente en suelos ácidos de baja fertilidad natural, alto contenido de aluminio, bajos niveles de fósforo disponible y alta concentración de materia orgánica. Es capaz de tolerar la sombra en todas las etapas de su crecimiento y se le considera una especie ombrófila de crecimiento moderado o lento, típica de bosques maduros, donde puede alcanzar una densidad de cientos de individuos por hectárea (Croge et al., 2021)

En cuanto al consumo de *Ilex paraguariensis* se ha observado un crecimiento en la demanda de los productos asociados. Asimismo, aumentó el interés en la investigación de la planta por sus propiedades asociadas a los compuestos bioactivos que contiene. Estos podrían estar aportando los efectos beneficiosos que abarcan desde capacidades antiinflamatorias, anti obesogénicas, antimutagénicas y antibacterianas hasta propiedades antivirales, además de su destacada capacidad antioxidante. Cabe destacar que los compuestos presentes en *I. paraguariensis* no solo promueven la salud mediante su consumo directo o en forma de fármacos y productos farmacéuticos, sino que también

demuestran utilidad en la fortificación y preservación de alimentos, así como en el desarrollo de materiales de envasado activos (Pullaiah, 2023).

En años recientes, se ha realizado una cantidad considerable de estudios para examinar cómo el consumo de *Ilex paraguariensis* afecta la salud de humanos y animales, también se realizaron estudios sobre virus y bacterias.

Un estudio en hombres y mujeres indicó que la suplementación con yerba mate puede ser eficaz para reducir la grasa corporal en individuos con obesidad, y sugiere que podría ser un agente antiobesidad potente (Kim et al., 2015). También el consumo de yerba mate tiene efectos en el control de los parámetros lipídicos (de Morais et al., 2009)

Se testeó la eficacia antifúngica de extractos acuosos de *Ilex paraguariensis* contra *Malassezia furfur*, un hongo que causa afecciones como pitiriasis versicolor, caspa y dermatitis seborreica en humanos, los resultados mostraron que el extracto acuoso posee actividad inhibitoria comparable al fármaco ketoconazol sugiriendo al mismo como una alternativa para el tratamiento de este tipo de infecciones (Filip et al., 2010).

En pruebas de extractos acuosos dializados de yerba mate como agentes bactericidas contra patógenos humanos y alimentarios, se ha demostrado la efectividad de estos tanto contra Gram-positivos (*S. aureus*) como Gram-negativos (*E. coli*). Concentraciones relativamente bajas de estos extractos proporcionan actividad antimicrobiana contra ambas bacterias, sugiriendo un potencial uso de la yerba mate como agente antimicrobiano (Burriss et al., 2011).

Por otro lado, en modelos murinos se evaluaron los efectos antineoplásicos de extractos acuosos de *Ilex paraguariensis*. Los individuos recibieron dosis diarias del extracto de yerba mate por vía oral y mostraron una inhibición significativa de la angiogénesis y el crecimiento tumoral sin afectar los parámetros biológicos o el peso corporal (Garcia-Lazaro et al., 2020).

Finalmente, con respecto a las propiedades antivirales de la yerba mate, se evaluaron los efectos antiherpéticos de diferentes fracciones de un extracto crudo obtenido de las hojas de *Ilex paraguariensis* contra HSV-1 y HSV-2. Las fracciones evaluadas incluyeron el extracto crudo, la fracción n-BuOH, la fracción residual acuosa, la fracción n-BuOH residual, y la fracción de acetato de etilo. Todas las muestras probadas mostraron actividad a concentraciones no citotóxicas, durante las pruebas, se encontró que la fracción de acetato de etilo demostró una significativa actividad antiherpética. Esta fracción no solo inactivó eficazmente los virus HSV-1 cepa KOS y HSV-2 cepa 333, sino que también afectó la

adsorción y penetración de los virus en las células Vero (Lückemeyer et al., 2012). También, fue probada la actividad de extractos acuosos de yerba mate contra HSV-1 cepas KOS y 29-R en experimentos *in vitro* con células Vero, demostrando valores significativos de inhibición. (Müller et al., 2007)

En nuestro país, el mate representa una tradición arraigada en la sociedad, tal es así que la Ley 26.871 lo declaró como infusión nacional. Además, según datos del Instituto Nacional de la Yerba Mate, en Argentina en relación a la yerba mate molida y envasada destinada al consumo interno, las cifras oficiales indican que desde enero hasta diciembre del 2022 se destinaron 275 millones de kilos para el mercado interno (Instituto Nacional de la Yerba Mate, 2023).

Teniendo en cuenta esta información, resulta interesante estudiar las propiedades medicinales de la planta de yerba mate y las posibles contribuciones de esta infusión a la salud pública, ampliando así nuestro entendimiento sobre sus beneficios más allá de lo cultural.

# Hipótesis y objetivos

## **Hipótesis**

Los extractos de hojas de *Ilex paraguariensis* presentarán actividad antiviral debido a la riqueza de sus compuestos químicos.

## **Objetivo**

El objetivo general consiste en estudiar las propiedades antivirales de los extractos vegetales de *Ilex paraguariensis*, yerba mate, teniendo en cuenta la gran diversidad de compuestos químicos que los componen.

## **Los objetivos específicos de este proyecto son:**

- 1- Obtener los extractos de hojas de *Ilex paraguariensis* y de una marca comercial de yerba.
- 2.- Evaluar la actividad antiviral de los extractos vegetales obtenidos contra HSV-1 y el virus del Zika.

# Materiales y Métodos

## Elaboración de extractos de *Ilex paraguariensis*

### Obtención y preparación de muestras de hojas para la extracción

Se llevaron a cabo tres extracciones a partir de las hojas de *Ilex paraguariensis*: una empleando las hojas frescas recogidas directamente de la planta sin tratamiento adicional, otra utilizando las hojas que habían sido sometidas a un proceso de secado, y la tercera a partir de una marca comercial de yerba mate.

#### 1. Obtención de hojas frescas

Las hojas frescas utilizadas en este estudio fueron proporcionadas por el Dr. Pedro Alfonso Sansberro del Laboratorio de Biotecnología Aplicada y Genómica Funcional. Facultad de Ciencias Agrarias (Universidad Nacional del Nordeste). Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE-CONICET). Estas hojas fueron seleccionadas de acuerdo con los criterios específicos de la investigación y una vez cosechadas y lavadas se congelaron a -20 °C hasta su posterior uso.

#### 2. Obtención de hojas secas

Una porción de las hojas frescas fue sometida a un proceso de secado en dos etapas. Inicialmente, se expusieron durante dos horas a una temperatura de 35°C, seguido de otras dos horas a 50°C, hasta alcanzar un estado de total sequedad.

#### 3. Obtención de hojas de marca comercial

En la selección de hojas de marca comercial para este estudio, se optó por la marca de Yerba mate Taragüi debido a una serie de factores que respaldan la validez y confiabilidad de los resultados. La composición específica de esta marca, que se compone exclusivamente de yerba mate, asegura que los compuestos extraídos sean inherentes de las hojas de yerba mate. Además, se destaca la ausencia de aditivos como saborizantes o aromatizantes, que podrían influir en los perfiles químicos del extracto, estableciendo así la aptitud de las muestras.

#### 4. Extracción de los compuestos

Todos los extractos se obtuvieron siguiendo el mismo protocolo. Brevemente, se pesaron 10 gramos de hojas de *Ilex paraguariensis* y se agregaron dentro de un vaso de precipitados con 100 ml de buffer de extracción, se procesaron con una minipimer, posteriormente se adicionaron otros 100 ml de buffer, se mezcló y se almacenó a -20°C.

Los extractos se descongelaron, se filtraron con una gasa, a los restos vegetales remanentes se les adicionaron 200 ml de buffer de extracción y se almacenaron en el freezer a -20 °C. Posteriormente, cada extracto fue sometido a centrifugación en frío a 4000 rpm durante 30 minutos para separar las partículas en suspensión y obtener un sobrenadante limpio. Luego, a los extractos acuosos se le realizó una extracción utilizando una proporción de 1:1 en volumen con acetato de etilo. La fase orgánica resultante se sometió a evaporación en el rotaevaporador a 40°C, hasta que se eliminó por completo el solvente.

El residuo resultante de la evaporación se resuspendió en 3 ml de metanol y se sometió a un proceso de evaporación en una centrifuga de vacío Savant hasta obtener un extracto seco.

Se obtuvieron 44,0 mg de extracto seco de hojas frescas (YF), 128,3 mg de hojas secas (YS) y 48,6 mg de yerba comercial (YC). Los extractos secos se resuspendieron en 300 µl de metanol y luego 700 µl de medio MEM 1,5% suero de ternera sin antibióticos obteniendo una concentración aproximada de 44,0 mg/ml ; 128,3 mg/ml y 48,6 mg/ml para los extractos YF, YS e YC respectivamente.

#### Cultivos Celulares

Se emplearon células Vero derivadas de riñón de mono verde africano (adquiridas del ATCC) y se cultivaron en frascos T25. Para el cultivo de las células se utilizó medio mínimo esencial de Eagle (MEM) suplementado con 5% de suero de ternera inactivado (MEM 5%) y 50 µg/ml de gentamicina. Las células se incubaron a una temperatura de 37°C y, una vez alcanzada la monocapa, se mantuvieron en MEM suplementado con 1,5% de suero de ternera (MEM 1,5%).

#### Virus

En el estudio, se empleó el virus HSV-1 (Herpesvirus humano 1, ICTV 2019) cepa KOS, cepa B2006 , el virus recombinante HSV-1 YK608 y el virus del Zika cepa INEVH116141.

Para generar los stocks virales, se infectaron monocapas de células Vero que habían sido cultivadas en frascos T25. Se utilizó un inóculo de 1 ml de virus, con una multiplicidad de infección (m.i.) de 0,01. El inóculo se adsorbió durante 1 hora en una estufa gaseada a 37°C, con agitación cada 15 minutos. Posteriormente, se retiró el inóculo y se añadieron 5 ml de MEM 1,5%. Las células se incubaron a 37°C con un 4% de CO<sub>2</sub> durante un período de 48 horas. Al finalizar este período de incubación, se realizaron dos ciclos de congelamiento y descongelamiento para lisar las células. Luego de la lisis celular, el virus total fue cosechado y sometido a una centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante resultante se tituló mediante el método de unidades formadoras de placas y posteriormente se fraccionó para su almacenamiento a -70°C.

## Citotoxicidad

### Ensayo de MTT

Se evaluó la citotoxicidad de los extractos procedentes de *Ilex paraguariensis* en células Vero. Las células se cultivaron en microplaca de 96 pocillos durante un período de 24 horas, luego, se agregaron diluciones seriadas al medio de los extractos en MEM 1,5% y se incubaron durante 24 horas a 37°C. Como control celular, se dejaron pocillos sin tratar agregando solo MEM 1,5%. Después de la 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 mitocondriales a un compuesto de color azul violáceo y su densidad óptica se puede medir a 590 nm. En cada pocillo se agregaron 10  $\mu$ l de MTT (5 mg/ml) y se incubó por 2 horas. Luego de la incubación, se removió el medio de cada pocillo, se resuspendió el precipitado de la sal de tetrazolio con 100  $\mu$ l de etanol 96% y se midió la densidad óptica en el lector de microplaca.

Se calculó el porcentaje de viabilidad para cada dilución de los extractos, comparando la densidad óptica media con el control celular, que se consideró como el 100% de viabilidad. En los casos en los que el valor superó el 100%, se informó como 100% de viabilidad.

Para cada extracto, se elaboró un gráfico que muestra el porcentaje de viabilidad en función de la concentración, y se determinó la Concentración Citotóxica 50 (CC<sub>50</sub>) mediante interpolación utilizando una regresión lineal. Si la viabilidad celular fue superior al 50% en todas las concentraciones evaluadas para ciertos compuestos, se indicó que la CC<sub>50</sub> excede la máxima concentración empleada en cada caso.

## Ensayo con cristal violeta

Se cultivaron células Vero en placas de microtitulación de 96 pocillos y se incubaron en presencia de diluciones seriadas de los distintos extractos durante un período de 24 horas. Al concluir la incubación, las células se fijaron con una solución al 10% de formaldehído durante 10 minutos. Después de la fijación, se descartó el formaldehído y se llevaron a cabo lavados con agua corriente. Luego, se tiñeron utilizando una solución de cristal violeta al 0,05%. Una vez retirado el exceso de cristal violeta, se procedió a lavar con agua de manera exhaustiva, y la microplaca se dejó secar al aire. Luego, el colorante se resuspendió en una solución de etanol:agua 1:1 con 0,01% de ácido acético glacial. Se leyó la absorbancia a 590 nm en un lector de ELISA.

A partir de los datos obtenidos de las lecturas de DO, se determinó la Concentración Citotóxica 50 (CC<sub>50</sub>) mediante un ajuste lineal. Para los compuestos en los que la viabilidad celular fue superior al 50% en todas las concentraciones evaluadas, se informó que la CC<sub>50</sub> excede la máxima concentración utilizada en cada caso.

## Actividad antiviral

### Ensayo de rendimiento viral

Para estudiar la actividad antiviral de los extractos de yerba mate, se realizó un ensayo de rendimiento viral.

Se cultivaron células Vero en placas de 24 pocillos hasta llegar a una confluencia celular del 100%. Luego, se infectaron las monocapas con un volumen de inóculo de 0,1 ml y se dejó adsorber a 37°C durante 1 hora. Al terminar la adsorción, se retiró el inóculo y se agregaron diluciones seriadas al medio de los extractos en MEM 1,5% ST que se incubaron durante 24 horas post infección. Al cabo de dicho tiempo se congelaron las microplacas y se tituló el virus por el método de formación de placas. Brevemente, las monocapas de células Vero se infectaron con diluciones seriadas al décimo de las muestras a titular por duplicado. Luego de la adsorción de una hora se retiró el inóculo y se cubrió con medio semisólido. A las 48 h.p.i. para HSV-1 y a los 5 días para el virus del Zika, se fijaron las células con formol 10% durante 10 minutos y se colorearon con cristal violeta al 1%. Luego de lavar con agua se contaron las placas de lisis y se calcularon los títulos virales de cada muestra. A partir de los títulos virales se determinaron los porcentajes de inhibición.

$$\text{Título viral} = \frac{\bar{x} \text{ unidades formadoras de placas}}{\text{Dilución} \times \text{Volumen de inóculo}}$$

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - \frac{\text{Título del tratamiento con extracto de yerba mate} \times 100}{\text{Título del control de virus}}$$

A partir del gráfico del porcentaje de inhibición en función de la concentración del extracto se calculó la Concentración Efectiva 50 ( $CE_{50}$ ) para cada uno de los extractos evaluados. La  $CE_{50}$  se define como la concentración de una sustancia que reduce al 50% el título viral.

Utilizando la  $CE_{50}$  y la  $CC_{50}$  se calcularon los índices de selectividad (IS) de los extractos a través de la relación  $CC_{50}/CE_{50}$ .

### Microscopía de Fluorescencia

Se estudió la inhibición de la expresión del virus HSV-1 cepa YK608 en los cultivos de células Vero tratados con los extractos de yerba mate.

El virus HSV-1 YK608 es un virus recombinante que tiene sus proteínas VP26 y VP22 fusionadas a proteínas fluorescentes verde y rojo respectivamente.

Las células Vero fueron cultivadas sobre cubreobjetos dispuestos dentro de una placa de cultivo de 24 pocillos. Se infectaron con el virus HSV-1 cepa YK608 a una m.i. 0,1 . Luego de la adsorción, se retiró el inóculo, se agregaron los distintos extractos y se incubaron durante 24 hs a 37 °C en atmósfera con 4% de CO<sub>2</sub>. Se incluyeron controles que consistieron en células sin tratamiento (CC), células infectadas con el virus y sin tratar (CV) y células sin infectar tratadas con los extractos. Transcurridas las 24 horas, las células fueron fijadas con metanol a -20°C durante 10 minutos. Posteriormente, las células se lavaron con PBS y los núcleos se tiñeron con DAPI. Los cubreobjetos se montaron sobre glicerina tamponada para su posterior observación al microscopio de fluorescencia. Se adquirieron imágenes utilizando un objetivo de 60x y diferentes filtros de fluorescencia. Las imágenes fueron coloreadas mediante el programa ImageJ.

A partir de las imágenes se cuantificaron las células infectadas. El conteo se realizó dividiendo la imagen en grillas, eligiendo al azar al 50% de las grillas y multiplicando por dos para ajustar los datos a la totalidad de la imagen. Una vez hecho el conteo se normalizó el número de células infectadas dividiendo por el número de células en las imágenes de la tinción con DAPI. Se tomó al CV como el 100% de las infecciones y se relativizaron los porcentajes de los tratamientos con respecto a este.

# Resultados

## Obtención de los extractos

Con el objetivo de evaluar la actividad antiviral de la yerba mate, se obtuvieron extractos a partir de hojas frescas de la planta, hojas secas y yerba comercial.

Las hojas frescas se recolectaron de plantas de *Ilex paraguariensis* que fueron suministradas por el Dr. Pedro Alfonso Sansberro del Laboratorio de Biotecnología Aplicada y Genómica Funcional, Facultad de Ciencias Agrarias (Universidad Nacional del Nordeste). Después de la recolección y lavado, las hojas fueron congeladas a -20 °C. Este procedimiento garantizó la preservación de los componentes de las hojas para su posterior extracción en nuestro laboratorio.

Una porción de las hojas frescas fue sometida a un proceso de secado en dos etapas, con temperaturas escalonadas de 35°C y 50°C, respectivamente. Este método aseguró la obtención de hojas completamente secas.

La selección de yerba comercial se centró en la composición exclusiva de yerba mate, sin aditivos como saborizantes o aromatizantes, asegurando la representatividad de los compuestos extraídos. Por este motivo se utilizó la marca Taragüi.

Tomando como punto de partida a las materias primas obtenidas, todos los extractos se obtuvieron mediante un protocolo estandarizado. Las hojas fueron pesadas hasta obtener 10 gramos y, posteriormente procesadas con un buffer de extracción. Después de la centrifugación en frío y la extracción con acetato de etilo, las fases orgánicas resultantes de los extractos acuosos se evaporaron para la obtención de los extractos secos.

Para realizar una comparación eficiente y poder diferenciar los extractos entre ellos, se les asignó abreviaturas distintivas. De este modo, el extracto seco obtenido de hojas frescas se identificó como YF, mientras que el extracto seco de hojas secas se designó como YS y el extracto seco proveniente de la yerba comercial se denominó YC.

Los extractos secos se resuspendieron en 10% de metanol y medio MEM 1,5% suero de ternera sin antibióticos obteniendo una concentración aproximada de 44 mg/ml; 128,3 mg/ml y 48,6 mg/ml para los extractos YF, YS e YC respectivamente (cuadro 1).

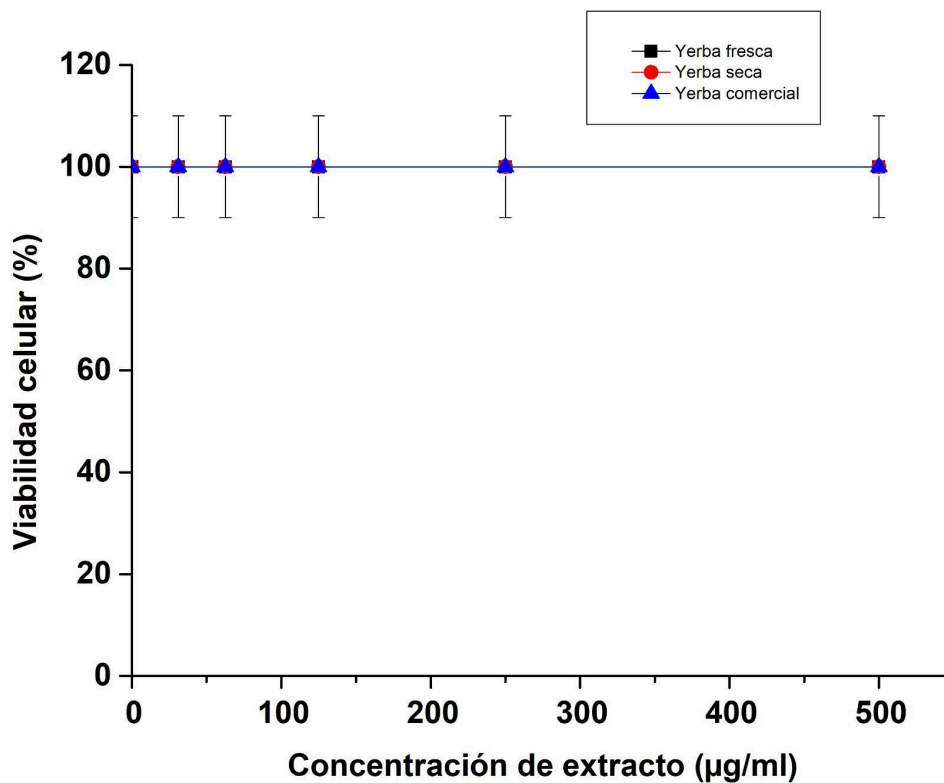
**Cuadro 1** : Extractos obtenidos de *Ilex paraguariensis*.

Extracto	Abreviatura	Concentración (mg/ml)
Yerba mate fresca	YF	44,0
Yerba mate seca	YS	128,3
Yerba mate comercial	YC	48,6

## Citotoxicidad

Se evaluó la citotoxicidad de los extractos de *Ilex paraguariensis* para determinar el rango de concentraciones en el cual no son tóxicos para las células Vero. Para ello, se utilizó el ensayo de MTT. Brevemente, las células Vero cultivadas en monocapa fueron tratadas con diluciones seriadas al medio de extractos de *Ilex paraguariensis* durante un periodo de 24 horas. Las diluciones abarcaron un rango desde la concentración mínima analizada de 31  $\mu\text{g/ml}$  hasta la concentración máxima 500  $\mu\text{g/ml}$ . Al concluir esta exposición de 24 horas, se llevó a cabo el ensayo de MTT, agregando el reactivo (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) y permitiendo una incubación adicional de 2 horas para la formación de la sal de tetrazolio. Tras ese periodo, el medio de cultivo fue retirado y la sal resultante fue resuspendida en etanol al 96%, permitiendo así la lectura de la densidad óptica a 590 nm con un lector de microplacas.

Se calculó el porcentaje de viabilidad, estableciendo el control de células tratadas con MEM 1,5% ST solo como el 100% de viabilidad. Se generaron gráficos para cada extracto, exhibiendo el porcentaje de viabilidad en función de la concentración del extracto (Fig. 6).

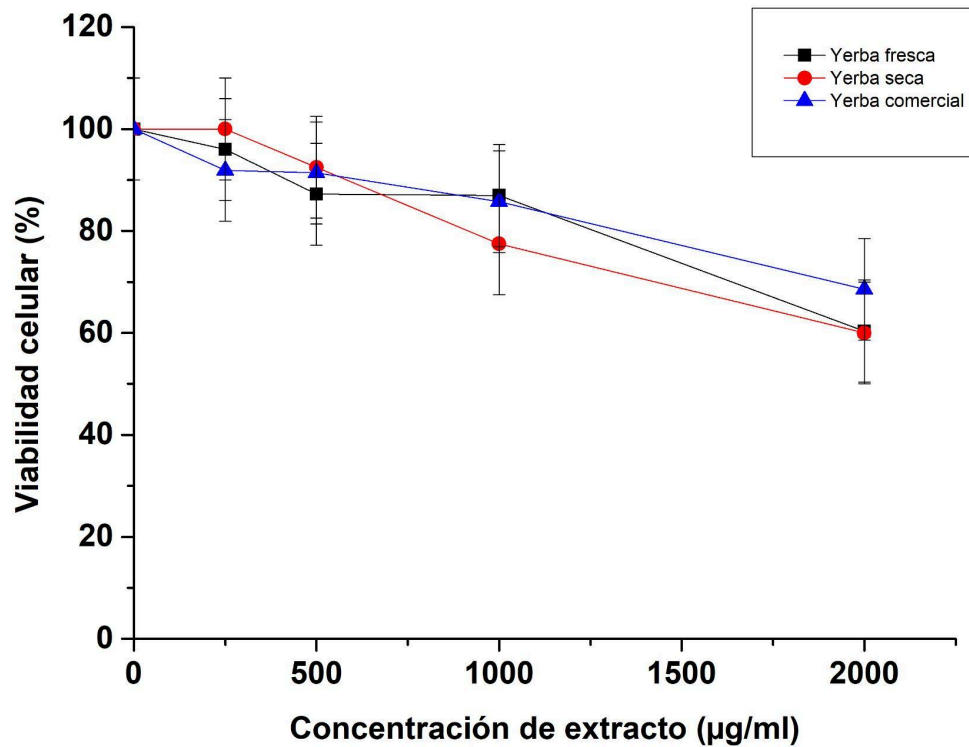


**Figura 6:** Citotoxicidad de los extractos de yerba mate. Monocapas de células Vero fueron tratadas con distintas concentraciones de los extractos durante 24 horas. Al cabo de este periodo, se evaluó la viabilidad celular mediante la técnica del MTT. El gráfico presenta un error del 10% asociado a la técnica utilizada

No se observó citotoxicidad para ninguno de los extractos evaluados. Incluso en la máxima concentración analizada de 500 µg/ml pudo observarse una viabilidad del 100% tanto para YF, YS e YC (Fig. 6). Al no haber indicios de efectos citotóxicos en el rango de concentraciones evaluado, se tomó la decisión de volver a evaluar la citotoxicidad incrementando las concentraciones de los extractos.

El segundo ensayo de citotoxicidad se llevó a cabo empleando la técnica de viabilidad a través de la tinción con cristal violeta. El procedimiento se realizó de manera similar al ensayo de MTT, exponiendo las células Vero con diluciones seriadas al medio de los extractos de *Ilex paraguariensis* durante un periodo de 24 horas. Sin embargo, en este caso, la concentración máxima se elevó a 2000 µg/ml, mientras que la concentración mínima evaluada fue de 250 µg/ml. Al finalizar la incubación, las células fueron fijadas con una solución al 10% de formaldehído. Tras la fijación, se realizaron los lavados correspondientes. Posteriormente, las células se tiñeron con cristal violeta. Después de retirar el exceso de colorante, se lavaron con agua y se dejó secar la microplaca al aire.

Posteriormente, el colorante se resuspendió en una solución de etanol: agua con 0,01% de ácido acético glacial y se procedió a leer la absorbancia de la microplaca. A partir de los datos obtenidos de densidad óptica, se obtuvo el gráfico de la figura 7.



**Figura 7:** Citotoxicidad de los extractos de yerba mate. Monocapas de células Vero fueron tratadas con distintas concentraciones de los extractos durante 24 horas. Al cabo de este periodo, se evaluó la viabilidad celular mediante la técnica de tinción con cristal violeta. El gráfico presenta un error del 10% asociado a la técnica utilizada

Al observar la viabilidad celular, podemos ver que los tres extractos presentan curvas similares. Se evidencia que la viabilidad disminuye a medida que aumenta la concentración de los extractos, sin embargo, en la concentración de 2000 µg/ml, aún presenta una viabilidad entre el 60% y el 68% (Fig. 7). En relación a la  $CC_{50}$ , que es un parámetro indicador de toxicidad y señala la concentración a la cual el extracto reduce la viabilidad celular en un 50%, como se puede ver en la figura 7, todas las concentraciones superan la concentración máxima analizada de 2000 µg/ml (cuadro 2). Este resultado pone en evidencia la baja citotoxicidad de los extractos evaluados durante 24 horas en células Vero. Puede notarse, que no hubo diferencias entre las técnicas de MTT y tinción con cristal violeta, ya que, a la concentración de 250 µg/ml se observa que ambas técnicas presentan el mismo porcentaje de viabilidad celular. Por lo tanto, se considera que ambos métodos arrojan resultados de citotoxicidad similares.

**Cuadro 2:** Citotoxicidad de los extractos obtenidos de *Ilex paraguariensis*.

Extracto	CC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )
YF	>2000
YS	>2000
YC	>2000

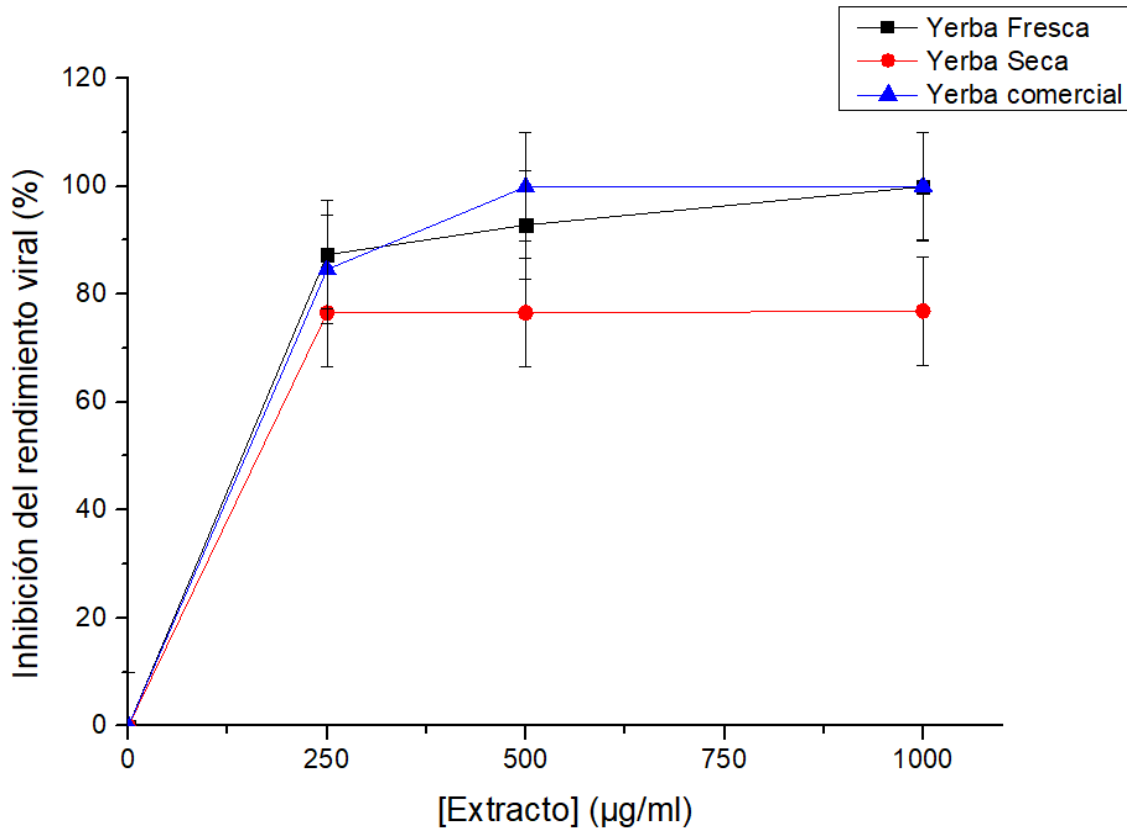
Valores de CC<sub>50</sub> obtenidos mediante interpolación a partir de los gráficos de porcentaje de viabilidad y concentración del extracto.

## Actividad antiviral contra el virus herpes

Teniendo en cuenta los resultados de investigaciones previas que muestran que extractos de yerba mate inhiben la replicación de HSV-1, evaluamos los extractos obtenidos contra distintas cepas de HSV-1. (Müller et al.,2007; Lückemeyer et al.,2012).

Para estudiar el efecto de los extractos de *I. paraguariensis*, utilizamos la técnica de rendimiento viral. Para ello, se infectaron monocapas de células Vero con las cepas KOS o B2006 a distintas multiplicidades de infección, luego de la hora de adsorción se agregaron diluciones seriadas al medio de los extractos y se incubaron durante 24 horas. Al terminar dicho tiempo se congelaron las microplacas y se tituló el virus por el método de formación de placas. A partir de los títulos virales se determinaron los porcentajes de inhibición y se determinó la Concentración Efectiva 50 (CE<sub>50</sub>) para cada extracto evaluado a partir del gráfico del porcentaje de inhibición en relación con la concentración del extracto. La CE<sub>50</sub> representa la concentración de extracto que reduce el título viral en un 50%. Utilizando la CE<sub>50</sub> y la CC<sub>50</sub> se calcularon los índices de selectividad (IS) de los extractos. El IS es un parámetro que relaciona la actividad antiviral de un extracto con su citotoxicidad, por lo que, cuanto mayor es, más selectivo resulta contra el virus a concentraciones poco tóxicas para las células.

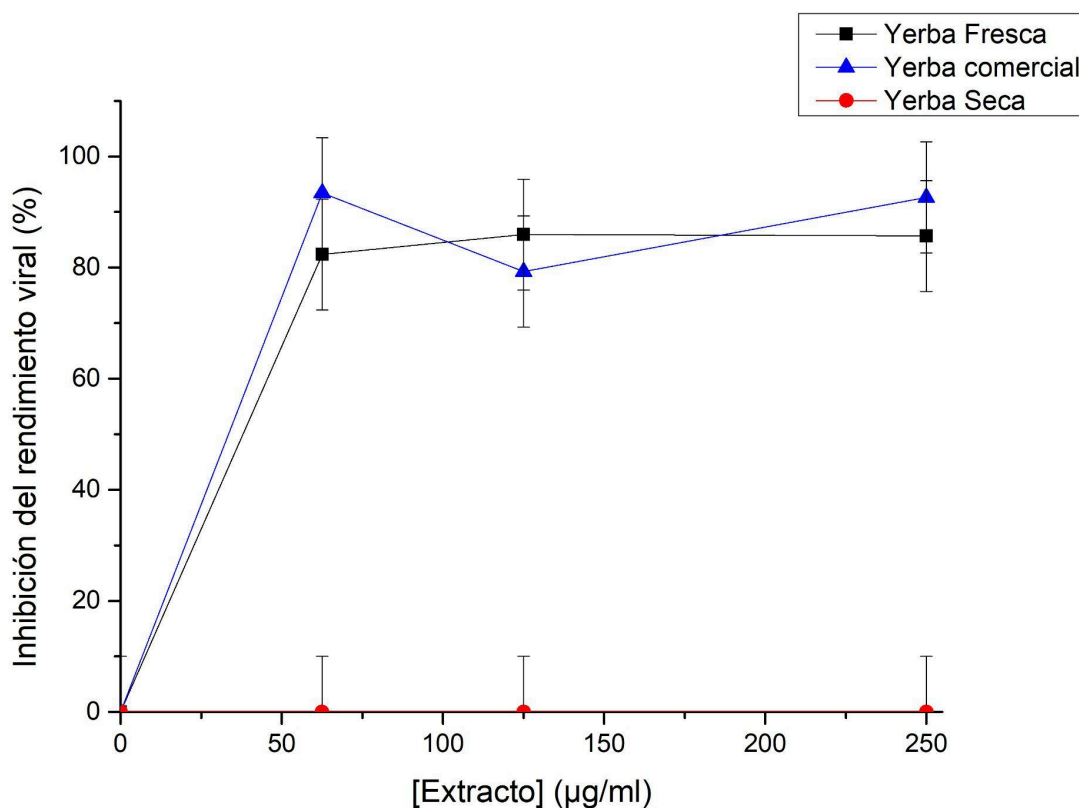
Después de haber realizado la prueba de citotoxicidad con concentraciones más altas y haber obtenido un rango más amplio de trabajo (Fig. 7), se optó por realizar los ensayos con diluciones seriadas al medio de los extractos desde 1000  $\mu\text{g/ml}$  a 250  $\mu\text{g/ml}$ .



**Figura 8:** Actividad antiviral contra HSV-1. Células Vero infectadas con HSV-1 KOS (m.i. 0,01) fueron tratadas con distintas concentraciones de los extractos luego de la adsorción viral. A las 24 hs se tituló el virus infectivo y se determinaron los porcentajes de inhibición.

Cuando se infectó con una m.i de 0,01, los tres extractos evaluados presentaron inhibiciones altas. Se puede observar que en los tres tratamientos hay inhibiciones mayores al 70%. Los extractos que mayor inhibición presentaron fueron los de YF e YC obteniendo porcentajes superiores al 80% en la concentración 250 µg/ml y llegando a una inhibición del 100% a la concentración de 1000 µg/ml. El porcentaje de inhibición de YS es menor que los otros dos y se mantiene constante al 76% en el rango de 250 µg/ml y 1000 µg/ml (Fig. 8).

Luego, se evaluó la actividad antiviral de los extractos utilizando una m.i de 1 de la cepa KOS y utilizando diluciones seriadas al medio de los extractos desde 250 µg/ml hasta 62,5 µg/ml.



**Figura 9:** Actividad antiviral contra HSV-1. Células Vero infectadas con HSV-1 KOS (m.i. 1) fueron tratadas con distintas concentraciones de los extractos luego de la adsorción viral. A las 24 hs se tituló el virus infectivo y se determinaron los porcentajes de inhibición.

Al infectar con una multiplicidad de infección de 1, los tratamientos con YF e YC siguen produciendo una inhibición alta que fluctúa entre el 80% y el 95% para las concentraciones de 62,5 µg/ml y 250 µg/ml. Mientras que el extracto YS no inhibe al HSV-1 KOS en ninguna de las concentraciones evaluadas. (Fig. 9).

**Cuadro 3:** Efecto antiviral de los extractos de yerba mate contra HSV-1 KOS.

Extracto	CE <sub>50</sub> (µg/ml)	CC <sub>50</sub> (µg/ml)	IS
YF	143,13	>2000	>13,97
YC	147,79	>2000	>13.53
YS	154,43	>2000	>12,95

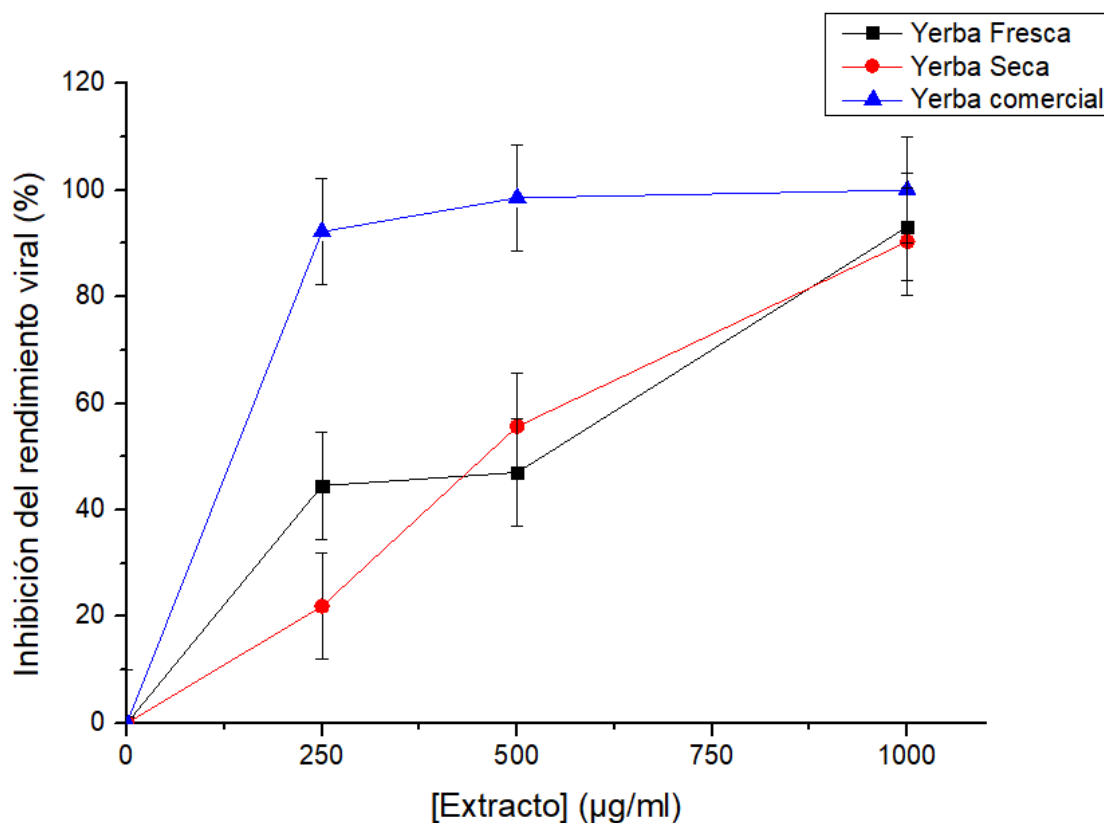
Valores de IS, CE<sub>50</sub> y CC<sub>50</sub> obtenidos mediante interpolación a partir de los gráficos de porcentaje de viabilidad y concentración del extracto.

El cuadro 3 presenta las concentraciones efectivas obtenidas al infectar con una m.i. de 0,01. Al observar los valores de  $CE_{50}$  e IS de los extractos, podemos notar que las diferencias entre ellos son mínimas, lo que nos llevaría a pensar que tienen el mismo efecto. Cabe destacar que la menor concentración utilizada en el ensayo para determinar estos porcentajes fue de 250  $\mu\text{g/ml}$ , por lo tanto, sería interesante saber cómo se comportan los extractos a concentraciones menores.

En resumen, todos los extractos evaluados contra HSV-1 cepa KOS demostraron tener actividad antiviral cuando la infección fue realizada a baja multiplicidad de infección. Por otro lado, los extractos YC e YF presentaron mayor inhibición que YS. Si bien la inhibición del rendimiento viral fue menor al utilizar una m.i. mayor, en ambos casos la respuesta obtenida fue concentración dependiente.

Teniendo en cuenta que los extractos de yerba mate inhiben la replicación del HSV-1 cepa KOS, se evaluó la actividad antiviral con una cepa TK- resistente al fármaco aciclovir, la cepa B2006.

Para ello, como se mencionó anteriormente, se implementó la técnica de rendimiento viral utilizando el mismo procedimiento que se llevó a cabo para HSV-1 cepa KOS. Esto permitió obtener el gráfico de inhibición del rendimiento viral que se presenta en la figura 10, junto con los valores de IS y  $CE_{50}$ .



**Figura 10:** Actividad antiviral contra HSV-1. Células Vero infectadas con HSV-1 B2006 (m.i.=0,1) fueron tratadas con distintas concentraciones de los extractos luego de la adsorción viral. A las 24 hs se tituló el virus infeccioso y se determinaron los porcentajes de inhibición.

La figura 10 muestra que los tres extractos fueron capaces de inhibir la cepa B2006 del HSV-1. Además, el extracto YC presentó la mayor inhibición manteniendo porcentajes mayores al 92% en el rango de 250 µg/ml a 1000 µg/ml. En los tratamientos con los extractos YF e YS se ve que al aumentar la concentración de extracto, hay un aumento en los porcentajes llegando a inhibiciones del 90% en la concentración de 1000 µg/ml pero el efecto de estos dos es menor al de YC.

**Cuadro 4:** Efecto antiviral de los extractos de yerba mate contra HSV-1 B2006.

Extracto	CE <sub>50</sub> (µg/ml)	CC <sub>50</sub> (µg/ml)	IS
YF	455,00	>2000	>4,39
YC	135,60	>2000	>14,75
YS	422,36	>2000	>4,74

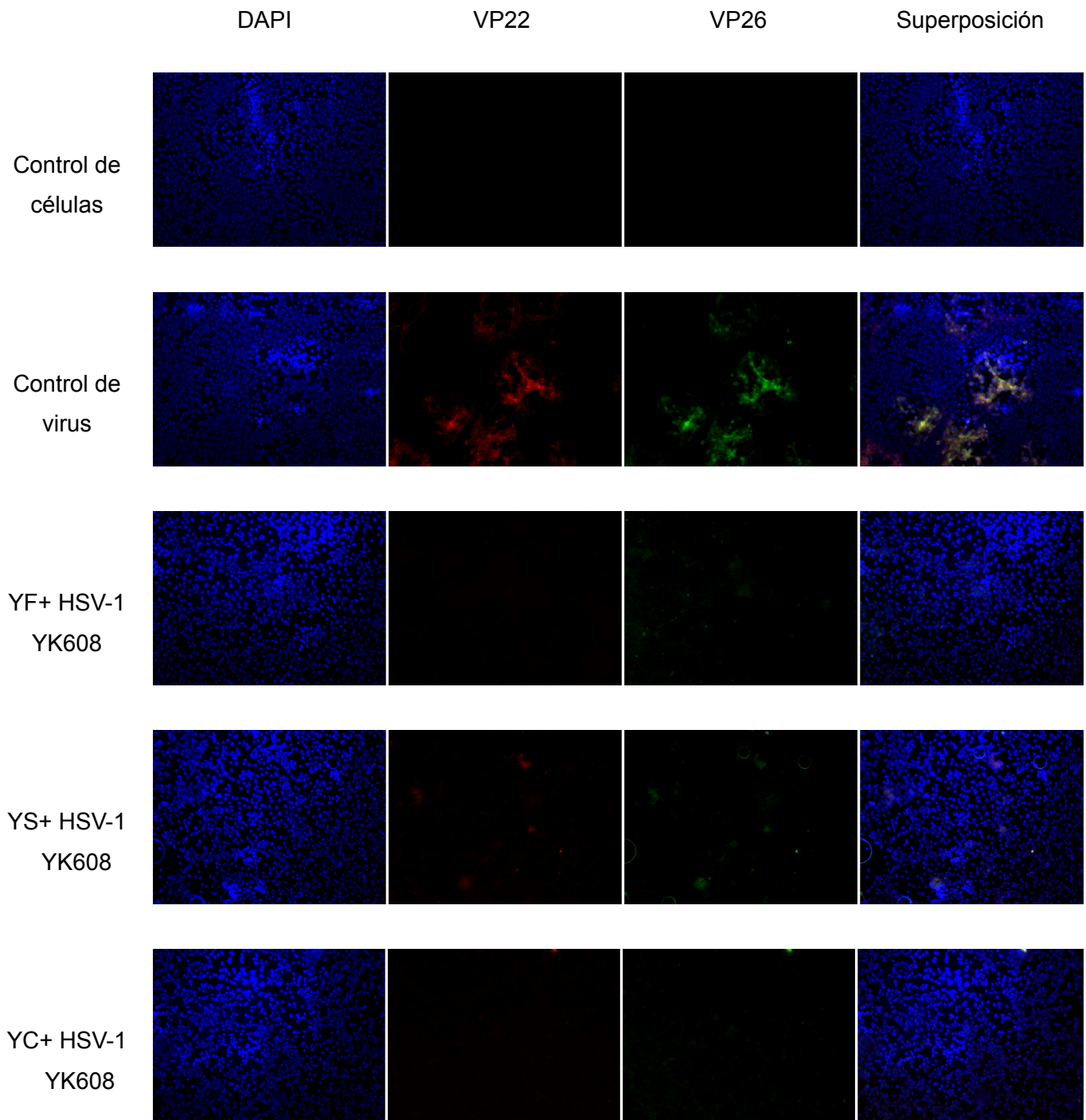
Valores de IS, CE<sub>50</sub> y CC<sub>50</sub> obtenidos mediante interpolación a partir de los gráficos de porcentaje de viabilidad y concentración del extracto.

Al analizar el cuadro 4 que contiene las concentraciones efectivas obtenidas al infectar con una m.i. de 0,1 se observa que YC ejerce mayor inhibición que YF e YS. Esto se ve en las CE<sub>50</sub> donde YC tiene menor valor que los otros extractos, por lo que, se necesita menor concentración de extracto para reducir un 50% el título viral. Al comparar los IS, el de YC es mayor denotando una acción antiviral más selectiva.

En base a estos resultados, se determinó que todos los extractos de yerba mate demostraron tener actividad antiviral contra el HSV-1 B2006, siendo el extracto de YC el que mayor inhibición presentó.

Siguiendo con la evaluación de la actividad antiviral de los extractos contra HSV-1, se utilizó la cepa recombinante YK608 que tiene la particularidad de expresar, en células infectadas, la proteína de tegumento VP22 fusionada a una proteína fluorescente roja y la proteína de cápside VP26 fusionada a una proteína fluorescente verde (Sugimoto et al.,2008).

Para realizar este ensayo, las células Vero fueron cultivadas sobre cubreobjetos en placas y fueron posteriormente infectadas con el virus HSV-1 cepa YK608 con una m.i. de 0,1. Después de la adsorción viral, se adicionaron los extractos a una concentración de 1 mg/ml, siendo esta la concentración más elevada empleada en nuestros experimentos y se procedió a incubar por 24 horas a 37°C. Se incluyeron controles que consistieron en células sin infectar y sin tratamiento (CC), células infectadas con el virus y sin tratar (CV) y células sin infectar tratadas con los extractos. Transcurridas las 24 horas, las células fueron fijadas con metanol a -20°C durante 10 minutos. Posteriormente, las células se lavaron con PBS y los núcleos se tiñeron con DAPI. Los cubreobjetos se montaron sobre glicerina tamponada para su posterior observación al microscopio de fluorescencia. Se adquirieron imágenes utilizando un objetivo de 60x y diferentes filtros de fluorescencia. Posteriormente, se procedió a colorear las imágenes y montarlas mediante el programa ImageJ para su posterior análisis.



**Figura 11:** Actividad antiviral contra HSV-1 YK608. Células Vero infectadas con HSV-1 YK608 fueron tratadas con 1 mg/ml de los extractos luego de la adsorción viral. A las 24 hs se observó la expresión de las proteínas virales VP22 y VP26 utilizando un microscopio de fluorescencia.

Al conocer las características de fluorescencia asociadas a las proteínas de tegumento (VP22) y la cápside (VP26) del HSV-1 YK608 mencionadas en Sugimoto et al.(2008) se pudo realizar el análisis de las imágenes. Es importante destacar que la reducción en la síntesis de las proteínas se asocia con una disminución en la infección viral, entonces, la reducción de estas proteínas se observa como una menor intensidad de fluorescencia o presencia de los colores asociados a los fluoróforos correspondientes. Por lo tanto, una disminución en la cantidad de focos verdes en las imágenes indicaría una expresión más baja de VP26, y este mismo principio se aplica a VP22, que se observa en color rojo.

La figura 11 muestra que en el control de células, los núcleos teñidos con DAPI confirman la presencia de la monocapa de células Vero, además, no se observa fluorescencia asociadas a VP22 y VP26. Esto nos indica que las células por sí solas no presentan fluorescencia roja o verde.

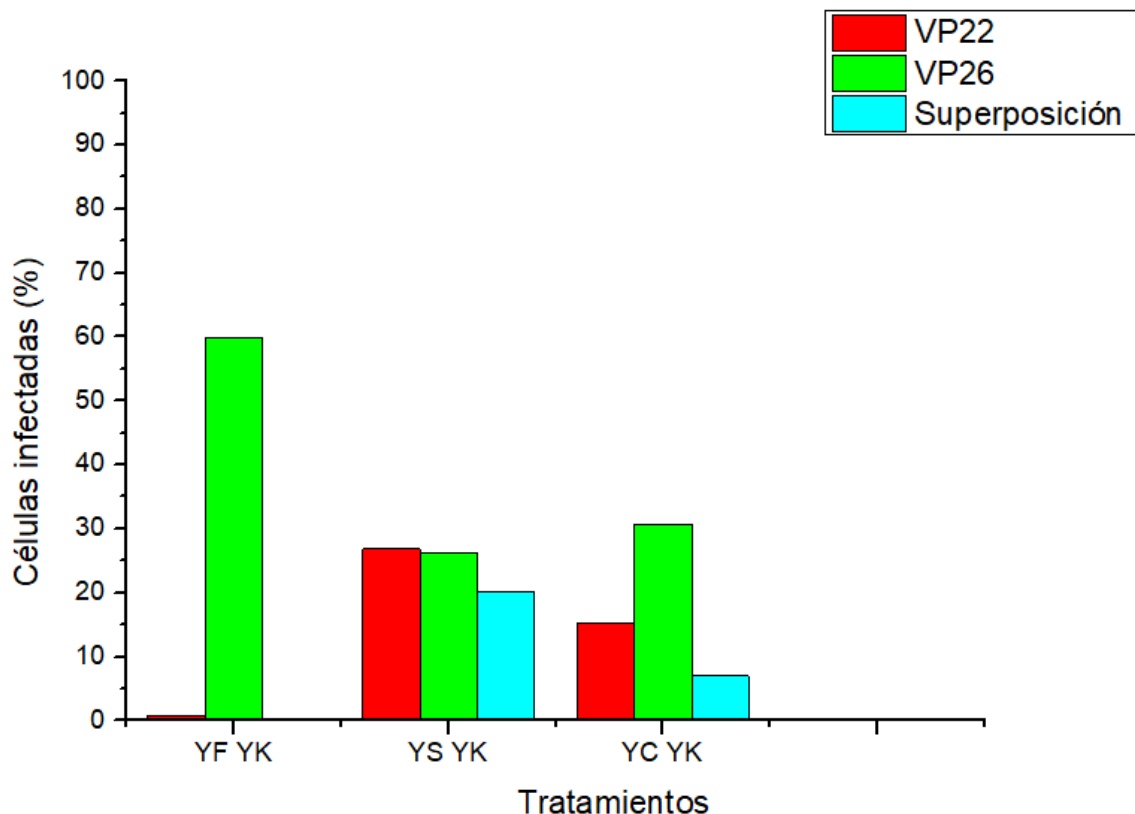
En el control de virus (CV) se observan focos fluorescentes de color rojo y verde respectivamente, indicando la presencia de células infectadas expresando las proteínas de HSV-1 cepa YK608. Asimismo, la intensidad de fluorescencia es alta, lo que sugiere una alta expresión de las proteínas virales en las células infectadas. La tinción con DAPI muestra la integridad de la monocapa luego de la infección.

En cuanto a los tratamientos con los extractos de yerba mate, se observa una disminución marcada del tamaño de los focos infecciosos así como también una menor intensidad de fluorescencia en la expresión de VP22 y VP26 con respecto al CV lo que nos indica que hay inhibición de la replicación viral. Cabe destacar que se identifican variaciones en la expresión de las proteínas virales VP22 y VP26 entre los diferentes tratamientos con extractos de yerba mate (Fig 11).

A partir de las imágenes obtenidas, se contaron las células positivas para cada fluorocromo. Para ello, se dividió la imagen en grillas eligiendo el 50% al azar y se ajustaron los resultados al total. Se normalizó dividiendo el número de células infectadas por el número de células positivas para DAPI. Se usó el número de células positivas del CV como referencia del 100% de células infectadas, obteniéndose de esta manera la figura 12.

En la figura 12 se observa que los tres extractos inhiben la expresión de las proteínas virales. En el tratamiento con YF, se observa un mayor porcentaje de expresión de VP26 mientras que VP22 presenta un porcentaje de expresión muy bajo. Por otro lado, en el tratamiento con YS se observan niveles relativamente similares de VP22 y VP26, mientras que con YC la expresión de VP26 es superior. Debido a que solo se realizó un ensayo, no podemos asegurar que haya diferencias significativas entre la expresión de ambas proteínas, pero podemos observar que la inhibición de la expresión ejercida por los

extractos está en el rango de 40-90 % de inhibición con respecto al CV. Sin embargo, es importante tener en cuenta que solo se contó el número de células que están expresando las proteínas, denotando solo presencia/ausencia del color correspondiente a cada una. Si se observa la intensidad de fluorescencia en los tratamientos, esta tiende a ser mucho menor comparada con las células infectadas sin tratar, en base a esto, podemos decir que hay menor cantidad de proteína viral expresada.



**Figura 12:** Inhibición de la expresión de proteínas virales. Se contaron las células Vero infectadas con HSV-1 cepa YK608. Cada imagen fue dividida en grillas, seleccionando aleatoriamente el 50%, y los resultados fueron ajustados al total. Se normalizó utilizando el conteo de las imágenes con DAPI. Se usó el CV como referencia del 100% de las infecciones para comparar con los tratamientos. Las barras en el gráfico representan el porcentaje de células infectadas para cada tratamiento.

En términos generales, a través del empleo de la microscopía de fluorescencia y de una cepa de virus modificada que expresa sus proteínas fluorescentes en las células infectadas confirmamos la capacidad inhibitoria de los extractos de yerba mate frente al HSV-1.

En resumen, los resultados del estudio de los extractos de yerba mate frente a distintas cepas de HSV-1 revelaron la capacidad antiviral de los mismos. La técnica de rendimiento

viral para las cepas KOS y B2006 evidenció que todos los extractos lograron inhibir la replicación viral. Por otra parte, en la microscopía de fluorescencia, cuando se trataron las muestras con los extractos, se vio una reducción en la expresión de proteínas virales VP22 y VP26 en células infectadas por la cepa YK608, demostrando nuevamente la capacidad inhibitoria de la yerba mate. Entonces, quedó en evidencia que las cepas KOS, B2006 e YK608 han demostrado ser sensibles a los extractos de *I. paraguariensis* confirmando así la capacidad antiherpética.

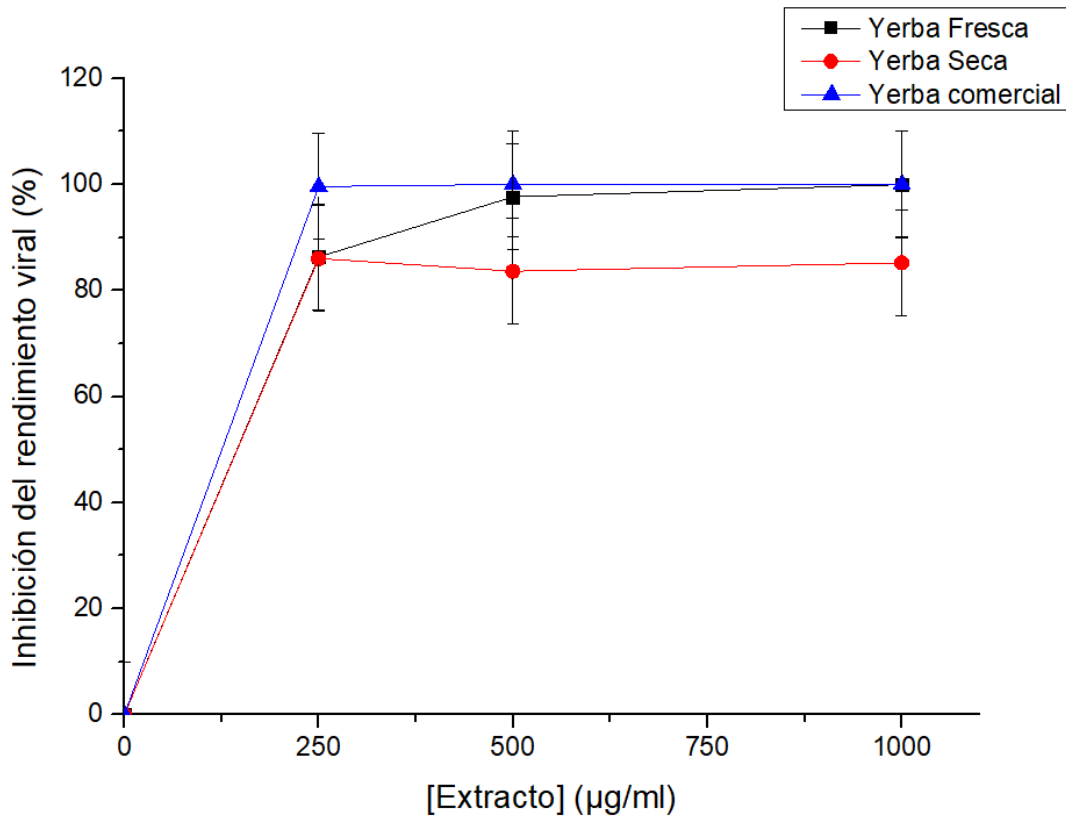
## Evaluación antiviral contra el virus del Zika

Conociendo los resultados previos que muestran la actividad de los extractos de yerba mate contra el virus HSV-1, se quiso evaluar la capacidad inhibitoria de estos contra el virus del Zika cepa INEVH116141.

Antes de comenzar con los ensayos, se buscaron estudios previos en los cuales se haya testeado la actividad anti Zika de la yerba mate. No obstante, no se encontró bibliografía en la que se haya demostrado la actividad de esta planta, por lo que este estudio podría considerarse una primera aproximación para comprender la relación entre este virus y la yerba mate.

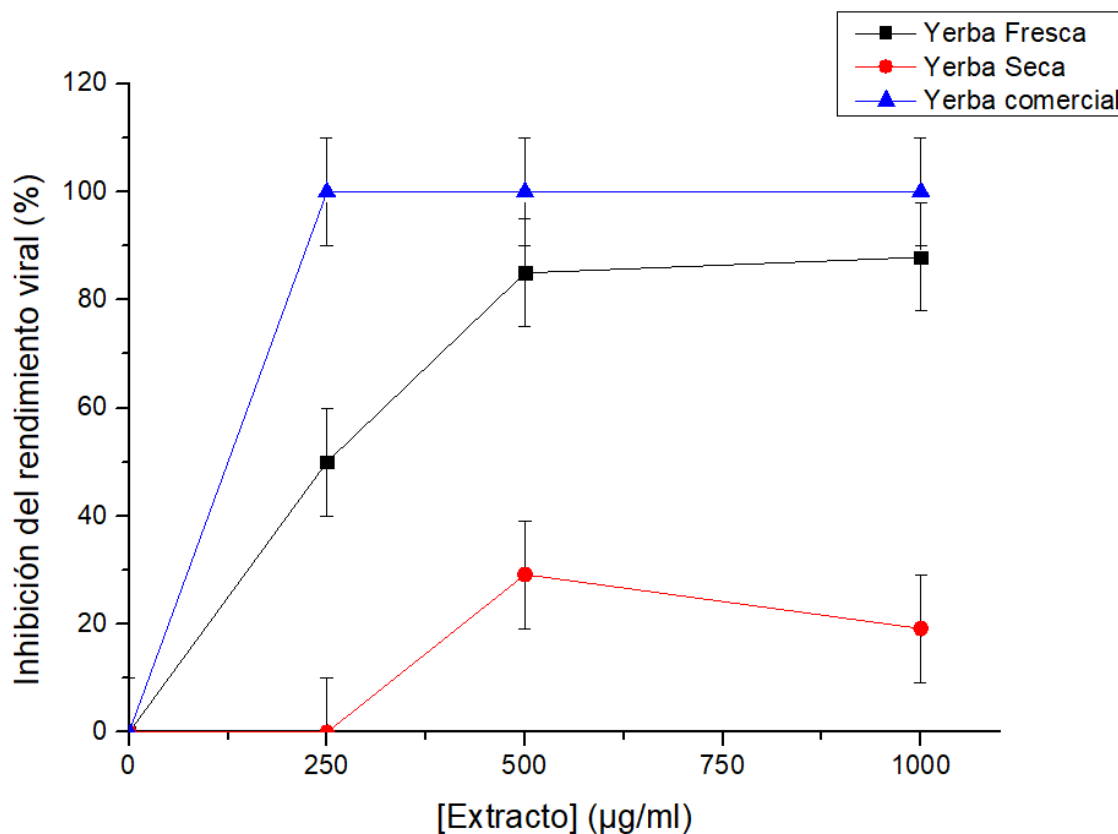
El estudio del efecto de los extractos de *I. paraguariensis* fue realizado mediante la técnica de rendimiento viral. Para ello, se realizó un procedimiento similar al utilizado con HSV-1. Las monocapas de células Vero se infectaron a distintas multiplicidades de infección del ZIKV y luego de la hora de adsorción se agregaron diluciones seriadas al medio de los extractos, a continuación, se incubaron por un periodo de 24 horas. Al terminar dicho tiempo se congelaron las microplacas y se tituló el virus por el método de formación de placas. A partir de los títulos virales se determinaron los porcentajes de inhibición, la  $CE_{50}$  y el IS.

Se utilizaron dos multiplicidades de infección diferentes una m.i de 0,1 y otra de 1. Para ello, se optó por realizar los ensayos con diluciones seriadas al medio de los extractos desde 1000  $\mu\text{g/ml}$  hasta 250  $\mu\text{g/ml}$ .



**Figura 13:** Actividad antiviral contra Zika. Células Vero infectadas con el ZIKV cepa INEVH116141 (m.i. 0,1) fueron tratadas con distintas concentraciones de los extractos luego de la adsorción viral. A las 24 hs se tituló el virus infeccioso y se determinaron los porcentajes de inhibición.

En la figura 13 se observa que cuando se infecta con una m.i 0,1 todos los extractos evaluados producen la inhibición del virus. El extracto que presentó mayor inhibición fue YC obteniéndose porcentajes mayores al 99,6% para el rango de concentraciones entre 250 µg/ml y 1000 µg/ml. Con respecto a YF, también mostró una inhibición alta alcanzando un 83% a la concentración de 250 µg/ml y porcentajes mayores al 99% a concentraciones mayores a 500 µg/ml. La inhibición producida por el extracto YS se mantuvo entre el 83% y 85% para todas las concentraciones entre 250 µg/ml y 1000 µg/ml presentando una inhibición menor con respecto a los otros extractos (Fig. 13).



**Figura 14:** Actividad antiviral contra Zika. Células Vero infectadas con el ZIKV cepa INEVH116141 (m.i. 1) fueron tratadas con distintas concentraciones de los extractos luego de la adsorción viral. A las 24 hs se tituló el virus infeccioso y se determinaron los porcentajes de inhibición .

En la figura 14, al infectar con una m.i de 1 se observa que el extracto YC es el que tiene mayor inhibición, manteniendo porcentajes mayores al 99,9% para todas las concentraciones testeadas. Con respecto a YF, se observa que con el aumento en la cantidad de virus hay una disminución de la inhibición de la replicación siendo del 50% al tratar con 250 µg/ml y llegando al 85% en concentraciones mayores a 500 µg/ml. El tratamiento con YS solo inhibe el rendimiento viral en un 20%.

**Cuadro 5:** Efecto antiviral de los extractos de yerba mate contra Zika cepa INEVH116141.

Extracto	CE <sub>50</sub> (µg/ml)	CC <sub>50</sub> (µg/ml)	IS
YF	144,79	>2000	>13,81
YS	257,18	>2000	>7,78
YC	125,52	>2000	>15,93

Valores de IS,  $CE_{50}$  y  $CC_{50}$  obtenidos mediante interpolación a partir de los gráficos de porcentaje de viabilidad y concentración del extracto.

En el Cuadro 5, se presentan los datos del  $CE_{50}$  e IS correspondientes al efecto antiviral de los extractos de yerba mate frente al ZIKV obtenidos a partir de una m.i de 0,1. Al comparar los valores de  $CE_{50}$ , se observa que YC e YF muestran valores cercanos, siendo YC ligeramente más bajo. Esto indica una inhibición levemente mayor asociada al extracto YC. Por otro lado, el extracto YS tiene la  $CE_{50}$  más alta, que se traduce como una menor inhibición en comparación con YC e YF. En términos de IS, se destaca que los extractos YC e YF son los más selectivos en su acción antiviral, mientras que el tratamiento con YS muestra el índice de selectividad más bajo, indicando un menor efecto en la inhibición del virus.

En resumen, en los experimentos realizados con ZIKV se observa que al igual que en los tratamientos contra herpes, las mayores inhibiciones están dadas por el extracto YC, seguido por YF y, en último lugar, el extracto de YS demostrando menor actividad. En estos ensayos se comprobó la actividad anti Zika de los extractos de yerba mate. Teniendo en cuenta que es una primera aproximación por la ausencia de la información previa, se resalta la importancia de estos resultados aportando a la comprensión de las propiedades medicinales de la yerba mate.

## Discusión

El aumento constante de la población mundial está dirigiendo la atención al desarrollo de políticas de atención médica y metodologías de investigación para mejorar las relaciones entre la nutrición y la salud humana. Dentro de este contexto, toma relevancia la búsqueda de diferentes alternativas como los metabolitos secundarios derivados de fuentes naturales como por ejemplo los provenientes de las plantas (Shetty K. y Sarkar D., 2020). Estos compuestos poseen la capacidad de establecer interacciones con uno o varios elementos de los tejidos vivos, presentando una diversidad de posibles efectos (Banwo et al., 2021).

Particularmente, en los últimos años, se han llevado a cabo varios estudios sobre *Ilex paraguariensis* centrándose principalmente en sus efectos sobre la salud (Croge et al., 2021). Esta planta no solo tiene importancia cultural por ser una de nuestras demostraciones de identidad como país al ser una infusión altamente consumida en nuestro territorio, sino que también numerosos estudios han reportado sus distintas bioactividades (Pullaiah, 2023).

Los componentes bioactivos presentes en la yerba mate, que constituyen alrededor del 10% de su peso seco, incluyen principalmente polifenoles como los ácidos clorogénicos y el ácido cafeico. También se encuentran alcaloides como la cafeína y teofilina, así como flavonoides que comprenden quercetina, rutina, luteína y miricetina, junto con terpenoides como los ácidos ursólico y oleanólico. Estos compuestos de origen vegetal son reconocidos por sus propiedades antiinflamatorias, anti-obesogénicas, antimutagénicas, antibacterianas y antivirales, así como por su capacidad antioxidante (Pinto et al., 2021)

Debido a lo expuesto anteriormente, el objetivo general de esta tesis consistió en examinar las propiedades antivirales de los extractos provenientes de *Ilex paraguariensis* considerando la amplia variedad de compuestos químicos presentes en dichos extractos.

La obtención de los extractos se consiguió de manera exitosa, se obtuvieron tres extractos a partir de las hojas de yerba mate. Los extractos obtenidos fueron: el extracto de hojas frescas (YF), el extracto de hojas secas (YS) y el extracto de yerba comercial (YC).

El análisis de los constituyentes químicos de los extractos no fue realizado dado que el propósito de este trabajo consistió en investigar sus propiedades antivirales pero se sabe por Barboza et al. (2009) que los compuestos de las hojas de *Ilex paraguariensis* incluyen ácido cafeico, ácido clorogénico, derivados del cafeoil, alcaloides de purina, flavonoides,

saponinas, vitaminas y compuestos polifenólicos. Además, está reportado que generalmente los efectos medicinales se deben a la combinación de estos productos secundarios de la planta.

Una vez obtenidos los extractos, se evaluó su citotoxicidad (Fig. 6 y 7) sobre las células Vero. Se sabe por estudios anteriores que los extractos de yerba mate no presentan citotoxicidad alta (Müller et al., 2007; Lückemeyer et al., 2012). En nuestros experimentos, se observó que en las dosis ensayadas, ninguno de los extractos YF, YS e YC resultó tóxico. Todos ellos mostraron baja citotoxicidad obteniendo como resultado  $CC_{50}$  mayores a 2 mg/ml (Cuadro 2), en base a esto, utilizamos concentraciones menores en los ensayos de actividad antiviral para asegurarnos de que no sean tóxicos. Teniendo en cuenta estos resultados, se podrían realizar ensayos con concentraciones más altas de los extractos para determinar el número exacto de la  $CC_{50}$ .

Con respecto a la acción antiviral de los extractos de yerba mate, se ha reportado previamente que los extractos hechos a partir de las hojas de *Ilex paraguariensis* presentan un efecto inhibitorio contra el virus herpes. Los estudios de Müller et al. (2007) mostraron la actividad antiherpética de los extractos acuosos de yerba mate contra HSV-1 cepas KOS y 29-R realizados *in vitro* en células Vero. Por otra parte, Lückemeyer et al. (2012) evaluaron la actividad antiherpética de distintos extractos provenientes de hojas de yerba mate también efectivos contra HSV-1 cepa KOS.

En nuestros experimentos, al testear los extractos de yerba mate contra la cepa KOS utilizando dos multiplicidades de infección diferentes se pudo observar que los extractos YF e YC tuvieron una capacidad de inhibición alta para ambas multiplicidades de infección, mientras que el extracto YS inhibió a baja m.i pero no lo hizo al aumentar la cantidad de virus (Fig. 8 y 9). Se podría pensar que esta menor inhibición se debe al proceso de secado, sin embargo, YC al sufrir todo el procesamiento para la comercialización también está sujeto al secado y su capacidad inhibitoria es alta. Probablemente el proceso de secado realizado en nuestro laboratorio no sea igual al comercial ya que consta de más pasos. Además, no podemos descartar que en los extractos de YC estén presentes otros compuestos como agroquímicos que aumentan la inhibición, pese a ello, no lo podemos confirmar con los experimentos realizados. Habría que realizar un extracto con yerba orgánica libre de agroquímicos y comparar con el extracto hecho a partir de la marca comercial, si este fuera el caso.

Nuestros ensayos confirman lo previamente publicado por Müller et al. (2007) y Lückemeyer et al. (2012) donde los extractos de *Ilex paraguariensis* son capaces de inhibir a la cepa

KOS de HSV-1. La preparación de los extractos en los estudios mencionados y en este trabajo presentan algunas diferencias, sin embargo, al no haber identificado la composición fitoquímica de los mismos no podemos inferir qué moléculas están realizando el efecto inhibitorio. Se puede añadir que la cromatografía de capa fina realizada en Lückemeyer et al. (2012) identificó la presencia de Rutina, meta saponina-2, ácido cafeico y clorogénico en los extractos con una importante actividad antiherpética por lo que nuestros extractos podrían compartir las características de este perfil fitoquímico.

Posteriormente, cuando se evaluaron los extractos contra HSV-1 cepa B2006, una cepa resistente a aciclovir por tener una mutación en el gen de la timidina quinasa, se observó que los tres extractos presentaron inhibición del rendimiento viral, siendo YC el de mayor actividad y los otros dos tuvieron inhibiciones similares (Fig. 10 y cuadro 4). Este resultado comprueba que los extractos no solo son funcionales contra la cepa KOS sino que también tienen capacidad inhibitoria contra otras cepas como lo es la B2006, información que no había sido publicada previamente. Este resultado es importante si tenemos en cuenta que la cepa evaluada es resistente al aciclovir y por lo tanto los extractos podrían utilizarse en reemplazo o en combinación con este antiviral.

Por último, se evaluó la capacidad inhibitoria de los extractos de yerba mate frente a la infección con HSV-1 YK608, que como se mencionó anteriormente expresa la proteína del tegumento y la de la cápside asociadas a proteínas fluorescentes. Todos los extractos inhibieron la replicación de este virus, ya que, en todos los tratamientos el número de células fluorescentes fue menor que en el control viral (Fig. 11 y 12). Cabe destacar que hubo diferencias entre los tratamientos, YF presentó altos niveles de VP26 con respecto a VP22 que fue casi nula, esto indicaría una expresión diferencial de las proteínas. En cuanto al tratamiento con YS, tanto el número de células positivas como la intensidad de fluorescencia de VP26 y VP22 fueron similares. Por último, el tratamiento con YC redujo la expresión de VP22 en mayor proporción que VP26 (Fig. 12). Con este ensayo se logró confirmar el efecto inhibitorio de los extractos, pero no se pudo explicar la diferencia en la expresión de las proteínas virales, la que podría deberse a cómo se cuantificó la fluorescencia. Para obtener mayor información deberíamos realizar varias repeticiones del mismo experimento y hacer un análisis estadístico.

Con respecto al virus del Zika, como se mencionó anteriormente no hemos encontrado bibliografía que demuestre la actividad anti Zika de la yerba mate por lo que los resultados obtenidos son muy importantes y constituyen una base para futuras investigaciones.

Al probar los tres extractos contra el virus del Zika cepa INEVH116141 para dos m.i diferentes pudo observarse que los extractos YF e YC tuvieron una capacidad inhibitoria alta para ambas multiplicidades de infección. Por otro lado, el extracto YS inhibe a una baja m.i pero al aumentar la cantidad de virus se ve disminuida la capacidad inhibitoria del mismo (Fig. 13 y 14), manteniendo el efecto observado contra el virus herpes.

Los resultados muestran que los extractos obtenidos a partir de las hojas de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) tienen actividad antiviral contra HSV-1 y el virus del Zika corroborando las propiedades medicinales de la planta.

El presente trabajo de tesis establece un punto de partida en el cual aparecen múltiples alternativas para futuras investigaciones tanto básicas como aplicadas asociadas a la yerba mate. Por ejemplo, se podría hacer un reconocimiento de los compuestos y profundizar en los mecanismos de acción como también una optimización del extracto para maximizar su eficacia. A partir de esto podría pensarse la posibilidad del desarrollo de fitomedicamentos. En el caso del virus herpes que se demostró la efectividad con cepas resistentes podría desarrollarse una alternativa al aciclovir y para el virus del Zika podría significar el desarrollo de una posible terapia efectiva contra el virus. Como vemos hay un amplio espectro de posibilidades en las cuales se pueden seguir trabajando.

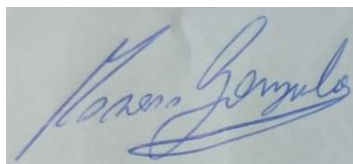


## Conclusión

Las plantas medicinales han desempeñado un papel esencial en la medicina, ofreciendo una gran variedad de compuestos bioactivos con potencial terapéutico. Desde tiempos ancestrales, diversas culturas han aprovechado las propiedades de estas plantas para tratar y prevenir enfermedades. Dentro de esta variedad se encuentra la yerba mate (*Ilex paraguariensis*) que normalmente se utiliza para consumo pero diversas investigaciones demostraron diferentes actividades biológicas asociadas a la planta, incluyendo actividad antiviral.

En el presente trabajo se estudió la actividad antiviral de distintos extractos de *Ilex paraguariensis* evaluando su eficacia contra virus de importancia sanitaria, como el HSV-1 y el virus del Zika. Los resultados de este estudio revelaron la actividad antiherpética de los tres extractos, evidenciando su capacidad de inhibición contra las cepas KOS e YK608 de HSV-1 demostrando incluso su eficacia contra la cepa B2006 que es resistente a aciclovir, un medicamento ampliamente utilizado para tratar este tipo de infecciones. Además, se demostró la actividad anti Zika de los extractos. Esto es de suma importancia, ya que, es un conocimiento que no se había registrado previamente en artículos científicos. Nuestro trabajo no solo confirma las propiedades antivirales de *Ilex paraguariensis*, sino que también resalta su capacidad para inhibir virus de distintas familias. Es importante mencionar también que abre la puerta a futuras investigaciones, señalando la posibilidad de desarrollar terapias destinadas a mitigar los síntomas causados por la infección del virus del Zika.

En resumen, los resultados obtenidos no solo respaldan la eficacia antiviral de los extractos de *Ilex paraguariensis* contra HSV-1, incluyendo cepas resistentes, sino que también revelan su potencial aplicación contra el virus del Zika, proporcionando así una base sólida para futuras investigaciones y desarrollos terapéuticos.



Gonzalo Moreno



Erina Petretera

## Referencias bibliográficas

Alché L.E., Barquero A.A., Sanjuan N.A. and Coto C.E. An antiviral principle present in a purified fraction from *Melia azedarach* L. leaf aqueous extract restrains Herpes simplex virus type 1 propagation. *Phytother. Res.* 2002, 16: 348-352.

Alché L.E., Berra A., Veloso M.J., Coto C.E. Treatment with meliacine, a plant derived antiviral, prevents the development of herpetic stromal keratitis in mice. *J. Med. Virol.* 2000, 61: 474-480.

Alché L.E., Ferek G.A., Meo M., Coto C.E., Maier M.S. An antiviral meliacarpin from leaves of *Melia azedarach* L. *Z Naturforsch C.* 2003 58: 215-219

Arturo Andrés Lizuain, Lucia Maffey, Maximiliano Garzón, Marina Leporace, Danny Soto, Paula Diaz, Oscar Daniel Salomón, María Soledad Santini, Nicolás Schweigmann, Larval Competition Between *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Argentina: Coexistence and Implications in the Distribution of the Asian Tiger Mosquito, *Journal of Medical Entomology*, Volume 59, Issue 5, September 2022, Pages 1636–1645, <https://doi.org/10.1093/jme/tjac102>

Banwo, Kolawole, Ayoyinka Olufunke Olojede, Adekemi Titilayo Adesulu-Dahunsi, Deepak Kumar Verma, Mamta Thakur, Soubhagya Tripathy, Smita Singh, et al. 2021. «Functional Importance of Bioactive Compounds of Foods with Potential Health Benefits: A Review on Recent Trends». *Food Bioscience* 43 (octubre): 101320. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101320>.

Barboza, G. E., Cantero J. J. , Núñez C., Pacciaroni A. & Ariza Espinar L. 2009. «Medicinal Plants: A General Review and a Phytochemical and Ethnopharmacological Screening of the Native Argentine Flora». *Kurtziana* [online]. vol.34, n.1-2. Disponible en:[http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1852-59622009000100002&lng=es](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1852-59622009000100002&lng=es).

Barquero A.A., Alché L.E., Coto C.E. Antiviral activity of meliacine on the replication of a thymidine kinase- deficient mutant of Herpes simplex virus type 1 alone and in combination with acyclovir. *Int. J. Antimicrob. Agents* 1997, 9: 49-55.

Barquero AA, Alché LE and Coto. CE Block of VSV endocytic and exocytic pathways by 1-cinnamoyl-3,11- dihydroxymeliacarpin, a tetranortriterpenoid of natural origin. *J. Gen. Virol.* 2004, 85: 483-493.

Betancur-Galvis L. A., Morales G. E., Forero J. E., & Roldan J. (2002). «Cytotoxic and Antiviral Activities of Colombian Medicinal Plant Extracts of the *Euphorbia* Genus». *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 97 (4): 541-46. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000400017>.

Bonica MB, Goenaga S, Martin ML, Feroci M, Luppo V, et al. (2019) . «Vector Competence of *Aedes Aegypti* for Different Strains of Zika Virus in Argentina». Editado por Paulo Pimenta. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 13 (6): e0007433. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007433>.

Bracesco N, Sanchez AG, ContrerasV, Menini T, Gugliucci A. "Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview." *Journal of ethnopharmacology* vol. 136,3 (2011): 378-84. doi:10.1016/j.jep.2010.06.032

Brezáni V, Leláková V, Hassan STS, Berchová-Bímová K, Nový P, Klouček P, Maršík P, Dall'Acqua S, Hošek J, Šmejkal K. Anti-Infectivity against Herpes Simplex Virus and Selected Microbes and Anti-Inflammatory Activities of Compounds Isolated from *Eucalyptus globulus* Labill. *Viruses*. 2018; 10(7):360. <https://doi.org/10.3390/v10070360>

Burris, Kellie P., P.M. Davidson, C. Neal Stewart, S. Zivanovic, y F.M. Harte. 2012. «Aqueous Extracts of Yerba Mate (*Ilex Paraguariensis*) as a Natural Antimicrobial against *Escherichia* Coll O157:H7 in a Microbiological Medium and pH 6.0 Apple Juice». *Journal of Food Protection* 75 (4): 753-57. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-214>.

Carlos Montalbetti, Alicia Zelada, Laura E. Alché, Ernestina Galdeano, Erina Petrera. "Inhibition of Herpes Simplex Virus replication by *Melia Azedarach* L Micropropagated Plantlet extracts". 7ma Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas. Santa Fe, noviembre de 2023.

Chiang L. C., Chiang W., Liu M. C., Lin C.C. "In vitro antiviral activities of *Caesalpinia pulcherrima* and its related flavonoids." *The Journal of antimicrobial chemotherapy* vol. 52,2 (2003): 194-8. doi:10.1093/jac/dkg291

Clain E, Haddad JG, Koishi AC, Sinigaglia L, Rachidi W, Desprès P, N. Duarte dos Santos C, Guiraud P, Jouvenet N, El Kalamouni C. The Polyphenol-Rich Extract from *Psiloxylon mauritanum*, an Endemic Medicinal Plant from Reunion Island, Inhibits the Early Stages of Dengue and Zika Virus Infection. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019; 20(8):1860. <https://doi.org/10.3390/ijms20081860>

Croge Camila Pereira, Francine Lorena Cuquel, y Paula Toshimi Matumoto Pinto. 2021. «Yerba Mate: Cultivation Systems, Processing and Chemical Composition. A Review». *Scientia Agricola* 78 (5): e20190259. <https://doi.org/10.1590/1678-992x-2019-0259>.

de Moraes, E. C., Stefanuto, A., Klein, G. A., Boaventura, B. C., de Andrade, F., Wazlawik, E., Di Pietro, P. F., Maraschin, M., & da Silva, E. L. (2009). Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(18), 8316–8324. <https://doi.org/10.1021/jf901660g>

Filip Rosana, Davicino Roberto, y Anesini Claudia. 2010. «Antifungal Activity of the Aqueous Extract of *Ilex Paraguariensis* against *Malassezia Furfur*: ACTIVITY OF *ILEX PARAGUARIENSIS* AGAINST *MALASSEZIA FURFUR*». *Phytotherapy Research* 24 (5): 715-19. <https://doi.org/10.1002/ptr.3004>.

Garcia-Lazaro, R. S., Lamdan, H., Caligiuri, L. G., Lorenzo, N., Berengeno, A. L., Ortega, H. H., Alonso, D. F., & Farina, H. G. (2020). In vitro and in vivo antitumor activity of Yerba Mate extract in colon cancer models. *Journal of food science*, 85(7), 2186–2197. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15169>

Hafidh, Rand R, Ahmed S Abdulmir, Fatimah Abu Bakar, Zamberi Sekawi, Fatemeh Jahansheri, y Farid Azizi Jalilian. 2015. «Novel Antiviral Activity of Mung Bean Sprouts against Respiratory Syncytial Virus and Herpes Simplex Virus –1: An *in Vitro* Study on Virally Infected Vero and MRC-5 Cell Lines». *BMC Complementary and Alternative Medicine* 15 (1): 179. <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0688-2>.

Hanna H. Schalkwijk, Robert Snoeck y Graciela Andrei. 2022. «Acyclovir Resistance in Herpes Simplex Viruses: Prevalence and Therapeutic Alternatives». *Biochemical Pharmacology* 206 (diciembre): 115322. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115322>.

Huang, Zhiwei, Yuxuan Zhang, Hongyu Li, Jiajie Zhu, Wanchen Song, Keda Chen, Yanjun Zhang, y Yongliang Lou. 2023. «Vaccine Development for Mosquito-Borne Viral Diseases». *Frontiers in Immunology* 14 (mayo): 1161149. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1161149>.

Instituto Nacional de la Yerba Mate (INYM) (enero de 2023). Yerba mate 2023. <https://inym.org.ar/noticias/estadisticas/80176-yerba-mate-en-2022-el-consumo-interno-y-las-exportaciones-superaron-los-316-millones-de-kilos.html>

Jamshidi-Kia, Fatemeh, Zahra Lorigooini, y Hossein Amini-Khoei. 2018. «Medicinal Plants: Past History and Future Perspective». *Journal of Herbmед Pharmacology* 7 (1): 1-7. <https://doi.org/10.15171/jhp.2018.01>.

Javed Farakh, Khanzadi N. Manzoor, Mubashar Ali, Irshad U. Haq, Abid A. Khan, Assad Zaib, y Sobia Manzoor. 2018. «Zika Virus: What We Need to Know?» *Journal of Basic Microbiology* 58 (1): 3-16. <https://doi.org/10.1002/jobm.201700398>.

Kelly Kate. 2009. *Early Civilizations: Prehistoric Times to 500 C.E.* The History of Medicine. New York, NY: Facts on File. p. 29-50.

Kim Sun-Young, Mi-Ra Oh, Min-Gul Kim, Han-Jeoung Chae, y Soo-Wan Chae. 2015. «Anti-Obesity Effects of Yerba Mate (*Ilex Paraguariensis*): A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial». *BMC Complementary and Alternative Medicine* 15 (1): 338. <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0859-1>.

Laporta, G. Z., Potter, A. M., Oliveira, J. F. A., Bourke, B. P., Pecor, D. B., & Linton, Y. M. (2023). Global Distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in a Climate Change Scenario of Regional Rivalry. *Insects*, 14(1), 49. <https://doi.org/10.3390/insects14010049>

Lückemeyer, D. D., Müller, V. D., Moritz, M. I., Stoco, P. H., Schenkel, E. P., Barardi, C. R., Reginatto, F. H., & Simões, C. M. (2012). Effects of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (yerba mate) on herpes simplex virus types 1 and 2 replication. *Phytotherapy research : PTR*, 26(4), 535–540. <https://doi.org/10.1002/ptr.3590>

Mohanty Swati Sucharita, Chita Ranjan Sahoo, Sudhir Kumar Paidesetty, y Rabindra Nath Padhy. 2023. «Role of Phytocompounds as the Potential Anti-Viral Agent: An Overview». *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 396 (10): 2311-29. <https://doi.org/10.1007/s00210-023-02517-2>.

Montalbetti CA, Galdeano E, Alché LE, Zelada A, Petrera E. "Actividad Antiviral de extractos de plantines de *Melia azedarach* L micropropagados *in vitro*". XIII Congreso Argentino de Virología 2021. Libro de resúmenes pag 54. ISBN 978-987-48458-0-1

Müller Vanessa, Juliana H. Chávez, Flávio H. Reginatto, Silvana M. Zucolotto, Rivaldo Niero, Dionezine Navarro, Rosendo A. Yunes, et al. 2007. «Evaluation of Antiviral Activity of South American Plant Extracts against Herpes Simplex Virus Type 1 and Rabies Virus». *Phytotherapy Research* 21 (10): 970-74. <https://doi.org/10.1002/ptr.2198>.

Musso Didier, y Duane J. Gubler. 2016. «Zika Virus». *Clinical Microbiology Reviews* 29 (3): 487-524. <https://doi.org/10.1128/CMR.00072-15>.

Organización Mundial de la Salud (Marzo de 2023). Virus del herpes simple 2023. [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus?gclid=Cj0KCQiA7OqrBhD9ARIsAK3UXh0HW\\_qAN2SZeLQjhI0dd19R4dnzdhhCsTszBPfXuXxETmCqPi\\_J9RAaArNoEALw\\_wcB](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus?gclid=Cj0KCQiA7OqrBhD9ARIsAK3UXh0HW_qAN2SZeLQjhI0dd19R4dnzdhhCsTszBPfXuXxETmCqPi_J9RAaArNoEALw_wcB)

Organización Mundial de la Salud (diciembre de 2022). Virus de Zika. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus>

Perera W. P. R. T., Janitha A. Liyanage, K. G. C. Dissanayake, Hiruni Gunathilaka, W. M. T. D. N. Weerakoon, D. N. Wanigasekara, W. S. K. Fernando, R. M. H. Rajapaksha, R. P. Liyanage, y Bingun T. Perera. 2021. «Antiviral Potential of Selected Medicinal Herbs and Their Isolated Natural Products». Editado por Hanchun Yang. *BioMed Research International* 2021 (diciembre): 1-18. <https://doi.org/10.1155/2021/7872406>.

Petrera E. Antiviral and immunomodulatory properties of Meliaceae family. *Journal of Biologically Active Products from Nature* 2015: 5: 241-254.

Petrera E., Coto C.E. Therapeutic effect of meliacine, an antiviral derived from *Melia azedarach* L., in mice genital herpetic infection. *Phytother. Res.* 2009, 23: 1771-1777.

Petrovska Biljana Bauer. 2012. «Historical Review of Medicinal Plants' Usage». *Pharmacognosy Reviews* 6 (11): 1. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.95849>.

Pielnaa Paul, Moyed Al-Saadawe, Adonira Saro, Marcellin Faniriantsoahenrio Dama, Mei Zhou, Yanxia Huang, Jufang Huang, y Zanzian Xia. 2020. «Zika Virus-Spread, Epidemiology, Genome, Transmission Cycle, Clinical Manifestation, Associated Challenges, Vaccine and Antiviral Drug Development». *Virology* 543 (abril): 34-42. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.01.015>.

Pifarré M.P., Berra A., Coto C.E., Alché L.E. Therapeutic action of meliacine, a plant-derived antiviral, on HSV-induced ocular disease in mice. *Exp. Eye Res.* 2002, 75: 327-334.

Pinto Vânia Zanella, Daniella Pilatti-Riccio, Edlaine Santos Da Costa, Yasmine Miguel Serafini Micheletto, Ernesto Quast, y Gustavo Henrique Fidelis Dos Santos. 2021. «Phytochemical Composition of Extracts from Yerba Mate Chimarrão». *SN Applied Sciences* 3 (3): 353. <https://doi.org/10.1007/s42452-021-04373-2>.

Plourde Anna R., Bloch Evan M.. 2016. «A Literature Review of Zika Virus». *Emerging Infectious Diseases* 22 (7): 1185-92. <https://doi.org/10.3201/eid2207.151990>.

Pullaiah, T. «Phytochemistry and Pharmacology of Medicinal Plants». volumen 1 (2023) pag 1-14

Sen Tuhinadri, Samanta Samir Kumar. 2014. «Medicinal Plants, Human Health and Biodiversity: A Broad Review». En *Biotechnological Applications of Biodiversity*, editado por Joydeep Mukherjee, 147:59-110. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/10\\_2014\\_273](https://doi.org/10.1007/10_2014_273).

Shara, Mohd, Sidney J Stohs. "Efficacy and Safety of White Willow Bark (Salix alba) Extracts." *Phytotherapy research : PTR* vol. 29,8 (2015): 1112-6. doi:10.1002/ptr.5377

Shetty Kalidas, Sarkar Dipayan, eds. 2020. *Functional Foods and Biotechnology: Sources of Functional Foods and Ingredients*. Food Biotechnology Series. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis Group.

Sofowora A, Ogunbodede E , Onayade A . 2013. «The Role and Place of Medicinal Plants in the Strategies for Disease Prevention». *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 10 (5): 210-29. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v10i5.2>.

Sugimoto, K., Uema, M., Sagara, H., Tanaka, M., Sata, T., Hashimoto, Y., & Kawaguchi, Y. (2008). Simultaneous tracking of capsid, tegument, and envelope protein localization in living cells infected with triply fluorescent herpes simplex virus 1. *Journal of virology*, 82(11), 5198–5211. <https://doi.org/10.1128/JVI.02681-07>

Zhang, J et al. *Zhongguo Zhong yao za zhi = Zhongguo zhongyao zazhi = China journal of Chinese materia medica* vol. 20,9 (1995): 556-8, 576, inside backcover.

Zhu Shuyong, Viejo-Borbolla Abel. 2021. «Pathogenesis and Virulence of Herpes Simplex Virus». *Virulence* 12 (1): 2670-2702. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1982373>.